



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA
Y MATERIALES

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA *IN SITU* PARA LA PRODUCCIÓN DE
XILANASA Y XILOOLIGOSACÁRIDOS EN *PICHIA PASTORIS*
RECOMBINANTE UTILIZANDO COMO MATERIA PRIMA XILANO
EXTRAÍDO DE RASTROJOS DE TRIGO**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA
INGENIERÍA, MENCIÓN QUÍMICA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN
BIOTECNOLOGÍA

CATALINA TAMARA ESPINA DÍAZ

PROFESORA GUÍA:
MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS
BÁRBARA ANDREWS FARROW

Este trabajo ha sido financiado por:
Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CEBIB. Fondo FB0001

SANTIAGO DE CHILE

2024

RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN
CIENCIAS DE LA INGENIERÍA, MENCIÓN QUÍMICA Y MEMORIA PARA
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: CATALINA TAMARA ESPINA DÍAZ
FECHA: 2024
PROF. GUÍA: MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

EVALUACIÓN DE UN SISTEMA IN SITU PARA LA PRODUCCIÓN DE XILANASA Y XILOOLIGOSACÁRIDOS EN *PICHIA PASTORIS* RECOMBINANTE UTILIZANDO COMO MATERIA PRIMA XILANO EXTRAÍDO DE RASTROJOS DE TRIGO

La gran cantidad de desechos en la industria agroindustrial y el enfoque actual de utilizar residuos como materia prima para generar productos de alto valor han llevado a considerar el uso de biomasa para la producción de xilooligosacáridos (XOS) que son de alto interés debido a sus efectos prebióticos. Los XOS se producen a partir de la hidrólisis del xilano presente en la hemicelulosa de la biomasa utilizando xilanasa y enzimas auxiliares como la arabinofuranosidasa. El proceso tradicional (en este trabajo denominado "*ex situ*") consta de tres etapas, producción de la enzima, extracción del sustrato xilano e hidrólisis. En la tesis presente se explora un método alternativo consistente en la producción de enzima y producto (XOS) simultáneamente, denominado *in situ*.

El objetivo general de esta tesis es evaluar la producción de XOS y xilanasa en el sistema *in situ* con *P. pastoris* y xilano extraído de rastrojos de trigo. Para ello se estudiaron distintos medios de crecimiento e inducción de la producción de la proteína recombinante. Se logró observar que los medios diseñados para abaratar costos (JCG y JCM) tienen el mismo rendimiento en la producción de XOS que los medios tradicionales (BMGY y BMMY). Además, los medios diseñados producen una mayor cantidad de enzima en comparación con los medios tradicionales, alrededor de 7 [U/ml] versus 4 [U/ml].

Al estudiar la producción de XOS con los medios diseñados se observó que hay una disminución en el rendimiento de la producción de XOS al aumentar la concentración de xilano comercial, alrededor de un 10 % a 7 % para una concentración de 0,5 % y 1,5 % de sustrato. En cuanto al xilano de rastrojo de trigo utilizado como sustrato (con una composición de xilano de aproximadamente 30 %, tanto para la extracción con 2 % y 12 % de NaOH), se observó el mismo efecto, disminuyendo el rendimiento de producción de XOS de 8 % a 2 % al aumentar la concentración del sustrato de 0,5 % a 2,5 %.

El sistema *in situ* y *ex situ* logran tener la misma producción de XOS a las 24 horas, por lo que se logra concluir la viabilidad del sistema *in situ*. En cuanto al estudio de inhibición por producto no fue posible encontrar que la xilobiosa y xilotriosa inhiban a la xilanasa utilizada. Además, se determinó que el xilano residual del sistema *in situ* se puede continuar hidrolizando con xilanasa al agregar arabinofuranosidasa, por lo que el sistema *in situ* podría mejorarse con la producción de enzimas auxiliares que ayuden con la hidrólisis de los residuos del xilano.

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a mi familia, mis padres Nardo y Sandra, y a mis hermanitos Alfredo y Loreto. Fueron un apoyo fundamental en este largo y desafiante proceso. Todo lo que soy se los debo a su amor incondicional, su dedicación y esfuerzo por darme una buena enseñanza. También agradecer a mi tío Eduardo y tía Violeta, quienes me recibieron con los brazos abiertos en mis primeros años de universidad.

Agradecer a mi profesora guía Oriana Salazar por su tiempo, dedicación y comprensión durante este trabajo. Ha sido una de las instancias en las que más he aprendido durante mi paso por la universidad. También a las personitas del grupo Trigos, con quienes celebrábamos nuestros logros y nos reíamos de nuestros fracasos experimentales para no llorar.

A los amigos que hice en el camino y con los que compartí bonitos momentos, cafés y chelas: Gabi C., Jp D, Alfredo G., Cata B., Vale B, Nico H., Naty N, Stefan, Natha y al querido Adrián, quien siempre estará presente en mis memorias. A las personas del CeBiB que en algún momento me enseñaron alguna cosa de la vida en el laboratorio, en especial a Pachi y Vale T. A mis amigas de Chépica, Michelle, Maripi, Dani, Leidy y Romi, quienes, a pesar de ya no vernos tanto, las recuerdo siempre con mucho cariño.

Dar especial agradecimientos a mi gran compañero de carrera y amigo Aníbal, con quien fue un gusto vivir este proceso y sobre todo recomendarte varios animes. Creo que llegue al final, gracias por esperar y ser un gran amigo jaja. También agradecer enormemente a mi pololo Francisco, quién fue un pilar fundamental para aquellos momentos difíciles. Han sido 6 bonitos años. Gracias también a tu familia, en especial a tu mamá. Creo que me quedo corta de palabras para agradecer a todos quienes estuvieron presentes. Así que:

Gracias totales.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Marco teórico	1
1.1.1. Biomasa lignocelulósica	1
1.1.2. Xilano	3
1.1.3. Métodos de extracción de xilano	4
1.1.4. Xilooligosacáridos	5
1.1.5. Enzimas para la degradación de hemicelulosa	7
1.1.6. Factores que afectan la actividad enzimática de la xilanasa	9
1.1.7. Producción de proteínas recombinantes	10
1.1.8. Producción tradicional de XOS	11
1.1.9. Producción de XOS en sistema <i>in situ</i>	12
1.2. Motivación	15
1.3. Objetivos	15
1.3.1. Objetivo general	15
1.3.2. Objetivos específicos	15
2. Materiales y metodología	16
2.1. Materiales	16
2.1.1. Equipos	16
2.1.2. Reactivos	17
2.2. Metodología	18
2.2.1. Estudio del crecimiento de <i>P. pastoris</i> en distintos medios de cultivo	18
2.2.2. Extracción xilano heterogéneo desde biomasa	18
2.2.3. Caracterización de xilano extraído	19
2.2.4. Producción de XOS en sistema <i>in situ</i>	20
2.2.5. Producción de XOS en sistema <i>ex situ</i>	21
2.2.6. Cuantificación de XOS	23
2.2.7. Ensayo de actividad enzimática de la xilanasa GTxyn10A	24
2.2.8. Análisis de la producción constante de XOS luego de 24 horas	24
2.2.8.1. Inhibición de xilanasa por producto (XOS)	25
2.2.8.2. Estudio de degradabilidad por xilanasas del xilano residual	26
2.2.8.3. Análisis estadístico	26
3. Resultados y discusión	27
3.1. Evaluación de medios diseñados en la producción de XOS y xilanasa	27

3.1.1.	Crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> KM71/9KGtXyn10A en distintos medios de cultivo	27
3.1.2.	Producción de XOS y xilanasa recombinante en medios de cultivo suplementados con xilano comercial en sistema <i>in situ</i>	30
3.2.	Extracción y caracterización de xilano extraído desde rastrojo de trigo y aserrín de lenga	39
3.3.	Producción de XOS y xilanasa recombinante en sistema <i>in situ</i>	41
3.3.1.	Comparación producción de XOS utilizando xilano comercial y xilano de trigo en sistema <i>in situ</i>	48
3.4.	Comparación de producción de XOS en sistema <i>in situ</i> y <i>ex situ</i>	49
3.4.1.	Producción de XOS <i>ex situ</i> a partir de xilano comercial o xilano de rastrojos de trigo	49
3.4.2.	Análisis comparativo de la producción de XOS en ambos sistemas	51
3.4.3.	Estudio de potenciales factores inhibitorios de la producción de XOS <i>in situ</i>	53
3.4.3.1.	Estudio de inhibición enzimática de xilanasa por producto (XOS)	53
3.4.3.2.	Análisis del rol de la composición de xilano en la actividad xilanasa de GtXyn10A	56
3.4.4.	Análisis sobre la potencial implementación a escala industrial del sistema <i>in situ</i>	58
4.	Conclusiones	60
4.1.	Proyecciones futuras	62
	Bibliografía	63
	Anexos	71
A.	Medios de cultivo	71
B.	Curvas de calibración	75
B.1.	Curva de calibración de DNS	75
B.2.	Curva de calibración de XOS	75
B.3.	Curva de calibración de azúcares para la caracterización del xilano	76
C.	Estándares	79
C.1.	Estándares de azúcares	79
C.2.	Estándares de XOS	79
D.	Caracterización xilano extraído de biomasa	80
E.	Gráficos complementarios producción de XOS	81
E.1.	Producción de XOS en medio con xilano residual	81
E.2.	Producción de XOS en medios con 0,5 % de sustrato	81
E.3.	Producción de xilobiosa y xilotriosa en sistema <i>in situ</i> y <i>ex situ</i> a las 24 horas	83

Índice de Tablas

1.1.	Composición de diferentes biomazas lignocelulósicas [8][9].	2
2.1.	Equipos de laboratorio utilizados en el trabajo de esta tesis.	16
2.2.	Reactivos utilizados en el trabajo de laboratorio.	17
2.3.	Factor para convertir polímeros a monómeros de azúcar, siendo de glucano a glucosa y de xilano a xilosa [64].	19
2.4.	Condiciones estudiadas en el sistema <i>ex situ</i> . Se utilizan condiciones similares a las del sistema <i>in situ</i> (30°C y pH 6) y en condiciones óptimas para la actividad enzimática (50°C y pH 5). El xilano comercial es xilano de madera de abedul, Megazyme.	22
2.5.	Enzimas utilizadas para la hidrólisis del xilano residual. A: Arabinofuranosidasa. X: Xilanasa. Control: Sin Arabinofuranosidasa ni Xilanasa.	26
3.1.	Composición de los medios de cultivo de crecimiento a comparar. BMGY es medio tradicionalmente usado para el crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> y JCM es el medio de crecimiento modificado a partir del medio BMGY.	28
3.2.	Composición de los medios de cultivo de inducción a comparar. BMMY es medio tradicionalmente usado para la inducción de proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i> y JCM es el medio de inducción modificado a partir del medio BMMY.	28
3.3.	Resultados del análisis ANOVA para el crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn1 en distintos medios de cultivo.	29
3.4.	Costos de los reactivos que forman parte de la fuente de nitrógeno de los medios de crecimiento. Precio al 2023 [68] [69] [70].	30
3.5.	Resultados del análisis <i>t-student</i> para la producción de xilobiosa y xilotriosa en medios de cultivo BMMY y JCM con 0,5 % de xilano comercial.	32
3.6.	Resultados del análisis <i>t-student</i> para la producción de xilobiosa y xilotriosa en medios de cultivo BMMY y JCM con 1,5 % de xilano comercial.	33
3.7.	Resultados del análisis <i>t-student</i> para la producción de XOS en medios de cultivo BMMY y JCM con 0,5 % y 1,5 % de xilano comercial.	34
3.8.	Rendimiento de la producción de XOS a las 24 horas en sistema <i>in situ</i> con <i>Pichia Pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante en medios de cultivo JCM y BMMY con diferentes concentraciones de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme), 0,5 % y 1,5 %.	35
3.9.	Resultados del análisis <i>t-student</i> para la producción de XOS por unidad de enzima en medios de cultivo BMMY y JCM para ambas concentraciones de xilano comercial de madera de abedul.	39

3.10.	Resultados del análisis <i>t-student</i> para la producción de XOS por unidad de enzima para ambas concentraciones de xilano extraído de rastrojo de trigo.	47
3.11.	Resultados del análisis <i>t-student</i> para la producción de XOS en sistema <i>ex situ</i> luego de 24 horas.	51
3.12.	Análisis estadístico para la comparación de las pendientes en la producción de XOS “Con XOS inicial” y “Sin XOS inicial”, considerando $p=0,05$ y 4 puntos en cada pendiente.	56
3.13.	Resultados del análisis <i>t-student</i> en el estudio del efecto de la concentración de producto en la actividad de la enzima.	56
3.14.	Resultados del análisis <i>t-student</i> de la producción de XOS en presencia de ARAF y ARAF+XYL.	58
3.15.	Rastrojo de trigo necesario en sistema <i>in situ</i> estudiado para la producción de 38,75 [g] de XOS (consumo de 1,25 [g] diario por un mes de una persona) a partir xilano extraído de trigo.	59
A.1.	Composición medio YPD-agar [65].	71
A.2.	Composición medio YPD [65].	71
A.3.	Composición medio BMGY [65].	72
A.4.	Composición medio BMGY modificado con 2,4 % de extracto de levadura y buffer fosfato de potasio [62].	72
A.5.	Composición medio BMGY modificado con 3,6 % de extracto de levadura y buffer fosfato de potasio [62].	72
A.6.	Composición medio BMGY modificado con 2,4 % de extracto de levadura y buffer citrato de sodio [62].	73
A.7.	Composición medio BMGY modificado con 3,6 % de extracto de levadura y buffer citrato de sodio [62].	73
A.8.	Composición medio BMMY [65].	73
A.9.	Composición medio JCG [62].	73
A.10.	Composición medio JCM [62].	74
C.1.	Tiempos de retención de azúcares para el estudio de la composición del xilano extraído de biomasa.	79
C.2.	Tiempos de retención de xilosa y XOS para el estudio de la producción de XOS en los sistemas <i>in situ</i> y <i>ex situ</i> .	79
D.1.	Composición de xilano extraído de trigo y lenga utilizando 2% y 12% de NaOH en la extracción.	80

Índice de Ilustraciones

1.1.	Estructura del material lignocelulósico donde se distingue la celulosa y hemicelulosa [6].	2
1.2.	Producción nacional de rastrojos de principales cultivos de cereales en Chile en el periodo 2021/22. Elaboración propia en base a datos de estadísticas productivas de cultivos [11].	3
1.3.	Enzimas que participan en la degradación enzimática del xilano. Adaptado de [9].	4
1.4.	Estructura de la xilosa y XOS de diferente grado polimérico. Adaptado de [25].	6
1.5.	A. Curva de progreso de la reacción enzimática de xilanasa recombinante (GtXyn10A) en <i>Pichia pastoris</i> a distintas temperaturas con xilano de madera de haya [33]. B. Termoestabilidad de xilanasa recombinante (GtXyn10A) a 50°C y 80°C [33].	8
1.6.	Efecto del pH en la reacción enzimática de xilanasa recombinante (GtXyn10A) [33].	8
1.7.	Acción enzimática de la α -L-arabinofuranosidasa (E.C 3.2.1.55) en arabinoxilano y arabinano. Ambos polímeros presentan residuos de arabinosa. Adaptado de [37] y [38].	9
1.8.	Mapa del vector de clonación y expresión pPIC9K en <i>Pichia pastoris</i> . Dentro de los principales elementos del vector se observan, Ampicillin: Gen de resistencia a la ampicilina; AOX1: Promotor de la alcohol oxidasa 1 inducible por metanol. [50].	11
1.9.	Diagrama de un sistema <i>ex situ</i> para la producción de XOS desde LCM (creación propia).	12
1.10.	Diagrama de un sistema <i>in situ</i> para la producción de XOS desde xilano. Se muestra la integración de las etapas de producción de xilanasa y la hidrólisis de xilano (creación propia).	13
2.1.	Condiciones para estudiar como afecta el medio de crecimiento e inducción y la concentración de xilano comercial de madera de abedul en la producción de XOS y xilanasa. A 30°C, 200 rpm y 0,5 % de metanol.	21
2.2.	Condiciones para estudiar como afecta la concentración de xilano extraído de rastrojos de trigo en la producción de XOS y xilanasa. A 30°C, 200 rpm y 0,5 % de metanol.	21
2.3.	Experimentos realizados para la comparación del sistema <i>ex situ</i> e <i>in situ</i>	23

3.1.	Crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A con xilanasa recombinante en distintos medios de cultivo. Condiciones de crecimiento: 30°C, pH 6 y 200 rpm. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	29
3.2.	Producción de xilooligosacáridos en medios BMMY y JCM con 0,5 % de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme) como sustrato en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. a) Concentración de xilobiosa. b) Concentración de xilotriosa. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	31
3.3.	Producción de xilooligosacáridos en medios BMMY y JCM con 1,5 % de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme) como sustrato en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. a) Concentración de xilobiosa. b) Concentración de xilotriosa. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	33
3.4.	Producción de XOS en diferentes medios de cultivo. Medios corresponden a JCM y BMMY con 0,5 % y 1,5 % de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme). Cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	34
3.5.	Producción de xilanasa en medios BMMY y JCM. Sistema <i>in situ</i> con 0,5 % y 1,5 % de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme). Cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	36
3.6.	Evolución del pH en cultivos de <i>P. pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A en medios BMMY y JCM, en sistema <i>in situ</i> con 0,5 % y 1,5 % de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme). <i>Pichia pastoris</i> recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	37
3.7.	Producción de XOS por unidad de enzima con 0,5 % y 1,5 % de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme). Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	38
3.8.	Caracterización de hemicelulosa obtenida a partir de rastrojos de trigo y aserrín de lenga utilizando distintas concentraciones de NaOH en el tratamiento alcalino/térmico. Cada ensayo se realizó en triplicado.	40
3.9.	Producción de xilobiosa en medio JCM con 0,5 % y 2,5 % de xilano proveniente de rastrojos de trigo. Cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante en sistema <i>in situ</i> se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	42

3.10.	Producción de xilotriosa en medio JCM con 0,5 % y 2,5 % de xilano proveniente de rastrojos de trigo. Cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante en sistema <i>in situ</i> se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	42
3.11.	Producción de XOS en medio JCM con 0,5 % y 2,5 % de xilano proveniente de rastrojo de trigo. Cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	44
3.12.	Rendimiento de XOS producidos en sistema <i>in situ</i> con 0,5 % y 2,5 % de xilano proveniente de rastrojos de trigo. Cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	44
3.13.	a) Producción de xilanasa en medio JCM en sistema <i>in situ</i> con 0,5 % y 1,5 % de xilano comercial de abedul. Adaptado de Figura 3.5. b) Producción de xilanasa en medio JCM en sistema <i>in situ</i> con 0,5 % y 2,5 % de xilano proveniente de rastrojos de trigo. Cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	45
3.14.	Producción de xilanasa y evolución del pH en cultivos de <i>P. pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A en medios JCM en el sistema <i>in situ</i> . Medios de cultivo suplementados con xilano de rastrojos de trigo al 0,5 % y 2,5 %. <i>Pichia pastoris</i> recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	46
3.15.	Producción de XOS por unidad de enzima en sistema <i>in situ</i> con xilano extraído de rastrojos de trigo. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	47
3.16.	Producción de XOS en medios con 0,5 % de sustrato. Sistema <i>in situ</i> con xilano comercial de madera de abedul (Megazyme) y xilano proveniente de rastrojos de trigo. Cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	49
3.17.	Producción de XOS <i>ex situ</i> a partir de dos sustratos y dos condiciones distintas. 1. Xilano comercial, pH 6, 30°C. 2. Xilano comercial, pH 5, 50°C. 3. Xilano extraído de rastrojos de trigo, pH 6, 30°C. 4. Xilano extraído de rastrojos de trigo, pH 5, 50°C. Tiempo de incubación fue de 24 horas. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	51

3.18.	Producción de XOS en sistema <i>in situ</i> y <i>ex situ</i> con xilano comercial de madera de abedul al 0,5 % y 2,64 U/ml de xilanasa (528 U/g de sustrato). El sistema <i>ex situ</i> se realizó a pH 5 y 50°C (condición óptima según resultados de la Figura 3.17) y el sistema <i>in situ</i> a pH 6 y 30°C. Se considera como producción total de XOS a la suma de xilobiosa y xilotriosa medida. Las barras representan la desviación estándar, donde cada ensayo se realizó en triplicado.	52
3.19.	Producción de XOS en sistemas <i>in situ</i> y <i>ex situ</i> luego de 24 horas en igual volumen de reacción enzimática. El sustrato utilizado es xilano de rastrojos de trigo al 0,5 %. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado. En la Figura 2.3, segunda comparación, se observa un esquema del volumen usado en este experimento.	53
3.20.	Azúcares reductores en presencia y ausencia de XOS al inicio de la hidrólisis del xilano. El control es el medio de reacción que solo contenía XOS agregados inicialmente y sin presencia de enzima. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado. . . .	54
3.21.	Efecto de la concentración de XOS, producto de la reacción de xilanasa sobre xilano. A pH 5, 50°C, 46,7 U/ml de xilanasa, xilano comercial al 0,5 % y 0,1 mM de XOS. Los datos “Con XOS inicial” corresponden a la producción de XOS con 0,03 [mg/ml] de XOS inicialmente en el medio. “Sin XOS inicial”, producción de XOS solo con el sustrato y la enzima, sin XOS al inicio de la reacción. Los XOS (suma de xilobiosa y xilotriosa) se midieron por HPLC. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	55
3.22.	Efecto de la adición de arabinofuranosidasa en la actividad xilanasa de GtXyn10A sobre xilano de rastrojos de trigo residual del sistema <i>in situ</i> . ARAF: Producción de XOS al agregar la enzima arabinofuranosidasa al medio con xilano residual. XYL: Producción de XOS al agregar la enzima xilanasa al medio con xilano residual. ARAF+XYL: Producción de XOS al agregar la enzima arabinofuranosidasa y xilanasa al medio con xilano residual. Control: Medio con xilano residual sin agregar enzimas frescas. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.	57
B.1.	Curva de Calibración de DNS obtenida para la medición de azúcares reductores.	75
B.2.	Curva de Calibración de xilobiosa para la medición de XOS producidos. . .	76
B.3.	Curva de Calibración de xilotriosa para la medición de XOS producidos. .	76
B.4.	Curva de Calibración de xilosa para la caracterización del xilano extraído. .	77
B.5.	Curva de Calibración de glucosa para la caracterización del xilano extraído.	77
B.6.	Curva de Calibración de arabinosa para la caracterización del xilano extraído.	78
B.7.	Curva de Calibración de celobiosa para la caracterización del xilano extraído.	78
E.1.	Producción de XOS en medio con xilano residual y 0,2 [mg/ml] de XOS inicialmente.	81
E.2.	Xilobiosa producida en sistema <i>in situ</i> con xilano comercial y xilano proveniente de trigo.	82

E.3.	Xilotriosa producida en sistema <i>in situ</i> con xilano comercial y xilano proveniente de trigo.	82
E.4.	Producción de xilobiosa y xilotriosa en sistemas <i>in situ</i> y <i>ex situ</i> luego de 24 horas en igual volumen de reacción enzimática. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado. En la Figura 2.3 segunda comparación se observa un esquema del volumen usado en este experimento.	83

Capítulo 1

Introducción

1.1. Marco teórico

1.1.1. Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es el producto más abundante del sector agroindustrial, por lo que existe un alto interés en utilizarlo como fuente de materia prima para diversos compuestos de alto valor industrial, como lo son la producción de etanol, combustible, inmunoadyuvantes o xilooligosacáridos. La elaboración de productos a partir de esta biomasa se pueden llevar a cabo mediante procesos bioquímicos y químicos. Por ejemplo, para descomponer la hemicelulosa en azúcares se puede utilizar tanto hidrólisis enzimática como química [1].

Este material lignocelulósico (LCM, por su sigla en inglés) forma parte de la pared celular de plantas y se encuentra conformado por un conjunto heterogéneo de polisacáridos, principalmente: lignina, un polímero fenólico con una composición diversa de monómeros que confiere rigidez a la pared celular; celulosa, formada por celobiosa en una cadena polimérica y hemicelulosa, polímero de pentosas (arabinosa, xilosa) y hexosas (glucosa, manosa, galactosa) con diferentes azúcares en sus cadenas laterales [2][3].

Dentro de los principales polisacáridos heterogéneos presentes en la hemicelulosa se encuentra el xilano, el cual es un compuesto de interés para la producción de xilooligosacáridos [4]. Los carbohidratos, como la hemicelulosa, se encuentran ligados químicamente a la lignina mediante un enlace éster, lo que forma un complejo lignina-carbohidratos. La presencia de lignina dificulta el tratamiento de la hemicelulosa, por lo que se debe descomponer su estructura para hacer la hemicelulosa más accesible por enzimas que la hidrolizan para la formación de diversos productos [5]. En la Figura 1.1 se muestra un boceto de lo que es el material lignocelulósico, observando el conjunto heterogéneo de polisacáridos que la conforman.

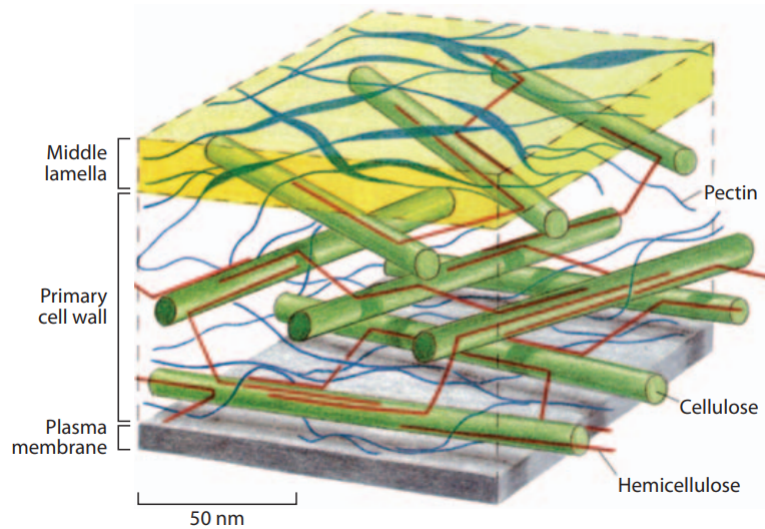


Figura 1.1: Estructura del material lignocelulósico donde se distingue la celulosa y hemicelulosa [6].

La composición de la biomasa lignocelulósica varía entre las distintas fuentes vegetales, incluso entre las mismas especies. Esto puede deberse a las diferencias en la condición de nutrientes, método de cosecha y regiones geográficas a las que se ven sometidas las plantas [7]. En la Tabla 1.1 se muestra la composición de algunas biomásas como residuos agrícolas, maderas duras y maderas blandas.

Tabla 1.1: Composición de diferentes biomásas lignocelulósicas [8][9].

Biomasa	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Bagazo de caña de azúcar	40-43	25-28	23-28
Mazorca de maíz	30-42	31-38	18-22
Rastrojo de trigo	38-41	22-28	20-22
Eucalipto	46	26	25
Nogal	41	25	33
Cedro	31	22	39

En Chile existe una gran producción de rastrojo proveniente de diversos cultivos. La producción nacional se observa en la Figura 1.2, donde se observa que el rastrojo de trigo es la que se produce en mayor cantidad, alcanzando cerca 1.3 millones de toneladas. Esta corresponde a una gran fuente de biomasa, sin embargo, en Chile se quema cerca del 80 % de los rastrojos. Esto no solo provoca efectos negativos en el medio ambiente, sino que también corresponde a un desperdicio de materia prima valiosa para la producción de otros productos [10].

Producción de paja de principales cultivos en Chile periodo 2021/22

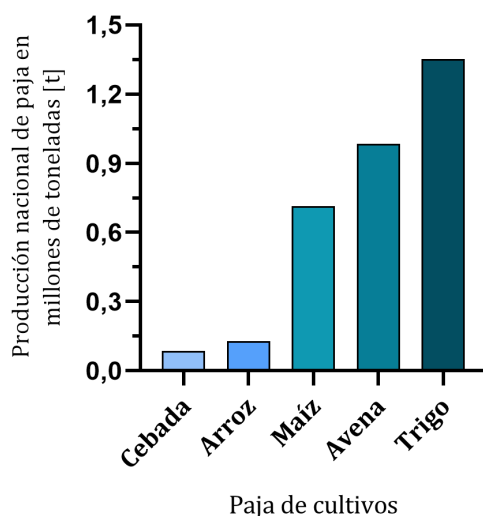


Figura 1.2: Producción nacional de rastrojos de principales cultivos de cereales en Chile en el periodo 2021/22. Elaboración propia en base a datos de estadísticas productivas de cultivos [11].

En cuanto a los materiales lignocelulósicos más estudiados para la producción de XOS se encuentran las maderas duras, el bagazo de caña de azúcar, la mazorca de maíz y el rastrojo de trigo, lo que proporciona bastante información para evaluar su uso como materia prima [9]. Cabe destacar que las maderas suelen clasificarse como maderas duras o blandas. Algunas maderas duras son el eucalipto, nogal y haya, y maderas blandas, el pino y el cedro [12].

La principal diferencia es la composición de la hemicelulosa de estas maderas, donde las maderas duras están compuestas por xilanos parcialmente acetilados, lo que las vuelve ventajosas para la extracción de hemicelulosa rica en xilosa, mientras que las maderas blandas contienen galactoglucomanos como hemicelulosa predominante. Al igual que las maderas duras, las biomásas de rastrojos contienen alto contenido de xilano con ramificaciones [8]. Debido a todo lo que ha sido mencionado anteriormente, se decidió utilizar como fuente de xilano rastrojos de trigo para el presente trabajo.

1.1.2. Xilano

El polisacárido de interés para este trabajo es el xilano que se encuentra en la hemicelulosa. El xilano es un polímero lineal formado por unidades de xilosa unidas por enlaces β -1,4-D-xilosídicos. Además, contiene diversos residuos unidos covalentemente a su estructura, como la arabinosa, ácido glucurónico y metil glucurónico, entre otros. En particular, la L-arabinosa corresponde a la segunda pentosa más abundante en la pared celular [2].

En la Figura 1.3 se muestra con mayor detalle las ramificaciones que presenta el xilano junto con las distintas enzimas que participan en el proceso de degradación enzimática de este, como lo son las xilanasas, arabinofuranosidasas, glucuronidasas, entre otras.

