



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

ESTUDIO DEL EFECTO DE XILANASAS FÚNGICAS EN LA DEGRADACIÓN DE SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA E
INGENIERO CIVIL QUÍMICO

JAVIER EDUARDO DEVIA ULLOA

PROFESORA GUÍA:
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

SANTIAGO DE CHILE

MAYO 2014

Resumen

Como una alternativa al uso de combustibles fósiles líquidos se propone utilizar bioetanol, con lo que se obtendría una reducción de los problemas asociados a la quema de los primeros. Bioetanol es un biocombustible renovable que produce menos dióxido de carbono. Su producción es limitada por temas económicos, ya que sus costos no compiten con los combustibles convencionales. Dentro del proceso productivo de bioetanol de segunda generación, la etapa de hidrólisis de la biomasa es una de las asociadas a mayores costos, lo que repercute directamente en los mayores precios que alcanzan los biocombustibles de este tipo.

En este documento se presenta un estudio realizado sobre xilanasas de origen fúngico. Estas enzimas intervienen en la hidrólisis del material lignocelulósico, degradando la cadena principal del xilano, que es el constituyente más abundante de la hemicelulosa y que dificulta el acceso de otras enzimas a la celulosa. La búsqueda de xilanasas se realizó en el contexto del proyecto FONDECYT 1121088, en que se busca identificar enzimas auxiliares que intervienen en la hidrólisis de la lignocelulosa, para generar mezclas celulolíticas mejoradas.

El objetivo general del trabajo consistió en identificar xilanasas producidas por los hongos *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum*, para evaluar su desempeño en la hidrólisis de paja de trigo. Se estudió las enzimas a través de dos enfoques: en el primero se clonó los genes que codifican la información de las xilanasas y se estudió propiedades derivadas de la secuencia predicha para cada una; adicionalmente se realizó un estudio de las proteínas, purificándolas parcialmente desde cultivos de los hongos, así se evaluó la capacidad de hidrólisis de xilano y paja de trigo pre-tratada que tiene cada xilanasas.

Se comprobó la expresión de xilanasas por ambas especies fúngicas al suplementar cultivos líquidos de paja de trigo pre-tratada 1% (p/v). Específicamente, se identificó dos xilanasas de *G. trabeum*: GTXYL1 y GTXYL2, y una de *T. versicolor*: TVXYL1. Se secuenció el gen que codifica para la xilanasas GTXYL1. Utilizando herramientas bioinformáticas se predijo un punto isoeléctrico de 4,57, un peso molecular de 37,9[kDa] y la presencia de una secuencia señal de exportación en el extremo amino y un dominio de la familia 10 de las glicosil hidrolasas.

En el caso de *T. versicolor* se logró identificar tres grupos de fracciones con actividad xilanasas por cromatografía de intercambio aniónico. Por otro lado, a través de esta estrategia se separó la xilanasas GTXYL1 de *G. trabeum*. Se logró enriquecer 16,8 veces la actividad xilanasas, con una recuperación del 39% de la actividad del cultivo. En ensayos de hidrólisis de paja de trigo se detectó la liberación de xilosa por las muestras provenientes del medio extracelulares de los hongos, con esto se concluye que las xilanasas de estos hongos son capaces de degradar la hemicelulosa presente en biomasa lignocelulósica.

Se recomienda seguir los estudios, clonando el gen obtenido de GTXYL1 en un vector de expresión para producir la enzima de forma recombinante y, de este modo, caracterizarla y evaluar su capacidad de hidrólisis sobre compuestos lignocelulósicos.

Agradecimientos

A mis padres, Boris y Matilde, por el enorme esfuerzo que han hecho para que haya llegado hasta aquí, y a mis hermanos Álvaro, Mariana y Natalia por estar siempre conmigo.

A mi segunda mamá, la Tita, por formarme en la persona que soy actualmente.

A mi pareja, Belén, por darme ánimo en los momentos difíciles y hacerme tan feliz día a día.

A mis mejores amigos, Wallo y Jon, por sus sabios consejos y palabras de apoyo desde que los conozco.

A mi profesora guía Oriana Salazar, por su gran compromiso, paciencia y dedicación, por estar siempre cuando la necesitaba, por aguantarme y hacer de mi Memoria de Título un trabajo ameno.

A la gente del CIByB por el grato ambiente de trabajo, en especial a Daniela Sandoval y Gonzalo Carvajal por guiarme en gran parte de los montajes experimentales.

A mis amigos de plan común, Chico, Peni, Pablo, Mago, Feña y Camilo que me motivaron para permanecer en la carrera a pesar de todo.

A mis amigos de IQBT, Dani, Jorge, Nacho y tantos otros, que hicieron que creciera muchísimo como persona y que lograron hacer de mi estadía universitaria, la mejor etapa de mi vida.

El estudio fue completamente financiado por FONDECYT a través del proyecto 1121088.

Tabla de contenido

Resumen	iii
Agradecimientos	iii
Índice de tablas	vii
Índice de Figuras	viii
I. Introducción	1
1. Contexto general	1
2. Energía en Chile	1
3. Biocombustibles	2
4. Lignocelulosa	4
4.1. Celulosa	4
4.2. Hemicelulosa	5
4.3. Lignina	5
5. Proceso productivo del bioetanol de segunda generación	6
5.1. Pre-tratamiento	7
5.2. Hidrólisis	7
5.3. Fermentación	9
5.4. Destilación	9
6. Antecedentes específicos y justificación del proyecto	9
7. Antecedentes preliminares	12
8. Objetivos	13
8.1. Objetivo general	13
8.2. Objetivos específicos	13
II. Materiales y Métodos	13
1. Materiales	13
1.1. Reactivos	13
1.2. Equipos	14
1.3. Enzimas	14
1.4. Vector de clonamiento	15
2. Métodos	15
2.1. Cultivo de hongos	15
2.2. Identificación y clonamiento de los genes de xilanasas	16
2.3. Estudio y separación de proteínas	19
2.4. Ensayo de actividad sobre paja de trigo	21
2.5. Métodos bioinformáticos	22
III. Resultados y Discusión	23
1. Verificación de la expresión de xilanasas en presencia de paja de trigo.	23
2. Identificación de xilanasas expresadas al inducir con paja de trigo	24
3. Clonamiento y análisis de secuencias que codifican para xilanasas	26
3.1. Extracción de RNA total	26
3.2. Aislamiento y amplificación de los genes de xilanasas	27
3.3. Estudio de dominios conservados	33
3.4. Similitud entre las xilanasas estudiadas	35
4. Separación y caracterización funcional de las enzimas	38
4.1. Separación de xilanasas de <i>T. versicolor</i>	38
4.2. Separación de xilanasas de <i>G. trabeum</i>	41
5. Estudios de actividad frente lignocelulosa	47

IV. Conclusiones	50
V. Bibliografía	52
VI. Anexos	55
Anexo A. Gel construido en los estudios preliminares	55
Anexo B. Detalle de protocolos	55
Anexo C. Medios y condiciones de cultivo	60
1. Medio líquido para <i>T. versicolor</i> (106):.....	60
2. Medio líquido para <i>G. trabeum</i> (117):	60
3. Condiciones de cultivo	61
Anexo D. Diseño de primers	61
Anexo E. Secuencias genéticas y proteicas	62
1. Genes y xilanasas hipotéticas	62
2. Resultados del secuenciamiento	71
Anexo F. Cultivos de hongos y manejo de proteínas	82
1. Manejo general de proteínas	82
2. Primer cultivo	83
3. Segundo cultivo	90
4. Tercer cultivo	91
Anexo G. Estrategias alternativas de separación	93
1. Separación a través de algodón	93
2. Separación incubando con avicel	93
Anexo H. Ensayo preliminar de actividad sobre paja de trigo	94
Anexo I. Composición de reactivos	96
Anexo J. Curvas estándar	97
1. Curva de Bradford.....	97
2. Curvas de calibración del ensayo de azúcares reductores para xilosa.....	98
3. Curvas de calibración del ensayo de azúcares reductores para glucosa	98
Anexo K. Constantes cinéticas de xilanasas de <i>G. trabeum</i>	100

Índice de tablas

Tabla 1. "Identificación de péptidos por espectrometría de masa para <i>G. trabeum</i> ".....	12
Tabla 2. "Identificación de péptidos por espectrometría de masa para <i>T. versicolor</i> ". ...	12
Tabla 3. "Reactivos utilizados y proveedores".....	13
Tabla 4. "Equipos utilizados, fabricante y modelos".	14
Tabla 5. "Enzimas utilizadas y proveedores".....	14
Tabla 6. "Genes GH10 y GH11 hipotéticas y en cultivo".	23
Tabla 7. "Péptidos encontrados en cultivos de <i>G. trabeum</i> ".....	24
Tabla 8. "Xilanasas seleccionadas para el estudio y características de cada una".....	26
Tabla 9. "Concentración y calidad de RNA extraído".	27
Tabla 10. "Patrones de secuencias aminoacídicas de los dominios conservados".	33
Tabla 11. "Peso molecular y punto isoeléctrico teórico de cada xilanasa".	35
Tabla 12. "Tabla de purificación de la actividad xilanasas de <i>G. trabeum</i> ".	46
Tabla 13. "Tabla de purificación de la actividad celulasa de <i>G. trabeum</i> ".	46
Tabla 14. "Glucosa liberada en hidrólisis frente sustrato lignocelulósico".	49
Tabla 15. "Xilosa liberada en hidrólisis frente sustrato lignocelulósico".....	49
Tabla 16. "Proteína cargada en el ensayo de actividad frente lignocelulosa".	59
Tabla 17. "Base del medio de cultivo 106, utilizada para <i>T. versicolor</i> ".	60
Tabla 18. "Solución de Metales trazas 106 y generación de stock 100x".....	60
Tabla 19. "Solución de cobre 106 y generación de stock 100x".	60
Tabla 20. "Mezclas 117-1 y 117-2".....	61
Tabla 21. "Base de medio de cultivo 117".	61
Tabla 22. "Actividad xilanasas medida a través de la matriz de algodón".	93
Tabla 23. "Actividad celulasa medida a través de la matriz de algodón".	93
Tabla 24. "Actividad enzimática medida en el protocolo de separación con avicel".	93
Tabla 25. "Valores de las constantes cinéticas de las xilanasas de <i>G. trabeum</i> ".	100

Índice de ilustraciones

Figura 1. "Abastecimiento total de energía primaria en Chile".	1
Figura 2. "Distribución de los sectores donde se utilizó la energía en Chile".	2
Figura 3. "Esquema de la estructura de la lignocelulosa".	4
Figura 4. "Estructura de la celulosa".	4
Figura 5. "Microfibrillas de celulosa".	5
Figura 6. "Estructura de la hemicelulosa".	5
Figura 7. "Estructura de alcoholes p-coumarílico, coniferílico y sinapílico".	6
Figura 8. "Estructura molecular de la lignina".	6
Figura 9. "Diagrama de bloques del proceso de producción de bioetanol".	7
Figura 10. "Esquema de la degradación enzimática de la celulosa".	8
Figura 11. "Esquema de la degradación enzimática de xilano".	10
Figura 12. "Estructura tridimensional de las familias 10 y 11 glicosil hidrolasas".	11
Figura 13. "Estructura de vector de clonamiento pGEM-T Easy".	15
Figura 14. "Protocolo de PCR utilizado".	18
Figura 15. "Monitoreo de RNA total cargándolo en un gel de agarosa".	27
Figura 16. "Amplificación a través de RT-PCR".	28
Figura 17. "Amplificación de los genes a través de un RT-PCR".	29
Figura 18. "Digestión con <i>EcoRI</i> de pGEM-T Easy/GTXYL1".	30
Figura 19. "Digestión con <i>EcoRI</i> de pGEM-T Easy/GTXYL2".	31
Figura 20. "Alineamiento de las distintas proteínas de los genes secuenciados".	32
Figura 21. "Dominios conservados presentes en las xilanasas".	34
Figura 22. "Puentes de hidrógeno presentes en el dominio de unión a carbohidratos".	34
Figura 23. "Alineamiento de las secuencias de xilanasas".	36
Figura 24. "Continuación del alineamiento de las secuencias de xilanasas".	37
Figura 25. "Árbol filogenético".	38
Figura 26. "EIA realizada sobre las proteínas de <i>T. versicolor</i> ".	39
Figura 27. "EIA realizada sobre las proteínas de <i>T. versicolor</i> ".	40
Figura 28. "Gel de poliacrilamida con fracciones de: EIA de <i>T. versicolor</i> ".	40
Figura 29. "HIC realizada sobre las proteínas de <i>G. trabeum</i> ".	41
Figura 30. "Gel de poliacrilamida con fracciones de HIC de <i>G. trabeum</i> ".	42
Figura 31. "HIC realizada sobre las proteínas provenientes de <i>G. trabeum</i> ".	43
Figura 32. "EIA realizada sobre las proteínas de <i>G. trabeum</i> ".	44
Figura 33. "Selección de fracciones de EIA de <i>G. trabeum</i> ".	45
Figura 34. "Gel de poliacrilamida con fracciones de EIA de <i>G. trabeum</i> ".	45
Figura 35. "Glucosa liberada por la hidrólisis de paja de trigo".	48
Figura 36. "Xilosa liberada por la hidrólisis de paja de trigo".	48
Figura 37. "Gel de poliacrilamida con proteínas provenientes de una filtración en gel realizada sobre proteínas de <i>G. trabeum</i> ".	55
Figura 38. "Cinética de la producción de enzimas del cultivo N°1".	84
Figura 39. "IEA realizada sobre las proteínas provenientes de <i>G. trabeum</i> ".	85
Figura 40. "Gel de poliacrilamida con fracciones de IEA de <i>G. trabeum</i> ".	86
Figura 41. "HIC realizada sobre las proteínas provenientes de <i>G. trabeum</i> ".	87
Figura 42. "Selección de fracciones de HIC de <i>G. trabeum</i> ".	88
Figura 43. "Gel de poliacrilamida con fracciones de HIC de <i>G. trabeum</i> ".	88
Figura 44. "Cinética de la producción de enzimas".	89
Figura 45. "HIC realizada sobre las proteínas provenientes de <i>T. versicolor</i> ".	91

Figura 46. "Cinética de la producción de enzimas".	92
Figura 47. "Muestras incubadas con sustrato lignocelulósico durante 16 horas".	94
Figura 48. "Muestras incubadas con sustrato lignocelulósico durante 24 horas".	95
Figura 49. "Curva estándar para el ensayo de Bradford".	97
Figura 50. "Curva de calibración de concentración de xilosa".	98
Figura 51. "Curva de calibración de concentración de xilosa".	98
Figura 52. "Curva de calibración de concentración de glucosa".	99
Figura 53. "Curva de calibración de concentración de glucosa".	99

I. Introducción

1. Contexto general

Los problemas a los que actualmente se enfrenta la comunidad global, o que serán de principal importancia en un futuro cercano, suelen enfocar el desarrollo científico y tecnológico en busca de soluciones para mitigar sus efectos a corto, mediano y largo plazo. Entre éstos se puede mencionar la escasez de alimentos y recursos hídricos, la conservación del ambiente, el abastecimiento de la creciente demanda energética, la deficiencia en la accesibilidad a tratamientos de salud, entre otros.

De aquellos problemas enunciados, para el desarrollo de la Memoria de Título se enfatizó en la creciente demanda energética y cómo ésta se suplirá en el futuro. Para ello se hace primordial estudiar la situación actual y determinar las falencias que presenta el actual sistema, o dónde podría generarse algún cambio que repercuta de manera positiva en torno a esta temática.

2. Energía en Chile

Como primer paso para el trabajo se analizó la situación energética en Chile y se observó que la demanda del país va en un constante aumento, llegando a cerca de los 33,6 [Mtoe] o 390[TWh] el año 2011 ^[1]. Esta demanda es abastecida principalmente por petróleo, llegando a suplir 47,2% de la demanda ese mismo año ^[1].

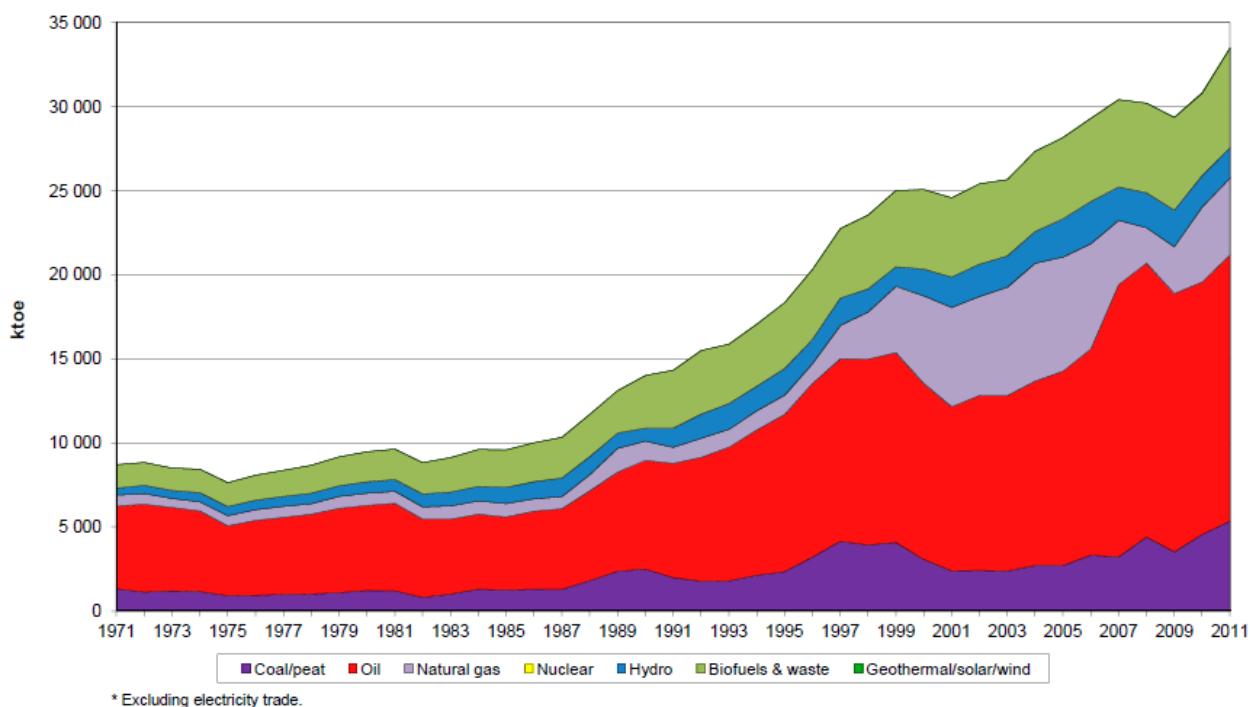


Figura 1. "Abastecimiento total de energía primaria en Chile desde los años 1971 hasta el 2011 ^[1]".

Aun cuando el petróleo y sus derivados son utilizados ampliamente tanto en el territorio nacional como en el extranjero, al quemarlos para obtener energía se produce dióxido de carbono como un subproducto que es liberado a la atmósfera. Este gas se

caracteriza por ser uno de los principales contribuyentes al efecto invernadero, por lo tanto se asocia directamente a un efecto negativo sobre el medioambiente. Otra de las dificultades que presentan el petróleo y sus derivados radica en que las fuentes naturales donde se extraen se hacen cada vez más difíciles de acceder y explotar, lo que representa un tope para su obtención en términos técnicos y económicos.

En Chile, el uso de la energía se distribuyó en el año 2011 tal como se presenta en la Figura 2. Se observa que aproximadamente un 30% se destina al transporte, energía que se suple casi en su totalidad por combustibles fósiles líquidos. Esta cantidad representa aproximadamente 8.000 millones de litros de petróleo equivalentes, que fueron utilizados ese año en el país ^[1].

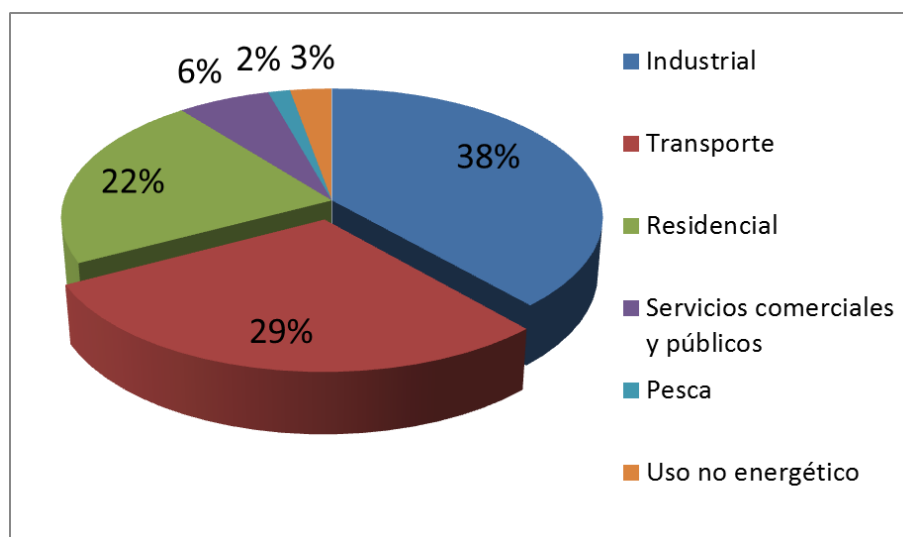


Figura 2. "Distribución de los sectores donde se utilizó la energía en Chile para el año 2011. Elaboración propia, datos obtenidos desde IEA ^[1]".

3. Biocombustibles

Debido a lo expuesto previamente, se presenta la alternativa de reemplazar los combustibles fósiles utilizados en el transporte por biocombustibles. Éstos, a diferencia de los combustibles derivados del petróleo, se producen a partir de biomasa. La biomasa se define como "materia orgánica renovable de origen vegetal, animal o procedente de la transformación natural o artificial de la misma" ^[2]. Aquella derivada de materia vegetal se genera a través del proceso de fotosíntesis, obteniéndose como resultado polímeros biológicos, a partir del dióxido de carbono del aire y aprovechando la energía de la radiación solar.

Se propone que al utilizar biocombustibles se podría reducir las emisiones de dióxido de carbono en comparación al liberado por la quema de combustibles fósiles. Si bien, la combustión de ambos libera una cantidad similar de CO₂ a la atmósfera, en el proceso de biosíntesis de la biomasa los organismos fijan las moléculas de este gas presentes en el aire. Es esta misma materia la que luego es devuelta a la atmósfera a través del proceso de combustión, a diferencia de los combustibles convencionales que utilizan fuentes no renovables de materia orgánica que genera un aumento del dióxido de carbono presente en la atmósfera.

Entonces, en relación al medioambiente, los biocombustibles presentan ventajas considerables en comparación a los derivados del petróleo, pero la principal razón por la que no son ampliamente utilizados radica netamente en temas económicos. El proceso productivo resulta de mayor complejidad que la destilación fraccionada del petróleo, lo que se asocia directamente a un mayor precio de venta.

Al revisar una evaluación económica del proceso productivo de bioetanol realizada por Humbird y cols. ^[3] se observa que el menor valor al que podría ser vendido el bioetanol es 137,34 [USD] por barril de petróleo equivalente, se comparó este valor con los 111,67 [USD] para el barril de petróleo promedio registrados el año 2012 ^[4], con lo que se observa la brecha que existe entre los precios de ambos combustibles.

Existe una normativa en torno al uso de los biocombustibles; en particular, el Ministerio de Economía define las especificaciones de calidad para biodiesel y bioetanol, autorizando la mezcla de 2% y 5% con petróleo diesel y gasolina, y anuncia el registro voluntario de personas e instituciones en la Superintendencia de Electricidad y Combustibles (SEC) ^[5]. Adicionalmente la Ley 18.502/1986 señala que los biocombustibles no son afectos al impuesto específico ^[5], lo que logra disminuir sus precios, y junto a ello, una competencia más equitativa.

Existen distintos tipos de biocombustibles diferenciados por las materias primas desde la cual se producen. Se definen entonces aquellos de primera, segunda y tercera generación:

Biocombustibles de primera generación: se producen desde materia vegetal rica en almidón, por ejemplo maíz o remolacha. Actualmente se está descartando su uso, ya que compiten con la industria alimentaria, destinando materia vegetal que podría ser utilizada para alimentar una parte de la población, en la producción de combustible.

Biocombustibles de segunda generación: Éstos se producen a partir de materia vegetal rica en lignocelulosa, que corresponde al principal componente de la estructura de todas las plantas, se presenta principalmente en la pared de sus células y en menor medida en la de las células de algas ^[6]. Se destaca entonces que este tipo de biocombustibles no presentan los inconvenientes de los biocombustibles de primera generación, pero a cambio, su obtención resulta más compleja, y en consecuencia, más costosa.

