

UCH-FC
Biotecnología
L 864
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

"Co-expresión de proteínas recombinantes de hongos con péptido 2A en *Pichia pastoris*"

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

FRANCO RODRIGO LÓPEZ CORONADO

Directora del Seminario de Título:

Dra. Oriana Salazar Aguirre

Profesor Patrocinante:

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Agosto 2016
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.

FRANCO LÓPEZ CORONADO

“Co-expresión de proteínas recombinantes de hongos con péptido 2A en *Pichia pastoris*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Oriana Salazar Aguirre
Directora Seminario de Título

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Profesor Patrocinante



Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman
Presidente Comisión

Dra. Claudia Stange Klein
Evaluadora

Santiago de Chile, agosto de 2016



Franco Rodrigo López Coronado.

Soy Licenciado en Ingeniería en Biotecnología Molecular (2015) de la Universidad de Chile. Nací en Viña del Mar, siendo el segundo de tres hermanos. La enseñanza media la realicé en el Instituto Superior de Comercio Francisco Araya Bennett de Valparaíso, donde egresé del programa dual de Administración y me titulé de Técnico Nivel Medio en Administración. Durante esta etapa, participé en un programa de idioma chino mandarín, participé en competencias de idioma y cultura china, y viajé a este país oriental becado en 2009. Además, participé en el programa BETA de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, incursionando en otras áreas del conocimiento.

De los miembros de mi familia, soy el único que siguió el área de la investigación científica. En la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile fui consejero de Escuela de Pregrado por un período, realicé ayudantías, participé como monitor en exposiciones científicas y fui asistente de laboratorio en un proyecto FONDEF-VIU. Participé, también, como monitor y gestor en el campamento científico Kimlu de la Fundación Ciencia Joven, y como tutor de escritura en el Programa de Lectura y Escritura Académica del Departamento de Pregrado de la Universidad de Chile.

Desde 2013 trabajo en Cpech, realizando docencia en el área de Química, y he sido distinguido con los premios de Excelencia Académica y del III Concurso de Innovación Pedagógica.

A mis padres.
A mis hermanos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a quienes me motivaron constantemente en este camino, mi familia. A mi mamá y mi papá, a quienes les costó convencerme de postular a la universidad. Eternamente en deuda con ustedes, por todo el sacrificio y esfuerzo. Gracias a Danny y Cristóbal, por ayudarme a distancia y más aún cuando viajo a *Valpo*. A mis tíos, abuelos, primos que me ayudaron en estos años de universidad, con palabras, llamados, incluso libros fotocopiados.

Quiero agradecer también a quienes hicieron posible la realización de este Seminario de Título. Profe Oriana, gracias por el ánimo, por las palabras y, sobre todo, por la confianza en mi trabajo. También gracias por la buena onda, súper importante para estar motivado en el trabajo de laboratorio. Gracias al profe Víctor, por acceder a ser el patrocinante de este Seminario y por la buena disposición ante mis requerimientos.

Agradecer a quienes me enseñaron sobre la investigación científica y me acompañaron en la U, Caro y Salomé. También gracias a mis amigos Meli, Nati y Sergio, con quienes compartí a la distancia este proceso universitario.

Infinitas gracias a Cristina, por la enseñanza, paciencia y simpatía durante los largos días en el lab. Gracias a la profe Claudia, por apoyarme en distintos proyectos.

Gracias a mis compañeros de U por los buenos momentos.

Gracias a la tía Marce, de BETA-PUCV, por el entusiasmo, el apoyo y el empuje.

Y a los chicos que fueron y son parte del CeBiB. Gracias al grupo al que me integré, Cynthia, Juan, Javi, Medardo. Y a Jose y Sev, que también me ayudaron mucho.

Cada uno aportó en llegar al final de esta carrera, ahora veamos qué depara el futuro.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Introducción	1
Energía y combustibles	1
Biocombustibles	3
Enzimas y proteínas utilizadas en el proceso de sacarificación	9
Efecto sinérgico de las enzimas lignocelulolíticas y proteínas auxiliares	14
Propuesta, hipótesis y objetivos	19
Materiales y métodos	21
Material biológico y condiciones de cultivo	21
Técnicas de biología molecular	23
Transformación y selección de microorganismos	24
Construcción de pPIC9K-XS para la expresión de xilanasa y swollenina en <i>Pichia pastoris</i>	26
Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i>	28
Determinación de actividades xilanasa y celulasa	29
Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida	31
Detección de proteínas unidas al epítipo FLAG por western-blot	32
Resultados	34
Construcción del fragmento conteniendo secuencias codificantes de xilanasa y swollenina unidas por la secuencia que codifica el péptido FMDV2A	34
Ligado de la construcción en los vectores pGEM-T Easy y pPIC9K	36
Selección de clones de <i>P. pastoris</i> recombinantes	43
Análisis de la producción de las proteínas recombinantes GtXyl1 y TrSwo1 en <i>P. pastoris</i>	45
Discusión y proyecciones	53
Conclusiones	63
Bibliografía	64
Anexo	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.	21
Tabla 2. Descripción de partidores utilizados en distintas PCR.	22
Tabla S1. Partidores utilizados en la secuenciación de pGEMT-XS.	70
Tabla S2. Partidores utilizados en la secuenciación de pPIC9K-XS.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Representación esquemática de la conversión de lignocelulosa a etanol.	8
Figura 2. Procedimiento para la obtención del fragmento XS ligado al vector pPIC9K.	27
Figura 3. Gel de agarosa del producto de PCR en la generación de la secuencia 2A.	35
Figura 4. Gel de agarosa con producto de PCR de solapamiento.	36
Figura 5. Gel de agarosa con producto de PCR de fragmento XS en vector de clonación a partir de DNA plasmidial, con gradiente de temperatura.	37
Figura 6. Análisis de restricción sobre el DNA plasmidial pGEMT-XS.	38
Figura 7. Gel de agarosa con producto de PCR de colonias, para confirmar la presencia del producto de fusión en el vector de expresión.	40
Figura 8. Gel de agarosa con producto de PCR de colonias del fragmento XS en el vector de expresión.	41
Figura 9. Análisis de restricción sobre el DNA plasmidial pPIC9K-XS.	42
Figura 10. Extracto de la secuenciación de pPIC9K-XS.	43
Figura 11. Gel de agarosa con producto de PCR de colonias, con arranque en caliente, desde <i>P. pastoris</i> transformantes.	44
Figura 12. Actividad xilanasa en sobrenadantes de cultivo de los clones recombinantes de <i>P. pastoris</i> .	47
Figura 13. Análisis electroforético de las proteínas de la fracción extracelular del cultivo de clones de <i>P. pastoris</i> .	47
Figura 14. Análisis electroforético temporal de las proteínas de la fracción extracelular del cultivo de un clon de <i>Pichia pastoris</i> recombinante.	48
Figura 15. Actividad xilanasa revelada mediante zimograma, a partir de la fracción extracelular de la inducción de clones recombinantes de <i>P. pastoris</i> .	50
Figura 16. Inmunodetección de proteínas que poseen el epítipo FLAG.	51
Figura S1. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas utilizadas.	69
Figura S2. Secuenciación de pGEMT-XS.	71
Figura S3. Secuenciación de pPIC9K-XS.	72
Figura S4. Curva de calibración de concentración de glucosa en ensayo de azúcares reductores con DNS.	73
Figura S5. Análisis electroforético de proteínas recombinantes GtXyl1 y TrSwo1 purificadas, obtenidas en <i>P. pastoris</i> .	73
Figura S6. Esquema de la co-expresión recombinante en <i>P. pastoris</i> con el péptido FMDV2A.	74

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la varianza
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BMGY	Medio complejo con glicerol, amortiguado
BMMY	Medio complejo con metanol, amortiguado
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria-Bertani
NBT	Nitroazul de tetrazolio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RDB	Medio de regeneración dextrosa
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes
TBS	Amortiguador Tris-salino
TE	Amortiguador Tris-EDTA
Tm	Temperatura de desnaturalación térmica
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YPD	Medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa

RESUMEN

Los biocombustibles surgen como una alternativa amigable con el ambiente frente al uso de combustibles fósiles y la consecuente contaminación ambiental. Los residuos de la agricultura se han estudiado como fuente de azúcares fermentables para la producción de bioetanol o biobutanol. Una etapa crítica del proceso es la conversión de la lignocelulosa en azúcares monoméricos. Diversas especies bacterianas y fúngicas son capaces de degradar la lignina, la hemicelulosa y la celulosa, produciendo enzimas y proteínas para esto. La expresión recombinante de los genes que codifican tales productos ha sido exitosa en microorganismos como *Pichia pastoris*. Gran interés ha generado el análisis de la sinergia entre distintas proteínas involucradas en la hidrólisis de lignocelulosa, utilizando métodos como la co-expresión policistrónica con péptidos virales 2A. Es así como el objetivo de este estudio fue evaluar el uso de este sistema de co-expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, a partir de la fusión de las secuencias codificantes de xilanasas de *Gloeophyllum trabeum* (*gtxy11*) y swollenina de *Trichoderma reesei* (*trsw1*) con una secuencia intermedia que codifica el péptido 2A del virus de la fiebre aftosa del ganado (FMDV2A). Estas secuencias se unieron mediante PCR por solapamiento, generando un marco de lectura abierto único. El vector de expresión para *P. pastoris* pPIC9K se utilizó para la integración genómica de esta construcción, pues contenía codificado el péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* para la expresión secretada de las proteínas recombinantes. Luego de la transformación de *P. pastoris* y la selección de clones recombinantes por prototrofia, resistencia a geneticina y PCR, se procedió a la inducción de las proteínas recombinantes utilizando metanol como inductor. Desde la fracción extracelular del medio de inducción, se observó la presencia de enzimas con

actividad xilanasa mediante ensayos de actividad en placas de 96 pocillos y zimograma, actividad que se detectó en las bandas de peso de 45 kDa y mayor a 120 kDa. Mediante western-blot se determinó la presencia de swollenina unida al epítipo FLAG en el extremo carboxilo terminal, con un peso molecular de más de 120 kDa. Por lo tanto, la proteína de 45 kDa correspondería a la xilanasa y la >120 kDa a la proteína de fusión xilanasa-swollenina. La co-expresión policistronica con el péptido FMDV2A permitió obtener una de las proteínas de interés de manera independiente, mientras que en menor medida se produjo la proteína de fusión en los clones analizados.

ABSTRACT

Biofuels are emerging as an environmental-friendly alternative compared to the use of fossil fuels and the resulting environmental pollution. Wastes from agriculture have been studied as a source of fermentable sugars for the production of bioethanol or biobutanol. A critical step in this process is the conversion of lignocellulose into monomeric sugars. Various bacterial and fungal species are able to degrade lignin, hemicellulose and cellulose by producing enzymes and proteins for this purpose. Recombinant expression of the genes encoding such products has been successful in microorganisms such as *Pichia pastoris*. The analysis of the synergy between different proteins involved in the hydrolysis of lignocellulose has generated great interest, using methods like polycistronic co-expression with 2A viral peptides. Thus the aim of this study was to evaluate the use of this system of recombinant proteins co-expression in *P. pastoris*, based on the fusion of the coding sequences of the xylanase from *Gloeophyllum trabeum* (*gtxyl1*) and swollenin from *Trichoderma reesei* (*trsw01*) including the foot-and-mouth disease virus 2A peptide (FMDV2A) encoding sequence in between. These sequences were joined together, by overlap PCR, in a single open reading frame. The pPIC9K expression vector for *P. pastoris* was used for genomic integration of this construct. The vector encoded the signal peptide from *Saccharomyces cerevisiae* α factor for the secreted expression of recombinant proteins. After transforming *P. pastoris* and selecting recombinant clones by prototrophy, geneticin resistance and PCR, an induction protocol was carried out for the expression of recombinant proteins using methanol as an inducer. From the extracellular fraction of induction medium, the presence of enzymes with xylanase activity was observed using activity assays in 96 well plates and in zymogram. This activity was detected in the

bands of a weight of 45 kDa and greater than 120 kDa. The presence of tagged swollenin with FLAG epitope at the carboxyl terminus was determined by western-blot. A band with a molecular weight greater than 120 kDa was observed. Then the 45 kDa protein would correspond to xylanase and the >120 kDa protein would correspond to the xylanase-swollenin fusion protein. The polycistronic co-expression with FMDV2A peptide allowed the independent production of one of the target proteins, while to a lesser extent the hybrid protein was produced into the analyzed clones.

INTRODUCCIÓN

1. Energía y combustibles

La energía ha sido la base del desarrollo de comunidades y civilizaciones en los distintos periodos y espacios que el hombre ha habitado. La historia de la humanidad puede dividirse en tres grandes épocas energéticas: la era solar pasiva, la era solar activa y el sistema de combustibles fósiles. La primera tuvo como base del sistema energético el uso de energía solar sin realizar modificaciones permanentes en el ambiente. La era solar activa, como proceso histórico, comienza con la invención de la agricultura en que el sistema energético solar se basó en la obtención de productos agrícolas. Los combustibles fósiles, considerados como energía solar almacenada y concentrada en el espacio subterráneo, superaron las limitaciones del sistema energético solar agrario y su uso promovió la revolución industrial. El uso de estos generó un aumento en la disponibilidad inmediata de energía, lo que permitió a las sociedades independizarse del rendimiento agrícola (Schlör y col., 2014).

El origen de los combustibles fósiles se relaciona con las transformaciones químicas y físicas de plantas y animales a lo largo de periodos geológicos y se caracterizan por poseer un tiempo de regeneración extenso. Los recursos fósiles convencionales corresponden al petróleo, gas natural y carbón (Tester, 2012).

La demanda de energía requerida para el desarrollo urbano e industrial actual se satisface principalmente con estos combustibles, siendo el petróleo quien suple los mayores requerimientos a nivel mundial (Murphy & Hall, 2011; Dale & Ong, 2014). No obstante, las reservas de petróleo explotadas podrían resultar escasas ante un escenario de aumento en su consumo, declinando la producción global. De hecho, la producción de petróleo a nivel mundial podría haber alcanzado su valor máximo o

podría ser alcanzado en pocos años más (Hughes & Rudolph, 2011; Abas y col., 2015). Esto ha generado una crisis energética, considerada el principal factor en el decrecimiento económico de las naciones (Capellán-Pérez y col., 2015). Además, el uso del petróleo como fuente de energía genera riesgos ambientales, debido a que en los procesos de combustión se liberan grandes cantidades de dióxido de carbono a la atmósfera, además de compuestos sulfurados y nitrogenados. Esta contribución a los gases de efecto invernadero está asociada al cambio climático, impacto ambiental que se pretende disminuir con políticas intergubernamentales (Hughes & Rudolph, 2011; Dale & Ong, 2014; Schlör y col., 2015).

Al contrario de los combustibles fósiles, las energías renovables (también llamadas energías no convencionales) usan una fuente de energía que no se agota, que se presenta en flujos repetitivos en el ambiente, y no añaden elementos contaminantes a la atmósfera. Así, la utilización de energías renovables reduciría las emisiones de dióxido de carbono y otros gases de efecto invernadero, y sería sustentable por cuanto se aprovechan los flujos de energía que ocurren naturalmente en el ambiente. No obstante, las energías renovables han de satisfacer de manera suficiente y apropiada los requerimientos de energía en el futuro, esto es, ofrecer seguridad energética (Twidell & Weir, 2015).

Las energías no convencionales tienen orígenes diversos: la energía solar proviene de la irradiación del Sol; la energía hidráulica proviene del agua; la energía geotérmica se obtiene desde rocas ardientes, magma y géiseres; la energía mareomotriz se deriva de las olas del mar, la energía eólica deriva del viento, y la biomasa llega a ser una fuente de energía cuando se quema (Palanna, 2009).

Actualmente, los combustibles fósiles suplen el 86% de la demanda global de energía primaria, con porcentajes de 36% por parte del petróleo, 27% por parte del gas natural

y 23% por parte del carbón, mientras que las energías renovables suplen el 8% de la demanda energética. Por otra parte, la energía obtenida del poder nuclear suple el 6% de esta demanda (Abas y col., 2015).

Se ha sugerido que posterior a la época que se basa los combustibles fósiles, pueda existir una nueva era energética: La era post-sistema energético de los combustibles fósiles (Schlör y col., 2014). Si bien no se puede asegurar a cabalidad cuál energía renovable será predominante en el futuro (Schlör y col., 2014), algunas modelaciones muestran que la biomasa suplirá un mayor porcentaje de demanda energética respecto a las demás energías renovables (Kralova & Sjöblom, 2010).

Se considera como parte de la biomasa al material vegetal y animal, incluyendo sus residuos y desechos. Este material orgánico, rico en carbono, reacciona con oxígeno en el proceso de combustión, liberando calor, el que puede ser utilizado para generar trabajo y electricidad. Actualmente, el término "biomasa" se atribuye a todos los materiales provenientes de plantas, debido a su mayor uso y aprovechamiento con respecto al material animal. Además, la biomasa se considera energía solar almacenada que puede ser convertida en combustibles, denominados biocombustibles (Palanna, 2009).

2. Biocombustibles

Entre las energías renovables se encuentran los biocombustibles, que corresponden a compuestos sólidos, líquidos o gaseosos que provienen de la biomasa y forman parte de los avances en bioenergía que pueden sustituir a los combustibles fósiles, reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero y diversificando la matriz energética. Estos compuestos se derivan del material biodegradable de los residuos de la agricultura, de la industria forestal y de los residuos municipales (Palanna, 2009). El

objetivo de todos los biocombustibles es ser carbono-neutral, reduciendo las emisiones de gases de invernadero en comparación a los combustibles fósiles. Algunos biocombustibles estudiados y/o producidos actualmente son el biodiesel, bioetanol, biometanol, biobutanol, biohidrógeno y biometano (Panwar y col., 2011). Dependiendo de la materia prima utilizada, se han clasificado los biocombustibles en cuatro categorías (Antizar-Ladislao & Turrion-Gomez, 2008).

Los biocombustibles de primera generación utilizan como materia prima biomasa vegetal (maíz, caña de azúcar, semillas oleaginosas) (Coulman y col., 2013) y se caracterizan por poder ser mezclados con combustibles basados en petróleo en ciertas proporciones, quemados en motores de combustión interna existentes y distribuidos a través de la infraestructura existente (Naik y col., 2010). Sin embargo, las tecnologías utilizadas en su producción presentan limitaciones, tales como la dependencia del rendimiento agrícola, el consumo de agua en desmedro de los cultivos alimentarios, y la controversia en la destinación de los vegetales a la producción de energía en lugar de utilizarlos como alimentos (Coulman y col., 2013).

La biomasa vegetal es uno de los recursos biológicos más abundante del planeta y no ha sido explotado en su totalidad. Existe un gran potencial para obtener combustibles líquidos derivados de la lignocelulosa (Naik y col., 2010). Es así como los biocombustibles de segunda generación aprovechan la biomasa lignocelulósica como materia prima, esto es, residuos no comestibles provenientes de los cultivos (Antizar-Ladislao & Turrion-Gomez, 2008; Naik y col., 2010).

La utilización de dichos biocombustibles podría reducir la producción de dióxido de carbono, no competiría con los cultivos destinados a generar alimentos y los autos alimentados con ellos podrían tener un mejor desempeño del motor que al usar combustibles fósiles (Naik y col., 2010). No obstante, existe una barrera técnica en el

desarrollo de esta tecnología que limita el uso de biocombustibles de segunda generación representada principalmente por la estructura recalcitrante de la pared lignocelulósica y la presencia de lignina en esta. Además, los procesos de separación de lignina de los polisacáridos contenidos en la biomasa vegetal, utilizables para producir biocombustibles, conllevan un alto costo económico (Antizar-Ladislao & Turrion-Gomez, 2008; Coulman y col., 2013).

La tercera y cuarta generación de biocombustibles envuelven a las tecnologías basadas en microorganismos fotosintéticos, principalmente microalgas. Los biocombustibles de tercera generación son derivados del procesamiento directo de la biomasa algal, mientras que los biocombustibles de cuarta generación, se obtienen luego de modificar el metabolismo de las microalgas para producir compuestos de interés (Lu y col., 2011). Las microalgas han sido propuestas como los recursos con mayor potencial de desarrollo en el campo de los biocombustibles. Sin embargo, existen dificultades en aprovechar este potencial, principalmente por el balance energético en la producción de biocombustibles (Lam & Lee, 2012).

Entre estos tipos de biocombustibles, los de segunda generación se han propuesto como una alternativa sustentable y económica, pues se aprovecha el abundante material lignocelulósico que no es utilizado como alimento producido como residuo por las industrias forestal, de papel, agrícola y frutícola (Dashtban y col., 2009; Talebnia y col., 2010).

La lignocelulosa es un componente estructural presente en los tejidos leñosos de los vegetales que se compone principalmente de lignina, celulosa y hemicelulosa, y en menor medida presenta pectina, proteínas, sales y minerales (Van Dyk & Pletschke, 2012). La biomasa lignocelulósica contiene cerca de 35 a 50% de celulosa, entre 20 y

35% de hemicelulosas y entre 15 y 25% de lignina, composición porcentual que varía entre plantas leñosas y biomasa herbácea (Wyman, 1994; Zhao y col., 2012).

El polímero principal que forma parte de la pared celular, la celulosa, consiste en cadenas de 300 a 15.000 glucosas (β -D-glucopiranosas) unidas mediante enlace β -1,4-glicosídicos. Estas cadenas interaccionan entre sí mediante puentes de hidrógeno, formando microfibrillas que generan una estructura cristalina muy difícil de degradar. No obstante, algunas regiones del polímero son amorfas, las que pueden ser degradadas con mayor facilidad (Ragauskas y col., 2006; Van Dyk & Pletschke, 2012).

La pared celular también está formada por hemicelulosa, la cual es diversa en estructura y composición, incluyendo los polímeros xilano, manano, galactano y arabinano. El polímero de hemicelulosa más abundante en el mundo es el xilano, formada por 70 a 200 residuos de xilosa (β -D-xilopiranosas) unidos mediante enlaces β -1,4-glicosídicos. Este polímero se presenta mayoritariamente como heteroxilano, con cadenas laterales formadas por residuos de arabinosa y glucosa y con residuos de xilosa acetilados. El xilano está sobrepuesto a la celulosa en la pared celular y establece interacciones mediante puentes de hidrógeno con ella, mientras que con la lignina se une covalentemente formando una envoltura que protege a la planta (Ragauskas y col., 2006; Van Dyk & Pletschke, 2012).

En los tejidos leñosos se deposita lignina en la pared celular, la que está formada por tres derivados fenilpropanoides: los alcoholes p-cumárico, coniferílico y sinapílico, que están unidos principalmente por enlaces de tipo éter. La lignina es muy resistente a la degradación y no se ha logrado definir su composición exacta o estructura tridimensional, debido a que siempre se encuentra fuertemente asociada a los polímeros de celulosa y hemicelulosa. Plantas leñosas y superiores poseen grandes

cantidades de lignina que les permite mantener la rigidez y las protege de los patógenos (Van Dyk & Pletschke, 2012; Jónsson y col., 2013).

