



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE POSTGRADO

“Expresión de una proteína de fusión para la producción de proteína unicelular rica en metionina en *Trichoderma reesei* (RUT C30)”

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de

**Magíster en Ciencias Biológicas**

Facultad De Ciencias

Por

Macarena Andrea Martínez Fajardo

Diciembre, 2021

Director de Tesis Dra: Claudia Stange Klein

Co-Director de tesis Dra: María Elena Lienqueo Contreras

Este trabajo fue financiado por el Proyecto FONDECYT 1180794 y el centro basal financiado por ANID CeBiB FB0001

**FACULTAD DE CIENCIAS UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

**Macarena Andrea Martínez Fajardo**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 08 de Noviembre 2021

Director de Tesis: Dra. Claudia Stange Klein

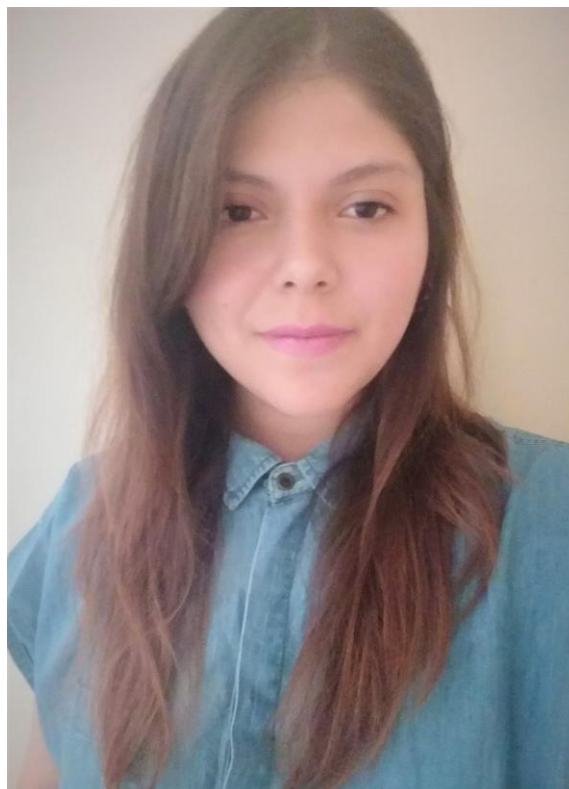
Co-Director de Tesis: Dra. María Elena Lienqueo Contreras

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marcelo Baeza

Dr. Víctor Cifuentes

*A Gladys Cárdenas Delgado y Augusto Fajardo Avilés*



Desde muy pequeña, durante mi infancia en Ovalle, manifesté un gran interés por la ciencia. Mis padres recuerdan cuando quería “analizar el cuerpo humano del kiwi”, cuando planté un árbol de huevos con mi hermana o cuando pedí de regalo un microscopio. Estos pequeños indicios se fueron transformando en una gran vocación a medida que crecía e iba descubriendo las maravillas de la ciencia.

Cursaba primero medio cuando descubrí la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular y se convirtió en mi gran meta. El camino no fue fácil ni mucho menos corto. Dejé Ovalle para irme a estudiar a Santiago, pasé por dos carreras previas –Biología en Bioprocesos y Biología Ambiental– ya que el sistema de selección me decía que no era apta ingresar a la carrera, pero persistí y lo logré.

Luego el Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB), me cobijó durante muchos años, donde me desarrollé como investigadora, desde mi pre-tesis de pregrado hasta ahora mi tesis de Magister. Gané muchos conocimientos y conocí a grandes personas.

No obstante, la vida me tenía preparado nuevos desafíos. Tuve que dejar a mi familia y cambiar el rumbo de mi carrera para partir al sur. Hoy, vivo en Puerto Varas donde me desempeño como Quality control validation assistant, en Kura Biotech, donde tengo el gran y lindo desafío de realizar ciencia en región. Espero que esta nueva etapa que culmina me entregue las herramientas necesarias ser un aporte, no sólo para la empresa en la que trabajo, también para la gente con la que comparto día a día y para la sociedad

## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi familia. A mis padres, Carmen y Luis, y a mis hermanos, Paz y Felipe, por todo el soporte, amor y paciencia entregados durante el tiempo que cursé el magíster y en la vida entera. Por otra parte - No menos importante- está mi querido Cone. Muchos no pueden llegar a imaginar lo que puede influir en la vida la presencia de un peludo compañero, en este caso ojerón, que me acompañó en mis noches en vela. A mis amigos Luis Pinuer y María Ignacia Segovia, por el inagotable apañe. Finalmente agradecer a Javier Gimpel por acompañarme en este camino y motivarme en los momentos difíciles.

Quisiera agradecerle también al Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB), por acogerme durante 4 años. Ahí, conocí profesores secos que me inspiraron, a grandes científicos y amigos.

Finalmente agradecer el apoyo y financiamiento al Proyecto Conicyt Basal Centro de Biotecnología y Bioingeniería FB0001, a FONDECYT 1180794 y a ACT192073. Además, a las profesoras María Elena Lienqueo y Claudia Stange por guiarme científica y administrativamente en este trabajo de tesis.

# Índice de contenidos

Índice de contenidos.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tablas.....	viii
Lista de abreviaturas.....	viii
Resumen.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Necesidad de fuentes alternativas de proteínas.....	1
1.2. Proteína unicelular, una fuente alternativa y sustentable de proteínas.....	2
1.3. Hongos como fuente de SCP.....	4
1.4. <i>Trichoderma reesei</i> , como proteína unicelular.....	5
1.5. Cuerpos de proteínas y su uso en la producción de proteínas recombinantes.....	6
1.6. Biomasa enriquecida en Metionina.....	8
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	10
2.1. Hipótesis.....	10
2.2. Objetivo General.....	10
2.3. Objetivos específicos.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. Medios de cultivo.....	11
3.2. Lista de plasmidios.....	12
3.3. Listado de microorganismos.....	13
3.4. Lista de partidores.....	14
3.5. Diseño de las construcciones de las proteínas de fusión.....	14
3.6. Diseño experimental del ensamblaje de los casetes de expresión.....	15
3.7. Ensamblaje de las construcciones Zera-MRP5 y HBF1-MRP5.....	17
3.8. Construcción de los casetes de expresión Zera-MRP5 y HBF1-MRP5.....	17
3.9. Extracción de ADN genómico.....	18
3.10. Extracción de proteínas.....	19
3.11. Determinación de las condiciones de cultivo para preparación de protoplastos.....	20
3.12. Preparación de protoplastos.....	21
3.13. Transformación de protoplastos de <i>Trichoderma reesei</i> con los casetes de expresión Zera-MRP5 y HBF1-MRP5.....	22

3.14.	Evaluación de las transformantes Zera-MRP5 y HBF1-MRP5, mediante secuenciación de productos de PCR.....	23
3.15.	Western Blot .....	23
3.16.	Análisis cualitativo del fenotipo de las cepas mutantes .....	24
4.	RESULTADOS .....	25
4.1.	Ensamblaje de las construcciones de fusión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5.....	25
4.2.	Obtención de los casetes de expresión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5 .....	28
4.3.	Preparación de protoplastos .....	30
4.4.	Transformación y evaluación de las transformantes T. reesei RUT C30 Zera-MRP5 Y T. reesei RUT C30 HFBI-MRP5 .....	32
4.5.	Análisis fenotípico.....	35
5.	DISCUSIÓN .....	36
6.	CONCLUSIONES.....	44
7.	REFERENCIAS .....	45
8.	Anexo .....	51
8.1.	Resultados .....	51

## Índice de Figuras

Figura 1	Construcciones de fusión.....	14
Figura 2	Diseño experimental para la construcción de los casetes de expresión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5.....	16
Figura 3	Curva de calibración con BSA para cuantificación de proteínas .....	20
Figura 4	Análisis transformantes para pMRKQ-Zera-MRP5 y pMRKQ-HBFI-MRP5 y purificación de las construcciones de fusión Zera-MRP5 y HBFI-MRP5. ....	27
Figura 5	Análisis de las transformantes para pTrEno-Zera-MRP5 y pTrEno-HBFI-MRP5 y purificación de los casetes de expresión Zera-MRP5 y HBFI-MRP5. ....	29
Figura 6	Determinación de las condiciones de cultivo de T. reesei RUT C30 para la preparación de protoplastos.....	30
Figura 7	Preparación de protoplastos. ....	32
Figura 8	Análisis de las colonias transformantes de T. reesei para los casetes de expresión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5 mediante secuenciación de amplicones .....	33
Figura 9	Análisis de las colonias transformantes de T. reesei mediante Western Blot. ....	34
Figura 10	Análisis cualitativo fenotípico de las transformantes HFBI-MRP5 y Zera-MRP5. ....	35

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.-</b> Proteínas de almacenamiento ricas en metionina candidatas para expresar en fusión con Zera e HFB1 .....	9
<b>Tabla 2.-</b> Lista de plasmidios utilizada en este trabajo .....	12
<b>Tabla 3.-</b> Lista de microorganismos utilizados en este trabajo.....	13
<b>Tabla 4.-</b> Lista de partidores utilizados en este trabajo .....	14
<b>Tabla 5.-</b> Tabla resumen de los métodos de transformación de <i>Trichoderma reesei</i> probados en este trabajo .....	22

## Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
Tm: Temperatura de desnaturalación térmica  
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida  
SDS: Dodecilsulfato de sodio  
dNTP: Desoxinucleótido trifosfato  
pb: Pares de bases  
kb: Kilobases  
ON: over night  
Luz UV: Luz ultra violeta



## Resumen

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) proyecta que la demanda de proteínas aumentará un 70% para el año 2050, lo cual traerá consigo un aumento en los requerimientos de alimento para animales. En el caso particular de Chile, esto afecta directamente a la industria del salmón, donde la harina de pescado es ampliamente utilizada para la alimentación de peces carnívoros como el salmón. Esto se suma a que se prevé que en los próximos años habrá poca disponibilidad de este alimento y que, además, experimentará un decaimiento de su calidad. Es por eso, que se hace necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas para la alimentación de salmones que cumplan con sus requerimientos nutricionales y que sea amigable con el medio ambiente. Una buena alternativa es la proteína a partir de hongos unicelulares, que tiene la ventaja de tener un bajo contenido de ácidos nucleicos y alto contenido de proteínas. Por ejemplo, *Trichoderma* sp es un género de hongos filamentosos que posee un alto contenido proteico y es considerado un organismo *Generally Regarded as Safe* (GRAS) lo que lo convierte en una buena alternativa para estos fines. Sin embargo, no cumple con los requerimientos nutricionales para salmones, por su bajo contenido de metionina. En esta tesis nos basamos en estrategias previas de aumento del contenido de metionina en hongos y vegetales, como es la expresión recombinante proteínas vegetales de almacenamiento y en proteínas formadoras de cuerpos de proteínas para generar dos proteínas de fusión entre proteínas formadoras de cuerpos de proteínas (Zera y HFB1) y una proteína de rica en metionina (AmA1). Se transformó *Trichoderma reesei* RUTC30 con ambas construcciones de fusión mediante transformación de protoplastos. Se obtuvieron transformantes para ambas proteínas de fusión, las que fueron validadas mediante

secuenciación de amplicones y Western Blot. Sin embargo, las transformantes obtenidas presentan un fenotipo distinto al parental, no esporulan y tienen un menor crecimiento.

## ABSTRACT

FAO predicts that the demand for protein will increase by 70% by 2050, which will bring also an increase in the demand for animal feed. Fishmeal is widely used to feed carnivorous fish such as salmon, which is one of the most important industries in Chile. However, it is expected that there will be a decrease in the availability and quality of fishmeal products in the next years. It is necessary to search for new sources of protein for animal feed, which meet their nutritional requirements and that are sustainable in the future. Fungal single cell protein is a good source of alternative proteins, which has the advantage of being low in nucleic acids and high in protein. For example, *Trichoderma* sp. is a genus of filamentous fungi that has a high protein content and is Generally Regarded as Safe (GRAS), which makes it a great alternative for these purposes. However, it does not meet the nutritional requirements of salmon, specifically due to its methionine content. In this work, we have based on previous strategies to increase the methionine content in fungi and plants, such as the recombinant expression of plant storage proteins and protein-body forming proteins. We generated two fusion proteins between a protein body-forming protein (Zera and HFB1) and a methionine-rich protein (AmA1). The fusion constructs were delivered into *Trichoderma reesei* RUTC30 nucleus by protoplast transformation. Transformants were obtained for both fusion proteins and validated by amplicon sequencing and Western Blot. However, the transformants present a different phenotype from the parental strain, since they do not sporulate and have a slower growth rate.

# INTRODUCCIÓN

## *1.1. Necesidad de fuentes alternativas de proteínas*

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estimó que la demanda de proteínas aumentará un 70% para el año 2050, provocado por el incremento en la población mundial (FAO, 2009). Se espera que la población mundial aumente en 2.000 millones de personas en los próximos 30 años, pasando de los 7.700 millones actuales a los 9.700 millones en 2050, pudiendo llegar a un pico de cerca de 11.000 millones para 2100 (The United Nations, 2021). Por lo tanto, se prevé como una consecuencia secundaria que aumente la demanda de alimento para ganado y acuicultura, los que aumentarán su producción para satisfacer la demanda de proteína (OECD-FAO, 2018).

La industria del salmón en Chile es la mayor exportación no cobre y representa un 6.1 % de las exportaciones totales del país. La producción viene aumentando sostenidamente desde el año 2016, llegando el año 2020 a producir 990.000 toneladas equivalentes a \$US 4.300 millones (Consejo del salmón, 2021). El salmón es un pez carnívoro y en cultivo es alimentado con harina de pescado, la cual es rica en aminoácidos esenciales (principalmente lisina, histidina y metionina) (Hertrampf & Piedad-Pascual, 2000). Sin embargo, la disponibilidad de este producto se ha visto mermada por la implementación de cuotas fijas de biomasa para la producción, la cual se ha visto disminuida casi en un 50% en países como Chile y Perú, principales productores del producto. Esto, sumado al aumento de la demanda, provocará un aumento en el precio del producto el que actualmente es de \$US1.600 por tonelada (Indexmundi, 2021). Por último, la harina de pescado de baja calidad ha tomado terreno

compitiendo directamente con la harina de pescado de alta calidad, siendo US\$ 300 más barata (Salmonexpert, 2021). Como alternativa a la harina de pescado se encuentra la harina de soya, sin embargo, contiene factores anti-nutricionales y compite con la producción para cultivo humano.

Se hace necesaria por tanto la búsqueda de fuentes de proteínas alternativas para la producción del salmón, que posea un alto valor nutricional, un bajo costo y por sobre todo que satisfaga los requisitos nutricionales del salmón. Las formulaciones alimenticias utilizadas en cultivo de salmón administran el doble de la cantidad mínima de aminoácidos requeridas por las especies. En el caso particular del salmón la metionina es considerada un aminoácido limitante y el contenido mínimo para las especies más producidas en Chile son los siguientes: Salmón atlántico 2,56 g/100 g de proteína (NRC, 2011); Trucha arcoiris 2.14 g/ 100 g de proteína; Salmón Coho 2.7 g/ 100 g de proteína (Sernapesca, 2021). Mientras que el contenido de harina de pescado es de 2.5-3/ 100 g de proteína de proteína y de la harina de soya 1,4 g/100 g de proteína.