Biocombustibles de tercera generación: son sintetizados a través de materia vegetal rica en aceites, por ejemplo micro y macro algas, en estos casos es posible obtener biodiesel a través del proceso de transesterificación de los aceites presentes en ellas. Al igual que los biocombustibles de segunda generación, su síntesis resulta bastante compleja, por lo que los costos de producción son elevados, y esto repercute directamente en los precios a los que puede ser vendido el biodiesel obtenido.

El actual trabajo de tesis fue enfocado hacia el proceso de producción de biocombustibles de segunda generación. En éste se utiliza como materia prima sustancias vegetales ricas en lignocelulosa para obtener etanol. La lignocelulosa corresponde al compuesto más abundante sobre la superficie terrestre, en relación a la

biomasa renovable, se produce a una tasa de 200 billones de toneladas por año ^[6] a través de la actividad fotosintética principalmente de plantas.

4. Lignocelulosa

Es un biopolímero complejo, compuesto de diversos carbohidratos como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, entre otros. Su conformación se basa principalmente en hebras de celulosa, sostenidas sobre una matriz de hemicelulosa y lignina, como se observa en la Figura 3.

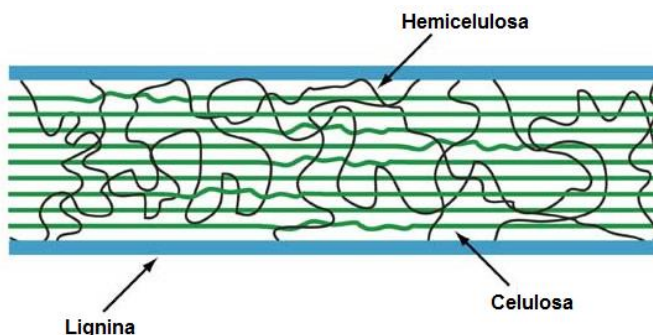


Figura 3. "Esquema de la estructura de la lignocelulosa, compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina".

4.1. Celulosa

La celulosa es el biopolímero que forma la mayor parte de la estructura de la pared celular de plantas y algas, aproximadamente un 50% del peso seco de las mismas ^[6]. La molécula corresponde a largas cadenas lineales, de entre 2.000 y 25.000 moléculas de D-glucosa, unidas a través de un enlace glucosídico β -1,4 ^[6], como se muestra a continuación.

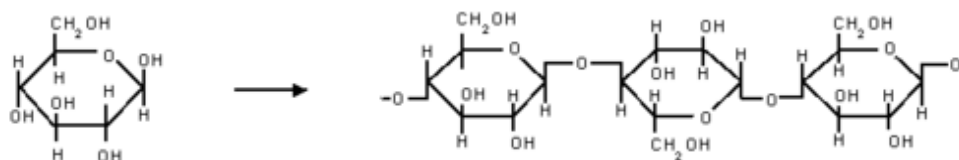


Figura 4. "Estructura de la celulosa, formada por la unión de moléculas de glucosa, a través de un enlace glucosídico β -1,4".

Estas largas cadenas se encuentran organizadas en una estructura mayor denominada microfibrillas, cada una de ellas compuesta de 36 a 1.200 unidades de celulosa unidas a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals ^[6]. Estas microfibrillas forman dos tipos de estructuras: una estructura cristalina con una organización compacta de los polímeros y otra menos organizada denominada celulosa amorfa. La segunda representa entre el 5 y 20% de las fibras ^[6] y es en estas zonas donde se realiza efectivamente la hidrólisis. Un esquema de la conformación de las fibras puede ser visto en la Figura 5.

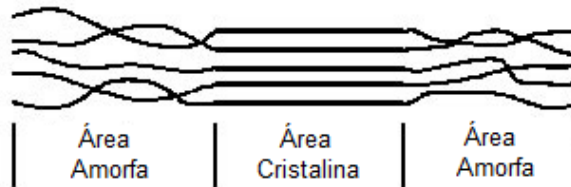


Figura 5. "Microfibrillas de celulosa, en sus distintas conformaciones".

4.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolisacárido cuya cadena principal se compone de pentosas como D-xilosa y L-arabinosa, además de hexosas, en particular, D-glucosa, D-manosa y D-galactosa. A diferencia de la celulosa corresponde a una molécula altamente ramificada, con la presencia de ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, unidos a través de enlaces glucosídicos β -1,4 y β -1,3. La hemicelulosa corresponde al 25-30% del peso seco de la madera y sus componentes pueden ser clasificados en xilanos, xiloglucanos, mananos, glucomanos y glucanos [6].

Se estudiaron particularmente los xilanos. Éstos son los más abundante, resultando en aproximadamente un 70% del peso de la hemicelulosa [6]. Se trata de moléculas de D-xilosa unidas a través de enlaces glucosídicos β -1,4, presenta acetilaciones y ramificaciones de arabinosa (unida a ácido ferúlico o p-coumárico), ácido glucurónico y ácido 4-O-metil éter-glucurónico como se muestra en la Figura 6.

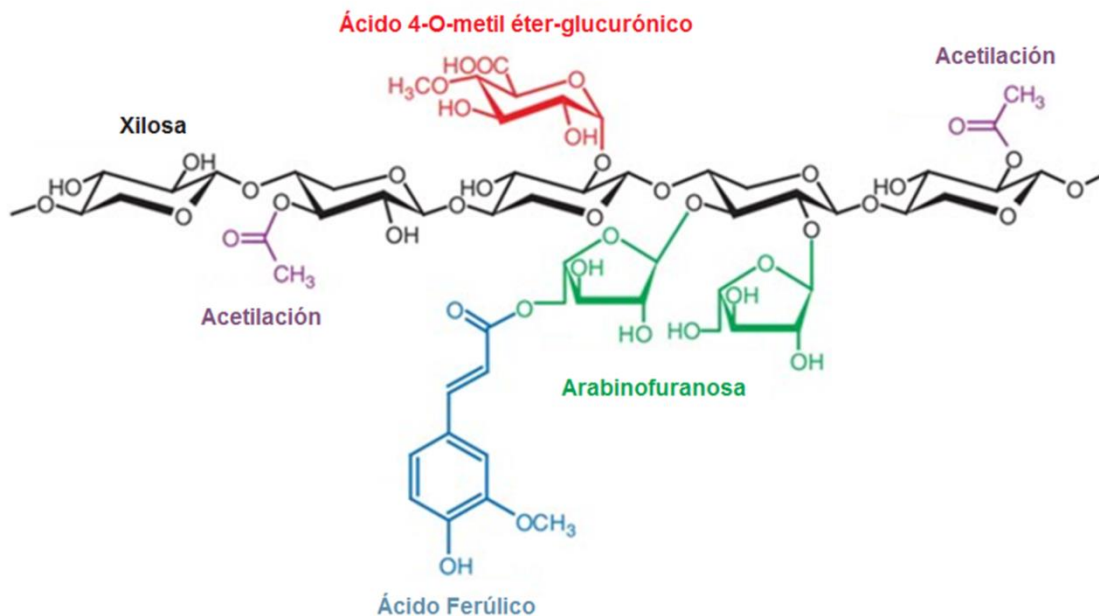


Figura 6. "Estructura de la hemicelulosa, compuesta principalmente por moléculas de xilosa unidas a través de un enlace glucosídico β -1,4 y distintas ramificaciones".

4.3. Lignina

La lignina representa el 20-30% del peso seco de la madera [6] y le brinda rigidez a la pared celular de plantas, es por ello que su degradación resulta altamente compleja y

difícil. Su estructura se basa en la polimerización de tres alcoholes fenilpropílicos aromáticos: alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico [6]. La molécula de cada uno de estos alcoholes se evidencia en la Figura 7.

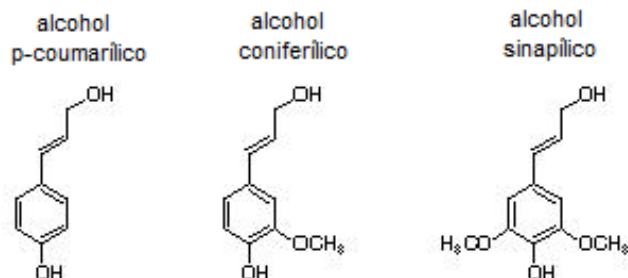


Figura 7. "Estructura de alcoholes p-coumarílico, coniferílico y sinapílico".

Debido a su conformación, la lignina es una molécula insoluble en agua y junto a la hemicelulosa forman una matriz que encapsula a las moléculas de celulosa, impidiendo su degradación. Además se trata de una molécula altamente ramificada, como se logra apreciar en la Figura 8.

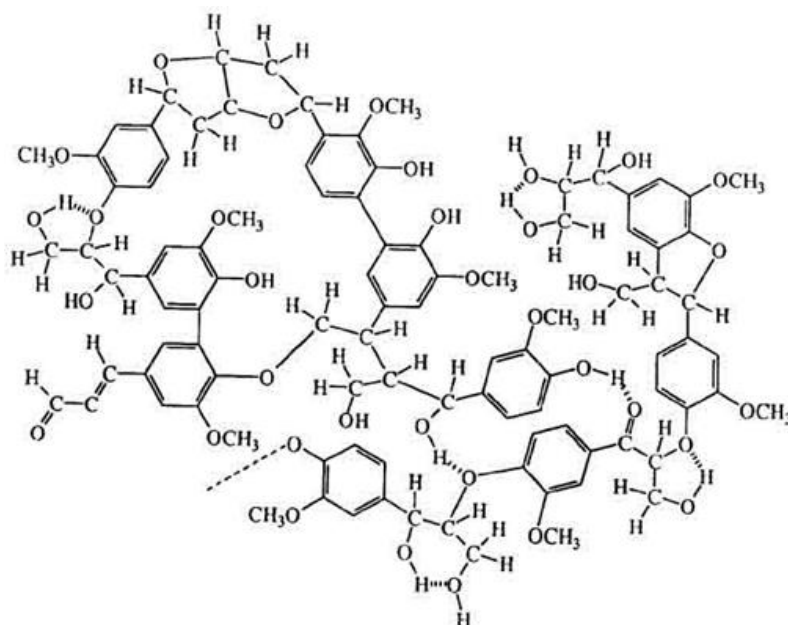


Figura 8. "Estructura molecular de la lignina".

5. Proceso productivo del bioetanol de segunda generación

Como se enunció antes, la producción de bioetanol de segunda generación se realiza a partir de material lignocelulósico, éste es transformado según se muestra en el diagrama de bloques de la Figura 9 para lograr la obtención de bioetanol.

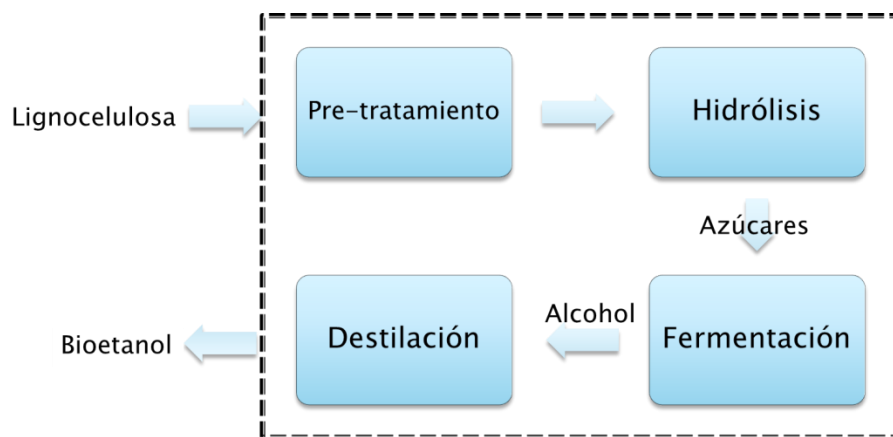


Figura 9. “Diagrama de bloques del proceso de producción de bioetanol de segunda generación”.

A continuación se detalla cada una de las etapas del proceso.

5.1. Pre-tratamiento

Su finalidad es liberar principalmente la celulosa, además de la hemicelulosa, de la compleja estructura de la lignocelulosa. Se induce una hidrólisis de la estructura generando mínima degradación de los carbohidratos, asociado a una alta velocidad y a bajos costos. Un ejemplo es el pre-tratamiento químico ácido o alcalino, donde se degrada parcialmente la estructura de la lignocelulosa. Esto se obtiene al incubarla en presencia de químicos de pH ácidos o básicos, con lo que se elimina la lignina, y con ello, se obtiene un mayor acceso a los polímeros de carbohidratos.

5.2. Hidrólisis

Es la etapa más compleja y representa actualmente la limitante dentro del proceso global, debido a los costos asociados a la misma.

La hidrólisis puede ser de dos tipos: química o biológica. Si bien la primera estrategia resulta más económica en relación a los insumos agregados, la segunda representa una alternativa más interesante debido a que utiliza condiciones suaves de presión, temperatura y pH, posee una alta especificidad de sustrato, no genera moléculas que inhiben la fermentación de la etapa siguiente, posee un bajo consumo energético y los equipos necesarios para realizarla son de menores costos. Todas estas ventajas se asocian al uso de enzimas.

Al tratarse de la hidrólisis de moléculas complejas, se requiere de una gran variedad de enzimas para la degradación de cada uno de los elementos que forman los biopolímeros.

El polímero al que se ha apuntado principalmente en esta etapa corresponde a la celulosa, ésta se compone solo de glucosa, un azúcar fácilmente fermentable. Aun así, actualmente la utilización de pentosas para la producción de etanol también representa una alternativa rentable, por lo tanto, la degradación de la hemicelulosa resulta interesante en esta etapa.

La degradación de la celulosa se lleva a cabo a través de la acción de endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, tal como se muestra en la Figura 10.

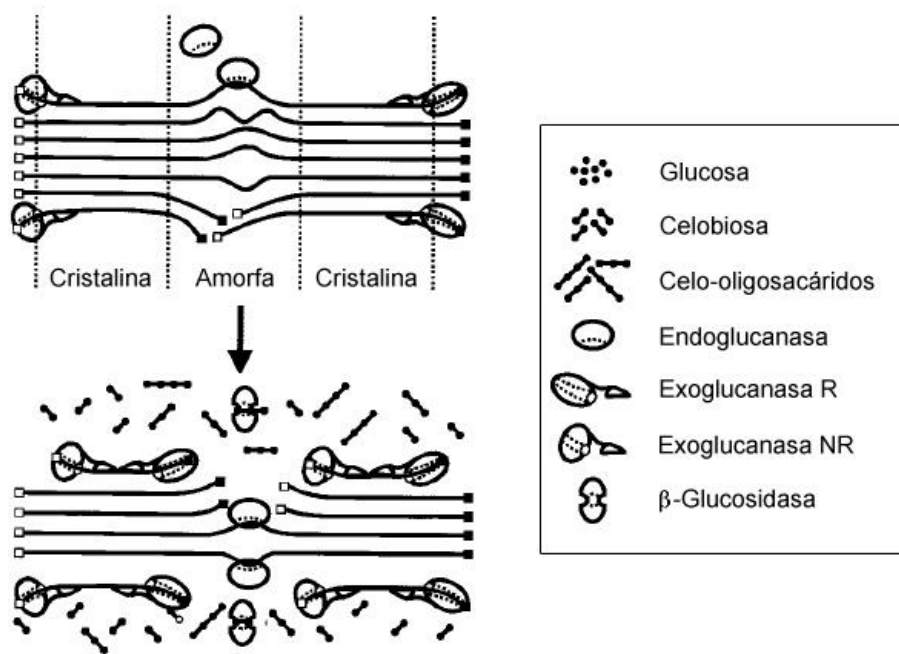


Figura 10. “Esquema de la degradación enzimática de la celulosa ¹⁷”.

Las endoglucanasas hidrolizan el enlace glucosídico β -1,4 que existe entre moléculas de glucosa en posiciones aleatorias en la zona interior de la estructura de las cadenas y su acción es más común en las zonas de celulosa amorfa que forman las microfibrillas. Como resultado de la acción de las endoglucanasas el polímero es dividido en fragmentos de menor dimensión, con lo que se generan nuevos extremos en la molécula. Las exoglucanasas o celobiohidrolasas actúan sobre los extremos de la celulosa liberando un dímero denominado celobiosa. Finalmente, las β -glucosidasas catalizan la reacción de hidrólisis del enlace glucosídico presente entre las dos moléculas de glucosa que forman la celobiosa. A través de la acción conjunta de estos tres tipos de enzimas se obtiene la correcta degradación de celulosa hasta moléculas simples de glucosa.

Cabe destacar que el acceso que tienen las celulasas está restringido por la presencia de la hemicelulosa y la lignina. Aun cuando se produjo previamente una degradación parcial de la compleja estructura que se forma entre sus distintos componentes, se requiere de la acción de proteínas auxiliares que permitan el acceso a las moléculas de celulosa para lograr efectivamente su hidrólisis. Entre las enzimas auxiliares, las xilanasas son las que cumplen un rol más importante en facilitar el acceso a la celulosa.

Las xilanasas cumplen tanto un rol auxiliar como principal en relación a la hidrólisis de la hemicelulosa, al degradar las cadenas de xilano facilitan el acceso de celulasas a la celulosa y de ellas mismas, junto a otras enzimas, a la hemicelulosa.

5.3. Fermentación

Los azúcares simples obtenidos de la etapa anterior son transformados en etanol a través del proceso de fermentación alcohólica, realizado por levaduras y bacterias en condiciones anaeróbicas. A través de este proceso se libera energía, que es utilizada por el microorganismo, y se libera como subproductos moléculas de etanol y de dióxido de carbono que son secretados al medio.

En esta etapa del proceso se agrega microorganismos capaces de genera etanol a partir de azúcares de 6 carbonos (glucosa, manosa y galactosa), por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*. También es aconsejable introducir microorganismos capaces de utilizar azúcares de 5 carbonos (xilosa y arabinosa) como *Sheffersomyces stipitis* o *Spathaspora passalidarum* ^[8].

5.4. Destilación

Tiene como objetivo purificar el etanol que fue producido en la etapa anterior, separándolo del agua y de algunas sales remanentes del proceso. Se realiza en torres de destilación donde, al someter el flujo de salida de la etapa anterior a altas temperaturas, se consigue una evaporación del etanol en primera instancia, debido a que el etanol es más volátil que el resto de los elementos presentes en la mezcla. Se recupera entonces la fracción evaporada que corresponde principalmente a etanol, y que luego son sometidas a tamices moleculares, con lo que se busca una pureza de al menos un 99,3% ^[9] para cumplir con los estándares exigidos para ser utilizado como un biocombustible o mezclado con combustibles convencionales.

6. Antecedentes específicos y justificación del proyecto

La Memoria de Título se enmarcó en el proyecto FONDECYT 1121088, a cargo de la Dra. Oriana Salazar Aguirre, en éste se buscan enzimas auxiliares que intervienen en la hidrólisis de la lignocelulosa. El objetivo del proyecto consiste en generar una mezcla enzimática que contribuya a la etapa de hidrólisis biológica del proceso productivo de biocombustibles de segunda generación.

El estudio realizado se enfocó en una de las enzimas ayudantes del proceso, específicamente xilanasas que degradan la hemicelulosa presente en el sustrato.

Se ha estudiado que las xilanasas mejoran la hidrólisis de lignocelulosa efectuada por la acción de celulasas ^[10], esto se explica porque la principal limitante en la degradación de las fibras de celulosa es el acceso que tienen las enzimas a ésta, por lo tanto, al degradar el xilano presente en el sustrato se logra una liberación de las fibras, y con ello una mejor acción de celulasas ^[10].

La completa degradación del xilano se lleva a cabo a través de la actividad conjunta de una gran cantidad de enzimas, tal como se muestra en la Figura 11. Gracias a la acción de estas enzimas se recupera las hexosas y pentosas que conforman la hemicelulosa.

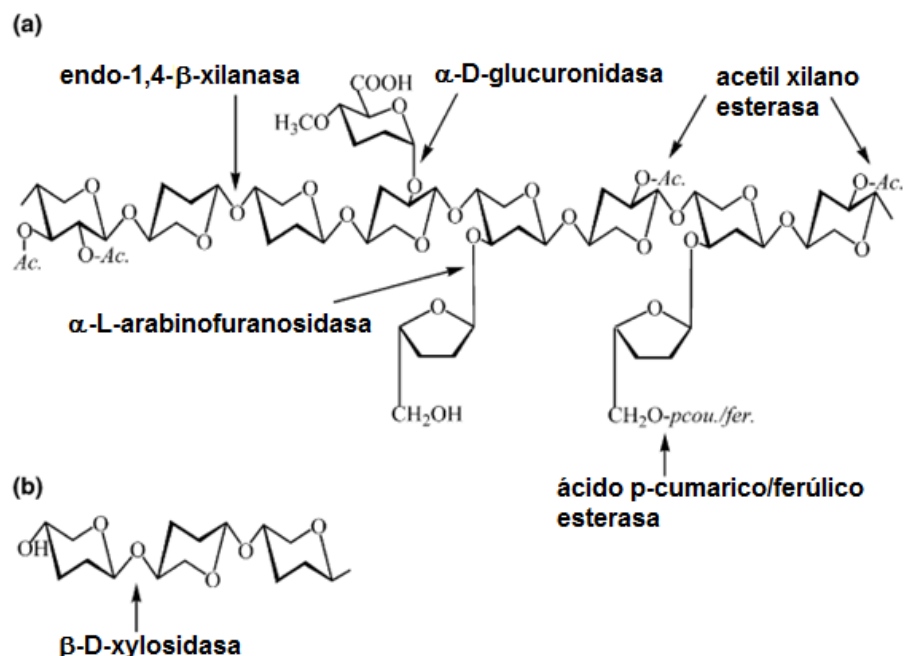


Figura 11. “Esquema de la degradación enzimática de xilano. (a): hidrólisis en la zona interna de la molécula de xilano; (b): hidrólisis de los extremos de la molécula de xilano”.

Las enzimas más relevantes, en relación a la ruptura de la estructura de la lignocelulosa, son las xilanasas, estas enzimas poseen actividad endo-β-1,4-xilanasas, es decir, hidrolizan el enlace glucosídico presente en la cadena principal del polímero con lo que facilitan el acceso a otras enzimas para la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa presentes en la lignocelulosa. Cabe destacar que la actividad de las xilanasas puede ser clasificada como ayudante en la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, pero también cumplen un rol principal en la degradación de la hemicelulosa.

La acción de β-D-xylosidasas resulta importante para la degradación de los extremos del polímero, además de moléculas constituidas por pocas unidades de xilosa. A través de su actividad se logra obtener moléculas simples de xilosa.

El resto de las enzimas presentes en la degradación del xilano son útiles para degradar las uniones que existen entre la cadena principal de la molécula y las distintas ramificaciones que presenta. A través de ellas se logra liberar otras moléculas de azúcar como arabinosa o glucosa.

Se destaca que las xilanasas pueden ser clasificadas dentro de las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas (GH10 y GH11), según Henrissay^[11]. Aun cuando ambos tipos de enzimas hidrolizan los enlaces endo-β-1,4-xilanasas presentes en las moléculas de xilano, existen diferencias estructurales y del sustrato sobre el que actúan ambas familias. Las GH10 suelen tener pesos moleculares más altos y menores puntos isoeléctricos que las GH11, y estas últimas no hidrolizan xilanos muy sustituidos^[12]. La estructura tridimensional de las enzimas de ambas familias se muestra en la Figura 12.

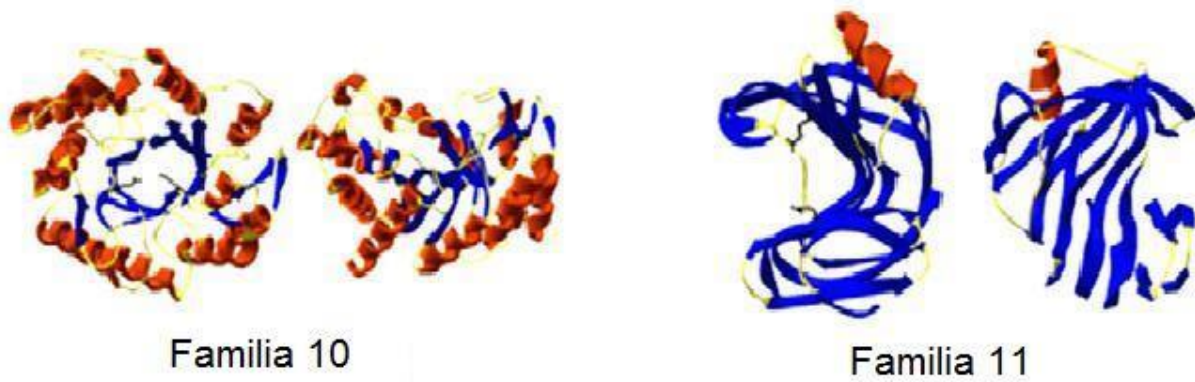


Figura 12. “Estructura tridimensional de las familias 10 y 11 glicosil hidrolasas ^[13]”.