Las tecnologías de conversión biológica de la lignocelulosa están basadas en procesos microbianos y enzimáticos para producir azúcares que puedan ser convertidos en alcoholes y otros solventes de interés mediante fermentación (Naik y col., 2010). Sin embargo, la producción de biocombustibles líquidos o gaseosos mediante conversión bioquímica no es un proceso simple, por cuanto el material vegetal no es fácilmente fermentable por los microorganismos (Talebnia y col., 2010). Esto se relaciona con la presencia de lignina, el grado de cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización de los polisacáridos, la superficie disponible y la humedad que contiene la materia prima (Van Dyk & Pletschke, 2012). De esta manera, para disponer de los azúcares fermentables a partir del material lignocelulósico, como por ejemplo, desde la paja de trigo que es el mayor residuo de la agricultura, son necesarias algunas etapas de transformación de la materia prima, que incluyen el pretratamiento, la producción de enzimas, la hidrólisis, la fermentación y la recuperación del biocombustible (Figura 1) (Naik y col., 2010; Cheng y col., 2011).

En el pretratamiento se modifica física o químicamente la estructura de la lignocelulosa, aumentando el rendimiento total de azúcares liberados en la fase siguiente, ya que la lignina provee una barrera física que limita la accesibilidad de enzimas degradadoras de hemicelulosa y celulosa hacia su sustrato, promueve la adsorción de celulasas lo que reduce la tasa de hidrólisis y puede inhibir directamente a las enzimas hidrolíticas utilizadas. Existen diversos métodos de pretratamiento que se diferencian en el mecanismo de acción y en la eficiencia de liberación de azúcares posterior (Van Dyk & Pletschke, 2012).

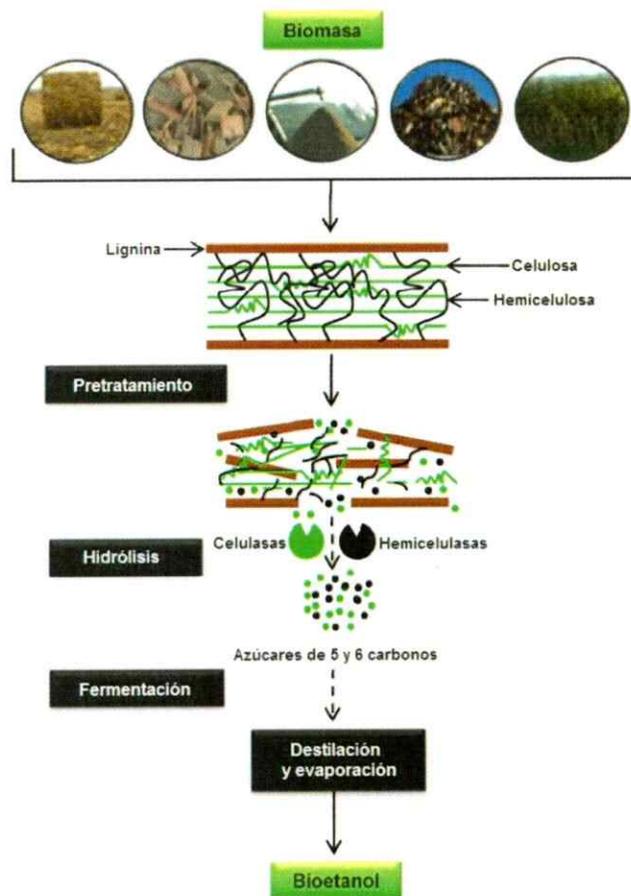


Figura 1. Representación esquemática de la conversión de lignocelulosa a etanol. La biomasa lignocelulósica es pretratada para remover la lignina, lo que permite la acción de celulasas y hemicelulasas. Estas enzimas liberan azúcares fermentables que serán usados por microorganismos para producir biocombustibles. Modificado de Dashtban y col., 2009.

La segunda fase corresponde a la sacarificación o hidrólisis, que es la etapa limitante en términos de velocidad en la producción de biocombustibles. En dicha etapa, la celulosa y hemicelulosa son transformadas en azúcares simples y fermentables, proceso llevado a cabo por distintas enzimas producidas por hongos y bacterias.

La última etapa en la conversión de material lignocelulósico a biocombustibles corresponde a la fermentación, en que los microorganismos son los encargados de

convertir los azúcares monoméricos en distintos compuestos, como etanol, hidrógeno u otros, en un ambiente que favorezca este proceso. La fermentación puede realizarse a continuación de la sacarificación o simultáneamente a esta (Cheng y col., 2011).

3. Enzimas y proteínas utilizadas en el proceso de sacarificación

En la etapa de la hidrólisis de azúcares, distintas enzimas y proteínas se utilizan para obtener azúcares monoméricos. Estas corresponden a celulasas, hemicelulasas y proteínas auxiliares (Cheng y col., 2011).

Las celulasas se obtienen desde hongos que las producen naturalmente, como *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*, y desde algunas bacterias como *Clostridium cellulovorans* (Talebnia y col., 2010). Estas enzimas se clasifican en el grupo de las glicosil hidrolasas (GH), las que hidrolizan el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos. La nomenclatura de las enzimas se basa en la especificidad de su sustrato, mientras que la clasificación de las glicosil hidrolasas en familias se basa en la similitud de las secuencias nucleotídicas, puesto que esta similitud está relacionada con las semejanzas en el plegamiento, refleja las características estructurales mejor que solo con la especificidad del sustrato y provee una herramienta para ordenar y procesar información de manera mecánica (Davies & Henrissat, 1995).

Estas enzimas presentan un dominio catalítico y son capaces de degradar celulosa (β -1,4-glucano) insoluble en agua, liberando azúcares que son solubles. Las exoglucanasas presentan un sitio activo en forma de canal y son enzimas procesivas que se mantienen unidas a la cadena de celulosa hasta que se completa la hidrólisis. Las endoglucanasas corresponden a glicosil hidrolasas con un sitio activo en forma de surco y pueden ser procesivas o no (Sukharnikov y col., 2011).

Muchas celulasas poseen dominios accesorios, como por ejemplo, el dominio de unión a carbohidratos (CBM - *carbohydrate binding module*). El CBM se une al dominio catalítico por una cadena de aminoácidos flexible y ayuda en la unión a la celulosa o hemicelulosa. Las endoglucanasas, que reaccionan con las regiones de baja cristalinidad o amorfas de las fibras de celulosa, provocan la disrupción de estas y crean extremos accesibles. Las exoglucanasas, hidrolizan la celulosa cristalina liberando celobiosa, compuestos por dos unidades de glucosa. Las β -glucosidasas o celobiasas son enzimas que degradan la celobiosa a glucosa (Talebnia y col., 2010; Cheng y col., 2011; Sukharnikov y col., 2011).

Durante la sacarificación enzimática, se reduce la actividad de las celulasas, debido a la adsorción irreversible de las enzimas con la superficie de la celulosa. Esta situación se minimiza agregando surfactantes que reducen la adsorción inespecífica de las enzimas, logrando promover la conversión de la celulosa en azúcares monoméricos (Talebnia y col., 2010).

Las hemicelulasas también pertenecen al grupo de las enzimas glicosil hidrolasas (GH), y, debido a la diversidad de homopolímeros y heteropolímeros existentes en la pared celular secundaria en plantas, se requiere una composición más variada de enzimas para hidrolizar los polímeros en comparación con las celulasas. Estas enzimas degradadoras de hemicelulosa se clasifican en aquellas que despolimerizan hidrolizando la cadena central del polímero y aquellas que liberan los sustituyentes o ramificaciones, pues estos podrían suponer un impedimento estérico para la acción de las demás enzimas (Van Dyk & Pletschke, 2012). Las hemicelulasas permiten la obtención de azúcares monoméricos desde las distintas cadenas de hemicelulosa. Este proceso es considerado una actividad auxiliar en la sacarificación en que se desea obtener la mayor cantidad posible de glucosa.

La hemicelulosa puede contener pentosas (β -D-xilosa, α -L-arabinosa), hexosas (β -D-manosa, β -D-glucosa, α -D-galactosa) y/o ácidos urónicos (ácidos α -D-glucorónico, α -D-4-O-metilgalacturónico, α -D-galacturónico). Para degradar la hemicelulosa y reducir la interacción covalente con la lignina, se requiere la acción de varias enzimas: endoxilanasas, β -xilosidasas, endomananasas, β -manosidasas, α -L-arabinofuranosidasas, α -glucoronidasas, ácido ferúlico esterasa, α -galactosidasas, feruloil esterasa, acetilxilano esterasa y acetilmanano esterasa (Van Dyk & Pletschke, 2012; Gírio y col., 2010).

Entre estas enzimas las más estudiadas han sido las xilanasas, puesto que hidrolizan el xilano que es el polímero hemicelulósico más abundante en el mundo (Gírio y col., 2010). La cadena principal de este polisacárido es degradada mediante la acción de enzimas de la familia glicosil hidrolasas: endoxilanasas (endo- β -1,4-xilanasas) que rompen las uniones β -1,4 entre residuos de xilosa liberando oligosacáridos, y β -xilosidasas (xilano- β -1,4-xilosidasas) que liberan xilosa a partir de los xilo-oligosacáridos (Van Dyk & Pletschke, 2012; Motta y col., 2013).

Las xilanasas han sido clasificadas considerando tres aspectos: peso molecular y punto isoeléctrico, estructura cristalina y propiedades cinéticas, o la especificidad por el sustrato y el perfil del producto. Sin embargo, actualmente existe un sistema más robusto de clasificación, que se basa en la estructura primaria de las enzimas, comparando sus sitios catalíticos y analizando las características mecánicas. Las xilanasas forman parte de las familias de glicosil hidrolasas 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 y 62, de las cuales GH10 y 11 fueron las familias en que primeramente se clasificaron estas enzimas (Motta y col., 2013).

Las xilanasas pertenecientes a las familias GH10 y 11 realizan la hidrólisis del xilano manteniendo la misma conformación anomérica inicial del carbono presente en el extremo reductor del carbohidrato. La estructura tridimensional asociada a estas

familias corresponde a barriles TIM (ocho hélices alfa y ocho láminas beta) para GH10 y barriles tipo remolino o "*β-jelly roll*" (cuatro pares de láminas beta antiparalelas, solo una adyacente en secuencia) para GH11. La familia GH10 está compuesta de endo- β -1,4-xilanasas y endo- β -1,3-xilanasas, las que son mayormente activas sobre xilooligosacáridos. Estas xilanasas poseen entre cuatro y cinco sitios de unión al sustrato. Presentan, además, gran versatilidad catalítica y menor especificidad por el sustrato respecto a la familia GH11. Las enzimas GH10 son capaces de hidrolizar las uniones entre xilosas cerca de las cadenas laterales presentes, por lo que superan el impedimento estérico de estos sustituyentes a lo largo de la cadena principal del xilano (Motta y col., 2013).

Las xilanasas se han utilizado en distintas industrias con éxito. Entre las aplicaciones que se han aprovechado de estas enzimas se encuentra su uso en el blanqueamiento del papel, removiendo lignina e incrementando el brillo de la pulpa; en la clarificación de jugos, disminuyendo el material en suspensión que causa turbidez; en el aumento de la digestibilidad de alimentos; y en la bioconversión de materiales lignocelulósicos hacia biocombustibles. Los microorganismos que producen estas enzimas no están restringidos a un dominio biológico, sino que es un amplio rango incluyendo hongos, actinomicetes y bacterias, como por ejemplo, los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Clostridia* y *Bacillus* (Motta y col., 2013).

Otras enzimas y proteínas son utilizadas de manera auxiliar en la hidrólisis de la lignocelulosa, participando en procesos de separación de lignina, hemicelulosa y celulosa. Entre estas proteínas se encuentran las proteínas inducidas por celulosa y las proteínas tipo-expansinas que interactúan con los sustratos celulósicos ejerciendo una acción que permite el desplazamiento de los componentes, facilitando el acceso de las glicosil hidrolasas (Mohanram y col., 2013).



Las proteínas inducidas por celulosa (CIP - *cellulose induced protein*), contienen un módulo de unión a carbohidrato y participan en la ruptura de las uniones covalentes entre lignina y hemicelulosa (Mohanram y col., 2013), mientras que las expansinas corresponden a una clase de proteínas vegetales secretadas que modifican la pared celular mediante la ruptura de los enlaces no covalentes entre los polisacáridos celulósicos y hemicelulósicos, permitiendo la expansión, desplazamiento y alargamiento de las estructuras de la pared celular.

La expansinas poseen dos dominios, un dominio homólogo al centro catalítico de GH45 y un dominio homólogo al Grupo II de alérgenos del polen de gramíneas, pero ninguno tiene actividad catalítica conocida (Sweeney & Xu, 2012). Se han descrito proteínas de similares características en bacterias, hongos y nemátodos, las que se denominan proteínas tipo-expansinas, entre las que se encuentran la loosenina y las swolleninas (Liu y col., 2015). La loosenina, producida por *Bjerkandera adusta*, posee una secuencia proteica similar al dominio DPBB (*double psi beta barrel*) presente en expansinas vegetales y a la de la familia GH45. Las swolleninas son proteínas homólogas a las expansinas vegetales que inducen la extensión de la pared celular en plantas, mediante la disminución de las interacciones no covalentes que se establecen entre las microfibrillas de celulosa o entre la celulosa y la hemicelulosa. En su extremo amino-terminal poseen un dominio de unión a carbohidrato (CBD - *cellulose binding domain*), mientras que en su extremo carboxilo-terminal poseen un dominio homólogo a los alérgenos del polen de las gramíneas (Mohanram y col., 2013).

La primera swollenina se describió en el hongo saprófito celulolítico *Trichoderma reesei*, y tras su identificación y caracterización se le asignó este nombre debido a la habilidad de abultar fibras de algodón sin producir cantidades detectables de azúcares reductores (del inglés, *swell*) (Saloheimo y col., 2002).

Debido a que estas proteínas no presentan actividad cuantificable con los métodos actuales, se ha estudiado su acción en conjunto con mezclas de celulasas y hemicelulasas, determinando el efecto de sinergia sobre la hidrólisis de lignocelulosa, en comparación a la sacarificación usando solo celulasas y hemicelulasas (Mohanram y col., 2013). No obstante, recientemente se determinó una actividad hidrolítica en la swollenina de *T. reesei*, correspondiente a una endoglucanasa (Andberg y col., 2015).

4. Efecto sinérgico de las enzimas lignocelulolíticas y proteínas auxiliares

Como se describió previamente, la degradación microbiana de lignocelulosa requiere actividades catalíticas que actúen sinérgicamente sobre sustratos diversos, tanto en composición de azúcares como en estructura, sean estos solubles o insolubles (Mohanram y col., 2013). El grado de sinergia o sinergismo se define como la razón de la tasa o productividad de liberación del producto por enzimas cuando estas se usan en conjunto respecto a la suma de las tasas o productividades de los productos liberados cuando las enzimas son usadas independientemente con cantidades idénticas a las utilizadas en la mezcla (Kumar & Wyman, 2009).

Es así como una forma de optimizar la conversión de lignocelulosa en azúcares fermentables es desarrollar un cóctel enzimático para intensificar el proceso de hidrólisis, incluyendo en esta mezcla celulasas, hemicelulasas y enzimas o proteínas accesorias que actúen sinérgicamente (Mohanram y col., 2013).

Las celulasas exhiben sinergia cuando actúan en conjunto sobre el mismo sustrato lignocelulósico. Esta característica se ha descrito para las mezclas entre distintas celobiohidrolasas; entre endo y exoglucanasas; entre distintas endoglucanasas; y entre celobiohidrolasas, endoglucanasas y β -glucosidasa (Sweeney & Xu, 2012; Van Dyk & Pletschke, 2012). Asimismo, en el estudio de las hemicelulasas se ha descrito tres

tipos de sinergia. La homosinergia ocurre entre enzimas que cortan la cadena principal. La heterosinergia se presenta entre enzimas que cortan la cadena principal y enzimas que hidrolizan las ramificaciones. La antisinergia es un efecto que ocurre cuando una enzima inhibe la acción de otra, por ejemplo, cuando una enzima que corta la cadena principal del polisacárido requiere la presencia de un sustituyente para su actividad y este sustituyente ha sido hidrolizado por otra enzima (Sweeney & Xu, 2012; Van Dyk & Pletschke, 2012).

Además, se ha determinado que celulasas y hemicelulasas provenientes de hongos y bacterias, respectivamente, también cooperan sinérgicamente (Gao y col., 2011). El efecto sinérgico también se ha evaluado al utilizar celulasas, hemicelulasas y proteínas accesorias, como swollenina, sobre un mismo sustrato. Este efecto se observa con determinadas combinaciones y proporciones de enzimas, mientras que en los casos en que no hay sinergia podría deberse a la producción de compuestos inhibitorios (Liu y col., 2015). También, se ha evaluado la sinergia secuencial y simultánea. Este efecto se ha observado al añadir las enzimas de manera secuencial así como en el mismo instante. En algunos casos, no existen diferencias entre ambos métodos, por lo que se ha establecido que las diferencias dependen de las enzimas utilizadas y del sustrato elegido como materia prima (Van Dyk & Pletschke, 2012).

La selección de las enzimas para la degradación de sustratos lignocelulósicos, considerando la sinergia entre ellas, puede realizarse considerando cócteles de enzimas a partir de mezclas crudas o a partir de la purificación de proteínas individuales (Van Dyk & Pletschke, 2012).

Las mezclas crudas comerciales de enzimas desarrolladas por empresas estadounidenses fueron elaboradas con el fin de aumentar la efectividad en la producción de biocombustibles. Algunas mezclas incluso contienen hasta ochenta

proteínas que participan en la degradación de material lignocelulósico (Van Dyk & Pletschke, 2012). La desventaja de utilizar estas mezclas comerciales es la falta de caracterización de las enzimas que las componen. En los estudios debe conocerse las actividades enzimáticas y las proporciones de esas actividades dentro de la mezcla, pues puede ocurrir que existan dos enzimas con actividad similar y compitan entre ellas por los mismos sitios activos. Además, las mezclas crudas contienen enzimas no esenciales que podrían afectar la actividad específica de otra enzima, aumentando los costos al requerir mayor cantidad o mayor tiempo para realizar la hidrólisis (Van Dyk & Pletschke, 2012).

Una alternativa al uso de estas mezclas comerciales es purificar las enzimas individuales y mezclarlas en proporciones definidas. En este caso se debe considerar el pH y temperatura óptima de actividad, de modo que sea compatible entre las enzimas a utilizar y con las condiciones de reacción. Una alta actividad específica se puede obtener utilizando enzimas con alto grado de pureza, aunque las etapas de purificación elevarían los costos asociados (Van Dyk & Pletschke, 2012).

Una técnica que aumenta la producción de las enzimas, así como su actividad, es la expresión heteróloga. Diversas enzimas y proteínas involucradas en los procesos de degradación de la lignocelulosa se han expresado heterológamente, incluyendo celulasas, hemicelulasas y proteínas tipo-expansina. Estas proteínas han sido producidas en complejos asociados a membrana o se han secretado al medio extracelular, utilizando diversos géneros, tanto bacterianos como fúngicos (Dashtban y col., 2009). Se han expresado de manera heteróloga en bacterias como *Escherichia coli*, en hongos como *Aspergillus niger* o en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, con el fin de tener una producción mayor de proteínas o con el propósito de ser producidas por los microorganismos que también realizarán la

fermentación de los azúcares (Dashtban y col., 2009; Cheng y col., 2011; Salinas y col., 2011).

Por otra parte, se ha evaluado la producción recombinante de distintas enzimas degradadoras de lignocelulosa a partir de un microorganismo, ya sea como proteínas de fusión (quimeras) o como proteínas individuales (Dashtban y col., 2009; Gírio y col., 2010; Nakatani y col., 2013).

Respecto al primer caso, varios estudios han comprobado el aumento en la tasa de hidrólisis de polisacáridos utilizando enzimas quiméricas, comparado con la suma de las tasas individuales. Entre estos estudios se encuentra la producción recombinante de proteínas de fusión con actividades endoglucanasa-glicosidasa, exoglucanasa-endoglucanasa, endoxilanasas-endoglucanasas, tanto en bacterias como levaduras y hongos (Warren y col., 1987; Adlakha y col., 2012; Zou y col., 2012; Kim y col., 2015). No obstante, la estructura tridimensional que adopta la proteína con dos sitios catalíticos puede impedir un trabajo cooperativo, exhibiendo una actividad inferior a las enzimas independientes. Esto podría deberse a la posición de los sitios catalíticos y al largo y composición de los péptidos que los unen (Morais y col., 2012).

Esta limitación se supera con la co-expresión de los distintos genes en un microorganismo modelo, produciendo cada proteína recombinante de manera independiente. Actualmente, las estrategias más utilizadas para la co-expresión de múltiples proteínas corresponden a utilizar múltiples *cassettes* de expresión monocistónica, utilizar vectores policistónicos basados en sitios internos de entrada al ribosoma (IRES - *internal ribosomal entry site*) y utilizar vectores policistónicos basados en péptidos 2A (de Felipe y col., 2006).

En cuanto a la co-expresión monocistónica, se han utilizado aproximaciones mediante transformación de las células con un vector de expresión que contenga dos o más

genes (Zhou y col., 2007) y mediante ensamblaje de fragmentos de DNA *in vivo*, este último en *Saccharomyces cerevisiae* y *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Gibson, 2009; Contreras y col., 2013). Enzimas distintas que participan en la sacarificación de la lignocelulosa se han producido heterológamente en el mismo microorganismo, para evaluar el efecto de sinergia (Nakatani y col., 2013). No obstante, al utilizar múltiples *cassettes* de expresión monocistrónica, con promotores y terminadores idénticos en cada *cassette*, se pueden producir rearrreglos en el DNA lo que llevaría a una escisión de alguna secuencia génica. Además, el utilizar un mismo promotor en cada transgén no asegura que se obtendrá el mismo nivel de expresión (Zhang y col., 2015).

Por otra parte, los métodos de co-expresión policistrónica basados en secuencias IRES y en péptidos 2A solo pueden utilizarse en sistemas eucariontes (Zhang y col., 2015).

En el método basado en IRES, se genera un RNA mensajero que contiene diversos sitios internos de entrada al ribosoma, lo que permite la traducción de proteínas a partir de la unión de varios ribosomas a un único mensajero. No obstante, una desventaja es que disminuye la eficiencia en la producción de proteínas que se encuentran río abajo de la segunda secuencia IRES (Renaud-Gabardos y col., 2015).

En la estrategia que se basa en utilizar péptidos virales 2A, también se produce un único RNA mensajero a partir de las secuencias génicas de interés. Entre estas secuencias que codifican para proteínas distintas, existe una secuencia nucleotídica obtenida desde un virus, la que al ser traducida produce un péptido que bloquea la polimerización proteica a nivel del ribosoma, permitiendo que se libere una proteína y que la siguiente se sintetice a partir del mismo complejo ribosoma/RNA mensajero. Por lo que en este caso no se requiere la unión de varios ribosomas. Además, solo es necesario un codón de término de la traducción en la última secuencia génica. Este sistema ha sido estudiado en plantas, animales, líneas celulares humanas y levaduras,

y la secuencia del péptido viral 2A utilizada en estudios previos proviene de virus como el de la fiebre aftosa del ganado (FMDV - *foot and mouth disease virus*), el virus de la rinitis equina A (ERAV - *equine rhinitis A virus*) y el tescovirus porcino-1 (PTV1 - *porcine teschovirus-1*) (de Felipe y col., 2003; de Felipe y col., 2006; Kim y col., 2011; Sharma y col., 2011; Luke, 2012; Wang y col., 2015).