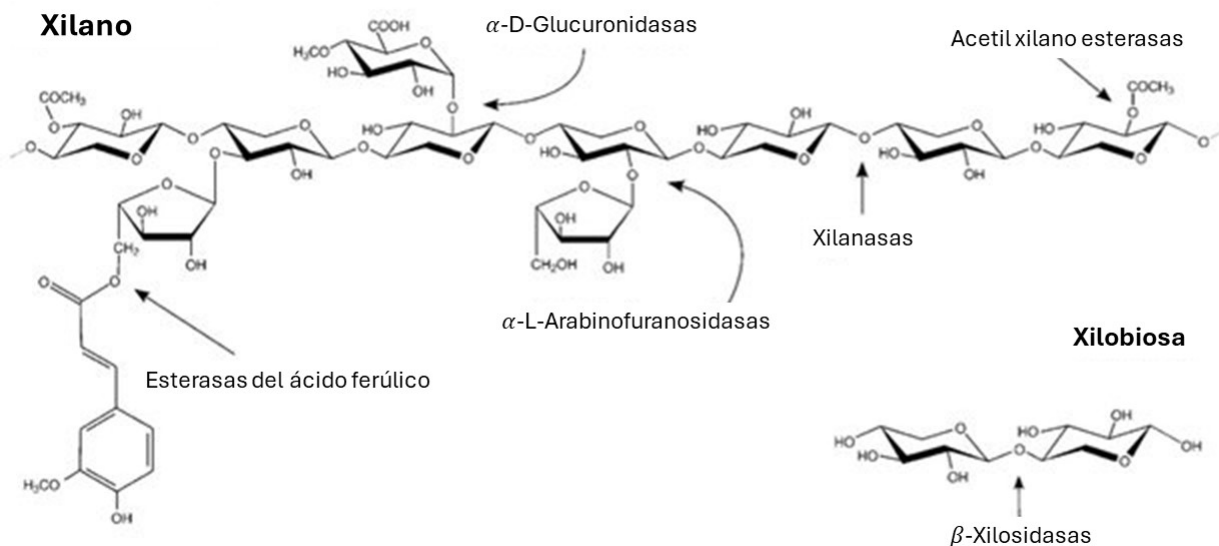


Figura 1.3: Enzimas que participan en la degradación enzimática del xilano. Adaptado de [9].

Existen diferentes estudios que buscan entender de mejor manera las propiedades, estructura y función del xilano. La investigación sobre este polisacárido está enfocada en el estudio de diferentes métodos de extracción, caracterización y posibles aplicaciones industriales. En el proceso de extracción, el xilano se puede obtener aplicando un método térmico-alcalino a la biomasa lignocelulósica ya que el xilano es soluble en este tipo de medios.

En cuanto a la caracterización del xilano extraído y la cuantificación de la producción de XOS, se realizan utilizando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para este procedimiento se considera el análisis de soluciones estándar que permiten identificar los compuestos existentes en las muestras y realizar curvas de calibración que permitan determinar la concentración de los compuestos presentes [13]. Los distintos azúcares analizados son la glucosa, xilosa, celobiosa y arabinosa.

1.1.3. Métodos de extracción de xilano

Existen diversos métodos de extracción de hemicelulosa desde biomasa lignocelulósica, los que pueden ser físicos, químicos, físico-químicos, biológicos y combinados. A partir de los biopolímeros que componen el LCM es posible generar diversos productos, por lo que es necesario estudiar el método más adecuado según lo que se desea producir. En particular, se han visto numerosas ventajas de utilizar xilano como materia prima para la elaboración de otros productos. Sin embargo, aún no es posible extraer xilano de manera eficiente a partir de biomasa. Por esta razón se han enfocado las investigaciones de la

extracción de xilano principalmente en 4 métodos: Hidrólisis de ácido diluido por calor, extracción con solvente orgánico, pirohidrólisis y extracción alcalina [14].

El método ácido es un método tradicional que permite descomponer la matriz vegetal para liberar el xilano. Uno de los ácidos utilizados en este proceso es ácido sulfúrico (H_2SO_4), el que rompe los enlaces glucosídicos permitiendo la solubilización de hemicelulosa y celulosa. Sin embargo, al utilizar lo extraído con este método como materia prima para la producción de XOS, una desventaja a considerar es la formación de subproductos no deseados, como la xilosa, que carece de actividad prebiótica [14][15]. Debido a que los XOS se producen por su uso como prebióticos, la presencia de azúcares como la xilosa disminuyen la pureza del producto [16].

Un nuevo enfoque es la extracción de xilano con solventes orgánicos. Se ha demostrado que es más efectivo para lograr un alto rendimiento (del orden de 80% [17]) en la extracción con un menor impacto en la estructura de la hemicelulosa. Algunos solventes utilizados para la producción de XOS son alcoholes como el etanol y metanol[14]. Este tratamiento se lleva a cabo con calor ya que permite que aumente la solubilidad del xilano en el solvente. No obstante, los solventes orgánicos son peligrosos y costosos, lo que dificulta su viabilidad comercial [17].

La obtención de xilano mediante pirohidrólisis es un proceso en el que la hemicelulosa se descompone en presencia de agua a altas temperaturas, lo cual la convierte en una alternativa respetuosa con el medio ambiente al prescindir de altas grandes cantidades de químicos, como por ejemplo, los ácidos y solventes orgánicos [18]. Además, reduce la formación de productos indeseados en la producción de XOS. La desventaja de este método es que el proceso es lento, lo que limita su aplicación en operaciones a escala industrial [19].

Uno de los métodos más utilizados en la extracción de xilano con el fin de utilizarlo como materia prima para la producción de XOS es la extracción por método alcalino. En el medio alcalino se produce la saponificación del enlace éster que une la hemicelulosa con la lignina y también se fracciona la lignina. Esto produce la solubilización de las hemicelulosas y las protege de una degradación excesiva [5]. Como medio alcalino se puede utilizar hidróxido de sodio (NaOH) o hidróxido de potasio (KOH) y se aplica calor con autoclave. Sin embargo, en este proceso se debe neutralizar la solución con ácido acético debido a que las soluciones alcalinas utilizadas tienen pH cercano a 13. Debido a la reacción química de neutralización ácido-base, se forma alta cantidad de sales de acetato de sodio, disminuyendo así la pureza del producto, afectando reacciones químicas y enzimáticas subsiguientes [15]. Este pretratamiento realizado a la biomasa lignocelulósica permite obtener alto rendimiento de xilano [13].

1.1.4. Xilooligosacáridos

A partir del xilano presente en la hemicelulosa, se pueden producir xilooligosacáridos (XOS), que corresponden a la unión de 2 a 10 xilasas, que son de alto interés debido a sus efectos prebióticos [20]. Estos prebióticos sirven como sustrato para los probióticos,

es decir, que son fermentados selectivamente por bacterias beneficiosas del microbiota intestinal, las cuales producen energía, metabolitos y micronutrientes utilizadas por el hospedador, mejorando así la salud del consumidor [21].

La producción de los xilooligosacáridos se puede realizar mediante un método enzimático utilizando las enzimas xilanasas, en particular, las endoxilanasas (E.C 3.2.1.8). Esta enzima actúa de manera más eficiente cuando la cadena de xilano se encuentra libre de residuos, por lo cual resulta ventajoso contar con la participación de diversas enzimas auxiliares que permiten romper los enlaces que unen a los residuos con la cadena de xilano, tal como se muestra en la Figura 1.3 [22][23].

Actualmente se investigan métodos para mejorar la producción de XOS con el fin de reducir costos y mejorar el rendimiento y pureza. Uno de los enfoques corresponde a la producción de XOS en el mismo medio en el que se produce la enzima. También se estudia el uso de diferentes fuentes de xilano ya que las biomásas tienen diferente composición, por lo que es posible extraer más xilano desde ciertas biomásas [24], como por ejemplo las maderas duras que tienen hemicelulosa rica en xilosa en vez de las maderas blandas que contienen galactoglucomanos como hemicelulosa predominante [8].

En la Figura 1.4 se muestran las estructuras químicas de la xilosa y XOS de diferente grado de polimerización como xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4) y xilopentaosa (X5).

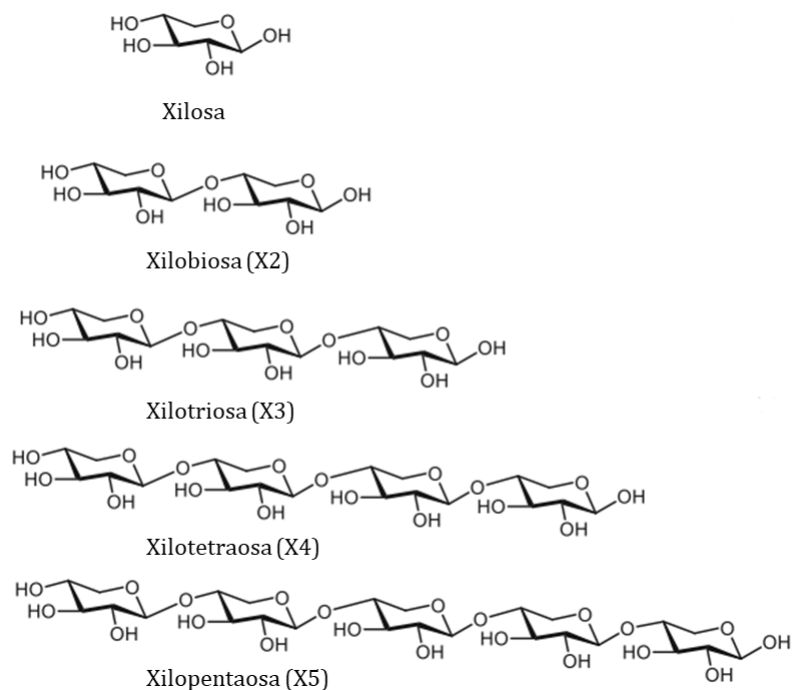


Figura 1.4: Estructura de la xilosa y XOS de diferente grado polimérico. Adaptado de [25].

1.1.5. Enzimas para la degradación de hemicelulosa

Como se mencionaba anteriormente, la producción de XOS puede llevarse a cabo mediante hidrólisis química o enzimática. Sin embargo, se prefieren los tratamientos enzimáticos debido a su compatibilidad con el medio ambiente, reciclabilidad y eficacia [26]. Hay múltiples enzimas con acción sinérgica que son requeridas para degradar por completo la hemicelulosa. Entre ellas se encuentra la endo-1,4- β -D-xilanasas (EC 3.2.1.8), también conocida como xilanasas, α -L-arabinofuranosidasas (3.2.1.55), β -xylosidasas (E.C 3.2.1.37), endo-arabinanasas (E.C.3.2.1.99), α -glucuronidasas (E.C 3.2.1.139), endo-mananasas (E.C 3.2.1.78), β -manosidasas (3.2.1.25), α -galactosidasas (E.C 3.2.1.22) y β -glucosidasas (E.C 3.2.1.21) [27]. En la Figura 1.3 se observa la acción de algunas de las enzimas mencionadas anteriormente.

En este trabajo se estudiará la producción de la enzima xilanasas de manera recombinante y su acción en el sistema *in situ* para la elaboración de xilooligosacáridos. Cabe destacar que esta enzima también tiene otras aplicaciones en la industria, participado en procesos de extracción de café, de aceites vegetales, de almidón, clarificación de jugos, entre otros [23][28].

Las xilanasas pertenecen principalmente a la familia 10 de glicosil hidrolasas (GH10) y a la familia 11 de glicosil hidrolasas (GH11) [29][30]. Estas familias son agrupaciones de enzimas que comparten características estructurales y funcionales, especialmente en términos de su habilidad para descomponer xilanos, que son un tipo de hemicelulosa. Las familias GH10 y GH11 actúan específicamente en los enlaces β -1,4-D-xilosídicos presentes en la estructura del xilano [31]. El modo de acción varía según el tipo de xilanasas, donde se distinguen una actividad exoxilanasas y una actividad endoxilanasas. La exoxilanasas hidroliza la cadena de xilano desde la parte distal, liberando una xilosa del extremo. En cambio, la endoxilanasas descompone la cadena de xilano de manera aleatoria los enlaces de xilosa que componen la cadena de xilano, generando xilooligosacáridos como productos de la reacción enzimática [32]. Es por esto que para la producción de XOS se utilizan endoxilanasas ya que permiten la formación de fragmentos de diversos grados de polimerización y disminuye la liberación de compuestos indeseados como la xilosa.

En este trabajo se utilizó una xilanasas (GtXyn10A) con tamaño teórico de 38 [kDa] y cuyas condiciones óptimas de acción hidrolítica son pH 5 y temperatura igual a 80°C, como se observa en la Figura 1.6 y en el gráfico A de la Figura 1.5, respectivamente. Sin embargo, tomando en cuenta la termoestabilidad de la enzima, se utiliza una temperatura igual a 50°C ya que así la enzima es capaz de conservar mejor la actividad enzimática inicial, como se observa en el gráfico B de la Figura 1.5. Cabe destacar que se ha observado un aumento en la actividad enzimática a temperaturas superiores, sin embargo, es importante considerar la termoestabilidad de la enzima, lo cual hace referencia a su capacidad para mantener su estructura y función biológica incluso a altas temperaturas. Esto cobra especial importancia para asegurar su eficacia en aplicaciones que involucran procesos a temperaturas elevadas [33].

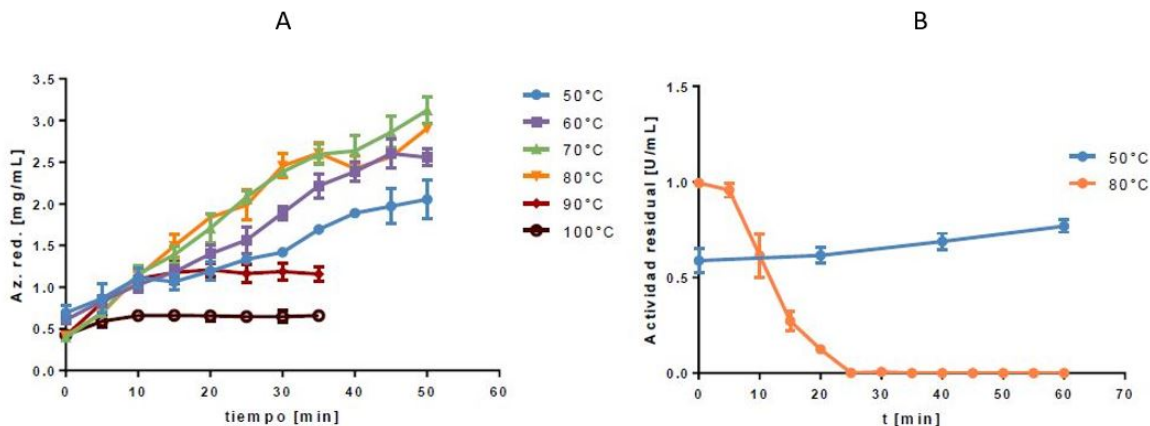


Figura 1.5: A. Curva de progreso de la reacción enzimática de xilanasa recombinante (GtXyn10A) en *Pichia pastoris* a distintas temperaturas con xilano de madera de haya [33]. B. Termoestabilidad de xilanasa recombinante (GtXyn10A) a 50°C y 80°C [33].

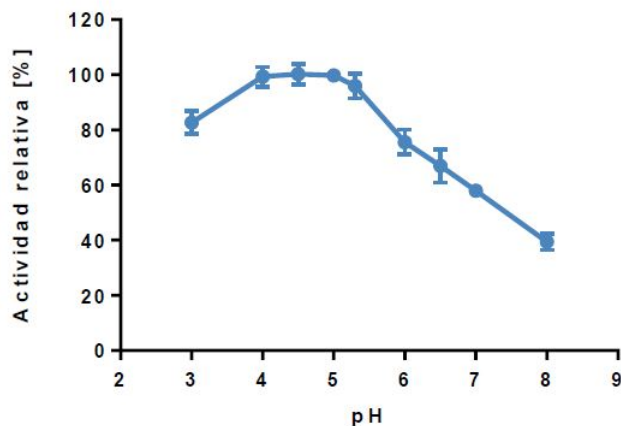


Figura 1.6: Efecto del pH en la reacción enzimática de xilanasa recombinante (GtXyn10A) [33].

Para que la acción de la endoxilanasas sea más eficiente, y por lo tanto se mejore el rendimiento en la producción de XOS, se requiere que la cadena de xilano se encuentre libre de residuos. Es allí cuando se vuelve necesario la participación de diversas enzimas auxiliares que permiten romper los enlaces que unen los residuos con la cadena de xilano [26].

Una de las enzimas que permite mejorar la eficiencia de la endoxilanasas es la α -L-arabinofuranosidasa (E.C 3.2.1.55) [34], que también pertenece al grupo de las glicosil hidrolasas, en particular a la familia GH51, e hidroliza principalmente los residuos L-arabinofuranosa (segunda pentosa más abundante) unidos a α -1,2 y α -1,3 de arabinoxilanos y arabinanos ramificados [35][36]. El pH y temperatura óptima de la arabinofura-

nosidasa utilizada son 4 y 40°C, respectivamente, y provienen del hongo *Aspergillus niger* [35]. Esta enzima es de origen comercial por lo que presenta una alta pureza. En la Figura 1.7 se muestra la actividad catalítica de la α -L-arabinofuranosidasa.

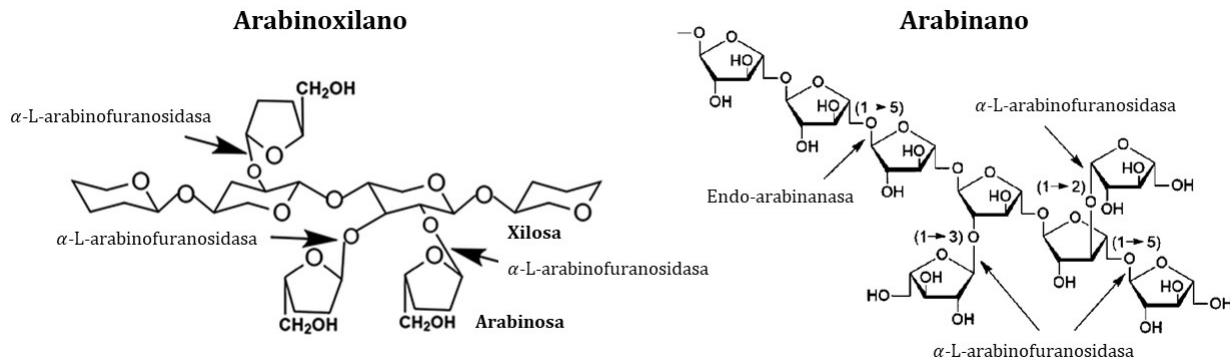


Figura 1.7: Acción enzimática de la α -L-arabinofuranosidasa (E.C 3.2.1.55) en arabinoxilano y arabinano. Ambos polímeros presentan residuos de arabinosa. Adaptado de [37] y [38].

1.1.6. Factores que afectan la actividad enzimática de la xilanasa

El uso de enzimas en la producción de XOS presentan algunos requerimientos que se deben tener en cuenta para utilizar este método eficientemente. En particular los arabinoxilanos (AX), que son los principales polisacáridos no amiláceos del trigo, presentan una fracción soluble y otra insoluble. Según el grado de selectividad que tenga una xilanasa hacia una de esas fracciones, se tendrá que la funcionalidad de esta enzima en la degradación del sustrato se verá afectada [39]. La selectividad se refiere a la capacidad de la enzima para preferir hidrolizar cierta fracción soluble/insoluble por sobre la otra. El concepto de selectividad de la xilanasa sobre el sustrato es reciente, por lo que se desconoce adecuadamente la base bioquímica. Se ha observado que xilanasas de una misma familia presentan una selectividad hacia el sustrato variable, lo que no permite predecir la descomposición de los AX insolubles por xilanasa [40].

Otro factor es la sensibilidad de la enzima hacia inhibidores endógenos presentes en cereales. Cereales como la cebada, maíz, arroz, trigo duro y trigo harinero, producen inhibidores proteínicos. Los inhibidores más estudiados son los del trigo, los cuales corresponden al tipo XIP (proteína inhibidora de xilanasa) y del tipo TAXI (inhibidor de xilanasa *Triticum aestivum*) [41][42]. La inhibición ha sido observada en una diversa variedad de xilanasas fúngicas, la cual es competitiva y se produce por la interacción de la enzima con las cadenas laterales del inhibidor proteico XIP, imitando la interacción de las xilanasas con los oligosacáridos, lo cual obstruye el sitio activo[43].

También se ha observado que ciertos productos resultantes de la actividad enzimática de la xilanasa en materia lignocelulósica provocan efectos inhibitorios en la enzima. Compuestos derivados de la hemicelulosa, como xilosa y glucosa, y aquellos provenientes de la lignina, como la vanilina, generan una disminución en el rendimiento de la hidrólisis [44]. Otros productos de la hidrólisis del xilano con el que se ha visto una reducción de

la actividad enzimática de la xilanasas es la xilobiosa y xilotriosa, ambos XOS que se producen en mayor cantidad [45].

1.1.7. Producción de proteínas recombinantes

Las xilanasas se producen en forma nativa en diferentes microorganismos como hongos, bacterias, levaduras, algas marinas, entre otros. Sin embargo, los hongos filamentosos forman parte de la principal fuente comercial de celulasas [46]. Los beneficios de la producción nativa de enzimas se base en la simplicidad y constancia en la producción debido a que aquellos microorganismos presentan un promotor inducible por derivados de celulosa, celobiosa, entre otros. No obstante, la producción es limitada y baja [47].

Una solución para el bajo rendimiento en la producción de proteínas es la utilización de sistemas recombinantes. En la actualidad se emplean diversos sistemas para producir proteínas recombinantes, abarcando bacterias, levaduras, mohos, mamíferos, plantas e insectos. Entre estos, los sistemas de expresión en levaduras son especialmente destacados, en particular, el sistema de expresión en *P. pastoris* ya que es una de las herramientas más comunes y establecidas en biología molecular para la producción de proteínas recombinantes [48].

Algunas de las ventajas de utilizar levaduras para la producción recombinante de proteínas son que: es capaz de realizar modificaciones post-traduccionales y puede secretar proteínas al medio extracelular, tiene un tiempo de expresión relativamente rápidos y produce una baja cantidad de compuestos tóxicos en comparación con otros microorganismos [48].

Es por lo anterior que resulta atractivo estudiar la producción de xilanasas en *P. pastoris*. Para ello el gen de la xilanasas utilizada (GtXyn10A) proveniente del hongo de pudrición parda *Gloeophyllum trabeum*, fue insertado en el vector pPIC9K y posteriormente transformado en *Pichia pastoris*.

El vector pPIC9K es un vector de clonación y expresión diseñado para su uso en *Pichia pastoris*. Este permite tanto la clonación eficiente del gen de interés como la expresión controlada de dicho gen en las células de *P. pastoris*. El mecanismo de expresión se basa en un promotor fuerte y regulado correspondiente al promotor del gen de alcohol oxidasa 1 (pAOX1) inducible por metanol, por lo que el vector pPIC9K tiene la ventaja de tener un fuerte nivel de expresión. Este promotor también permite controlar la producción de la enzima ajustando la concentración de metanol en el medio de inducción [49].

Además, pPIC9K cuenta con la secuencia del factor α lo que permite que la proteína sea secretada al medio extracelular [50]. Esto es sumamente conveniente para considerar la elaboración de productos en sistemas *in situ* ya que es posible prescindir de etapas de purificación donde se realice lisis celular para la extracción de la proteína. En la Figura 1.8 se muestra el mapa de los elementos presentes en el vector pPIC9K.

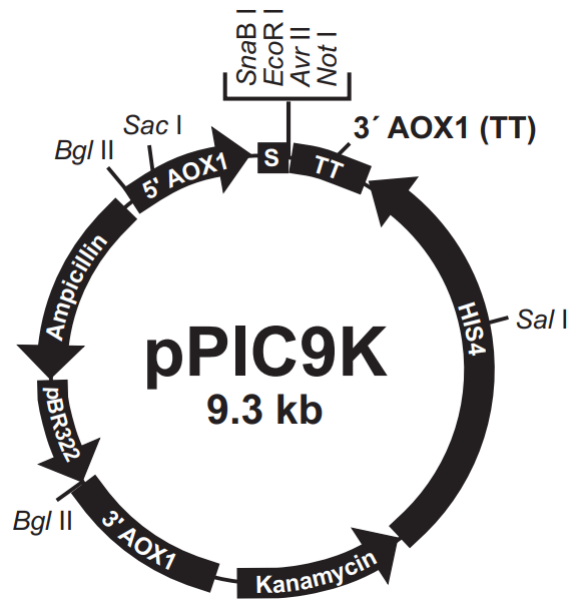


Figura 1.8: Mapa del vector de clonación y expresión pPIC9K en *Pichia pastoris*. Dentro de los principales elementos del vector se observan, Ampicillin: Gen de resistencia a la ampicilina; AOX1: Promotor de la alcohol oxidasa 1 inducible por metanol. [50].

1.1.8. Producción tradicional de XOS

Actualmente se utilizan diferentes métodos para la producción de XOS, como los químicos, autohidrolíticos, enzimáticos o una combinación de los anteriores [51]. Algunas desventajas de los métodos químicos y autohidrolíticos son la producción de compuestos indeseados y tóxicos para quienes consumirían XOS, como el hidroximetilfurfural (HMF) y furfural. Por ejemplo, el HMF ha sido reconocido como posible compuesto mutagénico y carcinogénico en alimentos [52]. Además, tiene una capacidad limitada para controlar el grado de polimerización de los productos [53].

En cuanto a la aplicación de tratamientos enzimáticos, estos tienen ciertas ventajas frente a los métodos químicos. Por ejemplo, se pueden realizar cócteles enzimáticos que permiten una hidrólisis eficaz de la hemicelulosa, obteniendo productos deseados y de manera sostenible [54]. El de mayor interés es el método combinado, donde, por ejemplo, se combina un pretratamiento químico a la LCM (que permite aumentar la accesibilidad de la enzima a la hemicelulosa) con la acción hidrolítica de enzimas xilanolíticas. Este método presenta una alta eficiencia y especificidad, y produce menores cantidades de xilosa y otros subproductos no deseados [51].

Uno de los métodos de producción de XOS se realiza en dos etapas: extracción alcalina de xilano desde biomasa lignocelulósica y una posterior hidrólisis enzimática. La etapa de hidrólisis enzimática suele llevarse a cabo en otras dos etapas que consisten en la producción y purificación de la enzima xilanasa, y luego la producción de XOS, donde al medio que contiene el xilano se le agrega la xilanasa producida (o xilanasa comercial, lo que aumenta los costos de producción). En la Figura 1.9 se muestra un breve *flowsheet*

con las etapas para la elaboración de XOS de manera tradicional. En ella se presenta como primera etapa el crecimiento del microorganismo, luego el traspaso de las células a un medio de inducción para la producción de la enzima y su posterior extracción para luego ser utilizada en un medio que contiene el xilano a hidrolizar.

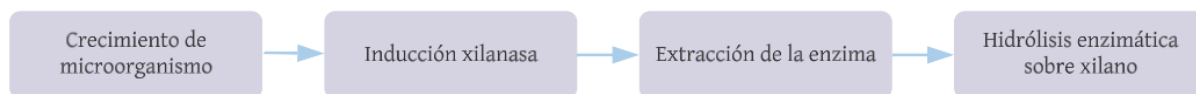


Figura 1.9: Diagrama de un sistema *ex situ* para la producción de XOS desde LCM (creación propia).

Este procedimiento, que de ahora en adelante será llamado *ex situ* debido a que la producción de XOS se realiza fuera del medio donde se produce la enzima, cuenta con la ventaja de que se puede trabajar en las condiciones óptimas tanto para la producción de la enzima como para la actividad enzimática [51]. Usualmente estas condiciones difieren entre sí. Por ejemplo, en *Pichia pastoris* las condiciones óptimas para la producción de enzima son a 30°C y pH 6, mientras que la actividad de la xilanasa es mejor alrededor de los 50°C y pH 5 [55][56]. Sin embargo, la desventaja del sistema *ex situ* es que necesita de etapas extras que conllevan a un aumento de los costos de producción, como por ejemplo, etapas complejas de extracción y purificación de la enzima con diversos equipos.

1.1.9. Producción de XOS en sistema *in situ*

En esta tesis se estudia la producción de XOS alternativo, que en adelante será llamado sistema *in situ*. Este sistema consiste en producir la enzima xilanasa recombinante en un sistema de cultivo en *Pichia pastoris*, en presencia del sustrato xilano, para la producción simultánea de XOS. Para que este nuevo enfoque de producción sea exitoso requiere de biomasa y microorganismos productores de xilanasa capaces de producir XOS eficientemente. Se usará *Pichia pastoris* como organismo productor de la enzima porque es GRAS (*Generally Recognized As Safe*) [51]. Al considerar el uso de XOS como prebióticos con aplicaciones alimentarias, la producción de enzimas se realiza en organismos GRAS para facilitar el uso en la fabricación de alimentos funcionales y seguros [57].

Algunas investigaciones ya han estudiado este sistema *in situ*, un ejemplo es la integración de las etapas de producción de lipasa recombinante en *Pichia pastoris* y la producción de biodiésel [58]. Este estudio marcó un avance significativo hacia la producción de este combustible ya que se logró concluir que la eliminación del paso de aislamiento de la enzima reduce el costo de producción de biodiésel. Otro ejemplo se encuentra en el bioprocesamiento consolidado de biomasa celulósica para la producción de etanol, el cual incluye etapas de producción de enzimas como celulasas y hemicelulasas, la descomposición de los componentes de los hidratos de carbono presentes en la biomasa pretratada para obtener azúcares y la fermentación de estas azúcares (principalmente hexosas y pentosas) [59].

La producción de XOS en un sistema *in situ* es de alto interés ya que permitiría simplificar el proceso al eliminar etapas intermedias y podría reducir los costos de producción al generar la enzima en el mismo sistema. Además, la presencia de microorganismos lograría

un efecto de purificación del producto debido a que subproductos no deseados, como la xilosa, serían consumidos por estos al tener tendencia a utilizar azúcares disponibles en el medio [60]. Hay investigaciones en las que se ha demostrado que la cepa GS115 de *P. pastoris* es capaz de asimilar la xilosa como fuente de carbono [61], por lo que sería interesante estudiar si la KM71 es capaz de consumir xilosa.

Considerando la interacción entre los microorganismos y los productos de la actividad enzimática durante el proceso de hidrólisis, es particularmente relevante considerar el uso de un sistema *in situ*. En dicho sistema, la presencia de microorganismos beneficia la actividad enzimática al consumir inhibidores de la xilanasa como la xilosa y la glucosa, lo que contribuye a mantener un entorno óptimo para la eficiencia de la reacción enzimática en el lugar de aplicación, tal como se señaló en el capítulo 1.1.5.

Descripción de la tesis

En un trabajo previo se diseñó un medio de crecimiento e inducción con el fin de reducir los costos asociados a las materias primas, manteniendo el rendimiento de la producción de la enzima recombinante xilanasa en *Pichia pastoris* y el rendimiento de XOS en el sistema *in situ* [62]. Estos medios serán nombrados como JCG y JCM, correspondiendo a los medios de crecimiento e inducción, respectivamente. La composición de estos medios se presenta en el Anexo A.

En la Figura 1.10 se muestra un breve *flowsheet* con las etapas del proceso de elaboración de XOS en un sistema *in situ*. En ella se aprecia la integración de dos etapas del proceso que corresponden a la producción de la xilanasa y la de XOS por degradación del xilano, ambos ocurriendo en el mismo medio. Esto permite prescindir de la etapa de extracción y purificación de la enzima.

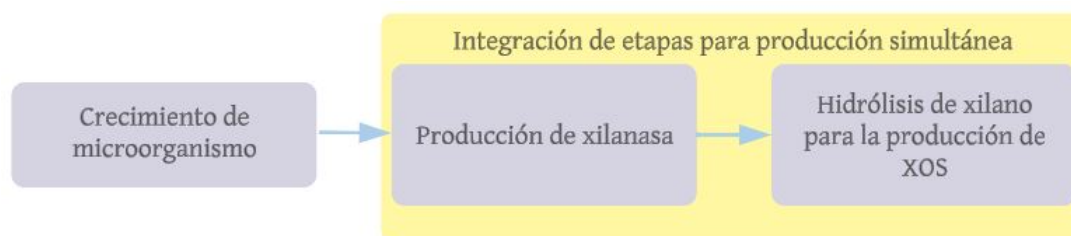


Figura 1.10: Diagrama de un sistema *in situ* para la producción de XOS desde xilano. Se muestra la integración de las etapas de producción de xilanasa y la hidrólisis de xilano (creación propia).

