



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE UNA ENDOGLUCANASA DEL HONGO *TRAMETES VERSICOLOR* EN *PICHIA PASTORIS*

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA MENCIÓN QUÍMICA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

MARCELA NATALIA VEGA MUÑOZ

PROFESOR GUÍA:

ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

BÁRBARA ANDREWS FARROW

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

RUBÉN POLANCO OTEÍZA

SANTIAGO DE CHILE

2014

RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL
TÍTULO DE: Ingeniero Civil en Biotecnología
y grado de Magíster en Ciencias de la
Ingeniería, mención Química
POR: Marcela Vega Muñoz
FECHA: 29/09/14
PROF. GUÍA: Oriana Salazar Aguirre

EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE UNA ENDOGLUCANASA DEL HONGO *TRAMETES VERSICOLOR* EN *PICHIA PASTORIS*

Existe una preocupación mundial por la disponibilidad de los combustibles fósiles para suplir la demanda de energía en el mundo, que aumenta año a año, y los problemas ambientales que su uso genera. Así, el bioetanol lignocelulósico ha surgido como una adecuada alternativa para reemplazar parcialmente la gasolina, pero todavía su costo no es competitivo con el petróleo o gasolina. El proceso de producción de bioetanol consta de tres etapas principales: pretratamiento, hidrólisis y fermentación. Específicamente, la hidrólisis es catalizada por celulasas y es una de las etapas con grandes proyecciones a disminuir su costo, por lo que este trabajo se enfoca en esta etapa, principalmente en el desarrollo de nuevas celulasas, que puedan aportar al desarrollo actual y a lograr reducir el costo de producción del bioetanol.

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar el gen que codifica para una endoglucanasa del hongo *Trametes versicolor* y expresar la enzima en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. A partir de dos fragmentos de la secuencia del gen, se obtuvo una secuencia con el dominio catalítico completo, llamada tveg. La secuencia se clonó en el vector pPICZaA y se transformó células de la cepa GS115 de *P. pastoris* para expresar la proteína en forma extracelular. Luego se realizó una curva de inducción y se estudió la expresión de la enzima en la fracción extracelular e intracelular. El análisis de la expresión se realizó mediante ensayos de actividad sobre carboximetilcelulosa (CMC) en medio sólido y en medio líquido, zimogramas y geles SDS-PAGE.

El análisis de tveg mediante BLASTX mostró, con un 90% de identidad, que corresponde a la secuencia de una endoglucanasa del hongo *T. versicolor*, perteneciente a la familia 5 de las glicosil hidrolasas. Los ensayos en medio sólido revelaron actividad enzimática en la cepa recombinante GS115, indicando que la expresión fue exitosa. Por otra parte, los ensayos en medio líquido de la cepa GS115-TvEG permitieron cuantificar la actividad de la endoglucanasa TvEG recombinante, produciendo 8,3 U/l de cultivo a las 84 horas de inducción con metanol, de las cuales un 50% se encontraba en la fracción extracelular y un 50% en la fracción citoplasmática. Los zimogramas corroboraron los resultados de los ensayos en medio líquido y en los geles SDS-PAGE se vio una proteína con un peso molecular aparente de 90 kDa, mucho mayor a los 30 kDa estimados para TvEG, posiblemente por hiperglicosilación y/o problemas de corte de la señal de secreción.

Por otro lado, se estudió la producción de celulasas nativas del hongo *T. versicolor* en Avicel, CMC y astillas de Lenga como fuente de carbono. Con CMC se logró mayor producción de actividad celulolítica, llegando a un máximo de 225 U/l a los 6 días de cultivo. La gran diferencia entre el sistema nativo y el sistema recombinante, y la comparación con otros estudios, indican que la expresión de TvEG debe y puede ser mejorada.

AGRADECIMIENTOS

Habiendo llegado al cierre de esta etapa, quiero agradecer a las distintas personas que han sido partícipe de ella y a quienes han permitido realizar este trabajo:

Primero que todo, agradecer a mis padres por ser un tremendo ejemplo, por todas sus enseñanzas, su apoyo incondicional, amor y paciencia. A mi hermano, por todas las eternas reflexiones y también por su ayuda. Al Mamito, por su cuidado, constante preocupación y cariño. Y a toda mi familia, que siempre han estado para apoyarme.

A mi profe guía Oriana Salazar, por su tiempo, dedicación y sobre todo por su comprensión durante el tiempo que llevó el término de este trabajo.

A mis buenos amigos Ale, Jano, Sergio, Chicho, Panky, Maurice, Mary, Titi, Paola y Pau y otros, por su compañía y hacer de esta una etapa maravillosa, llena de lindos (y no tan lindos) recuerdos. Especialmente, a Sergio por su ayuda en el laboratorio y a Jano por encontrar la pieza clave de esta tesis.

A las niñas y niños del volei, Javi K., Sofi, Javi B., Pili, Eileen, Clau, Cami, Nico P., Nico S., Manacho, Rolo y al equipo en general, por compartir el amor por este deporte y darle a mi vida universitaria más diversión y valor.

A Christian Wilson, por todo el conocimiento y ayuda que me ha entregado en mi desarrollo académico, además de diferentes aportes a este trabajo.

A Gina, por la gran ayuda, disponibilidad y guía que me entregó en todo lo que necesité.

Al Programa Domeyko (Optimización del Proceso de Tratamiento de Lignocelulosas para obtener Bioetanol) y el Proyecto de Investigación Conjunta en Energías Renovables no Convencionales Chile/Finlandia (Procesos óptimos para el tratamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol), gracias a los que se realizó este trabajo.

Por último, especialmente a Rodrigo, que con todo su amor me ha dado enorme apoyo, empuje y contención para poder cerrar esta etapa.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS	ii
TABLA DE CONTENIDO	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS.....	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.MARCO TEÓRICO	1
1.1.1. ANTECEDENTES	1
1.1.2. EL BIOETANOL.....	2
1.1.2.1. MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.....	2
1.1.2.2. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL BIOETANOL.....	3
1.1.2.3. VENTAJAS DEL BIOETANOL LIGNOCELULÓSICO.....	4
1.1.2.4. ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	4
1.1.3. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL LIGNOCELULÓSICO	6
1.1.3.1. PRETRATAMIENTO.....	6
1.1.3.2. HIDRÓLISIS	7
1.1.3.3. FERMENTACIÓN	8
1.1.3.4. CONFIGURACIÓN DEL PROCESO PRODUCTIVO	9
1.1.4. LAS CELULASAS	10
1.1.4.1. HIDRÓLISIS DE CELULOSA.....	10
1.1.4.2. ESTRUCTURA DE LAS CELULASAS	11
1.1.4.3. PRODUCCIÓN DE CELULASAS.....	11
1.1.4.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CELULASAS EN HONGOS.....	12
1.1.4.5. CLASIFICACIÓN DE LAS CELULASAS.....	13
1.1.4.6. DOMINIOS CONSERVADOS.....	13
1.1.5. SISTEMAS DE EXPRESIÓN RECOMBINANTE	14
1.1.6. JUSTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	15
1.2.OBJETIVOS	17
1.2.1. OBJETIVO GENERAL	17
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1. MATERIALES.....	18
2.1.1. REACTIVOS	18
2.1.2. EQUIPOS	18
2.1.3. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	19

2.1.4. VECTORES	19
2.1.4.1. VECTOR DE CLONAMIENTO	19
2.1.4.2. VECTOR DE EXPRESIÓN	20
2.1.5. HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES	20
2.1.6. SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS.....	20
2.2. MÉTODOS	21
2.2.1. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS CBD2_A Y F5H106	21
2.2.2. GENERACIÓN DE LA SECUENCIA TVEG	21
2.2.2.1. DIGESTIÓN DE LOS FRAGMENTOS CBD2_A Y F5H106 CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	22
2.2.2.2. LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTOS CBD2_A Y F5H106.....	22
2.2.2.3. DISEÑO DE PARTIDORES.....	22
2.2.2.4. AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA TVEG POR PCR.....	23
2.2.3. CLONAMIENTO DE LA SECUENCIA TVEG PARA SU SECUENCIACIÓN	23
2.2.4. GENERACIÓN DEL CONSTRUCTO PPICZ α A-TVEG	23
2.2.4.1. PROPAGACIÓN DEL PLASMIDIO PPICZ α A.....	24
2.2.4.2. DIGESTIÓN DEL PLASMIDIO Y DEL INSERTO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	24
2.2.4.3. CLONAMIENTO DE LA SECUENCIA EG_F5H106 EN EL VECTOR PPICZ α A	24
2.2.5. PROPAGACIÓN DEL CONSTRUCTO PPICZ α A-TVEG EN <i>E. COLI</i>	25
2.2.6. LINEALIZACIÓN DEL CONSTRUCTO PPICZ α A- TVEG.....	25
2.2.7. TRANSFORMACIÓN EN <i>P. PASTORIS</i>	25
2.2.8. EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LA ENZIMA TVEG EN <i>P. PASTORIS</i>	26
2.2.8.1. MEDIOS DE CULTIVO E INDUCCIÓN	26
2.2.8.2. CURVA DE INDUCCIÓN	26
2.2.9. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DURANTE LA CURVA DE INDUCCIÓN.....	27
2.2.9.1. ENSAYO EN GEL AGAROSA-CMC	27
2.2.9.2. HIDRÓLISIS DE CMC.....	28
2.2.9.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SDS-PAGE.....	28
2.2.9.4. ZIMOGRAMAS CMC	29
2.2.10. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE GLICOSIL HIDROLASAS DEL HONGO <i>T. VERSICOLOR</i>	29
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.1. ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS CB2_A Y F5H106.....	31
3.2. GENERACIÓN DE LA SECUENCIA TVEG	32
3.2.1. DIGESTIÓN DE LOS FRAGMENTOS CBD2_A Y F5H106 CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	33
3.2.2. PCR PARA LA OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA TVEG.....	34
3.2.3. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA TVEG	35
3.3. CLONAMIENTO DE LA SECUENCIA TVEG Y TRANSFORMACIÓN DE <i>P. PASTORIS</i>	37
3.4.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD EN GEL DE AGAROSA-CMC	39
3.4.2. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN MEDIO LÍQUIDO.....	40
3.4.2.1. EXPRESIÓN EN LAS FRACCIONES INTRA Y EXTRACELULAR.....	40
3.4.2.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TOTAL	44
3.4.3. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LA EXPRESIÓN DE TVEG EN <i>P. PASTORIS</i>	46
3.4.3.1. EXPRESIÓN EXTRACELULAR EN LA CEPA GS115	46

3.4.3.2. EXPRESIÓN INTRACELULAR EN LA CEPA GS115	48
3.5. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE GLICOSIL HIDROLASAS DEL HONGO <i>T. VERSICOLOR</i>	51
3.5.1. PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO	51
3.5.2. COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA NATIVA EN <i>T. VERSICOLOR</i> Y RECOMBINANTE EN <i>P. PASTORIS</i>	54
3.6. DISCUSIÓN FINAL	54
4. CONCLUSIONES	57
5. RECOMENDACIONES	58
6. BIBLIOGRAFÍA	59
7. ANEXOS	66
7.1. METODOLOGÍA ADICIONAL	66
7.1.1. MEDIOS DE CULTIVO	66
7.1.1.1. MEDIOS LÍQUIDOS	66
7.1.1.2. MEDIOS SÓLIDOS	66
7.1.2. SOLUCIONES	66
7.1.3. CLONAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA AL VECTOR PGEM®-T EASY	67
7.1.4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS <i>E. COLI</i> DH5 α	67
7.1.5. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMIDIAL DESDE <i>E. COLI</i> DH5 α	67
7.1.6. PURIFICACIÓN DE DNA DESDE GELES DE AGAROSA	67
7.1.7. VERIFICACIÓN DE INSERCIÓN DEL INSERTO	68
7.1.8. SECUENCIA DE PARTIDORES UTILIZADOS PARA SECUENCIAR	68
7.1.9. LISIS CELULAR DE LEVADURAS	68
7.1.10. ENSAYOS DE ACTIVIDAD EN GELES DE AGAROSA-CMC	68
7.1.11. ENSAYO DE HIDRÓLISIS DE CMC	68
7.1.12. CURVA DE CALIBRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	69
7.1.13. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	69
7.1.14. ZIMOGRAMA	70
7.2. RESULTADOS ADICIONALES	71
7.2.1. MAPAS DE RESTRICCIÓN	71
7.2.2. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA TVEG	73
7.2.3. SECUENCIA AMINOACÍDICA TVEG	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Avances en la configuración del proceso productivo de bioetanol lignocelulósico	9
Figura 1.2. Mecanismo de las celulasas para la degradación de celulosa.....	11
Figura 2.1. Vector pGem®-T Easy y sus puntos de referencia.....	19
Figura 2.2. Vector pPICZ α y sus puntos de referencia relevantes	20
Figura 3.1. Alineamiento de los fragmentos CBD2_A y f5h106 con la secuencia de mayor semejanza.....	32
Figura 3.2. Estrategia para obtener la secuencia tveg.....	32
Figura 3.3. Digestión doble de las secuencias CBD2_A y f5h106	33
Figura 3.4. PCR para la amplificación de la secuencia tveg.....	34
Figura 3.5. Resultados de la comparación de dominios conservados utilizando la herramienta CDC, para la secuencia TvEG.....	35
Figura 3.6. Alineamiento de la secuencia TvEG con otras endoglucanasas.....	36
Figura 3.7. Secuencia tveg clonada en pPICZ α A.....	38
Figura 3.8. Ensayo de actividad endoglucanasa sobre agar-CMC de las enzimas extracelulares producidas por la cepa GS115.....	39
Figura 3.9. Curva de actividad endoglucanasa sobre CMC en las fracciones extracelular e intracelular de cultivos de la cepa GS115 recombinante y control, a distintos tiempos de inducción con metanol.....	41
Figura 3.10. Cinética de producción total de endoglucanasa en la cepa GS115 a distintos tiempos de inducción con metanol.....	44
Figura 3.11. Análisis electroforético de la fracción extracelular de cultivos de las cepas GS115 control y recombinante, a distintos tiempos de inducción	47
Figura 3.12. Análisis electroforético de la fracción intracelular de cultivos de las cepas GS115 control y recombinante, a distintos tiempos de inducción.	49
Figura 3.13. Cinética de producción de actividad celulolítica en <i>T. versicolor</i> cultivado en Avicel como fuente de carbono.....	52
Figura 3.14. Cinética de producción de actividad celulolítica en <i>T. versicolor</i> cultivado en CMC como fuente de carbono.....	52
Figura 3.15. Cinética de producción de actividad celulolítica en <i>T. versicolor</i> cultivado en astillas de Lenga como fuente de carbono	53
Figura 7.1. Curva de calibración de azúcares reductores.....	69
Figura 7.2. Mapa de restricción del fragmento f5h106.....	71
Figura 7.3. Mapa de restricción del fragmento CBD2_A	72
Figura 7.4. Mapa de restricción de la secuencia tveg.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos de agricultura y desechos.....	5
Tabla 1.2. Comparación de diferentes pretratamientos.....	7
Tabla 2.1. Lista de reactivos.....	18
Tabla 2.2. Equipos de laboratorio utilizados.....	18
Tabla 2.3. Enzimas de restricción.....	19
Tabla 2.4. Herramientas bioinformáticas utilizadas.....	20
Tabla 2.5. Partidores para el clonamiento de tveg en pPICZ α A.....	23
Tabla 3.1. Significancia estadística de los resultados de actividad enzimática en las porciones extra e intracelular de la cepa GS115.....	42
Tabla 3.2. Distribución de la actividad de TvEG en el medio intracelular y extracelular de GS115....	43
Tabla 7.1. Partidores utilizados para la secuenciación.....	68
Tabla 7.2. Composición del gel de resolución.....	69
Tabla 7.3. Composición del gel concentrador.....	70

ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
Amp	Ampicilina
BMGY	Medio complejo con glicerol amortiguado
BMMY	Medio complejo con metanol amortiguado
CDD	Conserved Domain Database
cDNA	DNA complementario
CMC	Carboximetil celulosa
DNS	Ácido dinitrosalicílico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
LB	Luria Bertani
MGYH	Medio mínimo con glicerol e histidina.
MMH	Medio mínimo con metanol e histidina.
NaAc	Acetato de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa
RNA	Ácido Ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MARCO TEÓRICO

1.1.1. ANTECEDENTES

En el último tiempo ha existido un gran interés por el desarrollo de energías a partir de fuentes renovables. Las razones de ello son principalmente dos: preocupación por la disponibilidad y dependencia de las principales fuentes de energía actuales; y los problemas de contaminación medioambiental que su uso conlleva, como el efecto invernadero y el calentamiento global que produce [1].

La calidad de vida de la población y el desarrollo de los países tiene directa relación con el uso de energía [2]. A partir de la revolución industrial el consumo mundial de energía ha aumentado significativamente, alcanzando un 2,2% anual, y se prevé que permanecerá así durante los siguientes 25 años [3,4].

El consumo de energía mundial en el 2008 fue de 514 EJⁱ, donde aproximadamente el 80% proviene de combustibles fósiles (principalmente petróleo); además se han realizado diversos estudios para estimar el consumo mundial en el 2030, 2050, e incluso 2100 y, a pesar de las diferencias entre ellos, la mayoría concuerda en que para el 2030 se requerirán 600-800 EJ y que para el 2050 el consumo será cercano a los 1000 EJ [4].

Resulta muy difícil que los combustibles fósiles puedan satisfacer esta demanda y continuar siendo el principal sustento de energía, puesto que, por ser fuentes no renovables de energía, se ha determinado que las reservas de petróleo de fácil extracción, gas e incluso carbón, tendrán un *peak* en el 2030 [4,6]. Esto no solo se deberá al agotamiento geológico de la fuente, sino también a la inestabilidad económica de los países proveedores o sus políticas nacionales respecto a este producto, pues podrían restringir el suministro para ganar influencia política o extender la vida de sus reservas para proporcionar ingresos futuros por exportación o para su propio consumo [4].

Debido a la alta dependencia de los combustibles fósiles descrita anteriormente, cualquier problema con la disponibilidad de ellos podría tener graves consecuencias en el desarrollo de los países [1].

Además, los combustibles fósiles emiten diversos gases de efecto invernadero y se estima que son responsables de un 73% de las emisiones de CO₂, generando diversos problemas ambientales, por lo que es imperativo disminuir estas emisiones [7].

ⁱ 1 EJ = exajoule = 10¹⁸ Joule

Por las razones mencionadas anteriormente es que durante los últimos 30 años se han estudiado diferentes tipos de energías renovables, como la energía solar, eólica, geotérmica, hidrotérmica y los biocombustibles [7]. El principal problema con estas energías, con la excepción de los biocombustibles, es que sólo pueden generar energía en forma eléctrica y térmica, pero el 40% del consumo total de energía en el mundo es en forma de combustibles líquidos, como petróleo o gasolina [8]; de hecho, el petróleo cubre actualmente un 97% de la energía usada en transporte [9]. Por lo tanto, remplazar a los combustibles fósiles con los biocombustibles es una de las opciones más prácticas, pues en su mayoría se presentan en forma líquida.

Chile no es ajeno a esta realidad, pues también es un país altamente dependiente de energías no renovables. En efecto, se importa el 72% de la energía que se consume a nivel nacional [10,11]. Por lo anterior, ha surgido la necesidad de buscar alternativas, para lo que hay diversas entidades gubernamentales y privadas trabajando en ello [11]. Incluso, en materia legislativa, el Decreto supremo N°11/2008 autoriza la mezcla de bioetanol hasta un 5% con gasolina [12,13].

1.1.2. EL BIOETANOL

El bioetanol es un biocombustible líquido que puede ser producido a partir de diferentes materias primas y procesos. Representa una buena alternativa porque es una fuente renovable y es oxigenado, lo que le confiere potencial para disminuir las emisiones contaminantes en máquinas de compresión-ignición y es fácil de implementar su uso en vehículos de combustión interna [7,14].

De todos los biocombustibles, es el más producido a nivel mundial. En el año 2006, la producción global de bioetanol alcanzó 13,5 billones de galones y en el 2008 su producción correspondió a más del 94% de la producción global de biocombustibles, con la mayor parte proveniente de caña de azúcar [7].

La mezcla más usada es el llamado E10, que corresponde a 10% etanol y 90% gasolina, pero es posible llegar a usar mezclas con 85-95% de etanol (E85-E95) en vehículos flexibles en cuanto a combustible. El potencial mundial de producción de bioetanol podría reemplazar 353 billones de litros de gasolina (32% del consumo global de gasolina), cuando el bioetanol se use en E85 [7].

1.1.2.1. MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

El bioetanol se produce a partir de materia biológica que contiene una cantidad suficiente de azúcares de cadenas cortas, o sustancias que puedan ser transformadas en estos azúcares, como almidón o celulosa. Esta materia prima es clasificada de diferentes formas por los distintos autores, pero de acuerdo a su composición se puede clasificar en los siguientes tres tipos [15]:

- (i) Materia que contiene sacarosa, como remolacha azucarera y caña de azúcar.
- (ii) Materia que contiene almidón, como el trigo, el maíz y la cebada.
- (iii) Biomasa lignocelulósica, como madera, hierbas, desechos agrícolas, residuos forestales, etc.

El 90% del etanol producido mundialmente proviene de la caña de azúcar y del maíz, cuyos principales productores son Brasil y Estados Unidos, respectivamente, los que en conjunto producen el 70% del bioetanol mundial [14].

Brasil basa su producción en la caña de azúcar y se usa pura o mezclada con gasolina en una mezcla llamada gasohol (24% bioetanol y 76% gasolina). Estados Unidos usa maíz para su producción y en muchos estados se añade un 10% de bioetanol a la gasolina, conocido como gasohol o E10 [7].

El bioetanol producido a partir de materias primas como la caña de azúcar y el maíz es llamado bioetanol de primera de generación. Su producción está bien desarrollada, logrando un bajo costo, sin embargo, tiene sus limitaciones, ya que estos cultivos poseen un alto valor alimenticio, compitiendo con áreas cultivables dedicadas a ello. Por lo tanto, ningún país con una economía basada en la agricultura usaría esta tecnología; además el rendimiento de azúcar por hectárea es bastante bajo comparado con la biomasa lignocelulósica [16].

Por otro lado, el bioetanol producido a partir de biomasa lignocelulósica, llamado bioetanol de segunda generación, tiene un futuro prometedor, ya que existe un gran espacio para su desarrollo: se puede emplear una amplia variedad de cultivos que pueden ser convertidos a etanol y aprovechando las herramientas que nos entrega la biotecnología es posible alcanzar grandes escalas y bajos costos [8]. Además, esta materia prima es muy abundante en la Tierra, siendo posible producir más de 442 billones de litros de bioetanol al año [15]. Sin embargo, el precio del etanol a partir de esta materia prima no es competitivo con otros biocombustibles, pero se debería lograr que lo sea en el corto plazo [17].

Particularmente en Chile la producción de bioetanol de primera generación tiene poca proyección pues las tierras disponibles para los cultivos necesarios no lograrían suplir ni siquiera el 2% de la demanda nacional [17]; en contraste, Chile posee una gran industria forestal cuyos desechos pueden ser utilizados en la producción de bioetanol de segunda generación [11].

1.1.2.2. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL BIOETANOL

La principal ventaja del bioetanol sobre la gasolina o el petróleo es que corresponde a una fuente de energía renovable, haciendo que la disponibilidad sea mucho mayor y disminuye las emisiones de gases contaminantes. El etanol posee 35% de oxígeno, lo que mejora eficiencia de la combustión,

reduciendo la emisión de hidrocarburos, como monóxido de carbonos, y las emisiones de NO_x [1,15].

Además, tienen otras características ventajosas, como que posee un alto número de octanos, mayor rapidez en la formación de llama y mayor calor de vaporización que la gasolina, lo que impide su autoignición. Estas propiedades permiten tiempos de quemado más cortos y mayor eficiencia teórica sobre la gasolina en un motor de combustión interna [15].

Entre las desventajas del bioetanol respecto de la gasolina están que posee menor energía (tiene un 66% de la energía que posee la gasolina), mayor corrosividad, menor presión de vapor (lo que hace más difícil encender los motores si están muy fríos) y mayor miscibilidad con agua [15].

1.1.2.3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL BIOETANOL LIGNOCELULÓSICO

Comparando el bioetanol de caña de azúcar o maíz con el bioetanol lignocelulósico, el segundo posee ventajas de gran relevancia sobre el primero. El bioetanol de primera generación se produce a partir de cultivos que se usan como alimentos, generando una competencia económica, lo que conlleva a un aumento en el precio de dichos productos alimenticios y además requiere de grandes extensiones de suelos. Esto ha llevado a la necesidad de destruir bosques tropicales para poder cultivar en sus suelos, perdiéndose la biodiversidad de esos lugares [7]. En cambio, el bioetanol lignocelulósico puede ser producido a partir de desechos forestales, evitando el problema de competencia con suelos para cultivo agrícolas y la destrucción de los bosques tropicales que ocurren con el bioetanol de primera generación [15].

La mayor desventaja del bioetanol lignocelulósico es que todavía no alcanza un valor competitivo con los combustibles fósiles y tampoco con el bioetanol de primera generación. Esto se debe a que, llegar a etanol desde materia lignocelulósica es más complejo que desde remolacha o caña de azúcar. El valor del bioetanol de caña de azúcar es de 0,2-0,5 US\$/l de bioetanol, mientras que el de materia lignocelulósica es de 0,8-1,1 US\$/l [18].

1.1.2.4. ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La biomasa lignocelulósica es el recurso renovable más abundante en la Tierra. Está compuesta básicamente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina.

Celulosa

La celulosa comprende aproximadamente del 40 al 60% de la madera seca. Es un homopolisacárido con alta cristalinidad compuesto de unidades de β-D-glucopiranosas unidas entre sí por enlaces glicosídicos (1-4). La unidad de repetición básica del polímero de celulosa consiste en dos unidades

de anhídrido de glucosa, llamada unidades de celobiosa. El anhidro de glucosa se polimeriza en largas cadenas de celulosa que contienen 5000 a 10000 unidades de glucosa [4]. Como último producto de la hidrólisis de celulosa se obtiene glucosa, un azúcar de seis carbonos (hexosa).