Se observa una estructura tipo barril (α/β)₈ en las GH10 y una tipo β -jelly roll en las GH11 ^[12].

Para la Memoria de Título se estudiaron enzimas producidas por los hongos *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum*, ambas especies son capaces de descomponer la materia vegetal al igual que otras especies fúngicas y bacterias. La especie *T. versicolor* es un hongo de pudrición blanca, éstos se caracterizan por secretar una gran variedad de enzimas que descomponen cada una de las moléculas presentes en los sustratos lignocelulósicos, entre ellas, peroxidasas que degradan la lignina. *G. trabeum* es un hongo de pudrición café, esto quiere decir que es capaz de despolimerizar los polisacáridos presentes en la lignocelulosa sin necesidad de degradar la lignina. La anotación de los genomas de ambas especies están disponibles en bases de datos, por esto y lo mencionado anteriormente, ambas especies resultan buenos candidatos para la búsqueda de enzimas novedosas e interesantes que intervienen en la degradación de lignocelulosa.

Como fue mencionado, la hidrólisis corresponde a una de las principales limitantes del proceso productivo, eso se debe al costo asociado a las enzimas utilizadas que asciende a aproximadamente un 16% del total de los costos variables en la producción del bioetanol ^[3], por lo tanto, se espera que a través del estudio e implementación de distintas alternativas enzimáticas, se logre generar una etapa que logre disminuir los costos, y con ello se logre obtener un bioetanol competitivo económicamente con combustibles fósiles convencionales.

Si bien la motivación de esta Memoria de Título corresponde a disminuir el costo de producción de biocombustibles, se aspira tan solo a realizar un estudio sobre las xilanasas secretadas por las especies fúngicas *T. versicolor* y *G. trabeum*. Por lo tanto no se pretende generar grandes cambios sobre el actual proceso productivo de los biocombustibles, pero si aportar en los estudios realizados sobre éstas enzimas. Considerando que el trabajo se realiza durante un semestre, se predice que el cumplimiento de los objetivos resulta factible.

7. Antecedentes preliminares

Al comenzar el trabajo se contó con resultados de experimentos anteriores que fueron usados como base sobre la cual continuar el estudio. Aquellos principalmente utilizados consistieron en la identificación de proteínas presentes en distintas muestras, a través de espectrometría de masa. Las muestras provenían del medio extracelular de *G. trabeum*, dónde se obtuvo las proteínas en solución, y otras desde las distintas bandas obtenidas de una cromatografía de filtración en gel realizado sobre cultivos de *T. versicolor* y *G. trabeum*. La Figura 37 (Anexo A) es una fotografía del gel de poliacrilamida de las proteínas de *G. trabeum*. A continuación se muestran las Tablas 1 y 2, que presentan todas las xilanasas identificadas en el proceso.

Tabla 1. "Resultados de identificación de péptidos por espectrometría de masa, en las bandas de filtración en gel para *G. trabeum*".

Origen	GeneBank	Nombre	GH	Proteína	Score
GAgel #5*	gi 392569323	endo-beta-1,4-glucanase [<i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1]	10	Endo-beta-1,4-glucanase	82
	gi 395328019	endo-beta-1,4-glucanase [<i>Dichomitus squalens</i> LYAD-421 SS1]	10	Endo-beta-1,4-glucanase	80
GAgel #8*	gi 242805021	endo-1,4-beta-xylanase A precursor, putative [<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500]	11	endo-1,4-beta-xylanase A precursor, putative	220
GAgel #7*	gi 242805021	endo-1,4-beta-xylanase A precursor, putative [<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500]	11	Endo-1,4-beta-xylanase A precursor	209
Solución**	gi 521722511	hypothetical protein GLOTRDRAFT_107452 [<i>Gloeophyllum trabeum</i> ATCC 11539]	10	Endo-1,4-beta-xylanase precursor	96
	gi 521722509	hypothetical protein GLOTRDRAFT_122601 [<i>Gloeophyllum trabeum</i> ATCC 11539]	10	Endo-1,4-beta-xylanase	72
	gi 392569323	endo-beta-1,4-glucanase [<i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1]	10	Endo-beta-1,4-glucanase	58

* GAgel#: Banda del gel mostrado en el Anexo A (Figura 37); n: número de la banda, mostrado en la foto del gel.

** Solución: Se realizó la espectrometría de masa sobre una fracción del medio extracelular del hongo.

Tabla 2. "Resultados de identificación de péptidos por espectrometría de masa, en las bandas de filtración en gel para *T. versicolor*".

Origen	GeneBank	Nombre	GH	Proteína	Score
TVgel #4	gi 392569323	endo-beta-1,4-glucanase [<i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1]	10	Endo-beta-1,4-glucanase	125

8. Objetivos

Los objetivos planteados para el presente trabajo de Memoria de Título cumplen con el enfoque del proyecto y corresponden a los enunciados a continuación.

8.1. Objetivo general

- Evaluar la contribución de xilanasas fúngicas en la degradación de sustratos lignocelulósicos.

8.2. Objetivos específicos

- Comprobar la expresión de xilanasas por parte de los hongos *T. versicolor* y *G. trabeum* al inducir los cultivos con paja de trigo.
- Entre los genes presentes en la anotación del genoma, determinar cuáles son expresados bajo las condiciones de cultivo utilizadas.
- Secuenciar los genes que codifican la información de las xilanasas en estudio.
- Determinar las características de las xilanasas expresadas.
- Purificar parcialmente las xilanasas en estudio.
- Evaluar la capacidad de estas xilanasas en la degradación de paja de trigo, solas y en presencia de otras enzimas.

II. Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Reactivos

A continuación se presentan todos los reactivos utilizados durante la fase experimental de la memoria de título.

Tabla 3. "Reactivos utilizados y proveedores".

Proveedor	Reactivo
Merck	PDA, cloroformo (99-99,4%), isopropanol (99,8%), etanol (99,9%), hidróxido de sodio, acetato de sodio, ácido acético, sulfato de amonio, ácido clorhídrico, cloruro de sodio, SDS, nitrato de plata, carbonato de sodio, formaldehido, ácido cítrico, D-xilosa, urea, potasio dihidrogenofosfato, sulfato de magnesio heptahidratado, cloruro de calcio dihidratado, sulfato de zinc heptahidratado, di amonio hidrogen fosfato, di-potasio hidrogenofosfato trihidratado.
Winkler	Ampicilina, glicerol, tris, acilamida-bisacrilamida (BM-0100).
Life Technologies	TRizol.
FCFM	Nitrógeno líquido.
BD and company	Luria broth base miller, bacto agar, bacto triptona, extracto de levadura.
Fermentas	IPTG, x-gal.
Sigma	Bromuro de etidio, xilano (from brichwood), CMC (C-5013), tween 20,

	tiamina (T-4625), l-asparagina (A-4284), sulfato cúprico pentahidratado, avicel (PH-101).
Fermelo	Agarosa Lafken.
J.T. Baker	Sulfato de manganeso monohidratado, cloruro de cobalto hexahidratado.
Randox	GLUC-PAP kit.
Geneaid	Extraction kit.
QIAGEN	QIAprep spin Miniprep kit.

1.2. Equipos

Los equipos utilizados se muestran a continuación.

Tabla 4. “Equipos utilizados, fabricante y modelos”.

Equipo	Fabricante y modelo
Autoclave	Onthmann
Centrifugas	Eppendorf centrifuge 5403 Eppendorf centrifuge 5804R Sorvall RC 6+ centrifuge
Termociclador	Eppendorf Mastercycler gradient
Baño seco	Equilab Multi block heater
Espectrofotómetro	Thermo spectronic
Bomba de vacío	Vaccumbrand RZ2C
Lector de placas	Anthos 2010
Cámara de electroforesis	de Fermento
Transiluminador ultravioleta	Vilber lourmat
Estufa	Gallenkamp
Baño húmedo	Julabo

1.3. Enzimas

Cada una de las enzimas utilizadas, junto a sus proveedores, se presentan a continuación.

Tabla 5. “Enzimas utilizadas y proveedores”.

Enzima	Tipo de enzima	Proveedor
SuperScript	Retro-tranciptasa	Life Technologies
Phusion	Polimerasa	New England biolab
Taq	Polimerasa	Promega
<i>EcoRI</i>	Endonucleasa	Fermentas
Cellobiase <i>Aspergillus niger</i>	Celobiasa	Sigma
cellulase <i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921	Celulasa	Sigma

1.4. Vector de clonamiento

Se utilizó el vector pGEM-T Easy de Promega, cuya secuencia y principales características se muestran en la Figura 13.

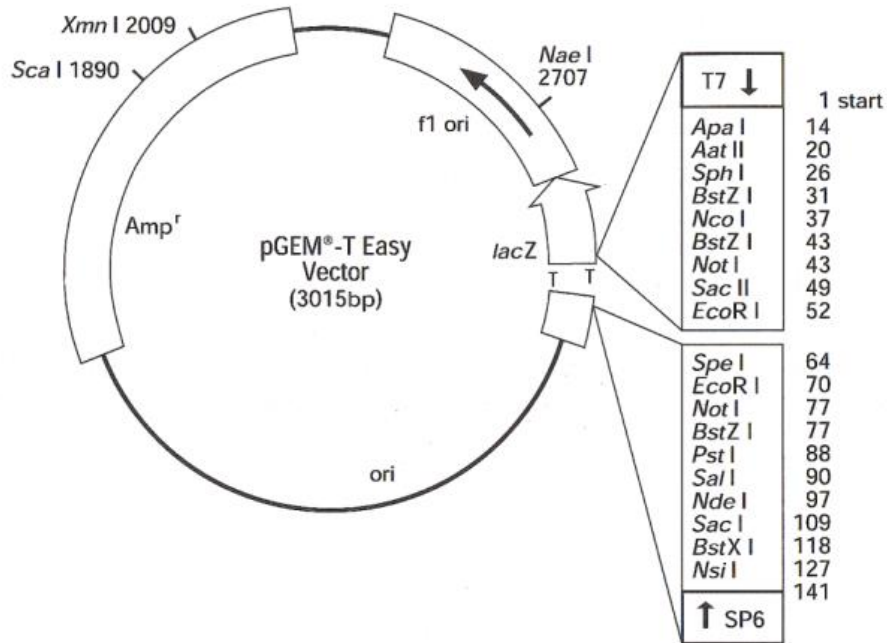


Figura 13. "Estructura de vector de clonamiento pGEM-T Easy".

2. Métodos

2.1. Cultivo de hongos

2.1.1. Medio para mantención de stock de hongos

Se preparó medio Agar Papa Dextrosa (PDA) agregando 39[g] del medio listo en 1[l] de H₂O destilada y luego fue autoclavado. Conservando las condiciones de esterilidad, se agregaron aproximadamente 40[ml] del medio estéril en placas Petri y se esperó que gelificara.

Se agregó una unidad de inóculo al centro de una nueva placa, esta unidad de inóculo consiste un área superficial de aproximadamente 1[cm²] proveniente de un cultivo previo que se corta con un bisturí estéril. Las placas recién inoculadas se incubaron durante 5 a 7 días a 28[°C]. Y posteriormente se almacenaron a 4[°C].

2.1.2. Cultivo de hongos para extracción de RNA

Para obtener células fúngicas se usó el protocolo descrito por Schumann y cols ^[14]. Al medio PDA se agregó 1% de paja de trigo molida y pre-tratada con NaOH 1[M] por 2[h] a 80[°C]. Las placas se prepararon como se indicó y sobre el medio sólido se depositó la membrana, cuya finalidad es separar el material fúngico del medio de cultivo pero permitiendo el paso de nutrientes hacia el hongo. Sobre la membrana se agregó una

unidad de inóculo y se incubó durante 7 días a 28[°C]. Fue posible recuperar fácilmente las células del hongo raspando la superficie de la membrana con un bisturí estéril.

2.1.3. Cultivo en medio líquido para inducción de la producción de actividad xilanasa

Se generaron cultivos de 100 y 500[ml], en presencia de un 1% de la paja de trigo pre-tratada en condiciones alcalinas como se describió en el punto 2.1.2. Los medios y las condiciones de cultivo se muestran en la sección Anexo C.

Para cada cultivo se montó un matraz con 1% (p/v) de paja de trigo y se completó con H₂O destilada en un volumen similar al volumen final del cultivo. Las distintas partes de los medios de cultivo se esterilizaron por separado, para evitar la precipitación del extracto de levadura con algunos de los metales presentes en el medio final. Para mezclar los componentes se abrieron los matraces que contenían el trigo bajo mechero, se descartó el agua y se agregaron todas las fracciones de cada medio de cultivo, los metales trazas, cobre y tiamina. Se inoculó con las unidades de inóculo descritas.

2.2. Identificación y clonamiento de los genes de xilanasas

2.2.1. Extracción de RNA total

Se realizó a partir de la metodología suministrada por Invitrogen de Life Technologies^[15] utilizando el compuesto TRIzol del mismo proveedor, con algunas variaciones: Se realizaron dos lavados con cloroformo y la incubación con isopropanol se realizó durante 2[h] a -20[°C].

Se calculó la concentración de RNA de la siguiente manera:

$$C_{\text{RNA}}[\text{mg/ml}] = \text{Abs}_{260[\text{nm}]} \cdot 40 \cdot \text{Dilución}$$

Por otro lado la pureza se evaluó a través del cociente $\text{Abs}_{260[\text{nm}]} / \text{Abs}_{280[\text{nm}]}$, dónde un valor superior a 1,8, se asocia a una muestra con un buen nivel de pureza.

Se diluyeron la muestra las veces que fuera necesario para obtener una medición dentro del rango lineal del espectrofotómetro utilizando las longitudes de onda de 260[nm] y 280[nm].

2.2.2. Síntesis de cDNA

Se utilizó la técnica de RT-PCR, según el protocolo sugerido por los proveedores de la enzima “SuperScript” (Life Technologies^[15]). En un tubo Eppendorf libre de nucleasas se agregó:

1. 1[μl] de oligodT (10[mM]).
2. 10[μg] del templado de RNA.
3. 1[μl] de dNTPs 10[mM].
4. H₂O mili-Q estéril hasta alcanzar los 10[μl].

Se calentó durante 5[*min*] a 65[°C] y se agregó:

1. 4[μ l] de 5x First-Strand Buffer.
2. 1[μ l] de solución DTT 0,1[M].
3. 1[μ l] de RNase out.
4. 1[μ l] de SuperScript.

Se mezcló suavemente y se incubó durante 60[*min*] a 50[°C]. Se detuvo la reacción incubando durante 15[*min*] a 70[°C].

Se limpió el cDNA usando el protocolo de limpieza del kit “Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit” de Geneaid ^[16], a través de éste se logra eliminar pequeños fragmentos de ADN, que podrían afectar las etapas siguientes del proceso, en particular secuencias resultantes de la presencia de oligodT.

2.2.3. Diseño de primers

Se utilizó la información de los genes de xilanasas obtenidos desde la anotación de los genomas de cada hongo ^[17]. Se identificaron secuencias que permitieran la amplificación completa de cada gen, pudiendo incluir zonas aledañas al mismo que probablemente podrían formar parte de la secuencia nucleotídica presente en el mRNA. Para el diseño se respetaron las restricciones mencionadas en el Anexo D.

2.2.4. Amplificación y aislamiento de los genes de xilanasas

Se utilizó como templado el cDNA que contiene la totalidad de los genes expresados por el hongo en presencia de paja de trigo pre-tratada. Se hizo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para ello, se generó una mezcla en un tubo Eppendorf de 0,6[*ml*], dónde se agregó:

- 35[μ l] de Phusion Buffer 5x.
- 3,5[μ l] de dNTPs (mix 10[mM] cada uno).
- 5,25[μ l] de dimetilsulfóxido (DMSO).
- 1,75[μ l] de la polimerasa Phusion.
- 103,25[μ l] de H₂O mili-Q.

En tres tubos de 0,2[*ml*] para PCR, se alicuotaron 30[μ l] de la mezcla y luego se agregaron los primers y el templado necesarios para aislar cada gen: 2,5[μ l] del cDNA de *T. versicolor* para el gen TVXTL1, y el de *G. trabeum* para los otros dos; además de 8,75[μ l] de los primers forward y reverse diseñados para cada uno. La secuencia de cada primer puede ser observada en la sección Anexo D. El protocolo de PCR utilizado para aislar y amplificar los genes de *G. trabeum* constó de 30 ciclos de elongación, como se muestra en la Figura 14.

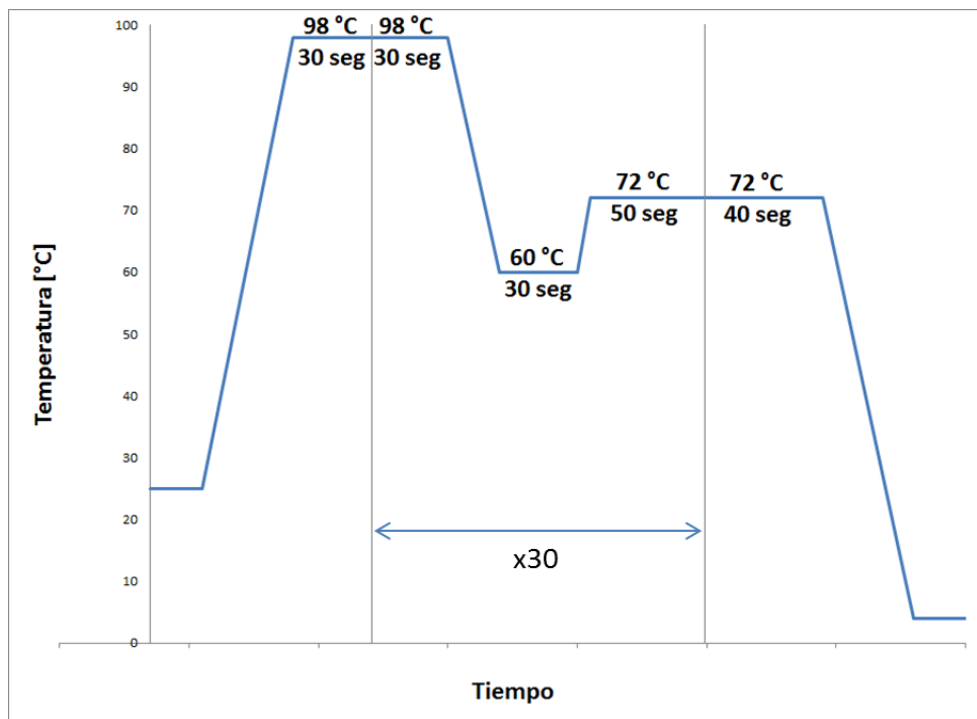


Figura 14. “Protocolo de PCR utilizado para aislar y amplificar los genes de *G. trabeum*”.

Para el gen de *T. versicolor* se utilizó el mismo protocolo, pero a diferencia del anterior, se realizó un gradiente de temperaturas, dónde se hizo tres reacciones con etapas de *annealing* a las temperaturas 53, 55 y 57[°C].

2.2.5. Adición de colas de adenina a fragmentos de PCR

Se mezcló:

- 8[μl] de buffer Taq 5x.
- 2,4[μl] de MgCl₂ (25[mM]).
- 4[μl] de dATP (2[mM]).
- 4[μl] de taq polimerasa.

Luego en alícuotas de 4,6[μl] de la mezcla se agregaron 5,4[μl] de cada producto de PCR y se incubó cada uno durante 30[min] a 70[°C] para lograr la adición de adenina a los extremos 5' de las cadenas de DNA.

2.2.6. Ligación a vector pGEM-T Easy

Se ligó cada uno de los productos de PCR, con la adenina en sus extremos 5', en el vector pGEM-T Easy, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

2.2.7. Transformación de células con vector de clonamiento

La transformación de células se llevó a cabo, de acuerdo a un protocolo de shock térmico, usando células quimio-competentes (*E. coli* Top₁₀) guardadas a -80[°C]. Las células transformadas se estabilizaron en 1[ml] de medio LB.

Para seleccionar aquellos clones que incorporaron efectivamente el vector con el inserto del gen, 100[μ l] de las bacterias obtenidas en el paso anterior fueron cultivados sobre placas con medio LB agar, en presencia de ampicilina 100[μ g/ml], IPTG 0,5[M] y x-gal 80[mg/ml]. Se incubaron las placas durante 16[h] a 37[$^{\circ}$ C].

2.2.8. Cultivo de colonias transformadas

Se hizo tubos de ensayo con 2[ml] de medio LB con ampicilina 10[μ g/ml], que fueron inoculados con colonias aisladas de color blanco obtenidas desde los cultivos selectivos, estos fueron luego incubados a 37[$^{\circ}$ C] para lograr la multiplicación de los distintos clones. A partir de este cultivo se generó un stock para almacenamiento a -80[$^{\circ}$ C] mezclando con glicerol hasta obtener una concentración final de 20%.

2.2.9. Minipreparación plasmidial

Se hizo a partir de 1[ml] de un cultivo de bacterias crecidas durante la noche a 37[$^{\circ}$ C] con agitación, utilizando un kit diseñado para este fin: "QIAprep spin Miniprep kit" de QIAGEN ^[18] y siguiendo el protocolo suministrado.

2.2.10. Digestión con EcoRI

El protocolo se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor ^[19].

2.3. Estudio y separación de proteínas

2.3.1. Cinética de producción enzimática

Para evaluar la producción de enzimas en los cultivos de cada hongo, cada día se tomó una alícuota de 1[ml] del medio extracelular. Ésta fue guardada a -20[$^{\circ}$ C] para medir al final del cultivo, actividad xilanasa y celulasa y construir la cinética de producción de estas enzimas por los hongos, tal como se detalla en procedimientos posteriores.

2.3.2. Precipitación de proteínas totales con sulfato de amonio

Los cultivos se centrifugaron durante 10[μ min] a 10.000[rpm] y 4[$^{\circ}$ C]. El sobrenadante fue filtrado a través de un poro de 0,2[μ m] de diámetro. Luego se agregó buffer Tris hasta obtener una concentración final de 100[mM] y sulfato de amonio hasta obtener una saturación del 80%.

La suspensión con proteínas precipitadas se centrifugó a 8.000[rpm], durante 30[μ min] y a 4[$^{\circ}$ C]. Se eliminó el sobrenadante y se agregó el buffer necesario para realizar la etapa de separación que serían sometidas las muestras. A cada muestra de proteínas guardadas se le agregó la cantidad necesaria del stock de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 10[mg/ml] para obtener una concentración final de 100[μ g/ml].

2.3.3. Separación de proteínas

Se utilizaron distintas columnas de cromatografía, además de técnicas alternativas, para generar la separación de las xilanasas estudiadas. Todas las etapas cromatográficas se realizaron en un cromatógrafo FPLC AKTA de GE Healthcare Life Sciences.

A continuación se detalla las condiciones aplicadas para cada una de las técnicas empleadas:

a) Cromatografía de intercambio aniónico

Se utilizó columna con Q-sefarosa de 1 u 8[ml]. Antes de cargar las muestras, se realizó una ambientación con buffer Tris 20[mM] a pH 7, utilizando tres volúmenes de columna.

Para eluir las muestras se generó un gradiente lineal de cloruro de sodio hasta alcanzar una concentración de 1[M] en 10 volúmenes de columna.

b) Cromatografía de interacción hidrofóbica

Se utilizó columna con Butil-sefarosa de 1 u 8[ml], equilibrada previamente con tres volúmenes de columna utilizando buffer acetato de sodio 50[mM] a pH 6, con la presencia de sulfato de amonio a una concentración 1 o 0,5[M].

Para la elución de las muestras se usó un gradiente lineal decreciente en concentración de sulfato de amonio entre 1 o 0,5 y 0[M] durante 10 volúmenes de columna.

c) Cromatografía de afinidad a carbohidratos

Las muestras fueron cargadas a una matriz construida con 5[ml] de algodón hidrofílico o Avicel. Para ello las proteínas fueron resuspendidas y cargadas a la matriz. Se incubó la muestra durante 10[min] dentro de la columna a temperatura ambiente y luego se dejó eluir completamente por acción de la fuerza de gravedad. La fracción recuperada de esta manera fue denominada "fracción eluída". Luego se agregó 2[ml] de buffer acetato de sodio a pH 5 en la columna y la fracción obtenida a la salida se llamó "fracción de lavado".

2.3.4. Cuantificación de actividad xilanasa

Se preparó un stock de xilano. Se mezclaron 25[μ l] de muestra (diluida las veces que fuera necesario), con 75[μ l] de xilano de abedul al 1% en buffer acetato de sodio 50[mM] pH 5 en microplacas de 96 pocillos. Se incubaron estas reacciones a 50[$^{\circ}$ C] durante 1[h] y luego se agregaron 100[μ l] de reactivo DNS (Composición en Anexo I) para detener la hidrólisis. Se incubaron durante 10[min] a 100[$^{\circ}$ C] y se enfriaron en hielo durante 5[min]. Se tomaron alícuotas de 100[μ l] que fueron cargadas en placas de 96 pocillos para leer absorbancia a una longitud de onda de $\lambda=550$ [nm].