También se ha probado el rendimiento de producción de XOS usando xilano comercial, por lo que es de interés evaluar si los resultados son similares para xilano extraído de potenciales fuentes de este sustrato para fines industriales, como lo es el rastrojo de trigo.

Además de evaluar la producción de la enzima y XOS en los nuevos medios, algunas

características para tener en cuenta para determinar las condiciones óptimas de producción de la enzima en la levadura *P. pastoris* son la temperatura, el pH y la concentración de metanol en el medio.

La temperatura óptima de crecimiento de la levadura *P. pastoris* es de 28-30°C, sin embargo, se ha observado que durante la etapa de inducción de proteínas recombinantes la temperatura óptima oscila en el rango de 20°C y 30°C. Lo anterior podría deberse a que una menor temperatura provoca una disminución en la muerte celular y un mejor plegamiento de la proteína, entre otras posibles causas [63]. La concentración óptima de metanol, que es utilizado como inductor de la producción de la proteína recombinante, para esta levadura oscila entre de 0,1 a 3% (v/v). De manera similar al parámetro mencionado anteriormente, valores fuera de este rango podrían afectar fuertemente la eficiencia de transcripción y la actividad metabólica celular. En cuanto al pH, esta levadura es capaz de desarrollarse en un rango de pH 5-6 [63].

1.2. Motivación

La búsqueda de alternativas sostenibles para la producción de diversos compuestos bioquímicos se ha vuelto crucial en una era de conciencia ambiental. Es por ello que resulta interesante obtener XOS a partir de biomasa lignocelulósica que proviene de desechos agroindustriales. Además, el desarrollo de métodos más eficientes para la producción xilooligosacáridos puede tener un impacto significativo en la escalabilidad y la rentabilidad del proceso. Con esto en mente, es de importancia estudiar nuevos métodos para optimizar la producción de XOS.

Considerando la optimización de un sistema *in situ*, es necesario estudiar cómo las condiciones del cultivo afectan el funcionamiento de *Pichia pastoris* y de la enzima. Es por esto que se estudian distintos medios de crecimiento e inducción, concentraciones de sustrato y fuentes de xilano.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la producción de xilooligosacáridos en un sistema *in situ* utilizando la levadura *Pichia pastoris* recombinante sobre xilano heterogéneo de rastrojos de trigo y xilano comercial.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Comparar la producción de xilanasa y XOS en medios de crecimiento e inducción tradicionales para *P. Pastoris* (BMGY y BMMY) versus medios similares (JCG y JCM) utilizando sistema *in situ* y con xilano comercial como sustrato.
2. Evaluar y caracterizar xilano heterogéneo extraído desde rastrojos de trigo con un método termo-alcálico.
3. Evaluar la actividad de la xilanasa recombinante y la producción de xilooligosacáridos a partir de xilano heterogéneo de rastrojos de trigo en el sistema *in situ* en medios JCG y JCM.
4. Comparar la producción de XOS en un sistema tradicional *in situ* con un sistema de producción *ex situ* a partir de xilano heterogéneo de rastrojos de trigo y xilano comercial.

Capítulo 2

Materiales y metodología

2.1. Materiales

2.1.1. Equipos

En la Tabla 2.1 se muestran los equipos utilizados en el trabajo experimental.

Tabla 2.1: Equipos de laboratorio utilizados en el trabajo de esta tesis.

Equipo	Fabricante
Agitador magnético	Equilab
Agitador orbital	Labtech
Baño maría	Julabo SW20
Bomba de vacío	Labtech
Calentador de bloques	Labline Instruments
Campana de extracción	Biobase biotech
Campana de flujo laminar	Steamline Laboratory Products
Centrifuga	Heal Force
Espectrofotometro de cubetas	Biochrom Ltd.
Espectrofotometro de placas	Bmg labtech
Estufa	Gallenkamp
HPLC	Shimadzu corp
Incubadora con agitación	Shel Lab
Microcentrífuga	Eppendorf
pHmetro	Corning
Sonicador	Ningbo scientz biotechnology

2.1.2. Reactivos

En la Tabla 2.2 se presentan los reactivos utilizados para el desarrollo del trabajo experimental.

Tabla 2.2: Reactivos utilizados en el trabajo de laboratorio.

Reactivo	Fabricante
Acetato de sodio	Sigma Aldrich (Merck)
Ácido acético glacial	Chemix
Ácido sulfúrico	Merck
Agar-Agar	Difco
Albúmina de Suero Bovino (BSA)	Sigma Aldrich (Merck)
Ampicilina	Merck
Arabinofuranosidasa	Megazyme
Arabinosa	Merck
Aserrín de lenga	Forestales del sur de Chile
Biotina	Sigma Aldrich (Merck)
Celobiosa	Fluka
Citrato tri-sodio dihidratado	Sigma Aldrich (Merck)
Dextrosa	Merck
DNS PanReac AppliChem	PanReac AppliChem, Merck
Etanol 95 %	PanReac AppliChem
Extracto de Levadura	BD Difco
Glicerol	Merck
Hidroxido de sodio	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Metanol	Merck
Rastrojos de trigo	-
Peptona (Bacto™ Peptone)	BD Difco
Sulfato de amonio	Merck
Tartrato de sodio	Sigma Aldrich (Merck)
Xilano de madera de abedul	Megazyme
Xilosa	Sigma Aldrich (Merck)
YNB	BD Difco

2.2. Metodología

En la siguiente sección se describen las metodologías experimentales llevadas a cabo para extraer el xilano desde la biomasa de rastrojos de trigo, producir XOS en sistemas *in situ* y *ex situ* con diferentes fuentes de xilano y medios de cultivo para *P. pastoris*, y estudiar la posible inhibición por producto en la hidrólisis de xilano en el sistema *in situ*. La composición de los medios utilizados en este trabajo se describen en el Anexo A.

2.2.1. Estudio del crecimiento de *P. pastoris* en distintos medios de cultivo

Para estudiar el efecto de medios de cultivo diseñados en el crecimiento de *P. pastoris* se utilizaron 5 medios de cultivos. Sus composiciones se describen en la Tablas A.4, A.5, A.6 y A.7, presentes en el Anexo A. Uno de ellos corresponde al medio BMGY, el cual es comúnmente utilizado en *P. pastoris*. Los otros 4 medios de crecimientos fueron variaciones basadas en el medio BMGY. Los principales cambios se deben al uso de dos buffer y dos concentraciones de extracto de levadura distintas.

Se utilizó *Pichia pastoris* transformada con el vector recombinante pPIC9K-GtXyn10A almacenadas a -80°C . Se plaquearon en medio YPD-agar y se incubó a 30°C por 24-48 horas hasta obtener colonias. Con una de las colonias formadas se hizo un pre-inóculo en 10 [ml] de medio YPD líquido y se dejó incubando. Después de 24 horas se tomó 1 [ml] del pre-inóculo y se inoculó en los medios de crecimiento.

Este experimento se llevó a cabo con 50 [ml] de volumen de medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 [ml] a 30°C , 200 rpm y en triplicados. Se midió la densidad óptica del cultivo agregando 1 [ml] de muestra, de las 0, 10, 15 y 19 horas, en cubetas para espectrofotómetro registrando la densidad óptica a 600 [nm] (OD_{600}). Algunas muestras fueron diluidas para no exceder el rango de linealidad del equipo. Se realizó un análisis ANOVA a los resultados para determinar si existe diferencia significativa en el crecimiento de *Pichia pastoris* en los medios de crecimiento BMGY, 2,4 y.e.+fosfato y 3,6 y.e.+fosfato.

2.2.2. Extracción xilano heterogéneo desde biomasa

Para la extracción de xilano se utilizaron dos biomásas; rastrojos de trigo y aserrín de lenga. La extracción de xilano, desde ambas biomásas, se realizaron mediante un tratamiento alcalinotérmico que permite extraer hemicelulosa con un alto porcentaje de xilano. Para lo anterior, se preparó el rastrojo de trigo y aserrín de lenga moliendo en la licuadora y tamizando a 35 mesh. Posteriormente se dejaron secando en la estufa a 60°C por 14-16 horas hasta obtener peso constante y eliminar la humedad [13].

Una vez seco, por un lado se masó 5 [g] del rastrojo de trigo molido y se mezcló con 100 [ml] de solución alcalina (NaOH), obteniendo una relación sólido-líquido igual a 1:20, mientras que por otro lado se mezclan 6,25 [g] de aserrín de lenga molido en 100 [ml] de NaOH, con relación sólido-líquido 1:16. La solución alcalina utilizada fue de 2% p/p y 12% p/p para cada una de las biomásas [13].

Luego se autoclavan las mezclas a 121°C por 45 minutos, posteriormente se enfriaron

a temperatura ambiente y filtraron con gasa doble para recuperar el líquido. Se ajustaron las soluciones a pH 5 con ácido acético glacial y se precipitaron con 3 volúmenes de etanol 95 % a 4°C por 30 minutos. Finalmente, se centrifugaron las mezclas a 10.000 rpm y 4°C por 15 minutos, colectando el pellet que contiene el xilano [13].

2.2.3. Caracterización de xilano extraído

Para determinar la composición de los productos obtenidos por el tratamiento termoalcalino mencionado anteriormente, se caracterizaron las muestras mediante la técnica HPLC. Para la preparación de las muestras se mezcló 0,3 [g] de peso seco de muestra con 3 [ml] de ácido sulfúrico al 72 % en tubos de ensayo de vidrio y se agitó en baño maría por 1 hora a 30°C. Luego, en frascos Duran Schott, se diluyó la solución hasta que el ácido sulfúrico alcanzara una concentración del 4 % (v/v) y se autoclavaron a 121°C por 1 hora. Se aforaron los sobrenadantes a 100 [ml] y se agregó 1,5 [ml] de esta solución a través de filtros de 0,22 μm a los viales para HPLC [13].

Para reconocer y cuantificar los azúcares producidos durante la hidrolización del xilano con ácido sulfúrico, se hicieron curvas de calibración de xilosa, glucosa, arabinosa y celobiosa. Para ello se prepararon soluciones a 4 concentraciones para cada azúcar y se midieron en el HPLC. Dichas curvas se encuentran en el Anexo B.3. En ellas se presenta la ecuación que relaciona el área descrita en el HPLC con la concentración presente en cada muestra.

Las curvas de calibración mencionadas anteriormente se prepararon bajo las mismas condiciones a las que se trataron las muestras, es decir, fueron diluidas en ácido sulfúrico al 2,16 %, que corresponde a la concentración final de las muestras medidas. También se hicieron estándares de aquellas azúcares en las mismas condiciones para determinar el tiempo de retención en la columna utilizada bajo las condiciones especificadas en las secciones posteriores. Los tiempos de retención se encuentran en el Anexo C.1.

Para determinar la cantidad de xilano y glucano presente en la muestra, se relacionaron las azúcares liberadas por la hidrólisis con el factor de conversión presente en la Tabla 2.3. Esto quiere decir, por ejemplo, que las xilosas medidas corresponden al 88 % del xilano total presente en la muestra.

Tabla 2.3: Factor para convertir polímeros a monómeros de azúcar, siendo de glucano a glucosa y de xilano a xilosa [64].

Polímero	Factor conversión
Glucano	0,99
Xilano	0,88

Para la caracterización de azúcares presentes en el xilano tratado, se utilizó la columna Aminex Bio-Rad HPX-87H a 65 °C, con un flujo de 0,4 ml/min e inyección de 10 μl de muestra. La fase móvil corresponde a ácido sulfúrico 5mM filtrado a 0,22 μM y utilizando sonicación para la desaireación [13].

2.2.4. Producción de XOS en sistema *in situ*

La producción de XOS en el sistema *in situ* se realizó en dos etapas, las cuales consisten en el crecimiento de *Pichia pastoris* y en la inducción de la enzima. Para la primera etapa se utilizaron células de *Pichia pastoris* transformada con el vector recombinante pPIC9K-GtXyn10A almacenadas a -80°C . Se plaquearon en medio YPD-agar y se incubó a 30°C por 24-48 horas hasta obtener colonias.

Con una de las colonias formadas se hizo un pre-inóculo en 10 [ml] de medio YPD líquido y se dejó incubando. Después de 24 horas se tomó 1 [ml] del pre-inóculo y se inoculó en 200 [ml] de medio de crecimiento en triplicados a 30°C y 200 rpm hasta alcanzar una $\text{OD}_{600}=2-6$. Se debe considerar que el volumen del medio de cultivo no debe superar el 20 % del volumen del matraz Erlenmeyer a utilizar, esto con el fin de mantener la aireación adecuada para el microorganismo [65]. Por lo anterior, se utilizaron matraces de Erlenmeyer con capacidad volumétrica igual a 1 litro.

Luego de crecer las células, se centrifuga el medio de crecimiento y se resuspende el pellet en el medio de inducción de un volumen de 20 [ml], considerando una razón de 1:10 con respecto al volumen del medio de crecimiento [65]. Este medio contiene metanol para la inducción de la enzima y debe añadirse metanol cada 24 horas por 4 días para mantener la inducción. Las condiciones de temperatura y concentración de metanol utilizadas en la expresión de la enzima son a 30°C y metanol al 0,5 %. Se utiliza esa concentración de metanol ya que en estudios anteriores se observó que no hay diferencia significativa en la actividad enzimática medida en el medio al utilizar una concentración igual a 1 % [62].

Con la metodología descrita en esta sección se realizaron dos estudios. El primero de ellos consistió en comparar los medios tradicionales BMGY/BMMY con los diseñados JCG/JCM, utilizando las condiciones anteriormente descritas y concentraciones de xilano comercial igual 0,5 % y 1,5 %. Por lo que finalmente se tienen 4 condiciones como se muestra en la Figura 2.1, cada uno en triplicado.





	0,5% Xilano	1,5% Xilano
Medio BMGY/BMMY		
Medio JCG/JCM		

Figura 2.1: Condiciones para estudiar como afecta el medio de crecimiento e inducción y la concentración de xilano comercial de madera de abedul en la producción de XOS y xilanasas. A 30°C, 200 rpm y 0,5 % de metanol.

El segundo experimento realizado bajo esta metodología, consistió en comparar la producción de XOS y xilanasas en el medio JCG/JCM con 0,5 % y 2,5 % de xilano extraído de rastrojos de trigo. Esto se observa en la Figura 2.2, considerar cada matraz Erlenmeyer en triplicado.



	0,5% Xilano	2,5% Xilano
Medio JCG/JCM		

Figura 2.2: Condiciones para estudiar como afecta la concentración de xilano extraído de rastrojos de trigo en la producción de XOS y xilanasas. A 30°C, 200 rpm y 0,5 % de metanol.

2.2.5. Producción de XOS en sistema *ex situ*

La producción de XOS en el sistema *ex situ* requiere de la enzima GtXyn10A, por lo que de manera análoga a lo descrito anteriormente, se crece la levadura *Pichia pastoris* recombinante en medio de crecimiento y posteriormente se pasan las células de esta levadura al medio de inducción para producir la enzima xilanasas. Luego de 72 horas de inducción con metanol al 0,5 %, se centrifuga el medio y se conserva el sobrenadante que contiene la xilanasas.

Posteriormente, se concentra la enzima producida utilizando precipitación con sulfato de amonio con 80 % de saturación. Para ello, el sobrenadante se mezcla lentamente con el sulfato de amonio agitando constantemente en frío. Una vez disuelta la sal, se mantiene

en agitación en la cámara fría por toda la noche. Al día siguiente, se centrifuga la solución y el pellet se resuspende en 10 [ml] de buffer citrato de sodio 50mM. Esta mezcla se vierte en membranas semipermeables y se realiza la diálisis para remover el sulfato de amonio presente. Finalmente, a lo obtenido se le mide actividad enzimática con el fin de agregar al sistema *ex situ* la actividad enzimática vista en el sistema *in situ*.

Para la comparación de ambos sistemas se realizaron dos experimentos en sistema *ex situ*. En el primero se realizan 4 reacciones enzimáticas de 1 [ml] en triplicados, donde dos de ellos se hacen en condiciones similares a las del sistema *in situ* (30°C, pH 6 y buffer de citrato de sodio 50mM) y los otros dos se hacen en condiciones óptimas para la actividad enzimática (50°C, pH 5 y buffer de citrato de sodio 50mM). El buffer utilizado es el mismo que el medio de inducción JCM para su posterior comparación con el sistema *in situ* y se agrega la misma concentración de enzima [U/ml] vista a las 24 horas en el *in situ*. Las reacciones que tienen la misma condición se diferencian en que una cuenta con xilano comercial de madera de abedul y el otro xilano extraído de rastrojos de trigo, ambos al 0,5%. Se extraen 200 μ l de muestra a las 24 horas para medir azúcares reductores y medir XOS en el HPLC. Para mayor claridad se resume lo anteriormente explicado en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Condiciones estudiadas en el sistema *ex situ*. Se utilizan condiciones similares a las del sistema *in situ* (30°C y pH 6) y en condiciones óptimas para la actividad enzimática (50°C y pH 5). El xilano comercial es xilano de madera de abedul, Megazyme.

Condición	Sustrato	Temperatura	pH
1	Xilano comercial	30°C	6
2	Xilano comercial	50°C	5
3	Xilano de trigo	30°C	6
4	Xilano de trigo	50°C	5

El segundo experimento se realizó en igual volumen para ambos sistemas y cada uno en triplicado. El volumen utilizado es 10 [ml], donde el sistema *in situ* se realizó con la metodología descrita anteriormente en el medio JCM pH 6 y el *ex situ* con buffer citrato 50mM, pH5. Si bien se decidió realizar el ensayo a los pH óptimos de cada sistema, ambos se incubaron por 24 horas a 30°C y 200rpm con el fin de comparar los sistemas con igual costo energético. La concentración de enzima en [U/ml] agregada al sistema *ex situ* fue la misma que se midió a las 24 horas en el sistema *in situ* (2,64 U/ml).

En la Figuran 2.3 se muestra un resumen de los dos experimentos realizados para comparar ambos sistemas.

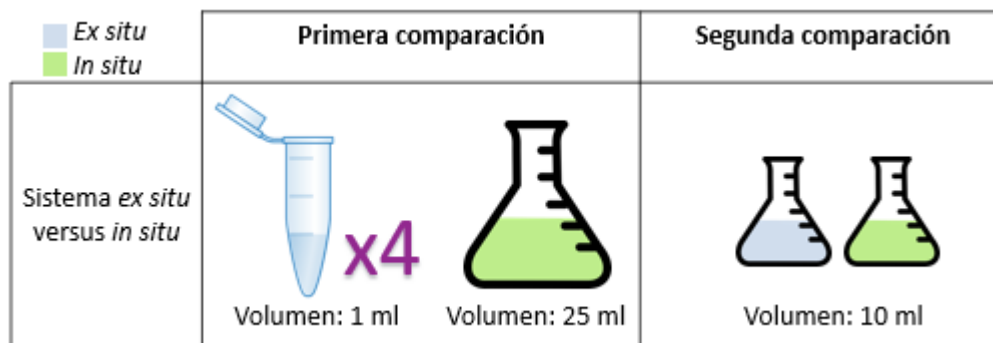


Figura 2.3: Experimentos realizados para la comparación del sistema *ex situ* e *in situ*.

2.2.6. Cuantificación de XOS

Una vez producidos los XOS en ambos sistemas, se tomaron 1 [ml] de muestra cada 24 horas y se centrifugaron para eliminar las células y/o restos de xilano presentes. Donde 100 μ l son destinados a medir la producción de XOS utilizando HPLC. Para ello, los 100 μ l de muestra se diluyen con 900 μ l de agua y, utilizando una jeringa y un filtro de 0,22 μ m, se traspara la mezcla a los viales para HPLC.

La columna de cromatografía a utilizar es la Rezex RSO-oligosacárido Ag+ (4) % (Phenomenex). Se utiliza un flujo de 0,3 ml/min con un volumen de inyección de 10 μ l a 65°C. La fase móvil se realiza con agua milli-Q, filtrada con un poro de diámetro 0,22 μ m y desairada por sonicación [66].

Para analizar los picos obtenidos por el HPLC resulta necesario conocer los tiempos de retención y curvas de calibración de cada uno de los XOS producidos bajo las condiciones anteriormente señaladas. Estos tiempos y curvas se encuentran presentes en los Anexos C.2 y B.2, respectivamente. Con los tiempos de retención se determinó cada compuesto presente en la muestras, y se relacionó el área asociada al *peak* con la concentración. Para ello se utilizaron las ecuaciones obtenidas de la curva de calibración de xilobiosa y xilotriosa.

La producción total de XOS se estimó como la suma de las concentraciones de xilobiosa y xilotriosa. El rendimiento se calculó considerando el factor de conversión de la tabla 2.3, considerando que la cantidad de producción teórica no corresponde al total del sustrato agregado inicialmente. Esto es, que solo el 88 % de la concentración inicial se convertirá en producto. Así, la fórmula utilizada fue la presente en la Ecuación 2.1

$$\text{Rendimiento}[\%] = \frac{\text{Producción real}}{\text{Producción teórica}} \cdot 100 \% \quad (2.1)$$

Los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism, donde se introdujeron los datos en triplicado y se calcularon las barras de error de cada uno de los datos. Se realizó un análisis *t-student* a los resultados para determinar si existe diferencia significativa en la producción de XOS entre los medios de cultivo utilizados.

2.2.7. Ensayo de actividad enzimática de la xilanasa GTxyn10A

Los ensayos de actividad enzimática realizados a los medios de cultivos mencionados antes, se llevaron a cabo extrayendo 1 [ml] de los medios cada 24 horas por 4 días para realizar un ensayo funcional con el sustrato xilano heterogéneo y graficar la curva de inducción.

En primer lugar, se miden los azúcares reductores basales presentes en las muestras debido a la degradación del xilano durante la inducción de la enzima y su actividad hidrolítica. Para ello se realiza una medición de la producción de azúcares reductores desde xilano, en donde en placas PCR de 96 pocillos se mezclan 100 μl de muestra con 100 μl de DNS, todo en triplicado. Se deja reaccionando por 5 minutos a 90°C en el termoblock y luego se enfría por 5 minutos en hielo. Se toman 100 μl de cada muestra y se traspasan a una placa de 96 pocillos para medir la absorbancia de la solución a 550 [nm] en el espectrofotómetro de placas.

Luego se mide la actividad enzimática de las muestras mezclando en las placas de 96 pocillos 25 μl de muestra con 75 μl de buffer citrato de sodio, añadiendo xilano de madera de abedul al 1%, todo en triplicados. Se deja reaccionando a 50°C por 10 minutos, posteriormente se agrega 100 μl de DNS y se incuba a 90°C por 5 minutos en el termoblock. Se deja enfriando en hielo por 5 minutos y se traspasan 100 μl de la mezcla una placa de 96 pocillos y se lee en espectrofotómetro a 550 [nm].

Para el calculo final de la actividad enzimática en el medio se consideró el medio basal, es decir, a la actividad enzimática medida con xilano se le descontó los azúcares reductores presentes inicialmente en las muestras. Se utiliza una curva de calibración de xilosa para la medición de la producción de azúcares reductores desde xilano, en donde se relaciona la OD_{550} con la concentración de xilosa, la curva se presenta en el Anexo B.1. Es preciso señalar que hubieron muestras que debieron ser diluidas para que las mediciones estuvieran dentro de la curva de calibración realizada.

La actividad enzimática en base a la concentración de azúcares reductores (xilosa) se calculó utilizando la Ecuación 2.2, con $PM_{xilosa} = 150, 13\text{g/mol}$.

$$\text{Actividad enzimática [U/ml]} = \frac{[\text{Xilosa}]}{PM_{xilosa} \cdot t_{reacción}} \quad (2.2)$$

Además, a las muestras extraídas también se les midió el pH con un pH-metro para analizar de mejor manera las condiciones a las que se ven afectadas la producción de la enzima y su actividad hidrolítica.

2.2.8. Análisis de la producción constante de XOS luego de 24 horas

De los experimentos realizados en el sistema *in situ* se notó que luego de las 24 horas, aproximadamente, la producción de XOS se mantenía constante. Ante esto se pensaron en las posibles causas de este efecto, donde se considero que la actividad enzimática se

veía inhibida por producto, que el xilano residual en el medio de cultivo no era capaz de seguir siendo hidrolizado solo por la xilanasa y, por ultimo, que la enzima perdiera su actividad hidrolítica.

2.2.8.1. Inhibición de xilanasa por producto (XOS)

Debido a la poca disponibilidad de XOS, en vez de realizar una curva de Michaelis-Menten para observar la posible inhibición, se decidió hacer una curva de cinética en presencia y ausencia de XOS. En primer lugar, se hizo una curva cinética previa para evaluar cual era la concentración adecuada de enzima para observar en un tiempo prudente la degradación del xilano hasta llegar a una constante.

En tubos eppendorf de 2 [ml] se agregaron 200 μ l de enzima y 600 μ l de buffer citrato de sodio 50mM pH 6 con xilano al 1% y 0,03 mg/ml de XOS (xilobiosa + xilotriosa), aproximadamente. En cuanto a la curva sin presencia de XOS, se hizo de la misma manera excepto que no se le agregó XOS. El control también se hizo de manera análoga al primero descrito, pero sin enzima. Estos tubos se dejaron reaccionando en el termoblock a 50°C y 200 rpm por 140 minutos, donde se tomo muestras a los 10 minutos, y luego cada 20 minutos, todo en triplicado.

A las muestras extraídas se les midió los XOS producidos utilizando la técnica HPLC y además se les midió la actividad enzimática realizando una medición de azúcares reductores para hacer la curva cinética. A partir de esta última, se comparan las pendientes de la recta tangente al inicio de la curva. Se analizó si las pendientes eran estadísticamente similares con el método *t-student*.

Para aplicar el método *t-student*, se estimó la pendiente como la línea de tendencia de los puntos de un pequeño intervalo inicial del ajuste polinomial en tercer grado que se le realizó a los datos. A partir de esto, se aplicó un ensayo F para ver si las varianzas eran homogéneas o no. El cálculo del ensayo F se muestra en la Ecuación 2.3, donde S_a^2 es la varianza de la pendiente a y S_b^2 es la varianza de la pendiente b, siendo $S_a^2 > S_b^2$.

$$F_{calc} = \frac{S_a^2}{S_b^2} \quad (2.3)$$

En cuanto al cálculo de la varianza de la pendiente a, este se muestra en la Ecuación 2.4, donde S_{xy}^2 es la covarianza de las coordenadas x e y de los puntos de una de las pendientes y n es el número de datos con los que se construyó la línea de tendencia.

$$S_a^2 = \frac{S_{xy}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}} \quad (2.4)$$

Una vez obtenido el valor de F_{calc} este se compara con el F_{tab} , el cual corresponde al F tabulado. Si $F_{calc} < F_{tab}$, entonces la varianza de las dos pendientes son homogéneas. Con esta conclusión se realiza el ensayo t utilizando la Ecuación 2.5, donde a es la pendiente de la recta a y b es la pendiente de la recta b. Si t_{calc} es menor que el t_{tab} , considerando $p=0,05$, entonces se infiere que las pendientes son estadísticamente similares.

$$t_{calc} = \frac{|a - b|}{\sqrt{S_a^2 + S_b^2}} \quad (2.5)$$

2.2.8.2. Estudio de degradabilidad por xilanasas del xilano residual

En primer lugar se realizó un sistema *in situ* bajo las mismas condiciones mencionadas en la sección que se describe la producción de XOS en sistema *in situ*. Solo se redujo el volumen del medio de crecimiento a 100 [ml] y por lo tanto el volumen del medio de inducción se redujo a 10 [ml]. Luego de 72 horas de inducción se tomó el contenido para estudiar lo que pasa con el xilano residual al agregar nuevas enzimas, xilanasas y arabinofuranosidasa.

En tubos eppendorf de 1.5 [ml] se agregó 600 μ l de enzima en buffer citrato 50mM y pH 6 y 750 μ l de muestra. Se hicieron 3 reacciones con enzimas (X+A, X, A) y un control. Estas se detallan en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Enzimas utilizadas para la hidrólisis del xilano residual. A: Arabinofuranosidasa. X: Xilanasas. Control: Sin Arabinofuranosidasa ni Xilanasas.

Enzima	A+X	X	A	Control
Arabinofuranosidasa [U/ml]	5	0	5	0
Xilanasas [U/ml]	5	5	0	0

Posteriormente, se incuban a 50°C en el termoblock por 140 minutos y se tomaron muestras a los 10 minutos y luego cada 20 minutos. Se midió la producción de XOS por HPLC, como se indica en la sección 2.2.6. También se midió la actividad enzimática tal como se describió en la sección anterior de ensayo de actividad enzimática (punto 2.2.7). Se realizó un análisis *t-student* a los resultados para determinar si existe diferencia significativa en la producción de XOS entre los sistemas de producción.

2.2.8.3. Análisis estadístico

A los resultados obtenidos se les aplicó un análisis estadístico con el objetivo de detectar diferencias significativas entre las muestras. Se empleó el software GraphPad Prism 8.0.1 para realizar un análisis de varianza (ANOVA) para el crecimiento de *P. pastoris* en distintos medios de cultivo y se realizó un análisis *t-student* al resto de los resultados para determinar si existe diferencia significativa entre dos sistemas distintos. Para ambos análisis se consideró un intervalo de confianza del 95 %.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. Evaluación de medios diseñados en la producción de XOS y xilanasa

El primer objetivo específico de este trabajo es comparar la producción de xilanasa recombinante y de XOS en el sistema *in situ*, en medios tradicionalmente utilizados para *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGtXyn10A con medios de cultivos modificados (JCG medio para crecimiento y JCM medio para inducción enzimática). Estos medios de cultivos fueron propuestos en la tesis en desarrollo de Coronado, J. [62] y se basaron en variaciones en la fuente de nitrógeno y en el buffer utilizado con respecto a los medios de cultivo usados tradicionalmente para el crecimiento de *Pichia pastoris* y la expresión de proteínas recombinantes, denominados BMGY y BMMY, respectivamente. La composición de estos medios se encuentran en el Anexo A. Estos cambios se realizaron debido a que en estudios previos se ha observado que el YNB y el fosfato (fuente de nitrógeno y buffer presentes en los medios tradicionales) producen un efecto inhibitorio en la enzima xilanasa GtXyn10A [67].

A continuación, se presenta el estudio del crecimiento de *Pichia pastoris* recombinante KM71/9KGtXyn10A, la producción de XOS y la actividad enzimática observados en los distintos medios de inducción en el sistema *in situ*. De este estudio se analiza los factores que afectan la producción de XOS y xilanasa, y la actividad enzimática.