Hemicelulosa

La hemicelulosa (o poliosa) es el segundo constituyente más importante de la madera, que generalmente representa del 25 al 35% de la masa de la madera seca. En cuanto a su composición, es una mezcla de varios monosacáridos polimerizados, como glucosa, manosa, galactosa, xilosa, arabinosa, ácido glucurónico y residuos de ácido galacturónico [4]. Tiene una estructura amorfa, por lo que es relativamente fácil de hidrolizar que la celulosa [16,17]. Su hidrólisis da origen principalmente a xilosa, un azúcar de cinco carbonos (pentosa).

Lignina

La lignina está presente en un 10 a 25% en la masa lignocelulósica. Es un polímero largo y complejo de fenilpropano y grupos metoxi, una sustancia polifenólica que une las células. Este complejo y las ligninas solas son a menudo bastante resistentes a la conversión por sistemas microbianos y muchos agentes químicos, sólo pueden ser degradadas por unos pocos organismos.

La combinación de hemicelulosa y lignina envuelven a la celulosa protegiéndola, por lo que primero es necesario remover esta capa para hidrolizar la celulosa [1719].

En la Tabla 1.1 se muestra la composición de diversas materias lignocelulósicas.

Tabla 1.1. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos de agricultura y desechos [19].

Material lignocelulósico	Celulosa [%]	Hemicelulosa [%]	Lignina [%]
Tallos de madera dura	40-55	24-40	18-25
Tallos de madera blanda	45-50	25-35	25-35
Cáscaras de nueces	25-30	25-30	30-40
Mazorcas de maíz	45	35	15
Pastos	25-40	35-50	10-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	20	20
Pelo de semillas de algodón	80-95	5-20	0
Papel de diario	40-55	25-40	18-30
Papel de desecho de pulpas químicas	60-70	10-20	5-10
Sólidos primarios de aguas de desecho	8-15	N/D	24-29
Estiércol sólido de ganado	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7
Hierbas	45	31,4	12

N/D: No disponible.

1.1.3. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL LIGNOCELULÓSICO

La producción de bioetanol a partir de materia lignocelulósica es más compleja que a partir de almidón o de caña de azúcar. Sin embargo, el procesamiento a partir de este material presenta la posibilidad de producir coproductos de valor agregado además del combustible bioetanol [15].

Dado que la materia prima puede representar más del 40% del costo de todo el proceso, un proceso económico de bioetanol a partir de biomasa depende críticamente de la rápida y eficiente conversión de todos los azúcares presentes [12].

Para obtener bioetanol a partir de material lignocelulósica, son necesarias tres etapas principales: pretratamiento, hidrólisis y fermentación, las que se describen a continuación.

1.1.3.1. PRETRATAMIENTO

Debido a la gran cristalinidad y resistencia de la materia lignocelulósica, la hidrólisis de esta materia presentada en forma natural tiene un rendimiento menor al 20%. Por ello se hace necesario incluir el pretratamiento, etapa cuyo objetivo es alterar esta estructura de la biomasa, rompiendo la matriz de lignocelulosa para hacerla más accesible a la acción de las celulasas. Con esto se mejora el rendimiento de la hidrólisis enzimática y se aumenta el rendimiento de los azúcares fermentables, lográndose un rendimiento mayor a un 90% [9].

En esta etapa ocurre la hidrólisis de la hemicelulosa y se modifica la estructura de la celulosa. Los productos que se obtienen son azúcares solubles, principalmente xilosa y en menor proporción manosa, arabinosa y galactosa; y sólidos insolubles como la celulosa y la lignina. Esta mezcla es filtrada y prensada, para que posteriormente los sólidos pasen a la etapa de hidrólisis y los líquidos a fermentación [9].

No existe un pretratamiento ideal, pues su efectividad varía según el tipo de materia prima que se use, por lo que se han estudiado diversos tipos de pretratamientos, los que se pueden clasificar como químicos, físicos, biológicos o una mezcla de ellos [20,21].

Los pretratamientos físicos son básicamente dos: la conminución mecánica y la pirolisis. Entre los pretratamientos químicos existe mayor diversidad, entre los que se encuentran ozonolisis, pretratamiento ácido, que puede ser concentrado o diluido, pretratamiento alcalino, delignificación oxidativa y proceso de organosolv. Los pretratamientos fisicoquímicos son la explosión de vapor, la explosión de fibra de amonio y la explosión de CO₂. Por último, el pretratamiento biológico es básicamente uno, la única variante es el microorganismo que se use para romper la lignina [20,21].

En la actualidad el método más usado es el proceso químico en que se usa ácido sulfúrico diluido, ya que se obtienen altos rendimientos. En la Tabla 1.2 se describen brevemente algunos pretratamientos [9].

Tabla 1.2. Comparación de diferentes pretratamientos [9].

Pretratamiento	Químicos	Temperatura/ Presión	Tiempo de reacción	Rendimiento de xilosa	Eficiencia de la hidrólisis enzimática posterior
Ácido diluido	Ácido	>160 °C	2 - 10 min	75-90%	< 85%
Alcalino	Base			60-75%	55%
Explosión de vapor sin catalizador	-	160 - 260 °C	2 min	45-65%	90%
Explosión de vapor catalizada con ácido	Ácido	160-220°C			88% (dos etapas)
Agua caliente líquida	Ninguno	190 - 230 °C p > p _{sat}	45 s - 4min	88-98%	> 90%
Explosión de fibra de amonio	Amonio	90 °C	30 min		50-90% (dos etapas)
Explosión de CO ₂	CO ₂	56,2 bar			75% (dos etapas)

1.1.3.2. HIDRÓLISIS

En la hidrólisis, también conocida como sacarificación, la celulosa es convertida en glucosa. A pesar de que en el pretratamiento ocurre la hidrólisis de la hemicelulosa, se considera que la hidrólisis principal corresponde a la de la celulosa [9].

Existen dos formas de realizar la hidrólisis: la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática. La primera es la que más se usa; ha sido bastante estudiada y ya quedan pocas opciones de perfeccionamiento, dejando lugar para el desarrollo de la hidrólisis enzimática [15].

La hidrólisis ácida se puede llevar a cabo con ácido concentrado o diluido y generalmente se usa ácido sulfúrico o clorhídrico. Ambas tienen un alto rendimiento, pero el uso de ácido requiere de reactores robustos debido a la corrosión que produce, lo que incrementa el costo de capital; además, el ácido no se puede recuperar en su totalidad, generando problemas de manejo de residuos peligrosos, afectando el medioambiente [15]. Y se generan compuestos que inhiben las siguientes etapas.

Por otro lado, la hidrólisis enzimática requiere de un conjunto de enzimas, entre ellas las llamadas celulasas para romper la celulosa en vez de ácido, por lo que es mucho menos nociva para el medio ambiente y las condiciones de operación de la hidrólisis enzimática son mucho más suaves (pH 4,8 y temperatura de 45-50 °C) [54]. El problema de la hidrólisis enzimática es que las celulasas son

bastante costosas, incrementando el costo de producción del etanol; pero por otra parte, al no requerir alto gasto en reactores, los costos de capital son menores. Sumado a ello, se tiene que el potencial de ser mejorada es enorme, pudiendo alcanzar costos y rendimientos similares a la hidrólisis ácida [9,15].

Después del pretratamiento, la hidrólisis es uno de los factores más influyentes en el costo del bioetanol, aportando US\$0,04/l de bioetanol al precio final de éste. El valor de esta etapa está determinado por los costos de producción de las enzimas y la cantidad de enzimas a usar. Debido a lo anterior, reducir los costos de esta etapa es crucial para reducir el costo total del bioetanol [8,19]. De hecho, los avances tecnológicos han logrado reducir el costo de las enzimas unas 20 veces, alcanzando los 15–20 centavos/galón y se proyecta que todavía puede disminuirse a menos de 0,1 centavos/galón [1,16,22].

Dentro de los factores que afectan la hidrólisis enzimática se incluyen el sustrato, la actividad enzimática y las condiciones de reacción (pH, temperatura entre otros parámetros); de ellos, el foco de investigación ha sido la optimización del proceso de hidrólisis y mejorar la producción y actividad de las celulasas [17,21].

1.1.3.3. FERMENTACIÓN

La fermentación implica la transformación de pentosas y hexosas en etanol y se puede llevar a cabo mediante proceso en lote, proceso por lotes alimentado o un proceso continuo [1].

Existe una gran variedad de microorganismos que pueden realizar esta operación, entre los que se encuentran bacterias, levaduras y hongos. De ellos, las bacterias han tenido mayor atención debido a la rapidez con la que pueden realizar la fermentación, pues generalmente les toma tan solo algunos minutos, mientras que a las levaduras les toma horas [15].

La mayor limitación de la fermentación es que no hay microorganismos capaces de fermentar pentosas y hexosas en forma simultánea, sino que sólo pueden fermentar una de ellas, lo que implica realizar dos operaciones en forma paralela [9].

Una de las levaduras más efectivas en la producción de bioetanol es *Saccharomyce cerevisiae*, que tiene varias ventajas debido a su alta producción de bioetanol a partir de hexosas y su alta tolerancia al bioetanol y a otros componentes inhibidores provenientes de la hidrólisis ácida. Sin embargo, como se explicó anteriormente, las cepas nativas de este microorganismo no pueden fermentar pentosas, como xilosa, arabinosa, etc. [15,23].

1.1.3.4. CONFIGURACIÓN DEL PROCESO PRODUCTIVO

Los costos de capital también son relevantes respecto del costo total del proceso y se pueden disminuir con mejoras que impliquen eliminar alguna de sus etapas, simplificar operaciones, aumentar las tasas de reacción y reducir los requerimientos de energía e insumos químicos [1].

Inicialmente, la sacarificación y la fermentación se hacían por separado (SHF: *Separate Hydrolysis and Fermentation*), con el tiempo el sistema evolucionó hasta que estas dos etapas se unieron en un solo reactor, proceso denominado SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*). La ventaja del proceso SSF es que evita la inhibición enzimática por glucosa y que se reducen los costos de capital, pues se reduce el número de reactores a usar [1,9].

Una nueva mejora al proceso consiste en además de realizar la hidrólisis y la fermentación en forma simultánea, cofermentar las hexosas y pentosas, el que es llamado SSCF (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*), para lo que es necesario un microorganismo modificado genéticamente para que pueda consumir azúcares pentosas y hexosas [1,9].

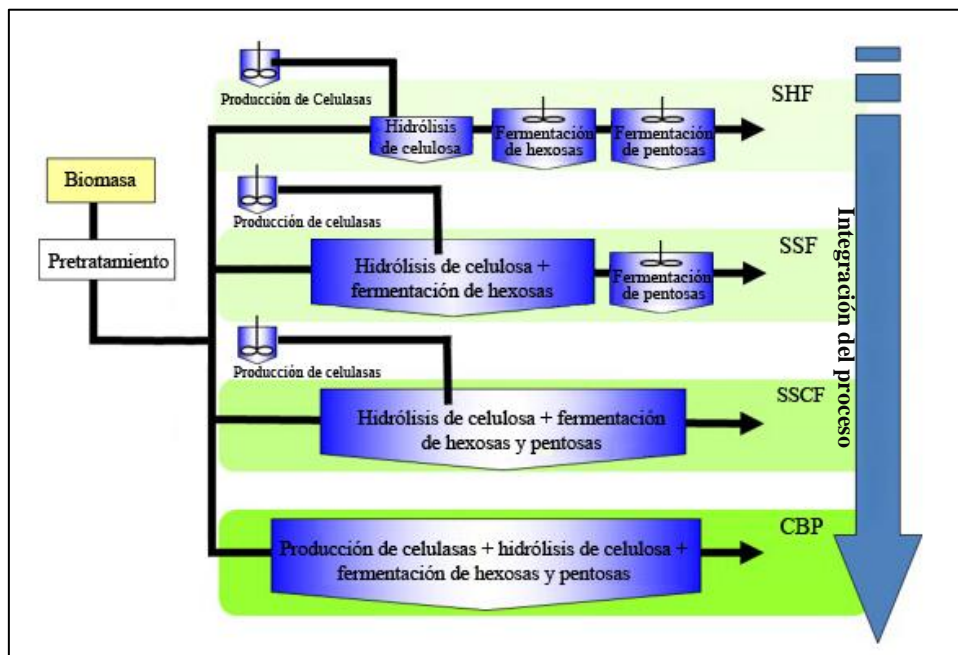


Figura 1.1. Avances en la configuración del proceso productivo de bioetanol lignocelulósico [adaptado de 9, 24].

La última integración de etapas estudiada corresponde al bioproceso consolidado (CBP: *Consolidated Bioprocessing*), en el que el etanol y todas las enzimas requeridas son producidos por un sólo organismo y en un sólo reactor, esto permite que se efectúe la hidrólisis y la fermentación simultáneamente. El CBP es la mayor evolución en la tecnología de conversión de masa y se espera que contribuya a disminuir en un 50% el precio del producto, dado que no implica costos de capital ni de operación para la producción enzimática. El problema del CBP es que aún no existe un

organismo capaz de producir celulasas y enzimas requeridas para la generación de etanol y que puedan fermentar los azúcares, cumpliendo con la elevada concentración y rendimientos que requiere el proceso. Además, el hecho de que la producción enzimática y la hidrólisis se realizan en condiciones diferentes (28 °C la primera y 50 °C la segunda), dificulta más la tarea [9].

La Figura 1.1 muestra un diagrama de las diferentes configuraciones del proceso de producción de bioetanol.

1.1.4. LAS CELULASAS

Las celulasas son enzimas que degradan celulosa y han sido estudiadas desde los años 50. Tienen diversas aplicaciones industriales, como en la industria textil, donde se usan para el desteñido de telas; en los detergentes, para degradar fibra de las pelusas; en la industria alimenticia, pues favorecen la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos o extracción de aceites comestibles, etc.; en la industria procesadora de papel y en la degradación de materia lignocelulósica, reacción importante para producir varios productos de gran valor, como el bioetanol. Debido a esta última aplicación, el mercado de las celulasas ha crecido enormemente, llegando a representar el 20% del mercado mundial de enzimas entre los años 2005 y 2010 [25,26,27].

Estas enzimas aún tienen un alto costo, por lo que actualmente muchos estudios están dirigidos a la obtención de nuevos microorganismos para producir celulasas con mayor actividad específica y mayor eficiencia [23], pues el diseñar mezclas de celulasas más eficientes ayudará a reducir el costo de los procesos que utilizan estas enzimas, como el de producción de bioetanol [27].

1.1.4.1. HIDRÓLISIS DE CELULOSA

La estrategia para degradar celulosa es diferente entre los organismos anaerobios y los aerobios. Los primeros producen complejos enzimáticos llamados Celulosomas, que se adhieren a la superficie de la célula que está en contacto con la celulosa, en vez de liberar al medio extracelular cantidades significativas de celulasas; en cambio los organismos aerobios secretan las celulasas al medio extracelular en forma libre, por lo que no se requiere contacto directo con el sustrato [27,28].

Se ha propuesto que el mecanismo de los sistemas de celulasas requiere tres tipos de celulasas. Las endoglucanasas (3.2.1.4), que cortan en las partes internas amorfas de la celulosa; las exocelulasas (EC 3.2.1.91), que cortan extremos reductores o no reductores y las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), que degradan la celobiosa a glucosa. La acción de las endoglucanasas aumenta la cantidad de extremos para la acción de las exocelulasas y éstas a su vez generan celobiosa, la que es degradada por las β -glucosidasas [29,30]. En la Figura 1.2 se muestra gráficamente el modo recién descrito.

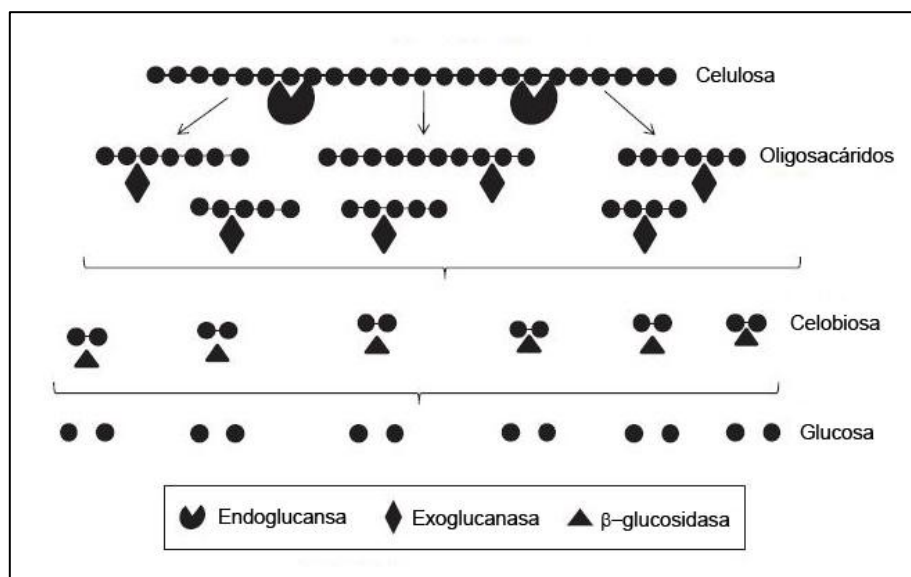


Figura 1.2. Mecanismo de las celulasas para la degradación de celulosa [30].

1.1.4.2. ESTRUCTURA DE LAS CELULASAS

Generalmente las celulasas están compuestas por un dominio catalítico, a través del cual se hidroliza la celulosa, y un dominio de unión a carbohidratos (CBD), que puede estar en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal. Ambos dominios están unidos entre sí por un dominio flexible [31].

1.1.4.3. PRODUCCIÓN DE CELULASAS

Existe una gran variedad de organismos que producen celulasas, debido a la amplia presencia de este biopolímero en la Tierra. Hasta hace poco se creía que sólo los microorganismos las producían, pero actualmente se ha descubierto que hay insectos, como las termitas, y moluscos que también las producen [28].

Sin embargo, a partir del análisis de árboles filogenéticos, se detecta que la expresión de celulasas se encuentra principalmente en bacterias y hongos. Entre las bacterias se encuentra actividad celulolítica principalmente en el género aerobio *Actinobacteria* y en el género anaerobio *Clostridios*. En el reino de los hongos hay una amplia gama de productores de celulasas, desde hongos primitivos como los *Quitridiomicetos* hasta hongos más evolucionados como los *Basidiomicetos*, tanto aerobios como anaerobios [27,28].

Dentro de las bacterias aerobias se han estudiado los géneros *Clostridium*, *Ruminococcus* y *Caldicellulose* y de las anaerobias resaltan los géneros *Celulomonas*, *Termobifida*, *Cytoplaga* y *Sporocytofa* [27,28].

En los hongos, hay algunos productores de celulasas anaerobios, como los pertenecientes a la división Quitridiomycetos, pero las celulasas son producidas mayormente por hongos aerobios, dentro de las divisiones Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes. De estas divisiones, los géneros más estudiados han sido: *Bulgaria*, *Chaetomium*, and *Helotium* (Ascomycetes); *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Poria*, *Schizophyllum* and *Serpula* (Basidiomycetes); y *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Deuteromycetes) [27,28].

De todos los productores de celulasas, el microorganismo más estudiado y el que domina el mercado de las celulasas es *Trichoderma reesei*, ya que tiene un alto nivel de expresión y expresa todas las celulasas requeridas para la degradación de celulosa; además éstas son resistentes a inhibidores químicos y estables a 50 °C por 48 horas o más. Sin embargo *T. reesei* también tiene desventajas, como no producir enzimas que degraden lignina, sus celulasas tienen baja actividad específica y son inhibidas por producto [26].

Dentro de los Basidiomycetes, los hongos de pudrición blanca y los de pudrición café son los hongos estudiados que mejor degradan material lignocelulósico. De ellos, *Trametes versicolor* es el más eficiente de los organismos ligninolíticos descritos hasta ahora, debido a que posee un sistema enzimático no selectivo, que degrada lignina, hemicelulosa y celulosa [31,32,33].

1.1.4.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CELULASAS EN HONGOS

La producción de celulasas es controlada mediante el mecanismo de inducción y represión. Estudios en diferentes hongos, como *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* indican que la regulación ocurre a nivel transcripcional. La expresión de los genes de celulasas es coordinada por factores transcripcionales, los que son activados por la presencia del inductor [26,27,28].

Como la celulosa es un sustrato insoluble, que no puede ingresar a la célula, por lo que se ha buscado el inductor natural de celulasas. Con dicho objetivo, se han probado diversas fuentes de carbono, que incluyen soforosa, lactosa, celobiosa e incluso xilosa. De ellos, soforosa es considerado el inductor más potente, pero no se considera como el inductor natural [25,28].

El represor de la expresión de celulasas es la glucosa o los azúcares de fácil disponibilidad. Cuando el microorganismo productor de celulasas tiene glucosa disponible para su uso, ocurre una represión por catabolito y se detiene la transcripción de los genes que codifican para celulasas. El nivel del azúcar debe ser menor a 0,1 mg/ml para permitir nuevamente su producción. Sin embargo, en ausencia de glucosa hay una producción basal de celulasas. Se cree que este nivel basal permite la

producción del inductor al hidrolizar celulosa en forma limitada; y a su vez esto induciría una mayor expresión de celulasas [28].

También se ha descubierto que la asimilación de algunos aminoácidos como L-leucina y la expresión de los genes de algunas celulasas, como exocelulasas y β -glucanasas, están involucradas en la formación del inductor, lo que sugiere que la síntesis de celulasas tiene relación con estos factores [27,28].

1.1.4.5. CLASIFICACIÓN DE LAS CELULASAS

De acuerdo a la IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), las enzimas son clasificadas según su especificidad de sustrato y las reacción que catalizan. Conforme a ello, las celulasas pertenecen a la categoría de las glicosil hidrolasas (GHs) (EC 3.2.1.x), puesto que éstas hidrolizan enlaces O-glicosídicos [34].

Sin embargo, tras la identificación de miles de GHs, la clasificación a partir de la especificidad de sustrato se ha vuelto insuficiente. Por ello, se creó una clasificación alternativa basada en la similitud de su secuencia aminoacídica, que las agrupa en familias. Las enzimas de una familia en particular tienen una alta similitud entre sus secuencias aminoacídicas y su plegamiento. Actualmente, existen 131 familias de GHs, de las cuales 17 familias presentan actividad endoglucanasas [34].

1.1.4.6. DOMINIOS CONSERVADOS

Un dominio de una proteína corresponde a una región de su secuencia aminoacídica que está fuertemente relacionada con la función o estructura de ella. De hecho, estos dos aspectos están íntimamente relacionados, pues la función de una proteína depende de la estructura que ella tenga y de los aminoácidos que presenta en su sitio activo. Debido a que cualquier modificación en estas zonas puede afectar la acción de las proteínas, han sido conservadas en la evolución [31,35].

Los dominios conservados se definen como unidades repetitivas de la secuencia de proteínas a través de la evolución molecular, cuya extensión puede ser determinada por análisis de secuencia y estructural. Contienen patrones de secuencias conservados o motivos, los que pueden ser detectados en alineamientos de secuencias polipeptídicas de diferentes especies [31].

Cada familia de proteínas tiene un motivo característico, por lo que si una proteína presenta en su secuencia el patrón de una familia en particular, es muy probable que tenga la misma función y estructura que otros miembros de la familia. Esto permite identificar fácilmente una proteína recién secuenciada [35].

1.1.5. SISTEMAS DE EXPRESIÓN RECOMBINANTE

Desde hace algunas décadas los científicos han aprendido a manipular el DNA. Entre las diversas técnicas desarrolladas está la “expresión recombinante”, que consiste en el traspaso de genes de un organismo a otro. Esta técnica es principalmente utilizada para la producción de proteínas heterólogas, ya sea con fines comerciales o de investigación [36].

La razón para producir una proteína en un organismo diferente al que la produce naturalmente, es que los organismos elegidos tienen una tasa de crecimiento y producción de biomasa mucho más alta, comparada con los organismos originarios; además de ser más fáciles de manipular [36,37].

Existe una variedad de organismos hospederos, llamados sistemas de expresión, que incluye a bacterias, levaduras, insectos y células de mamíferos. Los dos primeros son los más ampliamente usados ya que se tiene mucho conocimiento sobre su funcionamiento, son más fáciles de manipular y más baratos que las células de insecto o las de mamíferos [36,37].

Hasta hace unos años, la bacteria *Escherichia coli* era el sistema preferido por los científicos para expresar proteínas heterólogas, ya que se tenía mucho conocimiento de su genética, crece rápidamente y es barato. Sin embargo, muchas de las proteínas de interés provienen de organismos eucariontes, en los que las proteínas son procesadas después de su traducción para ser expresadas en forma activa y *E. coli*, al ser procarionte, no tiene la maquinaria celular para realizar dichas modificaciones [36,37].

Así, las levaduras surgen como un mejor sistema de expresión, pues son igualmente fáciles de manejar, cultivar y son baratas como las células procariontes, pero tienen la ventaja de poder realizar varias de las modificaciones post-traduccionales necesarias para el buen funcionamiento de las proteínas de eucariontes [37,38].

La levadura más comúnmente utilizada ha sido *Saccharomyces cerevisiae*, dado que se tenía un amplio conocimiento de su funcionamiento; sin embargo, en el último tiempo han aumentado notoriamente los estudios que utilizan *Pichia pastoris* como sistema de expresión. La mayor ventaja de *P. pastoris* respecto de *S. cerevisiae* es que realiza modificaciones post-traduccionales más similares a las que realizan los organismos nativos, como por ejemplo, la glicosilación. Sumado a ello, tiene promotores que están estrechamente regulados por metanol. Por ejemplo, la enzima alcohol oxidasa (AOX), tiene un promotor que en presencia de metanol aumenta en un 30% la cantidad de enzima expresada; en cambio, en presencia de otras fuentes de carbono como etanol, glicerol, glucosa, etc, la expresión es prácticamente nula. Por ello, en proteínas recombinantes se ha usado el promotor de esta enzima (5' AOX) en diferentes vectores, logrando altos niveles de

expresión de la proteína. Por otra parte, el gen generalmente es incorporado al genoma de *P. pastoris*, otorgándole mayor estabilidad a la construcción; secreta bajos niveles de proteínas endógenas, lo que facilita la purificación de la proteína recombinante al evitar el tener que lisar la célula y hay un amplio rango de promotores, marcadores de selección y señales de secreción que se pueden usar en la expresión, otorgando flexibilidad a los a los diferentes tipos de proteínas que se pueden expresar [37,38].