En este escenario se creó en proyecto FONDECYT 1180794, en el cual está inserto este trabajo, que tiene como objetivo: “Desarrollar un método para utilizar el desecho de biomasa algal para cultivar *Trichoderma reesei* enriquecida en metionina como proteína de alto valor para alimentación de salmones”

### *1.2. Proteína unicelular, una fuente alternativa y sustentable de proteínas*

El término proteína unicelular o SCP por sus siglas en inglés, se utiliza para referirse a la proteína derivada de células o de microorganismos como levaduras, hongos, algas y bacterias, los cuales son cultivados a partir de diversas fuentes de carbono de bajo costo

para luego ser cosechados y consumidos tanto por humanos como animales (Ghasem, 2015).

La producción de proteína a partir de microorganismos tiene la ventaja de ser más eficiente que cualquier cultivo animal si consideramos el tiempo que demoran en doblar su masa. Por ejemplo, una vaca puede producir 200 g de proteína por día, mientras que los microorganismos, en teoría, pueden producir 25 toneladas en el mismo intervalo de tiempo en condiciones óptimas de cultivo. Si los comparamos con especies vegetales, éstos pueden crecer en pequeñas áreas, por lo que no compiten con el uso de tierras cultivables destinados a alimentación humana, su crecimiento es independiente de las condiciones climáticas y tienen un contenido de proteínas mayor. Por otra parte, los microorganismos son capaces de explorar un amplio rango de sustratos desde CO<sub>2</sub> y azúcares hasta sustratos más complejos como hidrocarburos y materiales lignocelulósicos, además, son más susceptibles a manipulación genética que los animales y vegetales (Nigam, 2014).

La principal desventaja de las SCP es su alto contenido de ácidos nucleicos (4-16 %), debido a que el humano y algunos animales monogástricos como el cerdo y los pollos, no son capaces de digerir completamente estas moléculas, causando daños en el tracto digestivo, cálculos renales y gota (Khan, y cols., 1992). Sin embargo, esto se puede sobrellevar mediante tratamientos químicos con hidróxido de sodio o soluciones salinas concentradas (10%) y tratamientos con calor a 60-70°C por 20 min. Por lo que las SCP pueden ser atractivas para la alimentación de muchos animales debido a la flexibilidad de la alimentación y la menor regulación que poseen los alimentos para estos fines (Ghasem, 2015).

### 1.3. Hongos como fuente de SCP

Se puede obtener SCP a partir de algas, hongos y bacterias: Las algas son la fuente más explotada debido a su bajo contenido de ácidos nucleicos (4-6%), no obstante, su lenta tasa de crecimiento y limitados sustratos a utilizar figuran como desventajas para su uso. Por otro lado, las bacterias tienen el más alto contenido de proteínas (50-83%), pero de igual manera lo es su contenido de ácidos nucleicos (15-16%), lo que dificulta su uso como proteína unicelular. De aquí que aparecen los hongos como una muy buena alternativa de SCP, su contenido de proteínas es de un 30-70%, mientras que el de ácidos nucleicos de 9.7%, considerado como medio. Además, los hongos- especialmente los filamentosos- son capaces de utilizar una amplia gama de sustratos, la mayoría de ellos desechos industriales de bajo costo y desechos lignocelulósicos (Ravindra, 2000). En cuanto a las desventajas, cabe mencionar que los hongos son conocidos por producir metabolitos especializados como micotoxinas como en el caso de las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Estas toxinas son conocidas por producir reacciones alérgicas, enfermedades y cáncer al hígado, tanto en humanos como en animales (Ravindra, 2000; Ghasem, 2015). A pesar de esto, las micotoxinas son fácilmente detectables y pueden ser eliminadas por ejemplo con amonificación en el caso de las aflatoxinas (Ravindra, 2000).

En el caso específico de salmónidos se han utilizado SCP a partir de levaduras como fuente de proteína. Se ha reportado el reemplazo del 37.5% de la harina de pescado por *S. cerevisiae* en la dieta de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris) sin tener impacto en el rendimiento de la producción (Hauptman *et al.*, 2014). De igual manera, la adición de un 18% de extracto de *S. cerevisiae* a la dieta de *O. mykiss* no afectó la tasa crecimiento (Sealey, 2015). Por otra parte, la levadura *Candida utilis* se utilizó para reemplazar la

harina de pescado en un 35% de la dieta de la trucha arcoíris, sin una diferencia significativa en el rendimiento del crecimiento (Martin, *et al.*, 1993). También, se agregó *C. utilis* en las dietas de *Salmo salar* (salmón del Atlántico) resultando en el alivio de la inflamación intestinal causada por los factores anti-nutricionales de la harina de soya (Grammes *et al.*, 2013).

#### 1.4. *Trichoderma reesei*, como proteína unicelular

*Trichoderma reesei* es un hongo filamentoso mesófilo, que se caracteriza por ser un gran productor de enzimas celulolíticas celulasas, por lo que, actualmente es la fuente principal de preparaciones celulíticas comerciales para la biodegradación (Paloheimo, *et al.*, 2016). Este organismo es maleable para la manipulación genética y un gran hospedero para la producción de enzimas recombinantes (Montenecourt & Eveleigh, 1979).

Este microorganismo es una buena alternativa para la producción de SCP, ya que es fácil de cultivar utilizando celulosa como fuente de carbono, alcanzando alta densidad de cultivo (hasta 50 g/L); tiene un alto contenido de proteínas (hasta 40% de su peso seco); no es patogénico y carece de micotoxinas. De hecho, es considerado como *General Regarding As Safe* (GRAS) por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA).

La cepa mutante *Trichoderma reesei* RUT-C30 es hipersecretora de celulasas, por lo que es ampliamente usada en la producción de este tipo de enzimas y de proteínas recombinantes. Esta cepa es producto de tres pasos de mutagénesis al azar de la cepa wild type QM6a, focalizada en la alta producción de celulasas, seleccionando por alta actividad celulasa, y por des-represión por catabolito, seleccionando por resistencia al antimetabolito 2-desoxiglucosa (2DG) (Montenecourt & Eveleigh, 1979). Por lo que, a



diferencia de la cepa *wild type*, RUT-C30 exhibe actividad celulasa en presencia de metabolitos como glucosa, lactosa y glicerol, la que puede llegar a ser casi 3 veces mayor (Gallo et al., 1978). La desrepresión presentada por esta cepa se puede atribuir a una mutación en el gen represor de glucosa *cre1*, codificando una proteína CREI truncada que carece de uno de sus dos motivos dedos de zinc, provocando la transcripción de los ARN mensajero de las celulasas en presencia de glucosa (Peterson & Nevalainen, 2012).

Por último, ya se ha reportado el uso de *T. reesei* para producir SCP. Al fermentar alimentos con *T. reesei*, resulta en una ganancia de peso y mejoras en la tasa de conversión de alimentos en el caso de pollos (Oh, et al., 1991), y en la ganancia de peso y disminución en el costo de alimentación en el caso de ovejas (Omer, et al., 2012). Por otra parte, se han obtenido SCP de cultivos mixtos de *T. reesei* y *Kluyveromyces marxianus* en pulpa de betarraga, produciendo proteína de alto valor nutricional en cuanto a su composición de aminoácidos esenciales, comparado con las pautas de la FAO y con la harina soya (Ghanem, 1992).

### *1.5. Cuerpos de proteínas y su uso en la producción de proteínas recombinantes*

Las plantas tienen la habilidad natural de acumular proteínas de almacenamiento en forma de grandes reservorios proteicos en semillas en desarrollo, llamados cuerpos de proteínas, PBs por sus siglas en inglés (Conley, y cols., 2011). Los cuerpos de proteínas son organelos derivados del retículo endoplasmático (RE) que acumulan proteínas de manera estable, los cuales primero se acumulan en el lumen del RE, para luego trasladarse al citosol en forma de orgánulos esféricos o son secuestrados por la vacuola. En los PBs, se encuentran por lo general dos tipos de proteínas las globulinas y las

prolaminas. Dentro de las últimas se destacan las zeínas del maíz, las que son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso (RER) y luego retenidas en el RE donde se agregan y forman PBs. Existen 4 tipos de Zeínas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ , siendo esta última la única capaz de ser retenida en el RE sin una señal canónica de retención en el RE (HDEL/KDEL). La  $\gamma$ -zeína, es un péptido de 27 KDa que posee 5 elementos asociados a su capacidad de retención y auto-agregación: un péptido señal en el extremo N-terminal, una secuencia repetida rica en prolina (PPPVHL)<sub>8</sub>, un motivo Pro-X (linker), dos residuos de Cys- N terminal y un dominio C-terminal rico en Cys (Schmidt, 2013). Por otra parte, los PBs pueden ser inducidos de manera recombinante, para ello se utilizan fusiones de proteínas, entre una proteína inductora de cuerpos de inclusión y una proteína de interés, con el principal objetivo de aumentar la concentración de la proteína interés y/o asistir la posterior purificación.

Entre las proteínas inductoras de cuerpos de proteínas encontramos a Zera e Hidrofobina 1. Zera es un péptido sintético, derivado de la  $\gamma$ -zeína, el cual contiene los elementos mínimos involucrados en la auto-agregación y retención: La secuencia repetida rica en prolina (PPPVHL)<sub>8</sub> y el dominio Pro-X. La expresión de Zera-fusión se ha probado en distintos sistemas eucariontes, como hongos filamentosos, plantas y células de mamíferos e insectos, lo que ha resultado en la acumulación de las proteínas de interés en cuerpos de proteínas y en el aumento en sus niveles de expresión. En *T. reesei* se expresó la fusión Zera-GFP, resultando en una acumulación de densos cuerpos fluorescentes en los filamentos del hongo (Torrent, *et al.*, 2009). Asimismo, la fusión de Zera con una galactosidasa resultó en una acumulación intracelular de la proteína recombinante alcanzando un título de 0,64 g/L (Smith, *et al.*, 2014).

Por otra parte, Hidrofobina I (HFB1) producida por *T. reesei*, se caracteriza por su pequeño tamaño y su estructura anfipática. Esta proteína si es expresada con un compañero de fusión y con una señal canónica de retención en el RE, es capaz de formar cuerpos de proteínas tanto en plantas como en hongos (Schmidt, 2013). La expresión de la fusión HFB1-GFP en *T. reesei*, resultó en la formación de cuerpos de proteínas a nivel intracelular. Asimismo, se observó que la fusión de HFB1 con una endoglucansa y con una lacasa, forman cuerpos de proteínas activas (Kiiskinen, *et al.*, 2004; Selber, *et al.*, 2004; Mustalahti, *et al.*, 2013).

#### 1.6. Biomasa enriquecida en Metionina

La proteína unicelular a partir de hongos posee un alto porcentaje de metionina alcanzando entre un 1,8- 2,5 % (Brock, 1989). En el caso específico del género *Trichoderma*, especies como *Trichoderma viride* y *Trichoderma deliquescens* reportan un contenido de metionina de 1,7g/ 100 g proteína y 1,3g/100 g de proteína, respectivamente, lo que estaría lamentablemente por debajo de los requerimientos nutricionales mencionados para salmónidos (Smith, *et al.*, 1975). Por lo que se hace necesario un enriquecimiento en metionina de la biomasa del hongo para ser utilizado para estos fines.

En plantas, la expresión recombinante de proteínas de almacenamiento ricas en metionina ha resultado en el aumento significativo de los niveles de esta molécula. Estas proteínas se caracterizan por ser muy estables y formar cuerpos de proteínas (Holding & Larkins, 2008; Amir, *et al.*, 2012). Las albúminas de almacenamiento de plantas se caracterizan por su estructura globular y por ser solubles en agua, muchas de ellas han sido expresadas heterológamente en otras especies vegetales resultando en un

aumento en contenido de proteínas totales y los de metionina (Anthony, y cols., 1997; Dinkins y cols., 2001; Hagan, y cols., 2003). En el proyecto FONDECYT 1180794, se consideraron 5 proteínas ricas en metionina, las que se muestran en la Tabla1. En este trabajo se escogió la proteína albúmina de semilla de *Amaranthus hypochondriacus* (AmA1), cuyo contenido de metionina es de 2.3%, no es alergénica y es rica en todos los aminoácidos esenciales. Esta proteína fue expresada en tubérculos de papa, resultando en un incremento de la proteína total de un 60% y un aumento de 7 veces de los niveles de metionina (Chakraborty, *et al.*, 2000; 2010). De ahora en más en este trabajo se referirá a esta proteína como MPR5, por su código de proyecto.

**Tabla 1.-** Proteínas de almacenamiento ricas en metionina candidatas para expresar en fusión con Zera e HFB1

<b>Proteína</b>	<b>Código</b>	<b>% de Met</b>	<b>Referencia</b>
Albúmina 2S de girasol	MRP1	16	Molvig, y cols., 1997
δ-Zein 18KDa de maíz	MRP2	27	Swarup, y cols., 1995
δ-Zein 10KDa de maíz	MRP3	23	Anthony, y cols., 1997
β-Zein 15KDa de maíz	MRP4	11	Dinkins y cols., 2001
Albúmina de amaranto AmA1	MPR5	2	Chakraborty, y cols., 2000

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### *2.1. Hipótesis*

Las proteínas de fusión entre una proteína inductora de cuerpos de proteínas y una proteína rica en metionina, como Zera-MRP5 o HFBI-MPR5, se expresan de manera estable en *Trichoderma reesei* RUT C30.