La unidad de actividad xilanasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1[μ mol] de xilosa por minuto, en un ensayo a 50[$^{\circ}$ C]. El volumen de muestra utilizado corresponde a un cuarto del volumen de reacción, por lo tanto se considera este factor de dilución para los cálculos correspondientes. Se construyó una curva estándar para obtener una ecuación que permite relacionar las unidades de absorbancia en μ moles liberados con la absorbancia medida en las muestras (Anexo J).

2.3.5. Cuantificación de actividad celulasa

Es análogo a la cuantificación de actividad xilanasa, pero se usa como sustrato carboximetil celulosa (CMC) al 1% en buffer acetato de sodio 50[mM] y pH 5.

La unidad de actividad celulasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1[μ mol] de glucosa por minuto, en un ensayo a 50[$^{\circ}$ C]. Al igual que en la reacción de hidrólisis del xilano, se debe considerar el mismo factor de dilución para éste ensayo.

La curva estándar construida puede ser vista en el Anexo J.

2.3.6. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó a través del protocolo de Bradford.

2.3.7. Desalinización o diafiltración

Se cargaron 2[ml] de la muestra en unidades para filtrar por centrifuga (centricones) con un diámetro de corte de 10[kDa] y se centrifugaron a 6.500xg a 4[$^{\circ}$ C] durante 20[min]. Con ello se consigue un traspaso de 1,5[ml] de la muestra a través de la membrana. Se agregó el mismo volumen que traspasó, pero de buffer sin sal y se repitió la etapa de centrifugación. Se recolectó la muestra retenida que luego fue diluida agregando 1,5[ml] del buffer sin sal.

2.3.8. Geles de poliacrilamida

Se utilizaron geles de acrilamida:bisacrilamida en proporción 30:1 al 12% de acuerdo al protocolo descrito por Laemli ^[20]. Los geles corrieron durante 45[min] a 200[V], utilizando un buffer de corrida cuya composición se muestra en el Anexo I.

Los geles corridos fueron teñidos con azul de Coomassie para evidenciar las bandas proteicas. En los casos que no se logró observar la aparición de bandas, los geles fueron sometidos a una tinción con nitrato de plata.

2.4. Ensayo de actividad sobre paja de trigo

Se hizo una reacción utilizando como sustrato de paja de trigo pre-tratada al 1% (p/v) y agregando distintas muestras: Proteínas provenientes de los cultivos de *T. versicolor* y *G. trabeum*, un pool de *G. trabeum* enriquecido en xilanasas y una celulasa comercial.

Se cuantificó concentración de glucosa y xilosa liberada por cada una de las muestras proteicas, además de la liberación obtenida al mezclar las muestras fúngicas con la celulosa comercial.

La hidrólisis se realizó durante 16[h] a 37[°C], usando las concentraciones de cada muestra proteica mostradas en el Anexo H.

2.5. Métodos bioinformáticos

2.5.1. Identificación de genes en el genoma de *T. versicolor* y *G. trabeum*

Se utilizó la base de datos de DOE Joint Genome Institute (JGI) ^[21] para obtener las secuencias nucleotídicas de cada uno de los genes que contienen la información de las enzimas pertenecientes a la familia 10 y 11 de las glicosil hidrolasas (GH10 y GH11), de acuerdo a la clasificación de Henrissat y col ^[11]. La base de datos utilizada contiene una anotación completa de todos los genes secuenciados de las especies en estudio.

2.5.2. Traducción de genes

Utilizando la herramienta “Translate tool” de expasy ^[22] se tradujo cada una de las secuencias encontradas a través del paso anterior, con esto se construyó un pool de proteínas que podrían ser producidas teóricamente por cada hongo. Éstas fueron denominadas xilanasas hipotéticas.

2.5.3. Estimación de punto isoeléctrico y masa

El punto isoeléctrico y la masa molecular teórica de cada proteína se estimó utilizando la herramienta “Compute pI/Mw” del sitio expasy ^[22].

2.5.4. Alineamiento de secuencias

Las secuencias aminoacídicas fueron alineadas con la herramienta “Clustal Omega” de The European Bioinformatics Institute (EBI) ^[23].

2.5.5. Árbol filogenético

Para la construcción del árbol filogenético se utilizó la herramienta “Clustal W2_Phylogeny” del sitio EBI ^[22], ingresando los datos del alineamiento realizado.

2.5.6. BLAST

Para vincular las enzimas hipotéticas con alguna presente en las bases de datos, se utilizó la herramienta BLAST del sitio National Center for Biotechnology Information (NCBI) ^[24], dónde se asigna valores de acuerdo a la similitud que existe entre una secuencia aminoacídica determinada, con aquellas presentes en la base de datos del mismo sitio.

2.5.7. Identificación de dominios conservados

Usando la herramienta “Interpro” del sitio EBI ^[23] se lograron identificar los dominios presentes en cada una de las secuencias aminoacídicas estudiadas.

III. Resultados y Discusión

1. Verificación de la expresión de xilanasas en presencia de paja de trigo.

El primer objetivo específico planteado en esta Memoria de Título fue comprobar la expresión de xilanasas por parte de los hongos *T. versicolor* y *G. trabeum*.

Por lo tanto, como primer paso, se identificaron los genes relacionados con la producción de xilanasas. Para ello se buscaron todas las enzimas pertenecientes a las GH10 y GH11 producidas por las especies *T. versicolor* y *G. trabeum* en la anotación de los genomas presentes en la base de datos de JGI ^[21].

Con la información desprendida de los genomas de *T. versicolor* y *G. trabeum* se generó un pool de secuencias de xilanasas hipotéticas que podrían ser potencialmente producidas por cada uno de estos microorganismos. Las secuencias se muestran en el Anexo E.

Para verificar la expresión de xilanasas por parte de ambos hongos, al ser inducidos con paja de trigo pre-tratada, se estudiaron los antecedentes preliminares del proyecto (mostrado en Introducción) y desde ellos se desprendió la existencia de diversas xilanasas en los cultivos, lo que se resume en la Tabla 6.

Según la anotación del genoma, publicada por Floudas y cols ^[17], existen 6 glicosilhidrolasas pertenecientes a las GH10 en *T. versicolor* y 3 en *G. trabeum*, esto también es agregado a la Tabla 6. Se destaca que al acceder a los datos de la base de datos de JGI se encontró la presencia de una GH11 en el genoma de *G. trabeum*, pero más adelante se descubrió que se trataba de un error.

Tabla 6. “Comparación del número de genes de glicosil hidrolasas de las familias 10 y 11 obtenidas desde el genoma (hipotéticas) y encontradas por espectrometría de masa (en cultivo)”.

Espece	GH10 hipotéticas	GH11 hipotéticas	GH10 en cultivo	GH11 en cultivo
<i>T. versicolor</i>	6	0	1	0
<i>G. trabeum</i>	3	0	2	0

Para garantizar la presencia de xilanasas se decidió cuantificar su actividad en los cultivos líquidos de los hongos. Se logró identificar la presencia de enzimas con actividad frente xilano observando actividad para ambos hongos. Esto puede ser evidenciado en las Figuras 38, 44 y 46 (Anexo F)

Se pudo determinar entonces que existen genes de xilanasas expresados por ambos hongos al cultivarlos en presencia de paja de trigo pre-tratada y a través de los antecedentes preliminares y verificando la capacidad del medio extracelular de los cultivos para hidrolizar xilano.

2. Identificación de xilanasas expresadas al inducir con paja de trigo

Para obtener mayor información sobre las xilanasas expresadas por los hongos *G. trabeum* y *T. versicolor*, se decidió contrastar las xilanasas hipotéticas descritas desde el genoma, con los resultados del análisis proteómico realizados en el proyecto previamente, es decir, con los péptidos identificados por espectrometría de masas. Estos péptidos ya habían sido contrastados con las proteínas presentes en la base de datos de NCBI y fue esta información la utilizada para los estudios en una primera instancia.

Se estudió cada uno de los péptidos encontrados y aquellos que se alinearon considerablemente con las secuencias de xilanasas hipotéticas se detallan en la Tabla 7. Para observar más fácilmente el alineamiento se le asignó a cada uno un color característico y luego se utilizaron estos mismos colores para identificarlos dentro de la secuencia aminoacídica de la xilanasas.

Tabla 7. “Antecedentes preliminares sobre los péptidos encontrados por espectrometría de masa en cultivos de *G. trabeum*. Se menciona el origen de cada uno: si fue encontrado en alguna de las bandas mostradas en la Figura 37, o si se encontró en una solución tomada directamente del medio extracelular del cultivo. Adicionalmente se presenta la proteína a la cual fue vinculado cada péptido encontrado”.

Origen	Proteína en base de datos de NCBI	GeneBank	Péptidos encontrados en cultivos
Solución	alcohol oxidase [<i>Gloeophyllum trabeum</i> ATCC 11539]	gi 521719815	DIPDVGQNLADHM
	hypothetical protein GLOTRDRAFT_107452 [<i>Gloeophyllum trabeum</i> ATCC 11539]	gi 521722511	TDYDTVISACR MPLPETAALLEQKQ
	hypothetical protein GLOTRDRAFT_122601 [<i>Gloeophyllum trabeum</i> ATCC 11539]	gi 521722509	MPLPATDALLAQKQ YFGSATDNPELSDSAYVK
GTgel #5	endo-beta-1,4-glucanase [<i>Dichomitus squalens</i> LYAD-421 SS1]	gi 395328019	MPLPETAALLEQKQ
	endo-beta-1,4-glucanase [<i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1]	gi 392569323	MPLPETAALLQKQK
GTgel #8	endo-1,4-beta-xylanase A precursor, putative [<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500]	gi 242805021	GNNYLQNWSVR GSLYSDGSEYQVCLVDR

Al contrastar estos péptidos con las xilanasas hipotéticas se obtuvo el siguiente resultado:

```
> Xilanasas_hipotética_4649
MISKTFVLLALLPLVQCAPPPTPAASSALPTGTSTVALNTAAKAAGKLYMGTATDNGELT
DTAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEPEQGTWWTNADQIANLAKTNGQLLRGHN
```

CVWYNQLPSWVTSGSWTNATLTAVVQDHTTELVSRYKGQVYAWDVINMCDDLQWCH
LEPFNDDGTYRSDVIFYNTIGPAYIPIALRAARAADPNKLYSKATAMLNLVESLKAEGVP
IDGVGLQSHFIVGEVPTSLQSIMEQFTALGVEVAITELDIR **MTLPETAALLEQQKTDYDTV**
SACRAVSGCVGVTVWDFTDKYSWVPSTFSGQGAATPYDSVRIANLVKKPAYDGIVAG
WQ

> Xilanasa_hipotética_140289

MSFKTLVAILCLVPVALAQQPAWAQCGGQGWTTGTTTCVAGYSCVAQNSYYSQCLPT
GTGTGSGTSTSTSGGSSPSATSTTPLNTAAKAAGKK **YFGSATDNPELSDSAYVK**ILSDS
TMFGQITPGNSMKWDATEPSRGTFTFTQGDQIANLAKANGQLLRGHNCVWHNQLPS
WVTSGNFNAATLSSIITTHCGTVVGHYKGMYSWDVVNEPFNDDGTFRQDVIFYNTLG
QDYISIALNAARAADPNKLYINDYNIEGTGAKSTAMVNLVKSLKAANVPIDGIGVQAHLI
VGQVPSTLEANLRQFTALGVEVAITELDIR **MTLPATDALLAQQK**KDYQTVIAACRAVSG
CIGVTIWDYTDKYSWVPATFSGQGAALPW DENFNKKPAYDGIVAGFAS

Este resultado permitió identificar genes de xilanasas que se expresan realmente en presencia de paja de trigo pre-tratada. Por lo tanto, se le dio nombre a cada secuencia de las que fue posible identificar.

Xilanasa_hipotética_33948: TVXYL1

Xilanasa_hipotética_4649: GTXYL1

Xilanasa_hipotética_140289: GTXYL2

Luego, estas enzimas fueron analizadas con la herramienta "BLAST" de NCBI ^[24]. A través de este procedimiento se logró vincular cada una de estas secuencias con la secuencia ingresada en la base de datos de NCBI. Las secuencias se muestran a continuación:

> **TVXYL1:** gi|392569323|gb|EIW62496.1| endo-beta-1,4-glucanase [*Trametes versicolor* FP-101664 SS1]

MHFSLLAAFVALAPAALAIPTPVADASLPGSTANVAGLHAVAKAAGKLYLGTATDNNE
LTNTQYTAILEAPNMFQGITAEENTMKWDATEPQQNVFTFAQGDQIANLARSHGMLLRG
HNCVWHQQLPSWVTAGNFNAQQLTQIIQNHCGTVVGHYRGQVWDVVNEPLNDDGSF
RQDVFFNTLGSYIATALRAARAADPAALYINEFVVEGLGAKSTALKNLVTSLKQQQGVPI
DGVGFQCHFIVGQVPTTLIQSMQQTALGLEVAITELDIR **MTLPETAALLQQQK**QDFQT
VIHACKSVAGCVGVTVWDFTDKFSFVPTFPQGGAATPWDQNLVKKPAFDGIVAGFQ
Q

> **GTXYL1:** gi|521722511|gb|EPQ52890.1| hypothetical protein GLOTRDRAFT_107452 [*Gloeophyllum trabeum* ATCC 11539]

MISKTFVLLALLPLVQCAPPPTPAASSALPTGTSTVALNTAAKAAGKLYMGTATDNGELT
DTAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEPEQGTWWTWNADQIANLAKTNGQLLRGHN
CVWYNQLPSWVTSGSWTNATLTAVVQDHTTELVSRYKGQVYAWDVINEPFNDDGTY
RSDVIFYNTIGPAYIPIALRAARAADPNKLYINEYNIETGSKATAMLNLVESLKAEGVPI
DGVGLQSHFIVGEVPTSLQSIMEQFTALGVEVAITELDIR **MTLPETAALLEQQKTDYDTV**
SACRAVSGCVGVTVWDFTDKYSWVPSTFSGQGAATPYDSNLVKKPAYDGIVAGWQ

> **GTXYL2:** gi|339219002|gb|AEJ35165.1| beta-1,4-endoxylanase [*Gloeophyllum trabeum*]
 MSFKTLVAVLCLVPVALAQQPAWAQCGGQGWTTGGTTCVAGYSCVAQNSYYSQCLPT
 GSGSGTVTSTSVGSSPSATSTTPLNTAAKAAGKKYFGSATDNPELSDPAYVKILSDSTM
 FGQITPGNSMKWDATEPSRGTFTFTQGDQIANLAKANGQLLRGHNCVWHNQLPSWVT
 SGNFNAATLSSIITTHCGTVVGHYKGGIYSWDVVNPFNDDGTFRQDVFYNTLGQDYIS
 IALTAARAADPDAKLYINDYNIEGTGAKSTAMVNLVKSLKAANVPIDGIGVQAHLIVGQVP
 STLEANLRQFTALGVEVAITELDIR**MTLPATDALLAQQK**KDYQTVIAACKAVSGCIGVTIW
 DYTDKYSWVPSTFSGQGAALPWDANLNKKPAYDGIVAGFAS

Se hizo uso de la herramienta “Compute pI/Mw tool” de ExPASy ^[22], con ella se calcularon el punto isoeléctrico (PI) y el peso molecular (PM) teóricos de cada una de las xilanasas buscadas. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. “Xilanasas seleccionadas para el estudio y principales características de cada una”.

Nombre Impuesto	Xilanasas hipotética	Proteína en NCBI	Nº acceso	PI	PM [kDa]
TVXYL1	33948	endo-beta-1,4-glucanase	gi 392569323 gb EIW62496.1	5,66	37,7
GTXYL1	4649	hypothetical protein GLOTRDRAFT_107452	gi 521722511	4,57	37,9
GTXYL2	140289	beta-1,4-endoxylanase	gi 339219002 gb AEJ35165.1	5,71	41,6

3. Clonamiento y análisis de secuencias que codifican para xilanasas

Se clonaron los genes que codifican la información de las xilanasas en vectores pGEM-T Easy, con lo que se logró secuenciarlos. Las secuencias obtenidas fueron analizadas a través de herramientas bioinformáticas para determinar características o propiedades que pudieran ser desprendidas desde su información conformacional.

En particular se estudiaron los dominios presentes en cada xilanasas, además de comparar aquellas expresadas en las condiciones utilizadas con el resto de las presentes en el genoma y algunas ya caracterizadas de otras especies.

El estudio comenzó creciendo las especies fúngicas *T. versicolor* y *G. trabeum* en medio sólido con paja de trigo pre-tratada, como se detalla en el Anexo F.

3.1. Extracción de RNA total

Se extrajo la totalidad de los RNA presente en cada hongo. A través de esto, se espera recuperar los mRNA de los genes de las xilanasas que son generadas en las condiciones del cultivo, además del resto de los genes expresados por el hongo bajo esas condiciones.

En la Tabla 9 se presenta los parámetros del RNA obtenido.

Tabla 9. "Concentración y calidad de RNA extraído para evaluar si puede ser utilizado en los pasos posteriores".

Especie	Abs ₂₆₀ [nm]	Abs ₂₈₀ [nm]	Dilución	C _{RNA} [µg/ml]	Pureza: Abs ₂₆₀ [nm]/Abs ₂₈₀ [nm]
<i>T. versicolor</i>	0,645	0,326	800	20.640	1,98
<i>G. trabeum</i>	0,719	0,336	200	5.752	2,14

Los valores para ambos hongos indican muestras de buena calidad, ya que los valores de la razón Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ son superiores a 1,8. Se obtuvo además una alta concentración (20 - 80 veces más de la cantidad necesaria para los pasos posteriores).

Con el fin de observar el RNA obtenido y corroborar los parámetros anteriores, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. A continuación se muestra una foto del gel sometido a luz ultravioleta.

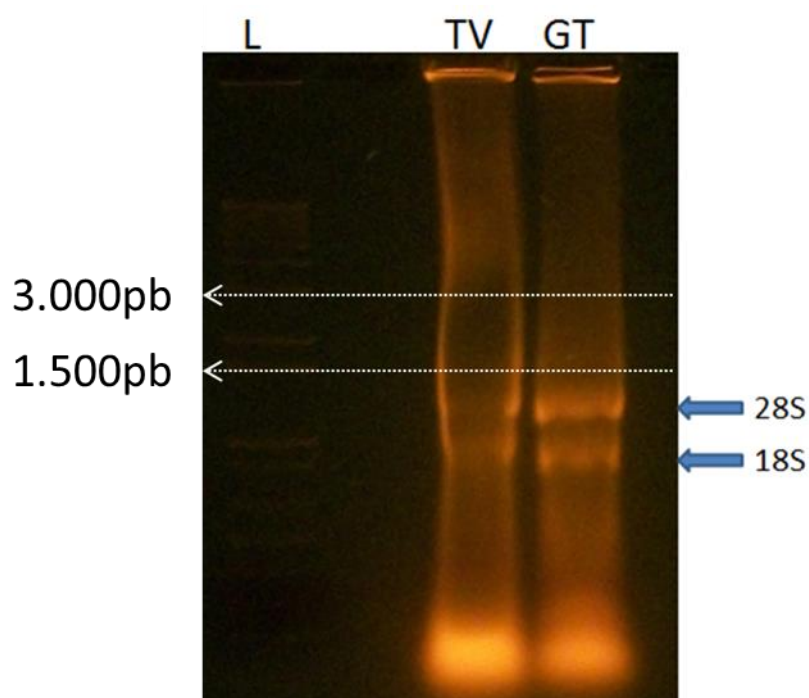


Figura 15. "Monitoreo de RNA total cargándolo en un gel de agarosa libre de nucleasas. A partir de éste se pretende observar la calidad y cantidad del RNA. L: Ladder 1kb plus; TV: RNA extraído de *T. versicolor*; GT: RNA extraído de *G. trabeum*, Se señala las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 18S y 28S". En el gel se cargaron 100[µg] de RNA de *T. versicolor* y 30[µg] de RNA de *G. trabeum*.

Se percibe una gran cantidad de RNA como un chorreo bastante definido en comparación a las bandas obtenidas en el marcador de pesos moleculares (L). Se advierte a simple vista las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 18S y 28S.

3.2. Aislamiento y amplificación de los genes de xilanasas

Al obtener una concentración y calidad aceptables de RNA, se usaron como templado para la síntesis de cDNA, según el protocolo descrito en Métodos. Así se obtiene DNA complementario que representa la totalidad de genes expresados por el hongo en el

momento de la extracción de RNA, con ausencia de intrones. Entre estos genes, se espera encontrar la presencia de los genes de xilanasas en estudio.

Se realizó una reacción de PCR para cada uno de los genes buscados utilizando los protocolos de PCR mostrados en Métodos y los primers diseñados según se describió en la sección Anexo D.

Los resultados de estas reacciones se muestran en la Figura 16.

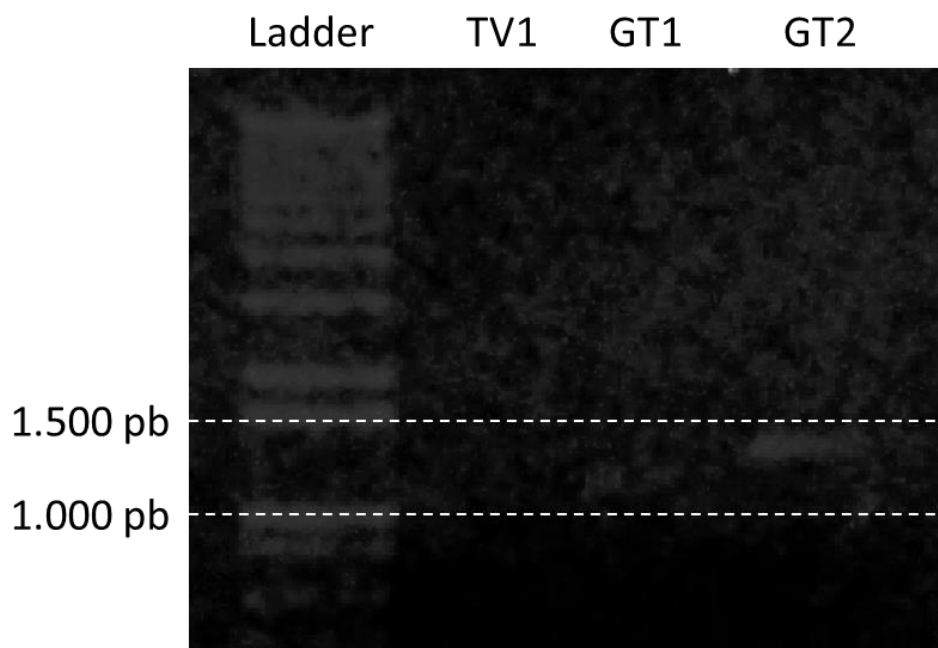


Figura 16. "Gel de agarosa al 1% para evidenciar la amplificación de los genes obtenidos a través de las reacciones de Reverse Transcription PCR (RT-PCR). Ladder: Marcador de pesos moleculares 1kb plus; TV1: producto de amplificación desde cDNA de *T. versicolor* para el gen TVXYL1; GT1: producto de amplificación desde cDNA de *G. trabeum* con primers para GTXYL 1.; GT2: producto de amplificación desde cDNA de *G. trabeum* con primers para GTXYL2".

Se observa una banda entre las 1.000 y 1.500[pb] tanto para la reacción de GTXYL1(esperada de 1.068[pb]), como la de GTXYL2(esperada de 1.191[pb]). No se evidencia ninguna banda para el caso de TVXYL1(esperada de 1.056[pb]). Se ve que para ambas xilanasas de *G. trabeum* se amplifica un gen de un tamaño similar al esperado.

Como no se obtuvo la amplificación del gen TVXYL1, se realizó una nueva reacción de PCR variando la temperatura de apareamiento entre 53 y 57[°C]. Los resultados se muestran en la Figura17.

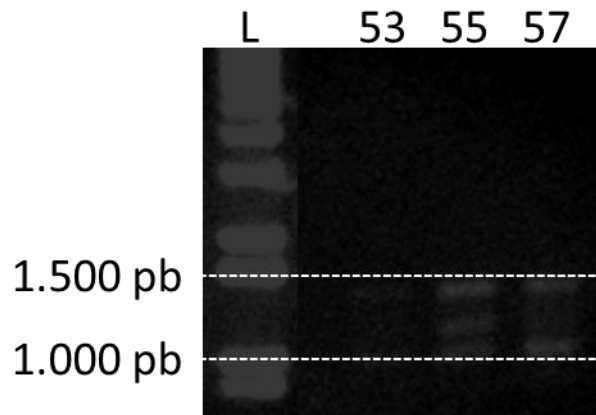


Figura 17. “Gel de agarosa al 1% para evidenciar la amplificación de los genes obtenidos a través de un RT-PCR. Se utilizó como templado el cDNA de *T. versicolor* y los primers diseñados para TVXYL1. L: Marcador de pesos moleculares 1kb plus; 53: protocolo usando una temperatura de apareamiento de 53[°C]; 55: con temperatura de alineamiento de 55[°C]; 57: con temperatura de apareamiento de 57[°C]”.