Dado lo anterior, *P. pastoris* resulta ser una muy buena alternativa para la expresión recombinante y se eligió para el desarrollo de este trabajo.

1.1.6. JUSTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Por lo expuesto anteriormente, queda claro que existe una necesidad mundial por encontrar nuevas alternativas energéticas renovables y que sean factibles de producir a gran escala. Una fuente promisoría de energía es el bioetanol lignocelulósico, principalmente en Chile, que posee muchos residuos de recursos forestales y agrícolas disponibles para su producción [6,10].

El principal obstáculo para el desarrollo de la industria del bioetanol lignocelulósico es que su costo aún no es competitivo en el mercado de los combustibles [8,16,17].

La producción de bioetanol lignocelulósico requiere de tres etapas: el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, la hidrólisis de celulosa y la fermentación de los azúcares a etanol. De ellas, las dos primeras son las más costosas. En particular, la hidrólisis enzimática tiene un gran espacio para su desarrollo y uno de los puntos más relevantes es el alto costo de las celulasas y el bajo rendimiento en la producción de bioetanol. A pesar de que las enzimas actualmente usadas en la producción de bioetanol han sido estudiadas y mejoradas durante años, no se logra superar los problemas que las enzimas presentan, por lo tanto, es necesario encontrar nuevas celulasas, que puedan ser mejoradas genéticamente y así disminuir el costo de producción del bioetanol.

Por lo anterior, en el Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología se han desarrollado una serie de estudios que apuntan a mejorar las etapas de pretratamiento e hidrólisis para la producción de bioetanol de segunda generación. En particular, los estudios para la mejora de la hidrólisis están dirigidos hacia la búsqueda de nuevas celulasas y futuras mejoras biotecnológicas.

El foco de este trabajo es la expresión recombinante en *Pichia pastoris* de una endoglucanasa del hongo *T. versicolor*. Se decidió estudiar una celulasa de este hongo porque es considerado un buen degradador de lignina y ha sido ampliamente estudiado por su capacidad de degradar este polímero, pero las celulasas que produce no han sido estudiadas, lo que da espacio a encontrar nuevas celulasas, que pueden tener un buen desempeño degradando celulosa.

Para lo anterior, se aisló la secuencia del gen que codifica una endoglucanasa del hongo *T. versicolor*. Luego, esta secuencia se clonó y expresó en forma recombinante en *Pichia pastoris*. Posteriormente se realizó una curva de inducción para evaluar los niveles de actividad enzimática mediante geles de proteínas SDS, zimogramas y ensayos de actividad en CMC, tanto sólidos como líquidos. Por otro lado, se hizo un estudio de la actividad enzimática del hongo en su forma nativa sobre tres sustratos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar el gen que codifica para una endoglucanasa del hongo *T. versicolor* y expresarlo en forma activa en *P. pastoris*.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Aislar el gen que codifica para una endoglucanasa del hongo *T. versicolor*.
- (ii) Obtener una endoglucanasa del hongo *T. versicolor* de forma recombinante en el sistema de expresión *P. pastoris*.
- (iii) Evaluar la expresión del gen en el sistema de expresión de *P. pastoris*.
- (iv) Determinar la producción celulolítica del sistema nativo con diferentes fuentes de carbono y compararlo con el sistema recombinante.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. REACTIVOS

En la Tabla 2.1 se presentan los reactivos utilizados en el trabajo de laboratorio, con su respectivo proveedor.

Tabla 2.1. Lista de reactivos.

Origen/Empresa	Reactivos
Difco	Agar, LB
CalBiochem	Ampicilina
Fermentas	Proteinasa K, X-Gal, IPTG
Fluka	Avicel
IDT	Oligonucleótidos
Invitrogen	dNTPs, E. coli DH5 α , kit elongasa, estándar de peso molecular para geles de agarosa (1 Kb), High Mass DNA Ladder, EasySelect™ Pichia Expression kit
Lafken	Agarosa
Merck	Papa dextrosa, sales inorgánicas, ácido cítrico, EDTA, SDS, ácido acético glacial, etanol, cloroformo, glucosa
New England Biolabs	Enzimas de restricción: <i>EcoRI</i> , <i>PmeI</i> , <i>XbaI</i> , <i>XhoI</i> , <i>EagI</i> , <i>NcoI</i>
Promega	Kit Taq DNA polimerasa, kit pGem®-T Easy
QIAGEN	Kit QIAEX II, kit QIAprep Spin Miniprep
Sigma	DNS, tris, bromuro de etidio, di-metilformamida
Facultad Ingeniería Forestal, Universidad de Chile	Astillas de Lengua (<i>N. pumillo</i>)

2.1.2. EQUIPOS

A continuación, en la Tabla 2.2, se especifican los equipos utilizados para el trabajo.

Tabla 2.2. Equipos de laboratorio utilizados.

Equipo	Fabricante y modelo
Agitador orbital	LabLine MaxQ 4000
Centrífuga	BOECO M-24 Eppendorf 5804 R
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer confort
Lector de absorbancia (para placas de 96 pocillos)	Asys UVM 340
Fuente de poder para electroforesis	BRL Model 500 Bio-Rad Power Pac 1000
Electroporador	Gibco BRL Cell-Porator
Termociclador	Eppendorf Mastercycler Gradient
Transiluminador para geles de agarosa	Vilber Loumat
Cámara fotográfica	Nikon Coolpix 4500

2.1.3. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

En Tabla 2.3 se presentan las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo.

Tabla 2.3. Enzimas de restricción

Enzima	Sitio de restricción
<i>EagI</i>	C [↓] GGCCG GCCGG [↑] C
<i>EcoRI</i>	GAT [↓] ATC CTA [↑] TAG
<i>NcoI</i>	C [↓] CATGG GGTAC [↑] C
<i>PmeI</i>	GTTT [↓] AAAC CAAA [↑] TTTG
<i>XbaI</i>	T [↓] CTAGA AGATC [↑] T
<i>XhoI</i>	C [↓] TCGAG GAGCT [↑] C

Los símbolos ↓ y ↑ muestran dónde corta la enzima.

2.1.4. VECTORES

2.1.4.1. VECTOR DE CLONAMIENTO

En la Figura 2.1 se muestra un esquema del vector de clonamiento pGem®-T Easy junto con sus principales puntos de referencia [39].

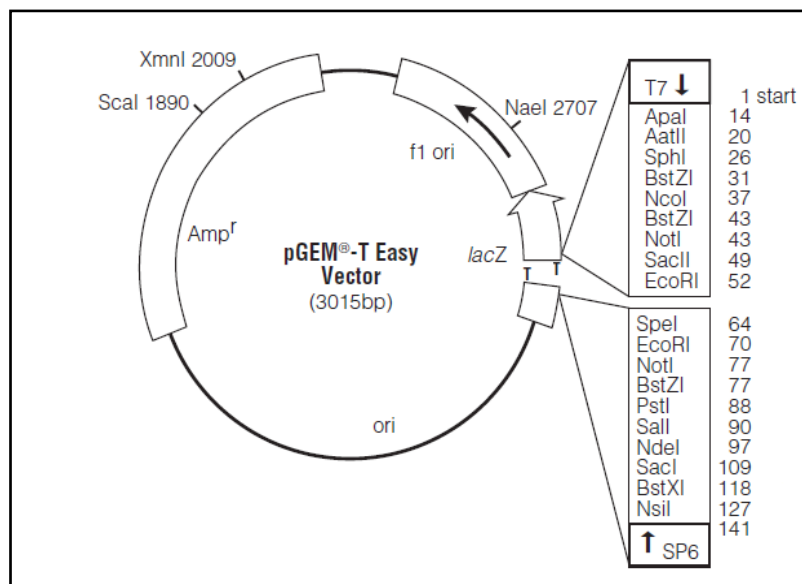


Figura 2.1. Vector pGem®-T Easy y sus puntos de referencia [39]. Amp^r: resistencia a ampicilina, lacZ: gen que codifica para la β-galactosidasa, interrumpido por el sitio de múltiple clonamiento. A la derecha del vector se muestran los sitios de restricción disponibles en el sitio de múltiple clonamiento.

2.1.4.2. VECTOR DE EXPRESIÓN

En la Figura 2.2 se muestra un esquema del vector de expresión pPICZ α , junto con sus principales puntos de referencia [40].

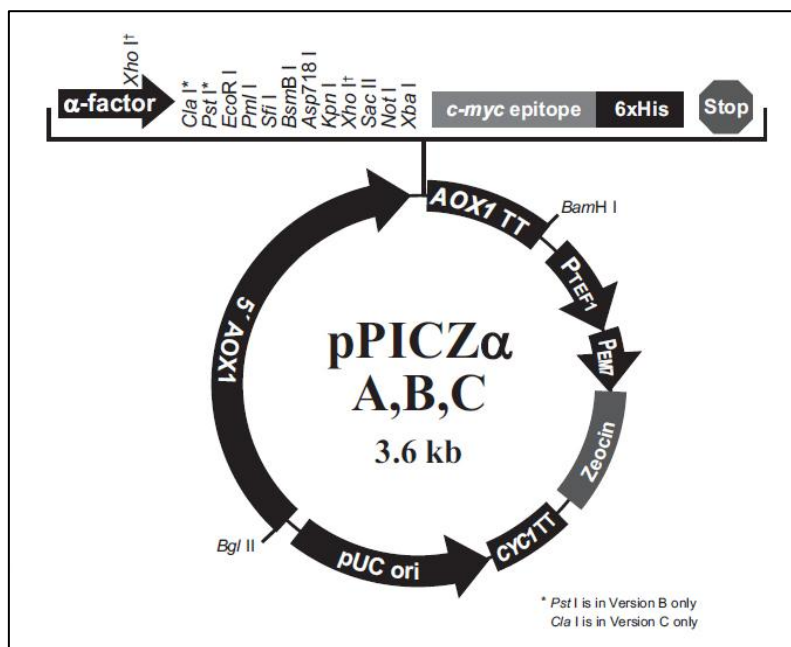


Figura 2.2. Vector pPICZ α y sus puntos de referencia relevantes [40]. Zeocin: resistencia a Zeocina, AOX1: gen que codifica para la enzima alcohol oxidasa, α -factor: señal de exportación de *Saccharomyces cerevisiae*, 6xHis: cola de polihistinas. Sobre el vector se muestran los sitios de restricción disponibles en el sitio de múltiple clonamiento.

2.1.5. HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES

En la Tabla 2.4 se presentan las herramientas bioinformáticas utilizadas para este trabajo.

Tabla 2.4. Herramientas bioinformáticas utilizadas.

Herramienta	Fuente
BLASTX	NCBI [41]
CDD	NCBI [35]
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research [42]
Translate tool	ExPASy [43]
Compute pI/Mw	ExPASy [43]
NebCutter	New England Biolabs [44]
Double Digest Finder	New England Biolabs [45]
BIOEDIT	Department of Microbiology, North Carolina State University [46]

2.1.6. SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

Al inicio del trabajo se contaba con dos fragmentos de cDNA que en conjunto completaban gran parte de la secuencia nucleotídica de una endoglucanasa del hongo *T. versicolor*. Cada uno estaba clonado en el vector pGEM®-T Easy [47].

Los fragmentos fueron obtenidos a través de RT-PCR, usando partidores degenerados y RNA extraído directamente de *T. versicolor* como templado. A continuación se muestran las secuencias nucleotídicas de cada fragmento:

> CBD2_A 5'-3' (666 bp)

GTCTGGAGGAAGTGGGGGTCACCGGCTTCTCTGGCGACCCTACCTGTGCCTCTTGCTCGAGCTGGATTACAGTCTGCT
CATACTACTCGCGATGCCTGCCGTGACGTCGACCACCAGTCGACCGCGTCCGCGCCCGGCCCTTCGGGATGCTCTGG
CCCGCGCAGCAAGTTCAAGCTGTTTCGGTGTGAACGAGTCCGGCGGAAGTTGAGGAACACCGTCATCCCGGGCGCGCTC
GGCCCGGAGTACACCTGGCCGTCGCCACCTCCATCGACTTCTTCATGGGCCAGGGCTTCAACACGTTCCGCATCCCGT
TCCTGATGGAGCGCGTCGACCCGCCGCTCCGGATGGCCTTACTGGCCCGTTCAACGGCACCTACCTCGACGGACTGAA
TCAAAGTGTTAGATACCTAACTGTAACGGTGGTTTTGCTGTTCATCGATGAGGACAACCTTCATGATCTTCAACGGCGC
GACTATCACGAACACCCTTCAGTTCGAGGCCTGGTGGCAAACGCTTGTGCGGACTTCAAACCAACAACAACGTCAT
CTTCGACCTCATGAACGAGCCGCACGACATCCCTGCGCATAACCGTCTTCCAGCTCATGCAAGCGGCCGCTCAACGGCGT
CGCGCGAGCGGCGCGACCAACCAGCTCATCCTCGC

> f5h106 5'-3' (471 bp)

TGATCTTCGACATCATGAACGAGTCACATGACATCCCCGCGCAGACCGTCTTCCAGCTCATGCAAGCGGCCGTC
CGTGCCGCGAGCGGCGCGACCAAGCCAGCTCATCCTCGCCGAGGGCACGAGCTGGACTGGGGCGTGGACGTGGACGACC
TCGGGCAACAGCGACGCGTTCGGCGCGATCAAGGACCCGAACAACAACATTGCTATCCAGATGCACCAGTACCTGGAC
TCGGACGGCTCGGGCACGTCCCGATCTGCGTGTGCGACACGATCGGCGCGGAGCGCCTGCAGGCGGCGACGCAGTGGC
TGCAGCAGAAGGGCCTCAAGGGCTTCTCGGCGAGATCGGCACGGGCAACAACACGCAGTGCCTGACCGCGCTGCAGG
GCGCGCTCTGCGAGATGCAGCAGGCCGGCGGGACGTGGCTCGGCGCGCTCAGGTGGGCCCGCGGCTCCTGTTGGGG

Los nucleótidos subrayados son los partidores degenerados y los marcados en rojo corresponden a los nucleótidos comunes entre ellos (118 pb).

Estas dos secuencias se utilizaron para generar una secuencia completa del gen que codifica la endoglucanasa del hongo *T. versicolor*.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS CBD2_A Y F5H106

Para determinar a qué familia de GHs pertenecen los fragmentos, cada secuencia se analizó usando el software en línea BLASTX y para identificar la presencia de dominios conservados en las secuencias, se utilizó la herramienta CDD.

2.2.2. GENERACIÓN DE LA SECUENCIA TVEG

Para expresar el gen de la enzima primero se generó una única secuencia a partir de los dos fragmentos que se tenían de ella, mostrados anteriormente.

Se buscó una enzima de restricción que cortara a ambos fragmentos en la zona que tenían en común y luego se unieron los fragmentos. De esta forma se obtendría una secuencia completa en forma continua de la endoglucanasa.

Usando la herramienta computacional *NebCutter*, se generó un mapa de los sitios de restricción de cada secuencia (ver Anexo 7.2.1).

2.2.2.1. DIGESTIÓN DE LOS FRAGMENTOS *CBD2_A* Y *F5H106* CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Como cada fragmento estaba clonado en el vector *pGEM®-T Easy* dentro de células *E. coli* DH5 α , se crecieron estas células en tubos de ensayo con 4 ml de medio LB-amp (Anexo 6.1.1.2) a 37 °C y agitación orbital de 200 rpm durante toda la noche. Luego se les extrajo el DNA plasmidial (ver Anexo 7.1.5), lo que se verificó a través de un gel de agarosa al 1% m/v.

Usando *Double Digest Finder*, se encontró las condiciones óptimas para la digestión de cada fragmento. El fragmento *CBD2_A* se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *EagI* como se describe a continuación: 15 μ l de DNA plasmidial, 40 U de *EagI*, 10 U de *NcoI*, 5 μ l de buffer N3, en un volumen final de 50 μ l, durante 7 h a 37 °C. El fragmento *f5h106* se digirió usando la misma mezcla, pero en vez de 10 U de *NcoI* se usó 10 U de *EcoRI*.

Finalmente se verificó la digestión en un gel de agarosa al 1% m/v y desde éste se purificó cada fragmento (Anexo 7.1.6), quedando aislados para ligar.

2.2.2.2. LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTOS *CBD2_A* Y *F5H106*

Ya digeridos y purificados los fragmentos, se procede a ligarlos. La ligación se hizo en un tubo Eppendorf de 0,6 ml estéril, mezclando 3 μ l de DNA proveniente de la purificación desde gel de agarosa de cada fragmento, buffer de ligación 2X y 1 U de DNA ligasa de T4 en un volumen final de 10 μ l. La mezcla de reacción se dejó toda la noche a 4 °C.

2.2.2.3. DISEÑO DE PARTIDORES

Para clonar la secuencia en el vector de expresión *pPICZ α A* fue necesario agregarle los sitios de restricción que permiten insertarla en el vector. Para ello se diseñó partidores específicos siguiendo las consideraciones del manual del sistema *EasySelect™ Pichia Expression* [48]: el gen debe ser clonado río abajo de la señal de exportación α -factor de *S. cerevisiae* y de la secuencia de corte *Kex2*. Esta señal se introdujo en el partidor sentido para estimular el adecuado procesamiento del extremo N-terminal. Además, a fin de poder purificar la proteína posteriormente, se le agregó una cola terminal de histidinas incluida en el vector, por lo que también se debió cuidar que el gen quedara con el mismo marco de lectura que la cola de histidinas en el C-terminal.

Se usó los sitios de restricción disponibles en el vector. Para la expresión de la enzima con el extremo N-terminal nativo, en el partidor sentido se debió agregar el sitio de restricción para *XhoI* y reconstruir la señal de corte *Kex2* (se muestra entre asteriscos en la Tabla 2.5) y en el partidor

antisentido se agregó el sitio de restricción para la enzima *Xba*I (mostrado entre flechas en la Tabla 2.5).

Tomando en cuenta las restricciones mencionadas anteriormente, se diseñó los partidores usando la herramienta Primer3, la que corrobora que no haya formación de estructuras secundarias como horquillas y dímeros.

Tabla 2.5. Partidores para el clonamiento de tveg en pPICZ α A.

Nombre	Dirección	Secuencia	Tm [°C]
tveg_Fwd	Sentido	GTC*TCGAGAAAAGAGAG*TCCGGC	59
tveg_Rev	Antisentido	GCATTGTTCTAGAA ⁺ GCGCGCC	60

* * indica el sitio de restricción para *Xho*I y la señal de corte de Kex2 y ⁺ muestra el sitio de restricción para *Xba*I. Tm fue calculada usando la herramienta Biomath de Promega [49].

Los partidores diseñados fueron usados en un PCR para la amplificación de la secuencia tveg.

2.2.2.4. AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA TVEG POR PCR

La secuencia se amplificó en un PCR en que se usaron los partidores mostrados en la Tabla 2.5. La mezcla de reacción utilizada para el PCR fue: 1 μ M de cada partidor (tveg_Fwd y tveg_Rev), 0,2 mM de dNTPs, 1,4 mM de MgCl₂, buffer Taq 1X, 1 U Taq polimerasa y 1 μ l de DNA, en un volumen total de 50 μ l.

Para la reacción se probaron tres temperaturas de alineamiento. El programa usado para el PCR fue el siguiente: un ciclo de 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 51 °C por 1 min con gradiente de 2 °C y 72 °C por 1 min y, finalmente, un ciclo de 72 °C por 10 min.

Se observó los productos de PCR en un gel de agarosa 1% m/v. Las bandas correspondientes a la secuencia tveg fueron purificadas desde el gel para su posterior clonamiento.

2.2.3. CLONAMIENTO DE LA SECUENCIA TVEG PARA SU SECUENCIACIÓN

Después de obtener el amplicón tveg puro, se clonó en el vector pGEM®-T Easy, para enviarla a secuenciar a Macrogen S.A., Corea. Para su secuenciación se utilizó los partidores M13F-pUC y M13R-pUC, cuyas secuencias se encuentran en el Anexo 7.1.8. El detalle del protocolo del clonamiento se presenta en el Anexo 7.1.3.

2.2.4. GENERACIÓN DEL CONSTRUCTO pPICZ α A-TVEG

Para la transformación y expresión de la secuencia tveg dentro de la levadura *P. pastoris*, se clonó la secuencia en el vector de expresión pPICZ α A.

El clonamiento, la transformación y expresión de la enzima TvEG en *P. pastoris* se hizo utilizando el sistema EasySelect™ Pichia Expression, siguiendo las instrucciones descritas en el manual [48].

2.2.4.1. PROPAGACIÓN DEL PLASMIDIO PPICZ α A

Antes de clonar la secuencia fue necesario propagar el vector pPICZ α A. Dada la capacidad que tiene *E. coli* DH5 α para generar muchas copias del DNA plasmidial, se electroporó células DH5 α con el vector:

Se resuspendió todo el vector proporcionado en el kit (20 μ g) en 20 μ l agua destilada estéril, para tener una solución de 1 μ g/ μ l. Luego se diluyó 1 μ l de dicha solución en 10 ml de agua destilada estéril, de manera de obtener una solución con una concentración de 100 pg/ μ l. De esta mezcla se tomó 1 μ l y se transformó en *E. coli* DH5 α (ver Anexo 7.1.4). En seguida, se seleccionó las células que contuvieran el plasmidio, usando placas con medio LB agar Low Salt suplementado con Zeocina (Anexo 7.1.1.2) como marcador de selección. Las células que crecieron en este medio se pasaron a medio LB líquido Low Salt (Anexo 7.1.1.1) y se las dejó crecer durante la noche. Por último, se realizó una extracción de DNA plasmidial (ver anexo 7.1.5) y se corroboró mediante un gel de agarosa 1% m/v.

2.2.4.2. DIGESTIÓN DEL PLASMIDIO Y DEL INSERTO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Al vector y a la secuencia se les hizo por separado una digestión doble con las enzimas de restricción *Xho*I y *Xba*I, para que así quedaran con extremos cohesivos, permitiendo su posterior ligación a través de ellos.

Cada digestión se hizo bajo las siguientes condiciones: 5 μ l de DNA, 10 U de *Xba*I, 10 U de *Xho*I, 5 μ l de buffer NE4, suplementado con BSA en una concentración final de 100 μ g/ml, en un volumen total de 50 μ l, durante 2 horas a 37 °C. Se verificó y purificó cada digestión a partir de un gel de agarosa al 1% m/v.

2.2.4.3. CLONAMIENTO DE LA SECUENCIA EG_F5H106 EN EL VECTOR PPICZ α A

Una vez que cada secuencia posee los extremos cohesivos correspondientes, se generó el constructo vector-inserto ligando ambas secuencias.

La ligación se hizo usando la siguiente mezcla: 3 μ l de la purificación del plasmidio desde el gel de agarosa, 3 μ l de DNA proveniente de la purificación desde gel de agarosa, buffer de ligación 2X y 1 U de DNA ligasa de T4 en un volumen final de 15 μ l. La mezcla de reacción se dejó toda la noche a 4 °C.

2.2.5. PROPAGACIÓN DEL CONSTRUCTO pPICZ α A-TVEG EN *E. COLI*

La transformación de *P. pastoris* requiere gran cantidad de DNA plasmidial (entre 5 y 10 μ g). Para propagar el constructo pPICZ α A-inserto se transformó células de *E. coli* DH5 α con él y posteriormente se les extrajo el DNA plasmidial (ver Anexo 7.1.5), lo que fue corroborado en un gel de agarosa al 1% m/v.

2.2.6. LINEALIZACIÓN DEL CONSTRUCTO pPICZ α A-TVEG

Como en *P. pastoris* el gen es incorporado al genoma, se debe linealizar el constructo, por lo que se digirió con la enzima de restricción *PmeI*. Con la herramienta NebCutter se generó un mapa de restricción de la secuencia (ver mapa en Anexo 7.2.1). Con éste se corroboró que *PmeI* sólo cortaba al vector y no a la secuencia.

La digestión se realizó en la siguiente mezcla: 15 μ l de DNA plasmidial obtenido de la purificación del constructo-inserto propagado, 10 U de *PmeI*, buffer NE4 1X, suplementado con BSA en una concentración final de 100 μ g/ml, en un volumen total de 20 μ l, durante 4 horas a 37 °C.

Una vez digeridos los fragmentos, se cuantificó la cantidad de DNA plasmidial, cargando 3 μ l de la linealización en un gel de agarosa al 1%. Para la cuantificación se ocupó el High DNA Mass Ladder de Invitrogen como marcador de peso molecular, que permite estimar la cantidad de DNA de una muestra comparando la intensidad y tamaño de las bandas.

2.2.7. TRANSFORMACIÓN EN *P. PASTORIS*

Mediante electroporación se transformó la cepa GS115 de *P. pastoris* con el constructo pPICZ α A-tveg. Por lo tanto, se preparó y electroporó células de *P. pastoris* electrocompetentes de acuerdo al protocolo descrito en el manual del sistema Easy Select. La mezcla usada para la electroporación fue: 20 μ l de DNA plasmidial diluido 1:10 y 60 μ l de células de *P. pastoris*, llegando a un volumen total de 80 μ l.