### *2.2. Objetivo General*

Generar cepas de *Trichoderma reesei* RUT C30 que expresen las proteínas de fusión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5

### *2.3. Objetivos específicos*

- i. Obtener los casetes de expresión de las proteínas de fusión Zera-MRP5 y HFB1-MRP5
- ii. Obtener cepas de *Trichoderma reesei* RUT C30 que expresen las proteínas de fusión Zera-MRP5 y HFB1-MRP5

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Medios de cultivo

#### **Potato Dextrose (PD):**

Almidón de papa (de infusión) 4 g/L

Dextrosa 20 g/L

#### **Potato Dextrose Agar (PDA):**

Almidón de papa (de infusión) 4 g/L

Dextrosa 20 g/L

Agar 15 g/L

#### **Potato dextrosa Agar Blando (PDB):**

Almidón de papa (de infusión) 4 g/L

Dextrosa 20 g/L

Agar 7 g/L

Sorbitol 1 M

#### **Caldo Luria Bertani (LB):**

Triptona 10 g/L

Extracto de levadura 5 g/L

NaCl 10 g/L

#### **LB Agar (LBA):**

Triptona 10 g/L

Extracto de levadura 5 g/L

NaCl 10 g/L

Agar 15 g/L

#### **GYEC (Xu, B., y cols.,1996):**

Glucosa 15 g/L

Extracto de levadura 3 g/L

Hidrolizado de caseína 5 g/L

#### **Medio mínimo *Trichoderma*, TrMM**

#### **(Pentillä, M, y cols., 1987):**

Glucosa 20 g/L

(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 5 g/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 g/L

MgSO<sub>4</sub> 0,6 g/L

CaCl<sub>2</sub> 0,6 g/L

FeSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O 0,0014 g/L

MnSO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O 0,0016 g/L

ZnSO<sub>2</sub>• 7 H<sub>2</sub>O 0,0014 g/L

CoCl<sub>2</sub> 0,002 g/L, Ajustar pH 5.5

### 3.2. Lista de plasmidios

**Tabla 2.-** Lista de plasmidios utilizada en este trabajo

<b>Plasmidio</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia/Fuente</b>
<b>pBSKII- MRP5</b>	pBluescript II SK(+), vector estándar de clonamiento, conteniendo el gen de la proteína MRP5 con optimización de codones para <i>T. reesei</i> .	Geneart, Alemania
<b>pMRKQ-Zera-MRP1</b>	plasmidio que contiene la construcción sintética de la proteína de fusión Zera-MRP1 con optimización de codones para <i>T. reesei</i> .	Biomatik, Alemania
<b>pMRKQ-HFB1-MRP2</b>	plasmidio que contiene la construcción sintética de la proteína de fusión HFB1-MRP2 con optimización de codones para <i>T. reesei</i> .	Biomatik, Alemania
<b>pMRKQ-Zera-MRP5</b>	Vector comercial que contiene la construcción de la proteína de fusión Zera-MRP5	Este trabajo
<b>pMRKQ-HFB1-MRP5</b>	plasmidio comercial que contiene la construcción de la proteína de fusión HFB1-MRP5	Este trabajo
<b>pTrEno</b>	Vector de expresión utilizado para la producción de proteínas bajo el promotor <i>eno</i> . Contiene inserto el gen <i>chbl</i> . Resistencia a ampicilina en bacterias. Marcador de selección: higromicina. Para <i>T. reesei</i> la integración en el genoma de <i>T. reesei</i> el vector se debe linealizar con <i>SbfI</i> y <i>XhoI</i>	Addgene plasmid # 115474 (Linger, et al., 2015)
<b>pTrEno-Zera-MRP5</b>	plasmidio pTrEno que contiene la construcción de la proteína de fusión Zera-MRP5	Este trabajo
<b>pTrEno-HFB1-MRP5</b>	plasmidio comercial que contiene la construcción de la proteína de fusión HFB1-MRP5	Este trabajo

### 3.3. Listado de microorganismos

**Tabla 3.-** Lista de microorganismos utilizados en este trabajo

<b>Cepa</b>	<b>Descripción</b>	<b>Fuente</b>
<b><i>E. coli</i> DH5α</b>	<i>E. coli</i> desarrollada como cepa de clonamiento, ya que posee mutaciones que aumentan la eficiencia de transformación.	Invitrogen
<b><i>E. coli</i> DH5α/pBSKII- MRP5</b>	<i>E. coli</i> DH5α que porta el vector pBSKII- MRP5	Este trabajo
<b><i>E. coli</i> DH5α pMRKQ-Zera-MRP1</b>	<i>E. coli</i> DH5α que porta el vector pMRKQ-Zera-MRP1.	Este trabajo
<b><i>E. coli</i> DH5α pMRKQ-HFB1-MRP2</b>	<i>E. coli</i> DH5α que porta el vector pMRKQ-Zera-MRP2	Este trabajo
<b><i>E. coli</i> DH5α pMRKQ-Zera-MRP5</b>	<i>E. coli</i> DH5α que porta el plasmidio pMRKQ-Zera-MRP5	Este trabajo
<b><i>E. coli</i> DH5α pMRKQ-HFB1-MRP5</b>	<i>E. coli</i> DH5α que porta el plasmidio pMRKQ-HFB1-MRP5	Este trabajo
<b><i>E. coli</i> DH5α pTrEno-Zera-MRP5</b>	<i>E. coli</i> DH5α que porta el plasmidio pTrEno-Zera-MRP5	Este trabajo
<b><i>E. coli</i> DH5α pTrEno-HFB1-MRP5</b>	<i>E. coli</i> DH5α que porta el plasmidio pTrEno-HFB1-MRP5	Este trabajo
<b><i>T. reesei</i> RUT C30</b>	Mutante de <i>T. reesei</i> hipersecretora, utilizada para la producción de enzimas celulíticas y proteínas recombinantes. En este trabajo se utiliza como cepa parental para transformación genética.	Fungal Genetics Stock Center (FGSC)
<b><i>T. reesei</i> RUT C30 Zera-MRP5</b>	<i>T. reesei</i> RUT C30 que contiene el casete de expresión Zera-MRP5 inserto en su genoma	Este trabajo
<b><i>T. reesei</i> RUT C30 HFB1-MRP5</b>	<i>T. reesei</i> RUT C30 que contiene el casete de expresión HFB1-MRP5 inserto en su genoma	Este trabajo



### 3.4. Lista de partidores

**Tabla 4.-** Lista de partidores utilizados en este trabajo

Partidor	Secuencia 5' → 3'	Tm (°C)	Uso
M13_FWD	tgtaaacgacggccagt	56	Partidores universales para verificación por secuenciación de Sanger ubicados en el gen <i>lacZ</i>
M13_REV	aggaaacagctatgac	49	
SEQ_FWD	atgcccagctacctacctc	60	Partidores para verificación por secuenciación de Sanger en el vector pTrEno
SEQ_REV	gacctgacagacaaccaa	58	
MRP5_FWD	atggccggcctccccgtattatg	63,2	amplificación del gen de la proteína MRP5 (AmA1)
MRP5_REV	cgttgttgagccaagctcaatgatttc	60,4	
F1_FWD	tgcaggtgattccgtcct	57	Amplificación de los casetes de expresión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5
F2_REV	ctcgagaacacttcggtg	52,8	

### 3.5. Diseño de las construcciones de las proteínas de fusión

Las construcciones de fusión tanto para Zera-MRP5 como para HFBI-MRP5, se muestran en la Figura 1.

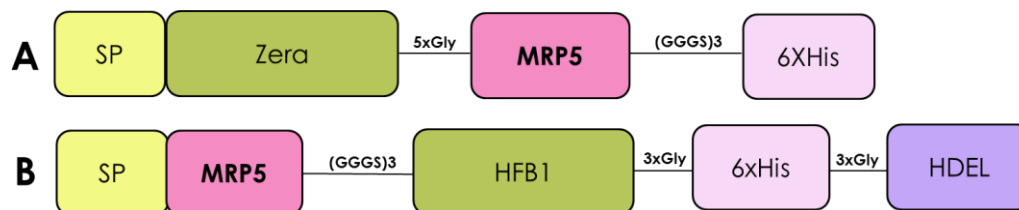


Figura 1 **Construcciones de fusión.** En A, construcción de fusión de la proteína Zera-MRP5. En B, construcción de fusión para proteína HFBI-MRP5. SP: Péptido señal de exportación a RE del gen *cbh1* de *T. reesei*, 6XHIS: tag de afinidad de 6 histidinas; HDEL: señal canónica de retención en el retículo endoplasmático. 5xGly, 3Gly y (GGGS)<sub>3</sub> enlazadores flexibles descritos por Torrent, 2009 y Mustalahti y col., 2013

### 3.6. Diseño experimental del ensamblaje de los casetes de expresión

Para la construcción de los casetes de expresión se inició con tres plasmidios base: pMRKQ-Zera-MRP1, pMRKQ-HFBI-MRP2 y pBSK(II)-MRP5, los cuales fueron sintetizados con optimización de codones para expresión en *T. reesei*. Estos plasmidios contienen la construcción Zera-MRP1, la construcción HFBI-MRP2 y el gen de la proteína MPR5, respectivamente y fueron digeridos con las enzimas *NdeI* y *NheI*, con el fin de poder insertar el gen de interés, MPR5, en las construcciones de fusión mediante una reacción de ligación (Figura 2A y 2B). Los productos de ligación corresponden a los plasmidios pMRKQ-Zera-MRP5, pMRKQ-HFBI-MRP5, con los cuales se transformó *E. coli* DH5 $\alpha$  por medio de transformación de células quimiocompetentes, con el fin de propagar ambos plasmidios. Luego, para insertar las construcciones Zera-MRP5 y HFBI-MRP5 al vector de expresión pTrEno, los plasmidios pMRKQ-Zera-MRP5, pMRKQ-HFBI-MRP5 y pTrEno fueron digeridos por las enzimas de restricción *PacI* y *XbaI* (Figura 2C). Los fragmentos correspondientes a las construcciones de fusión insertados en pTrEno mediante una reacción de ligación (Figura 2D), obteniéndose los plasmidios pTrEno-Zera-MRP5 y pTrEno-HFB1-MRP5. Las construcciones de fusión quedaron así bajo control del promotor *eno* y la terminación de la transcripción determinada por el terminador Cel6ter. Se transformó la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  por medio de quimiotransformación, con ambos plasmidios con el fin de propagarlos. La transformación de *T. reesei* RUT C30 debe llevarse a cabo con ADN lineal, por lo tanto, los vectores pTrEno-Zera-MRP5 y pTrEno-HFB1-MRP5 fueron linealizados digiriendo con las enzimas *SfiI* y *XhoI* (Figura 2E). Como resultado se obtuvieron los casetes de expresión (Figura 2F), con los que se transformó *T. reesei* RUT C30 mediante de transformación de protoplastos.

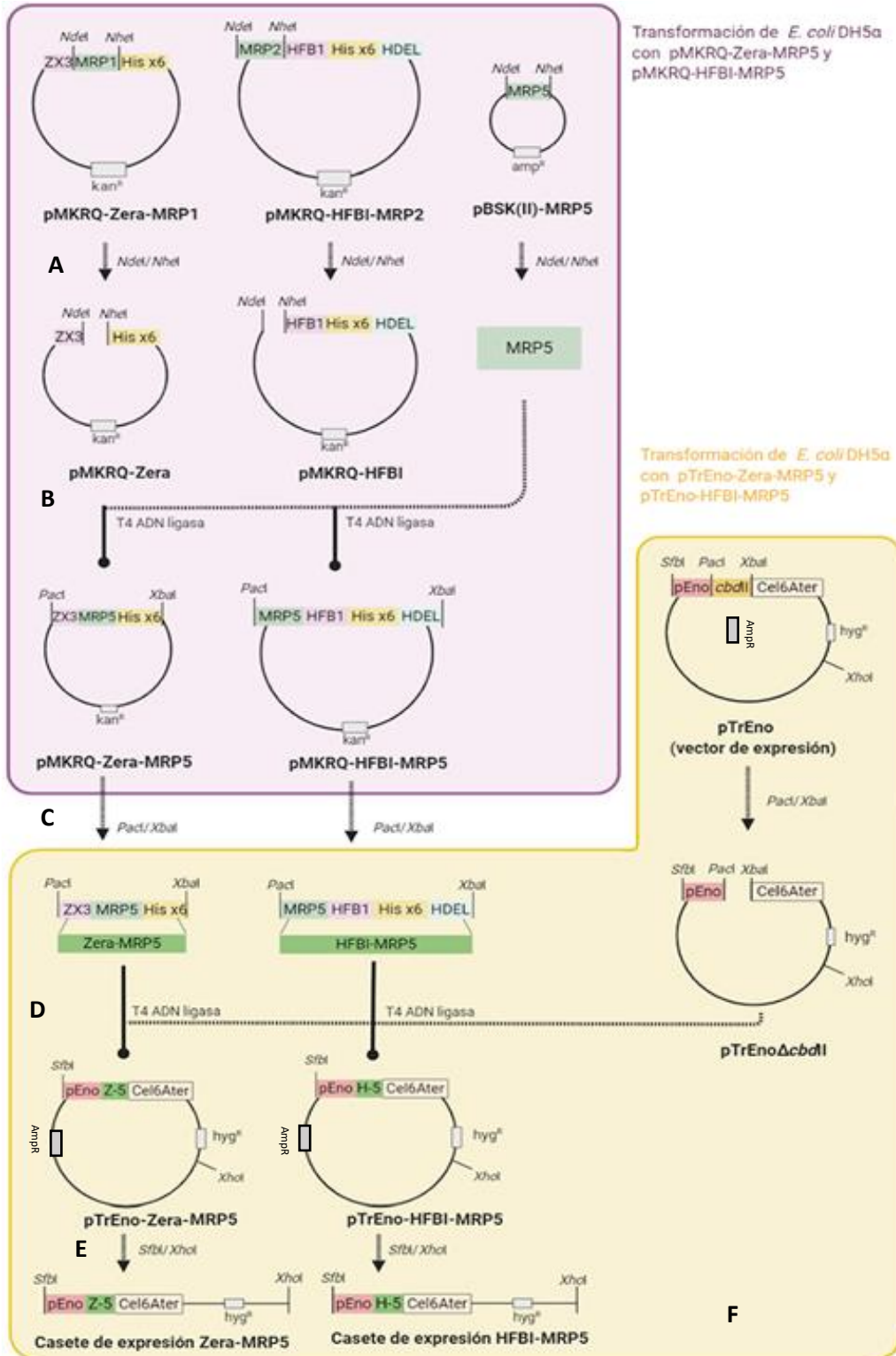


Figura 2 Diseño experimental para la construcción de los casetes de expresión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5

### 3.7. Ensamblaje de las construcciones Zera-MRP5 y HBF1-MRP5

Para el ensamblaje de las construcciones de fusión Zera-MRP5 y HBF1-MRP5, 500 ng de los plasmidios pBSKII- MRP5, pMRKQ-Zera-MRP1 y pMRKQ-HFBI-MRP2 fueron digeridos con las enzimas *NdeI* y *NheI* (New England Biolabs) y se visualizó los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). Las bandas correspondientes a las secuencias de pMRKQ-Zera, pMRKQ-HFBI y MRP5, fueron purificadas desde gel mediante el kit GeneJET Gel Extration Kit (Thermo Scientific). Luego, se realizaron dos reacciones de ligación con la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), las que se incubaron a 4°C durante toda la noche. Se utilizó 5 µl de cada reacción de ligación para transformar *E. coli* DH5α mediante quimiotransformación. Las células transformadas se plaquearon en placas de selección con LB suplementado con kanamicina 50 µg/mL. Se analizaron las colonias transformantes obtenidas mediante PCR de colonias utilizando los partidores M13\_FWD y M13\_REV. Además, se extrajo ADN plasmidial de las colonias transformantes mediante el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) y se enviaron a secuenciar, utilizando los mismos partidores. Las secuencias resultantes fueron editadas y alineadas con el programa Snapgene® 3.2.1. Mientras que, las secuencias de consenso fueron determinadas mediante la plataforma Benchling ([www.benchling.com](http://www.benchling.com)).