Se observaron tres bandas que representan a tres secuencias de distinto largo que fueron amplificadas en cada una de las temperaturas utilizadas. Se esperaba obtener una secuencia de 1.056[pb], por lo tanto se sospecha que el gen de la xilanasas buscada es la banda que coincide con las 1.000[pb].

Es necesario purificar esta banda, cortando directamente del gel para realizar los estudios posteriores. Debido a falta de tiempo, el estudio realizado sobre el gen de esta enzima no continuó.

El trabajo continuó con los productos de PCR de GTXYL1 y GTXYL2. Estos fragmentos fueron ligados al vector pGEM-T Easy. La construcción se introdujo en *E. coli* y se recuperaron las colonias blancas resistentes a ampicilina.

Se obtuvo muchas colonias que incorporaron el vector pGEM-T Easy/GTXYL1, y ninguna que incorporó pGEM-T Easy/GTXYL2, por lo tanto se hizo una nueva placa selectiva que se inoculó con una mayor concentración de las bacterias transformadas. Así se obtuvo 5 colonias del clon con GTXYL2.

Cada colonia se creció en medio LB con ampicilina. Una fracción de este volumen se usó para generar un stock glicerol que fue guardado a -80[°C], y el resto, para extraer el plasmidio presente en cada colonia.

Se utilizó la enzima de restricción *EcoRI* para liberar los genes de xilanasas presentes en el vector recombinante de cada una de las colonias transformadas. Luego, estas muestras fueron cargadas en un gel de agarosa, que se muestra en la Figura 18.

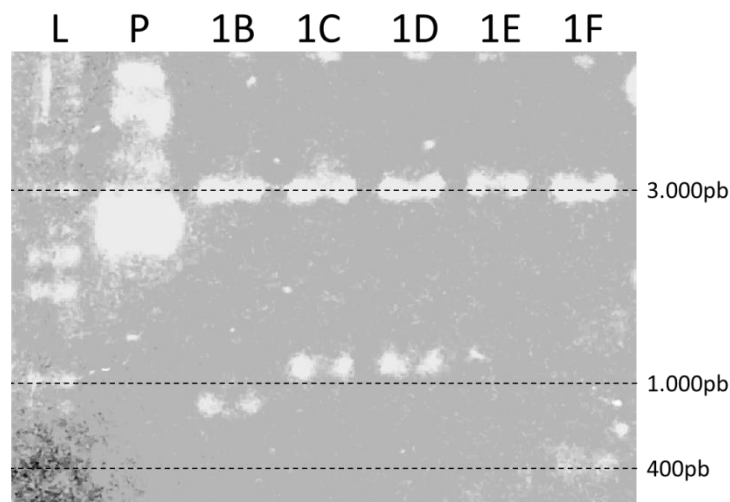


Figura 18. "Digestión con *EcoRI* de plasmidios recombinantes pGEM-T Easy/GTXYL1 extraídos desde cinco colonias de bacterias *E. coli* transformadas. L: Ladder 1kb plus; P: Plasmidio de la colonia B sin digerir; 1B, 1C, 1D, 1E y 1F: plasmidio digerido proveniente de las colonias B, C, D, E y F respectivamente".

Las bacterias fueron previamente transformadas con el gen GTXYL1 unido al vector pGEM-T Easy, con este experimento se pretende identificar la presencia del gen y el vector en cada colonia al separarlos con la acción de esta enzima de restricción.

Se observa varias bandas en el plasmidio no digerido (P), que representan los distintos grados de sobre enrollamientos del ADN.

En todas las muestras digeridas se ve el vector pGEM-T Easy linealizado (aproximadamente 3.000[pb]).

Se advierte un inserto inferior a 1000[pb], en la colonia B, que corresponde a un tamaño menor que el esperado para GTXYL1 (1.068[pb]). Para las colonias C y D se observa una banda del largo esperado. No hay inserto visible en la colonia E. Se observa un inserto de 400[pb] en la colonia F.

Por lo tanto solo las colonias C y D pueden presentar el gen GTXYL1, el resto de las colonias contienen secuencias de tamaños inferiores, que podrían estar incompletas o ser distintas del gen GTXYL1.

Aun considerando lo anterior, se analizaron las secuencias de los plasmidios obtenidos desde las 5 colonias para examinar cada uno de los insertos.

En el caso de los clones con el gen GTXYL2, al digerir con la enzima de restricción *EcoRI*, se encontró que, además de la banda correspondiente al vector pGEM-T Easy, se obtuvo un fragmento de DNA.

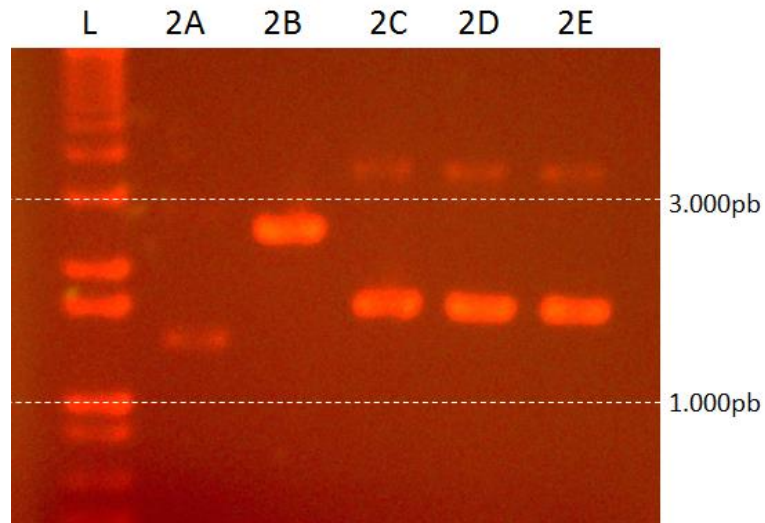


Figura 19. "Digestión con *EcoRI* de los plasmidios recombinantes pGEM-T Easy/GTXYL2 extraídos desde cinco colonias de bacterias *E. coli* transformadas. L: Ladder 1kb plus; 2A, 2B, 2C, 2D y 2E: plasmidio digerido proveniente de las colonias A, B, C, D y E respectivamente".

Se observa una banda levemente superior a 1.000[*pb*] que probablemente contiene al gen de GTXYL2.

Se observa que las colonias A y B carecen de la banda esperada en las 3.000[*pb*] que representa al plasmidio pGEM-T Easy linealizado y se divide una banda superior a 3.000[*pb*] en las demás colonias.

Se nota una banda un poco inferior a las 1.500[*pb*] en la colonia A, una cercana a 3.000[*pb*] en B y una cercana a las 1.500[*pb*] para C, D y E.

Ninguna de las bandas corresponde al tamaño esperado para GTXYL2, podría tratarse de un error en la secuencia estudiada o una amplificación de otro fragmento. Para descifrar el origen de este patrón, se enviaron a secuenciar los plasmidios de todas las colonias obtenidas.

A través del secuenciamiento de los plasmidios extraídos de las colonias transformadas con ambos plasmidios recombinantes, se obtuvo las secuencias mostradas en el Anexo E.

En las colonias B, C, D y F de GTXYL1 se lograron identificar secuencias del inserto. Al traducir cada secuencia y compararla con la xilanasa hipotética GTXYL1 (gi|521722511), se aprecia una gran similitud entre ellas (Figura 20).


```

GTXYL1_C -----
GTXYL1_B MISKFTFVLLALLPLVQCAPPTPAASSALPTGTSTVALNTAAKAAGKLYMGATDNGELT
hyp_107452 MISKFTFVLLALLPLVQCAPPTPAASSALPTGTSTVALNTAAKAAGKLYMGATDNGELT
GTXYL1_D MISKFTFVLLALLPLVQCAPPTPAASSALPTGTSTVALNTAAKAAGKLYMGATDNGELT
GTXYL1_F MISKFTFVLLALLPLVQCAPPTPAASSALPTGTSTVALNTAAKAAGKLYMGATDNGELT

GTXYL1_C -----MKWENTEPEQGTWTWTNADQIASLAKTNGQLLRGHNCV
GTXYL1_B DTAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEPEQGTWTWTNADQIANLAKTNGQLLRGHNCV
hyp_107452 DTAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEPEQGTWTWTNADQIANLAKTNGQLLRGHNCV
GTXYL1_D DTAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEPEQGTWTWTNADQIANLAKTNGQLLRGHNCV
GTXYL1_F DTAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEPEQGTWTWTNADQIANLAKTNGQLLRGHNCV
*****

GTXYL1_C WYNQLPSWVTSGSWTNATLTAVVQDHTTELVSRYKGQVYAWDVINEPFNDDGTYRSDVIFY
GTXYL1_B WYNQLPSWVTSGSWTNATLTAVVQDHTTELVSRYKGQVYAWDVINEPFNDDGTYRSDVIFY
hyp_107452 WYNQLPSWVTSGSWTNATLTAVVQDHTTELVSRYKGQVYAWDVINEPFNDDGTYRSDVIFY
GTXYL1_D WYNQLPSWVTSGSWTNATLTAVVQDHTTELVSRYKGQVYAWDVINEPFNDDGTYRSDVIFY
GTXYL1_F WYNQLPSWVTSGSWTNATLTAVVQDHTTELVSRYKGQVYAWDVINEPFNDDGTYRSDVIFY
*****

GTXYL1_C NTIGPAYIPIALRAARAADPNAKLYINEYNI EYTGSKATAMLNLVESLKAEGPIDGVGL
GTXYL1_B NTIGPAYIPIALRAARAADPNAKLYINEYNI EYTGSKATAMLNLVESLKAEGVPIDGVGL
hyp_107452 NTIGPAYIPIALRAARAADPNAKLYINEYNI EYTGSKATAMLNLVESLKAEGVPIDGVGL
GTXYL1_D NTIGPAYIPIALRAARAADPNAKLYINEYNI EYTGSKATAMLNLVESLKAEGVPIDGVGL
GTXYL1_F NTIGPAYI-----
*****

GTXYL1_C QSHFIVG EVPTSLQS IMEQFTALGVEVAITELDIRMTLPETAALLEQQKTDYDTVISACR
GTXYL1_B QSHF-----
hyp_107452 QSHFIVG EVPTSLQS IMEQFTALGVEVAITELDIRMTLPETAALLEQQKTDYDTVISACR
GTXYL1_D QSHFIVG EVPTSLQS IMEQFTALGVEVAITELDIRMTLPETAALLEQQKTDYDTVISACR
GTXYL1_F -----

GTXYL1_C AVSGCVGVTVDFTDKYSWVPSTFSGQGAATPYDSNLVKKPAYDGVIVAGWQ
GTXYL1_B -----TDKYSWVPSTFSGQGAATPYDSNLVKKPAYDGVIVAGWQ
hyp_107452 AVSGCVGVTVDFTDKYSWVPSTFSGQGAATPYDSNLVKKPAYDGVIVAGWQ
GTXYL1_D AVSGCVGVTVDFTDKYSWVPSTFSGQGAATPYDSNLVKKPAYDGVIVAGWQ
GTXYL1_F -----

```

Figura 20. “Alineamiento de las distintas proteínas obtenidas al traducir los genes secuenciados. Hyp_107452: Secuencia teórica de la xilanasa GTXYL1; GTXYL1B, GTXYL1C, GTXYL1D, GTXYL1F: Secuencias de los insertos presentes en los plasmidios recombinantes obtenidos desde las colonias B, C, D y F, respectivamente”.

Con esto se buscan las similitudes entre la secuencia teórica y aquellas encontradas en las colonias. Se logra identificar una gran similitud entre todas las secuencias y la identidad entre la enzima teórica y la colonia D.

Los insertos provenientes de las colonias B, C, D y F dan origen a la misma proteína teórica que se estaba buscando, pero las secuencias de las colonias B, C y F se obtuvieron incompletas. Se concluye que solo el clon recombinante D contiene el gen completo de la xilanasa GTXYL1.

Se ve que en la colonia B el inserto corresponde a la misma enzima con la ausencia de una zona interna de su secuencia aminoacídica y las colonias C y F carecen de los extremos N y C terminal respectivamente.

Por lo tanto solo se logró identificar el gen completo de la xilanasas GTXYL1 en el gen presente en el vector recombinante de la colonia D.

Ninguna de las secuencias obtenidas desde el clon con GTXYL2 mostró la presencia del gen recombinante.

Como no se obtuvo ninguna secuencia relevante para este clon, el resto de los estudios de las enzimas GTXYL2 y de TVXYL1 se realizaron sobre las estructuras de las xilanasas presentes en la base de datos de la NCBI, con códigos de acceso gi|339219002 y gi|392569323 respectivamente. A través de esta metodología no puede corroborarse la secuencia genética del gen que codifica la información para cada una de esas enzimas, pero aun así, el estudio bioinformático realizado sobre ambas xilanasas debe ser bastante certero.

3.3. Estudio de dominios conservados

Se buscaron los dominios conservados de cada xilanasas hipotética, mediante la metodología descrita en el Anexo B. Los sitios encontrados se evidencian en la Figura 21, y la presencia de cada uno en las secuencias aminoacídicas puede ser visto en las anotaciones de las secuencias mostradas en el Anexo E.

Cada uno de los dominios presentes en las enzimas fue determinado según las secuencias conservadas. Estas fueron extraídas desde sitio “PROSITE” de expasy^[22] y se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. “Patrones de secuencias aminoacídicas de los dominios conservados de proteínas, según PROSITE de expasy^[22]”.

Dominio	Código PROSITE	Secuencia conservada
Dominio catalítico GH10	PS00591 (GLYCOSYL_HYDROL_F10)	[GTA]-{QNAG}-{GSV}-[LIVN]-x- [IVMF]-[ST]-E-[LIY]-[DN]- [LIVMF]
Dominio de unión a carbohidratos	PS00562 (CBM1_1)	C-G-G-x(4,7)-G-x(3)-C-x(4,5)- C-x(3,5)-[NHGS]-x-[FYWMI]- x(2)-Q-C
Dominio catalítico Quitinasa 18	PS01095 (CHITINASE_18)	[LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]- [LIVMF]-[DN]-x-E
Dominio catalítico GH11		[PSA]-[LQ]-x-E-[YF]-Y- [LIVM](2)-[DE]-x-[FYWHN]

Dónde:

[A, B, C, ...]: Cualquiera de los aminoácidos A, B, C, ...

{A, B, C,...}: Cualquier aminoácido, salvo A, B, C, ...

x: Cualquier aminoácido.

A(n,m): Se repite A, n a m veces.

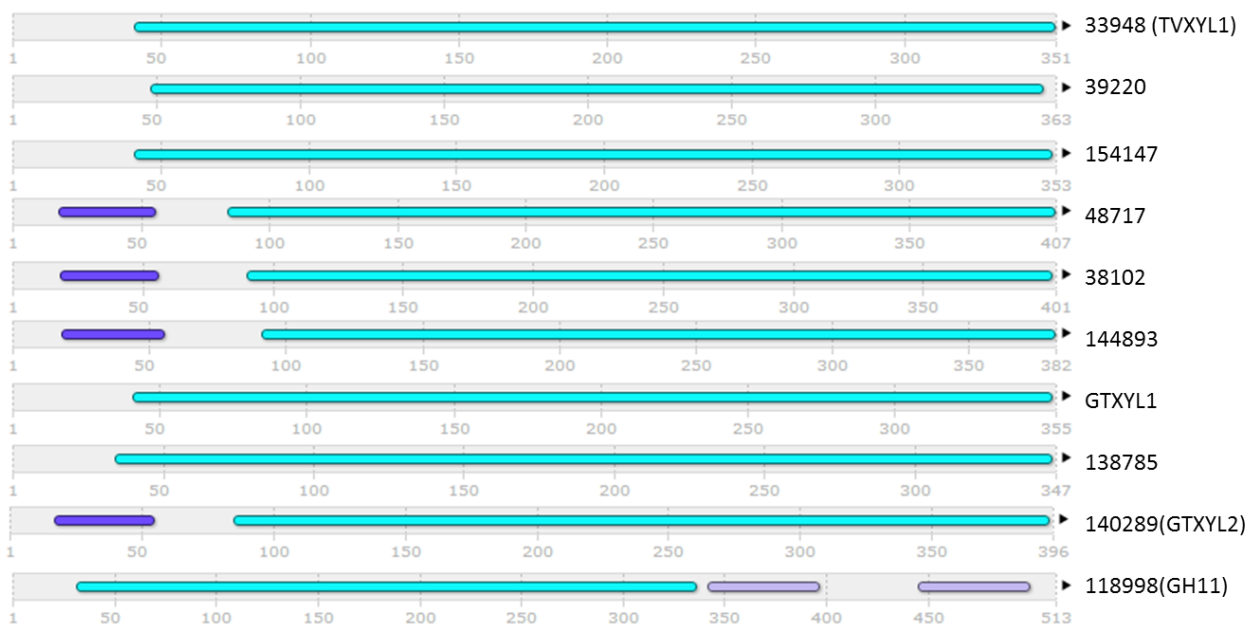


Figura 21. “Dominios conservados presentes en las xilanasas hipotéticas derivadas del genoma y aquella secuenciada (GTXYL1)”.

A través de este estudio se verificó que la xilanasas_hipotética_118998 corresponde a una quitinasa y no a una GH11, eso explica la incongruencia entre el resultado obtenido del análisis del genoma y desde el análisis proteómico. Su sitio catalítico concuerda completamente con el patrón de quitinasa 18 y difiere del correspondiente a GH11.

Todas las otras enzimas hipotéticas presentan 4 secuencias denominadas “fingerprints”, que permiten clasificarlas como GH10 [25]. Presentan también el dominio catalítico que concuerda completamente con la secuencia conservada para estas enzimas, y se identificó en cada una, un residuo de ácido glutámico (E), que corresponde a uno de sus aminoácidos catalíticos.

Las xilanasas hipotéticas 48717, 38102, 144893 y 130289, presentan además un sitio de unión a carbohidrato denominado “Cellulose-binding domain, fungal (IPR000254)” se trata específicamente de un dominio de unión a carbohidratos de tipo 1 (CBM1) en todas estas secuencias. En su estructura se identifica la presencia de 4 cisteínas (C), que forman puentes de hidrógeno entre ellas [22], tal como se muestra en la Figura 22.

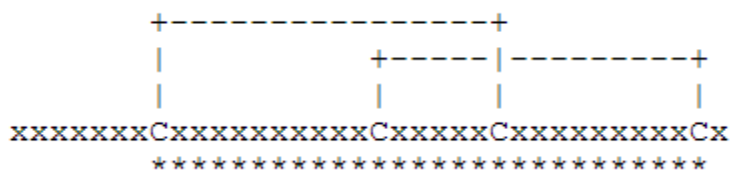


Figura 22. “Puentes de hidrógeno formados entre las cisteínas presentes en el dominio de unión a carbohidratos CBM1”.

Se calcularon el peso molecular y punto isoeléctrico teórico de cada una de las enzimas hipotéticas, además de la identificada GTXYL1, a través de la herramienta de ExPASy: “Compute pI/Mw tool”. El resultado se muestra a continuación.

Tabla 11. “Peso molecular y punto isoeléctrico teórico de cada una de las xilanasas hipotéticas y de GTXYL1”.

Enzima	Peso molecular teórico (kDa)	Punto isoeléctrico teórico
33948 (TVXYL1)	37,7	5,66
39220(Tv)	40,0	5,17
154147(Tv)	38,8	5,03
48717(Tv)	43,3	4,71
38102(Tv)	42,5	4,79
144893(Tv)	39,8	6,51
GTXYL1	37,9	4,57
138785(Gt)	38,5	4,56
140289 (GTXYL2)	41,9	5,72

Los pesos moleculares de todas las xilanasas son similares, oscilando entre los 37 y 44[kDa] para todas las xilanasas estudiadas. El punto isoeléctrico resulta un factor más variable, desplazándose desde 4,5 hasta 6,5 aproximadamente.

3.4. Similitud entre las xilanasas estudiadas

Finalmente se construyó un árbol filogenético mostrado en la Figura 25 para determinar el grado de similitud entre las xilanasas estudiadas, usando los dominios GH10 presentes en cada una. Se muestra además el alineamiento de las secuencias completas en las Figura 23 y 24, destacando la presencia del sitio de unión a carbohidratos en morado, el sitio catalítico en rojo y las secuencias “fingerprint” conservadas que permiten identificar el dominio GH10 en verde.



Figura 23. “Alineamiento de las secuencias de xilanasas hipotéticas de *T. versicolor* y *G. trabeum*, GTXYL1 y dos xilanasas provenientes de *P. chrysosporium*: XynC y endo-1,4-B-xylanase A. Se muestra las secuencias conservadas de GH10 en recuadros verdes, y el dominio de unión a carbohidratos en morado”.

```

Xilanasa_hipotética_138785      FNDNGTYRENWVYQLGPDYIPNAYAVARSVNTLAKLYINDYNTIEGNNKSDALLAVVQS
Xilanasa_hipotética_144893      FNDDGTFRSSVFSNVLGQDFVTIAFQAARAADPAKLYINDYNLDTINPKLNGVVNLVKK
Xilanasa_hipotética_33948 (TVXYL1) LNDDGSFRQDVFNTLIGSGYIATALRAARAADPAKLYINEFVVEGLGAKSTALKNLVTS
GTXYL1                           FNDDGTYSRSDVFNITIGPAYIPIALRAARAADPAKLYINEYNIIEYTGSKATAMNLVSVES
Xilanasa_hipotética_140289 (GTXYL2) FNDDGTFRQDVFNTLIGQDYIISIALNAARAADPAKLYINDYNIIEGTGAKSTAMVNLVKS
XynC[P.chrysosporium]           FNDDGTSWRIDVFNITLGTYSVQIALEAARAADPAKLYINEYNIIEFAGAKATSLNLNVKS
endo-1,4-B-xylanase_A_[P.chrysosporium] FNDDGSWRIDVFNITLGTYSVQIALEAARAADPAKLYINEYNIIEFAGAKATSLNLNVKT
Xilanasa_hipotética_48717       FNDDGTWRSDVFNITLIGQSVYSIALKAARAADPAKLYINDYNIIEGTGAKSTAMNLVVKQ
Xilanasa_hipotética_38102       FNDDGTWRSDVFNITLGTYSVPIALKAARAADPAKLYINDYNIIEGTGAKATAMNLVVKQ
Xilanasa_hipotética_39220       FNDDGTWRETMTWENTLNTTYIPLALHAARVADPAKLYINEYNIIEGTGPKATSMKNLIKD
Xilanasa_hipotética_154147      FNDDGTFRSDIFFNITLNTTYIPLALYAARAADPAKLYINDFNIEGTGAKSDALKSLIKD
*:*::*: *::* *::* *::* *::* *::* *::* *::* *::* *::*

Xilanasa_hipotética_138785      MKARNL--VDGVGFQCHFFVGLPEL-PDLEQNFARFVAAGVEIAVTELDIDM-NLPPSQAD
Xilanasa_hipotética_144893      INGQGTKLIDIGIGTQAHLSAGGAG--GFQAALTQLATPSTEIAITELDIDG-----
Xilanasa_hipotética_33948 (TVXYL1) LKQQGV-PIIDGVGFQCHFFVGGVPTLLIQQSMQQFTAIAGLEVAITELDIDM-TLPETAAL
GTXYL1                           LKAVGV-PIIDGVGLQSHFFIVGVEP-TSLQSIMQPTAIAGVEVAITELDIDM-TLPETAAL
Xilanasa_hipotética_140289 (GTXYL2) LKAVGV-PIIDGIGVQAHLIVGQVP-STLEANLRQFTAIAGVEVAITELDIDM-TLPATDAL
XynC[P.chrysosporium]           LKAVDV-PIIDGIGFQCHFFVGFVSGPGIQTQLSTFAAAGVEVAITELDIDM-TLPSTPAL
endo-1,4-B-xylanase_A_[P.chrysosporium] LKAVSV-PIIDGIGFQSHFFVGGVPTGLQQSQTTFAAAGVEVAITELDIDM-TLPSTPAL
Xilanasa_hipotética_48717       LQAVGV-PIIDGVGFQSHFFVGVV-EVGFVLEQTALGLEVAITELDIDM-TLPATDAL
Xilanasa_hipotética_38102       LIATGV-PIIDGIGVQAHLIVGQVP-PSFQTVLEQFTAIAGLEVAITELDIDM-TTPASQSA
Xilanasa_hipotética_39220       LKRRGV-PVHGVGVQAHLIVGVEP-TDIRKNLEELVAAGLEVAITELDVFNITLPPNAAG
Xilanasa_hipotética_154147      LKSNQV-PIIDGVGLQSHFFVGGVPTLLQQNMEEFVAAGLEVAITELDIDFTALPPTAAG
*:*:*: *:*: *:*: *:*: *:*: *:*: *:*: *:*: *:*: *:*:

Xilanasa_hipotética_138785      IEQQARDYATVNVNKAQGAACVGIITWGITDL--YSWIPSTYFPEGYALLFDDNYVPHF
Xilanasa_hipotética_144893      --AAPNDYSTLVKACLAV-EESCVSITSWGVVDP--DSWRAST-----NPLLFDFANFNKPK
Xilanasa_hipotética_33948 (TVXYL1) LQQQKQDFQTVIHACKASV-AGCVGVTVWDFTDK--FSFVPSVFFGGGAATPVDQNLVKKP
GTXYL1                           LEQQKTDYDVIACRAV-SGCVGVTVWDFTDK--YSWVPSTFSGQGAATPYDSNLVKKP
Xilanasa_hipotética_140289 (GTXYL2) LAQQKRDYQTVIAACRAV-SGCIQVTIWDYTDK--YSWVPATFSGQGAALPVDENFNKPK
XynC[P.chrysosporium]           LAQQQTDYNSVITACMNV-ESCIQVTVWDWTDK--YSWVPNTFSGQGAACPVDQNVFKKP
endo-1,4-B-xylanase_A_[P.chrysosporium] LAQQKTDYNSVIAKASV-EACVGTVWDWTDK--YSWVNTFSGQGAACPVDQNFVKKP
Xilanasa_hipotética_48717       LAQQQKDYQSVVQACMNV-KGCVGVTIWDWTDK--YSWVPSTFSGQGAALPVDQTFNKKP
Xilanasa_hipotética_38102       LAQQEKDYQTVIQACMNV-KGCVGATLWDFDCK--YSWVPSTFSGQGAACPVDQNLVKKP
Xilanasa_hipotética_39220       LEQQRRDYEIVAAAEV-KGCVGVTVWDFTDKASYSWIPGTFPGIGDACPWDDDLNKKP
Xilanasa_hipotética_154147      IAQQKADYETVVAACNAV-PKCVGVTLWDFDCK--YSWIPGTFPGQGDACPWFIDEFVKKP
*:*: *:*: *:*: *:*: *:*: *:*: *:*: *:*:

Xilanasa_hipotética_138785      AFNATIQALLA--
Xilanasa_hipotética_144893      AYTAVMQALA---
Xilanasa_hipotética_33948 (TVXYL1) AFDGIVAGFQQ--
GTXYL1                           AYDGIVAGWQ---
Xilanasa_hipotética_140289 (GTXYL2) AYDGIVAGFAS--
XynC[P.chrysosporium]           AFNGIAAGFSA--
endo-1,4-B-xylanase_A_[P.chrysosporium] AYDGAIGFGN--
Xilanasa_hipotética_48717       AYSGITAAALA---
Xilanasa_hipotética_38102       AYTGIVNALSAA--
Xilanasa_hipotética_39220       AYYGILDGFGIAR
Xilanasa_hipotética_154147      AYQGIIIEGFKTHH
*:*:

```

Figura 24. “Continuación del alineamiento de las secuencias de xilanasas hipotéticas de *T. versicolor* y *G. trabeum*, GTXYL1 y dos xilanasas provenientes de *P. chrysosporium*: XynC y endo-1,4-B-xylanase A. Se muestra las secuencias conservadas de GH10 en recuadros verdes, y el dominio catalítico en un rojo”.