Después de la electroporación se agregó 1 ml de Sorbitol 1 M, previamente enfriado en hielo; se transfirió las células a un tubo Eppendorf estéril de 1,5 ml y se las dejó recuperando por una hora a 30 °C sin agitación. Luego se cultivaron 10, 25, 50, 100 y 200 μ l de células en distintas placas con medio YPDS (Anexo 7.1.1.2), suplementado con 100 μ g/ml de Zeocina, como se indicaba en el manual. La Zeocina es un antibiótico que se degrada con la luz, por lo que el cultivo se hizo con la menor cantidad de luz posible y las placas se mantuvieron todo el tiempo cubiertas con papel aluminio. Los cultivos se incubaron durante cuatro días. Las cepas recombinantes se guardaron a -80 °C en medio LB-glicerol al 20% v/v.

2.2.8. EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LA ENZIMA TVEG EN *P. PASTORIS*

Para estudiar la expresión activa de la enzima se hizo una curva de inducción, con el objetivo de determinar el punto máximo de producción de la enzima recombinante, entre 0 y 96 h de inducción.

2.2.8.1. MEDIOS DE CULTIVO E INDUCCIÓN

Para la curva existían tres pares de medios posibles con los que se podían crecer las cepas e inducir la expresión de la proteína. En cada par hay un medio para el crecimiento de las cepas y otro para la inducción de la expresión. La elección de los medios de cultivo e inducción se hizo siguiendo las recomendaciones del manual, en el que se indica que se debía considerar el tipo de cepas usadas (Mut⁺ o Mut^s), si la enzima sería expresada en forma intracelular o extracelular y el pH al que actuaba la enzima.

La cepa GS115 es del tipo Mut⁺, lo que significa que crece en forma rápida en presencia de metanol. Se usó esta cepa porque la enzima sería secretada al medio extracelular y, en general, se recomienda este fenotipo para ello [48]. Esta cepa es auxótrofa de histidina, por lo que es necesario suplementar los medios de cultivos con este aminoácido.

Los medios que mejor se adaptaban a las condiciones explicadas anteriormente, eran el par BMGY (*Buffered complex glicerol medium*) y BMMY (*Buffered complex metanol medium*), donde el primero es para la producción de biomasa y el segundo es el medio inductor, que se debe suplementar con metanol cada 24 h. Estos son medios complejos, con histidina y fosfato de potasio a pH 6 como amortiguador.

2.2.8.2. CURVA DE INDUCCIÓN

Se hizo una curva de inducción para la cepa GS115 transformada con el constructo pPICZαA–inserto y otra para la cepa control, que corresponde a la misma cepa, pero transformada con el vector parental.

De las placas donde se creció las células transformadas, se seleccionaron 4 colonias con mejor crecimiento (ver sección 2.2.7). Con estas cuatro colonias se volvió a inocular placas con medio YPD (Anexo 7.1.1.2) suplementado con Zeocina 100 µg/ml.

Por otro lado, también se creció células de las cepas control en placas con medio YPDS, suplementado con 100 µg/ml de Zeocina.

Crecidas las colonias, se tomó una de cada cultivo, a partir de las cuales se hizo la curva de inducción. Se inoculó 50 ml de medio BMGY con una colonia de cada cultivo en un matraz de 500 ml.

Se incubó las células a 29 °C con 250 rpm de agitación, hasta alcanzar una DO_{600} entre 2 y 6. Luego se recolectó las células, centrifugando a 2.000 x g durante 5 min a temperatura ambiente; se descartó el sobrenadante y se resuspendió las células en 100 ml de BMMY. Cada cultivo se traspasó a un matraz estéril de 1 litro y se dejó incubando a 29 °C con 250 rpm de agitación, durante 96 h. Cada 24 h se le agregó a cada cultivo 0,5 ml de metanol, para tener una concentración final de 0,5% v/v.

2.2.9. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DURANTE LA CURVA DE INDUCCIÓN

Para el análisis posterior de la curva de inducción, del total de 96 horas en que se llevó a cabo la inducción se tomó alícuotas de 2 ml de cada uno de los cultivos a las 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas, teniéndose 10 tiempos en total para la curva de inducción.

De cada muestra se separó la porción intracelular de la extracelular, analizándose cada una por separado. La parte extracelular se analizó directamente; en cambio, para analizar la expresión en el medio intracelular se debió lisar las células usando el protocolo descrito en el anexo 7.1.9. Para esto, se tomó 1,5 ml de cada muestra, se centrifugó las muestras a 15.000 x g durante 3 minutos a 4 °C; el sobrenadante se traspasó a un tubo Eppendorf de 2 ml y el pellet se resuspendió en 1,5 ml de buffer de lisis. Corresponde destacar que el volumen en el que se resuspendió la fracción intracelular es el mismo que el de la fracción extracelular, por lo se pueden comprar directamente.

Para el análisis de la expresión recombinante de la enzima se usaron los siguientes ensayos: ensayo de actividad en geles de agarosa-CMC, ensayo de actividad en medio líquido, gel de proteínas SDS-PAGE y zimograma utilizando CMC como sustrato. El ensayo en gel de agarosa-CMC se realizó sólo para determinar en forma preliminar si la enzima estaba siendo expresada en forma activa o no y para ajustar los métodos de detección de la actividad.

2.2.9.1. ENSAYO EN GEL AGAROSA-CMC

El ensayo en gel agarosa-CMC es un ensayo de actividad que permite detectar la presencia de enzimas endoglucanasas. Si la muestra contiene endoglucanasas, éstas degradarán la CMC del agar, lo que quedará en evidencia ya que dejan unos halos blancos en la zona degradada [50].

Como ya se explicó, el objeto de este ensayo era determinar si la enzima estaba siendo expresada y exportada al exterior en forma activa, razón por la cual sólo se analizó el medio extracelular.

De cada muestra de la curva se tomó tres alícuotas de 3 µl de las cepas control y recombinante y se transfirieron a una placa con agar-CMC (1% agar m/v y 1% CMC m/v). Estas placas se llevaron a 37 °C y se dejaron incubando durante toda la noche. Para determinar la actividad de las

endoglucanasas presentes en las muestras, se tiñeron las placas utilizando rojo Congo al 0,1% m/v durante 30 min y posteriormente se lavaron con NaCl 1M durante 15 min con agitación orbital suave.

2.2.9.2. *HIDRÓLISIS DE CMC*

Este ensayo, a diferencia de los otros, es el único ensayo cuantitativo, pues permite cuantificar los azúcares reductores liberados por la enzima al hidrolizar el CMC usando el método de DNS (ver detalle del método en el anexo 7.1.11) [50]. Luego de la reacción, se mide la densidad óptica de la solución resultante a 540 nm. Como la reacción entre el DNS y los azúcares reductores produce un compuesto de color cobrizo, esto permite relacionar la densidad óptica de la muestra con la concentración de azúcares reductores. Para calcular los azúcares reductores se utilizó una curva de calibración, la que se elaboró con los valores de densidad óptica a 540 nm obtenidos a distintas concentraciones de glucosa (ver Anexo 7.1.12). Determinados los azúcares reductores de las muestras, se calcula las unidades de actividad enzimática, donde una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que genera un μmol de azúcares reductores producidos en un minuto a 37 °C y pH 5.

Para este ensayo es necesario identificar si hay azúcares reductores que no hayan sido producidos por la acción enzimática en sí, o sea, que hayan estado presentes en el medio previamente. Para ello, se realizó en forma paralela dos blancos: uno correspondiente a la reacción de cada muestra sin sustrato, que revelaría la presencia de azúcares reductores en el medio; y otro correspondiente a sólo *buffer* acetato con sustrato, que indica si la preparación de éste está bien hecha y si pudo o no haber alterado los resultados. El valor real de la absorbancia de la muestra se calcula restándole la absorbancia del blanco de cada muestra a la absorbancia de la muestra. Todas las muestras fueron realizadas en duplicado y los valores fueron promediados.

En este ensayo se analizó la porción intracelular y la extracelular de los cultivos de las cepas recombinantes y de las cepas control. La actividad presente en los controles indicará si hay producción de endoglucanasas en *P. pastoris* o no, y si la cepa recombinante produce una cantidad significativa de azúcares reductores comparada con la cepa control, *i.e.*, si la enzima TvEG está siendo expresada adecuadamente.

2.2.9.3. *ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SDS-PAGE*

El método de electroforesis consiste en separar estas moléculas según su peso molecular usando un campo eléctrico aplicado a una matriz de gel, como poliacrilamida.

Así, el ensayo se realizó para identificar las proteínas producidas por cada cepa y estimar el peso molecular de ellas. Al comparar los geles de la cepa control con los de la cepa recombinante se deberá poder distinguir la enzima TvEG de las proteínas expresadas en forma nativa.

El detalle de la metodología se encuentra en el Anexo 7.1.13.

2.2.9.4. ZIMOGRAMAS CMC

A través de este ensayo es posible relacionar directamente las enzimas que poseen actividad endoglucanasa con su peso molecular, pues también se hace una electroforesis de proteínas, pero el gel además contiene CMC como sustrato, el que será degradado por las enzimas [50]. Primero se corre el gel y una vez listo se deja incubando; ahí es cuando se lleva a cabo la reacción de hidrólisis, en la que las enzimas degradan el sustrato. Luego el gel se tiñe con rojo Congo, el revelará halos sin tinción donde hubiese habido actividad endoglucanasa.

Como las enzimas deben mantener su estructura para no perder su actividad, las muestras no se calientan antes de cargarlas al gel, pero el gel se corre en condiciones desnaturantes.

Al igual que en los geles de proteínas, en un gel se colocaron muestras de todos los puntos de la curva de una determinada porción de un cultivo. El método se describe en forma detallada en el Anexo 7.1.14.

2.2.10. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE GLICOSIL HIDROLASAS DEL HONGO *T. VERSICOLOR*

Se estudió la cinética de producción de GHs del hongo *T. versicolor* a partir de diferentes fuentes de carbono, pues se ha mostrado que la expresión enzimática puede variar si se utilizan diferentes fuentes de carbono para el crecimiento de hongos [51].

El objetivo es determinar la cinética de producción de GHs e identificar las mejores condiciones para la expresión de endoglucanasas. Con esta información se podrá comparar la expresión recombinante de TvEG en *P. pastoris* con la expresión nativa de celulasas de *T. versicolor*, a fin de identificar si el sistema recombinante presenta ventajas en cuanto a la tasa de degradación de CMC.

Para ello, se consideraron tres distintas fuentes de carbono para el crecimiento: Avicel, CMC y Madera (astillas de Lengua); y dos sustratos distintos para la medición de la actividad: Avicel y CMC.

De una placa con medio agar-Malta, que se mantiene como stock del hongo, se cortaron tres cuadrados de 1 cm de lado aproximadamente y con cada uno de ellos se inoculó 250 ml de medio de cultivo; uno con medio mínimo-Avicel, otro con medio mínimo-CMC y otra con medio mínimo-madera. Los cultivos se dejaron incubando a 28 °C con agitación orbital a 200 rpm, durante 12 días.

Cada 24 horas se tomó una muestra de 1 ml bajo condiciones de esterilidad y se realizó un ensayo de hidrólisis sobre Avicel y CMC. Estos sustratos permitirán medir separadamente la actividad de celobiohidrolasas y endoglucanasas presentes en los cultivos. CMC, es un sustrato soluble en agua y es comúnmente usado para detectar actividad endoglucanasa; en cambio, Avicel es un sustrato microcristalino, insoluble en agua, que es principalmente hidrolizado por exoglucanasas [29,52].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS CB2_A Y F5H106

Los fragmentos CBD2_A y f5H106, descritos en la sección 2.1.6, corresponden a dos partes que completan la secuencia de una endoglucanasa del hongo *T. versicolor*. Estos fragmentos tienen 118 pares de bases consecutivas en común, lo que indicaría que pertenecen a la misma secuencia. Esto fue corroborado con el software BLASTX, que compara los seis marcos de lectura de una secuencia nucleotídica respecto a una base de datos internacional de secuencias de proteínas. Así, la herramienta muestra todas las secuencias que presentan semejanzas con la secuencia consultada, el marco de lectura utilizado y el *e-value* asociado a cada uno de los alineamientos. El marco de lectura permitirá conocer la secuencia aminoacídica de la secuencia y el *e-value*, que es un parámetro estadístico, indica qué tan azaroso fue el alineamiento, por lo que es un indicador de cuán significativo es el alineamiento. Mientras más cercano a cero sea el valor del *e-value*, más significativo es el alineamiento, particularmente, cualquier alineamiento que tuviera asociado un *e-value* menor a 10^{-3} , es considerado como significativo.

Al realizar el análisis de las secuencias de cada fragmento con esta herramienta, se obtuvo que ambos poseían gran similitud con secuencias de endoglucanasas y resultó que el mejor alineamiento de ambas fue con una endoglucanasa del hongo *T. versicolor* (código de acceso EIW57949.1), confirmando que ambos fragmentos pertenecen a la misma secuencia.

Para el fragmento CBD2_A el *e-value* obtenido fue de 2×10^{-109} con un 80% de identidad y para el fragmento f5h106, el *e-value* fue de 2×10^{-87} y un 97% de identidad. En la búsqueda de dominios conservados, usando el marco de lectura +1 para CBD_2 y +3 para el fragmento f5h106, se encontró la presencia de un dominio de la celulasa de la familia 5, con un *e-value* de 4.43×10^{-11} y $1,32 \times 10^{-17}$, respectivamente. Como todos los *e-value* son menores que 10×10^{-3} , los resultados de los alineamientos son significativos.

Además, se pudo determinar las regiones del fragmento que alineaba con dicha endoglucanasa. En la Figura 3.1 se muestra un diagrama de cómo alinean las secuencias aminoacídicas de los fragmentos entre sí y respecto a la endoglucanasa más parecida.

Como se mostró en el punto 2.1.6, los segmentos se solapan en 118 pb, a partir de lo cual se supuso que pertenecían a una misma secuencia. La zona común representada en la Figura 3.1 y los resultados de los alineamientos corroboran dicha suposición.

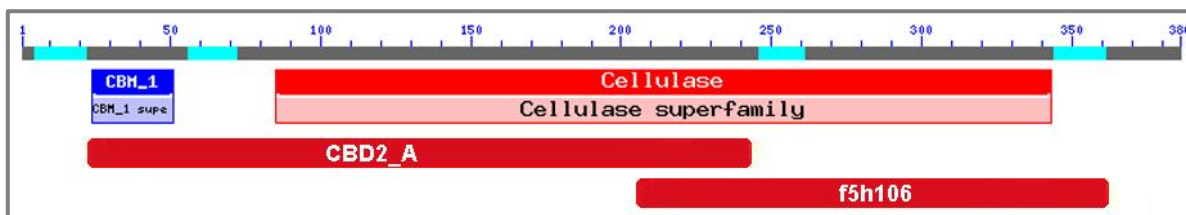


Figura 3.1. Alineamiento de los fragmentos CBD2_A y f5h106 con la secuencia de mayor semejanza. Fragmentos en rojo corresponden a CBD2_A y f5h106. En color rosa el sitio catalítico y en azul el sitio de unión a carbohidratos de una endoglucanasa del hongo *T. versicolor*. La barra gris con números azules enumera los aminoácidos.

3.2. GENERACIÓN DE LA SECUENCIA TVEG

Para obtener una secuencia completa y en forma continua de la endoglucanasa, se buscó una enzima de restricción que cortara a ambos fragmentos solamente en la zona común, para así generar extremos cohesivos y luego unir los fragmentos a través de ellos.

Usando la herramienta computacional NebCutter, se obtuvo un mapa de los sitios de restricción de cada secuencia (ver Anexo 7.2.1), con los que fue posible identificar que la enzima de restricción *EagI* cumplía con los requisitos.

La Figura 3.2 muestra el esquema de la estrategia.

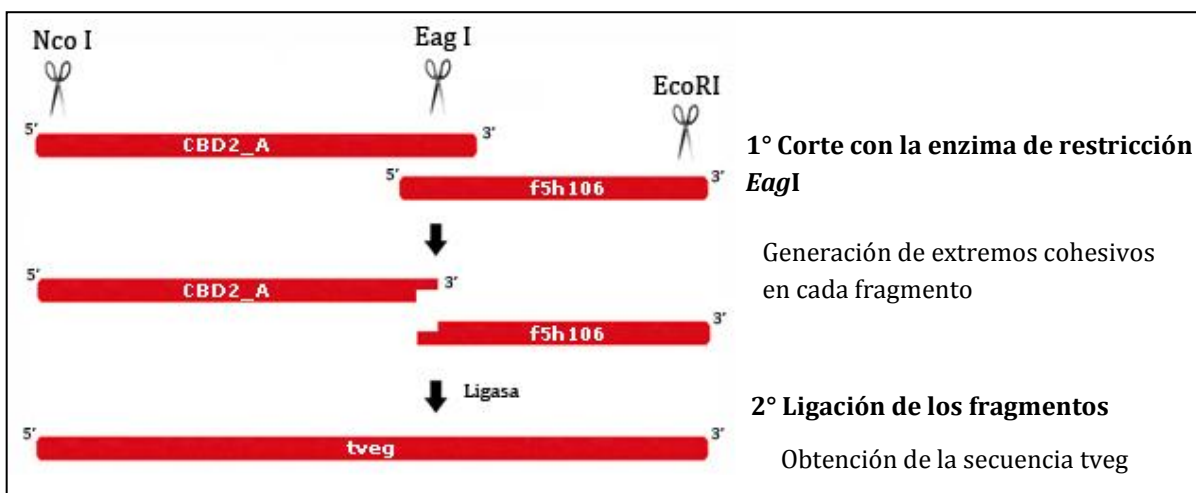


Figura 3.2. Estrategia para obtener la secuencia tveg. La estrategia consistió en cortar ambos fragmentos con la enzima de restricción *EagI*, para luego ligarlos, obteniéndose la secuencia continua del gen de una endoglucanasa de *T. versicolor*.

Aun cuando en la Figura 3.2 no se muestra, cada fragmento está clonado en el vector pGEM®-T Easy, entre los sitios de restricción de *EcoRI*. Por lo tanto, para extraer a los fragmentos del plasmidio se debe hacer una digestión doble. La zona común de ambos fragmento se corta con la misma enzima, *EagI*, y los extremos no comunes se cortan con otras enzimas, diferentes entre sí, de manera de evitar generar extremos cohesivos y que los fragmentos se unan a través de ellos. Por lo anterior, el fragmento CBD2_A se cortó con la enzima *NcoI* en el extremo 5' y *EagI* en el extremo 3'; y

el fragmento f5h106 se cortó con *EagI* en su extremo 5' y *EcoRI* en el extremo 3', como explica la Figura 3.2.

3.2.1. DIGESTIÓN DE LOS FRAGMENTOS CBD2_A Y F5H106 CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Los fragmentos CBD2_A y f5h106 se digirieron con las enzimas *NcoI* y *EagI*; y *EcoRI* y *EagI*, respectivamente. La Figura 3.3 muestra los resultados de dicha digestión. En ella es posible ver dos bandas indicadas con flechas, una en el carril 1, cercana a los 396 pb, que corresponde al fragmento f5h106, lo que coincide con el largo de dicha secuencia, que es de 471 pb, pero al cortarla con la enzima de restricción, ésta le quita 67 pb. La otra banda, correspondiente a la digestión doble del fragmento CBD2_A, se ve en el carril 2 a la altura de las 600 pb, consistente con las 665 pb esperadas que tiene el fragmento CBD2_A, menos lo que se pierde por el corte de las enzimas.

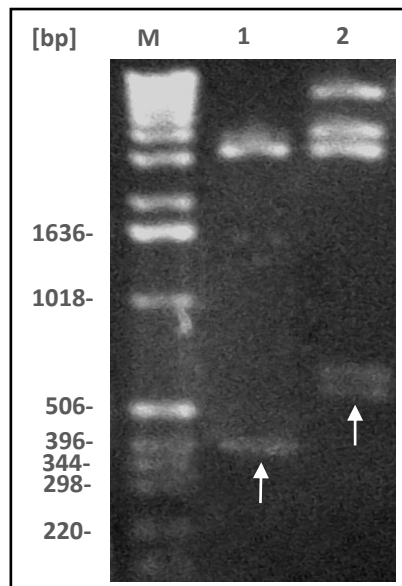


Figura 3.3. Digestión doble de las secuencias CBD2_A y f5h106. Resultado de la electroforesis de los productos de la digestión doble de los fragmentos CBD2_A y f5h106 en un gel de agarosa al 1% m/v. M: marcador de peso molecular. Carril 1: resultado de la digestión doble del fragmento f5H106 con *EagI* y *EcoRI*. Carril 2: resultado de la digestión doble del fragmento CBD2_A con las enzimas de restricción *EagI* y *NcoI*. Las flechas muestran los productos de digestión.

Después de la digestión, los fragmentos, se purificaron desde el gel (Anexo 7.1.6) y luego se ligaron para reconstruir una sola secuencia de la enzima deseada, denominada tveg. Esta secuencia se usó como templado para amplificarla mediante PCR.

Cabe indicar que las enzimas *EagI* y *EcoRI* también cortan al vector en otras zonas [53], lo que podría generar fragmentos diferentes al deseado, pero de un tamaño similar, como se observa en el carril 2 de la Figura 3.3. En consecuencia, al ligarlos también se pudo haber formado secuencias no

deseadas. No obstante, esto no presenta un problema, ya que después de la ligación se hace un PCR con partidores específicos para amplificar la secuencia deseada.

3.2.2. PCR PARA LA OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA TVEG

La secuencia tveg se amplificó mediante PCR con los partidores específicos diseñados, los que además introducen los sitios de restricción para que la secuencia pueda ser clonada en el vector de expresión pPICZ α A. Las bandas obtenidas con el PCR se muestran en la Figura 3.4.

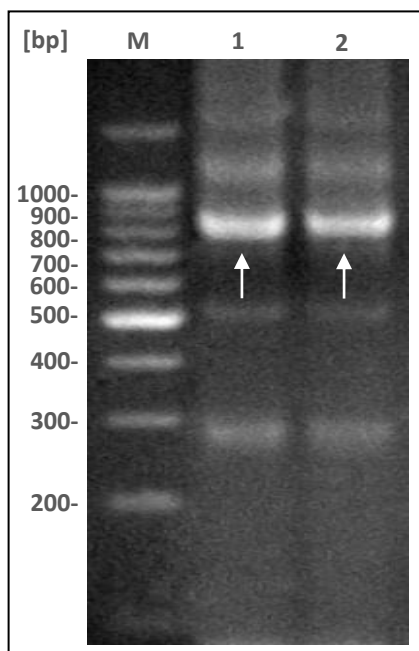


Figura 3.4. PCR para la amplificación de la secuencia tveg. Resultados de la electroforesis de los productos obtenidos de la amplificación de la secuencia tveg con los partidores tveg_Fwd y tveg_Rev en un gel de agarosa al 1%. M: marcador de peso molecular. Carril 1: productos de PCR a 53 °C de temperatura de alineamiento. Carril 2: productos de PCR a 51 °C de temperatura de alineamiento. Las bandas seleccionadas se indican con las flechas blancas.

Primero se realizó un PCR a tres temperaturas de alineamiento cercanas a la temperatura de hibridación de los partidores: 57, 59 y 61 °C, pero no se obtuvo bandas. Entonces, se hizo un nuevo PCR, en el que la temperatura de hibridación se disminuyó a 51 y 53 °C, con el propósito de generar una mayor cantidad de interacciones, aunque dentro de ellas pudiera haber interacciones no deseadas. De hecho, como es posible ver en la Figura 3.4, en los dos PCR se obtuvo los mismos productos: dos bandas mayores a 1000 pb, una banda bien marcada entre los 800 y 900 pb, otra más tenue cercana a los 500 pb y la última alrededor de las 300 pb. En el Anexo 7.2.2 se puede ver que el largo de la secuencia deseada es de 823 pb, por lo que la banda indicada con la flecha fue la seleccionada y purificada desde el gel (ver 7.1.6).

Para comprender la formación de las bandas no deseadas, más allá de la disminución en la temperatura de hibridación, se verificó el alineamiento de partes de los partidores con la secuencia. De esto se observó que un trozo del partidador antisentido alineaba en otras dos zonas de la secuencia, lo que no se previó al momento de diseñarlos, pues sólo se corroboró cómo alineaban los partidores enteros entre sí, pero no partes de ellos. Aunque este no es el caso, es posible que se formen productos no deseados de tamaño similar al que se requiere, por lo que este punto debiese ser considerado en futuros estudios para evitar problemas de este tipo.

3.2.3. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA TVEG

La secuencia obtenida de la purificación del gel se clonó en el vector pGEM-T Easy y se envió a secuenciar. El resultado del secuenciamiento fue analizado utilizando las herramientas BLASTX y CDD, como se indicó en la metodología. Antes de analizar la secuencia se le eliminó las secuencias correspondientes al vector de clonación que rodeaban el inserto.

El análisis con BLASTX arrojó como resultado que la secuencia en cuestión tiene un alto grado de similitud con varias endoglucanasas, siendo la endoglucanasa EIW57949.1 del hongo *T. versicolor* la con mayor similitud, con un *e-value* de 9×10^{-157} y 90% de identidad, descrita recientemente [54]. Cabe mencionar, que EIW57949.1 es la misma secuencia con la que alinearon los fragmentos por separados, por lo que se corrobora que la digestión de los fragmentos, la ligación de ellos y la amplificación de la secuencia funcionaron correctamente, generando la secuencia de la enzima deseada.

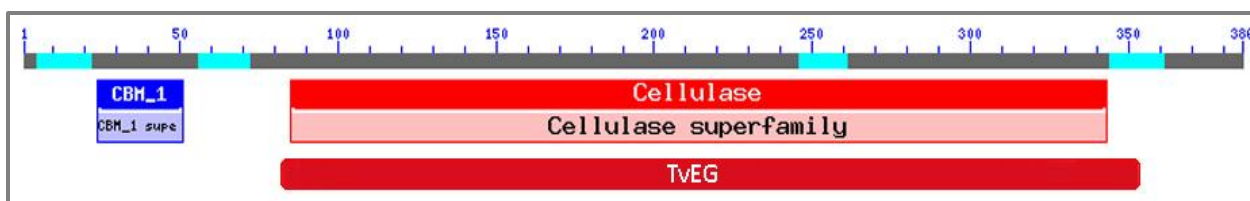


Figura 3.5. Resultados de la comparación de dominios conservados utilizando la herramienta CDC, para la secuencia TvEG. Barra en rojo es la TvEG. En color rosa el sitio catalítico y en azul el sitio de unión a carbohidratos de una endoglucanasa del hongo *T. versicolor*. La barra gris con números azules enumera los aminoácidos. Se usó el marco de lectura +3 para el alineamiento.