3.1.1. Crecimiento de *Pichia pastoris* KM71/9KGtXyn10A en distintos medios de cultivo

Para determinar el medio de crecimiento a utilizar para el crecimiento de *Pichia pastoris* KM71 con xilanasa recombinante (GtXyn10A) se estudiaron cuatro medios de cultivos distintos, más el medio BMGY (medio tradicional para esta levadura). Los cuatro medios de crecimiento mencionados corresponden a variaciones del medio BMGY realizados en la tesis de Coronado [62], en los cuales se utilizan dos concentraciones distintas (2,4% y 3,6%) de extracto de levadura (y.e.) y dos buffers distintos (buffer fosfato de potasio y buffer citrato de sodio). Estos fueron denominados 3,6 y.e. + citrato, 2,4 y.e. + citrato, 3,6 y.e. + fosfato y 2,4 y.e. + fosfato (medio JCG), cuyas composiciones se describen en las Tablas 3.1 y 3.2, medio de crecimiento e inducción, respectivamente.

Tabla 3.1: Composición de los medios de cultivo de crecimiento a comparar. BMGY es medio tradicionalmente usado para el crecimiento de *Pichia pastoris* y JCM es el medio de crecimiento modificado a partir del medio BMGY.

Medio BMGY			Medio JCG		
Componente	Cantidad	Unidad	Componente	Cantidad	Unidad
Extracto de levadura	1	%	Extracto de levadura	2,4	%
Peptona	2	%	Fosfato de potasio	100	mM
Fosfato de potasio	100	mM	Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$	%
YNB	1,34	%	Glicerol	1	%
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$	%			
Glicerol	1	%			

Tabla 3.2: Composición de los medios de cultivo de inducción a comparar. BMMY es medio tradicionalmente usado para la inducción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* y JCM es el medio de inducción modificado a partir del medio BMMY.

Medio BMMY			Medio JCM		
Componente	Cantidad	Unidad	Componente	Cantidad	Unidad
Extracto de levadura	1	%	Extracto de levadura	2,4	%
Peptona	2	%	Citrato de sodio	200	mM
Fosfato de potasio	100	mM	Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$	%
YNB	1,34	%	Metanol	0,5	%
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$	%			
Metanol	0,5	%			

En la Figura 3.1 se observa que los medios que contienen el buffer citrato de sodio presentan un menor crecimiento de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante en comparación con los medios que contienen buffer fosfato de potasio, lo que puede deberse a que se utilizó una concentración muy baja para buffer citrato. Esto disminuye la capacidad amortiguadora y podría haber provocado un cambio significativo en el pH, lo que afectaría negativamente el crecimiento de *Pichia pastoris*, cuyo pH recomendado para su crecimiento es igual a 6. Se propone evaluar el crecimiento con el buffer citrato de sodio en una concentración mayor a 200 [mM].

Además, de la Figura 3.1 se revela una similitud en el crecimiento de la levadura en el medio BMGY y aquellos que incluyen el buffer fosfato de potasio. De este resultado se puede decir que la sustitución de la fuente de nitrógeno, al reemplazar YNB y peptona por una mayor concentración de extracto de levadura, no influye en el crecimiento de *Pichia pastoris*, bajo las condiciones estudiadas. Estos resultados sugieren que los medios diseñados podrían emplearse en la fase de crecimiento del proceso. En este trabajo no se midió la evolución del pH en los medios de cultivo, sin embargo, se recomienda controlar el pH ya que permitirá explicar más adecuadamente el efecto que tiene el medio de cultivo

en el crecimiento de *Pichia pastoris*.

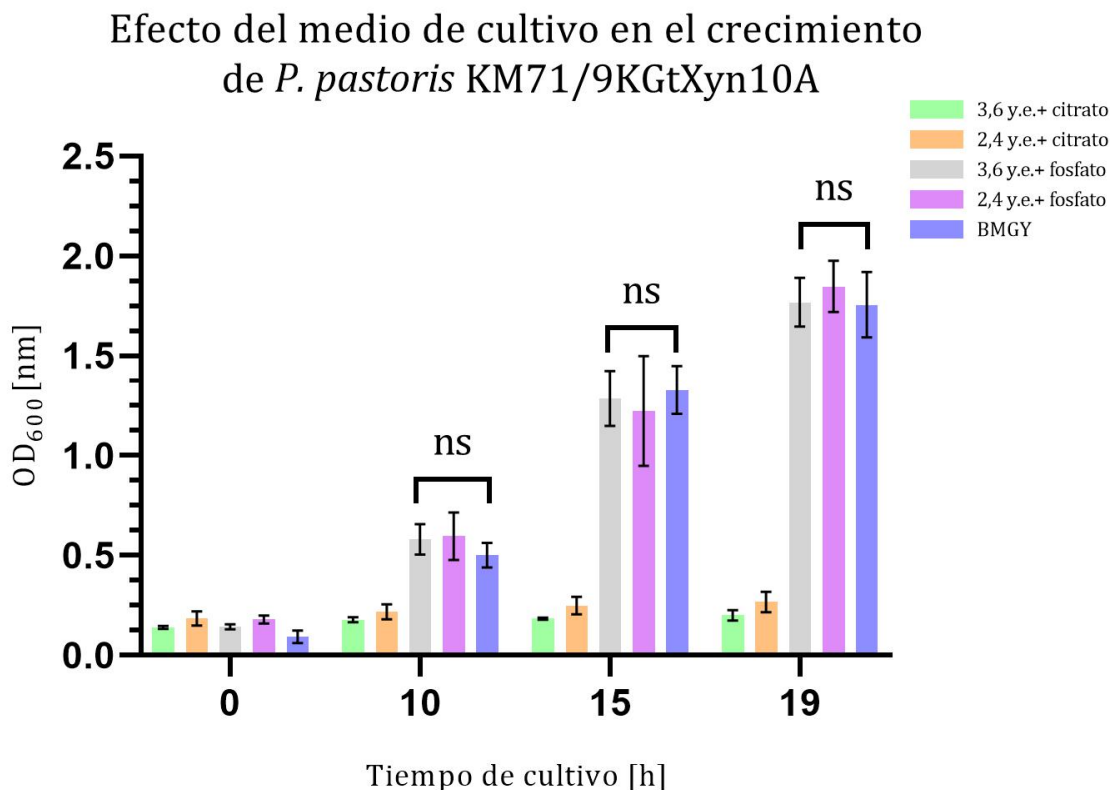


Figura 3.1: Crecimiento de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A con xilanas recombinante en distintos medios de cultivo. Condiciones de crecimiento: 30°C, pH 6 y 200 rpm. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Para determinar estadísticamente cual es mejor medio de crecimiento para *Pichia pastoris*, se realizó un análisis estadístico ANOVA de aquellos medios de cultivo donde se vió una mayor densidad óptica, con un intervalo de confianza del 95 %. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 3.3 y se concluye que no hay una diferencia significativa (ns) en el crecimiento de *P. pastoris* en los medios BMGY, 2,4 % y.e. + fosfato y 3,6 % y.e. + fosfato ya que los *p-value* fueron mayores a 0,05.

Tabla 3.3: Resultados del análisis ANOVA para el crecimiento de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A en distintos medios de cultivo.

Datos comparados		<i>p-value</i>	Significativamente diferente
Medios de cultivo	Tiempo		
BMGY -	10 [h]	0,424	No
2,4y.e.+fosfato (JCG) -	15 [h]	0,799	No
3,6y.e.+fosfato	19 [h]	0,699	No

Ya que el crecimiento de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A en los medios BMGY, 3,6 y.e. + fosfato y 2,4 y.e. + fosfato (medio JCG) no presentan diferencias significativas, para elegir el medio a utilizar en este trabajo se utiliza un criterio económico. Los medios de crecimiento sólo varían en la composición de la fuente de nitrógeno. En la Tabla 3.4 se observa el costo de la fuente de nitrógeno de cada medio de cultivo. De acuerdo a esto se usará el medio que contiene un menor porcentaje de extracto de levadura denominado 2,4 y.e. + fosfato debido a que permite disminuir costos de producción. Este medio de crecimiento es el denominado JCG.

Tabla 3.4: Costos de los reactivos que forman parte de la fuente de nitrógeno de los medios de crecimiento. Precio al 2023 [68] [69] [70].

Medio BMGY		
Reactivo	Cantidad	Precio en 1L de cultivo (CLP)
Extracto de levadura	1 %	951
Peptona	2 %	4500
YNB	1,34 %	17956
Total		23407
Medio 2,4 % y.e. + fosfato		
Reactivo	Cantidad	Precio en 1L de cultivo (CLP)
Extracto de levadura	2,4 %	2282
Total		2282
Medio 3,6 % y.e. + fosfato		
Reactivo	Cantidad	Precio en 1L de cultivo (CLP)
Extracto de levadura	3,6 %	3424
Total		3424

3.1.2. Producción de XOS y xilanas recombinante en medios de cultivo suplementados con xilano comercial en sistema *in situ*

Los principales productos de la hidrólisis de xilano son xilobiosa, xilotriosa y otros oligómeros presentes en el polisacárido [71] que se midieron en la columna Rezex RSO-oligosacárido Ag+ (4) % (Phenomenex) en HPLC. Además, entre los XOS existentes, la xilobiosa y la xilotriosa son los prebióticos más eficaces para inducir bacterias intestinales [72], es por esto que la producción de XOS se estimó como la suma de la producción de xilobiosa y xilotriosa. La xilosa también se produjo, pero en bajas cantidades.

Los medios de inducción utilizados fueron el medio BMMY y el JCM, los cuales se diferencian en la composición de la fuente de nitrógeno y en el buffer utilizado, ver composición en Anexo A. Ya que anteriormente se observó que el medio de crecimiento con 2,4 % de extracto de levadura es estadísticamente similar al medio tradicional, se utiliza un medio similar denominado JCM. Además, este utiliza buffer citrato de sodio ya que se ha observado que el buffer fosfato de potasio, utilizado en el medio BMMY, presenta un efecto inhibitorio en la actividad enzimática de la xilanas a utilizar [62].

El gráfico en la parte a) de la Figura 3.2 presenta la producción de xilobiosa en el medio *in situ* con 0,5% de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme) en los medios BMMY y JCM. En las primeras 48 horas se observa que la producción de xilobiosa es estadísticamente mayor en el medio BMMY que en el JCM. Sin embargo, luego de las 72 horas se observa en la Tabla 3.5 una concentración estadísticamente similar de xilobiosa entre el medio BMMY y JCM. En el gráfico no se observa una disminución en la concentración de xilobiosa debido a que la xilanasa no es capaz de hidrolizarla [71]. La diferencia inicial puede deberse a que en el medio JCM la enzima produce más xilotriosa que xilobiosa, como se ve en el gráfico en b de la Figura 3.2.

En cuanto al gráfico en la parte b) de la Figura 3.2 se observa que la concentración de xilotriosa disminuye drásticamente luego de las 24 horas en el medio BMMY, diferenciándose significativamente de la concentración en el medio JCM. Aunque se sabe que la hidrólisis de xilotriosa a xilobiosa y xilosa en general es insignificante o limitada [71], esto podría deberse a que la xilanasa cuenta con las condiciones necesarias en el medio BMMY para continuar hidrolizando xilooligosacáridos de mayor grado de polimerización, como xilotriosa. Para entender mejor este comportamiento también se midió el pH y la actividad enzimática en los medios de cultivo, presentes en las Figuras 3.5 y 3.6.

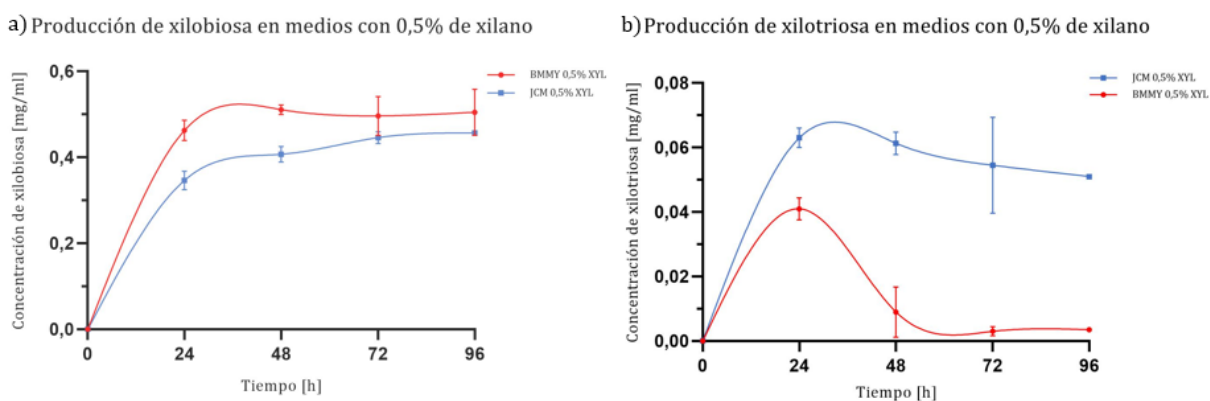


Figura 3.2: Producción de xilooligosacáridos en medios BMMY y JCM con 0,5% de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme) como sustrato en cultivos de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. a) Concentración de xilobiosa. b) Concentración de xilotriosa. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Para determinar estadísticamente si la producción de xilobiosa y xilotriosa es significativa en ambos medios de cultivo se realizó un análisis estadístico de *t-student* con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 3.5 y se concluye que luego de las 72 [h] la producción de xilobiosa es estadísticamente similar en ambos medios de cultivo, BMMY y JCM.

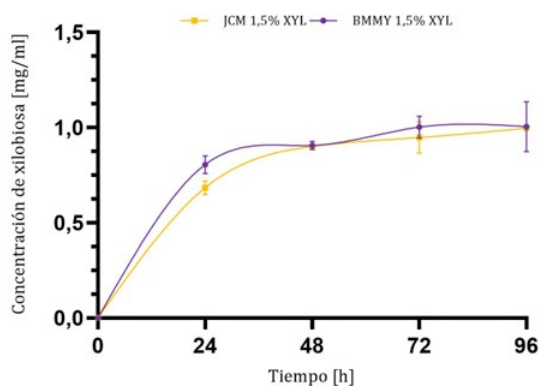
Tabla 3.5: Resultados del análisis *t-student* para la producción de xilobiosa y xilotriosa en medios de cultivo BMMY y JCM con 0,5% de xilano comercial.

Datos comparados	Producción xilobiosa		Producción xilotriosa	
	<i>p-value</i>	Significativamente diferente	<i>p-value</i>	Significativamente diferente
24 [h]	0,003	Sí	0,001	Sí
48 [h]	0,001	Sí	0,001	Sí
72 [h]	0,269	No	0,040	Sí
96 [h]	0,334	No	0,001	Sí

De manera análoga, se midieron los XOS producidos en los medios BMMY y JCM con 1,5% de xilano comercial. En el gráfico en la parte a) de la Figura 3.3 se muestra la producción de xilobiosa, que luego de las 48 horas alcanza una concentración constante. La producción de xilotriosa se observa en el gráfico en la parte b) de la Figura 3.3, la cual presenta un comportamiento similar al gráfico en b de la Figura 3.2, mencionada anteriormente.

El xilano presenta diversos residuos que interfieren con el acceso de la enzima a los enlaces β -1,4-glicosídicos, lo que podría provocar que la enzima no corte de manera eficiente las cadenas internas del xilano debido a su efecto estérico [66] [73]. Esto conlleva a que, para ambas concentraciones de xilano (0,5% y 1,5%), la producción de xilobiosa sea mayor que la producción de xilotriosa, alcanzado valores de hasta 10 veces más. Para mejorar el rendimiento de la hidrólisis se podría combinar su uso con una enzima de menor tamaño para lograr un efecto sinérgico y con ello, aumentar su eficiencia.

a) Producción de xilobiosa en medios con 1,5% de xilano



b) Producción de xilotriosa en medios con 1,5% de xilano

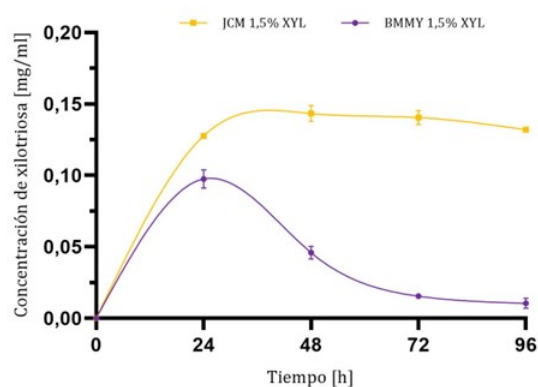


Figura 3.3: Producción de xilooligosacáridos en medios BMMY y JCM con 1,5 % de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme) como sustrato en cultivos de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. a) Concentración de xilobiosa. b) Concentración de xilotriosa. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Para determinar si la producción de xilobiosa y xilotriosa es estadísticamente diferente o similar en ambos medios de cultivo se realizó un análisis estadístico de *t-student* con un intervalo de confianza del 95 %. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 3.5 y se concluye que luego de las 48 [h] la producción de xilobiosa es estadísticamente similar en ambos medios de cultivo, BMMY y JCM.

Tabla 3.6: Resultados del análisis *t-student* para la producción de xilobiosa y xilotriosa en medios de cultivo BMMY y JCM con 1,5 % de xilano comercial.

Datos comparados	Producción xilobiosa		Producción xilotriosa	
	<i>p-value</i>	Significativamente diferente	<i>p-value</i>	Significativamente diferente
24 [h]	0,022	Sí	0,003	Sí
48 [h]	0,720	No	0,0001	Sí
72 [h]	0,481	No	0,001	Sí
96 [h]	0,935	No	0,0004	Sí

En la Figura 3.4 se muestra la producción de XOS, que corresponde a la suma de las concentraciones de xilobiosa y xilotriosas medidas. Se nota que, a mayor concentración de sustrato, mayor es la producción de XOS. También, se hizo un análisis estadístico para conocer si la producción de XOS es similar para ambos medios de cultivo, BMMY y JCM. Los resultados se muestran en la Tabla 3.7, de la cual se determina que en el medio con 0,5 % de xilano la producción de XOS fue estadísticamente similar luego de las 72 [h]. En cuanto a la producción de XOS en el medio con 1,5 % de xilano, se observa que en casi

todos los puntos, excepto a las 48 [h], la producción de XOS es estadísticamente similar en ambos medios (BMMY y JCM).

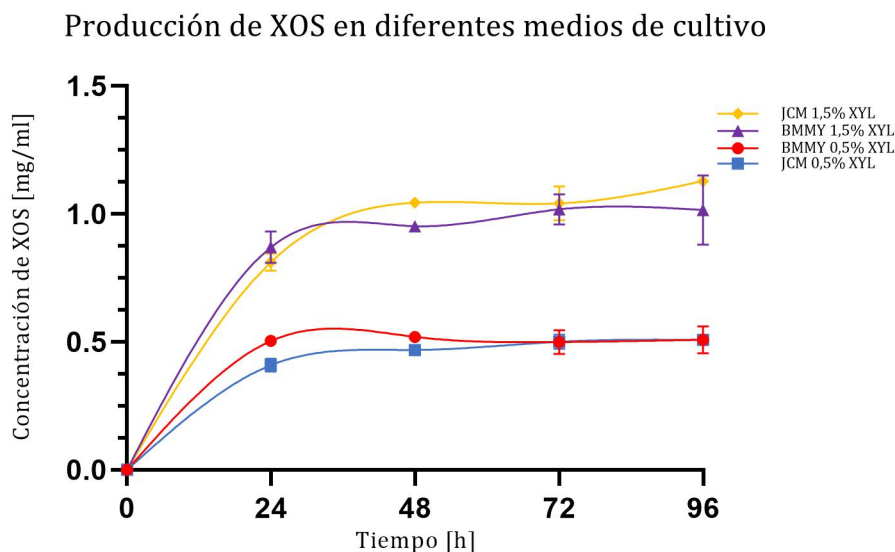


Figura 3.4: Producción de XOS en diferentes medios de cultivo. Medios corresponden a JCM y BMMY con 0,5 % y 1,5 % de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme). Cultivos de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Tabla 3.7: Resultados del análisis *t-student* para la producción de XOS en medios de cultivo BMMY y JCM con 0,5 % y 1,5 % de xilano comercial.

Datos comparados	XOS con 0,5 % xilano		XOS con 1,5 % xilano	
	<i>p-value</i>	Significativamente diferente	<i>p-value</i>	Significativamente diferente
24 [h]	0,008	Sí	0,222	No
48 [h]	0,011	Sí	0,0051	Sí
72 [h]	0,980	No	0,718	No
96 [h]	0,990	No	0,360	No

Sin embargo, en la Tabla 3.8 se observa que en los medios con 0,5 % de xilano el rendimiento de XOS producidos fue aproximadamente un 10 % mientras que en los medios con 1,5 % de xilano el rendimiento fue aproximadamente 7 %. La disminución del rendimiento en la producción de XOS puede deberse a varias causas. Una de ellas es una

posible inhibición por producto (XOS) ya que se ha observado en algunas xilanasas cierta afinidad con XOS, los cuales se unen al sitio activo de la enzima y se comportan como inhibidores competitivos con el sustrato a hidrolizar[45]. A Los medios que tienen 0,5 % y 1,5 % de xilano presentan una producción de xilanasas similar, sin embargo, el medio suplementado con 1,5 % produce una mayor concentración de XOS. Se podría deber a que la actividad enzimática se ve afectada por la presencia de XOS y la velocidad de la acción enzimática comience a disminuir por el aumento de la concentración del sustrato, saturando la enzima [74]. Esto podría ser una característica a mejorar del sistema *in situ* propuesto.

Sumado a lo anterior, se conoce que la velocidad de la hidrólisis normalmente disminuye a medida que la longitud de la cadena del sustrato oligomérico disminuye puesto que las xilanasas muestran mayor actividad hidrolítica con el xilano polimérico [71]. Estas consideraciones podrían explicar porqué la concentración de XOS no disminuye y se mantiene prácticamente constante luego de las 24 horas aún con xilanasas presente en el medio. A partir de estos valores, se puede concluir que luego de 72 [h] los medios BMMY y JCM producen la misma cantidad de XOS para ambas concentraciones de xilano.

Tabla 3.8: Rendimiento de la producción de XOS a las 24 horas en sistema *in situ* con *Pichia Pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante en medios de cultivo JCM y BMMY con diferentes concentraciones de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme), 0,5 % y 1,5 %.

Medio de cultivo	Concentración xilano [%]	Rendimiento [%]
BMMY	0,5	10,0
	1,5	7,3
JCM	0,5	10,0
	1,5	7,4

Se midió la actividad enzimática mediante la medición de la producción de azúcares reductores desde xilano, obteniéndose el gráfico presente en la Figura 3.5, donde se aprecia que hubo una mayor actividad enzimática en los medios JCM en comparación con el medio BMMY, siendo mayor hasta aproximadamente 3 veces. Esto indica que hubo una mayor producción de xilanasas en el medio JCM. Sin embargo, una mayor concentración de enzima no produjo una mayor producción de XOS. Esto se puede explicar en cierta parte analizando el pH del medio.

En la Figura 3.6 se muestra cómo varió el pH en el tiempo, donde los medios JCM alcanzaron un pH cercano a 8 y los medios BMMY cercano a 6,5. Esto indicaría que el medio BMMY ofrece una mejor condición para la actividad enzimática ya que el pH óptimo de esta xilanasas es 5. Además, se ha observado que la actividad de la enzima a pH 8 disminuye llegando a un 40 % su actividad [33], lo cual explicaría una menor producción de XOS a pesar de que los medios JCM cuentan con mayor concentración de enzima. También se observa, en la Figura 3.6, que a las 96 horas en el medio JCM

1,5% XYL hay una caída del pH. Esto se debe a que uno de los triplicados obtuvo un pH mucho menor (alrededor de 6,5), lo que podría deberse a que en aquel medio hubo un cambio que provocó que el metabolismo de la levadura haya producido compuestos indeseados que acidificaran el medio de cultivo [75].

Producción de xilanasa en medios BMMY y JCM

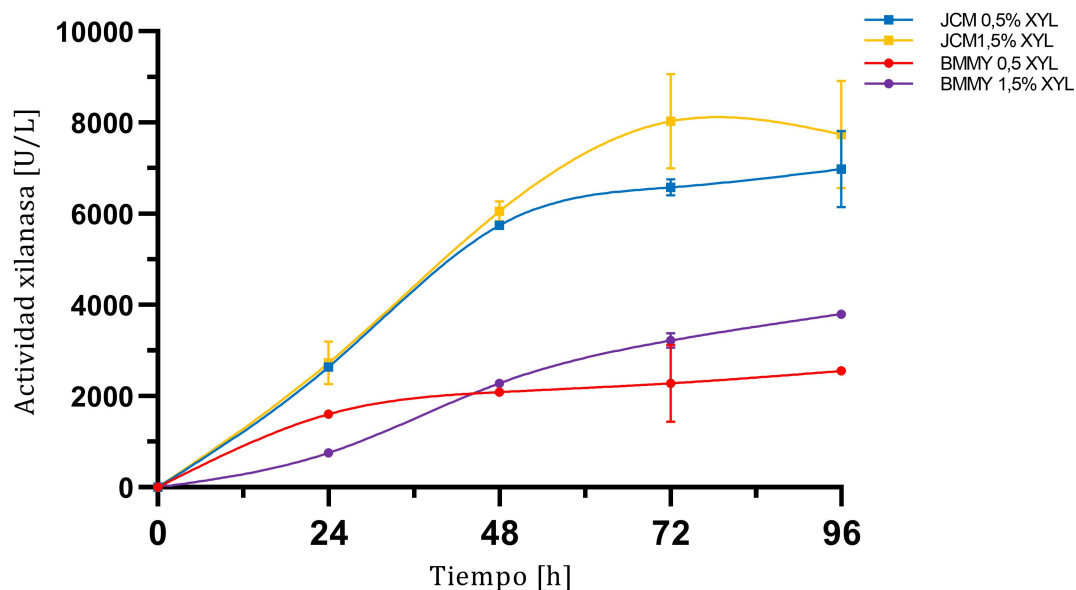


Figura 3.5: Producción de xilanasa en medios BMMY y JCM. Sistema *in situ* con 0,5% y 1,5% de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme). Cultivos de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Evolución del pH en cultivos de *P. pastoris* KM71/pPIC9KTxyn10A en medios BMMY y JCM

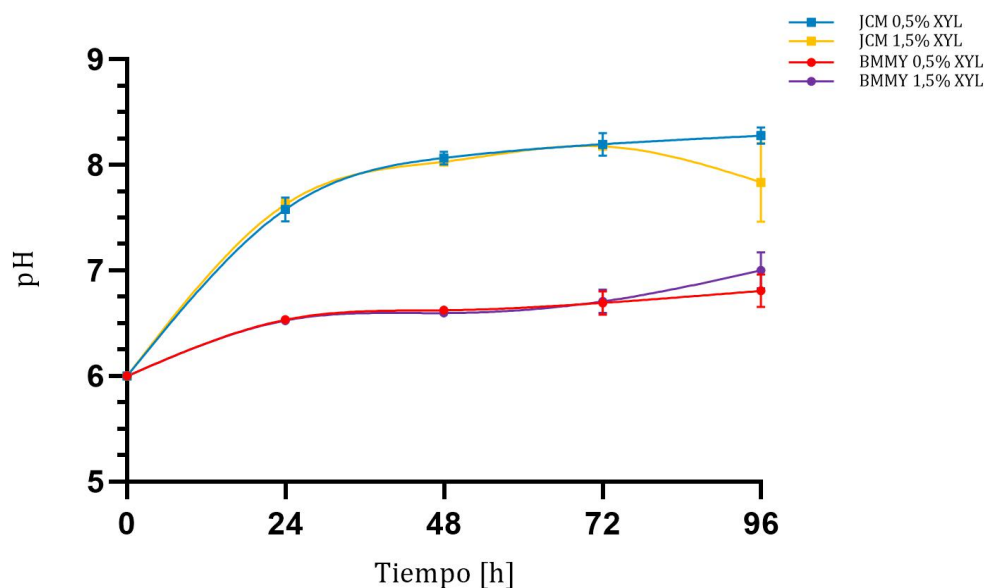


Figura 3.6: Evolución del pH en cultivos de *P. pastoris* KM71/pPIC9KTxyn10A en medios BMMY y JCM, en sistema *in situ* con 0,5 % y 1,5 % de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme). *Pichia pastoris* recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores (Figuras 3.4 y 3.5) y que el medio de inducción BMMY fue preparado con buffer fosfato de potasio, no es posible notar su efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de la xilanasas observado en otros estudios [62]. Esto se debe a que los medios con buffer fosfato mantienen de mejor manera el pH cercano al óptimo para la actividad de la xilanasas comparado con el buffer citrato de sodio. Se postula que este efecto podría generar un equilibrio entre un posible efecto inhibitorio que podría tener el medio si tuviera buffer fosfato de potasio y el mantenimiento de un pH adecuado que entregaría este mismo buffer para la actividad enzimática.

A partir de los datos anteriores se estudió la relación entre la producción de XOS y enzima presentes en cada medio de cultivo. Este análisis es interesante porque permite evaluar la eficiencia de la enzima en la producción de XOS en cada uno de los medios de cultivo. Además, es fundamental para optimizar los procesos de producción de XOS a escala industrial. Facilita la determinación de la cantidad de enzima necesaria para generar una cierta cantidad de XOS, lo que influye en la planificación y eficiencia del proceso [76]. En la Figura 3.7 se observa la producción de XOS por unidad de enzima. Por un lado, se nota que los medios BMMY tienen una mayor producción de XOS por unidad de enzima que los medios JCM. Esto refuerza lo mencionado anteriormente sobre

el efecto del pH y el efecto inhibitorio del buffer fosfato de potasio. Donde pareciera que, en tiempos prolongados, el pH afecta más en la actividad enzimática que la inhibición del buffer fosfato. El efecto del pH puede solucionarse utilizando un reactor con pH controlado.

Además, se observa que los medios con mayor concentración de sustrato tienen mayor producción de XOS por unidad de enzima que los que tienen menor concentración. Esto indica que la concentración de sustrato en el medio de reacción no es saturante. Cabe destacar, que la irregularidad observada en el medio BMMY 1,5 % xilano a las 24 horas, puede deberse a la sub-estimación en la medición de la actividad enzimática medida en ese punto. No se sabe a ciencia cierta a que podría deberse que en el medio BMMY 1,5 % XYL haya una menor producción de xilanasa a las 24 horas con respecto al medio BMMY 0,5 % XYL ya que se esperaría que tuviera el mismo comportamiento visto en los medios JCM con 0,5 % y 1,5 % XIL. Sin embargo, se podría intuir que en aquel medio, una mayor concentración de xilano podría haber provocado un retardo en la producción adecuada de la enzima.

A partir de lo anterior, se puede concluir que el medio de inducción diseñado (JCM) disminuye la eficiencia de la enzima en la producción de XOS en comparación con el medio tradicional (BMMY). En cuanto a la producción de la enzima, *P. pastoris* produce más xilanasa por unidad de volumen en el medio JCM que en el medio BMMY.