### 3.8. Construcción de los casetes de expresión Zera-MRP5 y HBF1-MRP5

Los casetes de expresión Zera-MRP5 y HBF1-MRP5, fueron construidos digiriendo 500 ng de los plasmidios pMRKQ-Zera-MRP5 y pMRKQ-HFBI-MRP5 con las enzimas *PacI* y *XbaI* (New England Biolabs). Se visualizó los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). Las bandas correspondientes a las construcciones de fusión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5, fueron purificadas desde gel mediante el kit GeneJET Gel Extration Kit (Thermo Scientific). Luego, ambas construcciones se unieron al vector pTrEno -

previamente linealizado por digestión con las mismas enzimas de restricción que las construcciones- mediante una reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), las que se incubaron a 4°C durante la noche. Se utilizó 5 µl de cada una de las reacciones de ligación para transformar *E. coli* DH5α mediante quimiotransformación. Las células transformadas se plaquearon en placas de selección con LB suplementado con ampicilina 50 µg/mL. Se analizaron las colonias transformantes obtenidas mediante PCR de colonias utilizando los partidores SEQ\_FWD y SEQ\_REV. Además, se extrajo ADN plasmidial de las colonias transformantes mediante el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). Los plasmidios pTrEno-Zera-MRP5 y pTrENO-HBF1-MRP5 fueron enviados a secuenciar utilizando los primer SEQ\_FWD y SEQ\_REV. Para purificar los casetes de expresión, se linealizaron estos plasmidios digiriendo 6 µg de cada uno con las enzimas de restricción *Sfbl* y *XhoI*. Se visualizó los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) y los casetes de expresión se purificaron desde gel con el kit GeneJET Gel Extration Kit (Thermo Scientific).

### 3.9. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de *T. reesei* RUT C30 se llevó a cabo mediante un protocolo modificado de Cassago y col., 2002. La pared celular del hongo se rompió de manera mecánica utilizando dos métodos. Primero, se molió con mortero el micelio obtenido a partir de 50 mL de un cultivo de 3 días de *T. reesei* RUT C30, que previamente enfriado con nitrógeno líquido y se agregó 400 µL de Buffer de Resuspensión [Tris HCl 50mM; EDTA 10mM; SDS 1% (p/v)] al homogeneizado obtenido. En un segundo paso, se lisó utilizando 0,2 g de bolitas de vidrio 425-600 µm (Sigma-aldrich) y Minilys Personal Homogenizer (Bertin) en 3 ciclos de 30 s a 3000 rpm y 15s de reposo en hielo. Se extrajo el ADN mediante el método fenol:cloroformo:isoamilalcohol para lo que se añadió 400 µL de solución fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1) al lisado y se incubó a 37°C por 15 min a 200 rpm.

Luego, se centrifugó a 14.000 rpm por 15 min y se rescató el sobrenadante. Se precipitó el ADN añadiendo 80  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M pH 4,8 y 1 mL de etanol absoluto, se incubó a -20°C por 30 min. Se centrifugó a 14.000 rpm por 15 min, el pellet obtenido se lavó dos veces, una con etanol 70% (v/v) y otra con etanol absoluto. Finalmente, se resuspendió con 20 $\mu$ L de Buffer TER [Tris-HCl 10 mM; EDTA 1mM; RNase A 20  $\mu$ g/ml]. Se visualizaron los resultados mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,5% (p/v).

### 3.10. *Extracción de proteínas*

La extracción de proteínas se realizó a partir de cultivos de 50 mL de *T. reesei* RUT C30 en medio MMTTr glucosa 2%, en el caso de las transformantes, en medio fue suplementado con higromicina 100  $\mu$ g/ml. Los cultivos se incubaron durante 3 días a 30°C a 200 rpm y luz (ampolleta 15 watts incandescente). Se colectó la biomasa por centrifugación y se transfirió a un tubo de centrifuga de 2 mL. Luego, se añadió bolitas de vidrio 425-600  $\mu$ m (Sigma-aldrich) en razón 1:1 con el peso del pellet obtenido y 400  $\mu$ L de Buffer PBH5 [HEPES 10mM; EDTA 2 mM]. Se homogeneizó la muestra con Minilys Personal Homogenizer (Bertin) en tres ciclos de agitación a 5000 rpm por 30 s y 15 s de reposo en hielo. Finalmente, se centrifugó durante 15 min a 14.000 rpm y se rescató el sobrenadante. Se cuantificó proteínas mediante el método de Bradford, utilizando el reactivo Bradford Biorad. La concentración de proteínas se obtuvo utilizando la curva de calibración de la Figura 3.

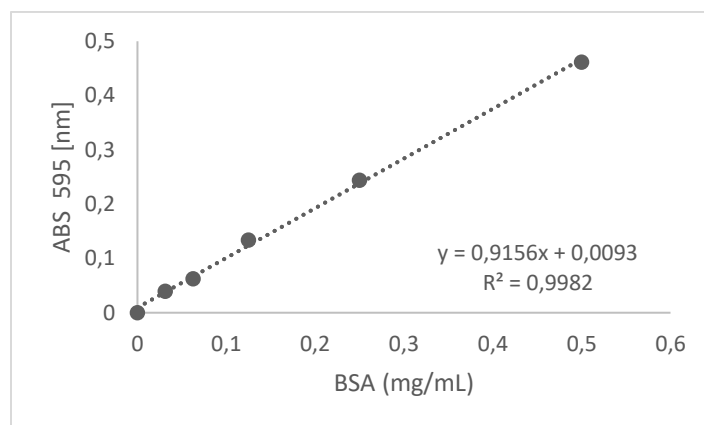


Figura 3 Curva de calibración con BSA para cuantificación de proteínas

### 3.11. Determinación de las condiciones de cultivo para preparación de protoplastos

Se realizó la recolección de conidias, la que se efectuó a partir de placas de PD agar, en las cuales se creció *T. reesei* RUT C30 en modo de césped hasta observar esporulación, aproximadamente 7 días. Se añadió sobre las placas 5-7 mL de agua destilada estéril y se desprendió las conidias con un rastrillo tratando de desprender la menor cantidad posible de micelio. Se filtró las conidias utilizando un embudo filtrador de porosidad 1. Se contó las conidias obtenidas utilizando cámara de Neubauer. Se almacenó las conidias a 4°C hasta su utilización por un máximo de 7 días.

Se determinaron las condiciones idóneas de cultivo, en cuanto a eficiencia de germinación de las conidias y de homogeneidad de cultivo. Se probaron 3 medios de cultivo: LB, CYEC y PD; distintas concentraciones de inóculo ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conidias/mL), 2 temperatura de cultivo (25 y 30°C), tiempo de incubación (entre 16-24 hr). Cada una de las condiciones fue probada en matraces de 250 ml con 100 mL de medio de cultivo, incubación con luz de ampolleta (15 watts incandescente) y agitación de 270 rpm. La germinación de las conidias se evaluó mediante observación con microscopio óptico a 400X y se registraron los

resultados mediante el software Leica LAS EZ 2.0.0. En el caso de la homogeneidad del cultivo se evaluó cualitativamente, observando presencia/ausencia de agregados y el tamaño de éstos.

### 3.12. Preparación de protoplastos

Se prepararon protoplastos a partir de un cultivo de 100 mL de *T. reesei* RUT C30, en las condiciones determinadas como idóneas para este propósito: en medio PD con un inóculo de  $10^7$  conidias/mL, a una temperatura 30°C por 17 h a una agitación de 270 rpm con luz de ampolleta (15 watts incandescente). El micelio fue recolectado mediante filtración utilizando un embudo estéril con dos filtros Miracloth. Se lavó el micelio obtenido con 50 mL de agua destilada estéril y se recuperó el micelio con una espátula igualmente estéril. En una placa Petri tarada se pesó entre 0,3-0,4 g de micelio, el que luego se agregó a un tubo Falcon de 50 mL conteniendo 10 mL de extracto enzimático esterilizado con filtro de 0,22 µm. El extracto enzimático corresponde a una solución de con "X" concentración de Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) en solución osmótica [CaCl<sub>2</sub> 50mM; manitol 0,5 M; MES 50 mM, pH 5,5 con KOH, esterilización con autoclave]. Se homogeneizó mediante vórtex y se incubó la reacción por distintos tiempos a 28°C y con agitación de 55 rpm. Se probó distintas concentraciones de enzimas líticas (5, 10, 20 y 40 mg/mL) y tiempos de incubación (16-24 h), hasta obtener la concentración de protoplastos necesaria ( $10^8$ - $10^9$  células/mL). Durante la incubación, se evaluó la formación de protoplastos mediante observación bajo microscopio óptico a un aumento de 400X. Una vez terminada la digestión, la suspensión de protoplastos con micelio se filtró utilizando el filtro Nytex. El filtrado se lavó con 2 mL de solución isosmótica para desprender la mayor cantidad de protoplastos. Se dividió la suspensión de protoplastos en tubos de centrifuga de 1,5 mL y se centrifugó por 10 min a 8000 rpm. Se descartó el sobrenadante, y el pellet de protoplastos se resuspendió en un volumen mínimo de solución osmótica mezclando



suavemente. Los protoplastos se cuantificaron utilizando cámara de Neubauer. Se validaron mediante la visualización de la explosión de protoplastos al añadir agua destilada a la solución, a lo que se denominó en este trabajo Test de agua destilada.

### 3.13. Transformación de protoplastos de *Trichoderma reesei* con los casetes de expresión Zera-MRP5 y HBF1-MRP5.

Se evaluaron distintos métodos de transformación para *T. reesei* RUT C30, además de distintos protocolos para un mismo método. Los métodos y protocolos probados se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5.-** Tabla resumen de los métodos de transformación de *Trichoderma reesei* probados en este trabajo

Método	Referencia	Resultado
Electroporación de conidias	(Linger, y col., 2015)	x
Electroporación de esferoplastos	(Kothe & Free, 1996)	x
Transformación de protoplastos	(Pentillä, y col., 1987)	x
Transformación de protoplastos	(Casas-Flores y col., 2004; Herrera-Estrella y col., 1990)	✓

Se obtuvieron resultados positivos con un protocolo adaptado a lo que describen Casas-Flores y col., 2004; Herrera-Estrella y col., 1990. Primero, se amplificó mediante PCR ambos casetes de expresión, utilizando los partidores F1\_FWD y F2\_REV. La reacción de 20µL de PCR se diluyó con 20 µL de solución osmótica. Luego, se realizaron 3 reacciones de transformación: La transformación con el casete Zera-MRP5 (240 µL de solución de protoplasto más 20 µL solución de producto PCR Zera-MRP5), La transformación con el casete HFBI-MRP5 (240 µL de solución de protoplasto más 20 µL solución de producto de PCR HFB1-MRP5) y una reacción control (240 µL de solución de protoplasto más 20 µL solución de solución osmótica). Se colocaron las muestras en hielo durante 20 min. Luego,

se les añadió 260 µL de Solución de Polietilenglicol [PEG 3335 al 40% en solución osmótica, esterilizada por autoclave] a 42°C y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se colocaron las reacciones en 10 mL de medio PDB suplementado con higromicina 100 µg/ml, los que después se dispersaron en una placa de PDA suplementada con sorbitol 0,5 M e higromicina 100 µg/ml. Se incubaron las placas a 30°C durante 10 días.

### 3.14. *Evaluación de las transformantes Zera-MRP5 y HBF1-MRP5, mediante secuenciación de productos de PCR*

Se extrajo el ADN genómico de transformantes de *T. reesei* RUT C30. Alícuotas de éste se enviaron a secuenciar utilizando los partidores MPR5\_FWD y MPR5\_REV. Las secuencias resultantes fueron editadas y alineadas con el programa Snapgene® 3.2.1. Mientras que las secuencias de consenso fueron identificadas mediante la plataforma Benchling ([www.benchling.com](http://www.benchling.com)).

### 3.15. *Western Blot*

La evaluación de la expresión de las proteínas de fusión Zera-MRP5 y HBF1-MRP5 en *T. reesei* Rut C30 se realizó mediante Western Blot. Las proteínas totales extraídas tanto de los clones transformantes como de la cepa parental fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12,5%, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Sigma-Aldrich) mediante electrotransferencia. La transferencia de las proteínas se corroboró utilizando una solución de Rojo Ponceau 0,1%(p/v). La membrana se bloqueó incubando con la solución de bloqueo [TBS-T 0,1%- 5% leche] durante 1 h a temperatura ambiente en agitación; transcurrida la incubación se lavó la membrana con buffer TBS [Tris HCl 50 mM, pH 7,6; NaCl 150 mM]. La membrana se incubó con el anticuerpo anti His-tag, 6X-His Tag Monoclonal Antibody (3D5), AP (Thermo Fisher Scientific), en dilución 1:5000 en una solución de TBS-T 0,1%- leche 1%. Se incubó con el anticuerpo durante una 1 h a

temperatura ambiente en agitación. Finalmente, se lavó la membrana con TBS y se reveló colorimétricamente incubando con una solución de 1-StepNBT/BCIP por 15 min.

### 3.16. *Análisis cualitativo del fenotipo de las cepas mutantes*

Se realizó un análisis cualitativo de las características fenotípicas de las mutantes Zera-MRP5 y HFBI-MRP5 de *T. reesei* RUT C30. Se observó el crecimiento de las mutantes en medio PD en matraces de 250 mL incubado durante 3 días, con énfasis en el desarrollo de filamentos y tamaño de los agregados. Por otro lado, se analizó el fenotipo de las colonias, las cuales fueron crecidas en placas de PDA, las que también fueron observadas al microscopio óptico con aumento 400X.