La búsqueda de dominios conservados se realizó usando el marco de lectura +3. Con ello, se obtuvo que la secuencia posee similitud con un dominio de la familia 5 de las GHs con un *e-value* asociado de 1.32×10^{-17} , como se muestra en la Figura 3.5

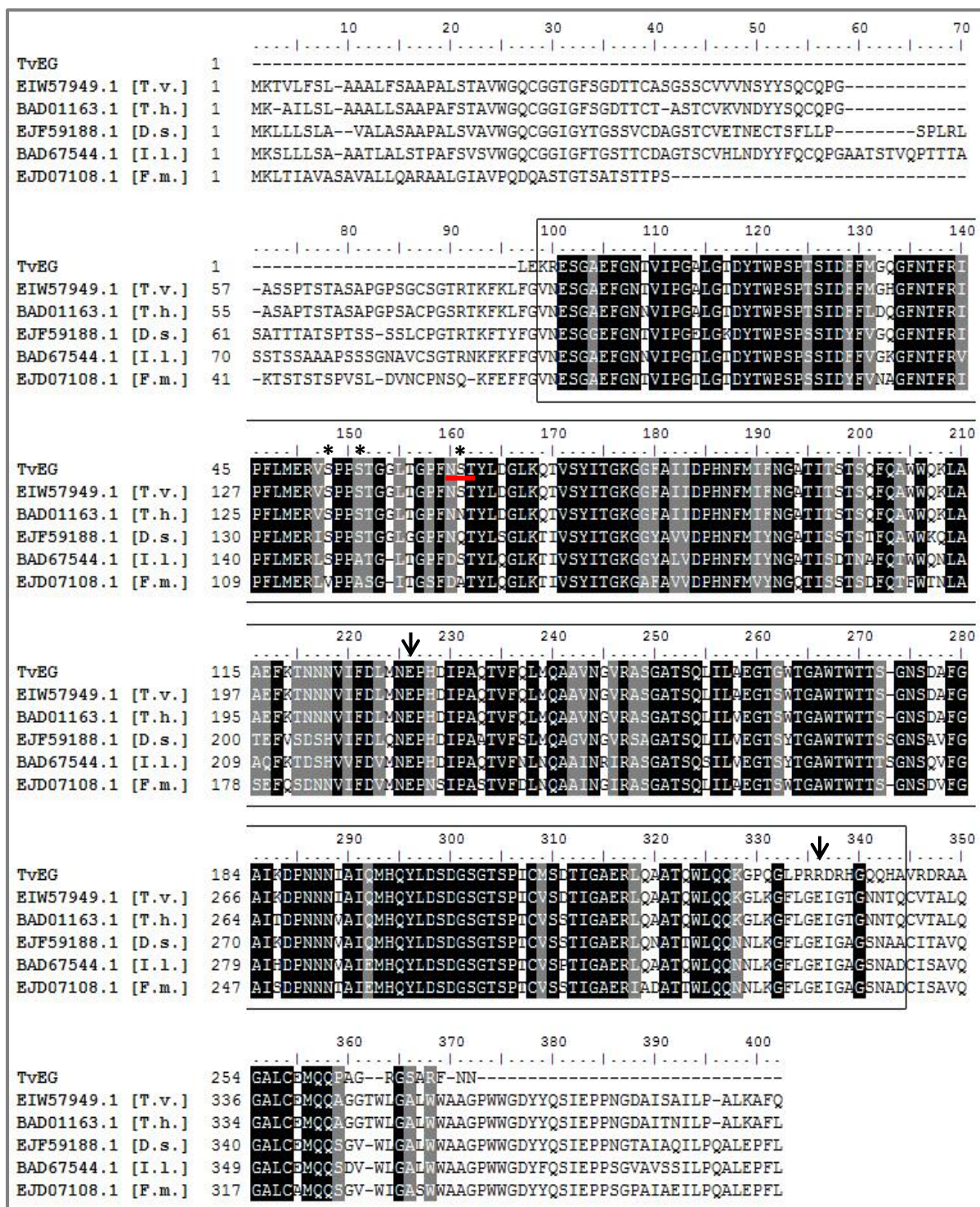


Figura 3.6. Alineamiento de la secuencia TvEG con otras endoglucanasas. Con Bioedit se alineó la secuencia aminoacídica de TvEG con las cinco secuencias que presentaron mayor semejanza con ella en el análisis con BLASTX. Los aminoácidos idénticos se representan en negro y en gris los aminoácidos similares. El enmarcado corresponde al dominio catalítico. Las flechas indican los residuos predichos como catalíticos. Con asteriscos se denotan los sitios posibles de O-glicosilación y en rojo se subraya el sitio posible de N-glicosilación. Las abreviaturas son: T.v., *T. versicolor*; T.h., *T. hirsuta*; D.s., *D. squalens*; I.l., *I. lacteus*; F.m., *F. mediterránea*.

En la Figura 3.5, se ve que la secuencia de la endoglucanasa TvEG contiene en forma completa el dominio catalítico de la enzima, pero le falta el dominio de unión a carbohidratos. Estudios han demostrado que la falta de CBM afecta la actividad sobre sustratos insolubles, pero no así la actividad en sustratos solubles, por lo que la falta del CBM en TvEG no debiese tener gran relevancia en su desempeño con estos sustratos [17,55,56].

El alineamiento entre la secuencia aminoacídica de TvEG y las secuencias con las que se obtuvo mayor semejanza, se muestran en la Figura 3.6. En ella se ve que TvEG es altamente conservada. Usando los servidores NetNGlyc y NetOGlyc se predijo que hay un sitio posible para N-glicosilación y tres sitios para O-glicosilación [57,58]. Además, en la Figura 3.6 se marcaron las posiciones 226 y 336 del alineamiento, que corresponden a residuos conservados del dominio catalítico de la familia 5 de GHs, por lo que se relacionan con la actividad catalítica de estas endoglucanasas. Estos residuos corresponden a ácidos glutámicos pertenecientes a los motivos Asn-Glu-Pro y Glu-X-Gly [59,60]. En la secuencia TvEG obtenida en este trabajo sólo se encuentra el residuo Glu del primer motivo (posición 226), pero el segundo motivo no se conserva y tampoco está presente el ácido glutámico; en su lugar hay una arginina. Esto podría tener efectos en la actividad catalítica de TvEG.

3.3. CLONAMIENTO DE LA SECUENCIA TVEG Y TRANSFORMACIÓN DE *P. PASTORIS*

Al corroborar que la secuencia generada correspondía al gen que codifica para una endoglucanasa del hongo *T. versicolor*, se procede a clonar el gen en el vector pPICZ α A y así introducir el gen en el sistema de expresión *P. pastoris*. En forma nativa TvEG es secretada al exterior de la célula, por lo que se expresó de esa forma.

El sistema de expresión *P. pastoris* se ha usado exitosamente en la expresión de diversas proteínas eucariotas debido a los altos niveles de enzima que expresa y en particular resulta un buen sistema para proteínas que se quieren expresar en forma extracelular [36,38]. *P. pastoris* expresa bajos niveles de proteínas nativas y el procesamiento de proteínas que realiza, como las modificaciones post-traduccionales, son muy similares a los de las proteínas nativas de organismos eucariontes.

Como la proteína se iba a expresar en forma extracelular, se eligió el vector de expresión pPICZ α A, ya que este vector cuenta con la señal de exportación del factor alfa de *S. cerevisiae*. El clonamiento de la secuencia en pPICZ α A se realizó entre los sitios de restricción *Xho*I y *Xba*I del vector, los que se integraron a la secuencia a través de los partidores con los que se amplificó la secuencia, quedando ésta río abajo de la señal de exportación. También, se clonó en el marco de lectura de la cola terminal de histidinas, para tener la opción de purificarla eventualmente. En la Figura 3.7 se muestra un diagrama de cómo quedó clonada la secuencia tveg en el vector pPICZ α A.

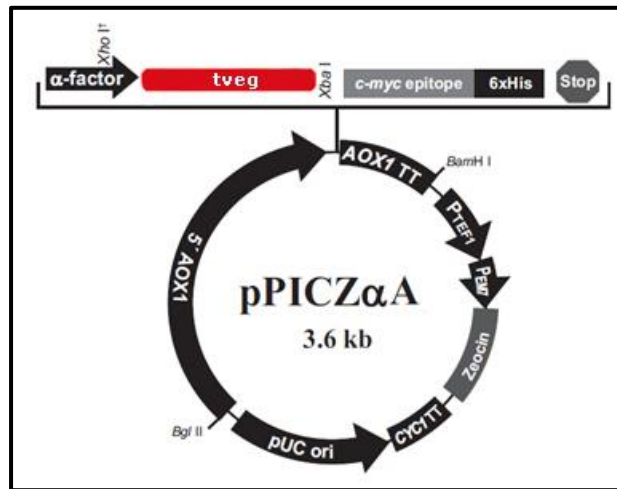


Figura 3.7. Secuencia tveg clonada en pPICZαA [adaptado de 40]. En rojo la secuencia tveg clonada en el vector pPICZαA en los sitios de restricción *XhoI* y *XbaI*, río abajo de α -factor. El clonamiento se hizo en el marco de lectura de la cola terminal de histidinas, para permitir su purificación.

La cepa usada para la expresión de TvEG fue GS115, que es de fenotipo Mut⁺. A esta cepa se le ha silenciado el gen que codifica para la proteína histidinol dehidrogenasa, siendo auxótrofa para histidina, por lo que necesita que se le suplemente histidina a su medio de cultivo. Las cepas Mut⁺ crecen en forma rápida en presencia de metanol, en cambio las cepas Mut^s lo hacen en forma más lenta. Se prefirió expresar la enzima TvEG en una cepa Mut⁺, ya que se quería obtener la mayor cantidad de proteína posible y esto se relaciona directamente con la cantidad de biomasa que se produzca en el medio.

Después de clonar la secuencia se transformó la cepa GS115 con el constructo pPICZαA-TvEG, se dejaron crecer por cuatro días y se escogió una colonia para realizar la curva de inducción.

3.4. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DURANTE LA CURVA DE INDUCCIÓN

Después de seleccionar las células recombinantes, se realizaron dos cultivos con medio BMMY, cada uno inoculado con una colonia de cada cultivo: GS115 control y GS115 recombinante. Los cultivos se dejaron creciendo hasta que tuvieran una DO₆₀₀ entre 2 y 6. Luego, con ese cultivo se inoculó medio BMMY y se realizó un experimento de inducción.

La inducción se realizó por 96 horas, tomándose muestras de 2 ml cada 12 horas, a excepción del segundo punto que se tomó a las 6 h de inducción. De cada muestra se separó la parte extracelular de la intracelular por medio de centrifugación.

Como se explicó en la metodología, se hizo dos curvas de inducción: la primera para verificar si la enzima estaba siendo expresada y secretada, y la segunda para definir el nivel de expresión de la

enzima. Para confirmar la expresión y secreción de la enzima se analizó las muestras en gel de agarosa con CMC y para identificar el nivel de expresión de la enzima se realizó ensayos de actividad sobre CMC y geles proteína SDS-PAGE y zimogramas.

En las siguientes secciones se muestran los resultados de los ensayos realizados.

3.4.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD EN GEL DE AGAROSA-CMC

Para este ensayo se agregó, en triplicado, alícuotas, de 3 μ l del sobrenadante de cada muestra de los cultivos de las cepas control y recombinante a una placa que contiene agar con 1% de CMC (ver detalle en 7.1.10). Si la muestra contiene endoglucanasas, éstas degradarán la CMC del agar, lo que se notará cuando se tiñan las placas con Rojo Congo y posteriormente se laven con una solución de cloruro de sodio, pues las zonas donde fue degradado CMC se desteñirán, quedando blancas.

En la Figura 3.8 se muestra los resultados de los ensayos de actividad en gel de agarosa-CMC de la fracción extracelular de las cepas GS115 control y recombinante. Cada imagen corresponde a la foto de una de las alícuotas.

En la Figura 3.8 se ve que las muestras de cultivo de la cepa recombinante con TvEG (filas B) dejan halos en el agar sin tinción de tamaño considerable, lo que indica que la enzima degradó la CMC del gel. Por el contrario, se observa que la cepa control de cada cultivo (filas A) no presenta actividad cuantificable, pues no hay presencia de halos. Este resultado entonces, confirma que hay expresión y secreción de la enzima TvEG al medio extracelular en forma activa.

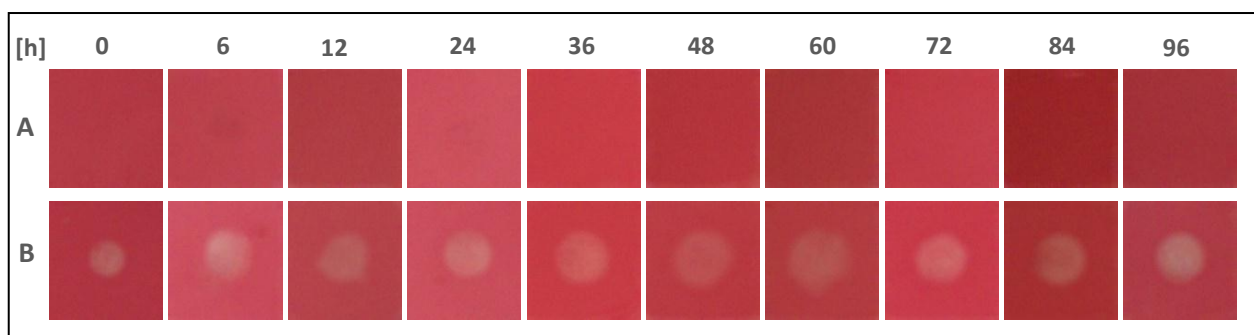


Figura 3.8. Ensayo de actividad endoglucanasa sobre agar-CMC de las enzimas extracelulares producidas por la cepa GS115. Ensayo de actividad sobre CMC al 1%. Fila A: Cepa control (pPICZ α A). Fila B: Cepa recombinante (pPICZ α A-tveg). Los tiempos de inducción se indican sobre cada cuadro. Los halos sin tinción son las zonas en que el CMC fue degradado.

La Figura 3.8 permite ver que en las muestras de la cepa GS115 recombinante hay expresión enzimática antes de la inducción, puesto que ya desde las 0 h hay halos, lo que debe ser porque esta curva de inducción se comenzó inoculando medio de cultivo puro con medio de cultivo en el que ya se había cultivado la cepa, siendo factible que aún sin inducción se haya expresado la proteína TvEG. Otra posibilidad es que la muestra se sacó después agregar metanol y se guardó a 4 °C hasta obtener

el último punto, tiempo en el que la cepa pudo haberse seguido induciendo, aunque en forma más lenta debido a la baja temperatura.

Gracias a este ensayo se pudo corroborar, en forma cualitativa, que hay expresión activa de la endoglucanasa TvEG. Los análisis cuantitativos y comparaciones más objetivas se obtendrán a partir del ensayo de hidrólisis en CMC y los geles de proteínas.

3.4.2. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN MEDIO LÍQUIDO

El objetivo de este ensayo fue determinar cuantitativamente la actividad enzimática de la enzima recombinante en el medio extracelular e intracelular y así averiguar si la enzima es secretada al exterior en forma adecuada, por lo que, se midió la actividad enzimática en estas dos fracciones. Para analizar las enzimas presentes en el medio intracelular fue necesario lisar las células como se explicó en 2.2.9.

El ensayo consistió en la medición de los azúcares reductores producidos luego de una reacción de hidrólisis sobre CMC. Para cuantificar los azúcares reductores obtenidos se utilizó el método DNS, en el que la absorbancia obtenida es directamente proporcional a la cantidad de azúcares reductores generados (ver detalles en la sección 2.2.9.2). La elección de CMC como sustrato se debió a que, como posee un alto grado de polimerización, se suele utilizar para la identificación de endoglucanasas; además su solubilidad permite trabajar con él fácilmente [61].

Para cada punto de la curva se realizaron dos mediciones, por lo que los resultados corresponden a un promedio entre dos valores. Además, los resultados fueron sometidos al modelo estadístico t-Student para definir su nivel de significancia.

3.4.2.1. EXPRESIÓN EN LAS FRACCIONES INTRA Y EXTRACELULAR

En la Figura 3.9 se muestran los resultados de la actividad enzimática de la cepa GS115 en el medio extracelular (A) y en el medio intracelular (B). Cada gráfico contiene los resultados de la cepa recombinante y de la cepa control transformada con el vector vacío.

En las curvas se han considerado los azúcares reductores que podrían haber estado presentes en el medio de cultivo, ya que al valor de absorbancia de cada muestra se le restó la absorbancia de su blanco, para así representar fidedignamente la actividad de la o las enzimas endoglucanasas expresadas por las cepas.

La Figura 3.9 A presenta la actividad endoglucanasa en el medio extracelular de la cepas GS115 recombinante y control. En ambas cepas se observa actividad enzimática, pero la actividad en la cepa recombinante es significativamente mayor que en la cepa control. La curva de actividad de la

cepa recombinante (cuadrados) va en aumento a una tasa constante hasta las 72 horas de inducción, punto en el que alcanza su *peak* correspondiente a 4,5 U/l de cultivo y luego la actividad decae prácticamente a la misma tasa con la que aumentó; en cambio, la actividad en la cepa GS115 control nativa (rombos) va en aumento hasta las 24 h de inducción, para luego mantenerse hasta las 60 h de inducción en un plató de aproximadamente 1,4 U/l de cultivo y posteriormente la actividad comienza a disminuir.

La detección de actividad enzimática en la cepa control se puede explicar a partir de la presencia de GHs en la cepa GS115 de *P. pastoris*. Al analizar el genoma de *P. pastoris* en CAZy se encuentran enzimas de diversas familias de esta clase de enzimas; en particular, hay enzimas pertenecientes a las familias 5 y 45, en las que se han detectado actividad endoglucanasa (E.C. 3.2.1.4) [62].

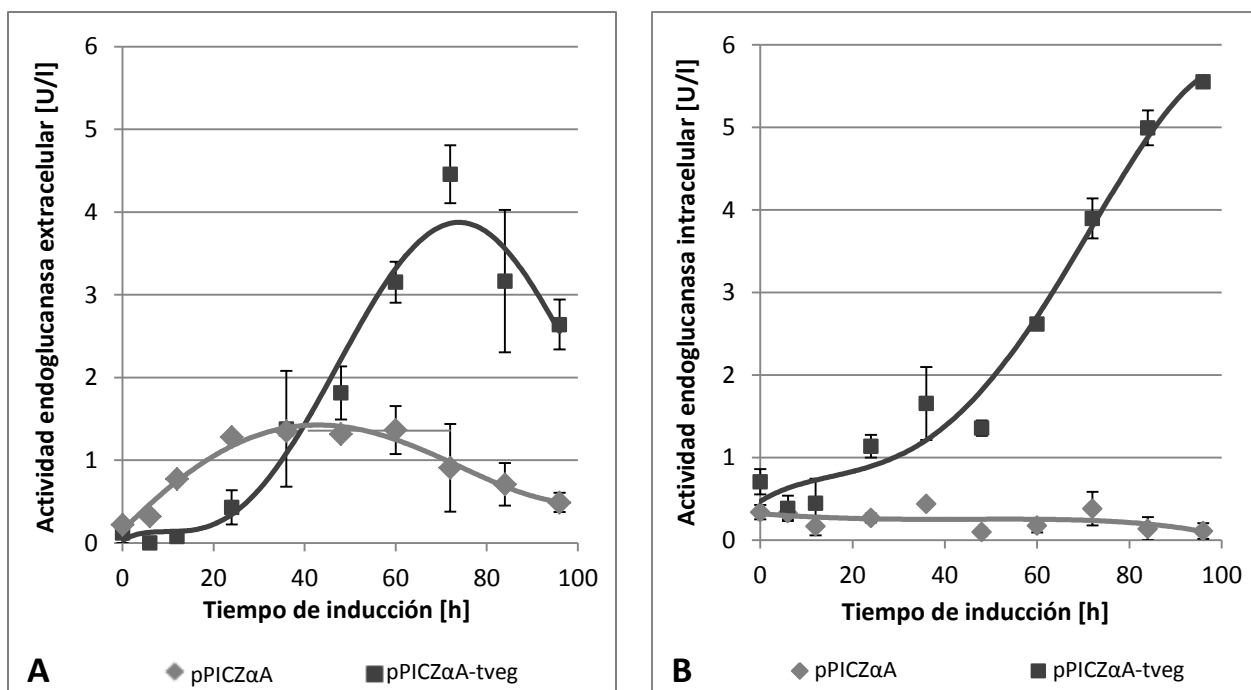


Figura 3.9. Curva de actividad endoglucanasa sobre CMC en las fracciones extracelular e intracelular de cultivos de la cepa GS115 recombinante y control, a distintos tiempos de inducción con metanol. El ensayo de hidrólisis de CMC al 1% se realizó durante 15 horas. Las células fueron inducidas en BMMY durante el tiempo indicado. (A) Fracción extracelular de *P. pastoris* GS115 control (pPICZαA) y recombinante (pPICZαA-tveg). (B) Fracción intracelular de *P. pastoris* GS115 control (pPICZαA) y recombinante (pPICZαA-tveg). Las barras de error corresponden al error estándar.

De lo anterior, se puede inferir que parte de la actividad enzimática presente en la cepa recombinante se debe a la acción de enzimas nativas de *P. pastoris*, pero se descarta que dicha actividad sea considerable respecto de la actividad de la proteína recombinante, debido a que las curvas de actividad de ambas cepas presentan una diferencia estadísticamente significativa. Esto se observa en la Tabla 3.1, donde se ve que desde las 48 h de inducción, la mayoría de los resultados

poseen un intervalo de confianza mayor al 95%. Por lo tanto, es posible que una pequeña parte de la actividad tenga relación con actividad enzimática endógena de *P. pastoris*, pero la mayor parte está relacionada con actividad de la enzima recombinante.

De la misma forma, al observar la actividad de la porción intracelular de la cepa GS115 en la Figura 3.9 B, se ve que la curva de la cepa control presenta una actividad prácticamente nula, mientras que la actividad de la cepa recombinante aumenta en forma constante hasta las 96 h de inducción, punto en el que alcanza un máximo de actividad de 5,6 U/l de cultivo. Al observar la Tabla 3.1, se puede ver que los valores desde las 48 h de inducción presentan un intervalo de confianza no menor al 99%, validando los resultados.

Tabla 3.1. Significancia estadística de los resultados de actividad enzimática en las porciones extra e intracelular de la cepa GS115

Tiempo de inducción [h]	Intervalo de confianza [%]									
	0	6	12	24	36	48	60	72	84	96
Medio extracelular	50	100	98	95	3	74	96	97	89	98
Medio Intracelular	83	23	6	97	89	99	100	99	100	100

Así, se corrobora que la expresión recombinante ha sido exitosa y por otro, se puede decir que la cepa control secreta el total de la(s) endoglucanasa(s) nativas que expresa en forma basal.

Por otra parte, al contrastar las curvas de actividad de la fracción extracelular e intracelular de la cepa GS115 recombinante, se observa que son muy similares hasta las 72 h de inducción e incluso presentan valores de actividad semejantes. Pero de las 72 h de inducción en adelante, se comienza a notar una diferencia en las curvas, puesto que, la actividad en la porción extracelular comienza a disminuir, mientras que la actividad en la porción intracelular continúa en aumento. Esta diferencia puede deberse a que la cepa haya saturado la maquinaria de secreción, generando una acumulación de TvEg en el medio intracelular o que la enzima secretada al medio extracelular haya sufrido proteólisis y que la enzima retenida en el medio intracelular no.

Para confirmar o descartar la segunda opción en los siguientes experimentos, se podría usar uno o más inhibidores de proteasas, como por ejemplo PMFS y/o Leupeptina, o, como recomienda el manual, usar ácidos Casamino con un medio amortiguado o los medios MGYH (*Minimal glicerol containing histidine medium*)/MMH (*Minimal methanol containing histidine medium*), que, contrarios a los medios usados, no tienen un amortiguador del pH, por lo que al crecer *P. pastoris*, el pH del cultivo bajaría inhibiendo las proteasas, aunque sería necesario verificar que la disminución del pH no provoque una disminución en la actividad de la endoglucanasa. Para evitar problemas de estabilidad de TvEG, se puede realizar un cultivo a un pH más bajo, pero fijo. Charoenrat et al. [63],

expresó una endoglucanasa en *P. pastoris* con cultivo a pH 5, con lo que se inhibió la actividad proteolítica, que si fue observada a pH 6.

Por otro lado, se determinó la distribución de TvEg en las fracciones intra y extracelular, para lo que se calculó el porcentaje de actividad en estas fracciones respecto del total obtenido en la cepa GS115 recombinante. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 3.2.

De la Tabla 3.2 se extrae que, en general, tiende a haber un mayor porcentaje de enzima en el medio intracelular, aunque hay puntos en que el porcentaje de expresión es casi equivalente en ambos medios. Esto indica que ha funcionado la señal de exportación del plasmidio pPICZ α A en esta cepa, pero algo ocurre en el sistema de secreción que no permite la secreción de toda la TvEG que se está produciendo. Resulta difícil indicar qué pudo haber ocurrido para explicar esto, pues no hay registros en literatura de problemas con la señal de exportación en este sentido, más aún, muchos estudios han expresado celulasas en *P. pastoris* en forma exitosa, usando el mismo sistema de expresión extracelular, con el mismo vector y la misma señal de exportación que los utilizados en este trabajo, sin registrar que parte de la actividad haya permanecido en la fracción intracelular [50,64,65,66,67]. Aun así, puede ser que en este caso particular la señal no funcione adecuadamente, para lo que se podría usar la señal nativa de *T. versicolor*

Tabla 3.2. Distribución de la actividad de TvEG en el medio intracelular y extracelular de GS115.