5. Propuesta, hipótesis y objetivos

En vista de la oportunidad que existe en la obtención de biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos y de las dificultades en la co-expresión de genes de interés para evaluar efectos sinérgicos, la propuesta de esta investigación consiste en la implementación de un sistema que permita la co-expresión heteróloga y secreción en *Pichia pastoris* de dos proteínas que participan en la degradación de lignocelulosa, utilizando un péptido 2A. La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* se caracteriza por alcanzar un alto nivel de producción y secreción de proteínas recombinantes, habiéndose utilizado en numerosas oportunidades para la expresión recombinante de enzimas lignocelulolíticas (Yoshida y col., 2001; Kawai y col., 2003; Daly & Hearn, 2005; Mellitzer y col., 2012; Rabert y col., 2013; Tiwari y col., 2013; Várnai y col., 2014). Las proteínas escogidas corresponden a la xilanasa del hongo *Gloeophyllum trabeum* (GtXyl1), de la familia GH10, y la swollenina del hongo *Trichoderma reesei* (TrSwo1), cuyas secuencias nucleotídicas ya se encontraban en vectores de expresión de *P. pastoris* y disponibles en el Centro de Biotecnología y Bioingeniería. Además, esta combinación de proteínas no se había estudiado previamente con el método de péptidos 2A. El péptido 2A escogido corresponde al FMDV2A, puesto que se ha utilizado con éxito en *P. pastoris* (Roongsawang y col., 2010). La co-expresión de estas proteínas podría facilitar los procesos de sacarificación al utilizar el sobrenadante o

fracción extracelular de los cultivos, que contiene las proteínas secretadas, directamente sobre el sustrato y sin requerir etapas de purificación.

5.1 Hipótesis

La metodología de co-expresión utilizando el péptido FMDV2A permitirá la expresión y secreción al medio extracelular de las proteínas xilanasas de *Gloeophyllum trabeum* y swollenina de *Trichoderma reesei* como polipéptidos independientes en *Pichia pastoris*.

5.2 Objetivo general

Evaluar el uso del sistema de co-expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* mediante un péptido viral 2A.

5.3 Objetivos específicos

1. Construir un vector portador de los genes que codifican la xilanasas de *Gloeophyllum trabeum* y swollenina de *Trichoderma reesei* basado en el sistema de co-expresión del péptido 2A para la expresión en *Pichia pastoris* y la secreción de ambas proteínas al medio de cultivo.
2. Implementar el sistema de co-expresión construido en *Pichia pastoris* para la expresión simultánea de xilanasas y swollenina secretadas al medio de cultivo.
3. Evaluar cualitativamente la producción y actividad de las proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* y de *Pichia pastoris* utilizadas, así como los plásmidos utilizados y generados en este trabajo se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas y plásmidos	Descripción	Referencia
pGEM-T Easy	Vector de clonación de <i>E. coli</i> , Amp ^r	Promega
pPIC9K	Vector de expresión de <i>P. pastoris</i> , Amp ^r , Gen ^r , secuencia codificante del péptido señal del factor α de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa 1 (AOX1), HIS4	Invitrogen
pPIC3.5K- <i>trsw1</i>	Vector de expresión de <i>P. pastoris</i> , Amp ^r , Gen ^r , HIS4, secuencia codificante de swollenina con péptido señal nativo de <i>Trichoderma reesei</i> (<i>trsw1</i>), cola 6xHis.	Soto-Aguilar, 2016
pPIC9K- <i>gtxy1</i>	pPIC9K con la secuencia codificante de xilanasas de <i>Gloeophyllum trabeum</i> (<i>gtxy1</i>)	Soto-Aguilar, 2016
pGEMT-XS	pGEM-T Easy con la unión de las secuencias codificantes de xilanasas, FMDV2A y swollenina con epítipo FLAG	Este trabajo
pPIC9K-XS	pPIC9K con la unión de las secuencias codificantes de xilanasas, FMDV2A y swollenina con epítipo FLAG	Este trabajo
<i>E. coli</i> TOP10	Cepa de <i>E. coli</i> general para clonación	Disponible en CeBiB
TOP10/pGEMT-XS	<i>E. coli</i> TOP10 llevando plásmido pGEMT-XS	Este trabajo
TOP10/pPIC9K-XS	<i>E. coli</i> TOP10 llevando plásmido pPIC9K-XS	Este trabajo
<i>P. pastoris</i> KM71	Cepa de <i>P. pastoris</i> general para expresión recombinante, genotipo <i>arg4 his4 aox1::ARG4</i> , fenotipo Mut ^S Arg ⁺ His ⁻	Invitrogen
KM71/pPIC9K	<i>P. pastoris</i> KM71 con pPIC9K integrado en el genoma	Este trabajo
KM71/pPIC9K-XS	<i>P. pastoris</i> KM71 con pPIC9K-XS integrado en el genoma	Este trabajo

Nota: CeBiB, Centro de Biotecnología y Bioingeniería, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.

E. coli TOP10 se creció toda la noche en medio LB líquido (triptona 1 %(p/v), extracto de levadura 0,5 %(p/v), NaCl 1 %(p/v), pH 7,0) a 37 °C y 200 rpm. Para mantener una reserva se guardó una fracción del cultivo en medio LB con glicerol 20 %(v/v) a -80 °C. El crecimiento en placas se realizó en medio LB con agar al 1,5 %(p/v).

P. pastoris KM71 se incubó toda la noche en medio YPD líquido (extracto de levadura 1 %(p/v), triptona 2 %(p/v), glucosa 2 %(p/v)) a 30 °C y 250 rpm. Para mantener una reserva, desde el cultivo se colectaron las células por centrifugación a 1500g y se guardaron con 100 µl de medio YPD con glicerol 15 %(v/v) a -80 °C. El crecimiento en placas se realizó en medio YPD con agar al 2 %(p/v).

Los partidores utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Descripción de partidores utilizados en distintas PCR.

Partidor	Secuencia (5'→3')	Largo (pb)	Tm (°C) ¹	%GC
Gtxyl_ext directo	AGATTCGGTAGAGCAGCTACTCATCCTAGGGCACCT CCTACTCCC GCC	48	69,8	57,4
Gtxyl_ext reverso	GTTAGACTCAACGTCACCAGCAAGCTTCAATAAGT CGAAGTTAAGCAATTGCTGCCAGCCAGCAACAATTC	71	68,9	45,1
Trsw0_ext directo	GAAGCTTGCTGGTGACGTTGAGTCTAACCAGGTC CAATGGCTGGTAAGCTTATCCTCG	59	70,0	52,5
Trsw0_ext reverso	TATCGGCCG TCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC ATTCTGGCTAAACTGCACACC	57	67,5	47,4
XS_coexp directo	CATCCTAGGGCACCTCCTACTCCC	24	60	62,5
XS_coexp reverso	TATCGGCCG TCACTTATCGTCG	22	58,6	54,5
AOX1 directo ²	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21	51,2	47,6
AOX1 reverso ²	GCAAATGGCATTCTGACATCC	21	54,3	47,6

Notas: Leyenda. Sitios de restricción, secuencia que codifica FMDV2A, secuencia que codifica epitopo FLAG, codón stop, secuencia de solapamiento. ¹Vector NTI, método Thermodynamic Tm: <35 pb, método %GC Tm: >35 pb. ²Obtenidos desde Invitrogen.

Técnicas de biología molecular

El DNA plasmidial se extrajo a partir de cultivos de *E. coli* TOP10 utilizando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (ThermoScientific). El DNA se cuantificó con MaestroNano (MaestroGen). Las secuenciaciones se realizaron en MacroGen.

Las secuencias de DNA se amplificaron por PCR. Se utilizó la Phusion DNA Polymerase (NEB), con un programa de 98 °C por 30 s, 35 ciclos de 98 °C por 10 s, 30 s a una temperatura de alineamiento determinada por los partidores y 72°C por un tiempo determinado por el largo del fragmento, y finalmente 72 °C por 5 min. La GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) se utilizó con un programa de 95 °C por 2 min, 30 ciclos de 95 °C por 20 s, 15 s a una temperatura de alineamiento determinada por los partidores y 72°C por un tiempo determinado por el largo del fragmento, y finalmente 72 °C por 5 min.

Se determinó la presencia de amplicones tras las reacciones PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %(p/v) con 0,005 %(v/v) de GelRed (Biotium) y posterior iluminación UV. Se utilizó el estándar de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). La extracción y purificación de las bandas desde los geles de agarosa se realizó utilizando el kit GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoScientific).

En la ligación del producto de PCR con el vector pGEM-T Easy se utilizó DNA ligasa T4 (Promega), previa reacción de poliadenilación con dATP y GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega). Las secuencias de DNA se ligaron con el vector pPIC9K utilizando DNA ligasa T4 (Invitrogen), previa digestión con enzimas de restricción.

Se utilizaron las enzimas de restricción *AvrII*, *EagI*, *NdeI*, *SacI*, *Sall*, *XhoI* (NEB) y *NcoI* (ThermoFisher), con las condiciones de reacción indicadas por el proveedor.

Para el análisis de secuencias nucleotídicas, aminoacídicas, de partidores y de ensayos de restricción se utilizaron los programas Vector NTI v10.3 (ThermoFisher) y

SnapGene v2.3.2 (GSL Biotech LLC). La secuencia del péptido señal se determinó utilizando el programa SignalP4.1 (Petersen y col., 2011). La secuencia nucleotídica que codifica el péptido 2A de FMDV ("FMDV2A") se obtuvo desde Geier y col., 2015. Las secuencias codificantes de xilanasasa madura de *G. trabeum* (*gtxyl1*) y de swollenina con el péptido señal nativo de *T. reesei* (*trsw01*) (Figura S1) se obtuvieron desde los plásmidos pPIC9K-*gtxyl1* y pPIC3.5K-*trsw01* (Tabla 1), respectivamente.

Transformación y selección de microorganismos

Se transformó *E. coli* TOP10, mezclando 100 µl de células quimiocompetentes con 10 µl de ligación; esta mezcla se incubó por 20 min en frío y luego a 42 °C por 55 s; se dejó en frío por 3 min, se agregaron 900 µl de medio LB y se incubó por 1 h a 37 °C a 300 rpm. A partir de la transformación con pGEM-T Easy y plásmidos derivados (Tabla 1), la mezcla se sembró en placas LB con ampicilina (100 µg/ml), IPTG (0,5 mM) y X-gal (80 µg/ml), y se incubaron toda la noche a 37 °C. Se seleccionaron colonias recombinantes (colonias blancas) y se crecieron colonias aisladas en placas con LB-ampicilina. Luego, se realizó PCR desde el DNA plasmidial. A partir de la transformación con pPIC9K y plásmidos derivados (Tabla 1), la mezcla se sembró en placas LB con ampicilina y se realizó PCR de colonia utilizando como molde la mezcla de células en agua, calentadas a 96 °C por 5 min.

Para la transformación de *P. pastoris* KM71, 20 µg de los vectores de expresión se linealizaron mediante digestión con la enzima de restricción *SalI* (NEB). Estos vectores se purificaron mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), agregando 1 volumen de esta mezcla. Se centrifugó a máxima velocidad por 10 min a 4 °C, la fase superior se recuperó, a esta se agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a máxima velocidad por 10 min a 4 °C. Se recuperó la

fase acuosa, se agregó 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, se incubó por 20 min a -20 °C y se centrifugó a máxima velocidad por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó, se agregaron 300 µl de etanol 70 % (v/v) frío y se centrifugó a máxima velocidad por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió el DNA en 11 µl de amortiguador TE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Con este DNA se transformó *P. pastoris* KM71 electrocompetentes, modificando lo descrito en el Manual de Expresión MultiCopia en *Pichia* (Invitrogen). Se mezclaron 80 µl de *P. pastoris* electrocompetentes con el DNA linealizado en amortiguador TE, se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm fría, se incubó la cubeta con las células en frío por 5 min y se realizó un pulso de 1500 V. Inmediatamente, se agregó 1 ml de sorbitol 1 M frío. Se transfirió el contenido a un tubo de microcentrífuga, se incubó en frío por 5 min y se sembraron entre 200 y 500 µl de la mezcla en placas de RDB-agar sin histidina (sorbitol 1 M, glucosa 2 % (p/v), base nitrogenada para levaduras 1,34 % (p/v), biotina 0,4 mg/l, aminoácidos 0,005 % (p/v), agar 2 % (p/v)). Estas se incubaron a 30 °C. Luego de 3 días, las colonias transformantes His⁺ se colectaron con agua estéril y se sembraron en placas YPD-agar con concentraciones finales de geneticina entre 0,25 y 2 mg/ml. A partir de las colonias resistentes a geneticina se realizaron PCR de colonias con arranque en caliente, utilizando la pareja de partidores AOX1 (Tabla 2). El molde correspondió a colonias mezcladas con agua y 25 U de líticasa, mezcla que se incubó a 30 °C por 10 min y a -80 °C por 10 min. En un programa de PCR modificado se incubó a 95 °C por 5 min, luego se agregó GoTaq Flexi DNA Polymerase. El programa continuó con 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 49,3 °C por 1 min y 72 °C por 3 min y 1 s, y finalmente 72 °C por 7 min.

Construcción de pPIC9K-XS para la expresión de xilanasa y swollenina en *Pichia pastoris*

El *cassette* de expresión se diseñó de la siguiente manera: sitio de restricción *AvrII*, secuencia codificante de xilanasa madura de *G. trabeum* (*gtxy1*); secuencia codificante del péptido 2A de FMDV (*foot and mouth disease virus*), secuencia codificante de swollenina con el péptido señal nativo de *T. reesei* (*trsw1*); secuencia que codifica el epítipo FLAG, codón de término de la traducción y sitio de restricción *EagI* (Figura 2).

Las secuencias nucleotídicas de xilanasa (*gtxy1*) y swollenina (*trsw1*) se amplificaron desde los vectores pPIC9K-*gtxy1* y pPIC3.5K-*trsw1* (Tabla 1), mediante PCR con las parejas de partidores *Gtxyl_ext* y *Trsw_ext*, respectivamente (Tabla 2). En estas PCR se utilizó Phusion DNA Polymerase (NEB). Utilizando PCR en gradiente de temperatura se determinó la temperatura de alineamiento de partidores óptima.

Los amplicones obtenidos en las PCR anteriores se utilizaron como moldes en la PCR de solapamiento. En estas PCR se utilizó Phusion DNA Polymerase (NEB), la pareja de partidores *XS_coexp* (Tabla 2) y de cada amplicón se añadieron 25 ng de DNA en un volumen total de 20 μ l de reacción. Se determinó la temperatura óptima de alineamiento de partidores realizando PCR en gradiente de temperatura.

El producto que se obtuvo en la PCR de solapamiento se ligó a pGEM-T Easy, generando el plásmido pGEMT-XS (Tabla 1), se transformó *E. coli* TOP10 y se seleccionaron colonias recombinantes. A partir del DNA plasmidial de *E. coli* TOP10/pGEMT-XS (Tabla 1) se realizaron ensayos de restricción, con las enzimas *XhoI*, *NdeI* y *SacI* (NEB) y se realizó PCR con la pareja de partidores *XS_coexp* (Tabla 2). La Figura S2 muestra el resultado de la secuenciación de pGEMT-XS.

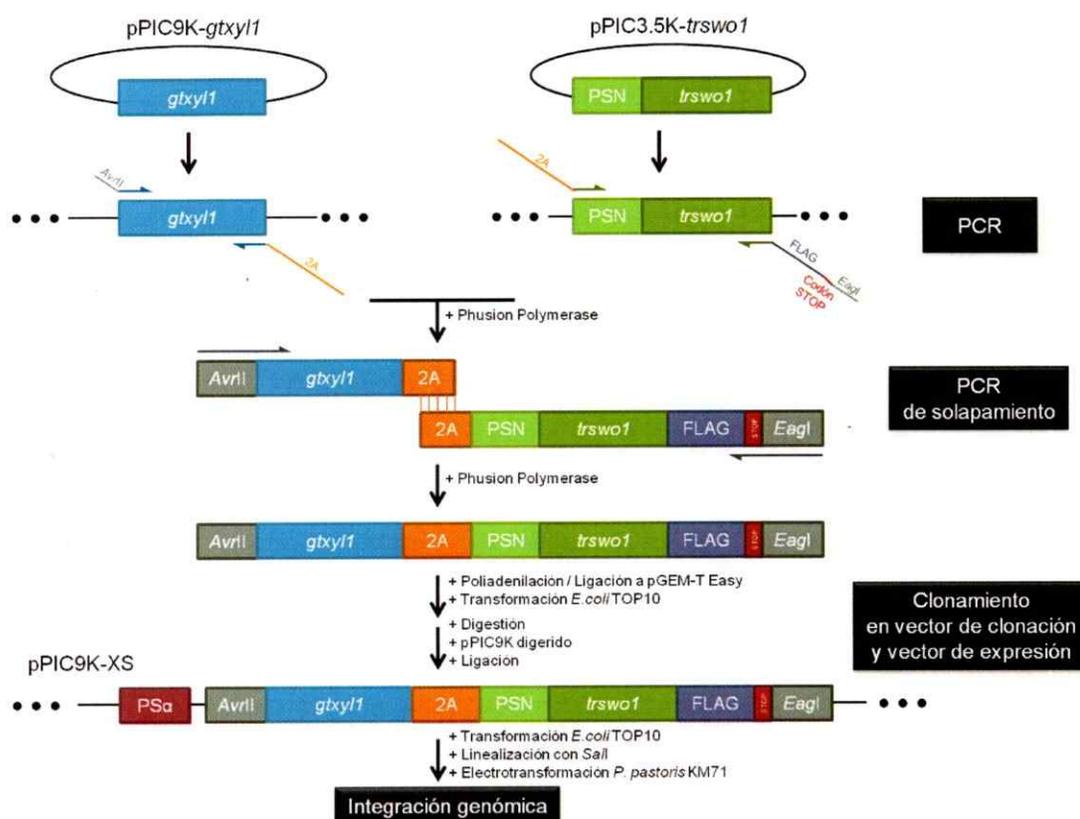


Figura 2. Procedimiento para la obtención del fragmento XS ligado al vector pPIC9K. A partir de las secuencias codificantes de xilanasas de *G. trabeum* y swollenina de *T. reesei*, clonadas previamente en vectores de expresión de *P. pastoris* pPIC9K y pPIC3.5K se realizaron PCR para generar sitios de restricción y zona de sobreposición en secuencia que codifica el péptido 2A. Con estos amplicones se realizó PCR de solapamiento, utilizando partidores externos XS_coexp (Tabla 2). Finalmente, este producto de PCR se clonó en el vector de clonación pGEM-T Easy y en el vector de expresión pPIC9K. El fragmento XS quedó río abajo del promotor AOX1 y la secuencia nucleotídica quedó en fase con el péptido señal incluido en el vector. Este vector se denominó pPIC9K-XS. Con el vector linealizado se transformó *P. pastoris* KM71 y se produjo la integración genómica mediada por recombinación homóloga. Nomenclatura: *gtxyl1*, xilanasas; *trswo1*, swollenina; PSN, péptido señal nativo; AvrII y EagI, sitios de restricción; 2A, péptido FMDV2A; FLAG, epítipo para inmunodetección; STOP, codón de término de la traducción; PS α , péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los plásmidos purificados pGEMT-XS y pPIC9K se digirieron de manera secuencial con las enzimas de restricción *AvrII* y *EagI* (NEB). Posteriormente, los fragmentos se ligaron, generando el vector pPIC9K-XS (Tabla 1), y con el producto obtenido se transformó *E. coli* TOP10. Se seleccionaron colonias recombinantes *E. coli* TOP10/pPIC9K-XS (Tabla 1), las PCR de colonias realizadas contenían GoTaq Flexi DNA Polymerase y la pareja de partidores AOX1 (Tabla 2) y luego se realizó con la pareja de partidores XS_coexp (Tabla 2). A partir del DNA plasmidial de *E. coli* TOP10/pPIC9K-XS (Tabla 1) se realizaron ensayos de restricción con las enzimas *AvrII*, *EagI* (NEB) y *NcoI* (ThermoFisher). La Figura S3 muestra el resultado de la secuenciación de pPIC9K-XS.

Con los vectores de expresión pPIC9K y pPIC9K-XS se transformó *P. pastoris* KM71 y se generaron las cepas *P. pastoris* KM71/pPIC9K y KM71/pPIC9K-XS (Tabla 1).

Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes en *P. pastoris*

Se utilizó el protocolo de expresión de cepas recombinantes de *P. pastoris* descrito en el Manual de Expresión MultiCopia en *Pichia* (Invitrogen), con algunas modificaciones. Se inoculó 100 ml de medio BMGY (extracto de levadura 1 %(p/v), triptona 2 %(p/v), fosfato de potasio 100 mM pH 6,0, base nitrogenada para levaduras 1,34 %(p/v), biotina 0,4 mg/l, glicerol 1 %(v/v)) con células de *P. pastoris* KM71/pPIC9K y KM71/pPIC9K-XS. Se crecieron las células a 25 °C y 200 rpm por 3 días. Luego, se colectaron las células por centrifugación a 1500g por 5 min a temperatura ambiente, se resuspendieron en 20 ml de medio BMMY (extracto de levadura 1 %(p/v), triptona 2 %(p/v), fosfato de potasio 100 mM pH 6,0, base nitrogenada para levaduras 1,34 %(p/v), biotina 0,4 mg/l, metanol 0,5 %(v/v)) en matraces de 125 ml tapados con 2 capas de gasa. Se indujo la expresión a 30 °C y 250 rpm por 5 días. Cada 24 h se

agregó metanol hasta una concentración final de 0,5 %(v/v) para compensar la evaporación de este compuesto y se extrajo 1 ml de cultivo para análisis de actividad enzimática, electroforesis y western blot. Se colectaron las células a 12000 rpm por 3 min a temperatura ambiente, se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga y se guardó a -80 °C.

La inducción de proteínas recombinantes a mayor escala se realizó a partir de colonias aisladas desde placas frescas con medio YPD-agar (una semana a 4°C), se realizó un pre-inóculo de 5 ml de medio BMGY en tubos de 50 ml y se incubó toda la noche a 30 °C y 250 rpm. Luego, se inocularon 500 ml de medio BMGY en un matraz de 1 l y se incubaron a 30 °C y 250 rpm por 2 días. Las células se colectaron por centrifugación a 1500g por 5 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 ml de medio BMMY. Se transfirieron a un matraz de 1 l tapados por dos capas de gasa y se incubaron a 30 °C y 250 rpm por 72 h. Cada 24 h se agregó metanol hasta una concentración final de 0,5 %(v/v). El cultivo se centrifugó a 3000g por 5 min a temperatura ambiente. La fracción del sobrenadante se decantó y guardó a -20 °C.

Para concentrar el contenido de proteínas de las muestras se utilizó un filtro de centrifuga Centricon YM-10 (Millipore) de 2 ml de capacidad, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Determinación de actividades xilanasa y celulasa

Se realizaron ensayos de actividad xilanasa y celulasa a partir de la fracción extracelular obtenida, descrito en el paso anterior. La actividad celulasa se evaluó como posible actividad de la swollenina. Para el análisis de la actividad xilanasa se utilizó xilano de abedul (Sigma) al 1 %(p/v) como sustrato, en amortiguador citrato de sodio 50 mM pH 5,3; para el análisis de la actividad celulasa se utilizó

carboximetilcelulosa (Megazyme) al 1 % (p/v) en amortiguador acetato de sodio 50 mM pH 5,0. Los ensayos de actividad se realizaron en placas de 96 pocillos. Se mezclaron 80 μ l de fracción extracelular con 120 μ l de sustrato y se incubaron por 2 h a 37 °C y 900 rpm (actividad xilanasa) o sin agitación (actividad celulasa). Esto se realizó por duplicado. Posteriormente, se mezcló 80 μ l de cada reacción con 80 μ l DNS, se incubó por 7 min a 99 °C sin agitación y luego por 5 min a 4 °C; se transfirió 100 μ l de esta reacción a placas planas y traslúcidas de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro lector de microplacas UV-Vis (Biochrom) para determinar la cantidad azúcares reductores. Se utilizó una curva de calibración con glucosa para determinar los azúcares reductores equivalentes liberados (Figura S4). Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que libera un μ mol de azúcares reductores equivalentes a glucosa por minuto. Los datos se analizaron utilizando la prueba estadística ANOVA de dos vías, prueba posterior de Tukey y el programa GraphPad Prism v6.01 (GraphPad Software).