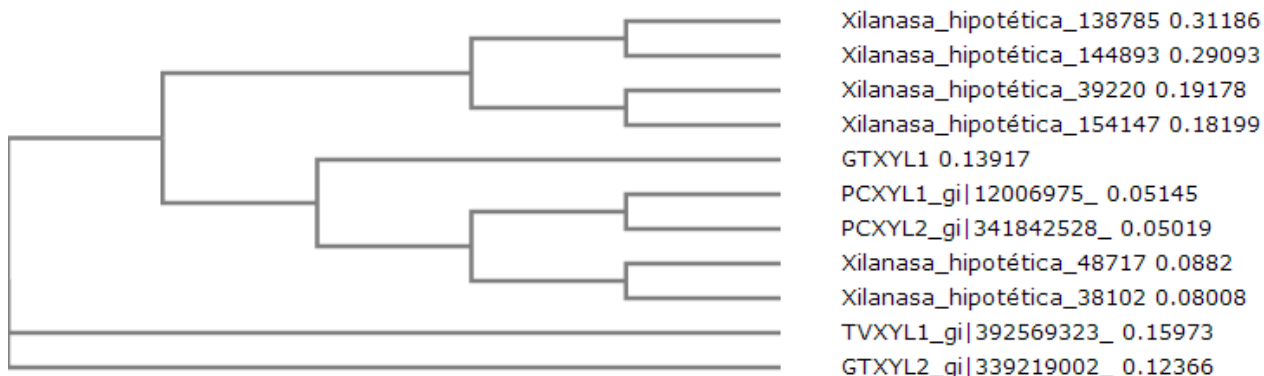


Figura 25. “Árbol filogenético construido con las secuencias aminoacídicas de las xilanasas hipotéticas, GTXYL1 y dos provenientes de *P. chrysosporium*: PCXYL1(XynC) y PCXYL2(endo-1,4-B-xylanase A). Construido con la herramienta ClustalW2_Phylogeny”.

Las enzimas expresadas por los hongos se encuentran alejadas del resto de las enzimas estudiadas, solo GTXYL1 se encuentra cercana a las xilanasas caracterizadas de *P. chrysosporium* [26], por lo tanto se podría esperar que ésta enzima presente características similares.

En la tesis de B. Decelle [26] se concluyó que las condiciones óptimas para las xilanasas caracterizadas de *P. chrysosporium* XynC y endo-1,4-xylanase A son 70[°C] y un pH de 4,5 y se demostró que las enzimas de *P. chrysosporium* son capaces de hidrolizar xilano.

4. Separación y caracterización funcional de las enzimas

Siguiendo con los objetivos de la Memoria de Título, se buscó purificar parcialmente las xilanasas provenientes de ambas especies fúngicas. Para ello, se recolectaron todas las proteínas presentes en los medios extracelulares de cultivos líquidos de los hongos, inducidos con paja de trigo. Posteriormente se realizaron distintas etapas de separación, los estudios más relevantes realizados sobre xilanasas de *T. versicolor* y *G. trabeum* se muestran a continuación. Otros estudios realizados pueden ser observados en los Anexos F y G.

4.1. Separación de xilanasas de *T. versicolor*

4.1.1. Separación por cromatografía de intercambio aniónico

Las proteínas de cultivos suplementados con paja de trigo como única fuente de carbono fueron separadas a través de una cromatografía de intercambio aniónico. Previamente las muestras fueron procesadas como se indica en Materiales y Métodos. Al ambientar la columna con un buffer a pH 7, se espera que todas las xilanasas presenten carga negativa y por lo tanto se adsorban sobre la resina, para luego ser eluidas en distintas fracciones a través del gradiente de sal generado. El cromatograma de esta etapa se muestra en la Figura 26.

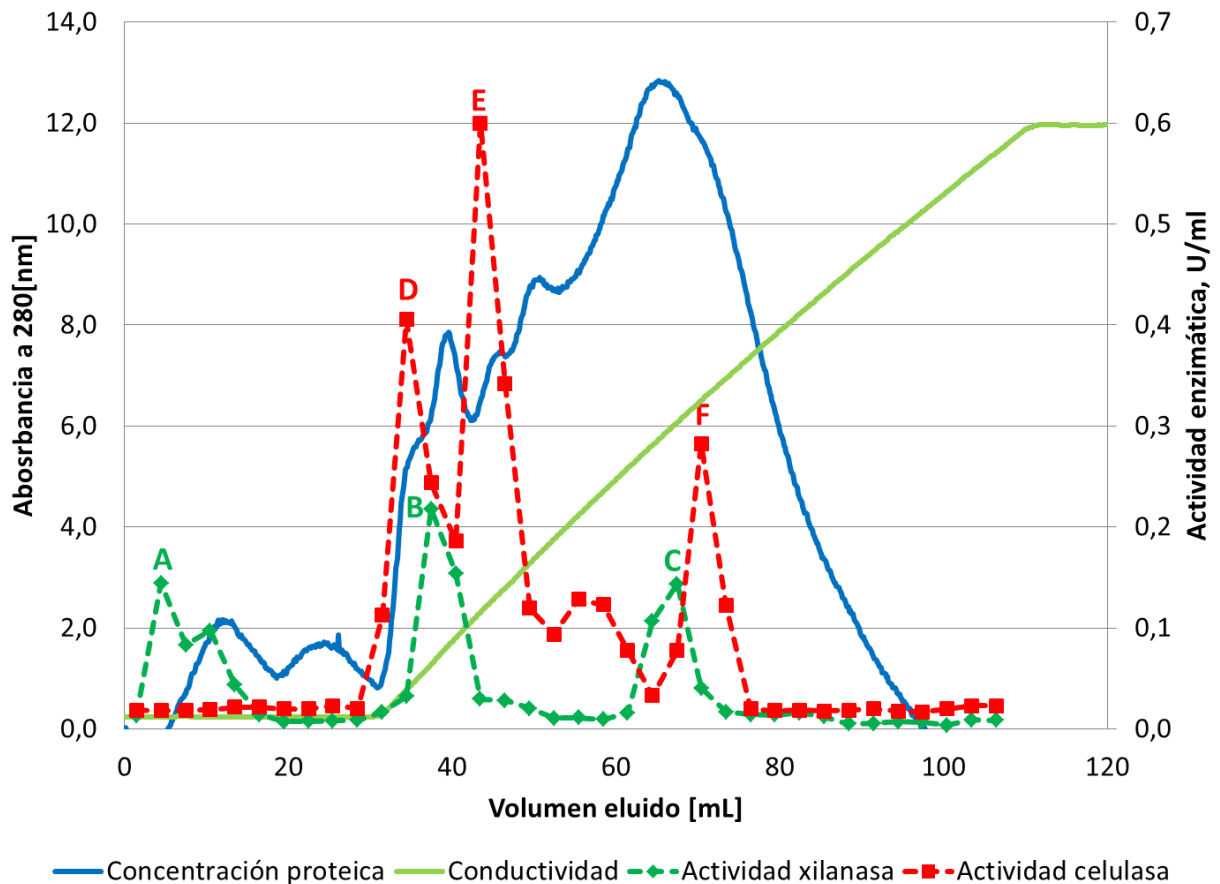


Figura 26. "Cromatografía de intercambio aniónico realizada sobre las proteínas provenientes del cultivo de *T. versicolor*. Se utilizó una columna Q-sefarosa de 8[mL]. La columna se ambientó con buffer Tris 20[mM] a pH 7; después de cargar la muestra en la columna, se lavó con tres volúmenes del mismo buffer y se aplicó una gradiente lineal de NaCl entre 0 y 1[M] en 10 volúmenes de columna."

Se cuantificó la actividad celulasa además de la actividad xilanasa. Se midió la actividad de fracción por medio.

Se aprecia cinco picos de actividad en el gradiente de sal: dos de actividad xilanasa (B y C) y tres de actividad celulasa (D, E y F), también se observa un pico de actividad xilanasa que eluye al comienzo de la cromatografía, entre las proteínas que no se unen a la resina: el pico A; éste pertenece a fracciones con una baja concentración proteica, por lo tanto se espera que la xilanasa presente en ellas tenga un mayor nivel de pureza que en las fracciones que forman los picos B y C, además se destaca que las fracciones de A carecen de celulasas.

Según los puntos isoeléctricos teóricos mostrados en la Tabla 11, se esperaría que todas las xilanasas se adsorbieran sobre la resina al ambientar la columna con un buffer con pH 7, pero el pico de actividad xilanasa A está presente en las fracciones que no se adhirieron a la columna de intercambio aniónico. Se sospecha que el pico B, que se presenta xilanasas unidas débilmente a la columna podrían corresponder a xilanasas de PI más altos, y que por lo tanto presentan una carga menos negativa al pH utilizado, a diferencia de las presentes en el pico C, que se unen con mayor fuerza.

En la Figura 27 se muestra una ampliación de la Figura 26, para indicar las fracciones que fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 12% las que se muestran en la parte superior de la figura. En la Figura 28 se muestran las fotos de los geles.

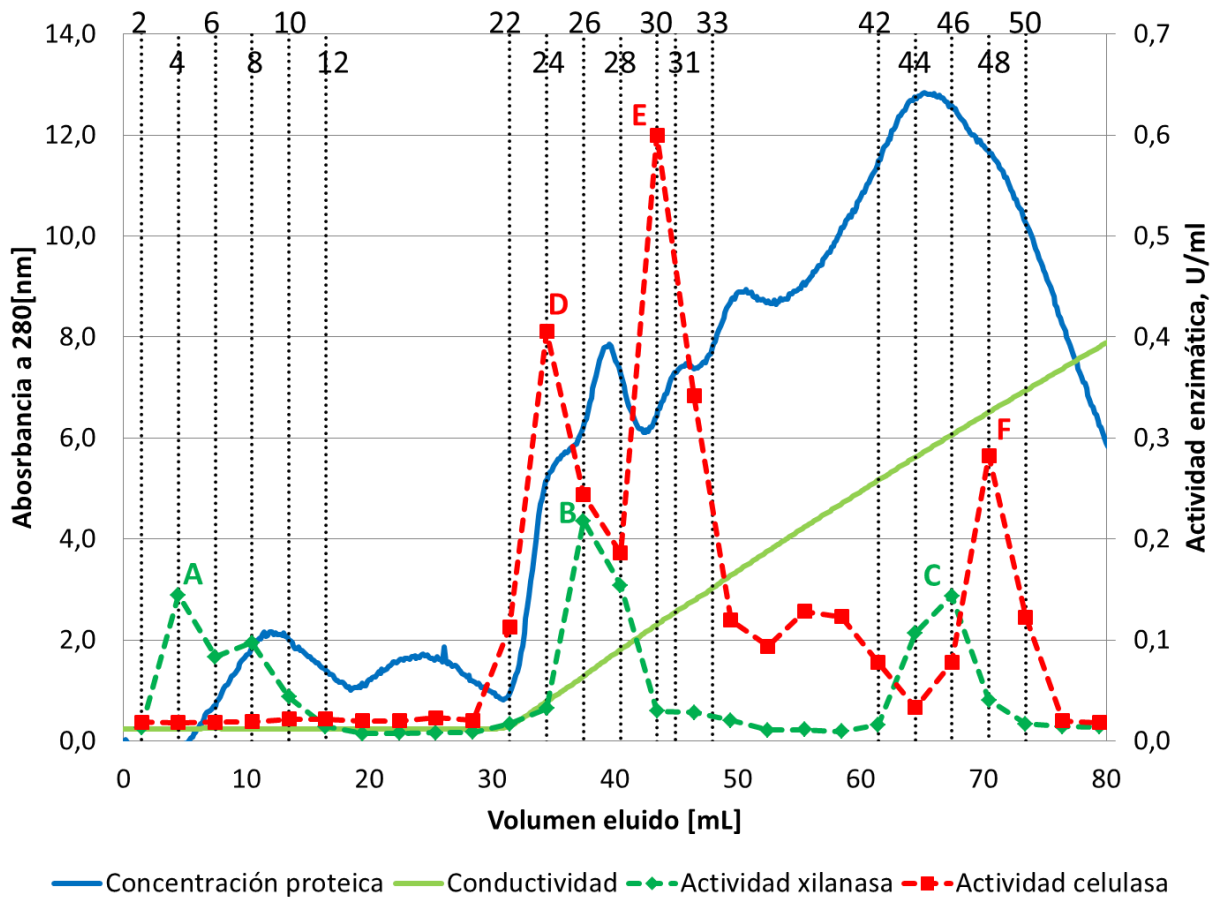


Figura 27. "Cromatografía de intercambio aniónico realizada sobre las proteínas provenientes de un cultivo de *T. versicolor*".

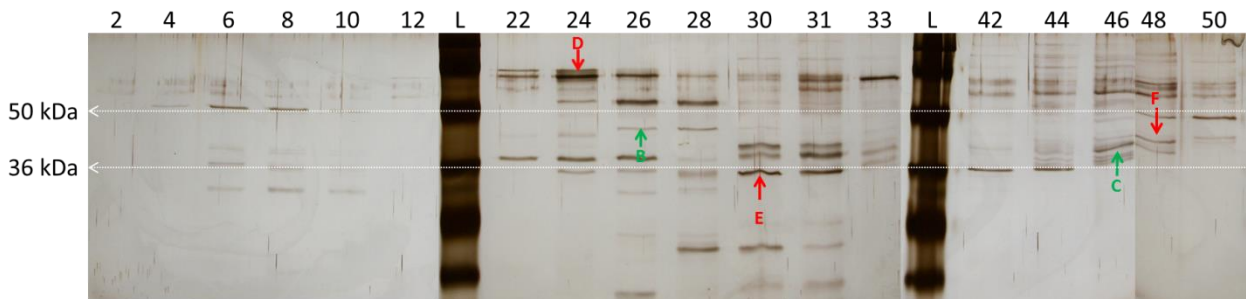


Figura 28. "Gel de poliacrilamida con fracciones de: Cromatografía de intercambio aniónico realizada sobre las proteínas provenientes del segundo cultivo de *T. versicolor*".

Se contrastaron los resultados de actividad xilanasa y celulasa de cada fracción con la intensidad de las bandas presentes en los geles, con ello se busca el mismo comportamiento entre ambos parámetros, es decir, obtener una banda cuya intensidad sea mayor en las fracciones dónde se obtuvieron valores más altos de actividad. De acuerdo a ello no se logró presenciar ninguna banda que representara al pico A, pero si se pudo vincular los picos B, C, D, E y F, con las bandas señaladas de la misma forma.

A través de este estudio se esperaba obtener un máximo de seis picos de actividad xilanasa, derivados de la información obtenida de la anotación del genoma. Si bien existen seis genes que codifican información de xilanasas, no se tiene ninguna información que permita asegurar que todas se expresan o son activas bajo las condiciones utilizadas en la inducción de los cultivos y en los ensayos de actividad.

Para concluir con el estudio se debieron haber realizado zimogramas de las distintas fracciones para identificar en qué bandas existen proteínas con actividad xilanasa o celulasa, para posteriormente cargar nuevos geles de poliácridamida, cortar las bandas de interés y analizarlas a través de espectrometría de masa para clasificar cada xilanasa o celulasa como alguna de las presentes en las bases de datos.

4.2. Separación de xilanasas de *G. trabeum*

Se hizo, en primera instancia, una cromatografía de interacción hidrofóbica, cuyo cromatograma se muestra a continuación.

4.2.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica de proteínas de *G. trabeum*

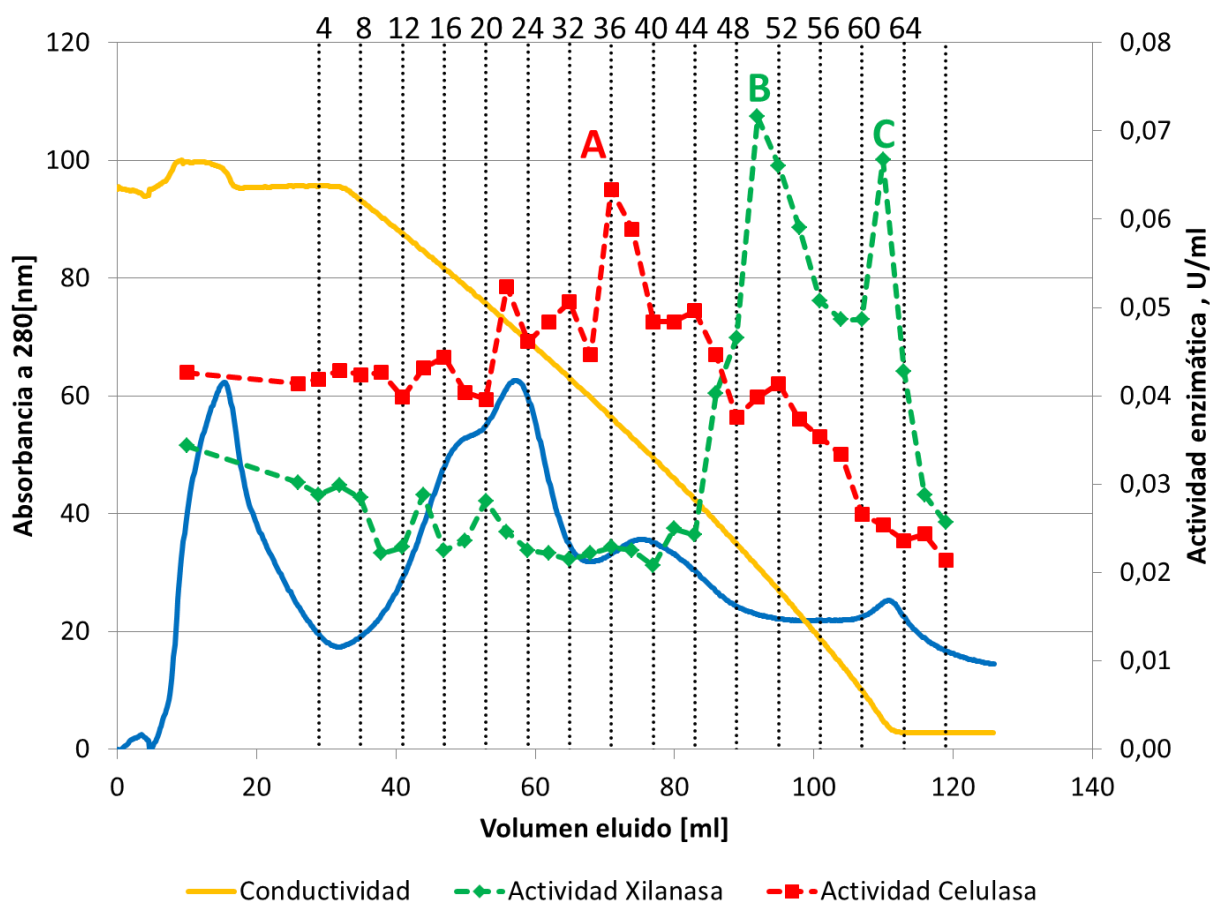


Figura 29. "Cromatografía de interacción hidrofóbica realizada sobre las proteínas del cultivo de *G. trabeum* en medio suplementado con paja de trigo pre-tratada. Se utilizó una columna butil-sefarosa de 8[ml]. El protocolo de separación consistió en ambientar la columna con buffer acetato de sodio 50[mM] a pH 6 con sulfato de amonio 1[M], cargar la muestra, hacer un lavado con el mismo buffer utilizando tres volúmenes de

columna y luego para eluir las proteínas con un gradiente lineal de sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración 0[M] en 10 volúmenes de columna”.

Previo a los ensayos de actividad xilanasa y celulasa se hizo dos gels de poliacrilamida al 12%, en éstos se cargaron las fracciones mostradas en la Figura 29. Los gels se muestran en las Figuras 30A y 30B.

Se observa dos picos de actividad xilanasa y uno de actividad celulasa, este último aparece cuando la concentración de sulfato de amonio es levemente superior a 0,5[M].