Tiempo de inducción [h]	Actividad [%]									
	0	6	12	24	36	48	60	72	84	96
Medio extracelular	15	0	15	28	45	57	55	53	39	32
Medio Intracelular	85	100	85	72	55	43	45	47	61	68

En Salinas et al. [64], se expresó la misma enzima TvEG, pero en forma completa (es decir, contiene el dominio CBD) y con la misma metodología aplicada en este estudio. Los resultados de dicho trabajo sólo mostraron actividad en la fracción extracelular. Por esto, se cree que en este caso, no haber expresado la proteína completa pudo haber provocado problemas de plegamiento, lo que impidió que la proteína pudiese ser procesada adecuadamente para su exportación. El retículo endoplásmico tiene sistemas de control de calidad que retienen a las proteínas si no se han plegado bien y no permiten su exportación hasta que alcancen su correcto plegamiento, lo que podría retrasar o impedir su continuación en la ruta secretoria [68]. Una manera de confirmar este punto sería expresar la enzima en forma intracelular, para que así no pase por el sistema de exportación, o realizar una nueva construcción con la secuencia completa.

3.4.2.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TOTAL

Dado que la cepa recombinante presentó actividad endoglucanasa en las porciones extra e intracelular, se sumó la actividad de las dos fracciones punto a punto, con el objetivo de observar la actividad endoglucanasa total.

Gracias a la Figura 3.10, es posible ver que la actividad en la cepa GS115 recombinante aumenta constantemente hasta las alcanzar un *peak* entre las 72 y 84 h de inducción, cercano a 8,3 U/l de cultivo. Además, se ve que la actividad en la cepa control no sobrepasa las 2 U/l de cultivo, correspondiente a menos de un 22% de la actividad obtenida en la cepa recombinante. Además, dado que el intervalo de confianza de cada fracción de la cepa GS115 resultó ser mayor a 95% para la mayoría de los valores después de las 48 h, la suma de esos valores también será estadísticamente significativa.

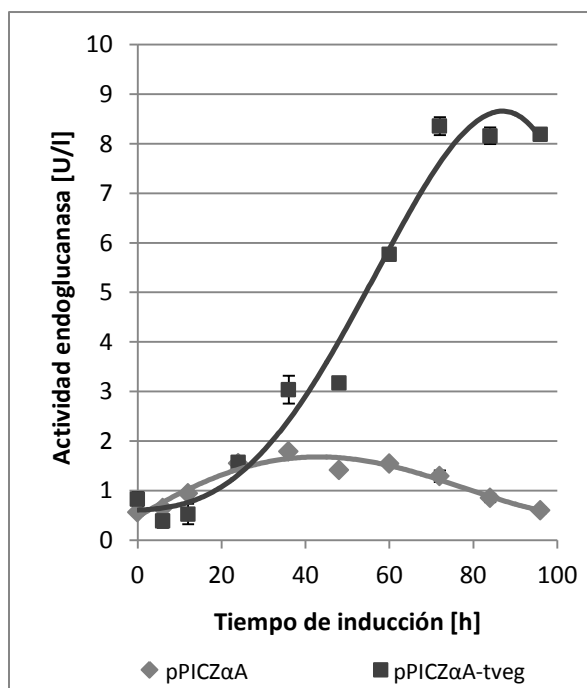


Figura 3.10. Cinética de producción total de endoglucanasa en la cepa GS115 a distintos tiempos de inducción con metanol. *P. pastoris* GS115 control (pPICZαA) y recombinante (pPICZαA-tveg). Las barras de error corresponden al error estándar.

Aun cuando la expresión recombinante fue exitosa, es necesario hacer mejoras en cuanto al nivel de actividad endoglucanasa, pues éste, comparado con otros estudios, es muy bajo.

Existen diversos trabajos donde se expresan endoglucanasas de en *P. pastoris* con niveles de actividad que varían entre las 222 U/l de cultivo hasta las 25.000 U/l de cultivo [50,55,63,65,69,71]. Sólo se encontró un estudio, donde se expresa una endoglucanasa del molusco *Ampullaria crossean*

en *P. pastoris* y obtienen cerca de 10 U/l de cultivo y lo justifican por la diferencia en el uso de codones entre las dos especies [7256], lo que se podría aplicar a este caso.

Si bien, al comparar el uso de codones en *T. versicolor* y *P. pastoris* en el servidor Codon Usage Database [73] se ve que hay diferencias en el uso de codones, se cree que esta explicación es poco probable, pues O'Callaghan et al. [74] y Stapleton et al. [75], han expresado una celobiosa deshidrogenasa y una lacasa, respectivamente, de *T. versicolor* en *P. pastoris*, con altos niveles de actividad, lo que indicaría que la diferencia en el uso codogénico entre estas especies no debiera ser un factor que limite el nivel de expresión de TvEG. Aunque, en caso de que otras estrategias fallaran, no se debería descartar por completo este punto.

Como otras posibles razones de este bajo nivel de actividad, surge el hecho de que TvEG no contiene el CBD, sin embargo estudios han mostrado que la actividad endoglucanasa sobre CMC de la misma enzima con y sin CBD es prácticamente igual [17,55,56]. Más aun, en Salinas et al. [64], donde TvEG fue expresada en forma recombinante y completa, incluyendo el CBD, se obtuvo 18 U/l de cultivo, lo que corresponde apenas a un poco más del doble de la actividad obtenida en este trabajo, pero todavía sigue estando muy por debajo de los niveles de actividad ejemplificados anteriormente.

Por otra parte, en la sección 3.2.3 se pudo ver que a TvEG le falta uno de los residuos catalíticos conservados en el dominio catalítico de la familia 5, lo que podría implicar una disminución en la actividad. Dado que en Salinas et al., TvEG si contenía este residuo, esto tampoco justificaría el bajo nivel de actividad obtenido. No obstante, la diferencia de actividad entre TvEG expresada en este estudio y TvEG expresada en Salinas et al, puede deberse a estas dos diferencias entre estas enzimas: la falta del CBD y de uno de los residuos catalíticos.

Descartadas las opciones anteriores, se piensa que se pudo haber trabajado con una colonia que no corresponde a la mejor colonia recombinante, pues la colonia usada no se eligió por mostrar mayor actividad endoglucanasa, sino que se escogió por mayor crecimiento. El que este clon no sea uno con alta actividad puede deberse a que posee un bajo nivel de copias del gen [66,70], por lo que se debería usar una mayor concentración de Zeocina para selección una colonia con mayor resistencia (estudios han usado hasta 1000 µg/ml, 10 veces más que lo que usó en este trabajo [70]) para seleccionar clones con mayor número de copias o buscar el clon recombinante con mayor copias del gen a través de un ensayo do blot o Southern blot [48].

Otro tema abordado en varios estudios son las condiciones de inducción y de cultivo de las cepas recombinantes. Por ejemplo, en Li et al. [66] estudiaron el nivel de expresión de una endoglucanasa de *V. volvacea* a diferentes concentraciones de metanol, distintos pH inicial de cultivo, temperatura y encontraron que las condiciones óptimas de 2% de concentración de metanol, pH inicial 7,5 y

temperatura de 28 °C, aumentando en 1,4 veces la producción en con 0,5% metanol, pH inicial 6 y temperatura 30 °C. En O'Callaghan et al. [74] notaron que el pH en el medio de cultivo BMM, a pesar de tener amortiguador de pH, no lo mantiene constante durante la inducción, bajando de 6 a 3. Por ello, suplementaron el medio de cultivo con alanina, que neutraliza los productos ácidos del metabolismo del metanol, manteniendo el pH constante durante todo el periodo de inducción. Con ello se incrementó al triple la producción de la proteína recombinante, no solo por un aumento en la biomasa, sino que también por mayor estabilidad de la enzima a ese pH. Stapleton et al. [75] también controlaron el pH con alanina y además usaron deflectores en los matraces, lo que ayudó en la aireación del cultivo, pues es necesario un alto nivel de oxígeno para la oxidación del metanol. Así, llegaron a quintuplicar el nivel de expresión obtenido en otros estudios. Sobre este punto, el manual de expresión también indica que al hacer un escalamiento del cultivo en un fermentador se pueden obtener mejores resultados [48].

También, el manual indica que hay proteínas que se expresan mejor en un fenotipo que en otro [48]. Un trabajo, mostró bajo nivel de expresión de una endoglucanasa en la cepa GS115, pero altos niveles en la cepa mut^s KM71H [69]. Por lo demás, muchos otros han usado esta cepa para expresar proteínas exitosamente [50,55,69,76,77]. Por ello, se recomienda probar la expresión en esta cepa.

Como última alternativa a explorar, puede ser que TvEG haya formado cuerpos de inclusión, aunque en realidad esto no se ha evidenciado en *P. pastoris*. Hay estudios que han logrado recuperar proteínas activas desde cuerpos de inclusión, replegando la proteína [78].

Una conjunción de varias de las medidas mencionadas podría implicar grandes mejoras en la expresión de TvEG.

3.4.3. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LA EXPRESIÓN DE TVEG EN *P. PASTORIS*.

En la siguiente sección se mostrarán los geles de proteínas SDS-PAGE y los zimogramas de las muestras extracelulares e intracelulares de las cepas control y recombinante. En los zimogramas las bandas de color blanco indican la actividad endoglucanasa, puesto que la enzima degradó el CMC de esa zona y debido a eso la zona no se tiñe con Rojo Congo, quedando más clara que el resto

3.4.3.1. EXPRESIÓN EXTRACELULAR EN LA CEPA GS115

En la Figura 3.11 A y B se muestran los geles de la electroforesis de proteínas del medio extracelular de la cepa GS115 control y recombinante, respectivamente. Al comparar ambos geles es posible detectar la presencia de dos bandas en la cepa recombinante. Una de ellas, a la altura de los 90 kDa aproximadamente (banda 2), que se puede ver desde las 72 h de inducción, con un aumento constante hasta las 96 h y otra banda, cercana a los 60 kDa (banda 3), que se ve aparecer en el gel de

cepa recombinante (Figura 3.11 B) a las 12 h de inducción y se mantiene hasta las 96 h, observándose un *peak* a las 72 h de inducción.

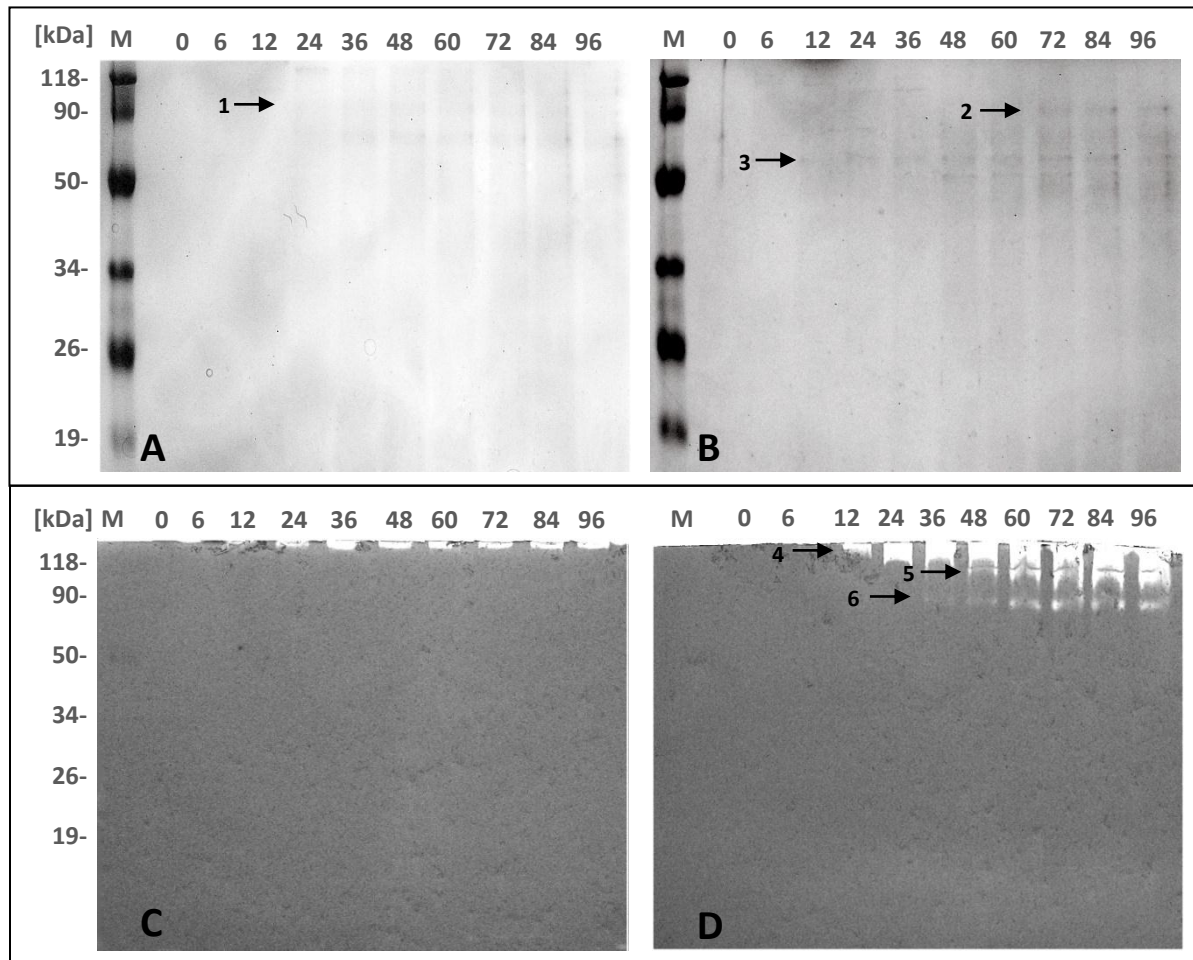


Figura 3.11. Análisis electroforético de la fracción extracelular de cultivos de las cepas GS115 control y recombinante, a distintos tiempos de inducción. (A y B) SDS-PAGE de *P. pastoris* GS115 control (pPIZCαA) y *P. pastoris* GS115 recombinante (pPIZCαA-tveg), respectivamente. (C y D) Zimogramas de *P. pastoris* GS115 control (pPIZCαA) y *P. pastoris* GS115 recombinante (pPIZCαA-tveg), respectivamente. M: marcador de peso molecular. Sobre los pocillos se indican las horas de inducción. Las flechas indican bandas de relevancia para la discusión (ver texto).

En la Figura 3.11 C y D, se muestran los zimogramas de la fracción extracelular del cultivo de la cepa GS115 control y recombinante respectivamente. En ellas se puede notar que hay actividad significativa en la cepa recombinante, pues se distinguen diversas bandas con actividad endoglucanasa, respecto de la cepa control. En la Figura 3.11 D es posible diferenciar tres bandas, una en la parte superior del gel sobre los 118 kDa (banda 4), otra de peso molecular cercano a los 100 kDa (banda 5) y una alrededor de los 90 kDa (banda 6). Aun cuando cada banda presenta un comportamiento diferente, se observa que en conjunto la actividad enzimática va en aumento desde las 12 h de inducción, alcanza un *peak* a las 72 h de inducción y luego decae suavemente, así como también se observó en el ensayo de actividad en medio líquido (Figura 3.9 A). La presencia de más

de una banda con actividad en el zimograma de la Figura 3.11 D se puede explicar si se considera que la enzima pudo haber sido glicosilada de forma heterogénea o que haya sufrido proteólisis que dieron origen a proteínas más cortas, pero activas.

Si bien las bandas 4 y 5 no se pueden relacionar con las bandas observadas en gel SDS-PAGE, la banda 6 se puede relacionar con la banda 2 del gel SDS-PAGE, dado que migraron hasta el mismo punto de su respectiva referencia. Esto indicaría en forma preliminar que la banda 2 correspondería a TvEG. Sin embargo, una banda con migración similar a ésta aparece muy tenuemente en la cepa control (banda 1), por lo que los resultados no son totalmente contundentes y se espera aclarar lo observado con los resultados de la fracción intracelular.

No obstante, los zimogramas demuestran claramente que hay actividad endoglucanasa en la fracción extracelular de la cepa recombinante, que se destaca respecto de la cepa nativa, lo que confirma los resultados del ensayo de hidrólisis de CMC en medio líquido.

3.4.3.2. EXPRESIÓN INTRACELULAR EN LA CEPA GS115

En la Figura 3.12 A y B se muestran los geles SDS-PAGE de la cepa control y recombinante, respectivamente. Observando la Figura 3.12 A se ve que la expresión de las proteínas intracelulares en la cepa control es relativamente constante en el transcurso del tiempo de inducción, sin notarse aumentos o disminuciones en el nivel de expresión que sean relevantes. Como la cepa recombinante sólo se diferencia de la cepa control en que posee el vector con el inserto, es de esperar que el patrón de proteínas sea parecido entre ellas, distinguiéndose sólo por la presencia de las enzimas recombinante. Sin embargo, cuando se contrasta la Figura 3.12 A con la Figura 3.12 B no se aprecia dicho fenómeno, si no que más bien los perfiles son bastante disímiles. Es probable que esta diferencia se deba a diferente cantidad de proteína cargada en el gel, dado que los geles se cargaron según volumen y no según cantidad de proteína.

Analizando la Figura 3.12 B se observan dos bandas con una migración muy similar a las bandas que se observaron en la fracción extracelular (Figura 3.11 B). Una de las bandas corresponde a una proteína de peso molecular aproximado de 90 kDa (banda 7), que se puede apreciar desde las 48 h de inducción y su concentración aumenta continuamente hasta las 96 h de inducción y una banda alrededor de los 60 kDa (banda 8), cuya presencia se nota desde las 6 h de inducción y su concentración se mantiene relativamente constante hasta las 96 h de inducción. También aparecen bandas debajo de la banda 8 con un perfil de aparición en el gel muy similar al de la banda 7 (bandas 9 y 10), las que se cree pueden corresponder a degradación por proteólisis de la proteína observada en la banda 7 o especies con diferente glicosilación, lo que se podría comprobar usando espectrometría de masa.

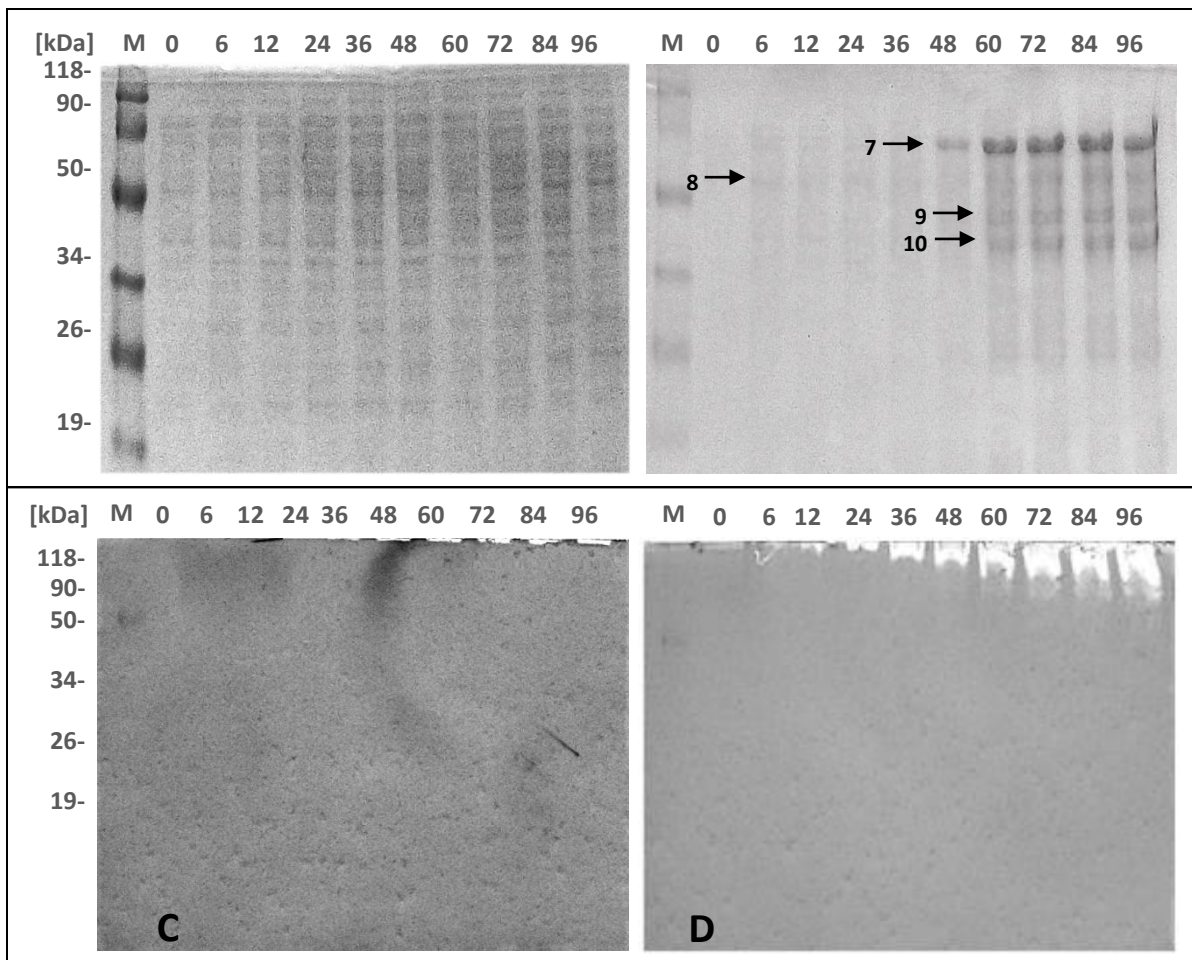


Figura 3.12. Análisis electroforético de la fracción intracelular de cultivos de las cepas GS115 control y recombinante, a distintos tiempos de inducción. (A y B) SDS-PAGE *P. pastoris* GS115 control (pPIZCαA) y *P. pastoris* GS115 recombinante (pPIZCαA-tveg), respectivamente. (C y D) Zimograma *P. pastoris* GS115 control (pPIZCαA) y *P. pastoris* GS115 recombinante (pPIZCαA-tveg). M: marcador de peso molecular. Sobre los pocillos se indican las horas de inducción. Las flechas indican bandas de relevancia para la discusión (ver texto).

En caso de que fuese proteólisis, esto indicaría que TvEG es altamente sensible a la proteólisis, ya que aquí se está observando la expresión intracelular, donde las proteínas están protegidas de la proteólisis, por lo que estos cortes se tendrían que haber efectuado entre la lisis de la célula y el corrimiento del gel, lo que no fue mayor a dos días

En la Figura 3.12 C se muestra el zimograma de la cepa control GS115 y en la Figura 3.12 D el zimograma de la cepa recombinante GS115. En la primera figura se ve que la cepa control apenas presenta actividad endoglucanasa, pues hay unas zonas casi imperceptibles que no están teñidas. Así, los geles de ambas fracciones muestran actividad en la cepa control sólo en la fracción extracelular, confirmando lo deducido de los ensayos de hidrólisis: que la producción basal de endoglucanasas de la cepa GS115 es completamente exportada al exterior.

A diferencia de la cepa control, las enzimas de la cepa recombinante si generan bandas de actividad, que se observan a partir de las 12 h de inducción y aumentan constantemente hasta las 96 h de inducción, llegando a un nivel muy similar al revelado en el zimograma de la fracción extracelular de esta cepa (Figura 3.11 D). La forma de migración de las enzimas en el zimograma no permite hacer una correlación entre banda y peso molecular, pero permite tener certeza de que se ha expresado la enzima recombinante y que su *peak* se presenta al final de la curva.

Respecto de cuál de las bandas indicadas en Figura 3.12 B correspondería a la enzima TvEG, la consistencia entre el perfil de aparición de la banda 7 en el gel SDS-PAGE (Figura 3.12 B) con el perfil de actividad endoglucanasa observado en el zimograma (Figura 3.12 D) y lo observado en la fracción extracelular, se concluye que la banda 7 es la enzima TvEG. Sin embargo, el peso molecular estimado para la enzima recombinante es de 29,5 kDa y no concuerda con los 90 kDa de peso molecular observado en el gel. Este fenómeno puede tener como explicación la glicosilación de la enzima. Como se indicó en la sección 3.2.3, la secuencia TvEG contiene un sitio para N-glicosilación y tres sitios para O-glicosilación y por otra parte, se ha observado este tipo de glicosilaciones en proteínas expresadas en *P. pastoris* [50,67,74,76]. Dado que el tamaño de los azúcares agregados en cada glicosilación es variable, no es posible hacer una correlación exacta del peso agregado según los sitios de glicosilación [79]. Por otra parte, es posible que la glicosilación haga que la proteína migre con un peso aparente de 90 kDa, pero no necesariamente su peso corresponde a 90 kDa, lo que tendría sentido con la extraña migración que tuvieron las enzimas en los zimogramas. Esto se debe confirmar tratando la enzima con diferentes glicosidasas, como endoglicosidasa F, N-glicosidasa F o endoglicosidasa H [48,74,76].

Si bien en la mayoría de los casos la glicosilación no aporta más de 15 kDa [79], en la literatura existen antecedentes de la expresión de enzimas en *P. pastoris* con un peso casi el doble al de enzima nativa, donde la principal explicación es la hiperglicosilación, pues al tratarlas con glicosidasas redujeron su peso molecular en hasta 50 kDa [67,80]. Con una reducción de esta magnitud en el peso de la enzima recombinante se acercaría más al peso estimado, aunque habría que desglicosilar la proteína para verificarlo.

Sumado a lo anterior, en varios estudios se ha registrado que el péptido señal no se ha cortado en forma completa, obteniéndose proteínas con hasta 19 aminoácidos de la señal alfa-factor [67,69,81]. En este caso pudo haber ocurrido algo similar, donde se pudo haber obtenido una proteína con más de 19 aminoácidos de la señal de exportación, los que podrían incluir sitios de glicosilación de la señal, aumentando el tamaño de la TvEG de la manera excesiva que se observó. Además, este problema con la señal también podría tener relación con que TvEG no haya sido exportada adecuadamente.