Para evaluar la actividad xilanasa mediante zimograma, se preparó un gel de acrilamida:bisacrilamida (29:1) al 10%, conteniendo 0,6 % (p/v) de xilano de abedul (fracción soluble en agua). Se realizó una PAGE en condiciones semidesnaturantes. Las muestras no se calentaron, se cargaron con amortiguador de carga 5X semidesnaturante (Tris 60 mM pH 6,8, glicerol 25 % (v/v), SDS 2 % (p/v), azul bromofenol 0,1 % (p/v)) y la electroforesis se efectuó a 4 °C con un voltaje constante de 80 V. El gel con xilano se lavó dos veces con Tritón X-100 2,5 % (v/v) por 30 min con agitación suave. Luego, se lavó con agua destilada por 5 min y con amortiguador citrato de sodio 50 mM pH 5,3 por 10 min, en ambos casos con agitación suave de 30 rpm. A continuación se incubó 2 h en forma estática a 50 °C en el mismo amortiguador. El gel se lavó 4 veces por 10 min con agua destilada en agitación, se tñó con rojo congo 0,1



%(p/v) por 20 min con agitación y se lavó con NaCl 1 M hasta que se observaron bandas traslúcidas. Se agregó ácido acético 10 %(v/v) para generar mayor contraste.

Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida

Se utilizaron alícuotas de 20 μ L de las fracciones extracelulares a partir de las inducciones de proteínas recombinantes de *P. pastoris* para realizar SDS-PAGE. La electroforesis se realizó con un gel de resolución de acrilamida:bisacrilamida (29:1) al 10% y voltaje constante de 200 V. Las muestras se calentaron a 100 °C por 5 min y se cargaron con amortiguador de carga 5X desnaturalante (Tris 60 mM pH 6,8, glicerol 25 %(v/v), SDS 2 %(p/v), 2-mercaptoetanol 5 %(v/v), azul bromofenol 0,1 %(p/v)). Se utilizó el estándar de peso molecular Prestained Protein Molecular Weight Marker (ThermoScientific).

El gel de acrilamida se tiñó con solución de azul de Coomassie (metanol 45 %(v/v), ácido acético 10 %(v/v), azul de Coomassie R-250 0,1 %(p/v)) en agitación suave por 30 min y luego se agregó solución de destinción (metanol 45 %(v/v), ácido acético 10 %(v/v)) por 30 min.

La tinción con plata del gel de acrilamida se realizó lavando con agua destilada por 1 h en agitación suave, se incubó por 30 min con ditioneitol (DTT) 0,005 mg/ml en agitación y se removió esta solución. Sin enjuagar se añadió una solución de AgNO₃ 0,1 %(p/v) y se incubó por 30 min con agitación. Se removió la solución, se agregó solución preparada al momento de usar de Na₂CO₃ 3,6 %(p/v) y formaldehído 0,02 %(v/v), se verificó la aparición de bandas y se detuvo la reacción añadiendo 5 g de ácido cítrico.

Detección de proteínas unidas al epítipo FLAG por western-blot

Se realizaron ensayos de inmunodetección de proteínas, mediante western-blot. Se utilizaron muestras obtenidas desde las fracciones extracelulares a partir de la segunda inducción de *P. pastoris* recombinantes realizadas a mayor escala. Además, se agregó una alícuota de fracción extracelular de inducción de proteínas de *Salmonella typhi* STH2370, conteniendo proteína Hemolisina E unida al epítipo FLAG (HlyE-FLAG), donado por el Dr. Nicolás Villagra, Universidad Andrés Bello. Las proteínas totales de las fracciones extracelulares se cuantificaron mediante el método de Bradford.

Para el western-blot, se realizó un SDS-PAGE con gel de resolución de acrilamida:bisacrilamida (29:1) al 12,5%, se mantuvo un voltaje de 80 V hasta alcanzar el límite entre gel concentrador y gel de resolución y luego se modificó el voltaje a 120 V. Se preparó un gel paralelo al gel de acrilamida utilizado en el western-blot. Finalizada la electroforesis, se armó el sistema para la electrotransferencia de proteínas, colocando secuencialmente una almohadilla, papel filtro, el gel, membrana de nitrocelulosa 0,45 μm , papel filtro y la segunda almohadilla. La transferencia se realizó con amortiguador de transferencia (glicina 1,44 % (p/p), Tris 0,3 % (p/p), metanol 20 % (v/v) agregado al momento de utilizar), en frío por 1 h a 100 V constantes. El gel utilizado en la transferencia se tiñó con azul de Coomassie y luego se destiñó. El gel paralelo se tiñó con azul de Coomassie, se destiñó y luego se tiñó con nitrato de plata. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 100 ml de TBS (Tris 25 mM pH 8,0, NaCl 125 mM) con leche descremada 5 % (p/v) (Svelty en polvo) toda la noche en agitación suave a temperatura ambiente. Se lavó una vez con TBS por 5 min y luego se lavó 4 veces por 5 min con TBS-Tween20 (TBS con Tween 20 0,05 % (v/v)). Se incubó con el anticuerpo primario (Anti-FLAG) diluido 1:5000 en TBS con leche descremada 1 % (p/v) toda la noche a 4 °C con agitación suave. Posteriormente, se

lavó 4 veces por 5 min con TBS-Tween20 y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón (Anti-IgG) ligado a fosfatasa alcalina, diluido 1:5000 en TBS con leche descremada 1 %(p/v), por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Se lavó 4 veces por 5 min con TBS-Tween20 y luego una vez por 5 min con TBS. A continuación, se sumergió la membrana de nitrocelulosa en la solución reveladora acuosa con BCIP 0,1 %(v/v) y NBT 0,1 %(v/v) (Invitrogen), hasta que se observó la aparición de un precipitado violeta. El sistema de revelado fue gentilmente donado por el Dr. Nicolás Villagra, Universidad Andrés Bello.

RESULTADOS

Construcción del fragmento conteniendo secuencias codificantes de xilanasas y swollenina unidas por la secuencia que codifica el péptido FMDV2A

Con el objetivo de evaluar la co-expresión recombinante en *P. pastoris* de proteínas con potencial uso en la degradación de lignocelulosa, utilizando un péptido 2A, se generó un fragmento de DNA que contiene las secuencias codificantes de xilanasas y swollenina unida a FLAG con la secuencia que codifica FMDV2A entre ellas, denominado fragmento XS. Las secuencias nucleotídicas que codifican la xilanasas madura de *G. trabeum* y la swollenina con su péptido señal nativo de *T. reesei*, se amplificaron mediante PCR desde los plásmidos pPIC9K-*gtxyl1* y pPIC3.5K-*trsw01* (Tabla 1) con partidores que permitieron generar sitios de restricción e incorporar al fragmento final la secuencia 2A y el epítipo FLAG (Figura 2). En la Figura 3 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa, de los fragmentos de ADN obtenidos en las PCR en que se amplificaron los genes *gtxyl1* y *trsw01*.

De acuerdo a la migración de los fragmentos de ADN en el gel de agarosa, el amplicón obtenido en la PCR realizada utilizando como molde pPIC9K-*gtxyl1* tuvo un tamaño aproximado de 1000 pb. Asimismo, el amplicón obtenido en la PCR con el molde pPIC3.5K-*trsw01* fue de 1500 pb aproximadamente. El control negativo, que no contenía DNA molde, no presentó estas bandas de amplificado (Figura 3). Los partidores utilizados tenían más de 50 bases nucleotídicas, lo que podría ser un factor en la obtención de bandas de 200 pb por amplificación inespecífica (Figura 3).

Los amplicones obtenidos desde los genes de xilanasas y swollenina se extrajeron y purificaron para ser utilizados en la siguiente PCR.

La PCR por solapamiento, utilizando los amplicones obtenidos anteriormente, se realizó con partidores externos XS_coexp (Tabla 2), tal como se ilustra en la Figura 2. Se obtuvieron amplicones con tamaños aproximados de 1500 pb y 2600 pb (Figura 4). La obtención de distintas bandas podría deberse a la formación de homo o heterodímeros entre los partidores XS_coexp (Tabla 2), a la asociación inespecífica de estos partidores con otras secuencias o a una hibridación de zonas internas de los fragmentos utilizados como molde que permitan la acción de la polimerasa, generando productos de gran tamaño. El amplicón de tamaño aproximado 2600 pb coincide con el tamaño esperado para el fragmento XS (unión de las secuencias codificantes de xilanasa, FMDV2A y swollenina), el cual era de 2583 pb.

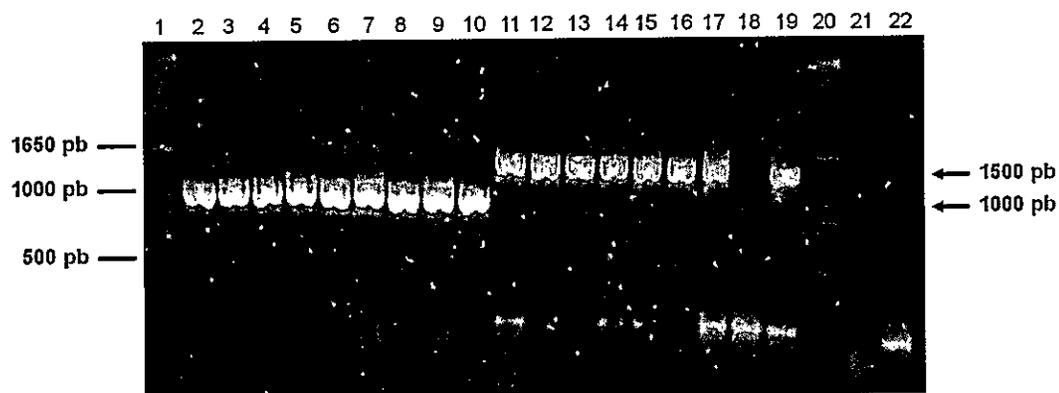


Figura 3. Gel de agarosa del producto de PCR en la generación de la secuencia 2A. Productos de PCR desde secuencias nucleotídicas que codifican a xilanasa y swollenina, de tamaños esperados 1080 y 1552 pb respectivamente, con temperatura de alineamiento de partidores de 70 °C. Carriles: 2-10, amplicones obtenidos en PCR con molde pPIC9K-*gtxyl1* y partidores Gtxyl_ext (Tablas 1 y 2); 11-19, amplicones obtenidos en la PCR con molde pPIC3.5K-*trswo1* y partidores Trswo_ext (Tablas 1 y 2); 21, reacción con partidores Gtxyl_ext (Tabla 2) y sin DNA molde; 22, reacción con partidores Trswo_ext (Tabla 2) y sin DNA molde; 1 y 20, estándar de tamaño molecular.

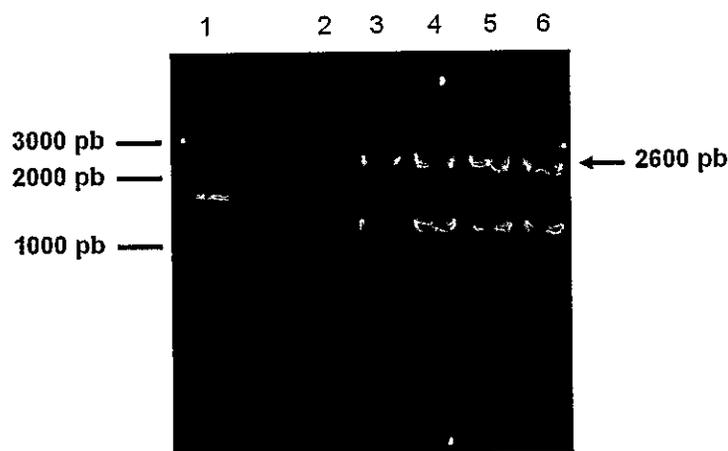


Figura 4. Gel de agarosa con producto de PCR de solapamiento. Amplicones obtenidos en la PCR utilizando como molde las secuencias que codifican xilanasas y swollenina con la secuencia 2A añadida, con un tamaño esperado del fragmento de 2583 pb, con partidores XS_coexp (Tabla 2) y una temperatura de alineamiento de 72°C. Carriles: 3-6, producto de PCR de solapamiento; 2, reacción sin DNA molde; 1, estándar de tamaño molecular.

Ligado de la construcción en los vectores pGEM-T Easy y pPIC9K

Las secuencias de DNA obtenidas en la PCR de solapamiento se purificaron, se sometieron a poliadenilación y se ligaron al vector pGEM-T Easy, generando el vector pGEMT-XS (Tabla 1). Tras la transformación de *E. coli* TOP10, se obtuvieron colonias blancas en placas con ampicilina, IPTG y X-gal, clones que se denominaron *E. coli* TOP10/pGEMT-XS y se extrajo el DNA plásmidial pGEMT-XS. Con este DNA plásmidial se realizó una PCR en gradiente de temperatura con partidores externos, para verificar que el vector de expresión tuviera el fragmento XS. Se obtuvieron amplicones del tamaño esperado (2600 pb aproximadamente), con temperaturas de alineamiento entre 53,4 y 72 °C; mientras que el control sin DNA molde no presentó bandas (Figura 5). En esta PCR solo se obtuvo un amplicón, por lo que los partidores utilizados hibridan específicamente en la secuencia XS. Entonces, las diferentes

bandas obtenidas en la PCR por solapamiento (Figura 4) no están relacionadas con los partidores utilizados.

Con el fin de corroborar que los clones de *E. coli* TOP10/pGEMT-XS contenían el vector diseñado, el DNA plasmidial de estos clones se digirió con distintas combinaciones de enzimas de restricción, comparando las bandas obtenidas en un ensayo *in silico* (Figuras 6A, B y C). Al incubar con las enzimas *XhoI* y *NdeI*, en el gel de agarosa se observaron bandas de tamaños aproximados de 2000 pb y 3600 pb (Figura 6D), tamaños que también se obtuvieron tras las digestiones con las enzimas *XhoI* y *SacI* (Figura 6E). Estos resultados indican que efectivamente los clones portan el vector pGEMT-XS. La inserción del fragmento XS tenía dos posibles orientaciones luego de la ligación y este se encontraba en orientación del promotor SP6 (Figura 6). Se obtuvo la secuencia nucleotídica del fragmento XS (Figura S2), la que no presentó errores.

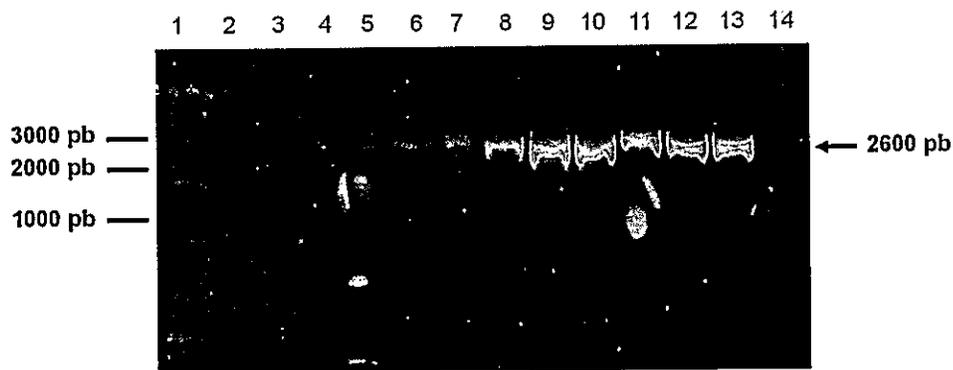


Figura 5. Gel de agarosa con producto de PCR de fragmento XS en vector de clonación a partir de DNA plasmidial, con gradiente de temperatura. Amplicones obtenidos en PCR del fragmento XS a partir del DNA plasmidial purificado desde *E. coli* TOP10/pGEMT-XS. Se utilizaron partidores XS_coexp (Tabla 1) y el tamaño esperado era de 2583 pb. Carriles: 2-13, producto de PCR con temperatura de alineamiento 48, 49,1, 50,8, 53,4, 56,5, 59, 61,8, 64,5, 67,1, 69,5, 71 y 72 °C; 14, reacción sin DNA molde; 1, estándar de tamaño molecular.

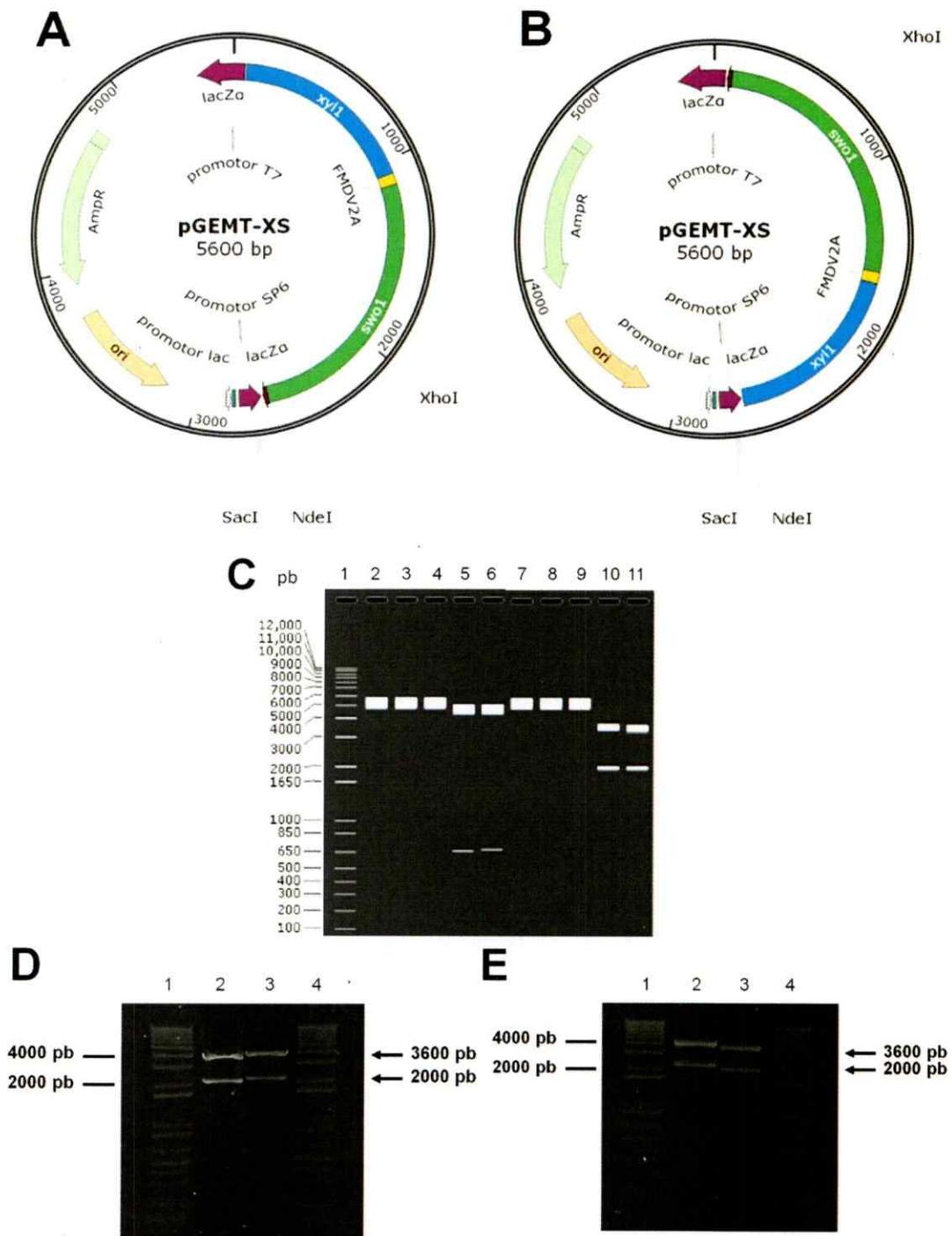


Figura 6. Análisis de restricción sobre el DNA plasmidial pGEMT-XS. (Descripción en página siguiente)

Figura 6. Análisis de restricción sobre el DNA plasmidial pGEMT-XS. (Figura en página anterior) **A y B.** Posibles orientaciones del fragmento XS en el vector pGEM-T Easy: Orientación en sentido del promotor T7 (**A**) y orientación en sentido del promotor SP6 (**B**). Se indica los sitios de restricción utilizados, en azul la posición de la secuencia codificante de xilanasa (*gtxyl1*), en verde la posición de la secuencia codificante de swollenina (*trswo1*) y en amarillo, la secuencia que codifica el péptido 2A (FMDV2A). **C.** Ensayo de restricción *in silico*. Carriles: 1, estándar de tamaño molecular; 2-6, orientación de fragmento en sentido de promotor T7, digestiones en orden *XhoI*, *NdeI*, *SacI*, *XhoI* + *NdeI*, *XhoI* + *SacI*; 7-11, orientación de fragmento en sentido de promotor SP6, digestiones en orden *XhoI*, *NdeI*, *SacI*, *XhoI* + *NdeI*, *XhoI* + *SacI*. **D y E.** Productos de digestión experimental con enzimas de restricción *XhoI* + *NdeI* (**D**) y *XhoI* + *SacI* (**E**). Carriles: 2-3, DNA plasmidial de clones de *E. coli* TOP10/pGEMT-XS; 1 y 4, estándar de tamaño molecular.

Por otra parte, el fragmento de DNA XS también se insertó en el vector de expresión pPIC9K, generando el vector pPIC9K-XS. Para ello, pGEMT-XS y pPIC9K se digirieron con las enzimas de restricción *AvrII* y *EagI*. Con la ligación de los productos de la digestión se transformó *E. coli* TOP10 y a las colonias resistentes a ampicilina se les realizó PCR de colonias, de tal modo de seleccionar aquellas que posean el vector de expresión recombinante (Figura 7). También se transformó *E. coli* TOP10 con pPIC9K digerido con *AvrII* y *EagI* para determinar si la digestión fue completa. Desde esta transformación se obtuvieron colonias resistentes a ampicilina, por lo que tendrían el vector sin digerir, lo que se comprobó mediante PCR de colonias (Figura 7). A partir del resultado de la PCR de colonias en clones de *E. coli* TOP10 transformados con la ligación del fragmento al vector de expresión, se concluyó que se obtuvieron cinco clones que contenían el producto de fusión de interés, de 3000 pb aproximadamente. Otros cinco clones presentaron amplicones de 500 pb aproximadas, por lo que tendrían el vector pPIC9K sin inserto. Un clon no presentó producto de PCR (Figura 7).