## RESULTADOS

### 4.1. Ensamblaje de las construcciones de fusión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5

El ensamblaje de las construcciones de fusión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5, se realizó a partir de vectores previamente sintetizados. Se digirieron los vectores pMRKQ-Zera-MPR1, pMRKQ- HFBI-MRP2 y pBSK(II)-MRP5 con las enzimas *NheI* y *NdeI*, obteniéndose el patrón de digestión esperado, por lo que, desde ahí se purificaron las bandas correspondientes a los fragmentos a pMRKQ-Zera y pMRKQ-HFBI y MRP5. En caso de pMRKQ-Zera y pMRKQ-HFBI se observaron dos bandas únicas de tamaño aproximado de 2,8 kb (Anexo 1A), mientras que para MPR5 una banda de aproximadamente 1kb (Anexo 1B). Con las reacciones de ligación entre pMRKQ-Zera y MRP5 y de pMRKQ-HFBI con MRP5, se transformó *E.coli* DH5 $\alpha$ , cuyas colonias transformantes fueron seleccionaron por resistencia a kanamicina. Se validaron las transformantes obtenidas para ambas transformaciones mediante PCR de colonias, cuyos resultados se muestran en la Figura 5. Se analizaron tres colonias transformantes para el plasmidio pMRKQ- Zera-MRP5, las cuales presentaron productos de PCR de aproximadamente 1600 bp (Figura 4A). En el caso del plasmidio pMRKQ-HBFI-MRP5, se analizaron 4 colonias, las cuales todas resultaron positivas, ya que presentaron productos PCR de tamaño cercano a los 1600 bp (Figura 4B). Además, C1-C3 de pMRKQ- Zera-MRP5 y C1-C3 de pMRKQ-HFBI fueron validadas mediante secuenciación de productos de PCR. Si bien, los resultados obtenidos corresponden sólo a las secuencias obtenidas con el partidor M13\_FWD (Tabla 3), estas secuencias alinean con alta identidad con más de la mitad de la secuencia de las construcciones (longitud de la flecha roja, Figura 4C y 4D). Las secuencias obtenidas de las colonias C1, C2 y C3 de la transformación pMRKQ-Zera-MRP5, presentan un porcentaje de identidad con la secuencia del plasmidio de 97,9%, 99,4% y 97,9%, respectivamente (Figura 4C). Mientras que obtenidas de las colonias C1, C2 y C3 de la transformación con

pMRKQ-HFBI-MRP5, presentaron un porcentaje de identidad con la secuencia del plasmidio de un 99,10%, 99,12% y 97,93%, respectivamente (Figura 4D). Finalmente, el ADN plasmidial de las colonias transformantes se digirió con las enzimas *PacI* y *XbaI*, lo que permitió validar las transformantes al obtener el patrón de digestión esperado, el que está constituido por dos bandas, una de aproximadamente 3 Kb y la otra cercana a 1,5 kb (Figura 4E). Las bandas de menor peso molecular corresponden en las construcciones de fusión, Zera-MRP5 y HFBI-MRP5, ya que éstas poseen un tamaño aproximado de 1,4 kb, por lo que fueron purificadas para poder ser insertadas en los casetes de expresión (Figura 4F).

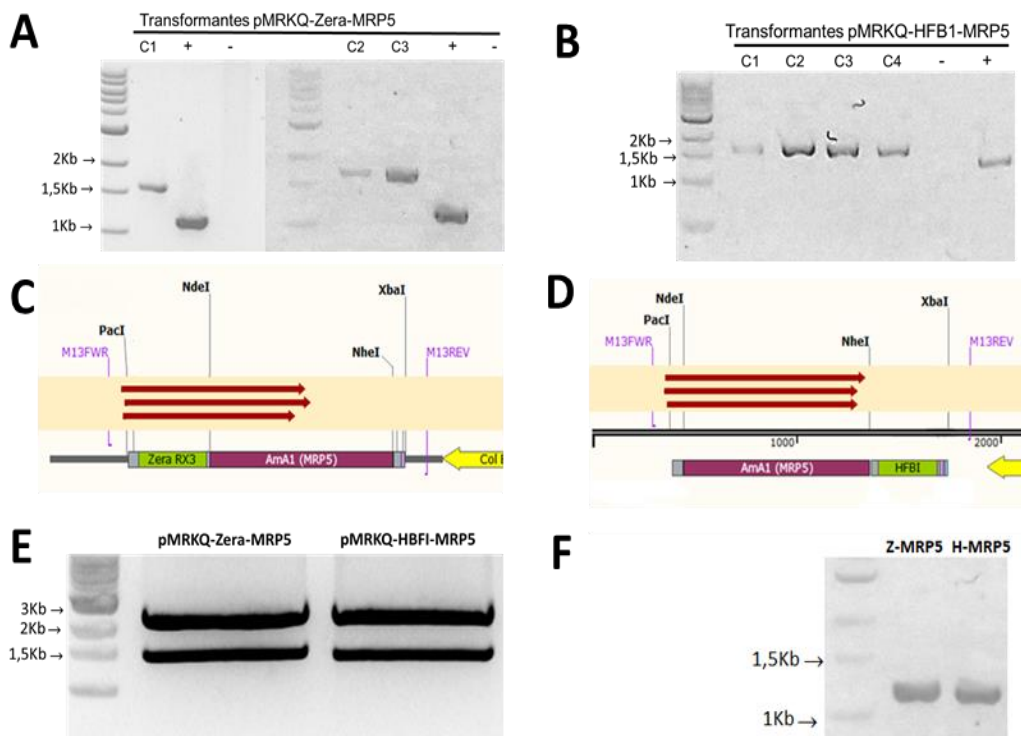


Figura 4 **Análisis transformantes para pMRKQ-Zera-MRP5 y pMRKQ-HBFI-MRP5 y purificación de las construcciones de fusión Zera-MRP5 y HBFI-MRP5.** En A, Electroforesis en gel de agarosa del PCR de colonias de las colonias transformantes para pMRKQ-Zera-MRP5, C1, C2 y C3, corresponden a los amplicones obtenidos para cada una de las colonias, (+) es el control positivo de amplificación el vector pMRKQ-Zera-MRP1 (938 bp) y (-) es el control negativo, agua. En B, Electroforesis en gel se agarosa del PCR de colonias de las colonias transformantes para pMRKQ-HBFI-MRP5, C1, C2, C3 y C4, corresponden a los amplicones obtenidos para cada una de las colonias, (+) es el control positivo de amplificación el vector pMRKQ-HBFI-MRP2 (1115 bp) y (-) es el control negativo, agua. En C, alineamiento de las secuencias obtenidas de la secuenciación del ADN plasmidial de las colonias transformantes para pMRKQ-Zera-MRP5 utilizando el partidor M13\_FWD. En D, alineamiento de las secuencias obtenidas de la secuenciación del ADN plasmidial de las colonias transformantes para pMRKQ-HBFI-MRP5 utilizando el partidor M13\_FWD. En E, electroforesis en gel de agarosa del patrón de digestión obtenido al digerir pMRKQ-Zera-MRP5 y pMRKQ-HBFI-MRP5 con las enzimas *PacI* y *XbaI*. En F, visualización de las construcciones Zera-MRP5 y HBFI-MRP5 purificados mediante electroforesis en del de agarosa. Marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (NEB).

#### 4.2. Obtención de los casetes de expresión Zera-MRP5 y HFB1-MRP5

Una vez purificadas las construcciones de fusión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5, estas fueron insertadas en el vector de expresión pTrEno. pTrEno fue digerido con las enzimas de restricción *PacI* y *XbaI*, y las construcciones fueron insertadas en el vector en una reacción de ligación. Se transformó *E. coli* DH5 $\alpha$  con ambos productos de ligación y se seleccionaron transformantes mediante resistencia a ampicilina. Se validaron las transformantes obtenidas mediante un PCR de colonias (Figura 5A). Se analizaron 3 colonias obtenidas de la transformación con pTrEno-Zera-MRP5 y 3 colonias de la transformación con pTrEno-HFB1-MRP5, evidenciando que todas las colonias presentaron productos PCR del tamaño esperado para la amplificación con los partidores SEQ\_FWD y SEQ\_REV (Tabla3), un fragmento de tamaño cercano a las 1,6 kb. A partir de 2 colonias de cada transformación se extrajo ADN plasmidial, los cuales fueron enviadas a secuenciar, cuyos resultados se presentan en las Figuras 5B y 5C. Se observa que las secuencias obtenidas de las transformantes con el plasmidio pTrEno- Zera-MRP5, alinean con gran identidad y con total cobertura (largo de la flecha) con la secuencia esperada del vector, las colonias C1 Y C2, obtuvieron un porcentaje de identidad de 99,93% y 99.73%, respectivamente (Figura 5B). Por otra parte, se observa que las secuencias obtenidas de las transformantes con el plasmidio pTrEno-HFBI-MRP5, también poseen alta identidad y cobertura con respecto a la secuencia del plasmidio, ambas poseen un 100% de porcentaje de identidad (Figura 5C). Finalmente, los ADN plasmidiales extraídos fueron digeridos utilizando las enzimas *SfiI* y *XhoI*, los patrones de digestión obtenidos se muestran en la Figura 5D. Ambos plasmidios presentan patrones de digestión similares constituidos por dos bandas, una banda superior que tiene un tamaño aproximado de 7 kb, y una inferior, de un tamaño cercano a los 3 kb. Los casetes expresión corresponden a las bandas de 7 kb, las cuales fueron purificadas,

ya que el vector pTreno para integrarse en el genoma debe estar de forma lineal (Figura 5E).

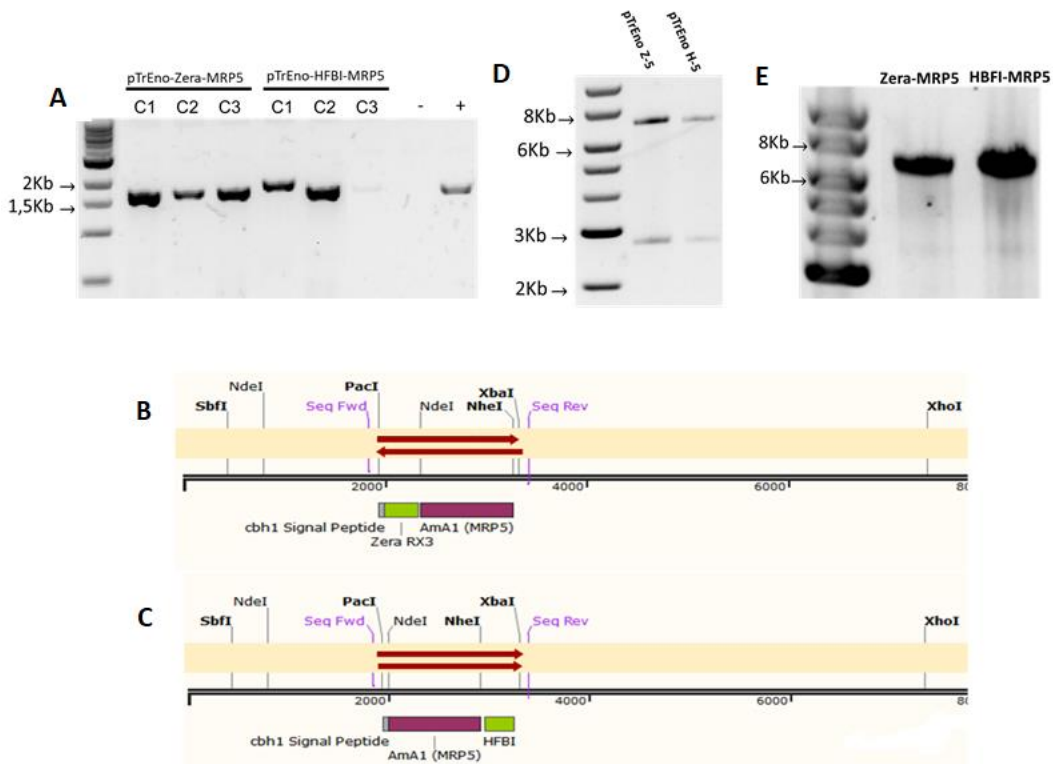


Figura 5 **Análisis de las transformantes para pTrEno-Zera-MRP5 y pTrEno-HFBI-MRP5 y purificación de los casetes de expresión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5.** En A, Electroforesis en gel de agarosa del PCR de colonias de las colonias transformantes para pTrEno-Zera-MRP5 (izq), C1, C2 y C3, corresponden a los amplicones obtenidos para cada una de las colonias, (+) es el control positivo de amplificación el vector pTrEno y (-) es el control negativo, agua. Las colonias transformantes para pTrEno-HFBI-MRP5 (der), C1, C2 y C3, también presentan amplicones. En B, Electroforesis en gel de agarosa del patrón de digestión obtenido al digerir pTrEno-Zera-MRP5 y pTrEno-HFBI-MRP5 con las enzimas *SbfI* y *XhoI*. En C, Electroforesis en de agarosa casete de fusión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5 purificados. En D, alineamiento de las secuencias obtenidas de la secuenciación del ADN plasmidial de las colonias transformantes para pTrEno-Zera-MRP5 utilizando los partidores SEQ\_FWD y SEQ\_REV. En E, alineamiento de las secuencias obtenidas de la secuenciación del ADN plasmidial de las colonias transformantes para pTrEno-Zera-MRP5 utilizando los partidores SEQ\_FWD y SEQ\_REV. Marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (NEB).



### 4.3. Preparación de protoplastos

Para establecer las mejores condiciones de cultivo para la preparación de protoplastos, primero se recolectó esporas de *T. reesei* RUT C30 obteniéndose de cada placa una concentración de esporas entre  $10^8$ - $10^9$  esporas/mL (Figura 6A). Luego, se probaron distintas condiciones de cultivo: distintos medios, cantidad de inóculo, temperatura de incubación y tiempo de incubación. Se logró establecer que las mejores condiciones de cultivo para la preparación de protoplastos corresponden a un cultivo de 100 ml en medio PD, con un inóculo de  $10^7$  conidias, a una temperatura  $30^\circ\text{C}$ , con un tiempo de incubación de 17h a 270 rpm con luz de ampolleta (15 watts incandescente). Estas condiciones fueron establecidas observando la formación de agregados en el medio de cultivo y la germinación de las esporas (Figura 6B). En dichas condiciones, el medio presentó la menor formación de agregados, los cuales fueron escasos en cuanto a número y de gran tamaño (Figura 6C), además se obtuvo una cantidad de biomasa adecuada para realizar la preparación de protoplastos (0,6 g en 100mL aproximadamente). En cuanto a las germinículas, éstas poseen el largo apropiado para obtener protoplastos a partir de ellas (Figura 6D), ya que se observa la germinación de la espora y crecimiento del tubo germinal.

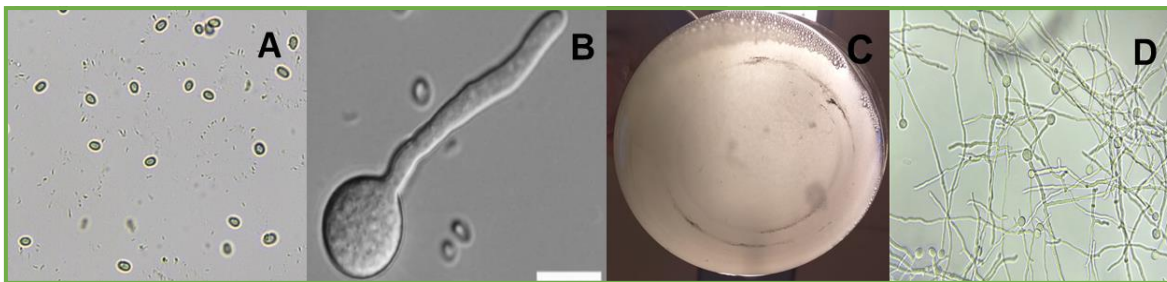


Figura 6 **Determinación de las condiciones de cultivo de *T. reesei* RUT C30 para la preparación de protoplastos.** En A, conidias recolectadas para los inóculos. En B, imagen de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) de conidia germinada de *T. reesei* RUT C30, barra 20  $\mu\text{m}$  (Seidl y col., 2008). En C, se muestra las condiciones de homogeneidad de cultivo. En D, se muestra imágenes de microscopio

óptico 400X del estado de crecimiento de las germinículas en las condiciones de crecimiento idóneas establecidas.