3.5. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE GLICOSIL HIDROLASAS DEL HONGO *T. VERSICOLOR*

Por otra parte, se estudió la cinética de producción de la enzima en forma nativa del hongo *T. versicolor*, para luego hacer una comparación con el sistema recombinante.

Para ello, primero se hizo un estudio preliminar con tres fuentes de carbono distintas, para determinar cuál funciona mejor como inductor de la producción de endoglucanasas y cuál es el tiempo de crecimiento al que el hongo presenta su *peak* de producción de celulasas. *T. versicolor* se creció con Avicel, CMC y madera de Lengua como fuentes de carbono. Luego se midió la actividad celulolítica en ensayos de hidrólisis de Avicel y CMC en medio líquido. En general, Avicel se usa para identificar exoglucanasas y CMC para identificar endoglucanasas [61,78,82]. De todas formas es posible que ambas enzimas presenten algún grado de actividad en los dos sustratos.

3.5.1. PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

En las Figura 3.13, Figura 3.14 y Figura 3.15 se muestran las curvas de producción de actividad endoglucanasa del hongo cultivado por 10 días con las fuentes de carbono indicadas. Cada 24 h se tomó una muestra del cultivo y se realizó ensayos de actividad con Avicel y con CMC.

La Figura 3.13 permite ver la cinética de producción de celulasas del hongo crecido con Avicel como fuente de carbono. Es posible observar que la actividad sobre CMC (cuadrados) presenta un valor máximo de aproximadamente 27 U/l a los 3 días de crecimiento. Luego la actividad comienza a decrecer, pero aparece otro máximo a los 6 días de crecimiento y luego continúa decreciendo. La actividad sobre CMC es aproximadamente 5 veces mayor a la actividad sobre Avicel, pues la actividad de celulasas sobre Avicel alcanza un *peak* de 6,3 U/l de cultivo a los 10 días de crecimiento.

En la Figura 3.14 se presentan la cinética de producción de celulasas del hongo *T. versicolor* cultivado en CMC como fuente de carbono. La actividad sobre CMC (cuadrados) aumenta constantemente hasta los 6 días de crecimiento del hongo y luego comienza a decaer. El *peak* alcanzado es de 225 U/l aproximadamente. En cuanto a la actividad sobre Avicel, ésta va incrementándose hasta los 5 días de crecimiento, punto en el que alcanza un valor de actividad enzimática cercano a 7 U/l de cultivo.

La Figura 3.15 exhibe los resultados de la cinética de producción de celulasas del hongo *T. versicolor* crecido con astillas de Lengua como sustrato. En ella, como en las figuras anteriores, también se observa una mayor actividad sobre CMC que sobre Avicel.

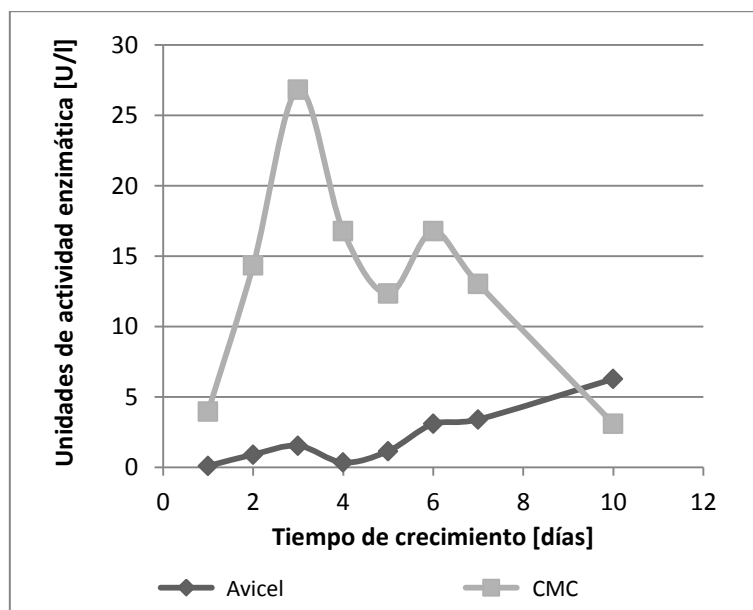


Figura 3.13. Cinética de producción de actividad celulolítica en *T. versicolor* cultivado en Avicel como fuente de carbono. Se midió la actividad enzimática en sobrenadante de un cultivo de *T. versicolor* cada 24 h. Los ensayos contenían 1% de Avicel o CMC.

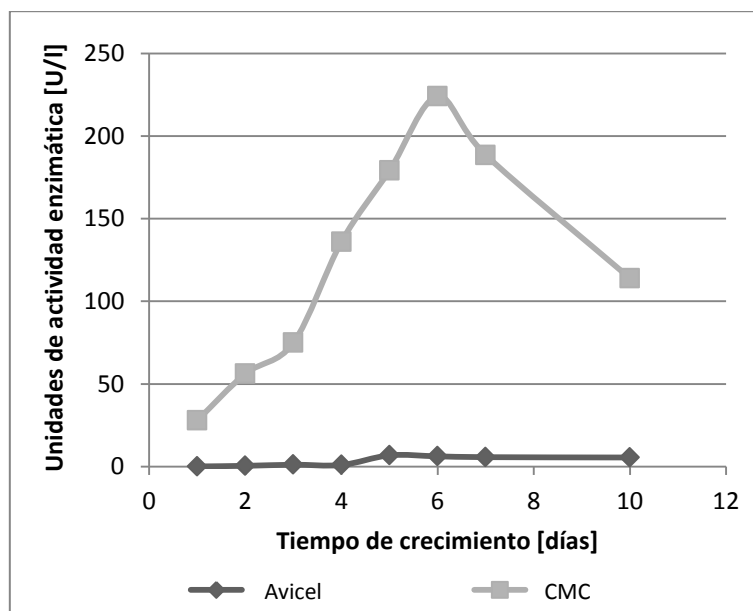


Figura 3.14. Cinética de producción de actividad celulolítica en *T. versicolor* cultivado en CMC como fuente de carbono. Se midió la actividad enzimática en sobrenadante de un cultivo de *T. versicolor* cada 24 h. Los ensayos contenían 1% de Avicel o CMC.

La actividad sobre CMC observada en la Figura 3.15 presenta dos máximos: a los 4 y 6 días de cultivo. La actividad máxima se observa al cuarto día de crecimiento, con un valor aproximado de 10 U/l de cultivo. Un comportamiento muy similar presenta la actividad sobre Avicel, alcanzando un máximo de 3,3 U/l a los 4 días de crecimiento.

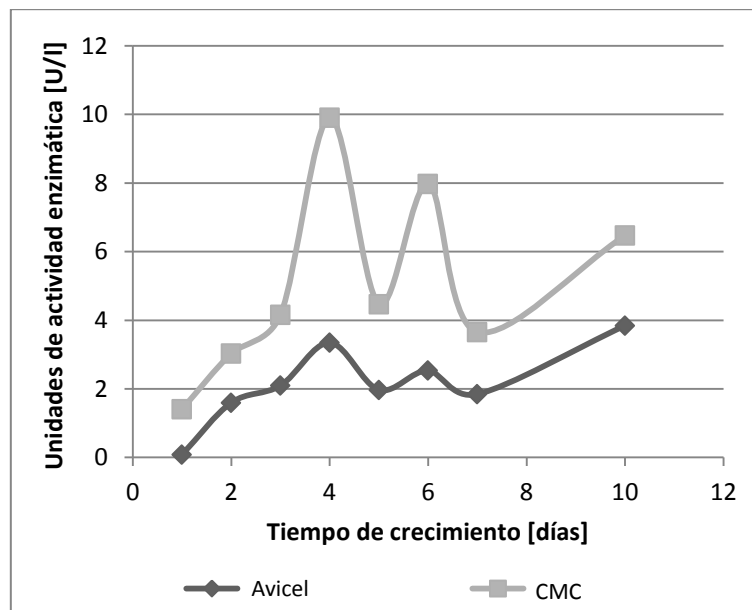


Figura 3.15. Cinética de producción de actividad celulolítica en *T. versicolor* cultivado en astillas de Lengua como fuente de carbono. Se midió la actividad enzimática en sobrenadante de un cultivo de *T. versicolor* cada 24 h. Los ensayos contenían 1% de Avicel o CMC.

Al comparar las tres figuras, se ve que en los tres casos la hidrólisis sobre Avicel muy parecida, sin superar las 7 U/l. En cambio, la hidrólisis de CMC varió dependiendo de la fuente de carbono, pero en los tres casos fue mayor a la hidrólisis de Avicel. Como los sustratos son prácticamente específicos para distinguir endoglucanasas de celobiohidrolasas, este resultado indicaría que *T. versicolor* produce más endoglucanasas que otras celulasas. Valášková et al. [83] también observó mucha mayor actividad endoglucanasa que celobiohidrolasa en medio de cultivo líquido.

Respecto de capacidad de las fuentes de carbono como inductores de la actividad celulosa, CMC fue la fuente de carbono que produjo mayor inducción de celulasas, siendo 8,4 veces mayor que Avicel y 22 veces mayor que Lengua, (comparando los valores de la hidrólisis sobre CMC).

Es probable que la baja inducción de celulasas en medios con madera y Avicel se deba a que son compuestos insolubles, lo que dificulta su acceso a las células [25,28]. En contraste, CMC que es soluble tiene más facilidad para ingresar a la célula e inducir la producción de celulasas

Con este experimento se determina que de las fuentes de carbono estudiadas, la mejor para el crecimiento del hongo *T. versicolor* para obtener mayor producción de celulasas, es crecerlo en CMC y el tiempo óptimo de crecimiento en esta fuente de carbono es de 6 días, cuando es incubado a 28 °C y agitación orbital de 200 rpm.

3.5.2. COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA NATIVA EN *T. VERSICOLOR* Y RECOMBINANTE EN *P. PASTORIS*.

La actividad endoglucanasa máxima obtenida de la expresión recombinante de la enzima TvEG del hongo *T. versicolor* en *P. pastoris* fue de 8,34 U/l (Figura 3.10 A), después de 3,5 días de inducción/crecimiento, lo que da una tasa de actividad de 0,1 U/l por hora de cultivo. Por otra parte, en forma nativa, el hongo *T. versicolor* produjo 225 U/l de cultivo de celulasas después de 6 días de crecimiento, por lo que por hora de crecimiento se obtuvo 1,6 U/l. Esto equivale a 16 veces lo obtenido en forma recombinante.

Con esto, se tiene que con los resultados de en la expresión recombinante, no se justifica la producción de TvEG en forma recombinante para su uso en un proceso industrial, pues se obtiene una menor tasa de actividad que con el sistema nativo. Sin embargo, se espera que el nivel de expresión se aumente y se logre superar ampliamente la tasa de hidrólisis del sistema nativo.

3.6. DISCUSIÓN FINAL

La estrategia para unir dos fragmentos de una endoglucanasa del hongo *T. versicolor* fue exitosa y se obtuvo una secuencia perteneciente a la familia 5 de las GHs, con el dominio catalítico completo, pero sin uno de los residuos catalíticos conservados en esta familia.

Tanto la falta de CBD, como la del residuo catalítico deben explicar la diferencia en el nivel de actividad obtenido en Salinas et al., donde se expresó una secuencia de TvEG en *P. pastoris* que contenía el CBD y el residuo catalítico Glu del motivo Glu-X-Gly. A pesar de lo anterior, la diferencia entre ambas construcciones es sólo poco más del doble, con un valor de 18 U/l, lo que aún es mucho menor que lo reportado por otros estudios [50,55,63,65,69,71]

A través de los diferentes experimentos realizados, fue posible observar que se logró expresar y secretar la enzima TvEG en forma recombinante en *P. pastoris*, pero con ciertas dificultades a superar, como los nombrados a continuación:

- (i) Los resultados de los ensayos de hidrólisis de CMC en medio líquido mostraron que el nivel de actividad es muy bajo comparado con lo obtenido en otros estudios donde expresaron endoglucanasas de diferentes microorganismos.
- (ii) Los geles SDS-PAGE y zimogramas, muestran que la enzima recombinante tiene un peso aparente mucho mayor que el calculado teóricamente, correspondiente a ser un triple de éste.
- (iii) En conjunto, tanto los ensayos de hidrólisis en medio líquido, como los geles SDS-PAGE y zimogramas, evidenciaron que la señal de secreción no funcionó completamente bien, pues

aproximadamente un 50% de la enzima queda dentro de la célula y un 50% fuera de ella. Además, indican que al parecer TvEG es muy susceptible al ataque proteolítico.

Después de analizar diferentes alternativas que podrían ser causa de los resultados obtenidos, se determina que es necesario implementar diversas mejoras en cuanto al clon recombinante elegido, a las condiciones de cultivo y a la cepa elegida. En primer lugar, es importante buscar un clon que presente multicopias del gen, pues esto ayudaría a mejorar el nivel de expresión [48]. Luego, respecto del medio de cultivo en sí, se opta por utilizar un medio con amortiguador a pH 7,5, suplementado con alanina, para mantener el pH constante durante todo el cultivo; además, usar matraces con deflectores, 28 °C de temperatura e inducir la expresión con 2% de metanol [74,75]. Respecto de la cepa en la cual expresar TvEG, hay proteínas que pueden expresarse mejor en un fenotipo que en otro, por lo que se debe probar también la expresión en la cepa KM71H, que es del fenotipo Mut^s y no Mut⁺ como GS115 [48,69].

El alto peso molecular aparente de TvEG parece tener relación con una hiperglicosilación o problemas con el procesamiento de la señal de exportación. La exportación de sólo el 50% de TvEG también podría radicar en problemas con la señal de exportación. La hiperglicosilación se puede verificar tratando la enzima con glicosidasas (como endoglicosidasa F, N-glicosidasa F o endoglicosidasa H [48,74,76]), pero se cree que, en primera instancia, la mejor forma para soslayar estos problemas es expresar la enzima sólo en forma intracelular, y así evitar que pase por el sistema de secreción y no sea modificada [48].

Por otro lado, los resultados indican que posiblemente TvEG es muy susceptible a la proteólisis, por lo que, si se expresa en forma extracelular en un medio amortiguado, será necesario agregar uno o un conjunto de inhibidores de proteasas, como PMSF, leupeptina, quimiostatina o los ácidos Casamino [48]. Y si se expresa intracelularmente, se deberán agregar los inhibidores al momento de lisar la célula.

En caso de que las estrategias anteriores no funcionen según lo esperado, se pueden abordar otras opciones, desde las más simples a las más complejas éstas serían: escalar el cultivo de *P. pastoris*, creciéndola en un fermentador; verificar la formación de cuerpos de inclusión; mutar la secuencia nucleotídica para acercarla más al uso de codones de *P. pastoris* o cambiar de sistema de expresión, a *S. cerevisiae* o *E. coli*, por ejemplo.

Finalmente, si bien se cree que la obtención y expresión del gen de una endoglucanasa del hongo *T. versicolor* aporta al conocimiento sobre los hongos celulolíticos y a la búsqueda y caracterización de nuevas endoglucanasas, este trabajo es hecho con miras a la aplicación industrial de estas enzimas, que presenten mejoras a las ya utilizadas en el proceso de producción de bioetanol y así, hacer de

este proceso uno más costo-efectivo que el actual. Por ello, se verificó si la producción recombinante presenta ventajas por sobre el sistema nativo. Los resultados mostraron que es imprescindible incrementar el nivel de actividad recombinante al menos 16 veces, para que sea ventajoso respecto del sistema nativo. Se espera que con las mejoras indicadas en los párrafos anteriores, se logre esto en forma sustancial.

4. CONCLUSIONES

Se logró reconstruir la secuencia (tveg) de una endoglucanasa del hongo *T. versicolor*, que contiene en forma completa el dominio catalítico, a partir de la ligación de dos fragmentos de dicha enzima, por lo que la estrategia utilizada fue exitosa y simple para ejecutar.

La secuencia obtenida es altamente conservada y, de acuerdo al análisis BLASTX, correspondería a una endoglucanasa de la familia 5 de las GHs, del hongo *T. versicolor*, publicada recientemente [54]. Dado que corresponde a una enzima nueva, que no ha sido muy estudiada ni mejorada, tiene gran potencial para mejorarla en diversos aspectos, lo que aportaría al estudio y al acercamiento para hacer un proceso de producción de bioetanol, a partir de material lignocelulósico que sea competitivo con las otras fuentes de energía existentes.

Tveg fue clonada en el vector de expresión pPICZ α A y transformada en la cepa GS115 de *P. pastoris*, usando el sistema EasySelect™ Pichia Expression, logrando expresar la enzima en forma recombinante, a través un protocolo fácil de aplicar. Sin embargo, es necesario aplicar diversas estrategias para mejorar sustancialmente el nivel de expresión de TvEG.

Por otro lado, el estudio comparativo de la cinética de producción de celulasas de *T. versicolor* con diferentes fuentes de carbono indican que, entre las probadas, CMC es la mejor fuente de carbono para la producción de celulasas y alcanza una mejor tasa de hidrólisis de CMC que el sistema nativo. Pero esto se debiera poder revertir con las mejoras que se implementen en el sistema recombinante.

5. RECOMENDACIONES

Según lo discutido en diversos puntos del trabajo, se recomienda:

1. Para el diseño de *primers* se debe no solo corroborar que no alienen entre ellos en forma completa, sino que también considerar usar partes de ellos, pues puede variar el alineamiento, formando productos no deseados, como lo que ocurrió en este trabajo.
2. Probar la expresión de la proteína en la cepa GS115 y KM71H en forma intracelular.
3. Seleccionar un clon que tenga varias copias del gen tveg.
4. Cultivar *P. pastoris* a 28 °C, en un matraz con deflectores, usar un medio de cultivo con amortiguador de pH, a pH 7,5, agregar alanina e inducir con 2% de metanol.
5. Siempre que la enzima esté expuesta al medio extracelular, utilizar un inhibidor de proteasas.
6. Los geles SDS-PAGE permitieron ver la proteína, pero con bandas muy tenues. No se recomienda usar nitrato de plata para detectar la proteína, pues se ha realizado y no se logra distinguir porque se ven demasiadas proteínas. Por lo tanto, se recomienda hacer ensayo de Western blot., con un anticuerpo contra la cola de histidina de la proteína expresada, lo que además permitirá identificar la proteína en forma específica.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kumar, A., Chan, E. S., Rudravaram, R., Lakshimi, M., Venkateswar, L., Ravindra, P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2, 14-32.
2. Roy, P., Tokuyasu, K., Orikasa, T., Nakamura, N., Shiina, T. (2012). A techno economic and envirometnal evaluation of the life cycle of bioethanol produces from rice straw by RT-CaCCO process. *Biomass and Bioenergy*, 37, 188-195.
3. Moriarty, P., Honnery, D. (2009). Hydrogen's role in an uncertain energy future. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 31-39.
4. Mohan, D., Pittman, C., Steele, P. (2006). Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. *Energy Fuels*, 20, 848-889.
5. Patzaek, T. W., Croft, G. (2010). A global coal production forecast with multi-Hubbert cycle analysis. *Energy*, 35, 3109-3122.
6. Chile potencia alimentaria. (2008). Chile sigue en carrera por los biocombustibles. [en línea]. Recuperado el 18 de marzo de 2013, de <http://www.chilepotenciaalimentaria.cl/content/view/327019/Chile-sigue-en-carrera-por-los-biocombustibles.html>.
7. Tan, K.T., Lee K.T., Mohamend, A.R. (2008). Role of energy policy in renewable energy accomplishment: The case of second-generation bioethanol. *Energy Policy*, 36, 3360-3365.
8. Wyman, C. E. (2007). What is (and what is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *TRENDS in biotechnology*, 25, 153-157.
9. Hamelinck, C. N., Van Hooijdonk, G., & Faaij, A. P. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long term. *Biomass & Bioenergy* , 28, 384-410.
10. Rudnick, H. (2006). Seguridad energética en Chile: dilemas, oportunidades y peligros. [en línea]. Recuperado el 5 de marzo de 2013 de <http://web.ing.puc.cl/~power/paperspdf/SeguridadEnergetica.pdf>
11. Ávalos, V., (2011). Biocombustibles en Chile. [en línea]. Recuperado el 5 de marzo de 2013 de <http://www.cec.uchile.cl/~biocombustibles/Viviana%20Avalos%20Biocombustibles%20liquidos%20UChile%2015nov2010.pdf>

12. Biblioteca del Congreso Nacional. (2007). Boletín N° 4.873-08. [en línea]. Recuperado el 12 de marzo de 2013, de http://www.bcn.cl/actualidad_legislativa/temas_portada.2007-01-29.7882319251/boletin_4873_actualidad.pdf.
13. Diario oficial de la República de Chile. (2008). Decreto Supremo N°11. Subsecretaría de Economía, Fomento y Reconstrucción. [en línea]. Recuperado el 12 de marzo de 2013, de http://www.cne.cl/archivos_bajar/DS11.pdf.
14. Hansen, A., Zhang, Q., Lyne, P. (2005). Ethanol –diesel fuel blends- a review. *Bioresource Technology*, 96, 277-285.
15. Balat, M., Balat, H., Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 551-573.
16. Mielenz, J. R. (2001). Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 324-329.
17. Viikari, L., Vehmaanperä, J., Koivula, A. (2012) Lignocellulosic ethanol: From science to industry. *Biomass and Bioenergy*, 46, 13-24.
18. Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52, 858-875.
19. Sun, Y., Jiayang, C. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1-11.
20. Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M., Negro, M.J. (2011). Pretreatment technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion. *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, 7, 149-176.
21. Soccol, C. et al. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*, 101, 4820-4825.
22. Schubert, C. (2006). Can biofuels finally take center stage? *Nature Biotechnology*, 24, 777-784.
23. Zhou, J., Wang, Y. H., Zhuang, Y. P., Zhang, S. L., Yin, P. (2008). Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride*T 100-14. *Bioresource Technology*, 99, 6826-6833.
24. Fukuda, H., Kondo, A., Tamalampudi, S. (2009). Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 2-12.
25. Ryu, D., Mandels, M. (1980). Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme Microbiology Technology*, 2, 91-102.

26. Foreman, PK, et al (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 31988-31997.
27. Rani, R. (2011) Production of Cellulytic Enzymes for the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, 8, 177-201.
28. Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 506-577.
29. Zhang, Y.H.P., Himmel, M., Mielenz, J. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24, 452-481.
30. Binod, P., Janu, K.U., Sindhu, R., Pandey, A. (2011). Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, 10, 229-250.
31. Linder, M., Terri, T. (1997). The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of Biotechnology*, 57, 15-28.
32. Lekounougou, S., Mounguengui, M., Dumarcay, S., Rose, C., Courty, P. E., Garbaye, J., Gérardin, P., Jacquot, J. P., Gelhaye, E. (2008). Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, 287-293.
33. López, M., Vargas-García, M., Suárez-Estrella, F., Moreno, J. (2006). Biodelignification and humification of horticultural plant residues by fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57, 24-30.
34. Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280, 309-316.
35. Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., DeWeese-Scott, C., Fedorova, N.D., Geer, L.Y., He, S., et al. (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Research*, 35, 237-240.
36. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M., McNeil, B., Harvey, L. (2005). Heterologous protein production using *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22, 249-270.
37. Cereghino, J. L., Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 45-66.
38. Cregg, J., Vedvick, T., Raschke, W. (1993). Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 11, 905-910.
39. Promega. (2007). *pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Technical Manual*.

40. Invitrogen. (2009). pPICZαA. [en línea]. Recuperado el 3 de diciembre de 2009, de http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/ppiczalpha_map.pdf.
41. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, L.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
42. Rozen, S., Skaletsky, H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.
43. Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., Bairoch, A. (2003). ExPASy—the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.*, 31, 3784–3788.
44. Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R.J. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31, 3688-3691.
45. New England Biolabs. (2009). Double Digest finder. [en línea]. Recuperado el 9 de diciembre de 2009, de <http://66.155.211.155/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp>.
46. Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
47. Salinas, A. Memoria de título: "Identificación y clonación de nuevas celulasas para la producción de bioetanol de segunda generación". Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. 2009.
48. Invitrogen. (2009). EasySelect™ Pichia Expression Kit. [en línea]. Recuperado el 27 de noviembre de 2009 de http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf.
49. Promega. (2009). Tm (Melting Temperature) Calculations for Oligos. [en línea]. Recuperado el 13 de diciembre de 2009 de <http://www.promega.com/a/apps/biomath/index.html?calc=tm>.
50. Liu G., Tang X., Tian S. L., Deng X., Xing, M. (2006). Improvement of the cellulolytic activity of *Trichoderma reesei* endoglucanase IV with an additional catalytic domain. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 22, 1301–1305.
51. King, B., Donnelly, M., Bergstrom, G., Walter, L., Gibson, D. (2009). An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1033-1044.