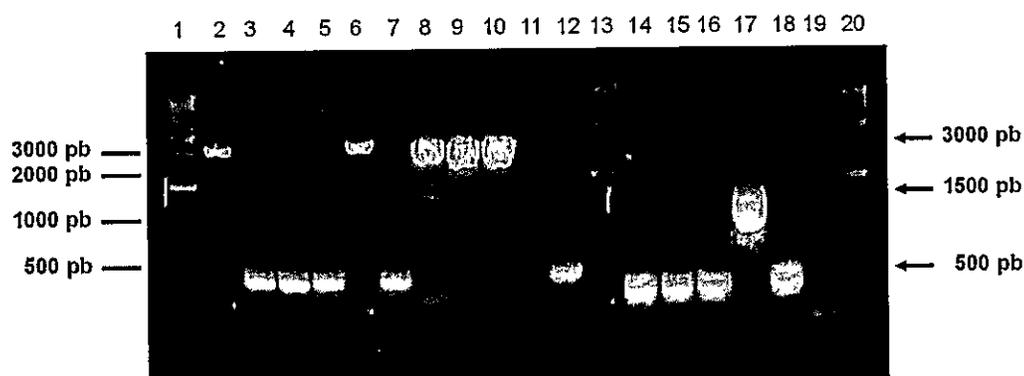


Figura 7. Gel de agarosa con producto de PCR de colonias, para confirmar la presencia del producto de fusión en el vector de expresión. Amplicones obtenidos en PCR del fragmento XS ligado a pPIC9K a partir de colonias transformantes *E. coli* TOP10, de tamaño esperado 3057 pb utilizando partidores AOX1 (Tabla 2). Carriles: 2-12, producto de PCR utilizando como molde colonias transformadas con ligación; 14-16, producto de PCR utilizando como molde colonias transformadas con pPIC9K digerido con *AvrII* y *EagI*; 17, DNA plasmidial pPIC9K-*gtxyl1*; 18, DNA plasmidial pPIC9K sin digerir; 19, reacción sin DNA molde; 1, 13 y 20, marcador de tamaño molecular.

Los clones transformados con el vector pPIC9K digerido presentaron amplicones de aproximadamente 500 pb, por lo que este vector no fue digerido totalmente (Figura 7). Al utilizar el DNA plasmidial del vector pPIC9K-*gtxyl1* y del vector pPIC9K sin digerir, se obtuvieron amplicones de tamaños aproximados esperados, 1500 pb y 500 pb, respectivamente. (Figura 7).

Las cinco colonias de *E. coli* TOP10 que dieron positivas en la PCR con partidores AOX1 (amplicones de tamaño aproximado de 3000 pb) se denominaron clones *E. coli* TOP10/pPIC9K-XS, y con ellas se realizó una nueva PCR de colonias con partidores específicos para amplificar el fragmento XS y evaluarlo mediante electroforesis en gel (Figura 8).

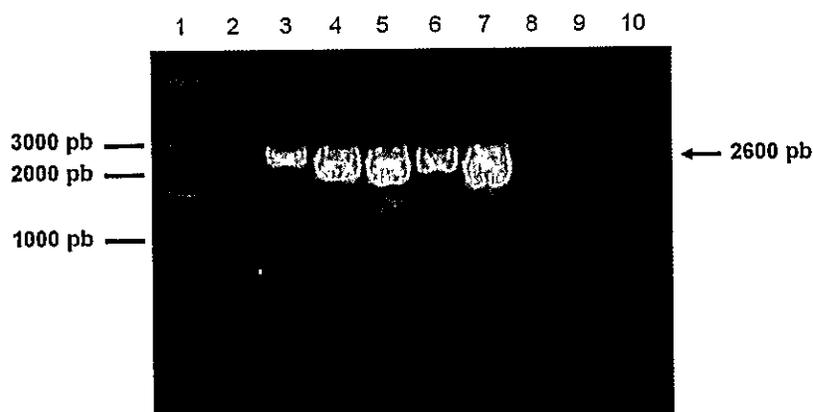


Figura 8. Gel de agarosa con producto de PCR de colonias del fragmento XS en el vector de expresión. Amplicones obtenidos en PCR del fragmento XS a partir de colonias transformantes *E. coli* TOP10/pPIC9K-XS, de tamaño esperado 2583 pb utilizando los partidores XS_coexp (Tabla 1). Carriles: 2-6, producto de PCR de colonias utilizando como molde colonias *E. coli* TOP10/pPIC9K-XS; 7, DNA plasmidial pGEMT-XS; 8, DNA plasmidial pPIC9K; 9, reacción sin DNA molde; 1 y 10, marcador de tamaño molecular.

Tras la PCR de colonias para amplificar el fragmento XS, se obtuvo para las cinco colonias transformantes un amplicón de tamaño aproximado de 2600 pb; por lo tanto, estos clones contenían el vector pPIC9K-XS, correspondiente al vector de expresión ligado al producto de fusión de *gtxy11* y *trsw01*. Un producto de PCR de idéntico tamaño se obtuvo al amplificar la secuencia del fragmento XS desde pGEMT-XS. En las PCR con el vector pPIC9K y en ausencia de DNA, no se observaron bandas como era esperado (Figura 8).

Los clones de *E. coli* TOP10/pPIC9K-XS se crecieron toda la noche y con el DNA plasmidial purificado se realizaron ensayos de digestión y se compararon con las digestiones *in silico* para determinar la correcta inserción del fragmento XS en el vector de expresión (Figura 9A). De los plásmidos de los cinco clones analizados, cuatro

presentaron bandas de 2900 pb y 9000 pb, aproximadamente, al realizar la digestión con la enzima *NcoI*, mientras que en una muestra se obtuvieron bandas de tamaño aproximado de 550 pb, 2300 pb y 9000 pb con la misma enzima, plásmido que se descartó para los siguientes análisis (Figura 9B). Luego de la digestión con enzimas *AvrII* y *EagI*, todas las muestras presentaron las bandas esperadas de 2600 pb y 9000 pb aproximadamente (Figura 9C).

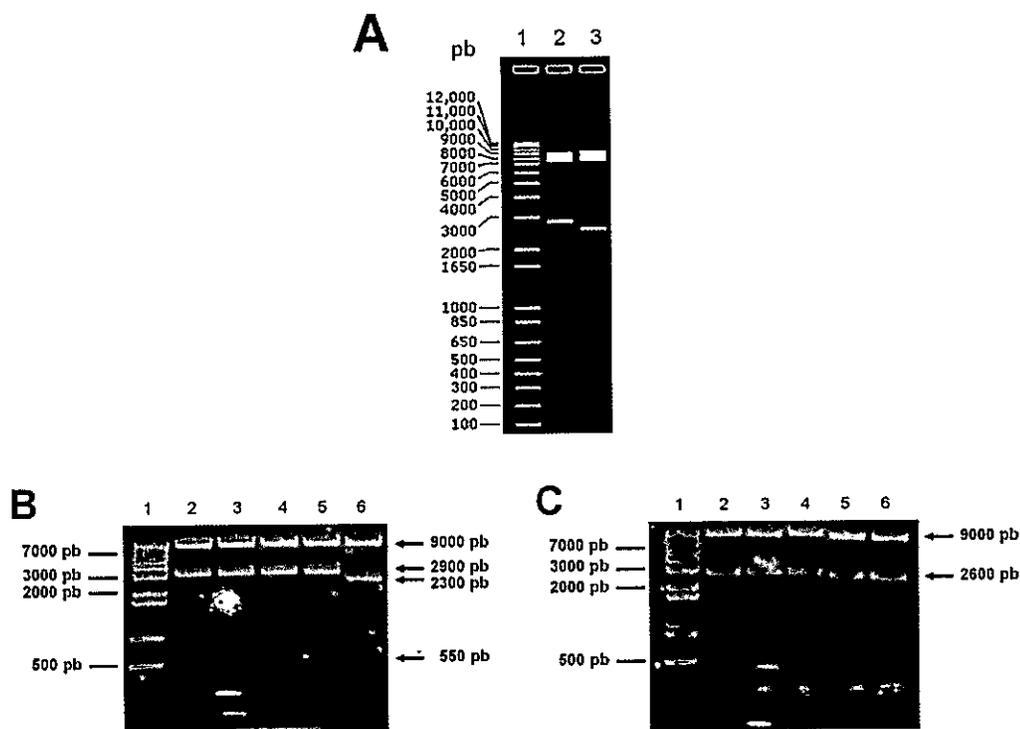


Figura 9. Análisis de restricción sobre el DNA plasmidial pPIC9K-XS. A. Ensayo de restricción *in silico*. Carriles: 2 digestión con *NcoI*; 3, digestión con *AvrII* + *EagI*; 1, estándar de tamaño molecular. **B.** Gel de agarosa con fragmentos de restricción tras digestión con *NcoI* a partir del vector de expresión ligado al fragmento XS. **C.** Gel de agarosa con fragmentos de restricción tras digestión con *AvrII* y *EagI* a partir del vector de expresión ligado al fragmento XS. Carriles: 2-6, DNA plasmidial de clones *E. coli* TOP10/pPIC9K-XS; 1, estándar de peso molecular.

El inserto del plásmido pPIC9K-XS se secuenció completamente, incluyendo la secuencia que codifica el péptido señal del factor α de *S. cerevisiae* contenida en el vector pPIC9K (Figura 10 y Figura S3). Los resultados de la secuenciación indicaron que el inserto correspondía al fragmento diseñado y este no presentaba errores de secuencia.

...5'-ACGGAATTGTTGCTGGCTGGCAGCAATTGCTTAACTTCGACTTATTGAAGCTT
GCTGGTGACGTTGAGTCTAACCAGGTCCAATGGCTGGTAAGCTTATCCTCGT-3'...

Figura 10. Extracto de la secuenciación de pPIC9K-XS. El vector de expresión recombinante se secuenció, obteniendo la secuencia nucleotídica que codifica a la xilanasa (azul) unida en el mismo marco de lectura abierto a la secuencia que codifica al péptido FMDV2A (amarillo) y a swollenina (verde), cuyo péptido señal comienza con el codón de inicio de la traducción ATG.

Selección de clones de *P. pastoris* recombinantes

El vector de expresión pPIC9K y el vector pPIC9K-XS se purificaron y linealizaron. Con ellos se electrotransformó *P. pastoris* KM71. Se realizó la selección de colonias recombinantes en medios de crecimiento sin histidina y posteriormente con el antibiótico geneticina. Colonias de *P. pastoris* KM71/pPIC9K-XS y KM71/pPIC9K, utilizados como control respecto a la expresión recombinante, se obtuvieron en placas con medio YPD-agar suplementado con geneticina en concentraciones de 0,25, 0,5, 1 y 2 mg/ml.

Para determinar la inserción en el genoma de estos vectores, se realizó una PCR de colonias con arranque en caliente, de modo de evitar una amplificación inespecífica, de colonias individuales de *P. pastoris* KM71/pPIC9K-XS, resistentes a 0,25, 0,5, 1 y 2 mg/ml de geneticina y de colonias de *P. pastoris* KM71/pPIC9K como control, resistentes a 0,25 y 2 mg/ml de geneticina (Figura 11).

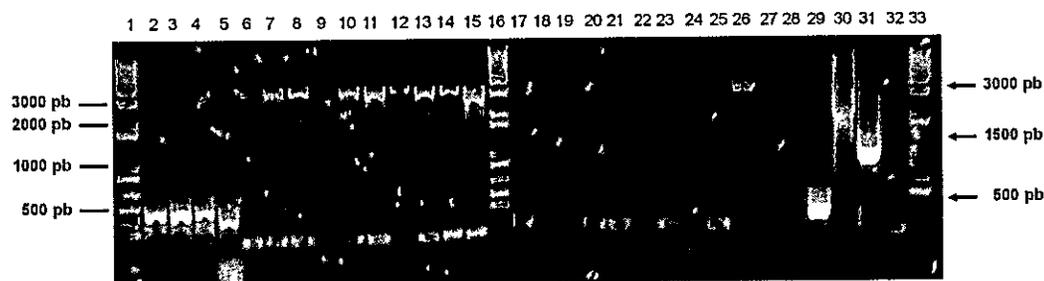


Figura 11. Gel de agarosa con producto de PCR de colonias, con arranque en caliente, desde *P. pastoris* transformantes. Amplicones obtenidos en PCR del fragmento XS, a partir de colonias de *P. pastoris* resistentes a geneticina. Se utilizaron los partidores AOX1, los tamaños esperados correspondían a 493 pb utilizando como molde *P. pastoris* KM71/pPIC9K y 3057 pb con el molde *P. pastoris* KM71/pPIC9K-XS. Carriles: 2-5, clones de *P. pastoris* KM71/pPIC9K como molde, seleccionados con geneticina en concentraciones 0,25 mg/ml (carriles 2 y 3) y 2 mg/ml (carriles 4 y 5); 6-15 y 17-28, clones de *P. pastoris* KM71/pPIC9K-XS seleccionados con geneticina 0,25 mg/ml (carriles 6-10 y 22-24), 0,5 mg/ml (carriles 25-26) y 1 mg/ml (carriles 27-28) y 2 mg/ml (carriles 11-15 y 17-21); 29, DNA plasmidial pPIC9K; 30, DNA plasmidial pPIC9K-XS; 31, DNA plasmidial pPIC9K-*gtxyl1*; 32, reacción sin DNA molde; 1, 16 y 33, estándar de peso molecular.

A partir de la PCR de colonias utilizando como molde *P. pastoris* transformada con PIC9K-XS digerido y la pareja de partidores AOX1 (Tabla 2), se obtuvieron bandas definidas de 3000 pb aproximadamente, en diecisiete muestras de colonias resistentes a las distintas concentraciones de geneticina, mientras que dos muestras presentaron una banda tenue con el mismo tamaño (Figura 11, carriles 18 y 28). Los amplicones obtenidos en tres PCR de colonias utilizando como molde *P. pastoris* transformada con pPIC9K digerido presentaron un tamaño aproximado de 500 pb, al igual que con el DNA plasmidial purificado pPIC9K sin digerir utilizado como control (Figura 11, carriles 2, 3 y 4); mientras que una muestra presentó una banda de aproximadamente 400 pb, la que se descartó para posteriores análisis (Figura 11, carril 5). Los controles

positivos, vectores de expresión recombinantes pPIC9K-XS y pPIC9K-*gtxy11*, presentaron amplicones de tamaños aproximados esperados, 3000 pb y 1500 pb, respectivamente (Figura 11).

Para la evaluación de producción de proteínas de recombinantes, desde las colonias positivas para la PCR con partidores AOX1, se seleccionaron y crecieron seis clones de *P. pastoris* KM71/pPIC9K-XS, resistentes a geneticina en concentraciones de 0,25 mg/ml (clones R1 y R4), 0,5 mg/ml (clon R5), 1 mg/ml (clon R6) y 2 mg/ml (clones R2 y R3). Además, se seleccionaron dos clones de *P. pastoris* KM71/pPIC9K como control, resistentes a 0,25 mg/ml de geneticina (clon C1) y a 2 mg/ml de geneticina (clon C2).

Análisis de la producción de las proteínas recombinantes GtXyl1 y TrSwo1 en *P. pastoris*

Los clones recombinantes de *P. pastoris*, que adquirieron el vector de expresión llevando el fragmento XS mediante integración genómica (clones R1-R6), se cultivaron en medio BMGY y luego se trataron con metanol al 0,5 % (v/v) para inducir la producción de las proteínas xilanasa (GtXyl1) y swollenina (TrSwo1). Ambas proteínas se producirían de manera independiente, debido a la incorporación de la secuencia que codifica el péptido FMDV2A entre las secuencias nucleotídicas que codifican a xilanasa y swollenina, permitiendo la co-expresión policistónica. Adicionalmente, en paralelo se sometió al mismo tratamiento a los clones de *P. pastoris* transformados con el vector pPIC9K sin inserto (clones C1 y C2) como control negativo de inducción.

La inducción se llevó a cabo por 120 h, y durante el transcurso se tomaron alícuotas para analizar la producción secretada de proteínas recombinantes. Cada 24 h desde el inicio de la inducción se midió la actividad xilanasa y celulasa en una muestra de medio en cultivos de todos los clones. La actividad xilanasa se midió para determinar la

presencia de GlXyl1 y la actividad celulasa se midió para determinar la presencia de TrSwo1, debido a la posible actividad endoglucanasa que tendría esta proteína.

En la Figura 12 se muestra la actividad xilanasa obtenida para las diferentes inducciones de clones recombinantes, medida sobre el sustrato xilano de abedul.

Con los distintos tiempos de inducción y clones de *P. pastoris* KM71/pPIC9K-XS analizados se obtuvieron valores de actividad enzimática diversos, influyendo ambas variables en estas mediciones (ANOVA de dos vías, $p < 0,01$). No obstante, al realizar múltiples comparaciones por cada par de muestras, no se obtuvo una diferencia significativa entre los valores de actividad (Post-prueba de Tukey, $p > 0,05$).

Los valores promedios más altos se obtuvieron a partir de la fracción extracelular de los cultivos de los clones R1 entre las 48 y 96 h de inducción, y R3 a las 72 h de inducción (Figura 12).

La actividad celulasa desde alícuotas de las fracciones extracelulares de los cultivos de *P. pastoris* fue medida de manera idéntica a la actividad xilanasa, utilizando carboximetilcelulosa como sustrato. En este ensayo, no se obtuvo actividad celulasa (datos no mostrados).

Luego de 48 h de inducción de *P. pastoris* con metanol se analizaron las proteínas de la fracción extracelular de los cultivos mediante SDS-PAGE (Figura 13).

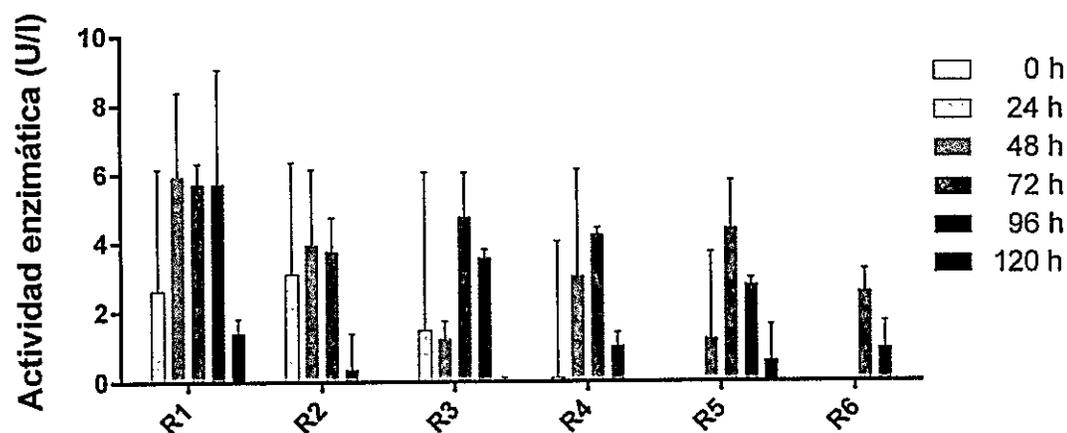


Figura 12. Actividad xilanasa en sobrenadantes de cultivo de los clones recombinantes de *P. pastoris*. Los azúcares reductores liberados en el ensayo de actividad hidrolítica con los clones controles (C1 y C2) se descontaron en el ensayo con clones recombinantes (R1-R6), en las distintas horas de inducción. El promedio de actividad xilanasa con barras de desviación estándar se muestra en unidades enzimáticas por litro de cultivo, $n=2$. ($p>0,05$).

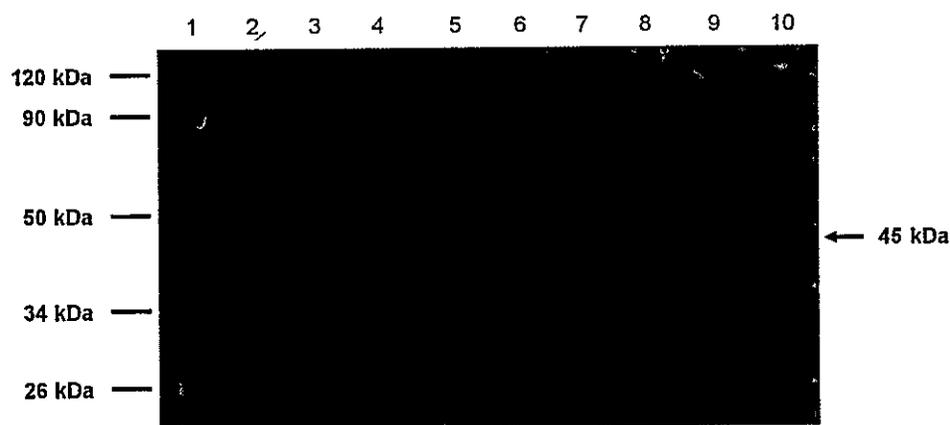


Figura 13. Análisis electroforético de las proteínas de la fracción extracelular del cultivo de clones de *P. pastoris*. SDS-PAGE realizado con las alícuotas obtenidas a las 48 h luego de iniciada la inducción con metanol al 0,5 % (v/v) de clones de *P. pastoris* recombinantes y no recombinante. El gel se tiñó con solución de azul de Coomassie. Carriles: 2, *P. pastoris* KM71 no recombinante; 3-4, sobrenadante de cultivos de *P. pastoris* clones C1-C2; 5-10, sobrenadante de cultivos de *P. pastoris* clones R1-R6; 1, estándar de peso molecular.

El patrón de proteínas observado tras el SDS-PAGE difiere entre los clones de *P. pastoris* recombinantes y no recombinante. En los clones R1 a R6 se observó una banda correspondiente a un tamaño de proteína de 45 kDa, que es cercano al tamaño esperado para la xilanasa y para la swollenina recombinantes (Figura 13). En los clones C1 y C2 no se observaron bandas luego de la tinción con azul de Coomassie (Figura 13). *P. pastoris* KM71 no recombinante presentó un patrón de bandas distinto a los clones recién descritos (Figura 13).

La fracción extracelular del cultivo del clon R1, inducido con metanol a distintos tiempos, se utilizó para observar los cambios cualitativos en la producción de las proteínas recombinantes (Figura 14).

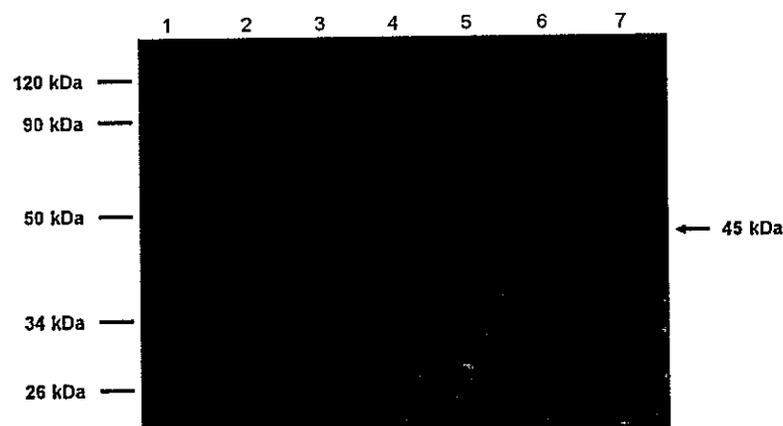


Figura 14. Análisis electroforético temporal de las proteínas de la fracción extracelular del cultivo de un clon de *Pichia pastoris* recombinante. SDS-PAGE realizado con alícuotas de la inducción con metanol al 0,5 % (v/v) del clon de *P. pastoris* R1 a los distintos tiempos de inducción. El gel se tiñó con solución de azul de Coomassie. Carriles: 1, estándar de peso molecular; 2-7, fracción extracelular a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h de inducción.

En el tiempo 0 h, no se observaron bandas para la fracción extracelular del cultivo del clon R1. En los tiempos de inducción entre 24 y 120 h se obtuvo la banda de 45 kDa observada anteriormente (Figura 13), la cual aumentó su intensidad en los sobrenadantes de los cultivos a mayor tiempo de inducción (Figura 14). Esta proteína presentó un tamaño cercano al esperado para xilanasa y swollenina recombinantes.