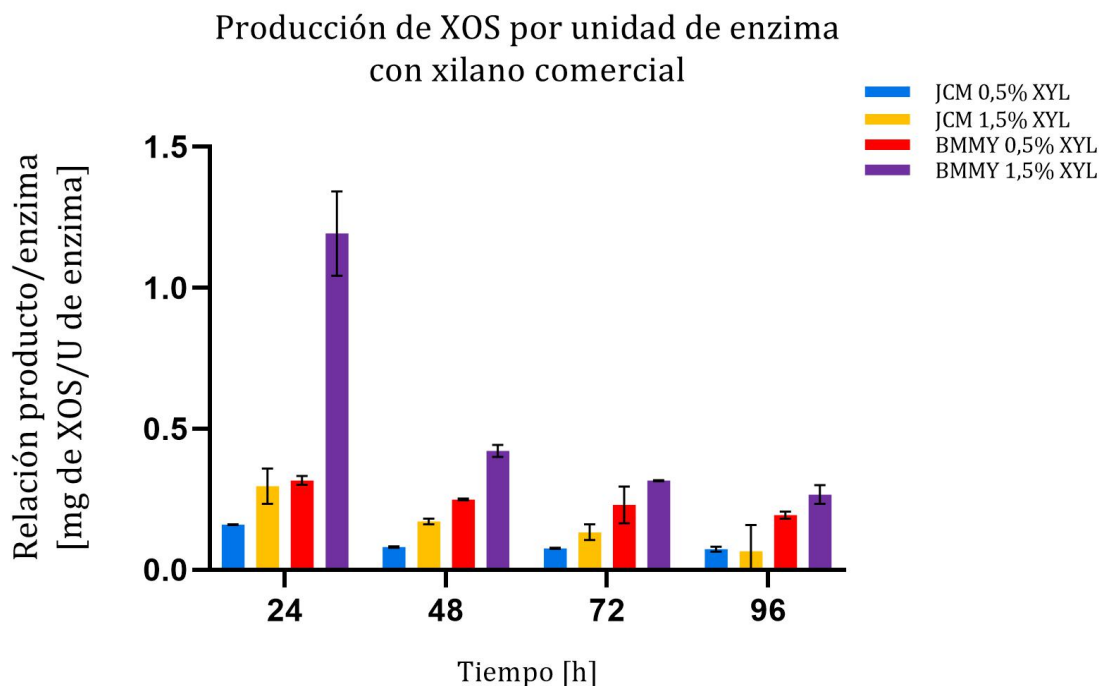


Figura 3.7: Producción de XOS por unidad de enzima con 0,5 % y 1,5 % de xilano comercial de madera de abedul (Megazyme). Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

En la Tabla 3.9 se muestra el análisis estadístico de la producción de XOS por unidad de enzima, de la cual se determina que en todos los tiempos, excepto a las 72 [h] para 0,5 % de xilano y a las 96 [h] para 1,5 % de xilano, la relación producto/enzima es estadísticamente diferente, ya que los *p*-value obtenidos fueron menores a 0,05.

Tabla 3.9: Resultados del análisis *t-student* para la producción de XOS por unidad de enzima en medios de cultivo BMMY y JCM para ambas concentraciones de xilano comercial de madera de abedul.

Datos comparados	Medios con 0,5 % xilano		Medios con 1,5 % xilano	
	<i>p-value</i>	Significativamente diferente	<i>p-value</i>	Significativamente diferente
24 [h]	0,0009	Sí	0,0159	Sí
48 [h]	<0,0001	Sí	0,0045	Sí
72 [h]	0,0775	No	0,0117	Sí
96 [h]	0,0013	Sí	0,1023	No

3.2. Extracción y caracterización de xilano extraído desde rastrojo de trigo y aserrín de lenga

El segundo objetivo específico de este trabajo es evaluar el proceso de extracción y caracterizar el xilano extraído desde rastrojos de trigo para utilizarlo posteriormente en la evaluación de producción de XOS y xilanasas. La extracción de hemicelulosa se realizó con un tratamiento termo-alcálico y para la caracterización se utilizó la técnica HPLC. También se extrajo y caracterizó xilano extraído de aserrín de lenga para usarlo como control ya que este proceso de extracción estaba caracterizado y sirve para evaluar la reproducibilidad del protocolo.

Se extrajo hemicelulosa realizando un pretratamiento alcalino-térmico a rastrojos de trigo y aserrín de lenga, los que fueron caracterizados mediante HPLC. En la Figura 3.8 se observa que la hemicelulosa obtenida al utilizar NaOH al 12 % desde el rastrojo de trigo presenta una mayor composición de xilano que la obtenida del aserrín de lenga, cercana al 39 % versus 24 %, respectivamente. Es por esta razón que se continuó el trabajo utilizando como materia prima rastrojo de trigo para la extracción de xilano. También se observa una parte importante de glucano presente en lo extraído. No se midió la presencia de lignina, sin embargo, se sabe que en este tipo de extracción se obtiene tanto hemicelulosa como lignina [66]. La fracción gris del gráfico representa otros compuestos obtenidos del proceso que no fueron medidos, como la lignina, otros azúcares, cenizas, sales, entre otros [66].

También se encontraron otras azúcares como arabinosa y celobiosa, las cuales provienen de la hidrólisis de la hemicelulosa y de la celulosa, respectivamente. Estos compuestos no se añadieron a la gráfica de la Figura 3.8 ya que su presencia era despreciable en comparación a la xilosa y glucosa presente. La composición porcentual de la Figura 3.8 se presenta con más detalle en la Tabla D.1 presente en el Anexo D.

Por otro lado, la composición de xilano entre el trigo tratado con 2 % y 12 % de NaOH presenta porcentajes cercanos correspondientes a 35 % y 39 %, respectivamente. Si bien al utilizar una mayor concentración de NaOH se obtiene más xilano, esta extracción contiene una mayor producción de sal durante la etapa de neutralización ácida que al utilizar un 2 % de NaOH, lo que disminuye la pureza del xilano y con ello la producción de XOS [66]. Debido a lo anterior se escogió el tratamiento con 2 % para el resto de las extracciones realizadas. Esto no solo disminuye las sales en la extracción, sino que también permite disminuir el consumo de NaOH.

En la literatura, se han registrado composiciones específicas para el aserrín de lenga pretratada con el método termo-alcalino y posteriormente precipitada con etanol, revelando contenidos aproximados del 20 % de xilano y alrededor del 2 % de glucano.[66]. En este trabajo se obtuvo un 24 % de xilano y 7 % de glucano a partir del aserrín de lenga. Si bien el proceso está estandarizado y se obtuvieron valores cercanos a los vistos en literatura, esta diferencia podría deberse a pequeñas variaciones en las condiciones del pretratamiento. En cuanto a la composición de rastrojo de trigo pretratado termo-alcalinamente y posterior precipitación con etanol, se encontró en literatura que se recupera un 39,4 % de la hemicelulosa (grupos xilano + arabano + acetilo) [77]. Si bien este dato representa el total de la hemicelulosa, gran parte corresponde a xilano, por lo que el contenido de xilano visto en literatura y las obtenidas en este trabajo (35 %-39 %) son similares.

Caracterización de biomasa pretratada

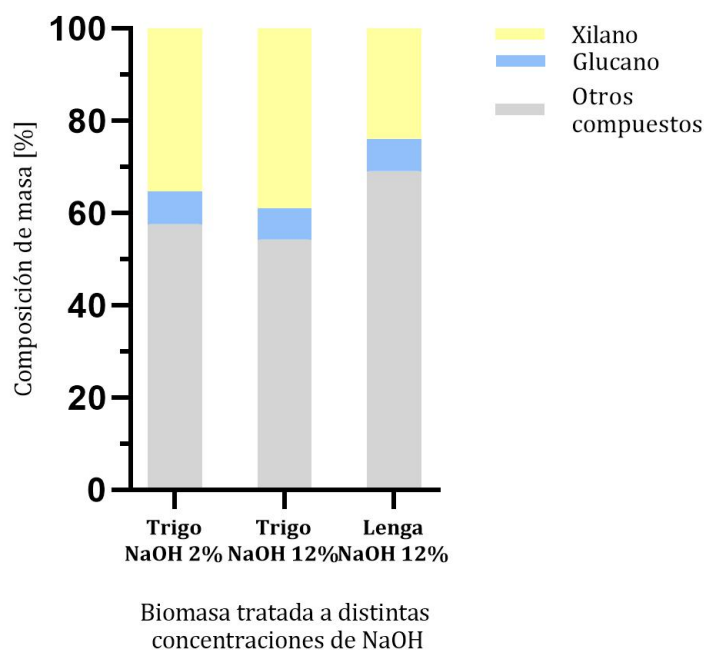


Figura 3.8: Caracterización de hemicelulosa obtenida a partir de rastrojos de trigo y aserrín de lenga utilizando distintas concentraciones de NaOH en el tratamiento alcalino/térmico. Cada ensayo se realizó en triplicado.

3.3. Producción de XOS y xilanasa recombinante en sistema *in situ*

El tercer objetivo específico de este trabajo es evaluar la producción de XOS y xilanasa en los medios diseñados utilizando como sustrato el xilano extraído de rastrojo de trigo. Para estudiar la producción de XOS a partir de xilano extraído con el método termoalcalino se utilizó el medio JCM y concentraciones de 0,5 % y 2,5 % del xilano extraído de rastrojo de trigo.

En principio, se decidió utilizar una concentración mayor de xilano (5 %), sin embargo, la concentración máxima que fue posible estudiar fue de 2,5 % ya que a concentraciones mayores el medio de cultivo quedaba demasiado denso y viscoso como para que *Pichia pastoris* pudiera mantenerse aireada de manera adecuada por agitación. Esto sería una característica a mejorar del sistema *in situ* debido a que no se podrían utilizar concentraciones mayores de sustrato para la producción de XOS, considerando que el microorganismo no podría producir la enzima eficientemente. De todos modos, utilizar una concentración mayor permitió observar cómo varía el rendimiento en la producción de XOS. Esto es importante para comprender cómo funcionaría el proceso en situaciones en las que la concentración de sustrato es naturalmente alta o para evaluar la aplicabilidad del proceso en entornos industriales.

En la Figura 3.9 se muestra la producción de xilobiosa en los medios JCM con 0,5 % y 2,5 % de xilano de trigo. Se observa que a 0,5 % de sustrato, luego de las 72 horas, la concentración de xilobiosa producida es constante. Mientras que con 2,5 % de xilano, la concentración de xilobiosa y xilotriosa aumenta drásticamente a las 72 horas (Figura 3.9 y 3.10, respectivamente). Este retardo en la producción de XOS, al utilizar una concentración mayor de sustrato, puede deberse a que *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A, al estar en presencia de un medio más denso y viscoso, el medio no se agita correctamente y la aireación se ve afectada negativamente, el cual es el factor más importante para la eficiencia en la expresión adecuada de proteínas durante la inducción [65]. A pesar de lo anterior, no fue posible encontrar antecedentes que permitan concluir de mejor manera la causa de este efecto de retardo observado en la producción de XOS para dicha concentración de xilano extraído de rastrojos de trigo.

Producción de xilobiosa en medio JCM con 0,5% y 2,5% de xilano

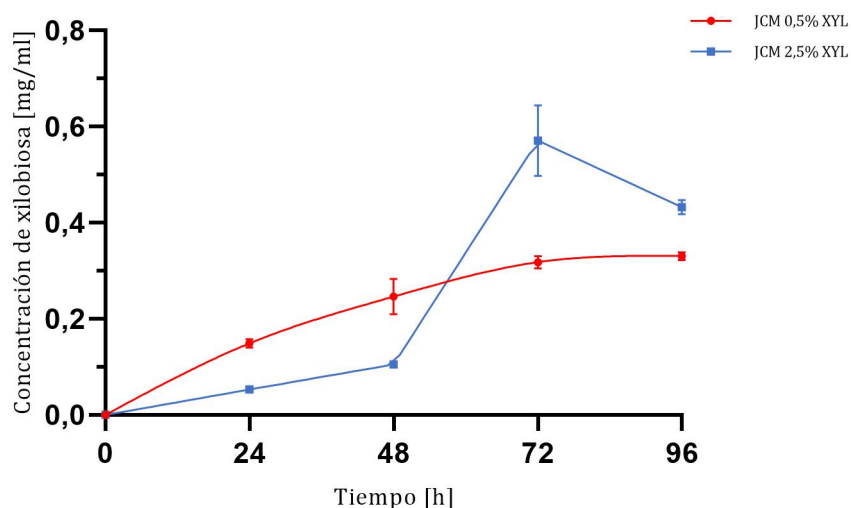


Figura 3.9: Producción de xilobiosa en medio JCM con 0,5% y 2,5% de xilano proveniente de rastrojos de trigo. Cultivos de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante en sistema *in situ* se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Producción de xilotriosa en medio JCM con 0,5% y 2,5% de xilano

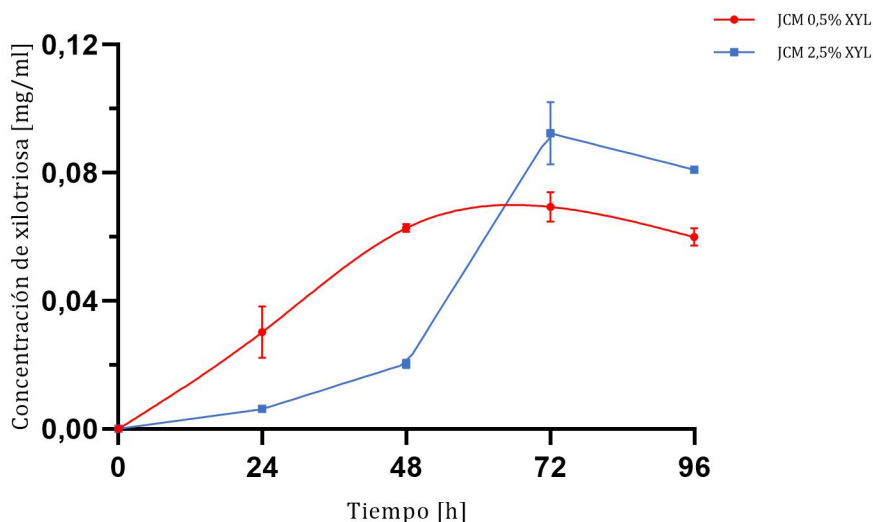


Figura 3.10: Producción de xilotriosa en medio JCM con 0,5% y 2,5% de xilano proveniente de rastrojos de trigo. Cultivos de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante en sistema *in situ* se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Cabe destacar que en este experimento, suplementado con xilano de rastrojos de trigo, la relación de xilobiosa:xilotriosa fue de 5:1, aproximadamente, mientras que la relación vista con xilano comercial fue de 10:1. De esta relación se puede establecer que el paso de xilotriosa a xilobiosa se ve desfavorecido cuando el sustrato es xilano de rastrojos de paja de trigo. Se ha descrito que las xilanasas difieren en cuanto a su tolerancia a la presencia de residuos laterales en la cadena de xilano [39], como arabinosa o glucuronatos. Por otro lado, también se ha observado que tienen distinta preferencia por fracciones solubles e insolubles de arabinoxilano. Esta característica no se ha estudiado para la enzima GtXyn10A, por lo tanto no se descarta que pudieran ser razones que explican la diferencia en preferencia de sustrato mostrada por esta enzima en este trabajo.

La producción total de XOS se muestra en la Figura 3.11, donde se observa el mismo comportamiento en la producción de xilobiosa y xilotriosa. En cuanto al rendimiento de la producción de XOS en el sistema *in situ* (calculado según la fórmula 2.1 Metodología), este se observa en la Figura 3.12, donde el rendimiento en el medio con 0,5 % de xilano es mayor al obtenido en el medio con 2,5 % de xilano. Esto permite inferir que el rendimiento en la producción de XOS disminuye al aumentar la concentración del sustrato, esto es similar a lo obtenido en la sección anterior al utilizar xilano comercial como sustrato (Tabla 3.8).

Se ha visto en otros trabajos el mismo efecto de disminución de rendimiento por aumento en la concentración del sustrato [78]. En otro caso similar se observó que el rendimiento de la hidrólisis de LCM con celulasas y xilanasas se redujo con el aumento de la concentración de biomasa [79].

Producción de XOS en medio JCM con 0,5% y 2,5% de xilano

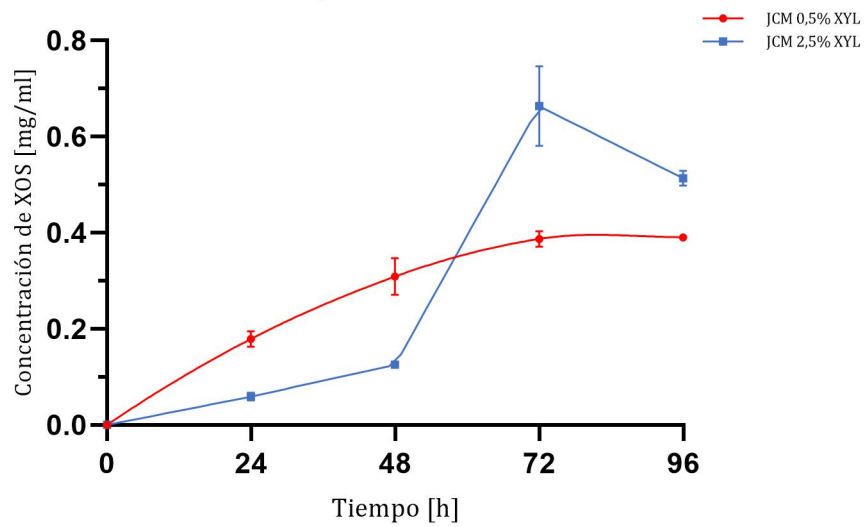


Figura 3.11: Producción de XOS en medio JCM con 0,5% y 2,5% de xilano proveniente de rastrojo de trigo. Cultivos de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Rendimiento de XOS producidos

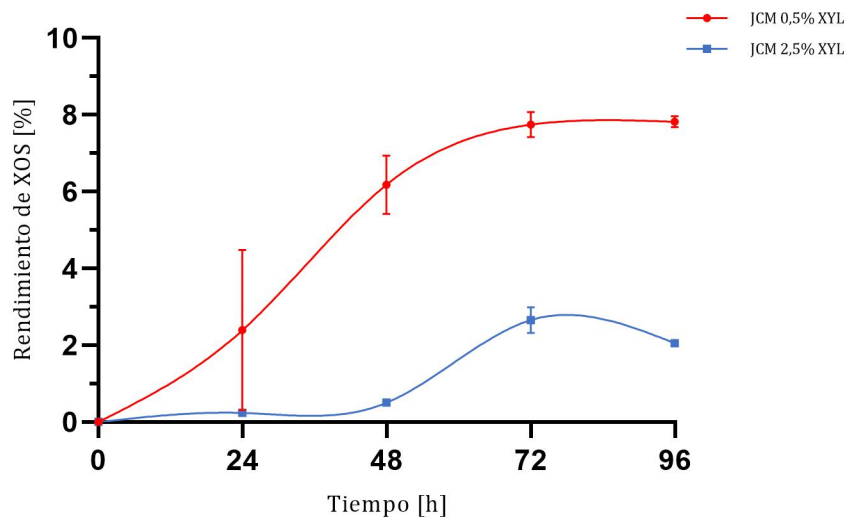


Figura 3.12: Rendimiento de XOS producidos en sistema *in situ* con 0,5% y 2,5% de xilano proveniente de rastrojos de trigo. Cultivos de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Se midió la producción de xilanasa, cuantificando la actividad en alícuotas retiradas del cultivo a diferentes tiempos, obteniéndose el gráfico presente en la Figura 3.13. Se aprecia una mayor actividad en el medio que contiene 0,5 % de sustrato, en comparación de la producción de enzima en el medio con 2,5 % de xilano de rastrojo de trigo. En la parte a) de la Figura 3.13 se observa que la producción de xilanasa en el sistema *in situ* es similar en medio JCM suplementados con 0,5 y 1,5 % de xilano comercial de abedul. En este caso, la parte b) de la Figura 3.13 se observa que al aumentar la concentración de xilano de rastrojos de trigo la producción de enzima disminuye drásticamente, incluso se obtiene menos enzima que el medio que contiene xilano de rastrojos de trigo a las misma concentración de sustrato (0,5 % de xilano). Las causas pueden ser que al tener un medio con mayor concentración de xilano se tiene menos aireación, afectando la viabilidad de *Pichia pastoris* y con ello la producción de la enzima, o bien, la enzima producida interacciona con el sustrato debido al fenómeno de grado de selectividad hacia el sustrato [39].

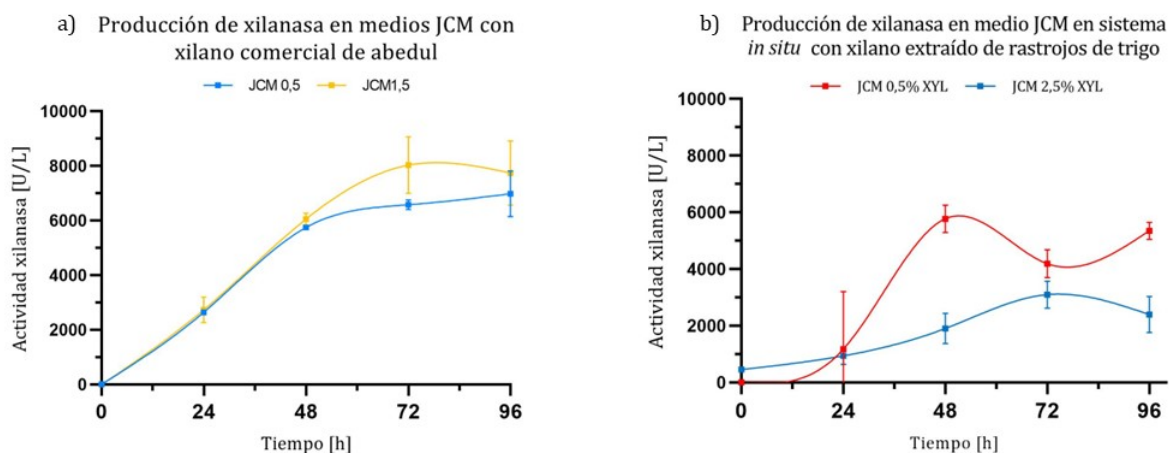


Figura 3.13: a) Producción de xilanasa en medio JCM en sistema *in situ* con 0,5 % y 1,5 % de xilano comercial de abedul. Adaptado de Figura 3.5. b) Producción de xilanasa en medio JCM en sistema *in situ* con 0,5 % y 2,5 % de xilano proveniente de rastrojos de trigo. Cultivos de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Para identificar posibles causas de la limitación en la producción de xilanasa en el sistema *in situ*, se procedió a medir el pH en los medios JCM con 0,5 y 1,5 % de xilano de rastrojos de trigo. Los resultados se muestran en la Figura 3.14. Se observa la evolución del pH en el tiempo, donde el medio JCM con 0,5 % de xilano alcanzó un pH cercano a 8 y el medio de cultivo que contenía 2,5 % de xilano alcanza pH cercano a 4,5. A partir de esto, se puede decir que el medio con mayor concentración alcanza un pH cercano a 5, el óptimo de la actividad xilanasa. Hasta ahora se desconoce la razón para este aumento de pH en el medio con mayor concentración de xilano; sin embargo, es posible especular que el metabolismo de la levadura haya acidificado el medio [75]. En este contexto, la limitación del oxígeno disuelto en el medio puede provocar la producción de compuestos

indeseados que provoquen esta disminución del pH. Se ha visto en otras levaduras, como la *Saccharomyces cerevisiae*, que su crecimiento esta sujeto a condiciones de estrés, generando incluso una disminución en el pH intracelular ante estrés por temperatura [80].

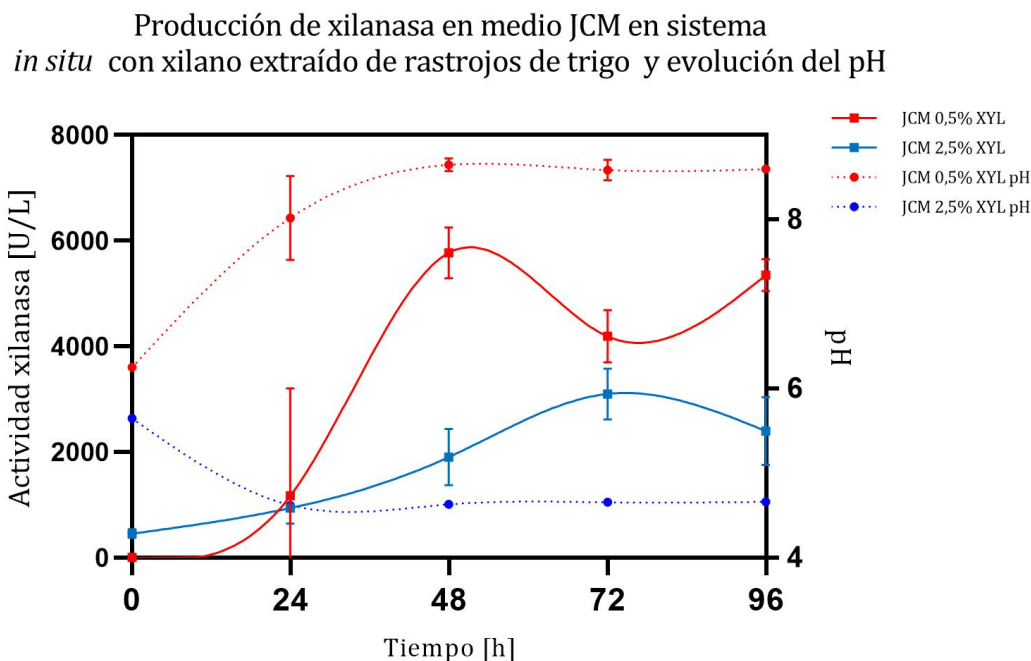


Figura 3.14: Producción de xilanasa y evolución del pH en cultivos de *P. pastoris* KM71/pPIC9KGtxyn10A en medios JCM en el sistema *in situ*. Medios de cultivo suplementados con xilano de rastrojos de trigo al 0,5% y 2,5%. *Pichia pastoris* recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

En la Figura 3.15 se muestran los XOS producidos por unidad de enzima. A partir de esta figura se observa que en las primeras 48 horas la producción de XOS por unidad de enzima es estadísticamente similar en ambas concentraciones. Sin embargo, a las 72 horas el medio con mayor concentración de xilano de trigo alcanza mayor producción de XOS por unidad de enzima. Esto puede deberse a que a la enzima le haya costado acceder al sustrato debido a la presencia de otros compuestos como la lignina, lo que también podría explicar el retardo visto en las Figuras 3.9 y 3.11. Sería interesante evaluar el efecto que tiene la lignina en la actividad enzimática de la xilanasa.

Al comparar las Figuras 3.7 y 3.15 se observan ciertas diferencias en la magnitud de la relación producto/enzima, siendo mayor al utilizar xilano comercial de abedul, alcanzando en el mejor de los casos 0,5 [mg de XOS/U de enzima], mientras que al utilizar xilano de rastrojos de trigo se alcanza 0,2 [mg de XOS/U de enzima]. De esto se podría concluir que el tipo de sustrato presente en el medio *in situ* afecta la actividad de la xilanasa GtXyn10A. Además, la tendencia en el tiempo de la relación producto/enzima en la Figura 3.7 pareciera mantenerse constante, en cambio en la Figura 3.15 se observa

que va en aumento, lo que podría deberse a la dificultad de la enzima para acceder al sustrato, mencionado anteriormente.

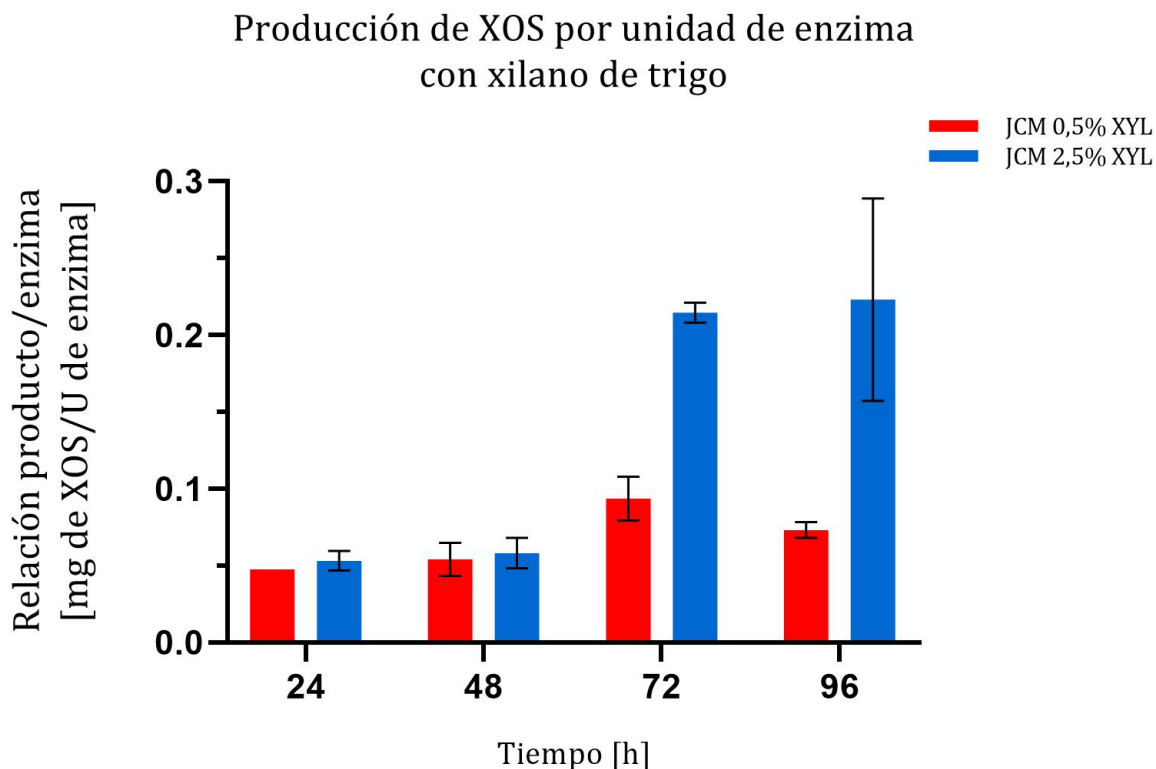


Figura 3.15: Producción de XOS por unidad de enzima en sistema *in situ* con xilano extraído de rastrojos de trigo. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

En la Tabla 3.10 se muestra el análisis estadístico de la producción de XOS por unidad de enzima, de la cual se determina que las primeras 48 [h] la relación producto/enzima es estadísticamente similar, ya que todos los *p-value* obtenidos fueron mayores a 0,05. Luego, se observa claramente un aumento en la relación producto/enzima para el medio JCM con 2,5% de xilano extraído de trigo.

Tabla 3.10: Resultados del análisis *t-student* para la producción de XOS por unidad de enzima para ambas concentraciones de xilano extraído de rastrojo de trigo.

Datos comparados	<i>p-value</i>	Significativamente diferente
24 [h]	0,341	No
48 [h]	0,698	No
72 [h]	0,002	Sí
96 [h]	0,023	Sí

3.3.1. Comparación producción de XOS utilizando xilano comercial y xilano de trigo en sistema *in situ*

En esta sección se compara la producción de XOS al utilizar 0,5 % suplementado con xilano de rastrojos de trigo (Figura 3.11) versus los XOS producidos con 0,5 % de xilano comercial de abedul (Figura 3.4).

En la Figura 3.16 se presenta la producción de XOS, en el que se compara la producción de estos al utilizar 0,5 % de xilano comercial de madera de abedul versus 0,5 % de xilano de trigo, ambos en el medio JCM. Se observa cierto retardo en el aumento de la concentración de XOS en el medio con xilano de trigo como sustrato en las primeras 48 horas. Esto puede deberse a que el xilano comercial presenta mayor pureza en comparación al que se obtuvo desde el trigo.