Una vez establecidas las condiciones idóneas de cultivo, se determinaron dos parámetros para la preparación de protoplastos: la concentración del mix enzimático de lisis y el tiempo de incubación. Los resultados indican que, a mayores concentraciones de enzima y tiempos de incubación, mayor es la concentración de protoplastos obtenida. Se observó formación de protoplastos desde la concentración 5 mg/mL de mix enzimático de lisis. Sin embargo, se obtuvo una concentración de protoplastos dentro de los valores requeridos,  $10^8$ - $10^9$  protoplastos/mL, solo con las concentraciones 20 y 40 mg/mL de enzimas de lisis. En cuanto a los tiempos de incubación, se fue evaluando la formación de protoplastos cada hora, y se registraron los resultados a partir de la tercera hora de incubación (Figura 7). En la Figura 7A se muestra la formación de protoplastos con 20 mg/mL a las 3 h de incubación, donde se advierte la formación de protoplastos, los que lucen como esferas de color verde oscuro. A las 4 h de incubación, se percibe un aumento en el número y en el tamaño de los protoplastos, por lo que fueron recolectados (Figura 7B). Se contabilizaron los protoplastos obtenidos después de la filtración de la reacción de digestión, diluidos 1:100 en solución osmótica los que alcanzaron una concentración de orden de  $10^8$  protoplastos/mL (Figura 7C). Se realizó la validación de la obtención de protoplastos mediante el Test de agua destilada, cuyos resultados se pueden observar en el siguiente enlace [https://drive.google.com/file/d/1Ka\\_oit--l0dtaQQQCoHYzDxsIMsIGVCi/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1Ka_oit--l0dtaQQQCoHYzDxsIMsIGVCi/view?usp=sharing). Se seleccionó la concentración de 20 mg/mL de solución de enzimas de lisis y un tiempo de incubación de 4 h para la preparación

de protoplastos, ya que se producía un volumen y concentración de protoplastos suficiente para realizar los experimentos deseados. En cuanto a la concentración 40 mg/mL no presentó resultados significativamente mejores a los obtenidos con 20 mg/mL.

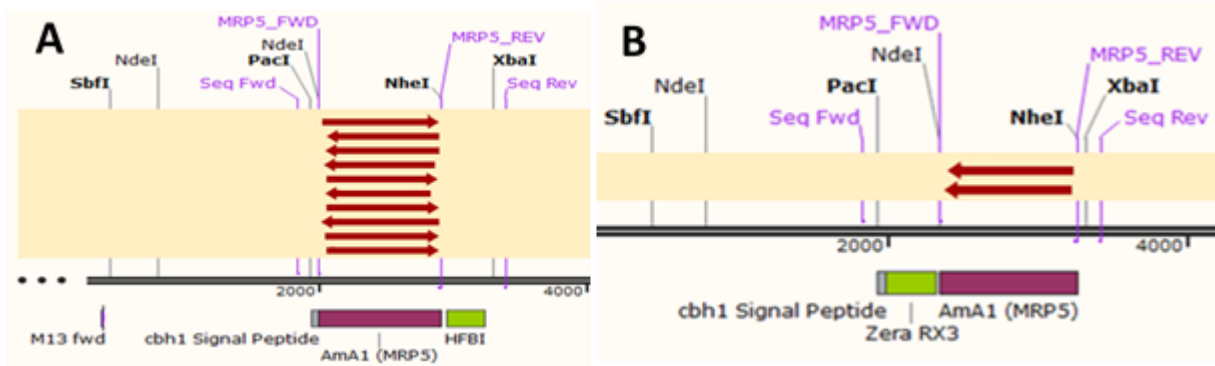


Figura 7 **Preparación de protoplastos.** En A, se observa la formación de protoplastos utilizando 20 mg/mL de mix enzimático de lisis a las 3 h de incubación. En B, se observa la formación de protoplastos utilizando 20 mg/mL de mix enzimático de lisis a las 4 h de incubación. En C, se observa la solución de protoplastos obtenida después del proceso de filtración (dilución 1:100). Imágenes obtenidas con microscopio óptico a 400X.

#### **4.4. Transformación y evaluación de las transformantes *T. reesei* RUT C30 Zera-MRP5 Y *T. reesei* RUT C30 HFBI-MRP5**

Los protoplastos fueron utilizados para la transformación de *T. reesei* RUT C30 con los casetes de expresión y se seleccionaron las transformantes mediante resistencia a higromicina. Se obtuvieron 12 colonias transformantes para el casete de expresión HFB1-MRP5 y 8 para el casete de expresión Zera-MRP5, a las cuales se les extrajo ADN genómico y se enviaron a secuenciar. Se utilizaron los partidores MRP5\_FWD y MRP5\_REV (Tabla 3) específicos para la amplificación de la proteína MRP5. Las secuencias resultantes de 10 (HC1-HC19) de las colonias obtenidas para la transformación con el casete HFBI-MRP5, fueron alineadas con la secuencia del vector pTrEno-HFBI-MRP5, presentando una alta identidad- entre 99,66-100%- y amplia cobertura, con respecto a la secuencia del gen de la proteína MRP5 (Figura 8A). En cuanto a las colonias obtenidas de la transformación con el casete Zera-MRP5, ZC1-ZC10, sólo se pudo obtener

secuencias de dos colonias, ZC1 y ZC2. Al alinear ambas secuencias con la secuencia del vector pTrEno-Zera-MRP5, se obtuvo una alta identidad y cobertura con la secuencia del gen de la proteína MRP5, alcanzando un porcentaje de identidad de 99,76% y 100%, respectivamente (Figura 8B).



**Figura 8 Análisis de las colonias transformantes de *T. reesei* para los casetes de expresión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5 mediante secuenciación de amplicones.** En A, alineamiento entre las secuencias obtenidas de la secuenciación del ADN genómico de las colonias transformantes para el casete Zera-MRP5, utilizando los partidores MRP5\_FWD y MRP5\_REV, y la secuencia del vector pTrEno-Zera-MRP5. En B, alineamiento entre las secuencias obtenidas de la secuenciación del ADN genómico de las colonias transformantes para el casete HFBI-MRP5, utilizando los partidores MRP5\_FWD y MRP5\_REV, y la secuencia del vector pTrEno-HFBI-MRP5.

Para evaluar la expresión de las proteínas de fusión en las colonias transformantes, HC y ZC, se seleccionaron tres de cada transformación se dejaron crecer en medio MMT<sub>2</sub> 2% glucosa durante 3 días a 30°C y se les extrajo las proteínas intracelulares, las que fueron cuantificadas (Figura 9 A). En el caso de las transformantes HC2, HC9 y HC4 se extrajeron 0,35, 0,38 y 0,15 mg de proteína, respectivamente. Mientras que para las transformantes ZC1, ZC2 y ZC8 se extrajeron 0,07, 0,015 y 0,26 mg de proteínas. Finalmente, desde cepa parental se extrajeron 4 µg de proteína.

Una vez extraídas las proteínas intracelulares, se analizó la expresión de las proteínas de fusión Zera-MRP5 y HFBI-MRP5 mediante Western Blot utilizando un anticuerpo anti-6XHis. Los resultados se muestran en la Figura 9B, donde se observa que HC2, HC4 Y HC9, colonias transformantes para el casete HFBI-MRP5, presentaron bandas al ser revelado el ensayo. Específicamente para HC4 y HC9, se puede observar una banda de 85 kDa aproximadamente, mientras que para HC2 se distinguen 2 bandas, una posee un tamaño cercano a los 85 kDa y la otra está por sobre los 120 kDa. Por otra parte, las transformantes para el casete Zera-MRP5, ZC1 y ZC8, presentaron una banda de tamaño aproximado de 85 kDa. ZC2, no presentó bandas. En cuanto a los controles, se utilizó como control positivo (+) una proteína Cas9 recombinante producida en nuestro laboratorio, la cual cuenta en su estructura con una etiqueta 6xHis, mientras que como control negativo se utilizó una tripsina comercial, la cual no cuenta con el tag de afinidad.

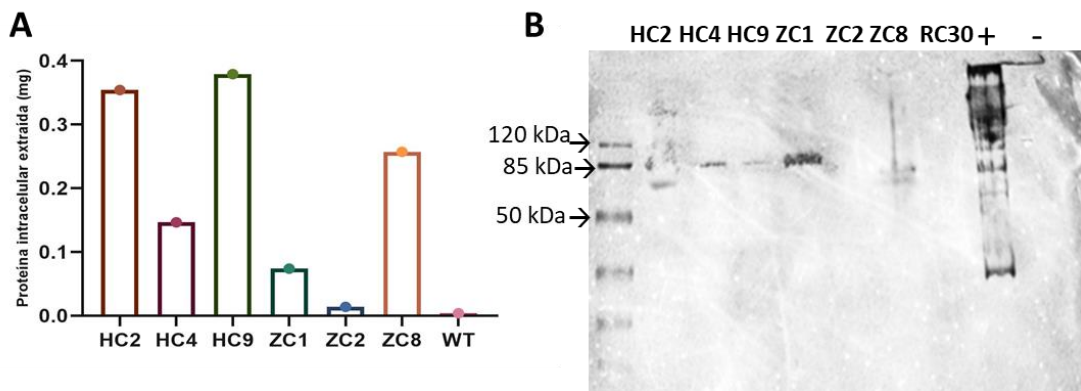


Figura 9 **Análisis de las colonias transformantes de *T. reesei* mediante Western Blot.** En A, Cuantificación en mg de proteína intracelular extraída de 50 ml de cultivo para transformantes para Zera-MRP5, para HFBI-MRP5. Además, proteínas extraídas de 0,4g de biomasa de la cepa parental RUT C30 En B, Resultado de Western Blot con anticuerpo anti-6XHis, de las proteínas intracelulares de las transformantes para Zera-MRP5 (HC2, HC4, HC9) y HFBI-MRP5 (ZC1, ZC2, ZC8). (+) Control positivo, proteína Cas9 recombinante que posee His-tag, (-) Control negativo, Tripsina. Marcador de peso molecular de proteínas preteñido Pierce™

#### 4.5. Análisis fenotípico

Se realizó un análisis fenotípico de las transformantes obtenidas en ambas transformaciones, observando que en cultivo líquido generaron agregados en suspensión al igual que la cepa parental. Sin embargo, estos son de menor tamaño y se logra advertir filamentos de menor longitud (Figura 10A). En cuanto al crecimiento en placa, a simple vista y al microscopio óptico se logra observar un menor largo de los filamentos (Figura 10B). Además, se observó que las transformantes, pasados los días no presentan esporulación (Figura 10C). Esto último persistió aún en ausencia del antibiótico.

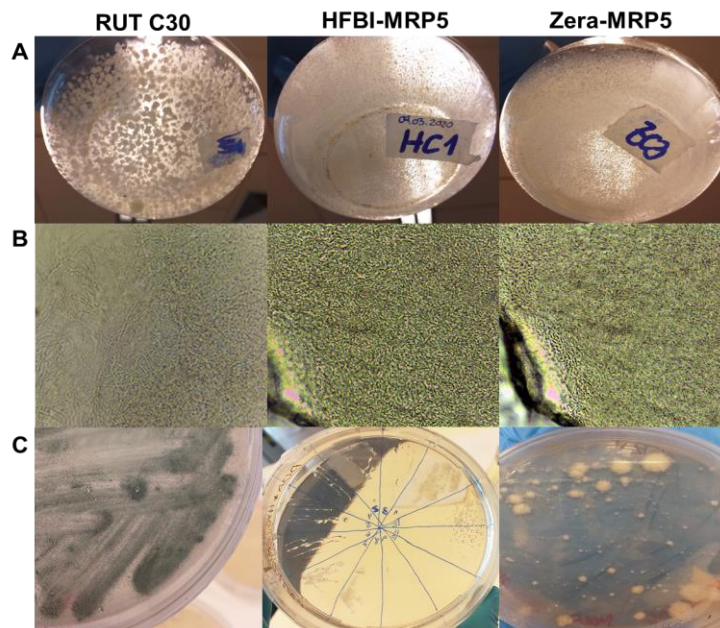


Figura 10 **Análisis cualitativo fenotípico de las transformantes HFBI-MRP5 y Zera-MRP5.** En A, crecimiento en medio líquido de las transformantes HFBI-MRP5 y Zera-MRP5 y la cepa parental RUT C30. En B, imagen de microscopio óptico de las transformantes HFBI-MRP5 y Zera-MRP5 y la cepa parental RUT C30, a partir de la placa, a un aumento 400X. En C, placas sembradas con las transformantes HFBI-MRP5 y Zera-MRP5 y la cepa parental RUT C30 por aproximadamente un mes, donde se observa esporulación de la cepa parental, mientras que en las transformantes no se observa esporulación.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se buscó obtener cepas transformantes de *Trichoderma reesei* Rut C30 que expresen dos proteínas de fusión Zera-MRP5 y HFBI-MPR5, con el fin de conseguir un enriquecimiento en metionina de la biomasa.

Para la construcción de los casetes de expresión de las proteínas Zera-MRP5 y HFBI-MRP5, se realizó un diseño experimental el cual contempla herramientas tradicionales de biología molecular, con el fin de poder insertar de forma sencilla cada una de las proteínas ricas en metionina contemplados en el proyecto FONDECYT 1180794, en los casetes de expresión. Esto se cumplió a cabalidad en este trabajo, logrando obtener las construcciones de fusión en un primer paso de transformación, siendo las colonias positivas de cada paso validadas por resistencia a antibiótico (kanamicina), PCR de colonias, secuenciación y digestión por enzimas de restricción. Cabe mencionar, que las construcciones de fusión entre Zera e HFB1 con proteínas ricas en metionina son novedosas, en el sentido de que en *Trichoderma sp.* se han reportado la expresión de Zera e HFB1 en fusión a enzimas con actividad enzimática de interés biotecnológico, como por ejemplo celulasas, endoglucanasas y galactoridasas con el fin de para ser expresadas y posteriormente purificadas, o por otra parte, en fusión con genes que codifican para proteínas marcadoras de fluorescencia lo es GFP para inmunolocalizar los cuerpos de proteínas (Torrent y col., 2009; Smith y col., 2014; Selber y col., 2004; Mustalahti y col., 2013; Kiiskinen, *et al.*, 2004; Joseph, y cols., 2012. Sin embargo, en este trabajo se utilizan con el fin de cambiar una característica molecular/bioquímica del hongo como lo es enriquecer su biomasa en metionina.