Con el fin de identificar la proteína visualizada en los geles de acrilamida a partir de la inducción recombinante de *P. pastoris*, se realizó un zimograma para revelar la actividad xilanasa. Para este ensayo se utilizó la fracción extracelular desde las inducciones de clones C1, R1, R3 y R6. Además, se utilizó xilanasa pura, cuya secuencia codificante se utilizó como molde para generar el fragmento XS (Figura 15).

A partir del zimograma, en las muestras provenientes de la fracción extracelular de la inducción de los clones R1, R3 y R6 (Figura 15B) se observó la banda de actividad de 45 kDa, coincidente en movilidad con la banda observada en el SDS PAGE (Figura 15A), y cercana al tamaño de 40 kDa de la banda de la xilanasa pura. El clon C1 no presentó bandas de actividad en este ensayo (Figura 15B), indicando que las proteínas extracelulares del clon control no poseen actividad xilanasa detectable. Esto sugiere que la banda de 45 kDa observada en el caso de R1, R3 y R6 corresponde a la xilanasa proveniente de la construcción recombinante y no a una xilanasa endógena de *P. pastoris*. En el zimograma, también se detectó actividad xilanasa en una banda de un tamaño superior a los 120 kDa, respecto al estándar de peso molecular, en los clones R1, R3 y R6 (Figura 15B). Esta proteína podría corresponder a una banda de menor grosor observada en el gel de acrilamida en los carriles de los clones R1, R3 y R6, de tamaño mayor a 120 kDa (Figura 15A). Esta banda no se observó en el carril del clon C1 (Figura 15), por lo que esta proteína podría corresponder a la proteína de fusión entre xilanasa y swollenina, con el péptido FMDV2A entre ellas.

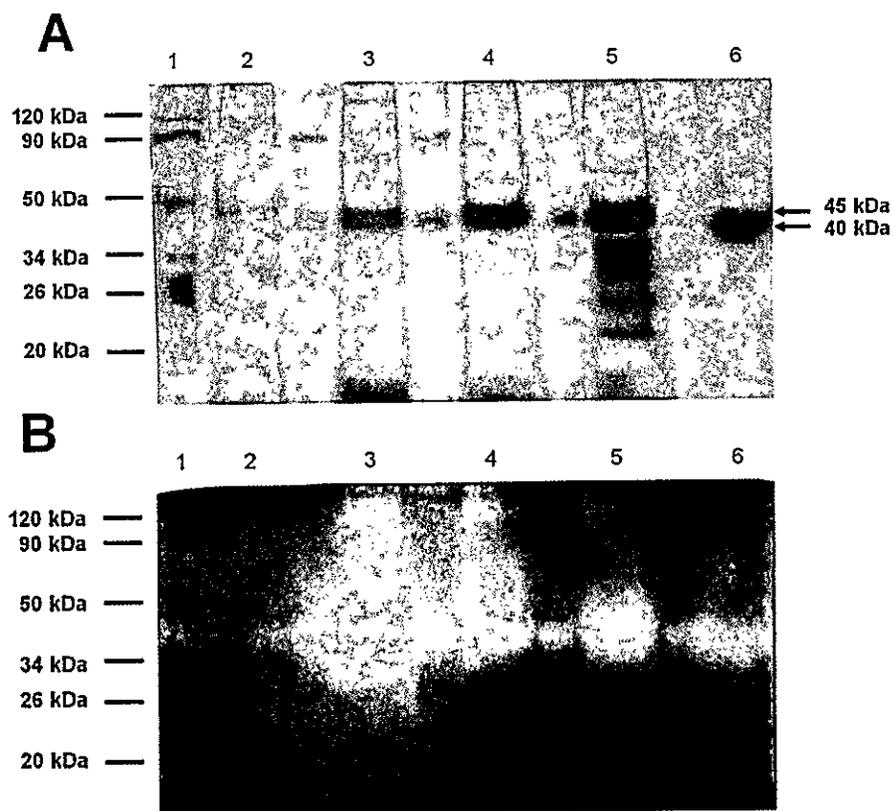


Figura 15. Actividad xilanasa revelada mediante zimograma, a partir de la fracción extracelular de la inducción de clones recombinantes de *P. pastoris*. A. PAGE en condiciones semidesnaturantes con alícuotas de la inducción a 120 h de clones control y recombinantes de *P. pastoris* y con xilanasa pura. Este gel se tiñó con nitrato de plata. B. Estas muestras se utilizaron también en un PAGE en condiciones semidesnaturantes para revelar la actividad xilanasa. El zimograma se tiñó con rojo congo 0,1 %(p/v) y luego con ácido acético 10 %(v/v). Carriles: 2-5, clones C1, R1, R3 y R6; 6, xilanasa pura; 1, estándar de peso molecular.

Con el fin de determinar si en las bandas de tamaños 45 kDa y mayor a 120 kDa observadas en los PAGE en condiciones semidesnaturantes y zimograma también está presente swollenina, se realizó la detección del epítipo FLAG unido al extremo carboxilo terminal de la secuencia aminoacídica de la swollenina, mediante western-

blot. En la membrana de nitrocelulosa se observó la presencia de este epítipo mediante la aparición de un precipitado coloreado, al incubar con la solución NBT-BCIP permitiendo la reacción de la fosfatasa alcalina ligada al anticuerpo secundario (Figura 16).

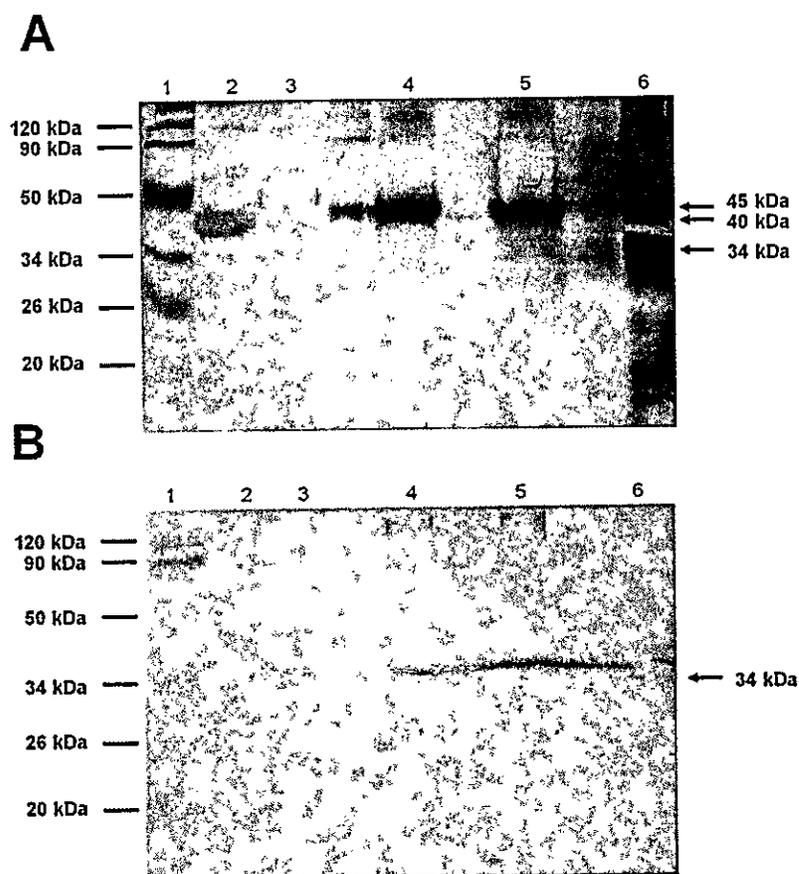


Figura 16. Inmunodetección de proteínas que poseen el epítipo FLAG. A. SDS-PAGE de la fracción extracelular a 72 h post-inducción de *P. pastoris* recombinantes. Tinción con nitrato de plata. B. Membrana de nitrocelulosa posterior a la inmunodetección sobre proteínas de la fracción extracelular a 72 h post-inducción de *P. pastoris* recombinantes. Carriles: 2, xilanasas pura (4 µg de proteína total); 3, clon C1 (2,7 µg de proteína total); 4, clon R1 (15 µg de proteína total); 5, clon R3 (15 µg de proteína total); 6, fracción extracelular de cultivo de *S. typhi* conteniendo proteína HlyE-FLAG (10 µg de proteína total); 1, estándar de peso molecular.

Se utilizaron fracciones extracelulares desde la inducción de los clones de *P. pastoris* C1, R1 y R3, y se agregó xilanasa pura y proteína recombinante HlyE-FLAG obtenida desde la fracción extracelular del cultivo de *Salmonella typhi*, en carriles distintos. Mediante inmunodetección se obtuvieron bandas que poseen el epítipo FLAG en los carriles de los clones R1 y R3 (Figura 16B). Estas bandas corresponden a proteínas con tamaño mayor a 120 kDa (Figura 16), tal como las obtenidas en el zimograma (Figura 15B). La proteína HlyE-FLAG se observó en la membrana de nitrocelulosa con un tamaño de 34 kDa (Figura 16B). Para la xilanasa pura y el sobrenadante del cultivo del clon C1 no se observaron bandas de proteínas que poseen el epítipo FLAG (Figura 16B). Esto indica que la swollenina se produce solo como una proteína de fusión y no es secretada como una proteína individual.

Los resultados obtenidos sugieren que la enzima xilanasa (GtXyl1) es activa y se produce y secreta al medio extracelular de manera independiente en *Pichia pastoris* recombinante, mientras que la proteína swollenina (TrSwo1) solo está presente en la proteína de fusión que contiene xilanasa y swollenina unidas por el péptido FMDV2A.

DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

La obtención de biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos requiere la producción de enzimas y proteínas que participen en su degradación. El efecto sinérgico en la acción de estas proteínas puede estudiarse mediante la co-expresión heteróloga de varios productos génicos. El objetivo de este estudio fue implementar un sistema de co-expresión policistrónica en *Pichia pastoris*, en el que a partir de un marco de lectura abierto se producen varias proteínas, mediante el uso de un péptido viral 2A. Las proteínas de interés fueron xilanasa de *G. trabeum* (GtXyl1) y swollenina de *T. reesei* (TrSwo1), y el péptido viral fue el del virus de la fiebre aftosa del ganado (FMDV2A).

Las secuencias nucleotídicas que codifican la xilanasa madura de *G. trabeum* y la swollenina con su péptido señal nativo de *T. reesei*, el cual es funcional en *P. pastoris* (Soto-Aguilar, 2016), se obtuvieron previo a este trabajo, a partir del cDNA generado desde el RNA mensajero de estas especies. Estas secuencias codificantes se insertaron en vectores de clonación y de expresión para *P. pastoris*, y con estos recursos se generó el fragmento XS para evaluar la co-expresión policistrónica, vale decir, varias proteínas sintetizadas a partir de un RNA mensajero. Se utilizó el péptido FMDV2A, puesto que se ha probado con éxito en la co-expresión de proteínas intracelulares y de proteínas secretadas al medio extracelular en *Pichia pastoris* (Wang y col., 2007; Roongsawang y col., 2010; Geier y col., 2015).

Desde la amplificación de los genes *gtxyl1* y *trswo1* se obtuvieron los fragmentos con el tamaño esperado de 1080 pb y 1552 pb, respectivamente (Figura 3).

Tras la PCR de solapamiento, se obtuvo un amplicón de 2583 pb, tamaño esperado para la amplificación del fragmento XS (Figura 4). Este fragmento de DNA se purificó y se utilizó para el clonamiento en el vector pGEM-T Easy y luego en el vector de expresión pPIC9K.

En una solución alternativa para la fusión de las secuencias de xilanasas y swolleninas podrían haberse generado sitios de restricción que coincidieran con los extremos de la secuencia del péptido 2A, como lo descrito por Roongsawang y col., 2010 para otras proteínas. Sin embargo, este método limita la combinación de bases posibles de usar y no se podría adecuar la secuencia respecto al uso de codones de la especie utilizada o reproducir las secuencias publicadas en artículos previos.

Diversos autores han utilizado la estrategia de la PCR por solapamiento, en la que se evita el trabajo con enzimas de restricción, disminuyendo el tiempo destinado al clonamiento de los fragmentos de interés (Heckman & Pease, 2007; Bryksin & Matsumura, 2010; Zuo & Rabie, 2010). Mediante PCR por solapamiento no existe la limitante de generar sitios de restricción específicos y es posible utilizar secuencias de nucleótidos que se adecuen al uso de codones de la especie a transformar para la producción recombinante de proteínas, en este caso, *Pichia pastoris*.

Luego de la transformación de *P. pastoris* KM71 con los plásmidos pPIC9K y pPIC9K-XS linealizados, se realizó una doble selección en medios de cultivo. En primer lugar, en el medio RDB sin histidina solo pueden crecer las colonias que han integrado el vector en su genoma, pues *P. pastoris* KM71 es auxótrofa para este aminoácido (*his4*) y solo al integrar el vector produce la enzima histidinol hidrogenasa que participa en la vía de biosíntesis de la histidina. Las colonias transformantes que integraron el vector en esta etapa, sintetizaron y acumularon diversos productos génicos, entre ellos el producto génico que otorga la resistencia a geneticina. En la segunda etapa de



selección, se agregaron distintas cantidades de este antibiótico al medio de crecimiento YPD. Se ha reportado que a bajas concentraciones de este agente de selección (0,25 mg/ml final) es posible el crecimiento de clones de *P. pastoris* que no poseen el gen de resistencia, lo que provoca la selección de falsos positivos (Scorer y col., 1994). Por tanto, los clones resistentes se analizaron además mediante PCR de colonias.

Se procuró realizar los análisis de producción de proteínas recombinantes en clones que fueran resistentes a distintas concentraciones de geneticina, pues se ha establecido una correlación entre la cantidad de copias del vector que se integran en el genoma de *P. pastoris* respecto a la resistencia a este agente de selección. Debido a posibles recombinaciones homólogas múltiples *in vivo*, *P. pastoris* contendría en el genoma mayor cantidad de secuencias del vector y, por tanto, expresaría en mayor medida los genes contenidos. Entonces, estas colonias producirían mayor cantidad de proteínas recombinantes y de producto génico relacionado a la resistencia con geneticina, pudiendo crecer con concentraciones finales de entre 2 y 4 mg/ml (Scorer y col., 1994; Braun & Suske, 1999).

La inducción de proteínas recombinantes se realizó añadiendo metanol al medio inoculado con *P. pastoris* transformantes. El promotor bajo el cual se clonó el fragmento XS corresponde al promotor AOX1, el cual es regulado a nivel transcripcional y la expresión del gen río abajo se induce con metanol. *P. pastoris* KM71 posee un fenotipo Mut^s (*methanol utilization slow*) pues no posee el producto génico AOX1 (alcohol oxidasa 1). Esta cepa puede crecer en medio con metanol a partir del producto génico AOX2, pero como el promotor AOX2 es débil, el crecimiento no es eficiente, ya que no se produce suficiente enzima para oxidar el metanol (Cregg y col., 1989).

Se han revisado de manera extensa las condiciones óptimas para crecer e inducir *P. pastoris* recombinantes. Los factores que influyen en la producción de proteínas recombinantes corresponden al medio de inducción del inóculo, temperatura de inducción, pH del medio, concentración de metanol, tiempo de inducción y oxigenación del medio (Daly & Hearn, 2005; Krainer y col., 2012; Charoenrat y col., 2013; Li y col., 2013; Byrne, 2015; Looser y col., 2015). Para estas inducciones, se siguieron las indicaciones de inducción de *P. pastoris* recombinantes entregadas en el Manual de Expresión MultiCopia en *Pichia* (Invitrogen), que fueron inducir en medio BMMY, a 30°C y 250 rpm, con metanol 0,5 % (v/v) por 120 h de tiempo total. El pH del medio no se ajustó.

A partir de la inducción, se evaluó la existencia de actividad xilanasa en la fracción extracelular para determinar si los clones escogidos producían enzimas con esta actividad, la que está codificada en la secuencia del vector pPIC9K-XS. En todos los clones recombinantes de *P. pastoris* (R1-R6) se obtuvo actividad xilanasa durante la inducción (Figura 12), lo que sugiere que en todos los casos se está secretando al medio una enzima capaz de degradar el xilano. Los valores promedios de actividad xilanasa más altos fueron 5,95, 5,73 y 5,73 U/l en la fracción extracelular de la inducción del clon R1, a 48, 72 y 96 h, respectivamente; y 4,75 U/l en el sobrenadante de la inducción a 72 h del clon R3 (Figura 12).

La producción secretada de proteínas se comprobó al comparar el patrón de proteínas obtenidas desde la fracción extracelular de las inducciones de *P. pastoris* KM71/pPIC9K-XS (R1-R6), KM71/pPIC9K como control (C1-C2) y *P. pastoris* KM71 no recombinante (sin transformar) (Figura 13). En el gel de acrilamida se distingue que hay una proteína predominante en el sobrenadante de las inducciones de clones recombinantes, mientras que en los controles no se evidenció esta banda. Además, las

bandas observadas para la inducción con un inóculo de *P. pastoris* KM71 no recombinante son distintas a las de los clones utilizados en la transformación, dando cuenta de la redirección del metabolismo hacia la producción de las proteínas recombinantes (Figura 13).

Esta proteína recombinante tiene un tamaño de 45 kDa, que es cercano al tamaño de proteínas de 38,8 kDa y 50,1 kDa, correspondientes a xilanasa y swollenina, respectivamente (Martinez y col., 2008; Sydenham y col., 2014). Esto podría deberse a que ambas proteínas migran de manera equivalente en un SDS-PAGE, por su tamaño similar (Figura S5) (Soto-Aguilar, 2016).

También podría deberse a que solo una de las proteínas se está produciendo o secretando. En caso de tratarse de xilanasa, la diferencia de tamaño de la proteína respecto al valor teórico estaría relacionado con las modificaciones post-traduccionales que se producen en *Pichia pastoris*, específicamente glicosilaciones, que al añadir cadenas de azúcares modifican propiedades como el tamaño de la proteína y su punto isoeléctrico (Macauley-Patrick y col., 2005; Guo y col., 2007). No es posible diferenciar ambas proteínas en base a su punto isoeléctrico, puesto que las predicciones sugieren que son similares.

La proteína de 45 kDa es efectivamente un producto de la inducción con metanol, ya que a distintos tiempos de inducción la intensidad de la banda varía, comenzando a tiempo 0 h de inducción sin la aparición de esta. A mayores tiempos de inducción, la mayor intensidad y grosor de la banda observada en el gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie evidencia que aumenta la cantidad de proteína recombinante en la fracción extracelular (Figura 14).

Para determinar si la banda de 45 kDa corresponde a una proteína que presenta actividad xilanasas, se realizó un zimograma con proteínas cargadas en un PAGE en

condiciones semi-desnaturantes. En esa posición relativa en el gel, se obtuvo una banda traslúcida que sugiere la existencia de actividad xilanasasa por la degradación del xilano presente en el gel de acrilamida (Figura 15B). En el control positivo (xilanasasa pura) se observó el mismo efecto, mientras que no se obtuvo este resultado al cargar la fracción extracelular del clon control C1 de *P. pastoris* (Figura 15B).

Además de la banda con un tamaño de 45 kDa, en el zimograma se observó una zona de actividad correspondiente a una proteína con migración relativa de tamaño mayor a 120 kDa (Figura 15B). No se observó una banda de este tamaño al teñir los geles de acrilamida con azul de Coomassie (Figuras 13 y 14), pero al analizar el gel con una técnica de mayor sensibilidad, como es la tinción con nitrato de plata, se observó una banda de este tamaño desde la inducción de clones recombinantes (Figura 15A). Esta banda de gran tamaño podría corresponder a la proteína de fusión proveniente del fragmento XS. En la Figura S6 se muestran los posibles resultados de la co-expresión de genes de xilanasasa y swollenina con la secuencia que codifica el péptido 2A. La secuencia carboxilo-terminal del péptido 2A (-NPGP-) al ser traducida, adquiere una conformación de hélice α que está limitada estéricamente en el centro peptidil transferasa del ribosoma, previo a la adición de la prolina. Esto impide el ataque nucleofílico del proil-tRNA sobre el enlace éster del glicil-tRNA unido al péptido 2A, en el sitio A del ribosoma (Luke, 2012). No obstante, esta secuencia de aminoácidos podría no tener un efecto de detención de la traducción, generando la proteína de fusión.

Con el fin de determinar si alguna de las proteínas observadas en los geles de acrilamida corresponde a swollenina, se realizó un western-blot contra el epítipo FLAG que se encuentra en el extremo carboxilo terminal de esta proteína. En la inmunodetección, se obtuvo a partir de las fracciones extracelulares de la inducción de

clones recombinantes de *P. pastoris* KM71/pPIC9K-XS una banda de una proteína con peso mayor a 120 kDa (Figura 16B). El peso de la swollenina con el epítipo FLAG calculado es de 50,1 kDa y el de la proteína de fusión que pudiese producirse es de 90 kDa. Al considerar las posibles glicosilaciones de las proteínas, las migraciones se ven afectadas por los azúcares añadidos pues se aumenta el peso molecular. Por lo tanto, la banda de más de 120 kDa podría ser la proteína de fusión, en la que se detectó el epítipo FLAG en el extremo carboxilo terminal. Esto explicaría la actividad xilanasa observada en el zimograma realizado, correspondiente a una proteína de ese tamaño (Figura 15B). Desde la fracción extracelular de la inducción con el clon C1 y con xilanasa pura no se visualizó reacción en el ensayo (Figura 16B), mientras que el control positivo sí evidenció un precipitado (Figura 16B).

Así, se estaría produciendo una proteína xilanasa-swollenina, con un péptido 2A entre estas y manteniendo el péptido señal nativo de la swollenina. Dado que esta proteína se encuentra en el medio de inducción, está siendo secretada, por lo que el péptido señal del factor α de *S. cerevisiae* presente en la proteína xilanasa precursora, fue reconocido y procesado. Además, los resultados descritos sugieren que el plegamiento de la proteína de fusión y su conformación tridimensional permiten la actividad de la enzima xilanasa (Figura 17B).

Estudios previos, en los que se utilizó el método de péptidos 2A para la co-expresión recombinante de proteínas en *P. pastoris*, mostraron la producción de manera independiente de las proteínas de interés (Wang y col., 2007; Roongsawang y col., 2010; Sun y col., 2012; de Amorim Araújo y col., 2015; Geier y col., 2015). Con esta metodología, estos autores lograron co-expresar dos proteínas recombinantes en *P. pastoris* dirigidos tanto al medio intracelular como a la membrana y al medio extracelular, e incluso co-expresaron cinco proteínas pertenecientes a una misma vía

metabólica. En esos estudios se obtuvieron proteínas recombinantes independientes en algunos clones, mientras que en otros se producían las proteínas independientes junto a la proteína de fusión o solo esta última (Geier y col. 2015).

Como fue revisado por Luke, 2012, el ribosoma que traduce el RNA conteniendo los codones para el péptido 2A, al llegar a los codones correspondientes a los aminoácidos glicina y prolina en el extremo carboxilo-terminal del péptido, puede terminar la traducción en ese punto, o puede continuar con la síntesis de la siguiente proteína de manera independiente o fusionada a la cadena anterior. Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con lo recogido en los reportes mencionados, pues se obtuvo una proteína de fusión en menor cantidad, mientras que se produjo solo una proteína independiente, correspondiente a la xilanasa. No obstante, es posible que la swollenina se esté produciendo de manera independiente, pero el péptido señal no esté siendo reconocido y procesado, por lo que quedaría esta proteína en la fracción intracelular de los clones de *P. pastoris* KM71/pPIC9K-XS, fracción que no fue analizada en este trabajo.