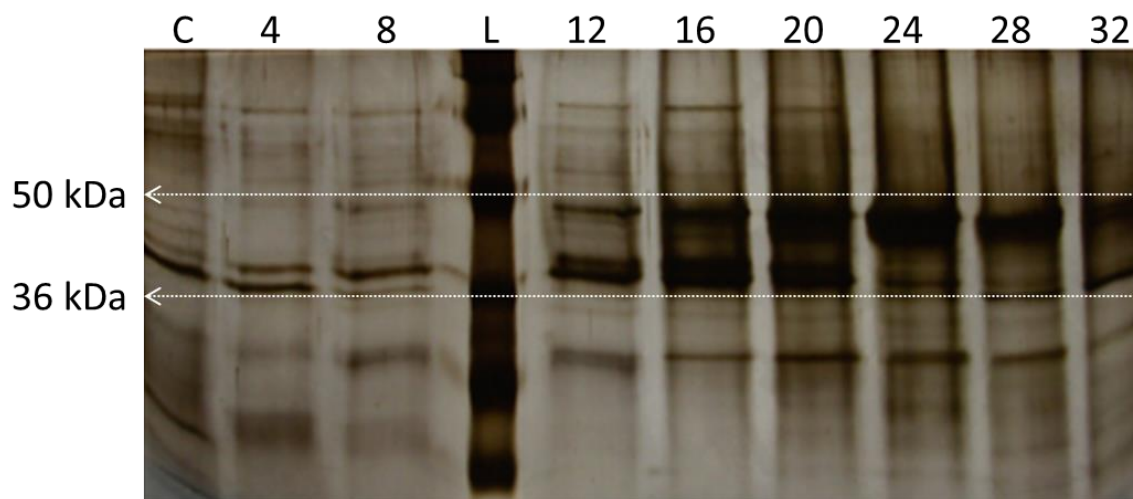


Figura 30A

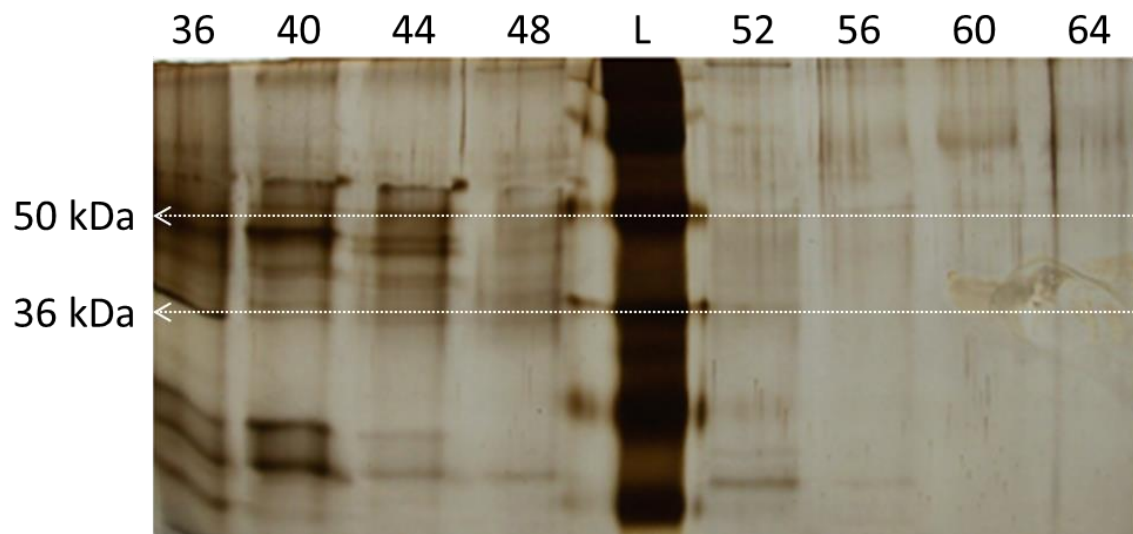


Figura 30B. "Gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes con fracciones de cromatografía de interacción hidrofóbica sobre las proteínas provenientes del cultivo de *G.trabeum*. En A, fracciones 4 a 32. En B, fracciones 36 a 64. L, marcador de masa molecular; C, mezcla inicial cargada en la columna”.

Se observa que la actividad celulasa eluye a una concentración de 0,57[M] de sulfato de amonio, antes que la actividad xilanasa, que eluye a concentraciones menores de 0,30[M]. Por lo tanto se espera que al lavar la columna a una concentración cercana de 0,5[M] de sulfato de amonio se logre eliminar las celulasas en el lavado, mientras que las xilanasas se adsorban a la resina en esas condiciones y logren ser eluidas durante

la gradiente entre 0,5 y 0[M] de sulfato de amonio, pudiendo recuperar fracciones con actividad xilanasas libres de actividad celulasas. Para probar esta alternativa de separación, se realizó una nueva cromatografía de interacción hidrofóbica sobre las proteínas de *G. trabeum*, utilizando una concentración inicial de sulfato de amonio de 0,52[M]. El cromatograma se muestra en la Figura 31.

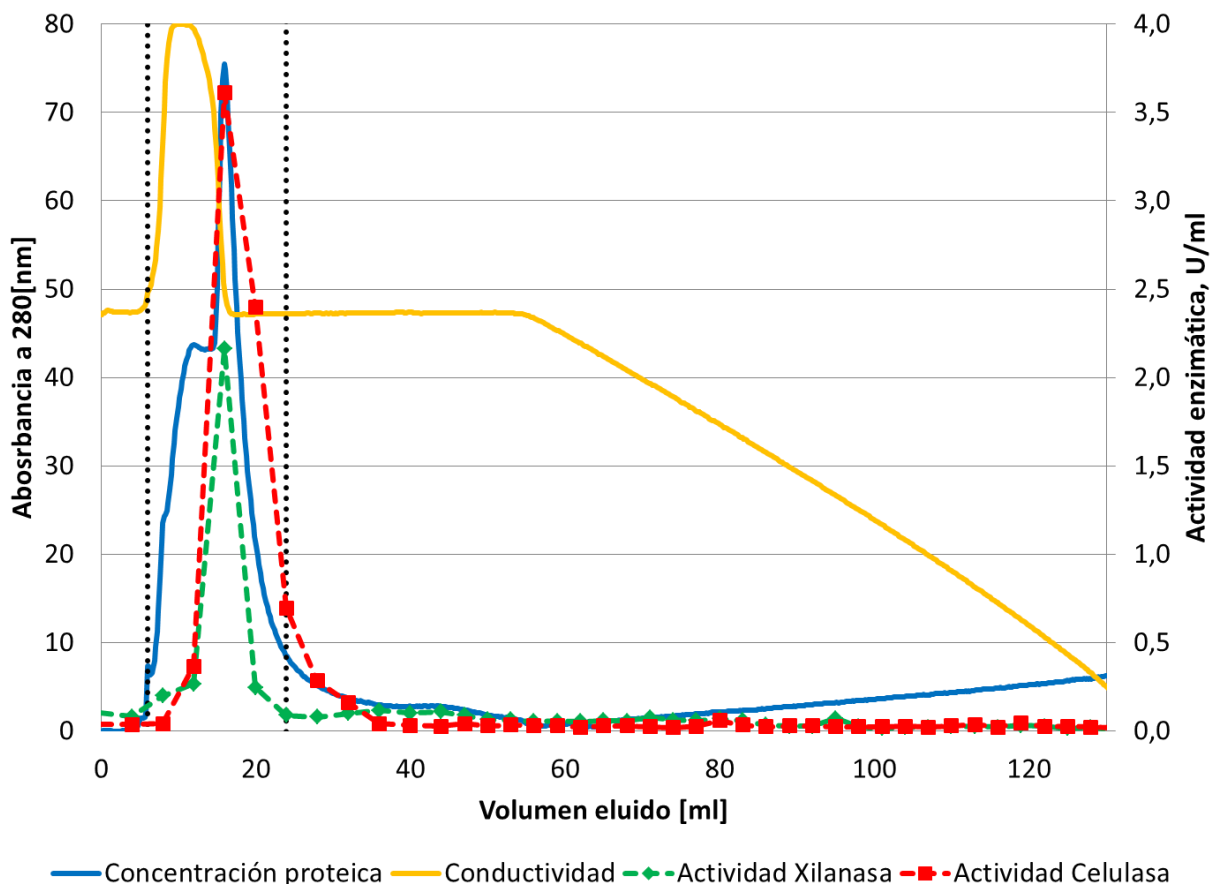


Figura 31. “Cromatografía de interacción hidrofóbica realizada sobre las proteínas del cultivo de *G.trabeum* en medio suplementado con paja de trigo pre-tratada. Se utilizó una columna butil-sefarosa de 8[ml] .El protocolo de separación consistió en ambientar la columna con buffer acetato de sodio 50[mM] a pH 6 con sulfato de amonio 0,5[M], cargar la muestra, hacer un lavado con el mismo buffer utilizando tres volúmenes de columna y luego para eluí las proteínas con un gradiente lineal de sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración 0[M] en 10 volúmenes de columna”.

Las xilanasas no se adsorbieron a la columna como se había proyectado, tanto celulasas como xilanasas eluyeron juntas al momento de ser cargadas. Se sospecha que la proyección realizada para la adsorción de las xilanasas en la resina fue errónea porque los picos obtenidos en la cromatografía anterior, desde los cuales se propuso esta técnica, no fueron medidos rigurosamente, por lo tanto están sujetos a errores que no permiten apreciar claramente el pico de actividad.

4.2.3. Separación de proteínas de *G. trabeum* mediante cromatografía de intercambio aniónico

Se generó un pool con las fracciones delimitadas por la línea punteada en la Figura 31 que presentaban actividad xilanasas (fracciones 4 a la 12) y ese pool fue sometido a

cromatografía de intercambio aniónico. En la Figura 32 se muestra el resultado de esta etapa.

Al igual que para la cromatografía de este tipo realizada sobre las proteínas de *T. versicolor*, se esperaba que todas las xilanasas se adhirieran a la matriz y fueran eluidas a través del gradiente de sal.

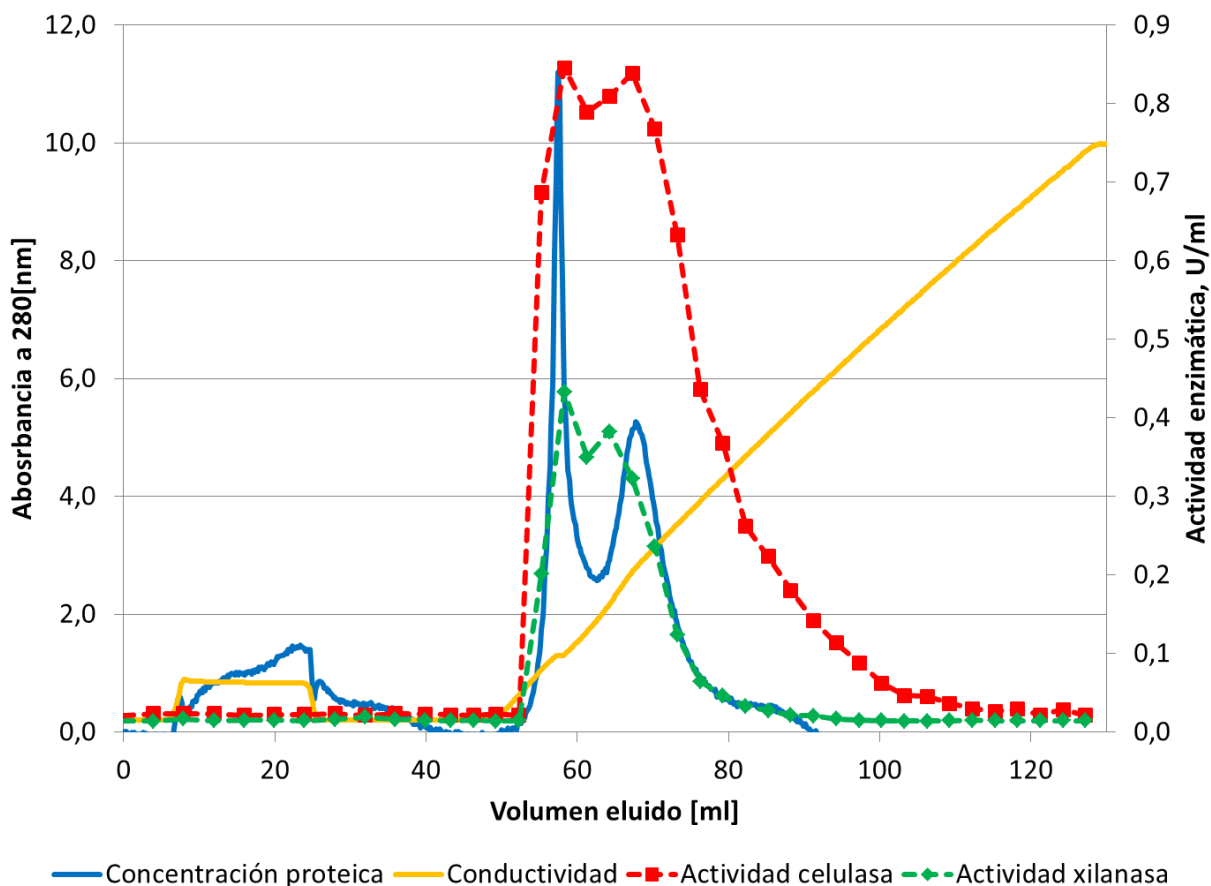


Figura 32. “Cromatografía de intercambio aniónico realizada sobre las proteínas de *G. trabeum* separadas previamente por la cromatografía de interacción hidrofóbica. Se utilizó una columna Q-sefarosa de 8[ml]. El protocolo de separación consistió en ambientar la columna con buffer tris 20[mM] a pH 7, cargar la muestra, hacer un lavado con el mismo buffer utilizando tres volúmenes de columna y luego realizar un gradiente lineal de cloruro de sodio hasta alcanzar una concentración 1[M] en 10 volúmenes de columna para eluir las proteínas adheridas a la resina”.

Las fracciones obtenidas al comienzo de la elución por efecto del NaCl, contienen tanto celulasas como xilanasas, esto se concluye debido a que se ven los picos de ambas actividades junto a la mayor parte de la proteína (absorbancia a 280[nm]) en estas fracciones. Por lo tanto no fue posible obtener fracciones que solo presentaran actividad xilanasas.

Se demuestra que, tal como se esperaba, todas las xilanasas presentes en la muestra se adsorben en la columna y son luego eluidas por efecto del sulfato de amonio.

Se cargaron las fracciones más relevantes en un gel de poliacrilamida al 12% (las que se muestran en un detalle del cromatograma de la Figura 32, en la Figura 33). La Figura 34 corresponde a una foto del gel.

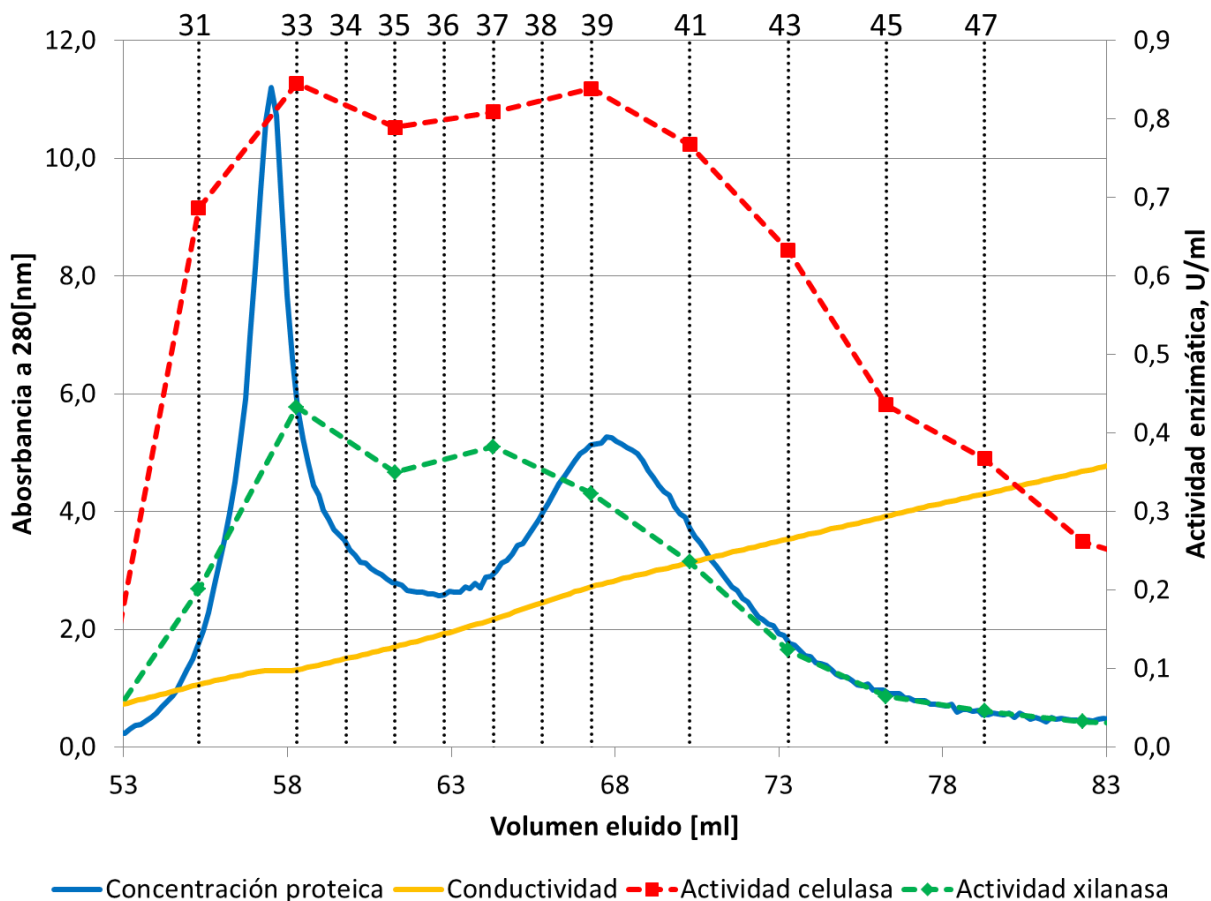


Figura 33. "Selección de fracciones de Cromatografía de intercambio aniónico realizada sobre las proteínas de *G. trabeum* separadas previamente por una la cromatografía de interacción hidrofóbica, para cargar en gel de poliacrilamida al 12%".

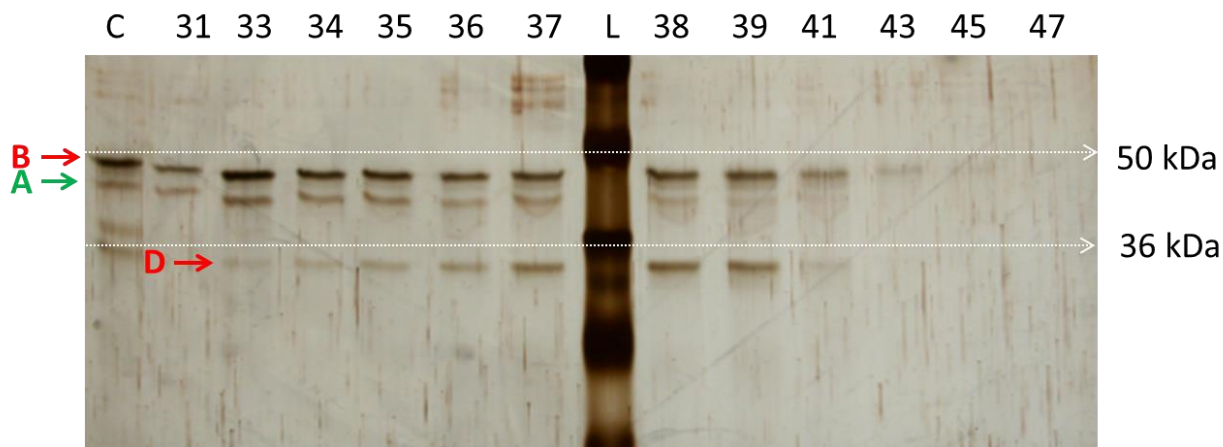


Figura 34. "Gel de poliacrilamida con fracciones de: Cromatografía de intercambio aniónico realizada sobre las proteínas de *G. trabeum* separadas previamente por una la cromatografía de interacción hidrofóbica".

Se detectó la presencia de una xilanasa de un tamaño entre los 36 y 50[kDa], señalada como A, podría tratarse de GTXYL1 (teórico de 37,9[kDa]) o GTXYL2 (teórico de 41,9[kDa]). La banda señalada como B, corresponde a una celulasa. Por lo tanto se logró separar una de las xilanasas expresadas por *G. trabeum*, además de su identificación en un gel de poliacrilamida.

En la Figura 33 se observa un pico de actividad xilanasa en las fracciones 37 a la 39, que coincide con el pico de intensidad de tinción de la banda de 35[kDa] (banda D) en el gel de la Figura 34.

Contrastando los resultados con los reportados por Cohen y cols ^[27], se deduce que las bandas A, B y D corresponden a la xilanasa GTXYL1 (gi|521722511), una celulasa de la familia GH12 (gi|339219006) y una de la familia GH5 (gi|296803329) respectivamente.

Por lo tanto se vincula la enzima visualizada en el gel y purificada parcialmente, con el gen clonado y secuenciado de GTXYL1.

Se generó un pool con las fracciones 30 a la 48 de la cromatografía, a esta mezcla se denominó "GT enriquecido". Se analizaron los parámetros de purificación del proceso total al que fueron sometidas las muestras, resultados que se muestran en las Tablas 12 y 13.

Tabla 12. "Tabla de purificación de la actividad xilanasa de las proteínas provenientes del cultivo de *G. trabeum*".

	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Nivel de purificación
Proteínas resuspendidas	3,00	158	52,6	100%	1
Cromatografía interacción hidrofóbica	0,594	70,6	119	45%	2,26
Cromatografía intercambio aniónico	0,0695	61,4	884	39%	16,8

Tabla 13. "Tabla de purificación de la actividad celulasa de las proteínas provenientes del cultivo de *G. trabeum*".

	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Nivel de purificación
Proteínas resuspendidas	3,00	366	122	100%	1
Cromatografía interacción hidrofóbica	0,594	192	324	53%	2,65
Cromatografía intercambio aniónico	0,0695	106	1.523	29%	12,5

Con la estrategia ejecutada se logra un nivel de purificación de xilanasas y celulasas de 16,8 y 12,5 veces respectivamente, asociado a una pérdida de aproximadamente un 60% de la actividad para las primeras y un 70% para las segundas.

Se destaca que en general las enzimas extracelulares de hongos se presentan en bajas concentraciones, por lo tanto, no es sorprendente que el factor de purificación sea pequeño.

5. Estudios de actividad frente lignocelulosa

Como último objetivo de la Memoria de Título se evaluó el efecto de las xilanasas estudiadas en la hidrólisis de material lignocelulósico, para ello se incubaron las enzimas expresadas por ambas especies fúngicas con paja de trigo pre-tratada como sustrato. Se cuantificaron las concentraciones de xilosas y glucosas liberadas durante la hidrólisis para evaluar la degradación de la hemicelulosa (xilanasas) y celulosa (celulasas) provocado por cada enzima.

Como no se obtuvo una fracción libre de actividad celulasas, se utilizaron como muestras fracciones de proteínas totales de los cultivos de *T. versicolor* y *G. trabeum*, concentradas por precipitación con sulfato de amonio, desaladas y resuspendidas en buffer acetato de sodio 50[mM] a pH 5. Además se probó la fracción parcialmente purificada de *G. trabeum* enriquecida en actividad xilanasas. Estas enzimas se mezclaron con una celulasa comercial Celluclast 1.5L, y se ensayó la capacidad de estas preparaciones de degradar paja de trigo en el ensayo de hidrólisis.

A través del ensayo se logró cuantificar de todas maneras el efecto que tiene cada una de las muestras en la degradación del sustrato lignocelulósico, pero aun así este efecto no puede ser atribuido completamente a las xilanasas debido a la presencia de otras enzimas en las soluciones.

Se evaluó la degradación de la paja de trigo cuantificando la concentración de glucosa y xilosa liberadas, a través del kit GLUC-PAP^[29] y HPLC respectivamente. Los resultados se muestran en las Figuras 35 y 36. Se comparó además el desempeño de las enzimas de hongos, tanto solas, como junto a la comercial, con esto se evaluó si existe un efecto de sinergismo entre ellas.

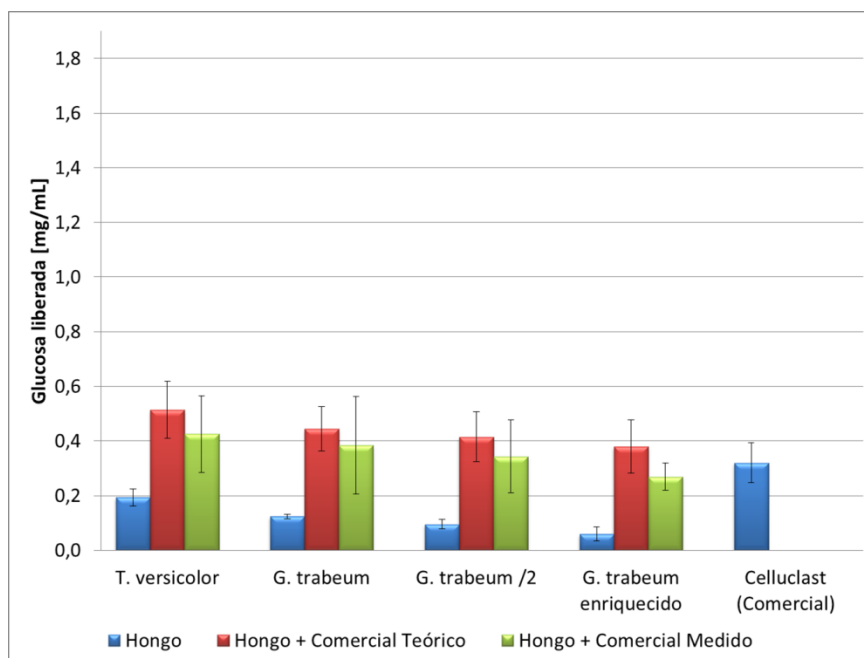


Figura 35. "Glucosa liberada por la hidrólisis de paja de trigo con fracciones proteicas de *G. trabeum* y *T. versicolor* con actividad xilanas. *T. versicolor*: enzimas provenientes del cultivo de *T. versicolor*. *G. trabeum*: enzimas provenientes de los cultivos de *G. trabeum*; *G. trabeum*/2: proteínas totales de un cultivo de *G. trabeum* diluidas a la mitad; *G. trabeum* enriquecido: muestras provenientes de cultivos de *G. trabeum*, enriquecidas en actividad xilanas, producto de la separación en dos pasos cromatográficos. Teóricos: suma de glucosa liberada por la enzima del hongo y la glucosa liberada por Celluclast 1.5L".