En un segundo paso de transformación se logró obtener los casetes de expresión para ambas proteínas de fusión, con una alta identidad nucleotídica con el vector original. Estos

casetes de expresión corresponden a las construcciones de fusión insertadas en el vector de expresión de *Trichoderma*, pTrEno, el cual debe ser linealizado para que se inserte en el genoma. La inserción ocurre de manera aleatoria, lo cual favorece la inserción cromosomal multicopia de los casetes y la inserción de estos en zonas de alta transcripción o *hot spots*, como por ejemplo las regiones eucromáticas, permitiendo una mayor expresión de la proteína. Sin embargo, una desventaja es que se requiere de un *screening* mayor para encontrar transformantes de interés (Seiboth, y cols., 2011). Además, el vector pTrEno incluye el promotor *eno* (enolasa) el cual está constitutivamente activo en medios que contienen glucosa, y que sumado a que la cepa RUT C30 es una cepa catabólicamente des-reprimida a metabolitos como la glucosa, la lactosa y el glicerol, permite la obtención de transformantes que sean capaces de explotar una mayor cantidad de sustratos, al estar el sistema endógeno de celulasas activo al mismo tiempo que se expresa la proteína de interés utilizando tanto glúcidos como material lignocelulósico del medio (Linger y col., 2015).

Otro punto en el estudio fue la liberación de protoplastos a partir del micelio hongo, la que depende de tres factores principales: la enzima lítica utilizada, el estabilizador osmótico, el estado fisiológico de los organismos, y las complejas interacciones entre ellos. El tipo de cultivo y la edad fisiológica del cultivo afectan el rendimiento de la producción de protoplastos, prefiriéndose medios en crecimiento exponencial o en crecimiento activo, ya que se sugiere que cambios producidos en la membrana ocurridos pasado este tiempo interfieren a la susceptibilidad a lisis (Chang, y cols., 1985). Previamente se ha descrito que la germinación de RUT C30 en medio mínimo suplementado con 1% glucosa se produce a las 2-3 horas de cultivo a 30°C, alcanzando una meseta a las 24-25 horas (Zamost & McClary, 1983.9), en este trabajo se utilizó se utilizó glucosa al 2% lo que puede acelerar la tasa de crecimiento del hongo, lo que se evidenció al observarse un avanzado estado de



germinación al microscopio óptico, lo que sugiere que menores tiempos de cultivo podrían mejorar el rendimiento en la producción de protoplastos. Respecto al tipo de enzima lítica, en este trabajo se utilizó “Lysing Enzymes from *T. Harzianum*” uno de los cocteles enzimáticos más ampliamente utilizados en la producción de protoplastos de hongos. Los cocteles enzimáticos disponibles comercialmente difieren en su formulación y en su actividad lítica. Por ejemplo, Novozyme 435 es otro producto de amplio uso para la producción de protoplastos, que, a diferencia del utilizado en este trabajo, posee más actividades enzimáticas entre las que figuran, quitinasas, glucanasas, manasas y proteasas, y ha reportado buen rendimiento de lisis en *Trichoderma reesei*, pudiendo ser una buena alternativa si es que se desea probar distintos métodos de lisis.

Conectando con lo anterior, muchos protocolos de transformación de protoplastos han optado por usar micelio joven, debido a que liberar protoplastos desde las hifas menos maduras mediante tratamiento enzimático, podría resultar más fácil que de hifas más maduras, debido principalmente a la composición de la pared (Ishikawa y col., 2009; Buxton & Radford, 1983). Sin embargo, en este trabajo se buscaron condiciones de cultivo donde predominaran las formas dispersas, es decir, donde las hifas se encuentran en suspensión y, por ende, más disponibles para la digestión de la pared. En cultivos líquidos, la morfología de los microorganismos filamentosos varía entre formas agregadas y dispersas (Reichl y col., 1992). Esto depende de varios factores, uno de ellos es la disponibilidad de oxígeno. En condiciones de limitación de oxígeno como las que se da a altas tasas de crecimiento, los gránulos tienden a reducir su tamaño e inducir el crecimiento “pulposo”, mientras que la suficiencia de oxígeno induce la formación de gránulos de mayor tamaño (Vecht-Lifshitz y col, 1990), lo que pudo ser una mejor estrategia manejar este factor que probar distintos medios. Por otra parte, se reportado que la concentración del inóculo juega un rol importante en la morfología de los hongos, específicamente en *T. reesei* RUT C30, a mayores tamaños

de inóculo se producen agregados de menor tamaño, mientras que a menores concentraciones prevalecen los agregados de mayor tamaño (menores a  $10^5$  esporas/mL) (Domingues y col, 2000).

En cuanto a la transformación del hongo se probaron distintos protocolos de transformación, pero sólo la transformación de protoplastos obtuvo resultados positivos. La transformación de protoplastos mediada por polietileglicol ha sido ampliamente utilizada, a pesar de presentar varios inconvenientes como eficiencias de transformación inconsistentes al presentar resultados dependientes del batch de enzimas utilizados en cada proceso (Chang, y cols., 1985). Además, la transformación depende de la aislación de protoplastos y del organismo utilizado, por ejemplo, resulta más difícil trabajar con hongos filamentosos de crecimiento lento (Chang, y cols., 1985; Minz & Sharon, 2010). Es por esto que han surgido métodos alternativos como la electroporación y la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* que permiten transformar esporas e hifas con resultados más consistentes (Minz & Sharon, 2010).

Como resultado de la transformación se obtuvieron 12 colonias transformantes para el casete Zera-MRP5 y 8 colonias transformantes para el casete HFBI-MRP5. Estos resultados no son los esperados, considerando que la frecuencia de transformación reportada para el método desde cual se adaptó el protocolo utilizado es de 200-800 transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN (Herrera-Estrella y col., 1990). Esto puede deberse a la utilización de un producto PCR para la transformación, ya que pueden haber compuestos que a pesar de la dilución de la muestra causen algún tipo de interferencia. Para evaluarlo se pueden probar distintas diluciones de la reacción de PCR o bien realizar la linealización del vector con enzimas de restricción a pesar de su bajo rendimiento. Por otra parte, la cantidad de ADN y su forma tienen relación con la eficiencia de transformación, los ADN

lineales y las mayores concentraciones de ADN, han mostrado mayores eficiencias de transformación, por lo que pueden ser testeados gradientes de concentración de ADN

(Armstrong, y cols, 1990). Finalmente, otro factor a considerar es la concentración del estabilizador osmótico. Se ha reportado que una disminución en la concentración del estabilizador osmótico en el agar superior (agar blando o cobertera) incrementa el número de transformantes. En este caso, una disminución de la concentración del sorbitol, de 0,5 M a 0,2 M podría ser probada (Ruíz-Díez, 2002).

Se logró detectar la expresión de las proteínas de fusión en varias de las transformantes. Sin embargo, las bandas correspondientes a las proteínas de fusión presentan un tamaño mayor al esperado 50,9 kDa en el caso de la proteína Zera- MRP5 y 49,4 kDa en el caso de HFBI-MRP5. Esto puede deberse a posibles modificaciones post traducciones que pueden tener las proteínas en su proceso de síntesis, tales como: fosforilaciones, metilaciones, glicosilaciones, entre otras. Las glicosilaciones son modificaciones post-traducciones donde grupos de carbohidratos se unen covalentemente a la proteína, esta unión resulta en un cambio significativo en la masa aparente de la proteína debido a su influencia en el radio de Stokes (El-Rassi, Z, 2002). La masa de la proteína se puede ver aumentada en un 50%, lo que por consiguiente altera su patrón de migración en un SDS-PAGE (El-Rassi Z, 2002). En el caso de las proteínas Zera y HFBI, no presentan sitios de glicosilación (Selber y col., 2004; Torrent y col., 1994), mientras que MRP5 posee 3 sitios putativos de N-glicosilaciones. Anteriormente, se ha reportado un aumento de la masa aparente de MRP5, de 50 KDa, en ensayos de inmuno-detección a pesar de tratamientos deglicosilantes con EndoH (Chakraborty y col., 2000). Por otra parte, los *linkers* utilizados para unión de las proteínas en una fusión resultan claves en la determinación de presencia o ausencia de modificaciones post traduccionales, ya que son zonas propensas a glicosilaciones. Se han reportado sitios de O-glicosilación en varios *linkers* universales,

como G4S o GSG, los que son muy similares en estructura a los utilizados en este trabajo (Spahr y col., 2014).

Finalmente, se debe mencionar el fenotipo cualitativo de las transformantes obtenidas, las cuales presentaron un menor desarrollo de filamentos y sin esporulación. La obtención de distintas morfologías en las colonias transformantes se ha reportado en *Trichoderma sp*, donde se puede observar diferencias en el tamaño de las colonias, en la esporulación, velocidad crecimiento de las colonias, las que pueden estar relacionadas con inserciones de los casetes en secuencias de genes relacionadas con dichos procesos (Nakari-Setälä y col., 2009). Es más, se ha reportado que colonias que presentan la misma morfología tienen diferencia en la expresión de la proteína recombinante de interés, o incluso, algunas pueden no presentar la expresión de la proteína (. Esto se puede considerar sobre todo en este caso, ya que, como se mencionó al utilizar un vector de expresión que se inserta de forma aleatoria en el genoma, una o más copias del vector de expresión se pueden insertar en el genoma (Linger y col., 2015). La no esporulación de las transformantes se considera una desventaja debido a que no se puede efectuar el proceso de homocarionización, el cual permite que todos los núcleos presentes en la célula sean núcleos transformantes (Vásquez, 2019). Esto permitiría evaluar mejor la expresión de la proteína de interés y una mejor comparación entre las mutantes. Por otro lado, al advertirse un menor desarrollo de hifas aéreas que los de la cepa parental hace necesario hacer una comparación de las curvas de crecimiento por si eventualmente éste se vio afectado.

La obtención de transformantes esporuladoras es un factor importante al momento de analizar la viabilidad de las cepas para los objetivos requeridos. Por ejemplo, las preparaciones comerciales de *Trichoderma spp*, principalmente bio-controladores, consisten en conidios producidos a granel (Steyaert, y cols., 2010). Por lo que, la obtención de transformantes no esporuladoras iría en desmedro del objetivo planteado. Si bien, en

este trabajo no considera este tipo de formulaciones, sino, la comercialización del micelio del hongo resulta esencial la esporulación en temas de propagación y mantención de cepas, ya que la biomasa debe ser cultivada para ser comercializada (Metz, y cols., 2011). Hay factores que influyen la esporulación en *Trichoderma* como la luz, ritmo circadiano, nutrición de carbono y nitrógeno, pH, calcio extracelular, lesiones mecánicas en el micelio y la presencia de compuestos orgánicos volátiles derivados de hongos, los cuales poseen efectos interactivos en la inducción de la conidiación. En condiciones de laboratorio la esporulación se puede inducir mediante la exposición a estrés, entre los métodos más utilizados figuran la foto-inducción, el daño mecánico y limitación de nutrientes. La foto-inducción se realiza con un estímulo de luz constante o mediante pulsos de luz/oscuridad, las longitudes de onda con mejor respuesta se encuentran dentro de los espectros UV cercano (320–380 nm) y luz azul (380–500 nm) (Betina & Zajacová, 1978). Por otra parte, encontramos el daño mecánico al micelio provocado por bisturí, que ha demostrado producir esporas incluso en condiciones de oscuridad (Casas-Flores, y cols., 2004). Finalmente, se puede crecer el hongo en medios con un medio o un cuarto de formulación, por ejemplo, el medio 0.5 PDA (*half strength* PDA) (Samuels, y cols., 2006; Steyaert, y cols., 2016). Estas estrategias se pueden utilizar tanto por si solas como en conjunto para inducir esporulación de las transformantes obtenidas en esta tesis.

Otro aspecto importante que evaluar de las transformantes es su tasa de crecimiento. Si bien, es un aspecto evaluado de manera cualitativa, sería importante como trabajo futuro, comparar de manera cuantitativa el crecimiento de las transformantes con el de la cepa parental. Se observó que las transformantes obtenidas crecen menos que la cepa parental en las mismas condiciones de cultivo, por lo que se podría evaluar una posible toxicidad de la proteína para célula, ya que se han descrito que expresar proteínas recombinantes en el RE podría producir toxicidad, produciendo entre otras cosas un menor crecimiento (Conley,

y cols., 2011). Por otra parte, se ha demostrado que *Trichoderma reesei* RUT C-30 es capaz de crecer en medio mínimo suplementado con biomasa algas de *Ulva rigida* 2.5% como única fuente de carbono, obteniendo una mayor biomasa e igual contenido de proteína, en comparación al crecimiento de medio de cultivo suplementado con 2% de glucosa. Además, la biomasa obtenida del cultivo en *Ulva* 2.5% cuadruplicó su contenido de metionina en comparación con la biomasa algal sin fermentar (Brain, y cols., 2021). Por lo que, se espera una vez estandarizadas las condiciones de cultivo, las cepas transformantes sean capaces de crecer y producir metionina, para suplir una mayor demanda, en las mismas condiciones de cultivo. Esto permitiría proyectar dichas cepas como posible suplemento para la alimentación de salmón y en el mejor de los casos ser un alimento de salmones en sí, cumpliendo con los objetivos a los que apunto el proyecto FONDECYT 1180794.

## CONCLUSIONES

Se lograron generar cepas que expresan las proteínas Zera-MRP5 y HFBI-MPR5 por medio de transformación de protoplastos, siendo el objetivo principal de este trabajo. Por otra parte, se lograron obtener los casetes de expresión que contienen las construcciones de fusión para Zera-MRP5 y HFBI-MRP5, mediante un diseño experimental que resultó simple y eficiente no sólo para las proteínas de fusión consideradas en este trabajo.

Se obtuvieron colonias transformantes para las proteínas de fusión Zera-MPR5 y HFBI-MRP5. Sin embargo, poseen un fenotipo distinto a la cepa parental, siendo la ausencia esporulación un factor determinante a la hora de establecer la viabilidad de estas colonias para los fines requeridos en este trabajo.

Queda como trabajo futuro la cuantificación del contenido de metionina de las transformantes, para así poder determinar y validar el enriquecimiento en metionina de la biomasa fúngica.

## REFERENCIAS

- Amir, R., Han, T., & Ma, F. (2012). Bioengineering approaches to improve the nutritional values of seeds by increasing their methionine content. *Molecular breeding*, 29, 915-924.
- Anthony, J., Brown, W., Buhr, D., Ronhovde, G., Genovesi, D., Lane, T., & Anderson, P. (1997). Transgenic maize with elevated 10 kD zein and methionine. Sulphur metabolism in higher plants: molecular, ecophysiological and nutritional aspects.
- Armstrong, C. L., Petersen, W. L., Buchholz, W. G., Bowen, B. A., & Sulc, S. L. (1990). Factors affecting PEG-mediated stable transformation of maize protoplasts. *Plant Cell Reports*, 9, 335-339.
- Betina, V., & Zajacová, J. (1978). Inhibition of photo-induced *Trichoderma viride* conidiation by inhibitors of RNA synthesis. *Folia microbiologica*, 23, 460-464.
- Brain-Isasi, S., Carú, C., & Lienqueo, M. E. (2021). Valorization of the green seaweed *Ulva rigida* for production of fungal biomass protein using a hypercellulolytic terrestrial fungus. *Algal Research*, 59, 102457.
- BROCK, T.D. (1989). A textbook of industrial microbiology. Sinauer, Sunderland, Mass, 362-385p
- Buxton, F. P., & Radford, A. (1983). Cloning of the structural gene for orotidine 5'-phosphate carboxylase of *Neurospora crassa* by expression in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*, 190, 403-405.
- Casas-Flores S., Rios-Momberg M., Bibbins M., Ponce-Noyola P. & Herrera-Estrella A. (2004) BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology*, 150, 3561–3569
- Cassago, A., Panepucci, R. A., Baião, A. M. T., & Henrique-Silva, F. (2002). Cellophane based mini-prep method for DNA extraction from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *BMC Microbiology*, 2, 1-4.
- Chakraborty, S., Chakraborty, N., & Datta, A. (2000). Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 3724-3729.
- Chakraborty, S., Chakraborty, N., Agrawal, L., Ghosh, S., Narula, K., Shekhar, S., ... & Datta, A. (2010). Next-generation protein-rich potato expressing the seed protein gene AmA1 is a result of proteome rebalancing in transgenic tuber. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 17533-17538.
- Chang, S. T., Li, G. S. F., & Peberdy, J. F. (1985). Isolation of protoplasts from edible fungi. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology*, 1, 185-193.