Dado que existe la posibilidad de obtener clones recombinantes de *P. pastoris* que co-expresan una o varias proteínas independientes y/o la proteína de fusión, es recomendable analizar un mayor número de colonias para aumentar la probabilidad de seleccionar clones que produzcan las proteínas recombinantes de manera individual, utilizar otro medio de inducción o modificar la concentración del inductor (metanol). Esta variabilidad podría estar relacionada con el contexto de producción de proteínas heterólogas, es decir, con las condiciones de cultivo e inducción de *P. pastoris* recombinantes, aunque estudios previos señalan que podría ser un efecto estocástico (de Felipe y col., 2006; Wang y col., 2007; Luke, 2012; Geier y col., 2015). Asimismo, la utilización de péptidos 2A con secuencia diferente podría promover el salto en la

lectura de codones por parte del ribosoma, o incluso modificando el extremo amino terminal de este péptido se puede obtener un incremento en el número de clones que sinteticen ambas proteínas por separado (de Amorim Araújo y col., 2015; Wang y col., 2015). Este sistema de co-expresión policistrónica posee ventajas respecto a la co-expresión monocistrónica en que cada gen posee un promotor asociado, puesto que en este último podría existir interferencia transcripcional, supresión entre los promotores o rearrreglos genómicos en caso de utilizar secuencias nucleotídicas idénticas (Luke, 2012).

Por otra parte, para implementar esta metodología de co-expresión, podría realizarse en primera instancia con dos o más enzimas distintas, cuya actividad sea fácilmente evaluable. También, se debe considerar sus tamaños, los que han de ser distintos para detectar las diferentes proteínas de manera sencilla.

En cuanto a la optimización en la producción recombinante de proteínas en *P. pastoris*, se puede evaluar el uso de matraces con deflectores que mejoren la distribución de oxígeno durante las etapas de crecimiento e inducción.

Al incubar las proteínas producidas en la inducción con deglicosilasas, la posible variación en el tamaño de la proteína indicaría una adición de cadenas de azúcares en esta y se obtendría el peso molecular sin estas modificaciones post-traduccionales.

Otras formas de co-expresión también deben ser evaluadas para comparar la eficiencia en producción recombinante de enzimas, como por ejemplo, utilizar el dominio dual-inteína entre dos proteínas, el que libera las proteínas aledañas mediante una ruptura autocatalítica (Zhang y col., 2015).

Mediante la co-expresión de xilanasa de *G. trabeum* y swollenina de *T. reesei* se busca evaluar el posible efecto sinérgico de estas proteínas en la degradación de hemicelulosa, principalmente en el residuo lignocelulósico de paja de trigo. En la

producción de ambas proteínas desde la misma plataforma biológica, surge la posibilidad de utilizar la fracción extracelular de las inducciones recombinantes directamente sobre estos residuos agrícolas. Esto supone una ventaja respecto al método en que se añade un cóctel enzimático con concentraciones y proporciones de enzimas definidas, puesto que al utilizar la fracción extracelular se evitan las etapas de separación y purificación de proteínas.

CONCLUSIONES

En este estudio se evaluó el uso de un sistema de co-expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*, basado en un péptido 2A, con la finalidad de obtener distintas proteínas degradadoras de lignocelulosa a partir del mismo microorganismo, cumpliendo el objetivo general planteado. La xilanasas recombinante se produjo de manera independiente y la proteína de fusión xilanasas-swollenina se produjo en menor cantidad; sin embargo, no se encontraron ambos polipéptidos independientes en el medio extracelular, por lo que el péptido FMDV2A no fue eficiente en la producción y secreción de estos en este caso. De este modo, la hipótesis planteada fue refutada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abas, N., Kalair, A. y Khan, N. 2015. Review of fossil fuels and future energy technologies. *Futures*. **69**: 31-49.
- Adlakha, N., Sawant, S., Anil, A., Lali, A. y Yazdani, S.S. 2012. Specific fusion of β -1,4-endoglucanase and β -1,4-glucosidase enhances cellulolytic activity and helps in channeling of intermediates. *Appl. Environ. Microb.* **78**: 7447-7454.
- Andberg, M., Penttilä, M. y Saloheimo, M. 2015. Swollenin from *Trichoderma reesei* exhibits hydrolytic activity against cellulosic substrates with features of both endoglucanases and cellobiohydrolases. *Bioresour. Technol.* **181**: 105-113.
- Antizar-Ladislao, B. y Turrion-Gomez, J.L. 2008. Second-generation biofuels and local bioenergy systems. *Biofuels Bioprod. Bioref.* **2**: 455-469.
- Braun, H. y Suske, G. 1999. Screening procedure for *Pichia pastoris* clones containing multiple copy gene inserts. *Biotechniques*. **26**: 1042-1044.
- Bryksin, A.V. y Matsumara, I. 2010. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*. **48**: 463-465.
- Byrne, B. 2015. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **32**: 9-17.
- Capellán-Pérez, I., Mediavilla, M., de Castro, C., Carpintero, O. y Miguel L.J. 2015. More growth? An unfeasible option to overcome critical energy constraints and climate change. *Sustain. Sci.* **10**: 397-411.
- Charoenrat, T., Khumruaengsri, N., Promdonkoy, P., Rattanaphan, N., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S. y Roongsawang, N. 2013. Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis. *J. Biosci. Bioeng.* **116**: 193-198.
- Cheng, C.L., Lo, Y.C., Lee, K.S., Lee, D.J., Lin, C.Y. y Chang, J.S. 2011. Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technol.* **102**: 8514-8523.
- Contreras, G., Barahona, S., Rojas, M.C., Baeza, M., Cifuentes, V. y Alcaíno, J. 2013. Increase in the astaxanthin synthase gene (*crtS*) dose by *in vivo* DNA fragment assembly in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Biotechnol.* **13**: 84.
- Coulman, B., Dalai, A., Heaton, E., Perez Lee, C., Lefsrud, M., Levin, D., Lemaux, P.G., Neale, D., Shoemaker, S.P., Singh, J., Smith, D.L. y Whalen, J.K. 2013. Developments in crops and management systems to improve lignocellulosic feedstock production. *Biofuels Bioprod. Bioref.* **7**: 582-601.
- Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P. y Stillman, C.A. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1316-1323.
- Dale, B.E. y Ong, R.G. 2014. Design, implementation, and evaluation of sustainable bioenergy production systems. *Biofuels Bioprod. Bioref.* **8**: 487-503.
- Daly, R. y Hearn, M.T.W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* **18**: 119-138.
- Dashtban, M., Schraft, H. y Qin, W. 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* **5**: 578-595.
- Davis, G. y Henrissat, B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. **3**: 853-859.

- de Amorim Araújo, J., Ferreira, T.C., Rubini, M.R., Duran, A.G., De Marco, J.L., de Moraes, L.M. y Torres, F.A. 2015. Coexpression of cellulases in *Pichia pastoris* as a self-processing protein fusion. *AMB Express*. **5**: 84.
- de Felipe, P., Hughes, L.E., Ryan, M.D. y Brown, J.D. 2003. Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J. Biol. Chem.* **278**: 11441-11448.
- de Felipe, P., Luke, G.A., Hughes, L.E., Gani, D., Halpin, C. y Ryan, M.D. 2006. *E unum pluribus*: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol.* **24**: 68-75.
- Gao, D., Uppugundla, N., Chundawat, S.P.S., Yu, X., Hermanson, S., Gowda, K., Brumm, P., Mead, D., Balan, V. y Dale, B.E. 2011. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnol. Biofuels*. **4**: 5.
- Geier, M., Fauland, P., Vogl, T. y Glieder, A. 2015. Compact multi-enzyme pathways in *P. pastoris*. *Chem. Commun.* **51**: 1643-1646.
- Gibson, D.G. 2009. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **37**: 6984-6990.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S. y Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technol.* **101**: 4775-4800.
- Guo, M., Hang, H., Zhu, T., Zhuang, Y., Chu, J. y Zhang, S. 2008. Effect of glycosylation on biochemical characterization of recombinant phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Tech.* **42**: 340-345.
- Heckman, K.L. y Pease, L.R. 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat. Protoc.* **2**: 924-932.
- Hughes, L. y Rudolph, J. 2011. Future world oil production: growth, plateau, or peak? *Curr. Opin. Environ. Sustain.* **3**: 225-234.
- Jönsson, L.J., Alriksson, B. y Nilvebrant, N.O. 2013. Bioconversion of lignocelluloses: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels*. **6**: 16.
- Kim, H.M., Jung, S., Lee, K.H., Song, Y. y Bae, H.J. 2015. Improving lignocelluloses degradation using xylanase-cellulase fusion protein with a glycine-serine linker. *Int. J. Biol. Macromol.* **73**: 215-221.
- Kawai, R., Yoshida, M., Tani, T., Igarashi, K., Ohira, T., Nagasawa, H. y Samejima, M. 2003. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* β -glucosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 1-7.
- Kim, J.H., Lee, S.R., Li, L.H., Park, H.J., Park, J.H., Lee, K.Y., Kim, M.K., Shin, B.A. y Choi, S.Y. 2011. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS ONE*. **6**: e18556.
- Kralova, I. y Sjöblom, J. 2010. Biofuels-Renewable energy sources: A review. *J. Disper. Sci. Technol.* **31**: 409-425.
- Krainer, F.W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O. y Glieder, A. 2012. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microb. Cell Fact.* **11**: 22.
- Kumar, R. y Wyman, C.E. 2009. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol. Prog.* **25**: 302-314.
- Lam, M.K. y Lee, K.T. 2012. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnol. Adv.* **30**: 673-690.

- Li, X., He, X., Li, Z. y Wang, F. 2013. Combined strategies for improving the production of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Bioresources*. **8**: 2867-2880.
- Liu, X., Ma, Y. y Zhang, M. 2015. Research advances in expansins and expansin-like proteins involved in lignocellulose degradation. *Biotechnol. Lett.* **37**: 1541-1551.
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D. y Kovar, K. 2015. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol. Adv.* **33**: 1177-1193.
- Lü, J., Sheahan, C. y Fu, P. 2011. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. *Energy. Environ. Sci.* **4**: 2451-2466.
- Luke, G.A. 2012. Translating 2A research into practice. *En E.C. Agbo (ed.)*, Innovations in Biotechnology. pp 161-186. InTech, Rijeka.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B. y Harvey, L.M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. **22**: 249-270.
- Martinez, D., Berka, R.M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S.E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P.M., Cullen, D., Danchin, E.G.J., Grigoriev, I.V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C.P., Han, C.S., Ho, I., Larrondo, L.F., de Leon, A.L., Magnuson, J.K., Merino, S., Misra, M., Putnam, B., Robbertse, B., Salamov, A.A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C.L., Yao, J., Barabote, R., Nelson, M.A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C.R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D.S., Lucas, S.M., Rubin, E.M., Dunn-Coleman, N., Ward, M. y Brettin, T.S. 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol.* **26**: 553-560.
- Mellitzer, A., Weis, R., Glieder, A. y Flicker, K. 2012. Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* **11**: 61.
- Mohanram, S., Amat, D., Choudhary, J., Arora, A. y Nain, L. 2013. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocelluloses hydrolysis in biorefineries. *Sustain. Chem. Process.* **1**: 15.
- Moraís, S., Barak, Y., Lamed, R., Wilson, D.B., Xu, Q., Himmel, M.E. y Bayer, E.A. 2012. Paradigmatic status of an endo- and exoglucanase and its effect on crystalline cellulose degradation. *Biotechnol. Biofuels*. **5**: 78.
- Motta, F.L., Andrade, C.C.P. y Santana, M.H.A. 2013. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: Classification, characterization and applications. *En A.K. Chandel y S.S. da Silva (eds.)*, Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization. pp 251-275. InTech, Rijeka.
- Murphy, D.J. y Hall, C.A.S. 2011. Adjusting the economy to the new energy realities of the second half of the age of oil. *Ecol. Model.* **223**: 67-71.
- Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K. y Dalai, A.K. 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14**: 578-597.
- Nakatani, Y., Yamada, R., Ogino, C. y Kondo, A. 2013. Synergetic effect of yeast cell-surface expression of cellulase and expansin-like protein on direct ethanol production from cellulose. *Microb. Cell Fact.* **12**: 66.
- Palanna, O.G. 2009. Energy. *En T. Jajoriya (ed.)*, Engineering Chemistry. pp 1-40. Tata McGraw Hill, New Delhi.
- Panwar, N.L., Kaushik, S.C. y Kothari, S. 2011. Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **15**: 1513-1524.

- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G. y Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods.* **8**:785-786.
- Rabert, C., Weinacker, D., Pessoa Jr, A. y Fariás, J.G. 2013. Recombinant proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Braz. J. Microbiol.* **44**: 351-356.
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick Jr., W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R. y Tschaplinski, T. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science.* **311**: 484-489.
- Renaud-Gabardos, E., Hantelys, F., Morfoisse, F., Chaufour, X., Garmy-Susini, B. y Prats, A.C. 2015. Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy. *World J. Exp. Med.* **5**: 11-20.
- Roongsawang, N., Promdonkoy, P., Wongwanichpokhin, M., Sornlake, W., Puseenam, A., Eurwilaichitr, L. y Tanapongpipat, S. 2010. Coexpression of fungal phytase and xylanase utilizing the *cis*-acting hydrolase element in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* **10**: 909-916.
- Salinas, A., Vega, M., Lienqueo, M.E., García, A., Carmona, R. y Salazar, O. 2011. Cloning of novel cellulases from cellulolytic fungi: Heterologous expression of a family 5 glycoside hydrolase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Tech.* **49**: 485-491.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Haloka, S., Pere, J., Swanson, B., Nyssönen, E., Bhatia, A., Ward, M. y Penttilä, M. 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.* **269**: 4202-4211.
- Schlör, H., Fischer, W. y Hake J-F. 2015. The system boundaries of sustainability. *J. Clean. Prod.* **88**: 52-60.
- Scorer, C.A., Clare, J.J., McCombie, W.R., Romanos, M.A. y Sreekrishna, K. 1994. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology (N Y).* **12**: 181-184.
- Sharma, P., Yan, F., Doronina, V.A., Escuin-Ordinas, H., Ryan, M.D. y Brown, J.D. 2011. 2A peptides provide distinct solutions to driving stop-carry on translational recoding. *Nucleic Acids Res.* **40**: 3143-3151.
- Soto-Aguilar, J. 2016. Evaluación del efecto de la mezcla de proteínas con actividad tipo expansina y xilanasa sobre la acción hidrolítica de celulasas en residuos lignocelulósicos. Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Sukharnikov, L.O., Cantwell, B.J., Podar, M. y Zhulin, I.B. 2011. Cellulases: ambiguous nonhomologous enzymes in a genomic perspective. *Trends Biotechnol.* **29**: 473-479.
- Sun, Y.F., Lin, Y., Zhang, J.H., Zheng, S.P., Ye, Y.R., Liang, X.X. y Han, S.Y. 2012. Double *Candida antarctica* lipase B co-display on *Pichia pastoris* cell surface based on a self-processing foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**: 1539-1550.
- Sweeney, M.D. y Xu, F. 2012. Biomass converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: Recent developments. *Catalysts.* **2**: 244-263.
- Sydenham, R., Zheng, Y., Riemens, A., Tsang, A., Powlowski, J. y Storms, R. 2014. Cloning and enzymatic characterization of four thermostable fungal endo-1,4- β -xylanases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 3613-3628.

- Talebniya, F., Karakashev, D. y Angelidaki, I. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technol.* **101**: 4744-4753.
- Tester, J.W., Drake, E.M., Driscoll, M.J., Golay, M.W. y Peters, W.A. 2012. Fossil fuels and fossil energy. *En P. Woolley y M. Abatte (eds.), Sustainable Energy: Choosing Among Options.* pp 373-446. MIT Press, Cambridge.
- Tiwari, P., Misra, B.N. y Sangwan, N.S. 2013. β -glucosidases from the fungus *Trichoderma*: an efficient cellulase machinery in biotechnological applications. *BioMed Res. Int.* **2013**: 203735.
- Twidell, J. y Weir, T. 2015 Principles of renewable energy. *En Renewable Energy Resources.* pp 1-36. Routledge, London.
- Van Dyk, J.S. y Pletschke, B.I. 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* **30**: 1458-1480.
- Várnai, A., Tang, C., Bengtsson, O., Atterton, A., Mathiesen, G. y Eijsink, V.G.H. 2014. Expression of endoglucanases in *Pichia pastoris* under control of the GAP promoter. *Microb. Cell Fact.* **13**: 57.
- Wang, S., Yao, Q., Tao, J., Qiao, Y. y Zhang, Z. 2007. Co-ordinate expression of glycine betaine synthesis genes linked by the FMDV 2A region in a single open reading frame in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**: 891-899.
- Wang, Y., Wang, F., Wang, R., Zhao, P. y Xia, Q. 2015. 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*. *Sci. Rep.* **5**: 16273.
- Warren, R.A.J., Gerhard, B., Gilkes, N.R., Owolabi, J.B., Kilburn, D.G. y Miller Jr., R.C. 1987. A bifunctional exoglucanase-endoglucanase fusion protein. *Gene.* **61**: 421-427.
- Wyman, C.E. 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. *Bioresource Technol.* **50**: 3-16.
- Yoshida, M., Ohira, T., Igarashi, K., Nagasawa, H., Aida, K., Hallberg, B.M., Divne, C., Nishino, T. y Samejima, M. 2001. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 2050-2057.
- Zhang, B., Rapolu, M., Liang, Z., Han, Z., Williams, P.G. y Su, W.W. 2015. A dual-intein autoprocessing domain that directs synchronized protein co-expression in both prokaryotes and eukaryotes. *Sci. Rep.* **5**: 8541.
- Zhao, X., Zhang, L. y Liu, D. 2012. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioprod. Bioref.* **6**: 465-482.
- Zhou, H., Chen, Z., Chen, H., Li, S., Huang, B. y Bi, R. 2007. Co-expression and purification of recombinant human insulin-like growth factor II and insulin-like growth factor binding protein-6 in *Pichia pastoris* yeast. *Protein Peptide Lett.* **14**: 876-880.
- Zou, G., Shi, S., Jiang, Y., van den Brink, G., de Vries, R.P., Chen, L., Zhang, J., Ma, L., Wang, C. y Zhou, Z. 2012. Construction of a cellulose hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by a promoter and enzyme engineering. *Microb. Cell Fact.* **11**: 21.
- Zuo, P. y Rabie, A.B.M. 2010. One-step DNA fragment assembly and circularization for gene cloning. *Curr. Issues Mol. Biol.* **12**: 11-16.

ANEXO

Secuencias nucleotídicas y aminoácidas

A

Secuencia nucleotídica *xy11* de *G. trabeum*

ATGATTCTAAGACCTTACCCTTCTCCTTGCCTTGTGCCCTTGTGCAATGCGCACCTCCTACTCCGCGCCTCTTGGCCTTGCCGACTGGTACATCTACCGTCGCCCTCAATACTGCGGGGAAGGCGGCAGGGAACTGTACATGGGACTGCCACCGACAACGGGGAGCTTACTGACACCGCTTACACCACTATCCTGGACAACAATGCAAACTTTGGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCATGAAATGGGAAAATACAGAGCCGGAGCAGGGAACATGGACCTGGACGAACGCTGACCAGATCGCCAACCTCGCGAAGACCAATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCACAACCTGTGTCTGGTACAACCAAGCTCCCAGCTGGGTGACCTCCGGGTCTTGGACCAATGCCACACTTACTGCAGTAGTTCAGGACCATACTACGGAATTGGTTAGCCGCTATAAGGGACAAGTTTATGCCCTGGGATGTAATCAATGAGCCCTTCAATGACGACGGTACTTACCCTCGGATGTCTTCTACAACCACTCGGCCAGCATACTCCCATCGCCCTGCGCGAGCCAGAGCCGCGACCTAATGCCAAGCTCTACATCAACGAGTACAACATGAGTACACGGGTCCAAAGGCGACAGCTATGCTGACCTCGTGAGAGTCTTAAGGCGAGGGCGTTCCCATCGACGGCGTGGTCTGCAGTCCCCTCATCGTCCGCGAAGTCCCCACCTGGCCTTCAGTCCATCATGGAGCAGTTCACCGCGCTCGGCCGTCGAGGTCCGCATCACCGAGTTGGACATCCGCATGACCCCTCCCGAACTGCTGCCCTCTGGAGCAGAGACCGGATTACGACACTGTCATCTCTGCATGCAGGGCGCTCTCCGGCTGCGTTGGCGTCAACCGTGTGGGACTTCACTGACAACTACTTTGGGTACCGACACCTTCTCCGGTCAAGGTCCGCGACACCTTACGACTCGAACTTGTGAAGAAGCTCCTACGACGGAATTGTTGCTGGCTGGCAGTAA

Secuencia aminoácídica *Xyl1* de *G. trabeum*

MISKTFVLLALLPLVQCAPPTPAASSALPTGTSTVALNTAAKAAGKLYMGTATDNGELDTAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEP
EQGTWWTNADQIANLAKTNGQLLRHNCVWYNQLPSWVTSGSWVNTALTAVVQDHTTELVSRYKGVYAWDWINEPNDGTYRS
DVFYNTIGPAYIPIALRAARAADPNAKLYINEYNIETGSKATAMLNLVESLKAEGVPIDGVGLQSHFVIGVEPTSLSQIMEQFTALGVEVAL
TELDIRMTLPETAALLEQKTDYDVISACRAVSGCVGVTVWDFTDKYSWVPSVTSFGGGAATPYDSNLVKKPAYDGVIGVWQ

B

Secuencia nucleotídica *swo1* de *T. reesei*

ATGGCTGGTAAGCTTATCCTCGTGGCTCTAGCAAGCCTTGTATCACTCTCTATTACGAGAATTGCGCAGCATATTATGGCCAAT
GTGGAGGCATAGGGTGGTCCGGCACCAATGTTGCGTGTGGCGCCAGTGCAGTTTTGTCAATGACTGGTACTCCCAGTGCC
TTGCGTCAACCGCGGAAACCCCAAACGGAAACACTTCTCTAGCTTGGTTTACCGGACGTCGTGAGCATCCTCATCCGTCG
GCTCGTCTTACCCGGCGGCAACTCACCAACTGGCAGTCTCCACTACACAACCACAGATACAGCTACCGTGGCTCCTCAAT
CGCAGTCTCCTTACCCAGCATTGCCGCATCCAGTTGCGGATCGTGGACCTCGTGGATAATGTTGCTGCCCATCATATTGTGC
TAATGATGACACATCCGAGTCATGCTCAGGCTCGGTTACCTGCACTACGCGCCCTCGGCGGACTGCAAAATCCGGAAACATGTA
TCCAGAGTCCATCACGTATCCAGCAACGAGAGCTGGCACTACAGTATAGTCAACCCACTTTGGCCTAACGAGCGCGGGCCCT
GTGGCTTTGGCCTGTACGGTCTCTGCACAAGGGCAGTGTACAGCCAGCTGGACGGATCCCATGCTTGGCGGACGTGTGAC
GCTTTTTGTACAGCGTATCCCTGCTTTGCAAAAGACCCTACCGGCACTACCCTTCTGGCAACTTCGCAGCTCCAACGCGGATT
ACTACACCAATTCTGGTCTCGTTGCCAGGAGCCCTCGATAACTACCTGTCTGCGGCGAGTGCATTGAGCTGATACAACAAA
GCCGATGGGACCGATTATGCTGTGCGGAGAAGCCGGCTACACGGATCCAATTAATCTCGAGATTGGGACAGCTGCCCGTGCA
GCGCGAACTCCAAGTGGTGTGTTGCGGCGCCGATCATTGCGGAGAGATCGACTTCAAATACGGCTGTCTCTTCTGCTG
ACAGCATTACATCGACCTGTGACGACATTGCCATGGGCGGTTGCGAGGGCAATGGATCACTAACCAATGGGTCATCCGACTC
GATATAGAAAGAGTCCAATGCCCAAAGTTGGGAACGCCTACATTTGGCTTCAAAATGGCGGAGGGCCTTACTATTTGCTCTCAC
GGCAGTCAACACCAACGGACCGGGCTCAGTACCAAATCGAGATCAAGGGCCGACACACCGAACAATGGGTTGCCCTGGTCC
ATGACCCAAACTATACGAGTACCGCCCAAGAAGCCTATGGCAGTTGGGTAATCCACAGGGATCAGGGCCCTTAACTTGG
CTGTTGGAATTCGCTGACTAGCCCAACGGGGGAACAGATTGTAATGAACAGGCCATCAAGACATTAATCCTCCGGCCACAG
GTGACCCCAATTTTACTACATTGACATTGGTGTGCAATTTAGCCAGAATTGA

Secuencia aminoácídica *Swo1* de *T. reesei*

MAGKLLIVALASVLSIQNCAALFGQCGGIGWSGTTCCVAGAQCFSVNDWYSQCLASTGGNPNPNTSSSLVSRSSSSVSS
SPGGNSPTGSASTYTTTDTATVAPHSQSPYPSIASSCGSWLVDNVCCPSYCANDDTSESCGCTCTPPSADCKSGTMYPEVHH
VSSNESWHYSRSTHFGLTSGGACGFLYGLCTKGSVTSASWTDPLMGATCDAFCTAYPLLCCKDPTGTLRGNFAAPNGDYTFWSS
LPGALDNYLSCGECIELIQTKPDGTDYAVGEAGYDPILEIVDSCPCPSANSKWCCGPGADHCGEIDPKYGCPLPADSIHLDLSDIAMGR
LQGGSLTNGVIPTRYRRVQPKVGNAYWLRNNGGGPYFALTAVNNTGPGSVTKIEKGADTDNWWALVHDPNNTSSRPQERYGSS
VIPQSGSPFNLPVGIRLTSPTGEQIVNEQAIFTPPATGDPNFYIDIGVQFSQN

Figura S1. Secuencias nucleotídicas y aminoácidas utilizadas. (Descripción en página siguiente)

C**Secuencia nucleotídica FMDV2A (Geier y col., 2015)**

CAATTGCTTAACTTCGACTTATTGAAGCTTGCTGGTGACGTTGAGTCTAACCCAGGTCCA

Secuencia aminoacídica FMDV2A (Geier y col., 2015)

QLLNFDLLKLAGDVESNPGP

D**Secuencia nucleotídica FLAG**

GATTACAAGGATGACGACGATAAG

Secuencia aminoacídica FLAG

DYKDDDDK

Figura S1. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas utilizadas. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de (A) xilanasasa, (B) swollenina, (C) péptido FMDV2A y (D) FLAG fueron obtenidos con anterioridad en los laboratorios del CeBiB (Soto-Aguilar, 2016) o fueron extraídos desde las referencias indicadas. Secuencias de péptido señal se marcaron con bordes y el codón de término de la traducción está subrayado.