52. Eurwilaichitr, L., Kanokratana, P., Chantasingsh, D., Champreda, V., Tanapongpipat, S., Pootanakit, K., (2008). Identification and expression of cellobiohydrolase (CBHI) gene from an endophytic fungus, *Fusicoccum* sp. (BCC4124) in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 58, 148-153.
53. LabLife. (2014). pGEM-T Easy Vector Sequence. [en línea]. Recuperado el 15 de julio de 2014 de https://www.lablife.org/g?a=seqa&id=vdb_g2..Z37ccvfjhFG6mEOwbPq1XiQOus-_sequence_54ca747e06b5ee46145c782519192b5e4eeeddb8_10.
54. Floudal, D. et al. (2012). The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. *Science*, 336, 1715-1719.
55. Wu, S., Ding, S., Zhou, R., Li, Z. (2007). Comparative characterization of a recombinant *Volvariella volvacea* endoglucanase I (EG1) with its truncated catalytic core (EG1-CM), and their impact on the bio-treatment of cellulose-based fabrics. *Journal of Biotechnology*, 130, 364-369.
56. Schülein, M. (1997). Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *Journal of Biotechnology*, 57, 71-81.
57. Steentoft, C., Vakhrushev, SY., Joshi, HJ., Kong, Y., et al. (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO Journal*, 32, 1478-1488.
58. Gupta, R., Jung, E., Brunak, S. (2004). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. En preparación.
59. Clarke, A., Drummelsmith, J, Yaguchi, M. (1997). Identification of the catalytic nucleophile in the cellulose from *Schizophyllum commune* and assignment of the enzyme to Family 5, subtype 5 of the glycosidases. *FEBS Letters*, 414, 359-361.
60. Lo Leggio, L., Larsen, S. (2002). The 1,62 Å structure of *Thermoascus aurantiacus* endoglucanase: completing the structural picture of subfamilies in glycoside hydrolase family 5. *FEBS Letters*, 523, 103-108.
61. Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R. (2004b). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non-complexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 797-824.
62. Cantarel, B.L. (2008). Carbohydrate Active Enzymes database. [en línea]. Recuperado el 19 de marzo de 2013, de <http://www.cazy.org>.
63. Charoenrat, T., Khumruaengsri, N., Promdonkoy, P., Rattanaphan, N., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S., Roongsawang, N. (2013). Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116, 193-198.

64. Salinas, A., Vega, M., Linqueo, M. E., García, A., Carmona, R., Salazar, O. (2011) Cloning of novel cellulases from cellulolytic fungi: Heterologous expression of a family 5 hydrolase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 49, 485-491.
65. Zhao, XH., Wang, W., Wang, FQ., Wei, D-Z. (2012). A comparative study of β -1,4-endoglucanase (possessing β -1,4-exoglucanase activity) from *Bacillus subtilis* LH expressed in *Pichia pastoris* GS115 and *Escherichia coli* Rosetta (DE3). *Bioresource Technology*, 110, 539-545.
66. Li, J., Tang, C., Shi, H., Wu, M. (2011). Cloning and optimized expression of a neutral endoglucanase gene (*ncel5A*) from *Volvariella volvacea* WX32 in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111, 537-540.
67. Koseki, T., Mese, Y., Fushinobu, S., Masaki, K., Fujii, T., Ito, K., Shiono, Y., Mutayama, T., Iefuji, H. (2008). Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 1279-1285.
68. Parodi, A. (2000). Protein Glucosylation and Its Role in Protein Folding. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 69-93.
69. Lindenmuth, B., McDonald, K. (2011). Production and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 77, 153-158.
70. Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Xu, Y., Tang, Z., Tian, W., Shen, Q. (2011). Expression, purification and characterization of two thermoestable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. *Protein Expression and Purification*, 79, 176-186.
71. Ding, S., Gea, W., Buswella, J. (2002). Secretion, purification and characterisation of a recombinant *Volvariella volvacea* endoglucanase expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 621-626.
72. Guo, R., Ding, M., Zhang, S., Xu, G., Zhao, F. (2008). Expression and characterization of two secreted His6-tagged endo-beta-1,4-glucanases from the mollusk *Ampullaria crosseana* in *Pichia pastoris*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40, 419-425.
73. Nakamura, Y., Gojobori, T. and Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research*, 28, 292.
74. O'Callaghan, J., O'Brien, MM, McClean, K., Dobson, ADW. (2002). Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29, 55-59.

75. Stapleton, P., O'Brien, M., O'Callaghan, J., Dobson, A. (2004) Molecular cloning of the cellobiose dehydrogenase gene from *Trametes versicolor* and expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 55-63.
76. Wonganu, B., Pootanakit, K., Boonyapakron, K., Champreda, V. (2008). Cloning, expression and characterization of a thermotolerant endoglucanase from *Syncephalastrum racemosum* (BCC18080) in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 58, 78-86.
77. Akcapinar, G. B., Gul, O., Sezerman, U. (2012). From *in silico* to *in vitro*: Modelling and production of *Trichoderma reesei* endoglucanase 1 and its mutant in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 159, 61-68.
78. Bischoff, K., Liu, S., Hughes, S. R. (2007). Cloning and characterization of a recombinant family 5 endoglucanase from *Bacillus licheniformis* strain B-41361. *Process Biochemistry*, 42, 1150-1154.
79. Unal, E. S., Zhao, R., Qiu, A., Goldman, D. (2008). N-linked glycosylation and its impact on the electrophoretic mobility and function of the human Proton-Coupled Folate Transporter (HsPCFT). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1778, 1407-1414.
80. Gu, L., Lajoire, C., Kelly, C. (2003). Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* Manganese Peroxidase Gene in the Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 19, 1403-1409.
81. Igarashi, K., Ishida, T., Hori, C., Samejima, M. (2008). Characterization of an Endoglucanase Belonging to a New Subfamily of Glycoside Hydrolase Family 45 of the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*, 74, 5628-5634.
82. Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Hoga, J., Moriya, T., Sumida, N., Yaguchi, Y., Kono, T. (2002). Purification and characterization of new endo-1,4- β -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 319-326.
83. Valášková, V., Baldrian, P. (2006). Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of Wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology*, 157, 119-124.

7. ANEXOS

7.1. METODOLOGÍA ADICIONAL

7.1.1. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios se prepararon en agua destilada MilliQ y se esterilizaron en autoclave por 1 h a 120°C.

7.1.1.1. MEDIOS LÍQUIDOS

- Medio LB
15,5 g/L de LB, 9,5 g/L de NaCl.
- Medio LB de recuperación
Glucosa 0,02 M, MgCl₂ 0,05 M en medio LB.
- Medio LB-amp
Ampicilina 0,1 mg/ml en medio LB.
- Medio LB agar Low Salt con Zeocina
Tryptone 1%, Yeast Extract 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.5 y Zeocina 25 µg/ml
- Medio mínimo-Avicel, CMC o Lenga
KH₂PO₄ 1,5%, (NH₄)₂SO₄ 0,5%, MgSO₄ 0,06%, CaCl₂ 0,06%, FeSO₄×7H₂O 0,0005%, MnSO₄×H₂O 0,00016%, ZnSO₄×7H₂O 0,00014%, CoCl₂×6H₂O 0,00037%, Avicel, CMC o Lenga 2%.
- Medio BMGY
Yeast extract 1%, peptona 2%, fosfato de potasio 100 mM pH 6, Yeast nitrogen base 1,34%, biotina 0,00004%, glicerol 1%.
- Medio BMMY
Yeast extract 1%, peptona 2%, fosfato de potasio 100 mM pH 6, Yeast nitrogen base 1,34%, biotina 0,00004%, metanol 0,5%.

7.1.1.2. MEDIOS SÓLIDOS

- Medio LB selectivo
Agar 1,5%, ampicilina 100 µg/ml, X-Gal 40 µg/ml (en di-metilformamida), IPTG 0,1 mM.
- Medio LB agar Low Salt con Zeocina
Tryptone 1%, Yeast Extract 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.5, agar 15 g/l y Zeocina 25 µg/ml.

7.1.2. SOLUCIONES

- Buffer de carga 5X
Tris-HCl 60 mM, glicerol 25% v/v, SDS 2% m/v, β-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1% m/v, pH 6,8.
- Buffer de corrida Tris-glicina-SDS
Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% m/v

- Buffer de lisis
Fosfato de sodio 50 mM pH 8, PMSF 1 mM, 1 mM EDTA, glicerol 5%, β -mercaptoetanol 10 mM

7.1.3. CLONAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA AL VECTOR pGEM®-T EASY.

Los fragmentos purificados desde un gel de agarosa son ligados en el vector de clonación en un tubo Eppendorf de 0,6 ml estéril, en el que se realiza una mezcla de ligación como se indica a continuación: 50 ng de pGem®-T Easy, buffer de ligación 2X, 1 U de DNA ligasa de T4 y 3 μ l de DNA proveniente de la purificación desde gel de agarosa, en un volumen final de 10 μ l. La mezcla de reacción se deja toda la noche a 4 °C.

7.1.4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS *E. COLI* DH5 α

La transformación en células *E. coli* DH5 α se utilizó principalmente para obtener un mayor número de copias del inserto, del plasmidio y/o del constructo plasmidio-inserto. Por eso, se clonan en células electrocompetentes *E. coli* DH5 α , mezclando 1 μ l de la mezcla de ligación descrita anteriormente con 20 μ l de células. Para la electroporación se utilizó un equipo Cell-Porator, con 420 V, 330 μ F, baja impedancia, una tasa de carga rápida y un tiempo máximo de 2,5 ms. Las células transformadas se recuperan durante 1 h a 37 °C en 1 ml de medio LB de recuperación y luego se cultivan en placas con medio LB selectivo. Las placas se incuban a 37°C toda la noche y al día siguiente se han obtenido colonias blancas y azules, correspondiendo las blancas a colonias de clones recombinantes. Se seleccionan 4 colonias recombinantes por placa y se traspasan a tubos de ensayo con 4 ml de medio líquido LB-amp, lo cual se incuba a 37 °C, con agitación orbital a 200 rpm, durante toda la noche. Los medios utilizados están descritos en el Anexo 7.1.1.

7.1.5. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMIDIAL DESDE *E. COLI* DH5A

Los cultivos líquidos de *E. coli* DH5 α se centrifugan a 15.294 g durante 2 min, quedando las células en el fondo del tubo. El pellet se utiliza para extraer el DNA plasmidial de las células utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep, siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.1.6. PURIFICACIÓN DE DNA DESDE GELES DE AGAROSA

Para purificar una muestra de DNA, se corre la muestra en un gel de agarosa 1%. Terminado el tiempo de corrida se utiliza el kit QIAEX II, siguiendo las instrucciones del fabricante. Como último paso, se eluye el DNA en 20 μ l de buffer TE, del mismo fabricante.

7.1.7. VERIFICACIÓN DE INSERCIÓN DEL INSERTO

Para verificar la presencia del inserto en el vector de clonamiento pGEM®-T Easy antes de mandar a secuenciar, se realiza una digestión del DNA plasmidial extraído. Para esto, se digieren 5 µl del DNA plasmidial con 1 U de *EcoRI* y buffer NE *EcoRI* 1X en un volumen total de 10 µl, durante 4 h a 37 °C. El producto de la digestión se visualiza en un gel de agarosa.

7.1.8. SECUENCIA DE PARTIDORES UTILIZADOS PARA SECUENCIAR

En la Tabla 7.1 se presentan los partidores utilizados para la secuenciación a partir del vector pGEM®-T Easy.

Tabla 7.1. Partidores utilizados para la secuenciación.

Nombre	Secuencia
M13F-pUC	GTTTCCCAGTCACGAC
M13R-pUC	CAGGAAACAGCTATGAC

7.1.9. LISIS CELULAR DE LEVADURAS

Se transfiere 1,5 ml de cultivo a un tubo Eppendorf, se centrifuga a 15.294 g durante 3 minutos a 4 °C, se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1,5 ml de buffer de lisis (ver Anexo 7.1.2). Luego se agrega un volumen de 300 µl de perlas de vidrio de 0,4 mm lavadas ácidamente y se agita el tubo vigorosamente con vórtex durante 5 min. Después se centrifuga el tubo a 15.294 g durante 5 minutos a 4°C y se extrae el sobrenadante a un nuevo tubo.

7.1.10. ENSAYOS DE ACTIVIDAD EN GELES DE AGAROSA–CMC

El gel se prepara utilizando agarosa al 1% y CMC al 1% en buffer NaAc (50 mM en agua destilada MilliQ y pH 5). Se calienta y luego se vacía en una placa Petri para realizar el ensayo. Una vez gelificado, se agregan 3µl del sobrenadante previamente centrifugado proveniente de los hongos crecidos en medio líquido. Se incuba la placa durante 2 h a 37°C para que se lleve a cabo la reacción. Se tiñe la placa con rojo Congo al 0,1% a temperatura ambiente durante 15 min con agitación orbital suave. Se lava varias veces con NaCl 1M a temperatura ambiente y agitación orbital suave, hasta notar claramente halos sin tinción.

7.1.11. ENSAYO DE HIDRÓLISIS DE CMC

En una placa de 96 pocillos se mezclan 50 µl de muestra con 100 µl de una solución de CMC al 1%, en buffer NaAc 50 mM y pH 5. Se deja incubando por 15 h a 37°C, luego se traspasan 90 µl de la reacción a una nueva placa y se le añaden 90 µl de DNS. Esto se deja reaccionar a 100°C por 10 minutos, para luego terminar la reacción enfriando la placa en hielo por 5 min. Finalmente, se

traspasan 100 µl de la reacción a una placa Falcon desechable y se midió la D.O. a 540 nm en un lector de placas.

7.1.12. CURVA DE CALIBRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Con esta curva es posible relacionar la absorbancia de una muestra a la que se aplicó el método de DNS con la concentración de azúcares reductores de ella, utilizando la ecuación de la línea de tendencia. Para confeccionarla se diluyó a la mitad una solución de glucosa con una concentración de 1 g/l, luego esa solución se volvió a diluir a la mitad y así sucesivamente. El procedimiento se hizo 6 veces hasta llegar a solución con una concentración de 0 g/l aproximadamente. Luego, se tomaron 90 µl de muestra 90 µl de DNS, se incubaron a 100 °C por 10 min y se enfriaron sobre hielo por 5 min. Después se transfirieron 100 µl a una placa Falcon y se midió D.O. a 540 nm en un lector de placas.

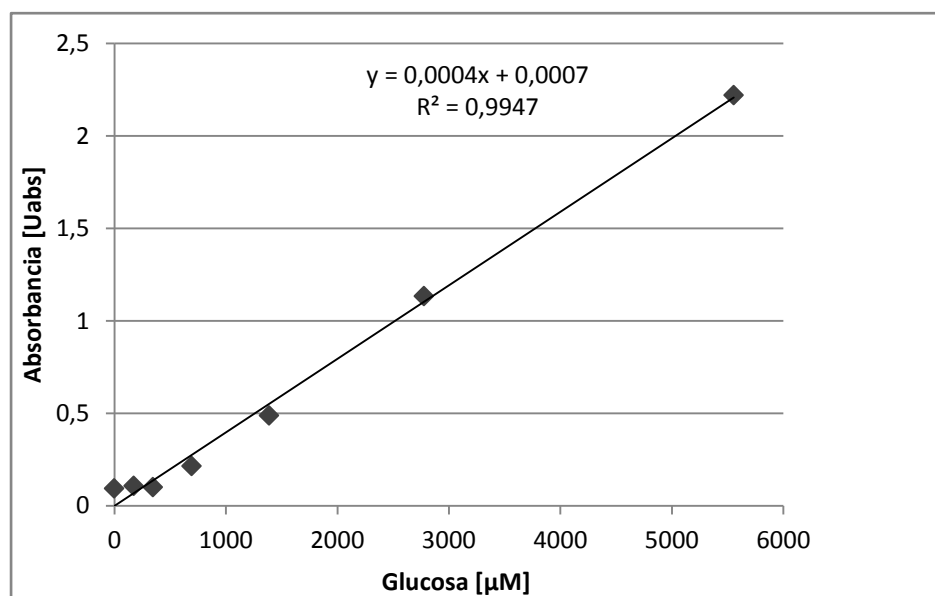


Figura 7.1. Curva de calibración de azúcares reductores.

7.1.13. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

En la Tabla 7.2 se muestra la composición del gel de resolución y en Tabla 7.3 lade los geles separador y concentrador:

Tabla 7.2. Composición del gel de resolución.

Reactivo	Volumen
Acrilamida Bisacrilamida 29:1	1,58 mL
Buffer Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,4%	0,95 mL
Agua destilada	1,27 mL
PSA 10%	20 µL
TEMED	2 µL

Tabla 7.3. Composición del gel concentrador.

Reactivo	Volumen
Acrilamida Bisacrilamida 29:1	0,17 ml
Buffer Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, SDS 0,4%	0,25 ml
Agua destilada	0,58 ml
PSA 10%	7,5µl
TEMED	1,25µl

Las muestras se preparan de acuerdo a lo siguiente: se mezclan las muestras con buffer de carga 5X (ver Anexo 7.1.2), en la proporción 4:1. Luego se denaturan calentándolas a 100 °C por 5 min y se cargan en el gel. Las electroforesis se realizó bajo un voltaje de 200 V, durante 1,5 horas, con buffer de corrida Tris-glicina-SDS sobre hielo. En el gel se cargó un estándar de peso molecular de proteínas preteñido.

Luego el gel se tiñe con una solución de azul de comassie durante 1 hora y se destiñe con una solución de 40% metanol y 10% ácido acético hasta que se vean las bandas.

7.1.14. ZIMOGRAMA

Para el zimograma se prepara el gel de resolución y el gel concentrador de la misma forma que para un SDS-PAGE, sólo que al gel de resolución se le agrega CMC como sustrato en una concentración final de 2%.

La preparación de las muestras se lleva a cabo de la misma forma que para el SDS-PAGE, pero sin denaturarlas, pues las proteínas deben mantener su actividad para la posterior hidrólisis de CMC. Luego se cargan en el gel y se corre bajo las mismas condiciones mencionadas. Posteriormente se hace la etapa de hidrólisis, en la que el gel se deja incubando toda la noche a 37 °C y se dejaron incubando durante toda la noche. Para determinar la actividad de las endoglucanasas presentes en las muestras, se tiñeron las placas utilizando rojo Congo al 0,1% durante 30 min y posteriormente se lavaron con NaCl 1M durante 15 min con agitación orbital suave. El rojo Congo es una sal que es sodio que posee gran afinidad con la celulosa, por lo que sólo teñirá lo que tenga celulosa. Debido a esto, en las zonas donde hay actividad endoglucanasa, es decir, se ha hidrolizado la celulosa, se generan halos sin tinción.

7.2. RESULTADOS ADICIONALES

7.2.1. MAPAS DE RESTRICCIÓN

La enzima de restricción *EagI* fue escogida para cortar la zona común de los fragmentos CBD2_A y f5h106, para luego ligarlos. Con los mapas de restricción se verificó que la enzima no cortara en otra zona a cada fragmento.

También se usó un mapa de la secuencia para verificar que las enzimas para linealizar el constructo pPICZαA-tveg no cortaran dentro de la secuencia.

En las siguientes figuras se muestran los mapas de restricción nombrados junto con la leyenda.



Figura 7.2. Mapa de restricción del fragmento f5h106. Mapa de todas las enzimas de restricción que cortan la secuencia del fragmento f5h106. Con este mapa se corroboró que la enzima de restricción *EagI* sólo cortaba la parte común entre f5h106 y CBD2_A. La flecha muestra donde está la enzima de restricción *EagI*.

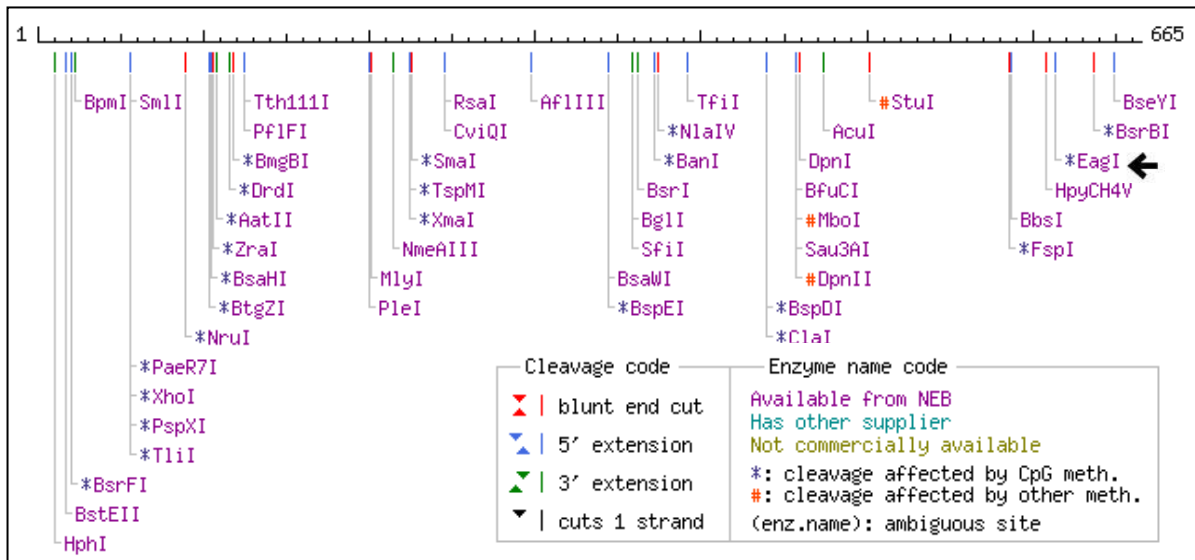


Figura 7.4. Mapa de restricción del fragmento CBD2_A. Con este mapa se corroboró que la enzima de restricción *EagI* sólo cortaba la parte común entre los fragmentos f5h106 y el fragmento CBD2_A. La flecha muestra está corta la enzima de restricción *EagI*.

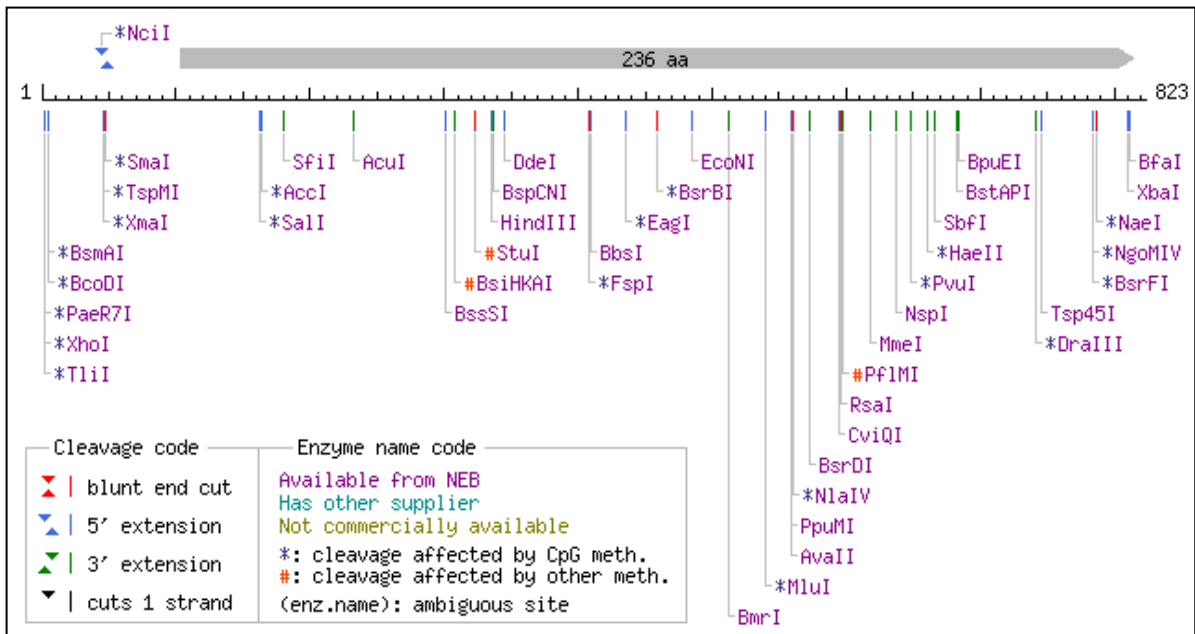


Figura 7.3. Mapa de restricción de la secuencia tveg. El mapa de restricción se utilizó para verificar que la enzima de restricción *PmeI*, con la que se linealizaría el constructo pPICZαA-tveg, no cortara al inserto.

7.2.2. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA TVEG

GTCTCGAGAAAAGAGAGTCCGGCGCGGAGTTCGGGAACACCGTCATCCCGGGCGCGCTCGGCACGGACTAC
ACCTGGCCGTCGCCCACCTCCATCGACTTCTTCATGGGCCAGGGCTTCAACACGTTCCGCATCCCGTTCCTG
ATGGAGCGCGTCAGCCCGCGTTCGACGGGTGGCCTTACTGGCCCGTTCAACAGCACCTACCTCGACGGTCTG
AAGCAGACTGTTAGCTACATCACGGGCAAGGGTGGTTTTGCTATCATCGACCCGCACAACCTTCATGATCTT
CAACGGCGCGACTATCACGAGCACCAGCCAGTTCAGGCCCTGGTGGCAGAAGCTTGCTGCTGAGTTCAAAA
CCAACAACAACGTCATCTTCGACCTCATGAACGAGCCGCACGACATCCCTGCGCAGACCGTCTTCCAGCTCA
TGCAAGCGGCCGTCAACGGCGTGGCGCGGAGCGGGCGACCAGCCAGCTCATCCTCGCCGAGGGCACGGGCT
GGACTGGGGCGTGGACGTGGACGACCTCGGGCAACAGCGACGGTTCGGCGCGATCAAGGACCCGAACAAC
AACATTGCTATCCAGATGCACCAGTACCTGGACTCGGACGGCTCGGGCACGTCCCCGATCTGCATGTCCGA
CACGATCGGCGCGGAGCGCCTGCAGGCGGGCAGCAGTGGCTGCAGCAGAAAGGGCCTCAAGGGCTTCCTC
GGCGAGATCGGCACGGGCAACAACACGCAGTGGTGGTACCAGCGCTGCAGGCGCGCTCTGCGAGATGCAGCAG
CCGGCGGGACGTGGCTCGGCGCGCTTCTAGAACAATGC

7.2.3. SECUENCIA AMINOACÍDICA TVEG

LEKRESGAIEFGNTVIPGALGTDYTWPSPTSIDFFMQGFNTFRIPFLMERSVPPSTGGLTGPFNSTYLDGLKQ
TVSYITGKGGFAIDPHNFMIFNGATITSTSQFQAWWQKLAAEFKTNNNVIFDLMNEPHDIPAQTVFQLMQ
AAVNGVRASGATSQLILAEGTGWTGAWTWTTSGNSDAFGAIKDPNNNIAIQMHQYLDSDGSGTSPICMSDT
IGAERLQAATQWLQKGPQGLPRRDRHGQHAVRDRAAGALCEMQQPAGRGSARF-NN