

# Tabla de Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes . . . . .	2
1.1.1. Prebióticos . . . . .	2
1.1.2. Biomasa lignocelulósica . . . . .	3
1.1.3. Xilooligosacáridos . . . . .	4
1.1.3.1. Procesos de producción . . . . .	5
1.1.3.1.1 Autohidrólisis . . . . .	5
1.1.3.1.2 Hidrólisis enzimática . . . . .	5
1.1.4. $\alpha$ -Glucuronidasa . . . . .	7
1.1.4.1. Producción recombinante . . . . .	8
1.2. Motivación . . . . .	9
<b>2. Objetivos</b>	<b>10</b>
2.1. Objetivo general . . . . .	10
2.2. Objetivos específicos . . . . .	10
<b>3. Metodología experimental</b>	<b>11</b>
3.1. Cultivo de <i>G. trabeum</i> . . . . .	11
3.1.1. Cultivo en medio líquido . . . . .	11
3.1.1.1. Concentración de proteínas . . . . .	12
3.1.1.2. Ensayo de actividad $\alpha$ -glucuronidasa . . . . .	12
3.1.2. Cultivo en medio sólido para la expresión de gen de GtAGluc . . . . .	12
3.2. Extracción de RNA . . . . .	13
3.2.1. Verificación y cuantificación del RNA extraído . . . . .	14
3.2.2. Purificación con DNAsa . . . . .	15
3.3. Síntesis de cDNA . . . . .	15
3.3.1. Purificación del cDNA . . . . .	16
3.4. Aislamiento del material genético codificante de GtAGluc . . . . .	16
3.4.1. Verificación de síntesis de gen de GtAGluc . . . . .	17
3.4.2. A-Tailing . . . . .	18
3.4.3. Purificación de gen de GtAGluc sintetizado . . . . .	18
3.5. Clonación del gen de GtAGluc en pGEM-T Easy . . . . .	18
3.5.1. Ligación del gen a pGEM-T Easy . . . . .	18
3.5.2. Preparación de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ quimiocompetentes . . . . .	19
3.5.3. Transformación de <i>E. coli</i> . . . . .	19
3.5.4. Selección de transformantes . . . . .	20
3.5.5. Secuenciación . . . . .	20

3.6.	Clonación del gen en pPIC9K . . . . .	20
3.6.1.	Preparación de inserto . . . . .	20
3.6.1.1.	Amplificación desde pGEM-T Easy . . . . .	20
3.6.1.2.	Digestión del inserto . . . . .	22
3.6.2.	Preparación de pPIC9K . . . . .	22
3.6.3.	Ligación del gen a pPIC9K . . . . .	23
3.6.4.	Preperación de <i>E. coli TOP 10</i> electrocompetentes . . . . .	24
3.6.5.	Electroporación de <i>E. coli</i> . . . . .	24
3.6.6.	Selección de transformantes . . . . .	25
3.6.6.1.	Verificación de transformantes . . . . .	25
3.6.7.	Secuenciación . . . . .	26
3.7.	Clonación del gen en <i>P. pastoris</i> . . . . .	27
3.7.1.	Preparación del DNA . . . . .	27
3.7.1.1.	Obtención del DNA . . . . .	27
3.7.1.2.	Digestión plasmidial . . . . .	27
3.7.1.2.1	Verificación de digestión . . . . .	27
3.7.1.3.	Purificación del DNA . . . . .	27
3.7.2.	Preparación de <i>P. pastoris</i> electrocompetentes . . . . .	28
3.7.3.	Electroporación de <i>P. pastoris</i> . . . . .	29
3.7.4.	Selección de transformantes en Geneticina <sup>®</sup> . . . . .	29
3.8.	Producción recombinante de $\alpha$ -glucuronidasa . . . . .	30
3.8.1.	Ensayos de actividad $\alpha$ -glucuronidasa . . . . .	31
3.8.2.	Concentración de proteínas . . . . .	31
3.8.3.	Electroforesis en geles de poliacrilamida . . . . .	31
3.8.4.	Cuantificación de proteínas por Método de Bradford . . . . .	32
<b>4.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>34</b>
4.1.	Aislamiento del gen de GtAGluc . . . . .	34
4.1.1.	Identificación de medio de cultivo inductor de GtAGluc . . . . .	34
4.1.1.1.	Producción de GtAGluc en cultivos de <i>G. trabeum</i> en presencia de distintas fuentes de carbono . . . . .	34
4.1.1.2.	Comparación de crecimiento de <i>G. trabeum</i> en placas con distintas fuentes de carbono . . . . .	37
4.1.1.3.	Obtención de biomasa para la extracción de RNA . . . . .	37
4.1.2.	Aislamiento del gen de GtAGluc desde cultivos en condiciones de inducción . . . . .	38
4.1.3.	Clonación del gen de GtAGluc en pGEM-T Easy . . . . .	41
4.1.4.	Análisis de las secuencias de los fragmentos clonados en pGEM-T Easy . . . . .	43
4.1.5.	Clonación del gen de GtAGluc en pPIC9K . . . . .	43
4.1.6.	Análisis de la secuencia del fragmento clonado en pPIC9K . . . . .	49
4.2.	Clonación del gen de GtAGluc en <i>P. pastoris</i> . . . . .	50
4.2.1.	Incorporación de pPIC9KGluc al genoma de <i>P. pastoris</i> . . . . .	51
4.3.	Producción recombinante de GtAGluc en <i>P. pastoris</i> . . . . .	55
4.3.1.	Cinética de producción de GtAGluc recombinante en cultivos de <i>P. pastoris</i> . . . . .	55
4.3.2.	Identificación de GtAGluc recombinante en cultivos de <i>P. pastoris</i> . . . . .	57

<b>5. Conclusiones</b>	<b>63</b>
<b>6. Proyecciones futuras</b>	<b>65</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>66</b>
<b>Anexos</b>	<b>71</b>
A. Vectores génicos utilizados	71
A.1. pGEM-T Easy	71
A.1.1. Ligación a pGEM-T Easy	72
A.2. pPIC9K	73
A.2.1. Ligación a pPIC9K	74
B. Metodologías experimentales	76
B.1. Electroforesis en gel de agarosa	76
B.2. Medios de cultivo estándares	76
B.2.1. LB	76
B.2.2. LB Agar	76
B.2.3. LB para selección de colonias	76
B.2.4. TB	77
B.2.5. YPD	77
B.2.6. YPD Agar	77
B.2.7. RDB Agar	78
B.2.8. BMGY/BMMY	79
B.3. Ensayos de actividad enzimática $\alpha$ -glucuronidasa	79
B.4. Purificación de DNA por geles de agarosa	81
B.5. Extracción de DNA plasmidial por miniprep	82
C. Resultados y Discusión	83
C.1. Ensayos de actividad $\alpha$ -glucuronidasa en cultivos líquidos de <i>G. tra-</i> <i>beum</i>	83
C.2. Clonación del gen en pGEM-T Easy	83
C.2.1. Análisis de secuencias de fragmentos clonados en pGEM- T Easy	83
C.3. Clonación del gen en pPIC9K	96
C.3.1. Análisis de secuencia de fragmento clonado en pPIC9K	97
C.4. Producción recombinante de $\alpha$ -glucuronidasa	104
C.4.1. Ensayos de actividad enzimática de clones	104
C.4.2. Cuantificación de proteínas por Método de Bradford	105