Detalles de secuenciación**Tabla S1. Partidores utilizados en la secuenciación de pGEMT-XS.**

	Parámetro	Detalle
Partidores universales	M13/pUC Forward	5' - GTTTCCAGTCACGAC - 3'
	M13/pUC Reverse	5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3'
Partidores internos	2A Forward	5' - TACCGCAGCCTGAGCATGAC - 3'
	2A Reverse	5' - GCCCAGCATACATTCCCATCG - 3'

Tabla S2. Partidores utilizados en la secuenciación de pPIC9K-XS.

	Parámetro	Detalle
Partidores universales	AOX1 Forward	5' - GACTGGTTCCAATTGACAAGC - 3'
	AOX1 Reverse	5' - GCAAATGGCATTCTGACATCC - 3'
Partidores internos	2A Forward	5' - GCCCAGCATACATTCCCATCG - 3'
	2A Reverse	5' - TACCGCAGCCTGAGCATGAC - 3'

Resultados de secuenciación



Figura S2. Secuenciación de pGEMT-XS. Secuencia nucleotídica obtenida para el fragmento XS ligado en el vector de clonación. La secuencia aminoacídica se obtuvo por traducción *in silico*.

Secuencia nucleotídica (5' → 3')

ATCAGATTTCTTCAATTTTTACTGCGATTTTTATTCGCGAGCATCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGA
 TGAACGGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTT
 CCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAG
 AAAAGAGAGGGCTGAAGCTTACGTAGAATTCCTTAGGGCACCTCCTACTCCCGCCGCCTCTCGGGTTTGGCCGACTGGTACA
 TCTACCGTCGCGCTCAATACTGCGGCGAAGGCGGCGAGGAAACTGTACATGGGTACTGCCACCGACAACGGGGAGCTTAC
 TGACACCGCTTACACCACTATCCTGGACAACATGCAAACTTTGGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCATGAAATGGGAAAAAT
 ACAGAGCCGGAGCAGGGAACATGGACCTGGACGAACCGTGACCAGATCGCCAACCTCGCGAAGACCAATGGCCAGTCTCT
 GAGAGGCCACAACCTGTGCTGGTACAACCAGCTCCCCAGCTGGGTGACCTCCGGGTCTTGGACCAATGCCACACTTACTGC
 AGTAGTTCAGGACCATACTACGGAATTTGGTTAGCCGCTATAAGGGACAAGTTTATGCCTGGGATGTAATCAATGAGCCCTTC
 AATGACGACGGTACTTACCGCTCGGATGCTTCTACAACCACTCCGCGCCAGCATACATTCCTCCCTCGCCGCGAGCC
 AGAGCCCGGACCTAATGCCAAGCTCTACATCAACGAGTACAACATTGAGTACACGGGTTCCAAAGGCGACAGCTATGCTG
 AACCTCGTGGAGAGTCTTAAGGCAGAGGGCGTTCCATCGACGGCGTTGGTCTGCACTCCACTTTCATCGTCCGCGAAGT
 CCCCACCTCGCTTCACTCATATGGAGCAGTTACCCGCGCTCGGCGTCCGAGGTCGCCATCACCGAGTTGGACATCCGCA
 TGACCTCCCGGAAACTGCTGCCCTCCTGGAGCAGCAGAAGACCGATTACGACACTGTCACTCTGTCATGCAAGGGCCGCT
 CCGGCTGCGTTGGCGTACCGGTGTGGGACTTCACTGACAAGTACTTTGGGTACCGAGCACCTTCTCCGGTCCAGGGTCC
 GCGACACCTTACGACTCGAACCTTGTGAAGAAGCCTGCCTACGACGGAATTGTTGCTGGCTGGCAGCAATTGCTTAACTTC
 GACTTATTGAAGCTTGGTGGTGGAGCTTGAAGCTTAAACCCAGGTTCAATGCTGGTAAGCTTATCCTCGTGGCTCTAGCAAGC
 CTGTATCACTCTCTATTACAGCAGAATTCGCGAGCATTATTTGGCCAAATGTTGGAGGCATAGGGTGGTCCGGCACCATGTT
 GCGTTGCTGGCGCCAGTGCAGTTTTGTCAATGACTGGTACTCCCTAGTGCCTTTCGCTCAACCGGCGGAAACCCCAAAACG
 GAACAACCTCTCTAGCTTGGTTTACGGACGTCGTCAGCATCTCATCCGTCGGCTCGTCTTACCCGGCGGCAACTCAC
 CAACTGGCAGTCTTCCACCTACACAACCAACAGATACAGCTACCGTGGCTCCTCATTCCGAGTCTCCTTACCCCAAGCATTGC
 CGCATCCAGTTGGCGATCGTGGACCCCTCGTGGATAATGTTTGGTCCCATCATATTGTGCTAATGATGACACATCCGAGTCA
 TGCTCAGGCTGCGGTACCTGCACTACGCCGCCCTCGGCGGACTGCAAAATCCGGAACCATGTATCCAGAGGTCCATCAGT
 ATCCAGCAACGAGAGCTGGCACTACAGTAGACTCAACCCACTTTGGCCCTAACGAGCGGGCGGCTGTGGCTTTGGCTGT
 ACGGTCTCTGCACAAAGGGCAGTGTACAGCCAGCTGGACGGATCCCATGCTTGGCGGACGCTGTGACGCTTTTTGTACAG
 CGTATCCCTGCTTTGCAAAGACCCTACCGGCCTACCCTTCTGGCAACTTCCGAGCTTCAAACGGCGATTACTACACCC
 AATTCTGGTCCCTCGTGGCAGGAGCCCTCGATAAATACCTGTCCCTGCGGCGAGTGCATTGAGCTGATACAACAACAAGCCCG
 ATGGGACCGATTATGCTGTGGAGAAGCCGGCTACACGGATCCAATTACTCTCGAGATTGTGGACAGCTGCCCGTGCAGCG
 CGAACTCCAAGTGGTGTGTTGGTCCGGGCGCCGATCATTGCGGAGAGATCGACTTCAAATACGGCTGTCTCTTCTGCTG
 ACAGCATTCACTCGACCTGTGACACATTGCCATGGCCGCTTTGCGAGGCAATGGATCACTAACCAATGGCGTCAATCCGA
 CTCGATATAGAAGAGTCCAATGCCCAAAAGTTGGGAACGCTACATTTGGCTTCCGAAATGGCGGAGGGCCTTACTATTTTGC
 TCTCACGGCAGTCAACACCAACCGGACCGGGCTCAGTCAACCAAAATCGAGATCAAGGGCGCAGACACCCGAACTGGGTTG
 CCTTGGTCCATGACCAAACTATACGAGTAGCCGCCACAAGAACGCTATGGCAGTTGGGTAATCCCAAGGGATCAGGGC
 CCTTTAACTTGGCTTTGGAAATTCGTCTGACTAGCCCAACCGGGGGAACAGATTGTGAATGAACAGGCCATCAAGACATTCAC
 TCCTCCGGCCACAGGTGACCCCAATTTTACTACATTGACATTGGTGTGACGTTAGCCAGAATGATTACAAGGATGACGAC
 GATAAGTGAACGGCCG

Secuencia aminoacídica (N-terminal → C-terminal)

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSLEDFDVAFLPFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEVSLEKREAEA
 YVEFPRAPPTPAASSALPTGTSTVALNTAAKAAGKLYMGATDNGELTDTAYTILDNANFQGIPANAMKWENTEPEQGTWT
 WTNADQIANLAKTNGQLLRGHNCWYNQLPSWVTSWGNATLTAUVQDHTTELVSRYKGVYAWDVINEPFNDGTYRSDVF
 YNTIGPAYIPIALRAARAADPNAKLYINEYNIETGSKATAMNLVLSLKAEGVPIDGVGLQSHFIVGEVPTSLQSIMEQFTALGVEVA
 ITELDIRMTLPETAALLEQKQTDYDVTISACRAVSGCVGVTVWDFTDKYSWVPTFSGQGAATPYDSNLVKKPAYDGVAGWQQL
 LNFDLLKLAGDYESNPGFMAGKLLVALASLVLSIQQNCAALFGQCQGGIGWSGTTCCVAGAQCFSVNDWYSQCLASTGGNPPN
 GTTSSSLVSRSSASSVGSPPGNSPTGSASTYTTTDTATVAPHSQSPYPSIAASSCGSWLVDNVCCPSYCANDDTSESCS
 GCGTCTTTPPSADCKSGTMYPEVHHVSSNESWHYSRSTHFLTSGGACGFLYGLCTKGSVTSASWTDPMGLATDAFCTAYPLL
 CKDPTGTLRGNFAAPNGDYTTQFWSLPGALDNYLSCGECIELIQKPDGTDYAVGEAGYTDPTILEIVDSCPCSANSKWCCGP
 GADHCGEIDFKYGCPLPADSIHLDSLDIAMGRLLQNGSLTNGVIPTRYRRVQCPKVGNAIWLNRNGGPPYFALTAVNTNGPGSV
 TKIEIKGADTDNWWALVHDPNYTSSRPQERYGSWVWIPQSGSPFNLPVGIKRLTSPTEQIVNEQAIKTFPPATGDPNFYIDIGVQF
 SQNDYKDDDDK*

Leyenda:

	Codón inicio de traducción		Secuencia del sitio de múltiple clonamiento
	Péptido señal factor α (<i>S. cerevisiae</i>)		FLAG
	Xilanasas (<i>G. trabeum</i>)		Codón STOP
	Péptido 2A (FMDV2A)		Sitios de restricción
	Swollenina (<i>T. reesei</i>)		

Figura S3. Secuenciación de pPIC9K-XS. Secuencia nucleotídica obtenida para el fragmento XS ligado en el vector de expresión. La secuencia aminoacídica se obtuvo por traducción *in silico*.

Curva de calibración para determinar actividad enzimática

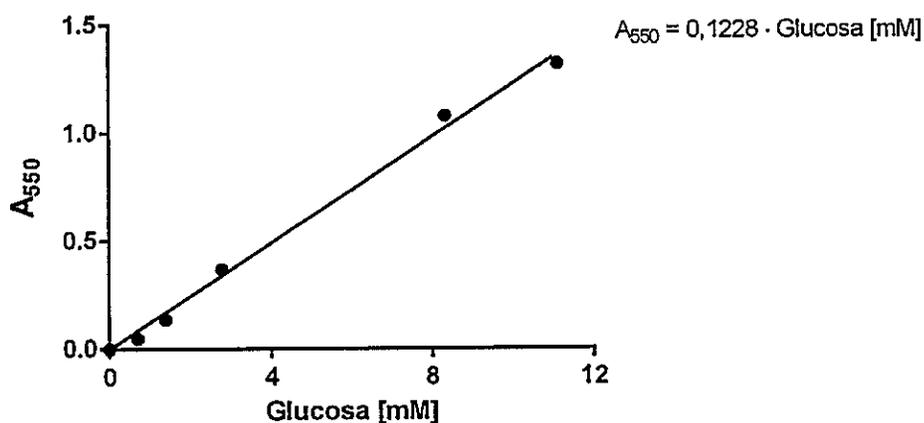


Figura S4. Curva de calibración de concentración de glucosa en ensayo de azúcares reductores con DNS. La absorbancia a 550 nm del producto de reacción de DNS con los azúcares reductores liberados se muestra en un rango lineal. La concentración de azúcares reductores equivalentes se obtiene al interpolar los valores de absorbancia en la curva. Gentilmente cedido por la Dra. Oriana Salazar, CeBiB.

SDS-PAGE de proteínas GtXyl1 y TrSwo1 recombinantes puras

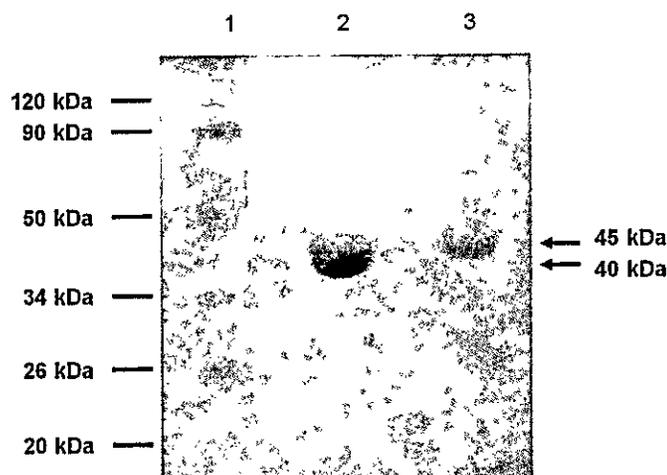


Figura S5. Análisis electroforético de proteínas recombinantes GtXyl1 y TrSwo1 purificadas, obtenidas en *P. pastoris*. SDS-PAGE realizado cargando 3 μg de proteína total pura, a partir de la inducción de proteínas recombinantes xilanasa y swollenina, en clones distintos de *Pichia pastoris*. El gel se tiñó con solución de azul de Coomassie. Carriles: 1, estándar de peso molecular; 2, xilanasa purificada (GtXyl1); 3, swollenina purificada (TrSwo1). Modificado de Soto-Agullar, 2016.

Co-expresión recombinante mediada por el péptido FMDV2A

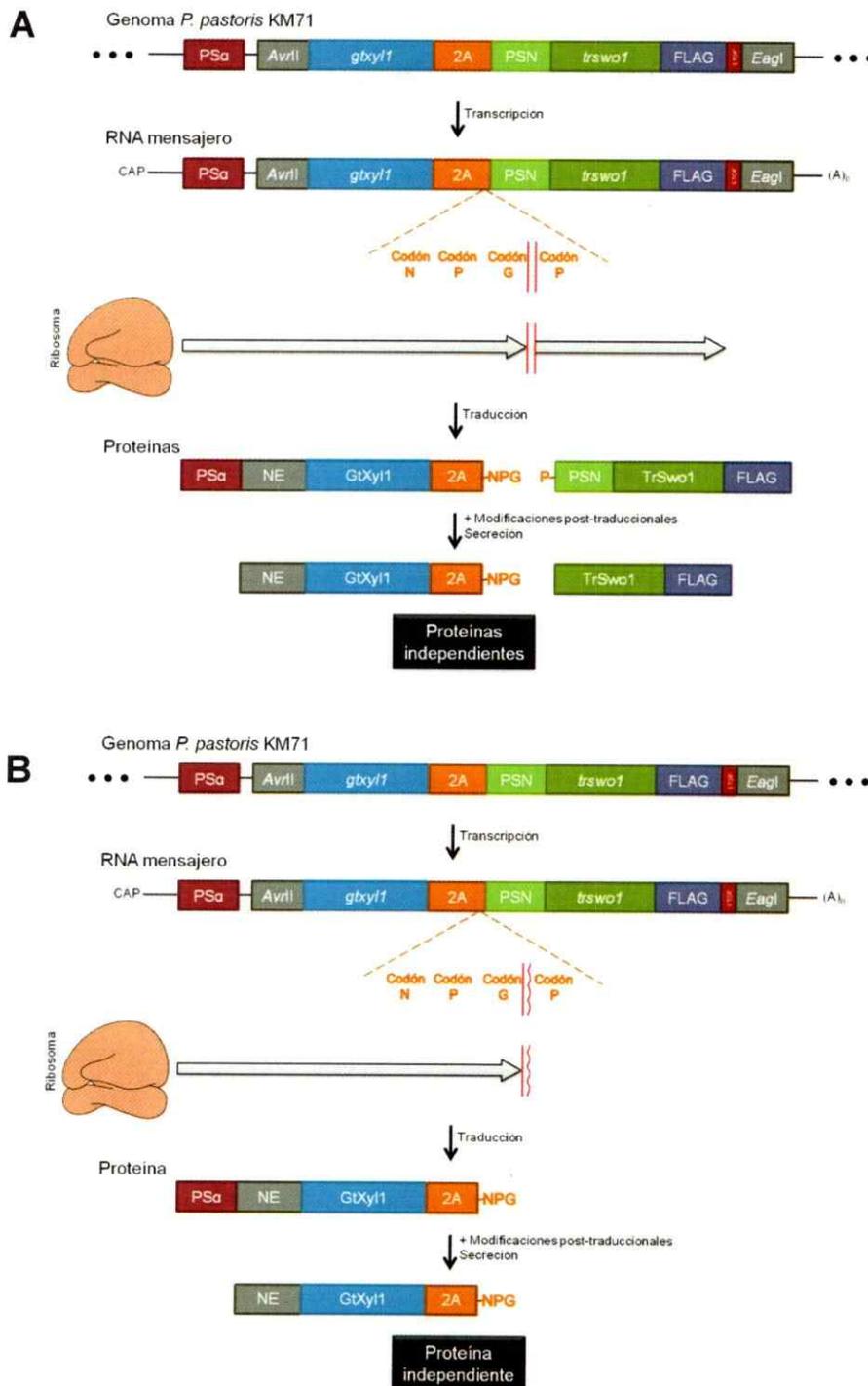


Figura S6. Esquema de la co-expresión recombinante en *P. pastoris* con el péptido FMDV2A. (Descripción en página siguiente).

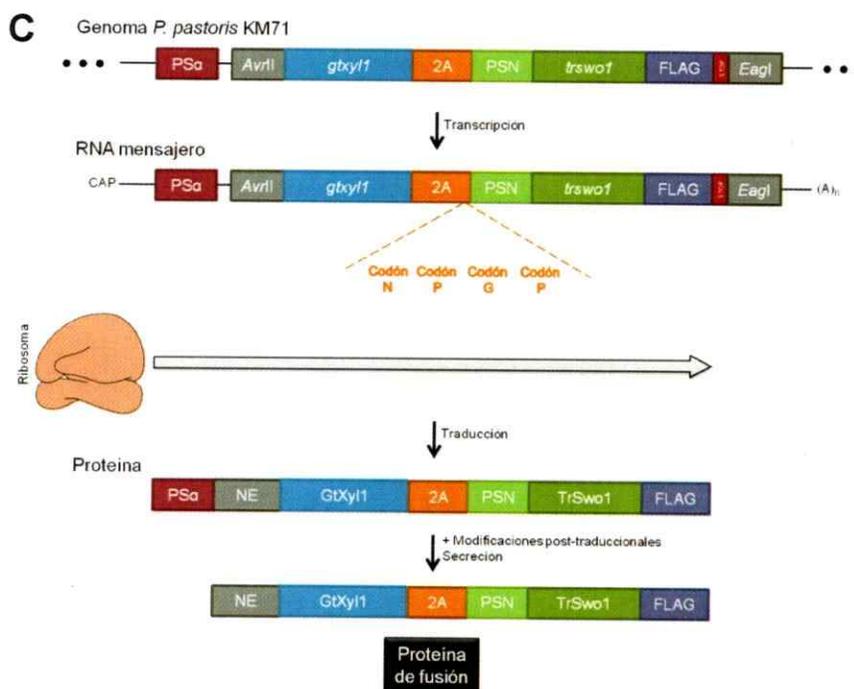


Figura S6. Esquema de la co-expresión recombinante en *P. pastoris* con el péptido FMDV2A. A partir de la inserción genómica del vector pPIC9K-XS, se genera un único RNA mensajero policistrónico. **(A)** Este RNA mensajero posee los codones de asparagina (N), prolina (P), glicina (G) y prolina (P), secuencia que al ser reconocida por un ribosoma provoca que se libere la cadena polipeptídica luego de la glicina y comienza la traducción de la siguiente proteína con una prolina inicial. **(B)** El ribosoma, luego de liberar la primera proteína puede abortar el proceso y liberar al RNA mensajero no traducido. **(C)** El ribosoma, por otra parte, puede continuar la traducción del RNA mensajero sin realizar una detención entre la glicina y la prolina generando una proteína de fusión. Nomenclatura: *gtxy1*/*GtXyl1*, xilanasas; *trsw1*/*TrSwo1*, swollenina; PSN, péptido señal nativo; *AvrI* y *EagI*, sitios de restricción; 2A, péptido FMDV2A; FLAG, epítipo para inmunodetección; STOP, codón de término de la traducción; PSa, péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*; NE, aminoácidos no esenciales.