Como se mencionaba anteriormente, el proceso de extracción de xilano desde una biomasa conlleva a obtener hemicelulosa y lignina, donde esta última podría estar interfiriendo con el acceso de la xilanasa al sustrato. Al aplicar el tratamiento alcalino se deslignifica la biomasa, es decir, se separa total o parcialmente los enlaces éster entre la lignina y la hemicelulosa en las paredes celulares y el grado de pureza de la hemicelulosa depende de la concentración de NaOH utilizada [81].

Luego de la neutralización se forma una gran cantidad de sales que disminuyen la pureza del xilano. En este punto se realiza la precipitación con etanol para separar el xilano de la lignina. Analizando este proceso es posible concluir que gran parte de los otros compuestos presentes en la hemicelulosa obtenida son en gran parte sales y en menor medida lignina. Esta gran cantidad de sales podría disminuir al usar un proceso de ultrafiltración luego del tratamiento alcalino para así disminuir el uso de ácido en la neutralización y con ello la formación de sales [66].

También sería interesante estudiar la producción de XOS utilizando xilano extraído de otra fuente de biomasa ya que el rastrojo de trigo presenta ciertos inhibidores de xilanasa [39]. Esto podría estar provocando la disminución en la producción de XOS en el medio con xilano de trigo en comparación con el xilano comercial de madera de abedul altamente purificado. El gráfico de la Figura 3.16 se realizó en base a los gráficos de la Figura E.2 y E.3, presentes en el Anexo E.2, donde se observa la producción de xilobiosa y de xilotriosa, respectivamente.

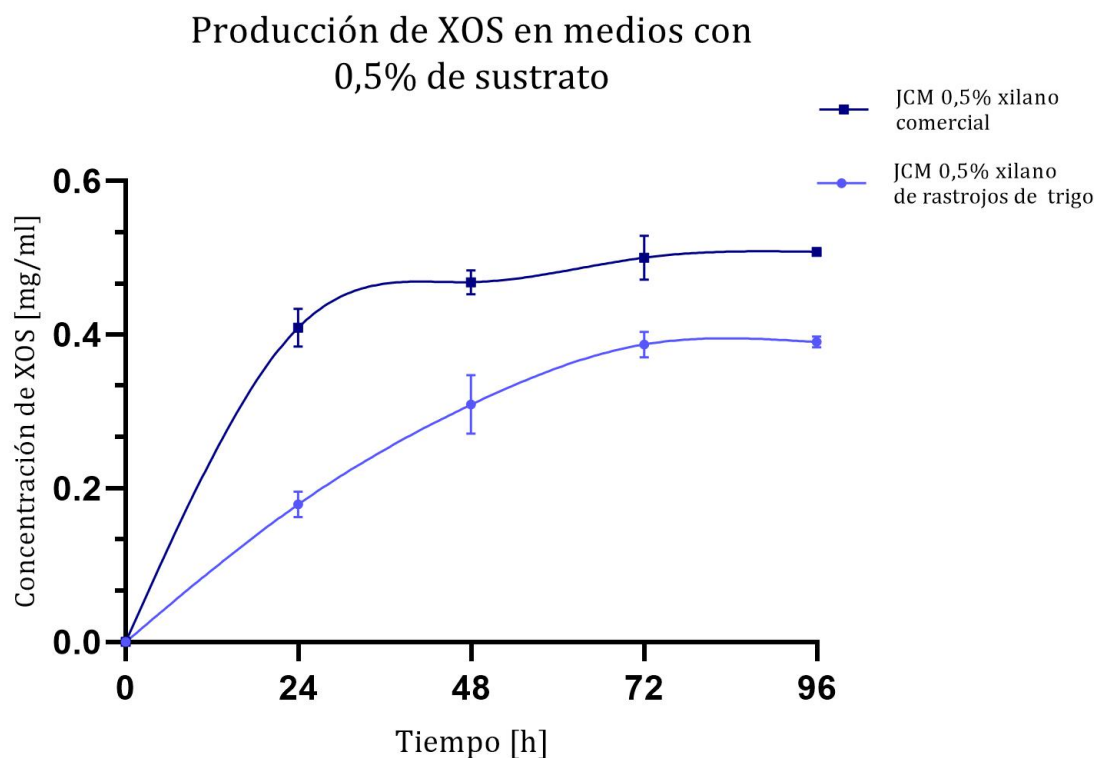


Figura 3.16: Producción de XOS en medios con 0,5% de sustrato. Sistema *in situ* con xilano comercial de madera de abedul (Megazyme) y xilano proveniente de rastrojos de trigo. Cultivos de *Pichia pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante se cultivó a 30°C, 200rpm y pH 6. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

3.4. Comparación de producción de XOS en sistema *in situ* y *ex situ*

El cuarto objetivo específico de este trabajo es comparar la producción de XOS en el sistema *in situ* y en el sistema *ex situ*. Esta comparación es importante para evaluar si se logra mejorar la producción de XOS con el sistema *in situ*. Para cumplir con este objetivo primero se evaluó la producción de XOS en el sistema *ex situ* utilizando ambos sustratos estudiados anteriormente, xilano comercial y xilano extraído de rastrojo de trigo. Luego se comparó la producción de los xilooligosacáridos en el sistema *in situ* versus el sistema *ex situ* utilizando xilano comercial. Además, se estudiaron potenciales factores inhibidores en la hidrólisis enzimática del xilano para tener una discusión más amplia al comparar los dos sistemas utilizados.

3.4.1. Producción de XOS *ex situ* a partir de xilano comercial o xilano de rastrojos de trigo

Estudiar la producción de XOS en un sistema *ex situ* con xilano comercial y xilano extraído de rastrojo de trigo resulta interesante porque permite comparar la eficiencia en

la producción de XOS a partir de diferentes fuentes de xilano. Además, como el xilano de rastrojos de trigo es una fuente renovable, permite evaluar su uso para una producción de XOS sostenible.

En la Figura 3.17 se presenta la producción de XOS luego de 24 horas en el sistema *ex situ*. Se utilizó los sustratos xilano comercial de abedul y el xilano obtenido de rastrojos de trigo. La reacción se realizó bajo las condiciones óptimas para la actividad enzimática de la xilanasa que corresponden a pH 5 y 50°C, y bajo las condiciones utilizadas en el sistema *in situ*, pH 6 y 30°C.

En la Figura 3.17 se observa que la producción de XOS desde xilano comercial a pH 6 y 30°C es estadísticamente menor que bajo las condiciones de producción, pH 5 y 50°C. Esto es esperable, ya que pH 6 y 30°C (condición 1) no son las condiciones ideales para la endoxilanasa GtXyn10A. La diferencia observada entre las condiciones 1 y 2, con xilano comercial de abedul, podría deberse a algún posible error en la medición de este medio ya que se esperaría ver el mismo efecto visto al utilizar xilano de rastrojos de trigo. Este error podría ser de tipo aleatorio, como por ejemplo utilizar puntas inadecuadas que afecten la precisión y exactitud de las medidas. En las reacciones sobre xilano de rastrojos de trigo se observa que la producción de XOS es similar, bajo las dos condiciones probadas (condiciones 3 y 4). Esto se puede deber a que, a las 24 horas, en ambas condiciones se alcanza la máxima producción de XOS ya sea porque la concentración de la enzima o del xilano sea el limitante, o hay algún inhibidor de la producción de XOS.

Para entender mejor el comportamiento de la producción de XOS en este sistema *ex situ*, se propone medir la concentración del producto en tiempos menores a 24 horas, con el fin de observar si se mantiene el mismo comportamiento visto en la Figura 3.17.

Producción de XOS en sistema *ex situ* a las 24 horas

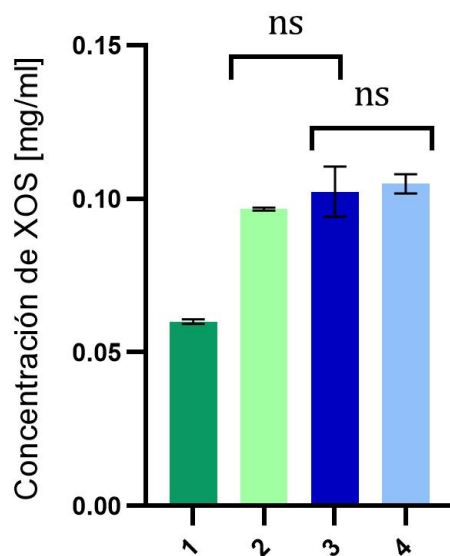


Figura 3.17: Producción de XOS *ex situ* a partir de dos sustratos y dos condiciones distintas. 1. Xilano comercial, pH 6, 30°C. 2. Xilano comercial, pH 5, 50°C. 3. Xilano extraído de rastrojos de trigo, pH 6, 30°C. 4. Xilano extraído de rastrojos de trigo, pH 5, 50°C. Tiempo de incubación fue de 24 horas. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

En la Tabla 3.11 se muestran los valores del *p-value* para las cuatro condiciones comparadas en la Figura 3.17, de la que se puede concluir que la producción de XOS es estadísticamente similar entre los medios 2 y 3, y los medios 3 y 4.

Tabla 3.11: Resultados del análisis *t-student* para la producción de XOS en sistema *ex situ* luego de 24 horas.

Datos comparados	<i>p-value</i>	Significativamente diferente
1 y 2	0,0001	Sí
2 y 3	0,421	No
2 y 4	0,040	Sí
3 y 4	0,643	No

3.4.2. Análisis comparativo de la producción de XOS en ambos sistemas

En el análisis comparativo de la producción de XOS en el sistema *in situ* y *ex situ* se midió la producción de XOS a las 24 horas en ambos sistemas. Esto se debe a que

anteriormente se observó que en el sistema *in situ* la concentración de XOS a las 24 horas esta llegando a la máxima producción de XOS medida en 96 horas.

En la Figura 3.17 que muestra la producción de XOS en el sistema *ex situ* y lo obtenido del sistema *in situ*, se comparó la producción de XOS utilizando xilano comercial como sustrato en ambos sistemas. Con aquellos datos, que corresponden al tiempo de máxima producción de cada uno, se realizó el gráfico presente en la Figura 3.18, donde se observa que la producción de XOS en el sistema *in situ* es hasta 4 veces mayor que la obtenida en el sistema *ex situ*. Se utilizaron las mismas concentraciones de sustrato (0,5 % xilano comercial) y de enzima (2,64 U/ml), por lo que se esperaba tener producciones similares entre ambos sistemas. Esto llevó a considerar que el volumen en que se realizó cada reacción podría estar afectando el rendimiento en la hidrólisis del xilano. Para estudiar esta posibilidad, se realizó una nueva comparación entre ambos sistemas en un volumen igual a 10 ml cada uno, cuyos resultados se presentan en las Figuras E.4 y 3.19.

Producción total de XOS en sistema
ex situ vs *in situ* a las 24 horas

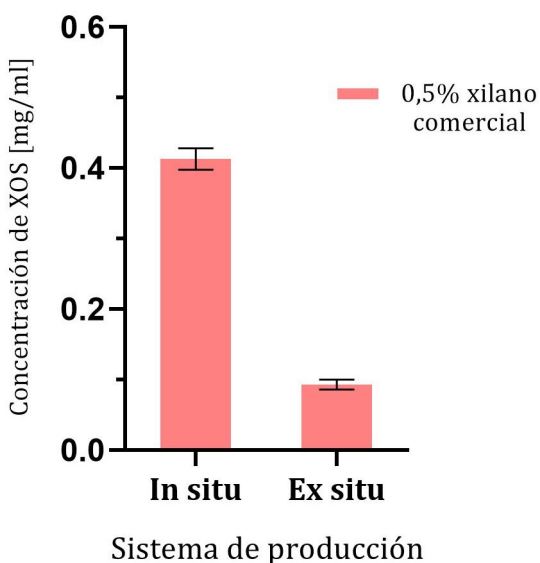


Figura 3.18: Producción de XOS en sistema *in situ* y *ex situ* con xilano comercial de madera de abedul al 0,5 % y 2,64 U/ml de xilanasa (528 U/g de sustrato). El sistema *ex situ* se realizó a pH 5 y 50°C (condición óptima según resultados de la Figura 3.17) y el sistema *in situ* a pH 6 y 30°C. Se considera como producción total de XOS a la suma de xilobiosa y xilotriosa medida. Las barras representan la desviación estándar, donde cada ensayo se realizó en triplicado.

En la Figura 3.19 se presenta la producción total de XOS, donde los XOS corresponden a la suma de xilobiosa y xilotriosa descrita en el Anexo E.3, Figura E.4. Se observa que la producción de XOS es estadísticamente similar en ambos sistemas, alcanzando cerca de 0,25 mg/ml y un *p-value* igual a 0,365 (ns). A partir de esto, se puede concluir que al utilizar el mismo volumen de reacción en ambos sistemas, la producción de XOS a las 24

horas (tiempo de máxima producción de XOS para 0,5 % de xilano) es estadísticamente similar ($p\text{-value} > 0,05$) en el sistema *in situ* y *ex situ*. A partir de las Figuras 3.18 y 3.19 se logra concluir que el volumen del medio donde ocurre la reacción enzimática sí afecta en la producción de XOS. Este fenómeno puede deberse a que al utilizar recipientes con distinta forma (un matraz y un eppendorf), la eficiencia de la mezcla puede variar en cada uno, viéndose el sistema *ex situ* aparentemente afectado en este caso. Mientras que el sistema *in situ*, realizado en un matraz, podría tener una mejor agitación. Por eso, cuando se trabaja en matraces de igual volumen (10 ml) la producción de XOS es similar.

Producción de XOS en sistemas *in situ* y *ex situ* a las 24 horas

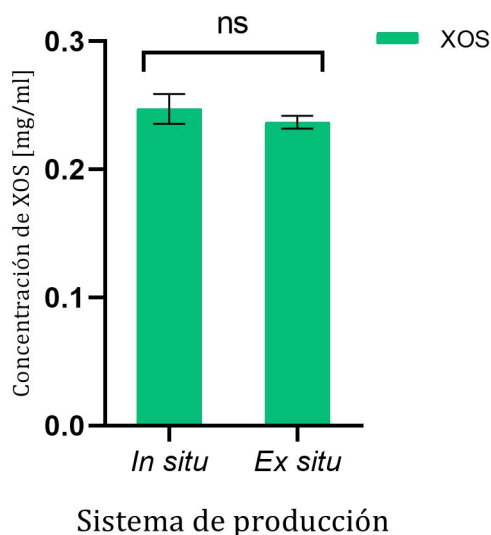


Figura 3.19: Producción de XOS en sistemas *in situ* y *ex situ* luego de 24 horas en igual volumen de reacción enzimática. El sustrato utilizado es xilano de rastrojos de trigo al 0,5 %. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado. En la Figura 2.3, segunda comparación, se observa un esquema del volumen usado en este experimento.

3.4.3. Estudio de potenciales factores inhibitorios de la producción de XOS *in situ*

Para mejorar la eficiencia del proceso *in situ* es necesario identificar los factores inhibitorios. El conocimiento de estos factores permitirá identificar las condiciones óptimas de reacción y desarrollar nuevos métodos que eliminen dichos factores con efectos inhibitorios, lo que mejoraría la eficiencia en la producción de XOS.

3.4.3.1. Estudio de inhibición enzimática de xilanasas por producto (XOS)

El estudio de inhibición por producto es un enfoque investigativo que tiene por objetivo evaluar un potencial efecto inhibitorio de los productos de la reacción sobre la actividad enzimática de la xilanasas. La inhibición por producto puede tener implicancias

significativas en la optimización de la producción de XOS y la cinética enzimática.

En este estudio se realizaron reacciones enzimáticas en dos medios, el primer medio contenía XOS, xilanasas y xilano comercial y el segundo contenía xilanasas y xilano comercial. Con esto se buscaba estudiar si la presencia de XOS desde el inicio de la reacción tenía efecto en la actividad enzimática de xilanasas y en la producción de XOS. Los XOS utilizados están compuestos principalmente de xilobiosa y xilotriosa en relación 9:1, respectivamente. Se midió la actividad enzimática durante la reacción, la cual se presenta en la Figura 3.20. Al medio que contenía inicialmente XOS, se le restó la concentración inicial del producto con el fin de poder comparar la producción neta de azúcares reductores por actividad enzimática. Se observa que la actividad enzimática es similar para aquellos con XOS inicialmente y sin XOS.

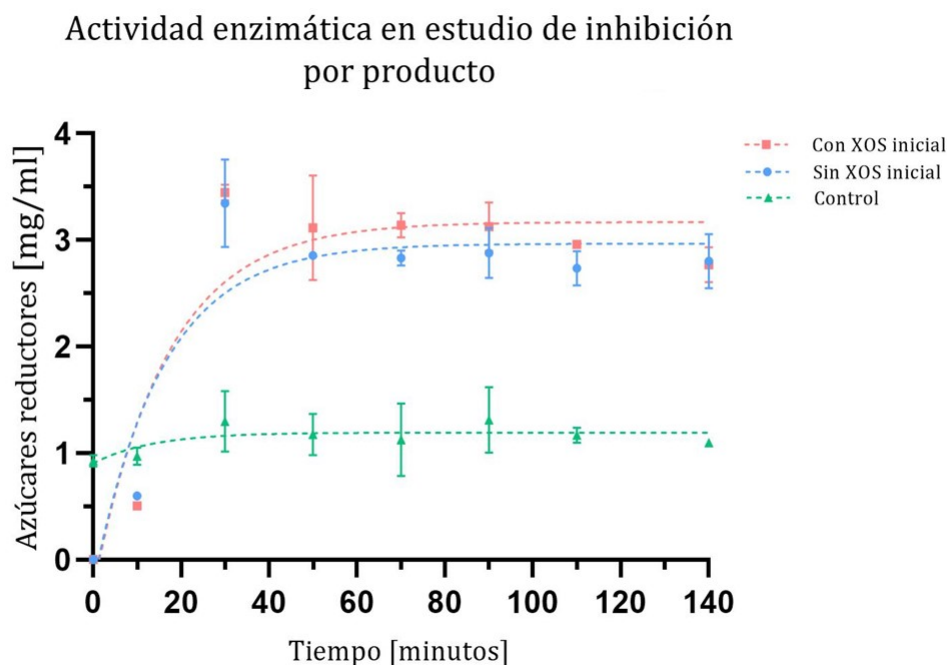


Figura 3.20: Azúcares reductores en presencia y ausencia de XOS al inicio de la hidrólisis del xilano. El control es el medio de reacción que solo contenía XOS agregados inicialmente y sin presencia de enzima. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Se propone realizar un ensayo enzimático competitivo utilizando concentraciones más altas de producto para obtener la velocidad inicial de cada uno, y así poder realizar un mejor análisis debido a que según bibliografía la xilobiosa y xilotriosa han provocado cierta inhibición a la actividad de la xilanasas [45]. Las concentraciones de XOS utilizados en aquel estudio oscilaban de 0 a 5 mM, y consideraban x2, x3, x4, x5 y x6. En este trabajo se utilizó XOS en una concentración de 0,1 mM y se consideraron solo x2 y x3. Este antecedente puede ser útil para futuros estudios y para ello se debe disponer de una gran cantidad de XOS purificados, por lo que resultará necesario establecer técnicas de

purificación o disponer de XOS producidos comercialmente como xilobiosa y xilotriosa.

La producción de XOS en presencia de este producto inicialmente se presenta en la Figura 3.21. Se observa una producción de XOS similar en los medios que contenían inicialmente XOS y los que no, en donde cada uno de los datos son estadísticamente similares, según lo visto en la Tabla 3.13. Cabe destacar que a la curva que representa la producción de XOS “con XOS inicial” en el medio, se le restó a cada punto la concentración inicial de XOS con el fin de facilitar la comparación con la curva en la que no había presencia inicial de XOS. Se estimó la velocidad inicial de cada reacción calculando la pendiente de las tangentes a la curva que representa el perfil de velocidad, observada en la Figura 3.21. La velocidad inicial de la curva “Con XOS inicial” (v_{01}) es $0,0060 \left[\frac{mg}{ml \cdot min} \right]$ y la velocidad inicial de la curva “Sin XOS inicial” (v_{02}) es $0,0055 \left[\frac{mg}{ml \cdot min} \right]$.

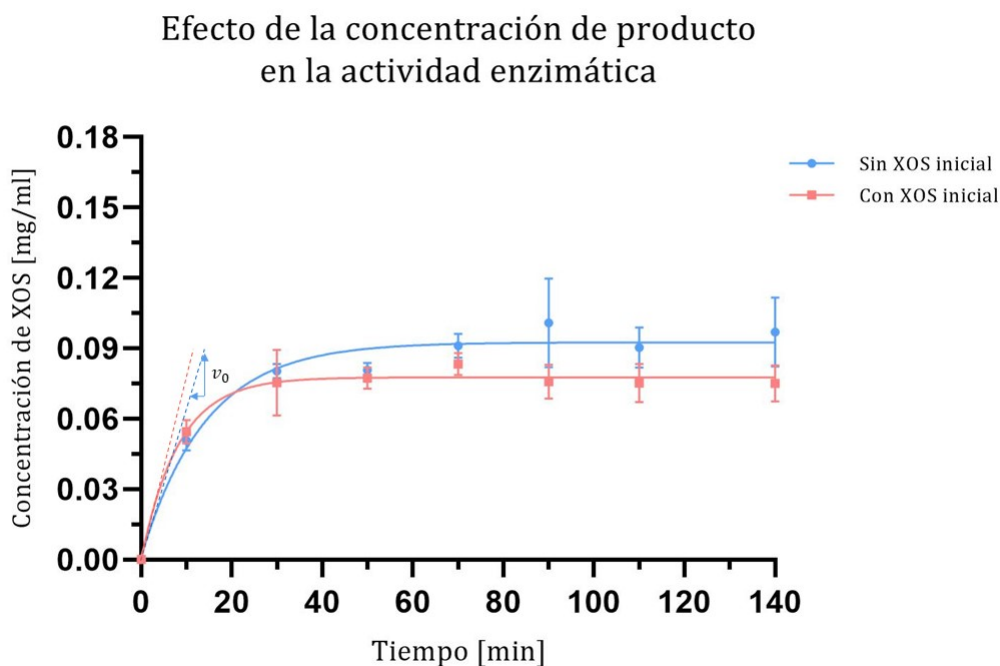


Figura 3.21: Efecto de la concentración de XOS, producto de la reacción de xilanasas sobre xilano. A pH 5, 50°C, 46,7 U/ml de xilanasas, xilano comercial al 0,5 % y 0,1 mM de XOS. Los datos “Con XOS inicial” corresponden a la producción de XOS con 0,03 [mg/ml] de XOS inicialmente en el medio. “Sin XOS inicial”, producción de XOS solo con el sustrato y la enzima, sin XOS al inicio de la reacción. Los XOS (suma de xilobiosa y xilotriosa) se midieron por HPLC. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Para comparar las velocidades iniciales obtenidas se realizó un análisis estadístico. En la Tabla 3.12 se muestran los valores calculados y tabulados de los estadísticos F y t, donde se puede concluir que las pendientes tienen varianzas homogéneas y son estadísticamente similares, respectivamente, ya que se cumple que los estadísticos tabulados son mayores

que los calculados. A partir de esto se concluye que la producción de XOS no se ve mayormente afectada por la presencia de XOS al inicio de la reacción.

Tabla 3.12: Análisis estadístico para la comparación de las pendientes en la producción de XOS “Con XOS inicial” y “Sin XOS inicial”, considerando $p=0,05$ y 4 puntos en cada pendiente.

Ensayo	Calculado	Tabulado
F	1,06	39,00
t	0,01	2,45

A modo de contextualización, la cantidad de XOS purificado y disponible para realizar este estudio era limitada, por lo que se estudió la inhibición con bajas concentraciones (0,1 mM aproximadamente de XOS). Se esperaba poder comparar las velocidades iniciales con el fin de vislumbrar la inhibición por XOS descrita en literatura [45]. Para un futuro estudio se propone producir y purificar XOS para el estudio de inhibición con mayores concentraciones.

Tabla 3.13: Resultados del análisis *t-student* en el estudio del efecto de la concentración de producto en la actividad de la enzima.

Datos comparados		<i>p-value</i>	Significativamente diferente
Con XOS inicial y Sin XOS inicial	10 [min]	0,420	No
	30 [min]	0,561	No
	50 [min]	0,367	No
	70 [min]	0,177	No
	90 [min]	0,217	No
	110 [min]	0,142	No
	140 [min]	0,161	No

3.4.3.2. Análisis del rol de la composición de xilano en la actividad xilanasa de GtXyn10A

El objetivo principal de esta sección es evaluar la presencia de residuos de arabinosa y su rol en la actividad enzimática de la xilanasa (GtXyn10A) para la producción de XOS. Para ello se utilizó el xilano de rastrojos de trigo residual de un experimento de hidrólisis *in situ*, donde la xilanasa actuó por 72 horas y la concentración de XOS se mantiene constante en el tiempo, a pesar de que quedaba xilano sin degradar. Este medio se separó en cuatro partes, a uno se le agregó 5 [U/ml] de arabinofuranosidasa (ARAF), a otro 5 [U/ml] de xilanasa (XYL), y al tercero se le agregó 5 [U/ml] de arabinofuranosidasa y 5 [U/ml] de xilanasa. Un cuarto tubo sin aditivos se utilizó como control para evaluar la actividad xilanasa remanente del sistema *in situ*.

En la Figura 3.22 se muestra la concentración de XOS producidos usando como sustrato

el xilano residual de un sistema *in situ* luego de 72 horas. Al medio se le agregaron las enzimas xilanasa y arabinofuranosidasa, por lo que se espera ver si el xilano residual del medio aún es degradable por enzimas. Se observa que el control, al que no se le agregó enzima, produjo de igual manera XOS. Esto puede deberse a que la enzima producida en el sistema *in situ* todavía es capaz de hidrolizar el xilano, lo que permitiría concluir que el xilano residual aún es degradable. Se notó que en el medio al que se le agregó xilanasa tuvo un comportamiento similar al control.

En cuanto a los medios a los que se le agregó arabinofuranosidasa, se observa una mayor producción de XOS en comparación con el control. Esto puede deberse a que la presencia de esta enzima libera las cadenas laterales de arabinosa, permitiendo que la xilanasa pueda acceder a zonas del xilano a las que antes no podía por la presencia de este residuo. Además, a partir de la Tabla 3.14 es posible concluir que la producción de XOS es estadísticamente similar entre los medios a los que solo se agregó arabinofuranosidasa y a los que se les agregó arabinofuranosidasa y xilanasa. Estos resultados pueden deberse a que la xilanasa no pueda degradar más xilano debido a que tienen cadenas laterales que dificultan la actividad enzimática.

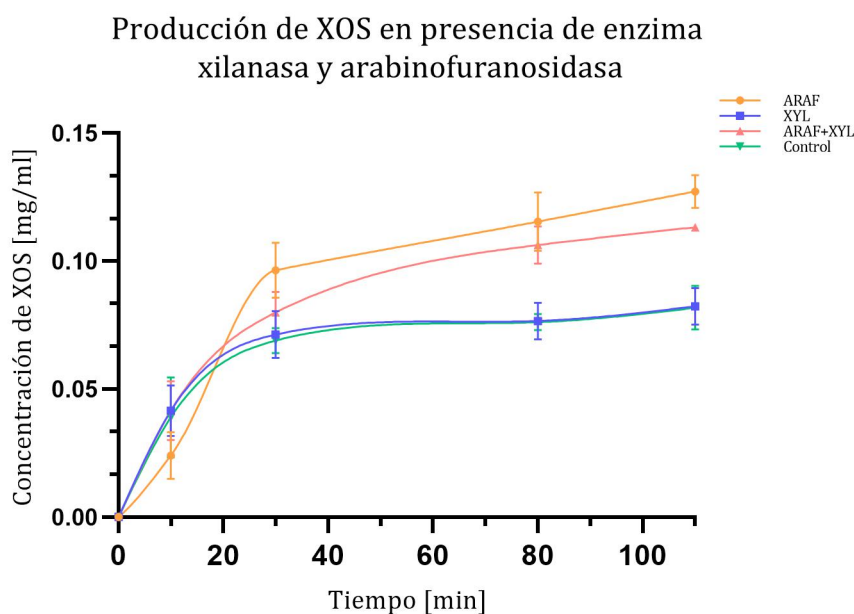


Figura 3.22: Efecto de la adición de arabinofuranosidasa en la actividad xilanasa de GtXyn10A sobre xilano de rastrojos de trigo residual del sistema *in situ*. ARAF: Producción de XOS al agregar la enzima arabinofuranosidasa al medio con xilano residual. XYL: Producción de XOS al agregar la enzima xilanasa al medio con xilano residual. ARAF+XYL: Producción de XOS al agregar la enzima arabinofuranosidasa y xilanasa al medio con xilano residual. Control: Medio con xilano residual sin agregar enzimas frescas. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado.

Tabla 3.14: Resultados del análisis *t-student* de la producción de XOS en presencia de ARAF y ARAF+XYL.

Datos comparados		<i>p-value</i>	Significativamente diferente
ARAF y	10 [min]	0,101	No
	30 [min]	0,101	No
ARAF+XYL	80 [min]	0,439	No
	110 [min]	0,022	Sí

3.4.4. Análisis sobre la potencial implementación a escala industrial del sistema *in situ*

La implementación a escala industrial de un método de producción presenta bastantes desafíos. Desarrollar un sistema *in situ* para la producción industrial de xilanasa y XOS, requiere de un amplio estudio para considerar diversos factores. Algunos de ellos, para tener en cuenta, son el medio de cultivo óptimo, la fuente de sustrato a utilizar, la producción de enzima y su actividad enzimática, el uso de enzimas auxiliares, el microorganismo adecuado, entre otras.

En primer lugar, para un sistema *in situ*, es necesario asegurar el crecimiento y mantenimiento adecuado del microorganismo productor, *P. pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A en este caso. La capacidad del microorganismo para desarrollarse en una escala más grande y producir de manera constante es esencial para un buen funcionamiento del sistema *in situ*. El control de las condiciones de cultivo, incluyendo la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes, es muy importante para garantizar un ambiente propicio para la producción óptima de los compuestos deseados. La producción conjunta de dos productos diferentes en un solo proceso puede aumentar la complejidad de la operación. Esto podría conllevar a un desafío en comparación con el sistema *ex situ* ya que depende de varios factores para el funcionamiento del microorganismo y la enzima.

Llevando a cabo un análisis más exhaustivo basado en los datos recopilados en este trabajo, se determina la cantidad de gramos de rastrojos de trigo requeridos para la producción de 1,25 [g] de XOS (dosis recomendada al día) [82]. Para ello se utilizan los datos obtenidos en los experimentos *in situ* por 72h, con medio JCM, 0,5 y 2,5 % xilano de rastrojos de trigo luego de 72 horas. Se tiene en cuenta que a partir de rastrojo de trigo se logra recuperar aproximadamente un 11 % de hemicelulosa [83] y que por una hectárea de trigo sembrado se obtiene alrededor de 7 [t] de rastrojos de trigo [84].