Conley, A. J., Joensuu, J. J., Richman, A., & Menassa, R. (2011). Protein body-inducing fusions for high-level production and purification of recombinant proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 9, 419-433.

Consejo del samón (2021). Principales datos de la industria. <https://www.consejodelsalmon.cl/informacion-de-la-industria/principales-datos-de-la-industria/> [visitado 7 noviembre 2021]

Dinkins, R. D., Reddy, M. S., Meurer, C. A., Yan, B., Trick, H., Thibaud-Nissen, F., ... & Collins, G. B. (2001). Increased sulfur amino acids in soybean plants overexpressing the maize 15 kDa zein protein. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37, 742-747.

Domingues, F. C., Queiroz, J. A., Cabral, J. M. S., & Fonseca, L. P. (2000). The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 394-401.

El-Rassi, Z. (2002). Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis, *Journal of Chromatography*. Chapter 20 pp 691-694. Amsterdam, The Netherlands

Gallo, B. J., Andreotti, R., Roche, C., Ryu, D., & Mandels, M. (1978). Cellulase production by a new mutant strain of *Trichoderma reesei* MCG77. In *Biotechnol. Bioeng. Symp.*; (United States) (Vol. 8). Army Natick Research and Development Command, MA.

García-Ortega, A., Kissinger, K. R., & Trushenski, J. T. (2016). Evaluation of fish meal and fish oil replacement by soybean protein and algal meal from *Schizochytrium limacinum* in diets for giant grouper *Epinephelus lanceolatus*. *Aquaculture*, 452, 1-8.

Ghasem, D. N. (2015). Chapter 14-Single-Cell Protein. *Biochemical Engineering and Biotechnology*, 417-434.

Grammes, F., Reveco, F. E., Romarheim, O. H., Landsverk, T., Mydland, L. T., & Øverland, M. (2013). *Candida utilis* and *Chlorella vulgaris* counteract intestinal inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PloS one*, 8, e83213.

Hagan, N. D., Upadhyaya, N., Tabe, L. M., & Higgins, T. J. V. (2003). The redistribution of protein sulfur in transgenic rice expressing a gene for a foreign, sulfur-rich protein. *The Plant Journal*, 34, 1-11.

Hauptman, B. S., Barrows, F. T., Block, S. S., Gaylord, T. G., Paterson, J. A., Rawles, S. D., & Sealey, W. M. (2014). Evaluation of grain distillers dried yeast as a fish meal substitute in practical-type diets of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 432, 7-14.

Herrera-Estrella A., Goldman G. & Van Montagu M. (1990) High-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Molecular Microbiology*, 4, 893-843.

Hertrampf, J. W., & Piedad-Pascual, F. (2000). Soya protein products. In *Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds* (pp. 396-402). Springer, Dordrecht.

Holding, D. R., & Larkins, B. A. (2008). Genetic engineering of seed storage proteins. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 1, 107-133.

Index mundi (2021). Precios de materias primas. <https://www.indexmundi.com/es/precios-de-mercado/>. [visitado 06 noviembre 2021]

Ishikawa, F. H., Barcelos, Q. D. L., Souza, E. A. D., & Dias, E. S. (2010). Fatores que afetam a produção e regeneração de protoplastos de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Ciência e Agrotecnologia*, 34, 74-79.

Joseph, M., Ludevid, M.D., Torrent, M. et al (2012).. Proteomic characterisation of endoplasmic reticulum-derived protein bodies in tobacco leaves. *BMC Plant Biology* 12, 36

Khan, M. Y., Dahot, M. U., & Khan, M. Y. (1992). Single cell protein production by *Penicillium javanicum* from pretreated rice husk. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 5, 39-43.

Kiiskinen, L. L., Kruus, K., Bailey, M., Ylösmäki, E., Siika-Aho, M., & Saloheimo, M. (2004). Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology*, 150, 3065-3074.

Kissinger, K. R., García-Ortega, A., & Trushenski, J. T. (2016). Partial fish meal replacement by soy protein concentrate, squid and algal meals in low fish-oil diets containing *Schizochytrium limacinum* for longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. *Aquaculture*, 452, 37-44.

Kothe, G. O., & Free, S. J. (1996). Protocol for the electroporation of *Neurospora* spheroplasts. *Fungal Genetics Reports*, 43, 31-32.

Linger, J. G., Taylor, L. E., Baker, J. O., Vander Wall, T., Hobdey, S. E., Podkaminer, K., ... & Decker, S. R. (2015). A constitutive expression system for glycosyl hydrolase family 7 cellobiohydrolases in *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for biofuels*, 8, 1-12.

Martin, A. M., Goddard, S., & Bemibster, P. (1993). Production of *Candida utilis* biomass as aquaculture feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, 363-370.

Mayer, M., & Buchner, J. (2004). Refolding of inclusion body proteins. In *Molecular diagnosis of infectious diseases* (pp. 239-254). Humana Press.

Metz, B., Seidl-Seiboth, V., Haarmann, T., Kopchinskiy, A., Lorenz, P., Seiboth, B., & Kubicek, C. P. (2011). Expression of biomass-degrading enzymes is a major event during conidium development in *Trichoderma reesei*. *Eukaryotic cell*, 10, 1527-1535.

Minz, A., & Sharon, A. (2010). Electroporation and Agrobacterium-mediated spore transformation. In *Molecular and cell biology methods for fungi* (pp. 21-32). Humana Press.

Molvig, L., Tabe, L. M., Eggum, B. O., Moore, A. E., Craig, S., Spencer, D., & Higgins, T. J. (1997). Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 8393-8398.

- Montenecourt, B. S., & Eveleigh, D. E. (1979). Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*.
- Mustalahti, E., Saloheimo, M., & Joensuu, J. J. (2013). Intracellular protein production in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) with hydrophobin fusion technology. *New biotechnology*, 30, 262-268.
- Nakari-Setälä, T., Paloheimo, M., Kallio, J., Vehmaanperä, J., Penttilä, M., & Saloheimo, M. (2009). Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. *Applied and environmental microbiology*, 75, 4853-4860.
- National Research Council. (2011). Nutrient requirements of fish and shrimp. National academies press.
- Nigam, P. S. N. (2014). Single Cell Protein: Mycelial Fungi. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 415-424). Elsevier.
- OCDE-FAO (2018). OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2019-2028. Enfoque especial: América Latina <http://www.fao.org/3/ca4076es/CA4076ES.pdf>. Consultado marzo 2020
- Oh, T. K., Kim, S. H., & Park, K. H. (1986). Determination of cellobiohydrolase from culture filtrate of *Trichoderma viride* by the method of single immunodiffusion and enzyme linked immunosorbent assay. *Biotechnology letters*, 8, 403-406.
- Omer, H. A. A., Ali, F. A. F., & Gad, S. M. (2012). Replacement of clover hay by biologically treated corn stalks in growing sheep rations. *Journal of Agricultural Science (Toronto)*, 4, 257-268.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO (2009). Estado mundial de la agricultura y la alimentación, la ganadería a examen. <http://www.fao.org/3/i0680s/i0680s00.htm>. Consultado marzo 2020
- Paloheimo, M., Haarmann, T., Mäkinen, S., & Vehmaanperä, J. (2016). Production of industrial enzymes in *Trichoderma reesei*. In *Gene expression systems in fungi: advancements and applications* (pp. 23-57). Springer, Cham.
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E., & Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 61, 155-164.
- Peterson, R., & Nevalainen, H. (2012). *Trichoderma reesei* RUT-C30—thirty years of strain improvement. *Microbiology*, 158, 58-68.
- Ravindra, P. (2000). Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology advances*, 18, 459-479.
- Reichl, U., King, R., & Gilles, E. D. (1992). Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. *Biotechnology and bioengineering*, 39, 164-170.F

SalmónChile (2018). III informe de sustentabilidad industria del salmón en Chile. <https://extranet.intesal.cl/sustentabilidad/>. Consultado marzo 2020

Salmonexpert (2021). Variables que condicionan la calidad de la harina de pescado. <https://www.salmonexpert.cl/article/variables-que-condicionan-la-calidad-de-la-harina-de-pescado/> [visitado el 30 Octubre 2021]

Samuels, G. J., Suarez, C., Solis, K., Holmes, K. A., Thomas, S. E., Ismaiel, A., & Evans, H. C. (2006). *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *mycological research*, 110, 381-392.

Schmidt, S. R. (2013). Protein bodies in nature and biotechnology. *Molecular biotechnology*, 54, 257-268.

Sealey, W. M., O'Neill, T. J., Peach, J. T., Gaylord, T. G., Barrows, F. T., & Block, S. S. (2015). Refining inclusion levels of grain distiller's dried yeast in commercial-type and plant-based diets for juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46, 434-444.

Seiboth, B., Ivanova, C., & Seidl-Seiboth, V. (2011). *Trichoderma reesei*: a fungal enzyme producer for cellulosic biofuels. *Biofuel production-recent developments and prospects*, 309-340.

Seidl, V., Gamauf, C., Druzhinina, I. S., Seiboth, B., Hartl, L., & Kubicek, C. P. (2008). The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. *BMC genomics*, 9, 1-15.

Selber, K., Tjerneld, F., Collen, A., Hyytiä, T., Nakari-Setälä, T., Bailey, M., et al. (2004). Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems. *Process Biochem.* 39, 889–896.

Smith, R. H., Palmer, R., & Reade, A. E. (1975). A chemical and biological assessment of *Aspergillus oryzae* and other filamentous fungi as protein sources for simple stomached animals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26, 785-795.

Smith, W., Jäntti, J., Oja, M., & Saloheimo, M. (2014). Comparison of intracellular and secretion-based strategies for production of human  $\alpha$ -galactosidase A in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *BMC biotechnology*, 14, 1-12.

Spahr, C., Shi, S. D., & Lu, H. S. (2014). O-glycosylation of glycine-serine linkers in recombinant Fc-fusion proteins: Attachment of glycosaminoglycans and other intermediates with phosphorylation at the xylose sugar subunit. In *mabs* (Vol. 6, No. 4, pp. 904-914). Taylor & Francis.

Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza-Mendoza, A., & Stewart, A. (2010). Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*, 156, 2887-2900.

Steyaert, J., Hicks, E., Kandula, J., Kandula, D., Alizadeh, H., Braithwaite, M., & Stewart, A. (2016). Methods for the evaluation of the bioactivity and biocontrol potential of species of *Trichoderma*. In *Microbial-Based Biopesticides* (pp. 23-35). Humana Press, New York, NY.

The United Nations (2021). Población | Naciones Unidas. <https://www.un.org/es/global-issues/population> [Visitado: Octubre 30, 2021]

Torrent, M., Geli, M. I., Ruiz-Avila, L., Canals, J. M., Puigdomènech, P., & Ludevid, D. (1994). Role of structural domains for maize  $\gamma$ -zein retention in *Xenopus* oocytes. *Planta*, 192, 512-518.

Torrent, M., Llompарт, B., Lasserre-Ramassamy, S., Llop-Tous, I., Bastida, M., Marzabal, P. & Ludevid, M. D. (2009 a). Eukaryotic protein production in designed storage organelles. *BMC biology*, 7, 1-14.

Torrent, M., Llop-Tous, I., & Ludevid, M. D. (2009 b). Protein body induction: a new tool to produce and recover recombinant proteins in plants. In *Recombinant Proteins from Plants* (pp. 193-208). Humana Press.

Vásquez, E. (2019). Caracterización del sistema de incorporación de hierro Fet3/Ftr1 en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* y evaluación de su participación en el proceso de infección (Tesis de Magister). Universidad Andrés Bello, Santiago de Chile.

Vecht-Lifshitz, S. E., Magdassi, S., & Braun, S. (1990). Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 890-896.

Xu, B., Wild, J. R., & Kenerley, C. M. (1996). Enhanced expression of a bacterial gene for pesticide degradation in a common soil fungus. *Journal of fermentation and bioengineering*, 81, 473-481.

Zamost, B. L., & McClary, D. O. (1983). The effects of plant growth regulators on cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Biotechnology Letters*, 5, 179-184.

## Anexo

### 4.6. Resultados

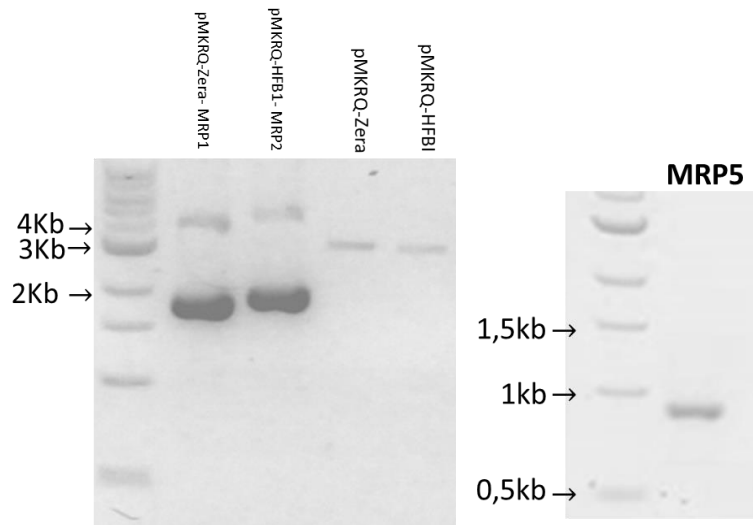


Figura 1 Linealización pMKRQ-Zera y pMKRQ-HFBI y purificación gen de la proteína MRP5 (AmA1). En A, se puede observar los plasmidios base enviados a sintetizar pMKRQ-Zera-MRP1 y pMKRQ-HFBI-MRP2 en los carriles 1 y 2, mientras que en los carriles 3 y 4, se observan los vectores pMKRQ-Zera y pMKRQ-HFBI. Purificados luego de la digestión de los vectores basales con las enzimas de restricción *NheI* y *NdeI*. En B, se observa la purificación del gen de la proteína AmA1, correspondiente a la MPR5 en la nomenclatura del proyecto.