En la Tabla 3.15 se muestra el sistema *in situ* estudiado con 0,5 % y 2,5 % de xilano extraído de trigo, donde se muestra el rendimiento del sistema y el rastrojo de trigo seco necesario para producir 1,25 [g] de XOS. Conocer cuanto rastrojo de trigo se necesita para producir cierta cantidad de XOS resulta interesante porque proporciona una idea de la eficiencia del proceso. Esta información puede ser crucial para evaluar la viabilidad económica y la sostenibilidad del método, especialmente si se considera a gran escala.

Tabla 3.15: Rastrojo de trigo necesario en sistema *in situ* estudiado para la producción de 38,75 [g] de XOS (consumo de 1,25 [g] diario por un mes de una persona) a partir xilano extraído de trigo.

Concentración xilano [%]	Rendimiento producción de XOS [g XOS/100g de xilano]	Rastrojos de trigo requerido [g]	Área sembrada [m^2]
0,5	8	484	0,7
2,5	2	1937	2,8

Otro factor para considerar son los costos económicos y energéticos asociados a la producción. La ventaja del sistema *in situ* es la reducción de costos debido a la eliminación de etapas complejas como la extracción y purificación de la enzima, disminuyendo el uso de equipos y procesos de separación costosos. Además, al realizar ambos procesos en el mismo sistema (producción de xilanas y XOS) se aprovecha la misma energía para que ocurran los dos procesos, disminuyendo el costo energético. Sin embargo, se podrían tener costos extras para monitorear las condiciones del cultivo para un óptimo desarrollo del microorganismo ya que pueden existir variaciones en el pH que afecten la producción.

En particular, en este estudio a escala de laboratorio se analizarán las principales diferencias de estos sistemas. En primer lugar se tienen las diferencias en costos de materias primas. Se considerará que el proceso hasta la producción de la enzima es lo mismo para ambos sistemas. El paso en el que se comienzan a diferenciar es la concentración de la enzima producida con *P. pastoris* KM71/pPIC9KGTxyn10A recombinante mediante precipitación con sulfato de amonio. Lo que no solo conlleva a un gasto extra en términos de reactivos a utilizar, si no que también requiere de 1 día más para su adecuada concentración y posterior uso. En este sentido, el sistema *in situ* presenta una ventaja en términos de costos materiales y tiempo respecto al sistema *ex situ*.

En cuanto al gasto energético, en este trabajo se utilizó la misma temperatura de incubación (30°C) y agitación (200 rpm) por 24 horas con el fin de comparar los sistemas teniendo un mismo costo energético durante la producción de XOS. Se obtuvo una producción de XOS estadísticamente similar por lo que, a escala de laboratorio, no parece que haya una ventaja clara de uno sobre el otro en reducción de costos energéticos. Además, en el sistema *ex situ* se observó que utilizar una temperatura de 50°C (temperatura óptima de la xilanas) no produce más XOS que cuando se incubaba a 30°C (Figura 3.17).

Para el escalamiento del proceso aún falta bastante ya que es crucial optimizar el proceso a pequeña escala en términos de eficiencia, rendimiento y calidad del producto. También se debe considerar la posibilidad de evaluar alternativas tecnológicas que podrían mejorar la eficiencia del proceso. Por ejemplo, para el sistema *in situ*, se puede aplicar un método fed-batch a diferencia del batch que se utilizó en este trabajo. Sin embargo, es importante mencionar los hallazgos que han permitido vislumbrar al sistema *in situ* como una opción más económica que los procesos actuales.

Capítulo 4

Conclusiones

En este trabajo se evaluó la producción de xiloligosacaridos en un sistema *in situ* con *P. pastoris* KM71 recombinante con la enzima xilanasa GtXyn10A, donde la producción de la proteína recombinante (GtXyn10A) tiene una fase de crecimiento de la levadura y una segunda fase de producción de la PR, por la adición de metanol al medio. El primer objetivo de este trabajo consiste en determinar el medio de cultivo más adecuado para reemplazar los medios de cultivo tradicionales. Respecto a la fase de crecimiento, como se observa en la Figura 3.1, se encontró que el crecimiento de *Pichia pastoris* es mejor en los medios de cultivo que estaban compuestos por buffer fosfato de potasio en vez de citrato de sodio, alcanzando una OD_{600} igual 2 versus un 0,3 a las 19 horas de crecimiento. Con respecto a las dos concentraciones (2,4 % y 3,6 %) de extracto de levadura utilizadas para el reemplazo de los reactivos YNB y peptona, se observó que no existe diferencia significativa en el crecimiento de *P. pastoris* entre los medios de crecimiento modificados (JCG) y el tradicional (BMGY), por lo que es posible utilizar el medio de crecimiento modificado para reducir costos en el proceso de producción de XOS.

En cuanto a la fase de inducción de la producción de xilanasa en *P. pastoris*, la producción de XOS en el medio JCM fue similar a la del medio tradicional BMMY. También se concluye que el pH del medio de cultivo afecta fuertemente la acción de la enzima xilanasa. El efecto inhibitorio descrito en bibliografía por el buffer fosfato de potasio en la actividad enzimática no se logra apreciar en reacciones que transcurren en varias horas. A partir de las Figuras 3.5 y 3.6 se concluye que hay cierta ganancia-pérdida entre el pH adecuado en el medio y la inhibición por el buffer fosfato de potasio visto en otros estudios [62]. En ambos medios, incluir una mayor concentración de sustrato xilano (de 0,5 % a 1,5 % de xilano comercial de abedul) provoca una disminución del rendimiento de la producción de XOS, de 10 % a 7 %, respectivamente. En el medio con xilano de rastrojos de trigo se ve que al utilizar 0,5 % y 2,5 % de sustrato el rendimiento disminuye de 8 % a 2 %, respectivamente. A pesar de lo anterior, se concluye que el medio modificado (JCM) es capaz de reemplazar el medio tradicional (BMMY) pues se mantiene la producción de XOS, lo cual permitirá reducir los costos de este proceso.

Para el segundo objetivo, que consistía en extraer y caracterizar el xilano desde rastrojo de trigo, se obtuvo una composición de xilano de aproximadamente 35 % y 39 % para NaOH 2 % y 12 %, respectivamente, como se observa en la Figura 3.8. Estos resultados

son similares a los reportados en literatura [77] por lo que se concluye que el proceso de extracción se realizó adecuadamente. A pesar de que se obtiene una mayor extracción de xilano al utilizar una mayor concentración de NaOH, se determina que es mejor realizar el proceso de extracción con una menor concentración. Esto permite obtener un sustrato con menos sales que interfieran en la posterior reacción enzimática [66]. Al caracterizar la biomasa pretratada, se infiere que el xilano presenta principalmente residuos de arabinosa y glucosa. También se observó celulobiosa en la biomasa pretratada, por lo que se concluye que hay celulosa. Además, se concluye que el rastrojo de trigo es un buena materia prima para obtener el sustrato a utilizar para la producción de XOS ya que contiene un alto contenido de xilano.

Del tercer objetivo, sobre evaluar la producción de XOS y xilanasa en medios diseñados con xilano de rastrojos de trigo, se obtuvieron las mismas conclusiones que las obtenidas al utilizar xilano comercial. Al utilizar altas concentraciones de sustrato extraído de rastrojos de trigo genera un retardo en la producción de XOS, lo cual puede ser por la presencia de impurezas, como lignina y sales o por una diferencia en el grado de selectividad de la enzima hacia la parte soluble e insoluble del sustrato. El rendimiento de XOS para el medio suplementado con 0,5 % y 2,5 % de xilano de rastrojos de trigo fue de aproximadamente un 8 % y un 3 %, respectivamente.

Acerca del cuarto objetivo sobre comparar la producción de XOS en los sistemas *in situ* y *ex situ*, se tiene que las condiciones en la que se producen XOS en el sistema *ex situ* suplementado con xilano de rastrojos de trigo no afectan mayormente en la hidrólisis del sustrato (Figura 3.17), considerando un tiempo de reacción igual a 24 horas. Luego, al comparar la producción de XOS en ambos sistemas se observó una mayor producción en el sistema *in situ*. Sin embargo, el volumen en el que se realiza la reacción afecta la producción, teniendo en cuenta que se usan la misma concentración de enzima y sustrato en ambos sistemas (Figura 3.18). Por eso al utilizar un mismo volumen, se obtuvo la misma concentración de XOS en el sistema *in situ* y *ex situ*, al rededor de 0,25 [mg/ml].

Del estudio sobre potenciales factores inhibitorios de la producción de XOS en el sistema *in situ*, en particular de la posibilidad de inhibición por producto, se concluye que una preparación de XOS consistente en una mezcla de X2 y X3, no inhiben la actividad xilanasa de GTXyn10A, en la concentración ensayada. En cuanto a la opción de que el xilano que queda luego de la reacción enzimática (xilano residual) afecte en la actividad xilanasa para producir XOS, se concluye que la xilanasa puede continuar con la hidrólisis en presencia de la enzima arabinofuranosidasa, lo que permite concluir que la presencia de enzimas auxiliares mejoran la producción de XOS.

Finalmente, se concluye que el trabajo realizado logró determinar medios de crecimiento e inducción que permiten producir la misma concentración de XOS que los medios de cultivos tradicionales. Además, estos medios logran disminuir costos de producción, por lo que esta investigación entrega antecedentes importantes para estandarizar la producción de XOS a escala industrial. También se observa el potencial uso de un sistema *in situ* en reemplazo de los métodos actuales.

4.1. Proyecciones futuras

Para futuros trabajos se propone modificar el medio de crecimiento de *P. pastoris* JCM, en particular, aumentar la concentración del buffer citrato para amortiguar de mejor manera el pH y estudiar si aumenta la producción de XOS. Además, evaluar si con este cambio sigue siendo económicamente conveniente en comparación con el medio BMMY y el JCM utilizado en este trabajo.

Según literatura la xilanasa presenta inhibición por productos tales como xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4), xilopentaosa (X5) y xilohexaosa (X6) [45]. Es por esto que se recomienda repetir el estudio utilizando mayores concentraciones de XOS, de hasta 5 mM, y considerar más de dos concentraciones para obtener más valores de velocidad inicial (v_0). Al tratarse de un estudio que requiere de una alta concentración de estos productos, se sugiere estudiar y aplicar métodos de purificación. Por otro lado, resultaría interesante estudiar si la disminución del rendimiento en la producción de XOS al utilizar xilano extraído de rastrojo de trigo en vez de xilano comercial, visto en la Figura E.2, se debe a la presencia de inhibidores como el XIP y TAXI presentes en el trigo.

En cuanto a la producción de XOS, se recomienda estudiar la eficiencia, factibilidad técnica y viabilidad económica de producir enzimas auxiliares en el sistema *in situ* para ayudar en la hidrólisis del xilano efectuada por la xilanasa. Se propone utilizar la arabinofuranosidasa ya que esta hidroliza principalmente los residuos L-arabinofuranosa, la cual es la segunda pentosa más abundante en la hemicelulosa.

A partir de este estudio es posible decir que el sistema *in situ* podría ser una opción por sobre un sistema *ex situ*, sin embargo uno de los mayores desafíos que se observan del sistema *in situ*, es que se deben usar bajas concentraciones de sustrato. Esto resulta en una limitante en caso de querer utilizar mayores concentraciones en busca de mejorar el proceso. Como se ha visto que en concentraciones mayores el rendimiento baja, podría afectar el punto de vista económico del proceso. Como se cree que una de las posibilidades de esta situación sea que la enzima se satura, se propone evaluar la posibilidad de aumentar la producción de enzimas utilizando, por ejemplo, un proceso *fed-batch*.

Bibliografía

- [1] Pinales-Márquez, C. D., Rodríguez-Jasso, R. M., Araújo, R. G., Loredó-Treviño, A., Nabarlantz, D., Gullón, B., y Ruiz, H. A., “Circular bioeconomy and integrated biorefinery in the production of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A review,” *Industrial Crops and Products*, vol. 162, p. 113274, 2021, [doi:10.1016/j.indcrop.2021.113274](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113274).
- [2] Santibáñez, L., Henríquez, C., Corro-Tejeda, R., Bernal, S., Armijo, B., y Salazar, O., “Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A comprehensive review,” *Carbohydrate polymers*, vol. 251, 2021, [doi:10.1016/J.CARBPOL.2020.117118](https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117118).
- [3] Kobetičová, K. y Nábělková, J., “Effect of wood hemicellulose composition on binding interactions with caffeine,” *Buildings*, vol. 11, no. 11, 2021, <https://www.mdpi.com/2075-5309/11/11/515>.
- [4] Ahmad, N. y Zakaria, M. R., “Chapter 8 - oligosaccharide from hemicellulose,” en *Lignocellulose for Future Bioeconomy* (Ariffin, H., Sapuan, S., y Hassan, M. A., eds.), pp. 135–152, Elsevier, 2019, [doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816354-2.00008-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816354-2.00008-6).
- [5] Area, M., Vallejos, M., Bengoechea, D., Felissia, F., Dagnino, E., y R.B., S., *Biorrefinería a partir de residuos lignocelulósicos. Conversión de residuos a productos de alto valor.* 2012.
- [6] Scheller, H. V. y Ulvskov, P., “Hemicelluloses,” <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>, vol. 61, pp. 263–289, 2010, [doi:10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042809-112315](https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042809-112315).
- [7] Burgos-Arcos, C. y Sablón-Cossío, N., “Evaluación de las alternativas del empleo de la biomasa lignocelulósica del café en Chimborazo,” *Ingeniería Industrial*, vol. 43, pp. 21 – 36, 2022, http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1815-59362022000400021&nrm=iso.
- [8] Gallina, G., Álvaro Cabeza, Grénman, H., Biasi, P., García-Serna, J., y Salmi, T., “Hemicellulose extraction by hot pressurized water pretreatment at 160°C for 10 different woods: Yield and molecular weight,” *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 133, pp. 716–725, 2018, [doi:https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.10.001](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.10.001). Biomass Fractionation by Subcritical and Supercritical Water.
- [9] Poletto, P., Pereira, G. N., Monteiro, C. R., Pereira, M. A. F., Bordignon, S. E., y de Oliveira, D., “Xylooligosaccharides: Transforming the lignocellulosic biomasses into valuable 5-carbon sugar prebiotics,” *Process Biochemistry*, vol. 91, pp. 352–363, 2020, [doi:https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.01.005](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.01.005).

- [10] Goldberg, H. P., Varnero, M., Santibañez, F., y Homer, I., ALTERNATIVA A LA QUEMA DE RASTROJOS MEDIANTE INOCULANTES PROVENIENTES DE BIODIGESTORES. 2016.
- [11] oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA), “Información nacional de superficie sembrada, producción y rendimientos anuales,” 2022. <https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fbibliotecadigital.odepa.gob.cl%2Fbitstream%2Fhandle%2F20.500.12650%2F72050%2FCultivosAnualesHistorico%2520%252811%2529.xls&wdOrigin=BROWSELINK>, Último acceso: 25/05/2023.
- [12] Lin, Y.-Y., Chen, W.-H., Colin, B., Pétrissans, A., Lopes Quirino, R., y Pétrissans, M., “Thermodegradation characterization of hardwoods and softwoods in torrefaction and transition zone between torrefaction and pyrolysis,” *Fuel*, vol. 310, p. 122281, 2022, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122281>.
- [13] Samanta, A. K., Senani, S., Kolte, A. P., Sridhar, M., Sampath, K. T., Jayapal, N., y Devi, A., “Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs,” *Food and Bioproducts Processing*, vol. 90, pp. 466–474, 2012, doi:[10.1016/J.FBP.2011.11.001](https://doi.org/10.1016/J.FBP.2011.11.001).
- [14] Liu, Q., Fan, H., Mou, H., Liu, J., Huang, J., Dong, X., y Song, H., “Preparation and characterization of xylan by an efficient approach with mechanical pretreatments,” *Industrial Crops and Products*, vol. 165, p. 113420, 2021, doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113420>.
- [15] Rashid, R., E. U. A. F. H. I. B. A. L. J. W. L. F. P. . S. M., “Combined pretreatment of sugarcane bagasse using alkali and ionic liquid to increase hemicellulose content and xylanase production,” *BMC Biotechnol*, vol. 20, p. 64, 2020, doi:<https://doi.org/10.1186/s12896-020-00657-4>.
- [16] Martins, O., “Inmovilización y estabilización de endoxilanasas de trichoderma reesei. producción de xilo-oligosacaridos por hidrolisis enzimática de xilano,” 2017. FACULTAD DE CIENCIAS PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN.
- [17] Zhang, W., Johnson, A. M., Barone, J. R., y Renneckar, S., “Reducing the heterogeneity of xylan through processing,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 150, pp. 250–258, 2016, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.013>.
- [18] Zhang, X., Zhang, W., Lei, F., Yang, S., y Jiang, J., “Coproducts of xylooligosaccharides and fermentable sugars from sugarcane bagasse by seawater hydrothermal pretreatment,” *Bioresour Technol*, vol. 309, p. 123385, 2020, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123385>.
- [19] Alves, R. C., Melati, R. B., Casagrande, G. M., Contiero, J., Pagnocca, F. C., y Brienzo, M., “Sieving process selects sugarcane bagasse with lower recalcitrance to xylan solubilization,” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 96, no. 2, pp. 327–334, 2021, doi:<https://doi.org/10.1002/jctb.6541>.
- [20] Mitmesser, S. y Combs, M., “Prebiotics: Inulin and other oligosaccharides,” *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis*, pp. 201–208, 2017, doi:[10.1016/B978-0-12-80402](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-80402)

- [21] Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M. L., Clemente, A., Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., y Plou, F. J., “Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos,” *Nutrición Hospitalaria*, vol. 31, pp. 99–118, 2015, doi:10.3305/nh.2015.31.sup1.8715.
- [22] Pretorius, I., “The australian wine research institute. adaptación del diseño vitícola y enológico en función del objetivo de mercado,” *Wine internet thecnical journal*, vol. 4, 2003, <https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto916-01-1.pdf>.
- [23] Jiménez, A., “Aplicación de etapas enzimáticas (lacasa-xilanasa) para la obtención de pulpaquímica de bagazo de caña,” 2016. Universidad Pontificia Bolivariana. <http://hdl.handle.net/20.500.11912/2770>.
- [24] Uckun Kiran, E., Akpınar, O., y Bakir, U., “Improvement of enzymatic xylooligosaccharides production by the co-utilization of xylans from different origins,” *Food and Bioproducts Processing*, vol. 91, p. 565–574, 2013, doi:10.1016/j.fbp.2012.12.002.
- [25] Mano, M.C.R., N.-N. I. d. S. J. e. a., “Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 102, 2018, doi:10.1007/s00253-017-8564-2.
- [26] Huy, N., Thayumanavan, P., Kwon, T., y Park, S., “Characterization of a recombinant bifunctional xylosidase/arabinofuranosidase from phanerochaete chrysosporium,” *J Biosci Bioeng*, vol. 116, 2013, doi:10.1016/j.jbiosc.2013.02.004.
- [27] Shallom, D. y Shoham, Y., “Microbial hemicellulases,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 6, no. 3, pp. 219–228, 2003, doi:https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00056-0.
- [28] Molina, J. P., Perales, D. T., y Torres, P. S., “Xylanase enzyme with extreme thermostability and alkaline stability,” 2022.
- [29] CAZy, “Glycoside hydrolase family 10,” <http://www.cazy.org/GH10.html>. Último acceso 08 Agosto 2023.
- [30] CAZy, “Glycoside hydrolase family 11,” <http://www.cazy.org/GH11.html>. Último acceso 08 Agosto 2023.
- [31] Rahmani, N., Kahar, P., Lisdiyanti, P., Lee, J., Yopi, Prasetya, B., Ogino, C., y Kondo, A., “Gh-10 and gh-11 endo-1,4- β -xylanase enzymes from kitasatospora sp. produce xylose and xylooligosaccharides from sugarcane bagasse with no xylose inhibition,” *Bioresource Technology*, vol. 272, pp. 315–325, 2019, doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.007.
- [32] Vandeplass, S., B.-J., “Acción de una xilanasa producida por bacillus subtilis. efectos sobre la flora intestinal y el estado sanitario en las aves,” *Selecciones avícolas*, pp. 19–22, 2012.
- [33] Soto, J., “Evaluación del efecto de la mezcla de proteínas con actividad tipo expansina y xilanasas sobre la acción hidrolítica de celulasas en residuos lignocelulósicos,” 2016. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.

- [34] Li, C., Cao, H., Wu, W., Meng, G., Zhao, C., Cao, Y., y Yuan, J., “Expression and characterization of α -l-arabinofuranosidase derived from aspergillus awamori and its enzymatic degradation of corn byproducts with xylanase,” *Bioresource Technology*, vol. 384, p. 129278, 2023, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129278>.
- [35] Megazyme, “ α -l-arabinofuranosidase (aspergillus niger).” <https://www.megazyme.com/alpha-l-arabinofuranosidase-aspergillus-niger>.
- [36] CAZy, “Glycoside hydrolase family 51.” http://www.cazy.org/GH51_characterized.html. Último acceso 08 Agosto 2023.
- [37] Thakur, A., Sharma, K., y Goyal, A., “ α -l-arabinofuranosidase: A potential enzyme for the food industry,” pp. 229–244, 2019, doi:[10.1007/978-981-13-3263-0_12](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_12).
- [38] Kumla, J., Suwannarach, N., Sujarit, K., Penkhrue, W., Kakumyan, P., Jatuwong, K., Vadthananat, S., y Lumyong, S., “Cultivation of mushrooms and their lignocellolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial waste,” *Molecules*, vol. 25, p. 2811, 2020, doi:[10.3390/molecules25122811](https://doi.org/10.3390/molecules25122811).
- [39] Berrin, JG., J.-N., “Factors affecting xylanase functionality in the degradation of arabinoxylans,” *Biotechnol Lett*, vol. 30, 2008, doi:[10.1007/s10529-008-9669-6](https://doi.org/10.1007/s10529-008-9669-6).
- [40] Moers, K., Celus, I., Brijs, K., Courtin, C. M., y Delcour, J. A., “Endoxylanase substrate selectivity determines degradation of wheat water-extractable and water-unextractable arabinoxylan,” *Carbohydrate Research*, vol. 340, no. 7, pp. 1319–1327, 2005, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.02.031>.
- [41] Gebruers, K., Brijs, K., Courtin, C. M., Fierens, K., Goesaert, H., Rabijns, A., Raedschelders, G., Robben, J., Sansen, S., Sørensen, J. F., Van Campenhout, S., y Delcour, J. A., “Properties of taxi-type endoxylanase inhibitors,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1696, no. 2, pp. 213–221, 2004, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.08.013>. Plant proteinaceous inhibitors of glycosidases.
- [42] Flatman, R., M.-W. R. J. N. F. C. B. J. G. H. R. K. M. P. L. J. E. O. R. . W. G., “Interactions defining the specificity between fungal xylanases and the xylanase-inhibiting protein xip-i from wheat.” *The Biochemical journal*, vol. 365, p. 773–781, 2002, doi:<https://doi.org/10.1042/BJ20020168>.
- [43] Payan, F., Leone, P., Porciero, S., Furniss, C., Tahir, T., Williamson, G., Durand, A., Manzanares, P., Gilbert, H. J., Juge, N., y Roussel, A., “The dual nature of the wheat xylanase protein inhibitor xip-i: Structural basis for the inhibition of family 10 and family 11 xylanases*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 34, pp. 36029–36037, 2004, doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M404225200>.
- [44] Maulana Hidayatullah I, Setiadi T, T. A. P. K. M. B. R., “Xylanase inhibition by the derivatives of lignocellulosic material,” *Bioresour Technol*, 2020, doi:[10.1016/j.biortech.2020.122740](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122740).
- [45] Lo Leggio, L. y Pickersgill, R. W., “Xylanase–oligosaccharide interactions studied by a competitive enzyme assay,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 25, no. 8, pp. 701–709, 1999, doi:[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00103-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00103-9).

- [46] Bajpai, P., “Xylanases,” en *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (Schaechter, M., ed.), pp. 600–612, Oxford: Academic Press, third edition ed., 2009, doi:<https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00165-6>.
- [47] Zahrl, R. J., Peña, D. A., Mattanovich, D., y Gasser, B., “Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*,” *FEMS Yeast Research*, vol. 17, p. fox068, 2017, doi:[10.1093/femsyr/fox068](https://doi.org/10.1093/femsyr/fox068).
- [48] Karbalaee, M., Rezaee, S. A., y Farsiani, H., “*Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 235, no. 9, pp. 5867–5881, 2020, doi:<https://doi.org/10.1002/jcp.29583>.
- [49] Vogl, T. y Glieder, A., “Regulation of *pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production,” *New biotechnology*, vol. 30, 2012, doi:[10.1016/j.nbt.2012.11.010](https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.010).
- [50] Invitrogen, “ppic9k a *pichia* vector for multicopy integration and secreted expression,” 2010. Catalog no. V175–20.
- [51] Amorim, C., Silvério, S. C., y Rodrigues, L. R., “One-step process for producing prebiotic arabino-xylooligosaccharides from brewer’s spent grain employing *trichoderma* species,” *Food Chemistry*, vol. 270, pp. 86–94, 2019, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.080>.
- [52] Huaman Castilla, N., Allica, E., Leon, N., y Yupanqui, G., “Uso de edulcorantes comerciales como una alternativa a la reducción de 5-Hidroximetil-2-Furfural (HMF) en galletas modelo,” *Revista de la Sociedad Química del Perú*, vol. 83, pp. 213 – 220, 2017, http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2017000200007&nrm=iso.
- [53] Chapla, D., Pandit, P., y Shah, A., “Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics,” *Bioresource Technology*, vol. 115, pp. 215–221, 2012, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.083>. Biocatalysis.
- [54] Wan Azelee, N. I., Jahim, J. M., Ismail, A. F., Fuzi, S. F. Z. M., Rahman, R. A., y Md Illias, R., “High xylooligosaccharides (xos) production from pretreated kenaf stem by enzyme mixture hydrolysis,” *Industrial Crops and Products*, vol. 81, pp. 11–19, 2016, doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.038>.
- [55] Henríquez, C., “Caracterización de la hidrólisis enzimática de xilano mediante herramientas experimentales y modelación en el marco de la producción de xilooligosacáridos,” 2021. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- [56] Chapla, D., Pandit, P., y Shah, A., “Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics,” *Bioresource Technology*, vol. 115, pp. 215–221, 2012, doi:[10.1016/j.biortech.2011.10.083](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.083). Biocatalysis.
- [57] Linares-Pasten A. Javier, A. A. y Eva, K. N., “Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass,” *Current Protein Peptide Science*, vol. 19, 2018, doi:[10.2174/13892037176661609231](https://doi.org/10.2174/13892037176661609231)

- [58] Yan, J., Zheng, X., Du, L., y et al., “Integrated lipase production and in situ biodiesel synthesis in a recombinant *pichia pastoris* yeast: an efficient dual biocatalytic system composed of cell free enzymes and whole cell catalysts,” *Biotechnology for Biofuels*, vol. 7, p. 55, 2014, doi:[10.1186/1754-6834-7-55](https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-55).
- [59] Lynd, L. R., van Zyl, W. H., McBride, J. E., y Laser, M., “Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 16, no. 5, pp. 577–583, 2005, doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.08.009>. Tissue and cell engineering/Biochemical engineering.
- [60] Amorim, C., Silvério, S. C., Prather, K. L., y Rodrigues, L. R., “From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides,” *Biotechnology Advances*, vol. 37, no. 7, p. 107397, 2019, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.05.003>.
- [61] Li, P., S. H. C. Z. e. a., “Construcción de xilosa eficiente utilizando *pichia pastoris* para enzimas industriales producción.” *Hecho de la célula microb*, vol. 14, p. 22, 2015, <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0206-8>.
- [62] Coronado, J., “Diseño y evaluación de un sistema in situ para la producción simultánea de xilanas y xilooligosacáridos en un cultivo de *pichia pastoris* recombinante.” Tesis en desarrollo para optar al grado de Magíster en Ingeniería Química. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- [63] Serrano-Rivero, Yunier Marrero-Domínguez, K. F.-C. R., “*Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas.” *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 2016, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181245821001>.
- [64] Berlin A, Maximenko V, G. N. S. J., “Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 97, p. 113274, 2007, doi:[10.1002/bit.21238](https://doi.org/10.1002/bit.21238).
- [65] Invitrogen, “*Pichia* expression kit. user guide. for expression of recombinant proteins in *pichia pastoris*, catalog number k171001.”, <https://bit.ly/3haK90c>.
- [66] Lehedé, L., Henríquez, C., Carú, C., Córdova, A., Mendonça, R. T., y Salazar, O., “Xylan extraction from hardwoods by alkaline pretreatment for xylooligosaccharide production: A detailed fractionation analysis,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 302, p. 120381, 2023, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120381>.
- [67] Corro, R., “Estudio del efecto de las condiciones de crecimiento y del medio de cultivo sobre la producción de xilanas recombinante en *pichia pastoris* y diseño de un modelo matemático para estimar la producción de la enzima en metanol,” Universidad de Chile, 2021.
- [68] aldrich, S., “Base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos.”. [En línea] https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/product/sigma/y0626?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=8691857239&utm_content=86936192109&gclid=CjwKCAiA1-6sBhAoEiwArqlGPot5-Vc4EBZOMrCft6vCXiU0S1TnX-WWZgUVx9sugxfJzJsxqnMF9BoCy24QAvD_BwE [Consulta: Agosto de 2023].

- [69] Termofisher, “Peptona bacto.”. [En línea] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/cl/es/211677> [Consulta: Agosto de 2023].
- [70] Termofisher, “Extracto de levadura.”. [En línea] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/211929?SID=srch-srp-211929> [Consulta: Agosto de 2023].
- [71] Bajpai, P., “Xylanases,” en *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (Schaechter, M., ed.), pp. 600–612, Oxford: Academic Press, third edition ed., 2009, doi:<https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00165-6>.
- [72] Huang, C., Yu, Y., Li, Z., Yan, B., Pei, W., y Wu, H., “The preparation technology and application of xylo-oligosaccharide as prebiotics in different fields: A review,” *Frontiers in Nutrition*, vol. 9, 2022, doi:[10.3389/fnut.2022.996811](https://doi.org/10.3389/fnut.2022.996811).
- [73] Thirametoakkhara, C., Hong, Y.-C., Lerkkasemsan, N., Shih, J.-M., Chen, C.-Y., y Lee, W.-C., “Application of endoxylanases of bacillus halodurans for producing xylooligosaccharides from empty fruit bunch,” *Catalysts*, vol. 13, no. 1, 2023, doi:[10.3390/catal13010039](https://doi.org/10.3390/catal13010039).
- [74] Robinson, P. K., “Enzimas: principios y aplicaciones biotecnológicas,” *Ensayos de bioquímica*, vol. 59, p. 1–41, 2015, doi:<https://doi.org/10.1042/bse0590001>.
- [75] Rosell, G., “Control de crecimiento de la levadura pichia pastoris,” 2010. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
- [76] Sóti, V., Lenaerts, S., y Cornet, I., “Of enzyme use in cost-effective high solid simultaneous saccharification and fermentation processes,” *Journal of Biotechnology*, vol. 270, pp. 70–76, 2018, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.020>.
- [77] García, J. C., Díaz, M., Garcia, M., Feria, M., Gómez, D., y López, F., “Search for optimum conditions of wheat straw hemicelluloses cold alkaline extraction process,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 71, pp. 127–133, 2013, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.12.008>.
- [78] de Freitas, C., Terrone, C. C., Masarin, F., Carmona, E. C., y Brienzo, M., “In vitro study of the effect of xylooligosaccharides obtained from banana pseudostem xylan by enzymatic hydrolysis on probiotic bacteria,” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 33, p. 101973, 2021, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101973>.
- [79] Budaeva, V., Skiba, E., Baibakova, O., Makarova, E., Orlov, S., Kukhlenko, A., Udoratina, E., Shcherbakova, T., Kuchin, A., y Sakovich, G., “Kinetics of the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials at different concentrations of the substrate,” *Catalysis in Industry*, vol. 8, pp. 81–87, 2016, doi:[10.1134/S2070050416010025](https://doi.org/10.1134/S2070050416010025).
- [80] Vital López, P., L. C. C. P., “Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial,” *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, vol. 67, pp. 86–91, 2016.
- [81] Farhat, W., Venditti, R., Quick, A., Taha, M., Mignard, N., Becquart, F., y Ayoub, A., “Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives,” *Industrial Crops and Products*, vol. 107, pp. 370–377, 2017, doi:[10.1016/j.indcrop.2017.05.055](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.055).

- [82] VitalABO, “Xilooligosacáridos xos.”. <https://www.vitalabo.es/allergy-research-group/xilooligosacaridos-xos>.
- [83] Torres, V., “Estudio de la actividad endoxilanas gtxyn10a utilizando sustratos lignocelulósicos que contienen glucanos como contaminantes: Evaluación del efecto de la adición de endoglucanasas al medio de reacción.” Tesis en desarrollo para optar al grado de Magíster en Bioquímica. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- [84] MundoAgro, “Problemas de la quema de rastrojos y alternativas posibles.”. [En línea] <https://mundoagro.cl/problemas-de-la-quema-de-rastrojos-y-alternativas-posibles/#:~:text=La%20acumulaci%C3%B3n%20de%20rastrojos%20de,triticales%20sobre pasar%C3%ADa%20las%2010%20toneladas>. [Consulta: Agosto de 2023].
- [85] Heinen, P. R., Betini, J. H., y Polizeli, M. L., “Xylanases,” en Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition) (Schmidt, T. M., ed.), pp. 604–615, Oxford: Academic Press, fourth edition ed., 2019, doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13127-9>.

Anexos

Anexo A. Medios de cultivo

A continuación, se presentan las composiciones de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento e inducción de *Pichia Pastoris* recombinante en el trabajo de laboratorio realizado.

En la Tabla A.1 se muestra la composición del medio YPD-agar, el cual fue utilizado para realizar el cultivo en placa petri con el fin de obtener colonias aisladas.

Tabla A.1: Composición medio YPD-agar [65].

Componente	Cantidad	Unidad
Peptona	2	%
Dextrosa	2	%
Extracto de levadura	1	%
Agar	2	%

La Tabla A.2 corresponde a la composición del medio YPD líquido. Este medio de cultivo se utilizó para preparar el pre-inoculo a partir de una de las colonias crecidas en el medio YPD-agar.

Tabla A.2: Composición medio YPD [65].

Componente	Cantidad	Unidad
Peptona	2	%
Dextrosa	2	%
Extracto de levadura	1	%

En la Tabla A.3 se describe la composición del medio de cultivo BMGY. Este medio se utilizó para crecer *Pichia pastoris* y posteriormente realizar una comparación con los medios diseñados similares al mismo.

Tabla A.3: Composición medio BMGY [65].

Componente	Cantidad	Unidad
Extracto de levadura	1	%
Peptona	2	%
Fosfato de potasio	100	mM
YNB	1,34	%
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$	%
Glicerol	1	%

En las Tablas A.4, A.5, A.6 y A.7 se muestran las composiciones de los medios diseñados para estudiar nuevas opciones frente al medio tradicional BMGY para el crecimiento de *Pichia pastoris*, con el fin de reducir costos de producción de XOS mediante el sistema in situ. Estos medios se diferencian al tradicional por la ausencia de los compuestos YNB y peptona. Además, se varió la concentración de extracto de levadura y se estudiaron 2 buffers (Fosfato de potasio y citrato de sodio).

Tabla A.4: Composición medio BMGY modificado con 2,4% de extracto de levadura y buffer fosfato de potasio [62].

Componente	Cantidad	Unidad
Extracto de levadura	2,4	%
Fosfato de potasio	100	mM
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$	%
Glicerol	1	%

Tabla A.5: Composición medio BMGY modificado con 3,6% de extracto de levadura y buffer fosfato de potasio [62].

Componente	Cantidad	Unidad
Extracto de levadura	3,6	%
Fosfato de potasio	100	mM
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$	%
Glicerol	1	%

Tabla A.6: Composición medio BMGY modificado con 2,4% de extracto de levadura y buffer citrato de sodio [62].

Componente	Cantidad	Unidad
Extracto de levadura	2,4	%
Citrato de sodio	200	mM
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$	%
Glicerol	1	%

Tabla A.7: Composición medio BMGY modificado con 3,6% de extracto de levadura y buffer citrato de sodio [62].

Componente	Cantidad	Unidad
Extracto de levadura	3,6	%
Citrato de sodio	200	mM
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$	%
Glicerol	1	%

En la Tabla A.8 se presenta la composición del medio BMMY, el cual fue utilizado para inducir la producción de la xilanasa recombinante. Este medio es uno de los tradicionalmente utilizados para inducir *Pichia pastoris* recombinante.

Tabla A.8: Composición medio BMMY [65].

Componente	Cantidad	Unidad
Extracto de levadura	1	%
Peptona	2	%
Fosfato de potasio	100	mM
YNB	1,34	%
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$	%
Metanol	0,5	%

De los medios de cultivos utilizados para el crecimiento, se eligió el que contenía 2,4% de extracto de levadura y Fosfato de sodio 100 mM, Tabla A.4. En adelante, este medio fue llamado JCG para mayor claridad, el cual se presenta en la Tabla A.9.

Tabla A.9: Composición medio JCG [62].

Componente	Cantidad	Unidad
Extracto de levadura	2,4	%
Fosfato de potasio	100	mM
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$	%
Glicerol	1	%

En cuanto al medio de inducción diseñado, fue llamado JCM. La composición de este se presenta en la Tabla A.10. La diferencia con el medio BMMY recae en la ausencia de YNB y peptona, un aumento en la concentración de extracto de levadura y cambio a un buffer Citrato de sodio 200 mM.

Tabla A.10: Composición medio JCM [62].

Componente	Cantidad	Unidad
Extracto de levadura	2,4	%
Citrato de sodio	200	mM
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$	%
Metanol	0,5	%

Anexo B. Curvas de calibración

A continuación se presentan las curvas de calibración utilizadas en este trabajo experimental.

B.1. Curva de calibración de DNS

En la Figura B.1 se muestra la curva de calibración de DNS para medir azúcares reductores, en particular xilosa. En ella se relaciona la concentración de xilosa con la OD_{550} nm medida.

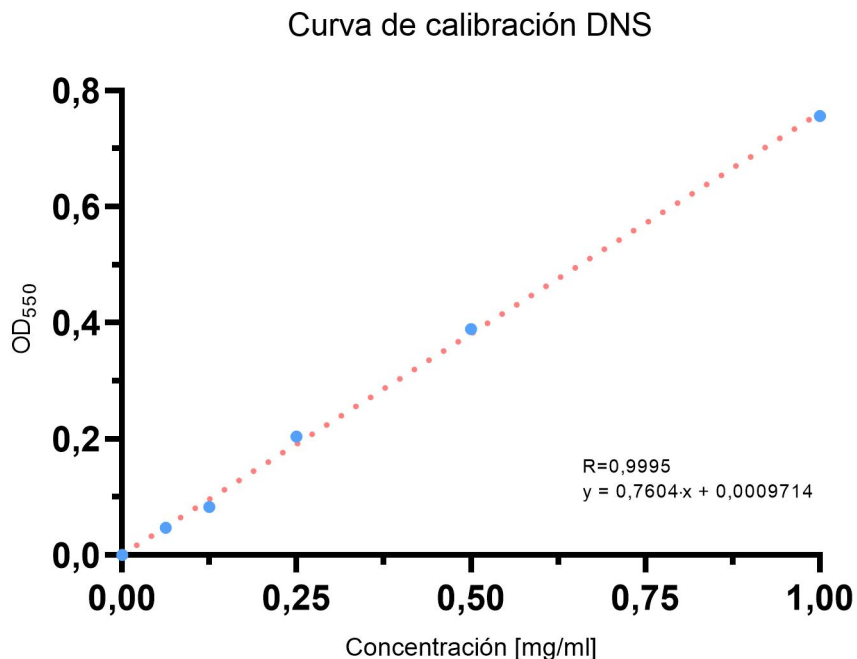


Figura B.1: Curva de Calibración de DNS obtenida para la medición de azúcares reductores.

B.2. Curva de calibración de XOS

En las Figuras B.2 y B.3 se muestran las curvas de calibración de la xilobiosa y xilotriosa, respectivamente.

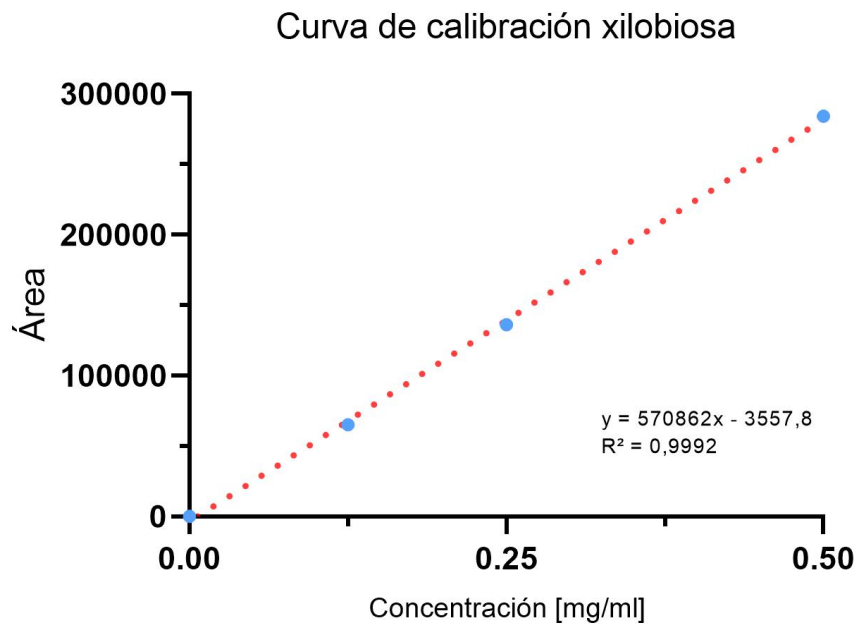


Figura B.2: Curva de Calibración de xilobiosa para la medición de XOS producidos.

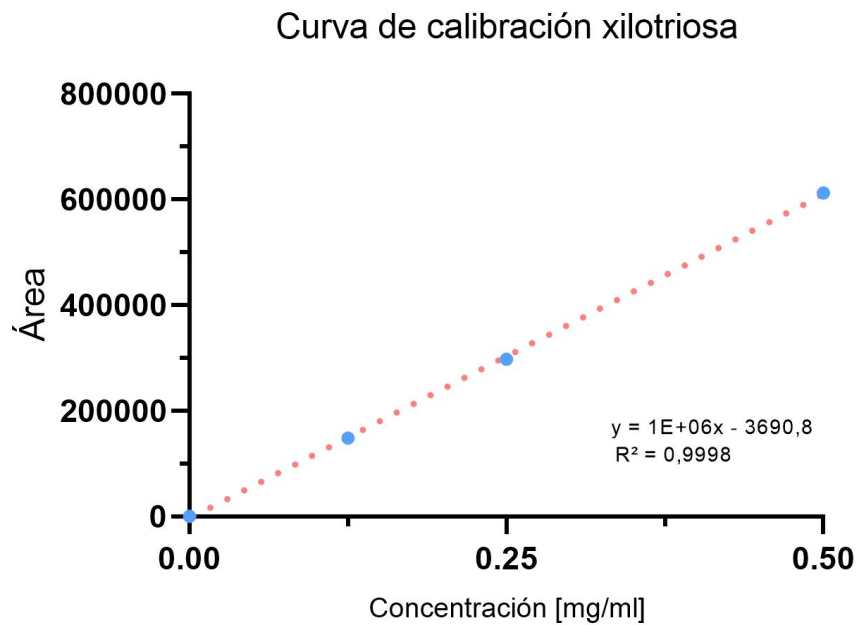


Figura B.3: Curva de Calibración de xilotriosa para la medición de XOS producidos.

B.3. Curva de calibración de azúcares para la caracterización del xilano

Para la caracterización del xilano se realizaron curvas de diferentes azúcares. En las figuras B.4, B.5, B.6 y B.7, se muestran las curvas de calibración para la xilosa, glucosa,

arabinosa y celobiosa.

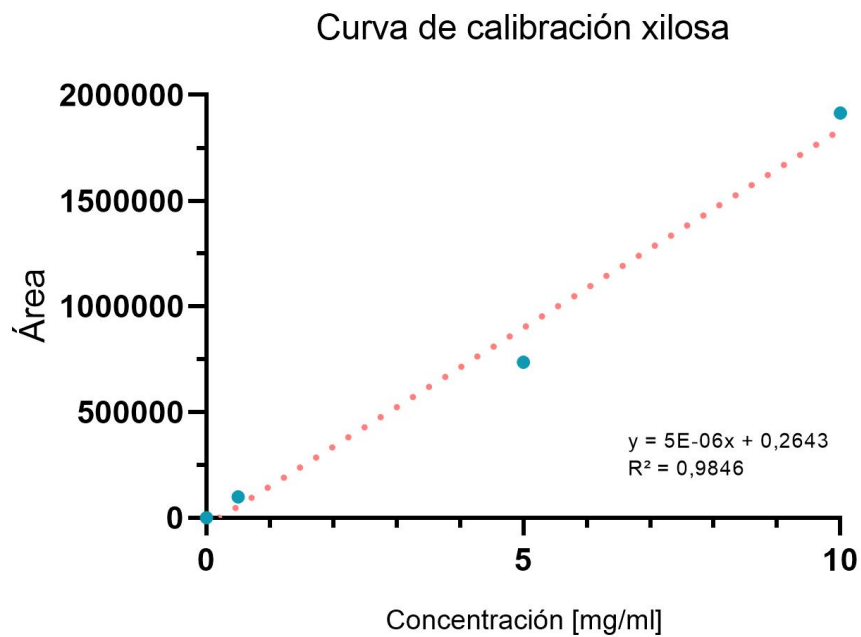


Figura B.4: Curva de Calibración de xilosa para la caracterización del xilano extraído.

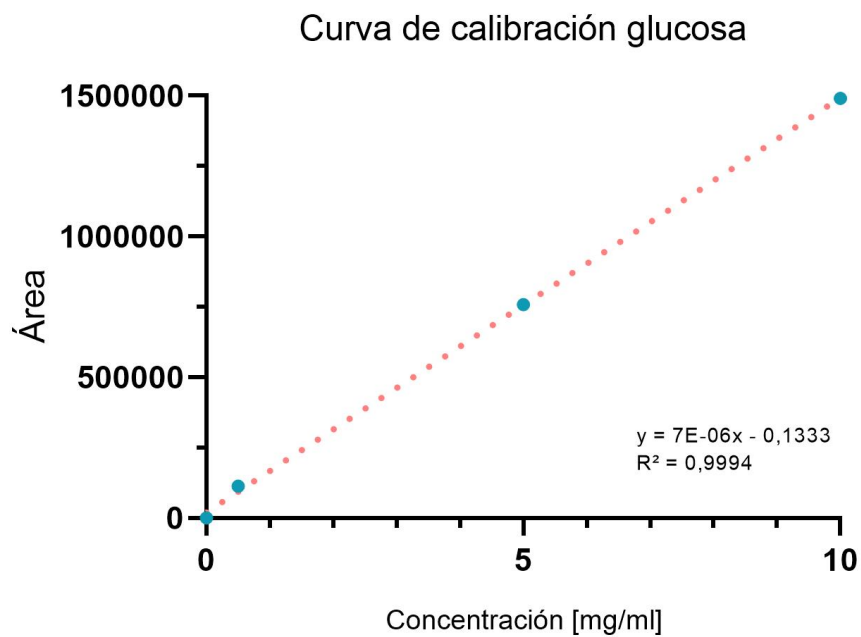


Figura B.5: Curva de Calibración de glucosa para la caracterización del xilano extraído.

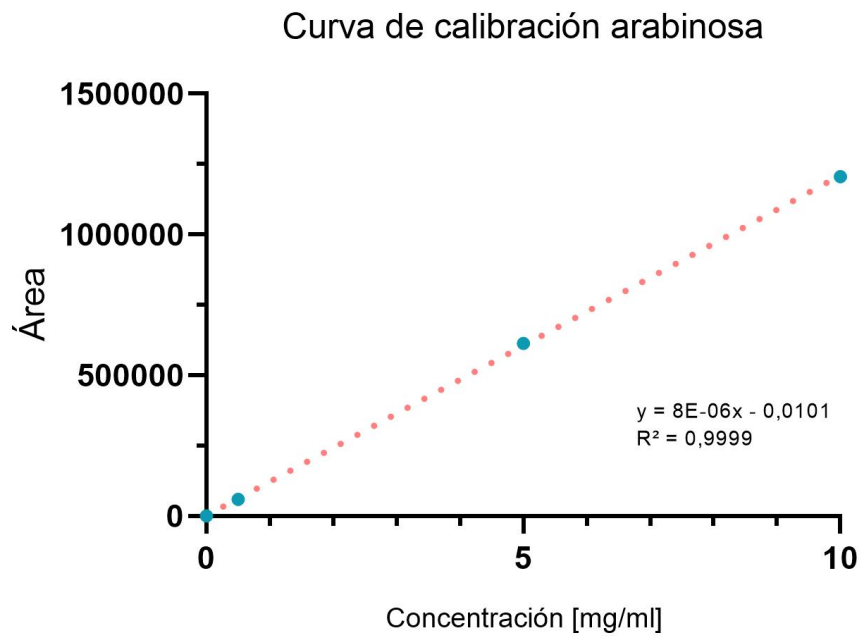


Figura B.6: Curva de Calibración de arabinosa para la caracterización del xilano extraído.

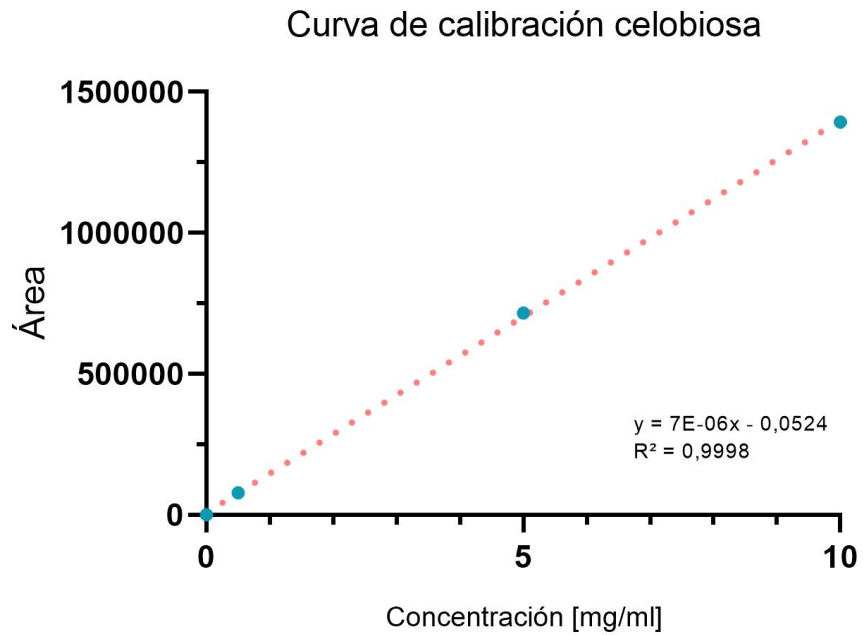


Figura B.7: Curva de Calibración de celobiosa para la caracterización del xilano extraído.

Anexo C. Estándares

C.1. Estándares de azúcares

En la Tabla C.1 se muestran los tiempos de retención para las azúcares a obtener en la caracterización al utilizar la columna Aminex Bio-Rad HPX-87H.

Tabla C.1: Tiempos de retención de azúcares para el estudio de la composición del xilano extraído de biomasa.

Estándar	Tiempo de retención [min]
Celobiosa	10,52
Glucosa	12,96
Xilosa	13,9
Arabinosa	15,04

C.2. Estándares de XOS

En la Tabla C.2 se muestran los tiempos de retención de la xilosa y xilooligosacáridos al utilizar la columna Rezex RSO-oligosacárido Ag+ (4) % (Phenomenex).

Tabla C.2: Tiempos de retención de xilosa y XOS para el estudio de la producción de XOS en los sistemas in situ y ex situ.

XOS	Tiempo de retención [min]
Xilosa	34,32
Xilobiosa	28,813
Xilotriosa	24,769
Xilotetraosa	21,632
Xilopentaosa	19,222
Xilohexaosa	17,37

Anexo D. Caracterización xilano extraído de biomasa

En la Tabla D.1 se muestran en mayor detalle la proporción porcentual de glucano y xilano en la biomasa lignocelulósica pretratada de manera termo-alkalina.

Tabla D.1: Composición de xilano extraído de trigo y lenga utilizando 2 % y 12 % de NaOH en la extracción.

Compuesto	Glucano [%]	Xilano [%]	Otros compuestos [%]
Xilano de trigo con NaOH al 2 %	7	35	58
Xilano de lenga con NaOH 2 %	7	24	69
Xilano de trigo con NaOH al 12 %	7	39	54

Anexo E. Gráficos complementarios producción de XOS

A continuación se presentan algunos gráficos complementarios obtenidos del estudio de la producción de XOS.

E.1. Producción de XOS en medio con xilano residual

En la Figura E.1 se muestra el gráfico obtenido a partir de la medición de XOS en un sistema *in situ* reaccionando por 72 horas. A ese tiempo ya se veía una concentración constante de XOS, por lo que facilitaba el estudio del xilano residual en el medio. Se observa que inicialmente había una concentración de XOS igual a 0,2 [mg/ml], aproximadamente. Se nota un aumento de hasta 0,1 [mg/ml] luego de reacción el medio con nueva enzima.

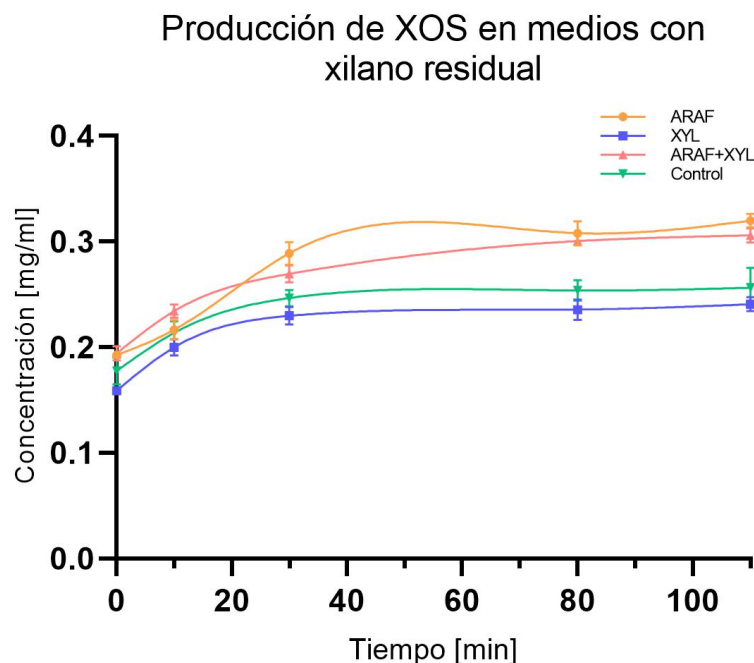


Figura E.1: Producción de XOS en medio con xilano residual y 0,2 [mg/ml] de XOS inicialmente.

E.2. Producción de XOS en medios con 0,5 % de sustrato

En las Figuras E.2 y E.3 se muestran la producción de xilobiosa y xilotriosa, respectivamente, al utilizar como sustrato xilano comercial y xilano de trigo al 0,5 %.

Producción de xilobiosa en medios con 0,5% xilano

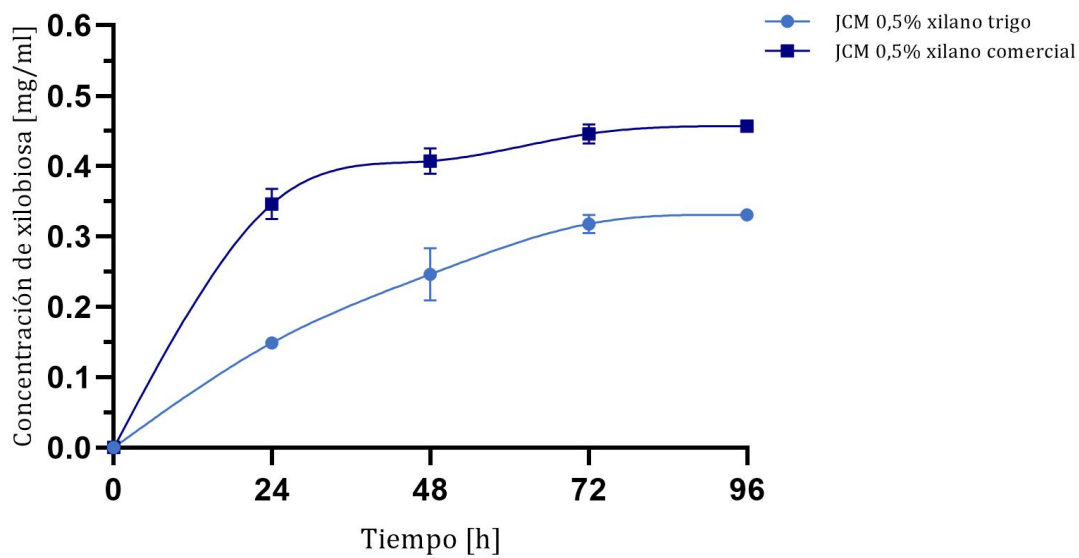


Figura E.2: Xilobiosa producida en sistema *in situ* con xilano comercial y xilano proveniente de trigo.

Producción de xilotriosa en medios con 0,5% xilano

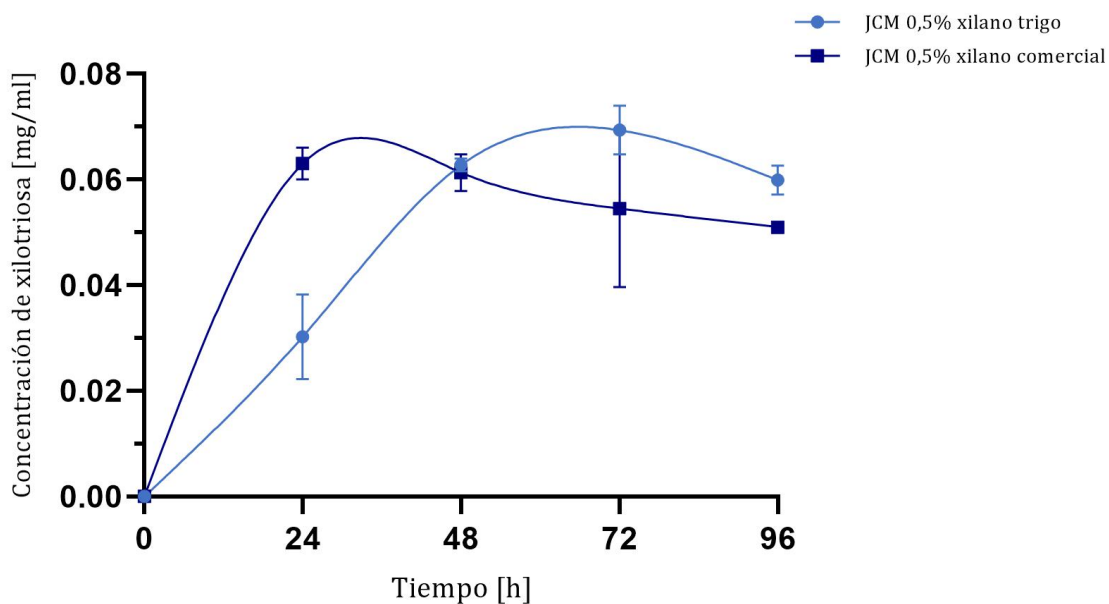


Figura E.3: Xilotriosa producida en sistema *in situ* con xilano comercial y xilano proveniente de trigo.

E.3. Producción de xilobiosa y xilotriosa en sistema *in situ* y *ex situ* a las 24 horas

En la Figura E.4 se muestra la producción de xilobiosa y xilotriosa en los sistemas *in situ* y *ex situ* luego de 24 horas de actividad enzimática. Se observa que en el sistema *in situ* la producción de xilobiosa es ligeramente mayor a la producida en el *ex situ*. En cambio la xilotriosa es mayor en el *ex situ* que en el *in situ*. Si bien la diferencia es pequeña, esto podría deberse a que en el sistema *in situ* la enzima degrada parte de la xilotriosa presente en el medio [85].

Producción de xilobiosa y xilotriosa en sistemas *in situ* y *ex situ* a las 24 horas

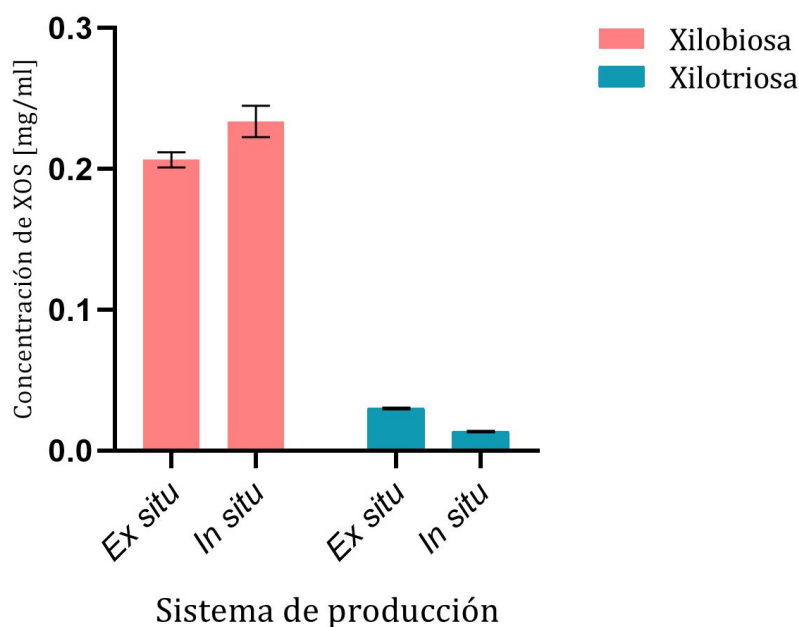


Figura E.4: Producción de xilobiosa y xilotriosa en sistemas *in situ* y *ex situ* luego de 24 horas en igual volumen de reacción enzimática. Las barras representan la desviación estándar, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó en triplicado. En la Figura 2.3 segunda comparación se observa un esquema del volumen usado en este experimento.