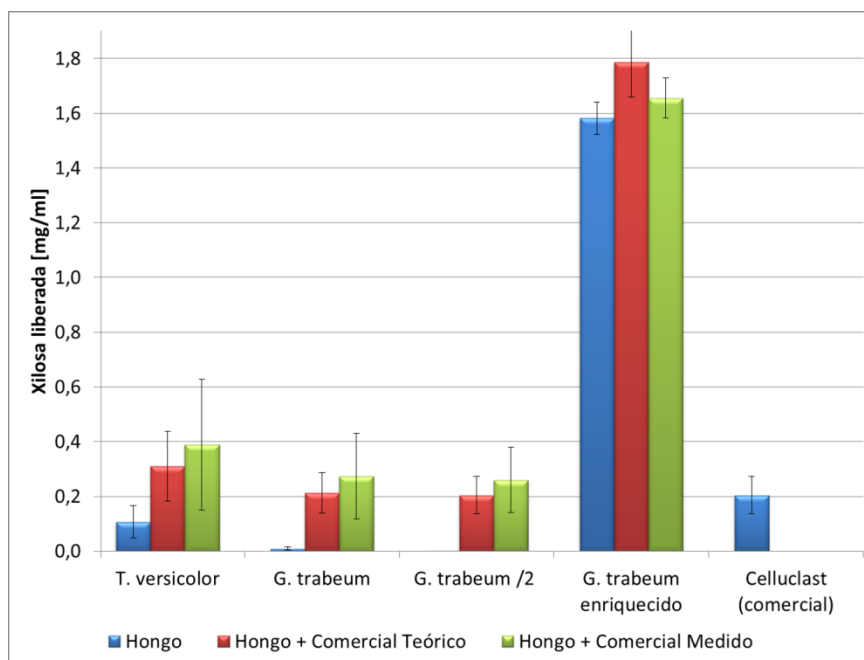


Figura 36. "Xilosa liberada por la hidrólisis de paja de trigo con fracciones pteicas de *G. trabeum* y *T. versicolor* con actividad xilanas. *T. versicolor*: enzimas provenientes del cultivo de *T. versicolor*. *G. trabeum*: enzimas provenientes de los cultivos de *G. trabeum*; *G. trabeum*/2: proteínas totales de un cultivo de *G. trabeum* diluidas a la mitad; *G. trabeum* enriquecido: muestras provenientes de cultivos de *G. trabeum*, enriquecidas en actividad xilanas, producto de la separación en dos pasos cromatográficos. Teóricos: suma de glucosa liberada por la enzima del hongo y la glucosa liberada por Celluclast 1.5L".

Para comparar el efecto real que tiene cada una de las enzimas sobre la lignocelulosa, se compara el cociente entre la cantidad total de azúcar liberada y la cantidad total de proteína utilizada. Esto se muestra en las Tablas 14 y 15.

Tabla 14. “Glucosa liberada por las distintas muestras estudiadas y proteína total cargada en los ensayos de hidrólisis frente sustrato lignocelulósico”.

	Proteína total [mg]	Volumen [ml]	Glucosa [mg/ml]	Glucosa total [mg]	mg _{glucosa} /mg _{proteína}
T. versicolor	$280 \cdot 10^{-5}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$194 \cdot 10^{-3}$	$96,8 \cdot 10^{-3}$	34,6
G. trabeum	$40,3 \cdot 10^{-5}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$125 \cdot 10^{-3}$	$62,5 \cdot 10^{-3}$	155
G. trabeum/2	$20,2 \cdot 10^{-5}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$96 \cdot 10^{-3}$	$47,8 \cdot 10^{-3}$	238
G. trabeum enriquecido	$104 \cdot 10^{-5}$	$425 \cdot 10^{-3}$	$60 \cdot 10^{-3}$	$29,8 \cdot 10^{-3}$	28,9
Celluclast (Comercial)	$2,53 \cdot 10^{-5}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$320 \cdot 10^{-3}$	$160 \cdot 10^{-3}$	6.330

Tabla 15. “Xilosa liberada por las distintas muestras estudiadas y proteína total cargada en los ensayos de hidrólisis frente sustrato lignocelulósico”.

	Proteína total [mg]	Volumen [ml]	Xilosa [mg/ml]	Xilosa total [mg]	mg _{xilosa} /mg _{proteína}
T. versicolor	$280 \cdot 10^{-5}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$107 \cdot 10^{-3}$	$53,5 \cdot 10^{-3}$	19,1
G. trabeum	$40,3 \cdot 10^{-5}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$9,52 \cdot 10^{-3}$	$4,76 \cdot 10^{-3}$	11,8
G. trabeum/2	$20,2 \cdot 10^{-5}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$0,165 \cdot 10^{-3}$	$0,082 \cdot 10^{-3}$	0,41
G. trabeum enriquecido	$104 \cdot 10^{-5}$	$425 \cdot 10^{-3}$	1,58	$790 \cdot 10^{-3}$	762
Celluclast (Comercial)	$2,53 \cdot 10^{-5}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$204 \cdot 10^{-3}$	$102 \cdot 10^{-3}$	4.030

Como la paja de trigo es insoluble en el buffer utilizado y precipita rápidamente, se hizo difícil mantener la proporción de ésta en los ensayos realizados, por lo tanto, se obtuvo una gran variabilidad en el experimento, lo que se asocia a grandes errores, que en algunos casos superan el 50%.

Los valores de concentración de glucosa liberada obtenidos al mezclar las enzimas de origen fúngico con la enzima comercial Celluclast 1.5L, son menores a los teóricos esperados para todas las muestras cargadas. Por el contrario, la concentración de xilosa es mayor que la teórica para todas las muestras, a excepción de las proteínas de *G. trabeum* enriquecidas en actividad xilanasa. De todos modos los errores no permiten ratificar la existencia de un efecto de sinergia para la liberación de xilosas.

La enzima comercial provoca la mejor hidrólisis, liberando 25 veces más glucosa que la mejor de las enzimas fúngicas y 5 veces más de xilosa. Por su parte, la muestra de *G. trabeum* enriquecido libera una cantidad mínima de glucosa, pero tiene el segundo mejor desempeño en relación a liberación de xilosa. Destacando una liberación de 65 veces más xilosa que las mismas muestras sin purificar.

Se debe destacar que los ensayos cuantifican los monómeros liberados y no oligómeros o polímeros, por lo tanto se sospecha la existencia de alguna β -xilosidasa en todas las muestras.

Al finalizar la Memoria de Título se publicó un documento sobre una investigación dónde se clonaron y caracterizaron las xilanasas GTXYL1 y GTXYL2 provenientes de *G. trabeum* [28]. En ésta, se obtuvo que las condiciones óptimas para las enzimas son pH 3,4 y una temperatura de 50[°C] para GTXYL1, y pH 4,5 con una temperatura de 70[°C] para GTXYL2. Se observó además que ambas enzimas son capaces de hidrolizar diversos tipos de sustratos lignocelulósicos y se calcularon las constantes cinéticas de ambas enzimas a través de un ensayo de actividad sobre xilano (Anexo K).

IV. Conclusiones

Se comprobó la expresión de xilanasas por las especies fúngicas *T. versicolor* y *G. trabeum* en cultivos líquidos de estos hongos suplementados con 1% (p/v) de paja de trigo pre-tratada. Se observó la presencia de genes que codifican la información de xilanasas de la familia GH10 en el genoma de cada especie, y adicionalmente se midió actividad xilanasas al realizar un ensayo de hidrólisis utilizando el medio extra celular de los hongos y xilano como sustrato.

Se identificaron todos los genes de GH10 presentes en los genomas de ambas especies, y a través de una espectrometría de masa realizada sobre proteínas separadas desde el medio extracelular de los hongos, se logró probar la expresión de dos xilanasas de *G. trabeum* y una de *T. versicolor* bajo las condiciones de cultivo utilizadas.

Entre los genes identificados, se obtuvo la secuencia de aquel que codifica la información de la xilanasas de *G. trabeum* GTXYL1 (gi|521722511), con ella y las otras encontradas en las bases de datos, se determinaron las propiedades de cada una, en particular, los puntos isoeléctricos y pesos moleculares teóricos, en algunas se observó la presencia de un módulo de unión a carbohidratos CBM1, se identificaron el dominio catalítico GH10 en cada una de ellas y la señal de exportación al medio extracelular.

Se logró separar las xilanasas desde los cultivos de las especies a través de las estrategias utilizadas:

Se purificaron parcialmente tres xilanasas y tres celulasas provenientes de cultivos de *T. versicolor* a través de una cromatografía de intercambio aniónico y adicionalmente se identificaron bandas correspondientes a dos xilanasas y una celulasa en geles de poliacrilamida.

Con la estrategia utilizada sobre las proteínas de *G. trabeum* se logró un enriquecimiento de 16,8 veces, asociado a una pérdida del 61% para xilanasas, y de 12,5 veces, con una pérdida del 71% para celulasas.

Se identificaron bandas en un gel de poliacrilamida correspondientes a las descritas por Cohen y cols ^[27], específicamente una celulasa de la familia GH5, otra de la familia GH12, y una xilanasas de la familia GH10: GTXYL1.

No fue posible demostrar un efecto sinérgico entre las xilanasas producidas por los hongos y la celulasa comercial Celluclast 1,5L, pero tampoco es posible descartar su existencia.

Al cuantificar la xilosa liberada por las muestras en el ensayo de hidrólisis sobre paja de trigo, se concluye que las enzimas provenientes de los hongos son capaces de degradar la hemicelulosa presente en compuestos lignocelulósicos, esta afirmación es coherente con los estudios realizados por Sydenham y cols ^[28]. Por lo tanto es probable que las xilanasas estudiadas intervengan en la hidrólisis de este tipo de sustratos.

V. Bibliografía

- [1]: International Energy Agency. Statics [en línea] <<http://www.iea.org>> [consulta: 10 de noviembre 2013].
- [2]: Centro de Energías Renovables, Ministerio de Energía, Gobierno de Chile. Tecnologías: Biomasa. [en línea] <<http://cer.gob.cl/tecnologias/biomasa/>> [consulta: 14 de febrero 2014].
- [3]: Humbird, D. y cols. Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado. 2011.
- [4]: U.S. Energy Information Administration (EIA). Today Energy. [en línea] <<http://www.eia.gov/todayinenergy/>> [consulta: 25 de marzo, 2014].
- [5]: Ávalos, V. Biocombustibles en Chile. En: Seminario Internacional de Clausura de Proyecto “Procesos óptimos para el tratamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol”: Noviembre de 2011, Chile.
- [6]: Quiroz, R. y FOLCH, J. Plant cell Wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. Laboratorio de Biología Molecular de Hongos, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México, 2011.
- [7]: Alejandro Andrés Salinas Vaccaro. Identificación y Clonación de Nuevas Celulasas para la Producción de Bioetanol de Segunda Generación. Tesis (Ingeniería Civil en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2009.
- [8]: Gentina M., J. 2012. Bioetanol de segunda generación. En: XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Química: 12 al 14 de noviembre de 2012. Montevideo.
- [9]: Naciones Unidas. Comisión Económica para América Latina y el Caribe – CEPAL. Especificaciones de la calidad del etanol carburante y del gasohol (mezcla de gasolina y etanol) y normas técnicas para la infraestructura. [en línea] <<http://www.cepal.org/publicaciones/xml/6/26436/L741-1.pdf>> [consulta: 25 de febrero 2014].
- [10]: Hu, J. y cols. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?. *Biotechnology for Biofuels* 2011 4:36.
- [11]: Henrissay, B. y cols. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 1991 Dec 1;280 (Pt 2):309-16.
- [12]: Kim, H. Efficient function and characterization of GH10 xylanase (Xyl10g) from *Gloeophyllum trabeum* in lignocellulose degradation. *Journal of Biotechnology* 172 (2014) 38– 45.

- [13]: Catalina Aurora Montecinos Pavez. Estudio del efecto de la adición de extremos hidrofóbicos en la expresión y purificación por HIC de xilanasas recombinantes. Tesis (Ingeniería Civil Química). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2009.
- [14]: Schumann, U. y cols. A fast and efficient method for preparation of high-quality RNA from fungal mycelia. *BioMed Central. Reserch notes* 2013, 6:71.
- [15]: Life Technologies. [en línea] <<http://www.lifetechnologies.com/cl/es/home.html>> [consulta: 23 de octubre 2013].
- [16]: Geneaid. [en línea] <<http://www.geneaid.com/>> [consulta: 25 de octubre 2013]
- [17]: Floudas, D. y cols. The Paleozoic origin of enzymatic mechanisms for decay of lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*. 1221748.
- [18]: QIAGEN. Sample & Assay Technologies. [en línea] <<http://www.qiagen.com/>> [consulta: 05 de diciembre 2013].
- [19]: Thermo Scientific. Life Science Research: Fermentas. [en línea] <<http://www.thermoscientificbio.com/fermentas/>> [consulta: 07 de diciembre 2013].
- [20]: Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.
- [21]: DOE Joint Genome Institute. [en línea] <<http://www.jgi.doe.gov/>> [consulta: 04 de Julio 2013].
- [22]: ExPaSy. SIB Bioinformatics Resource Portal. [en línea] <<http://www.expasy.org/>> [consulta: 15 de Julio 2013].
- [23]: The European Bioinformatics Institute. Bioinformatics services. [en línea] <<http://www.ebi.ac.uk/>> [consulta: 19 de enero 2014].
- [24]: National Center for Biotechnology Information. [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> [consulta: 20 de julio 2013].
- [25]: The University of Manchester. PRINTS. [en línea] <<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/>> [consulta: 05 de marzo, 2014].
- [26]: Barbara Decelle. Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4-beta-xylanases. Tesis (Master of Science). Montreal, Canada. Concordia University, 2006.
- [27]: Cohen, R. y cols. Processive Endoglucanase Active in Crystalline Cellulose Hydrolysis by the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and Enviromental Microbiology*. 2005, 71(5):2412.

[28]: Sydenham, R. y cols. Cloning and enzymatic characterization of four thermostable fungal endo-1,4- β -xylanases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014, 98:3613–3628

[29]: Randox Laboratories. Glucose/fructose manual. [en línea] <<http://www.randox.com/>> [consulta: 13 de enero 2014].

[30]: Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer 3.1. [en línea] <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>> [consulta: 02 de septiembre 2013].

VI. Anexos

Anexo A. Gel construido en los estudios preliminares

De los estudios preliminares realizados en el proyecto, se utilizó la información proveniente de un gel de poliacrilamida, en él se cargaron distintas muestras de una cromatografía de filtración en gel realizada sobre proteínas provenientes de un cultivo de *G. trabeum*. Las bandas señaladas fueron sometidas a un proceso de espectrometría de masa, y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1 en la sección Introducción.

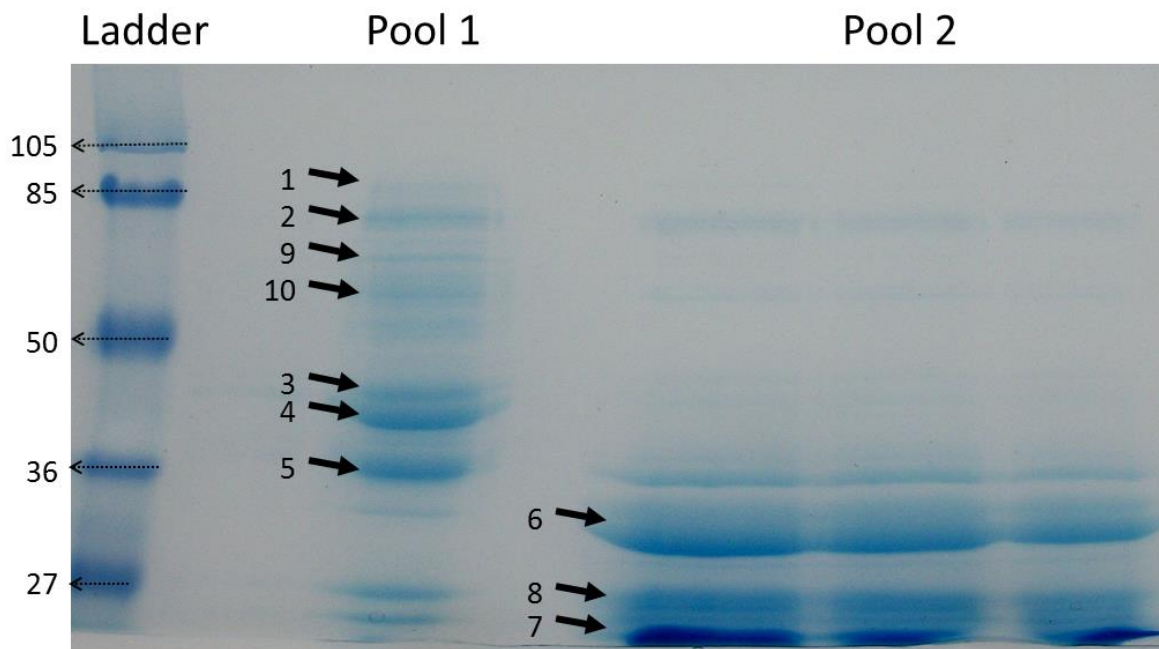


Figura 37. "Gel de poliacrilamida al 12%. Se cargaron dos pools de proteínas provenientes de una filtración en gel realizada sobre proteínas de *G. trabeum*., Se señala los pesos moleculares de cada banda del ladder en kDa. Las bandas señaladas con números fueron sometidas a una espectrometría de masa cuyos resultados se muestran en la Tabla 1".

Anexo B. Detalle de protocolos

1. Extracción de RNA total

Se sumergió la muestra del hongo en N₂ líquido, y al estar completamente sólida fue molida hasta obtener un polvo fino, con la ayuda de un mortero previamente enfriado y libre de nucleasas. Se agregaron 2[ml] del compuesto TRIzol^[15] y se siguió moliendo hasta que la muestra se derritiera. Al conseguirlo, ésta fue dividida en dos volúmenes iguales que fueron transferidos a tubos Eppendorf de 1,5[ml]. Se incubó la mezcla durante 5[min] a temperatura ambiente y a cada uno de los tubos se le agregó 300[μl] de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15[s] y luego se incubaron durante 3[min] a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13.000xg durante 15[min] a 4[°C], y siguiendo con la fase superior, se repitió el protocolo desde la adición del cloroformo. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5[ml], en el que se agregaron 500[μl] de isopropanol y luego se incubó durante 2[h] a -20[°C]. El RNA

precipitado fue recolectado luego de centrifugar a 13.000xg durante 15[*min*] a 4[°C], el pellet se lavó con 1[*ml*] de etanol 75% helado y se dejó secar brevemente con aire a temperatura ambiente. Finalmente el RNA se resuspendió en 20[μ l] de agua libre de nucleasas.

2. Limpieza de cDNA

Se limpió el cDNA usando el protocolo de limpieza del kit “Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit” de Geneaid ^[16].

Se transfirieron 20[μ l] de cDNA (de un máximo de 100[μ l]) a un tubo Eppendorf de 1,5[*ml*], se le agregaron 5 volúmenes de DF buffer y se mezcló por vortex. Se montó la DF column en un tubo colector de 2[*ml*], en ella se cargó la muestra, que fue luego centrifugada a 14.000xg durante 30[*s*]. Se descartó la fracción que pasó a través de la columna y para lavar se agregaron 600[μ l] de Wash Buffer (con etanol), se incubó durante 1[*min*] a temperatura ambiente y se centrifugó a 14.000xg durante 30[*s*]. Se volvió a descartar la fracción que pasó a través de la columna y se realizó una nueva etapa de centrifuga por 3[*min*] a 14.000xg. Se eluyó la muestra de cDNA adherida a la columna, cambiando ésta a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5[*ml*], agregando 30[μ l] de H₂O estéril, incubando durante 2[*min*] a temperatura ambiente y finalmente centrifugandola a 14.000xg durante 2[*min*].

3. Geles de agarosa al 1%

Se diluyó buffer TAE 50x (cuya composición se muestra en el Anexo I) en H₂O destilada hasta lograr una dilución de 50 veces. Luego se agregaron 50[μ l] de bromuro de etidio por cada 100[μ l] de buffer 1x. Se mezcló el buffer TAE 1x con agarosa hasta obtener una concentración de un 1% (p/v). La mezcla se calentó en un microondas y luego se esperó a que se enfriara hasta alcanzar aproximadamente 60[°C] para cargarlo en la cámara donde adquiere su forma. Se le agregó una unidad para formar los distintos pocillos donde se cargan las muestras y se esperó que gelificara. Después, éste se dispuso en la cámara electroforética y se rellenó con buffer de TAE 1x, hasta cubrir completamente el gel. Se incorporaron las muestras en los pocillos, mezclando previamente 5[μ l] de cada una con 1[μ l] de buffer de carga 6x. Los geles fueron sometidos a un campo eléctrico de 40[V], durante aproximadamente 1[h]. Finalmente se visualizaron las distintas bandas iluminando el gel con un transiluminador ultravioleta.

4. Recuperación de medio extracelular

Para recuperar el medio extracelular de los hongos se trasvasió completamente los cultivos líquidos a tubos de 300[*ml*] para centrifuga. Fueron centrifugados durante 10[*min*] a 10.000[rpm] y 4[°C]. El sobrenadante se traspasó a un nuevo recipiente con cuidado de no tomar parte del pellet, y finalmente el líquido obtenido fue filtrado a través de un poro de 0,2[μ m] de diámetro.

5. Precipitación de proteínas

Se agregó sulfato de amonio hasta alcanzar una saturación del 80%. Se midió el volumen obtenido del medio extracelular previamente filtrado y se agregó buffer Tris 1[M] hasta obtener una concentración final de 100[mM]. En hielo, se agregó lentamente sulfato de amonio hasta lograr una saturación del 80%, es decir, 52,3[g] por cada 100[ml]. Se debe utilizar una velocidad de agitación reducida con el fin de no denaturar las proteínas presentes. Se incubó overnight a 4[°C] y se centrifugó a 8.000[rpm] durante 30[min] a 4[°C]. Se descartó el sobrenadante y se guardó el pellet a -80[°C] o se agregó un reducido volumen del sobrenadante descartado (saturado), dónde las proteínas no se resuspenden. La decisión anterior se tomó dependiendo si las muestras serían utilizadas inmediatamente o si serían guardadas por un periodo de tiempo considerable.

6. Inhibición de proteasas

Para ello se hace una solución stock de PMSF a una concentración de 10[mg/ml], diluyendo en isopropanol. A cada muestra de proteínas guardadas se le agregó la cantidad necesaria del stock de PMSF para obtener una concentración final de 100[μg/ml].

7. Resuspensión de proteínas

Se realizó una centrifugación a 8.000[rpm], durante 30[min] y a 4[°C]. Se eliminó el sobrenadante de buffer con sulfato de amonio saturado a un 80% que había sido dejado en cada volumen y se agregó el buffer necesario para la etapa de separación que serían sometidas las muestras.

8. Cuantificación de actividad xilanasa

La unidad de actividad xilanasa se definió como los μmoles de xilosa liberada por minuto, en el ensayo realizado sobre el xilano. Se construyó una curva de calibración para determinar concentración de xilosa en función a la absorbancia medida con una longitud de onda de λ=550[nm], mostrada en el Anexo J.

Por lo tanto la transformación se realizó de la siguiente forma:

$$U \left[\frac{\mu\text{mol}_{\text{xilosa}}}{\text{min}} \right] = \frac{\text{Abs}_{550[\text{nm}]} + n}{m} \cdot t^{-1} \cdot d = \frac{\text{Abs}_{550[\text{nm}]} + 0,0563}{0,2664} \cdot \frac{1}{60} \cdot 4$$

Dónde:

- U: Actividad enzimática, en este caso xilanasa.
- Abs_{550[nm]}: Absorbancia del ensayo de DNS con λ=550[nm].
- n: Valor de la curva estándar (=0,0563).
- m: Valor de la pendiente de la curva estándar (=0,2664).
- t: Tiempo de reacción (=60[min]).
- d: Dilución de la muestra en el ensayo (=4).

9. Cuantificación de actividad celulasa

La unidad de actividad celulasa se definió como los μmoles de glucosa liberada por minuto, en el ensayo realizado sobre el CMC. Se construyó una curva de calibración para determinar concentración de glucosa en función a la absorbancia medida con una longitud de onda de $\lambda=550[\text{nm}]$, mostrada en el Anexo J.

Por lo tanto la transformación se realizó de la siguiente forma:

$$\frac{U \left[\frac{\mu\text{mol}_{\text{glucosa}}}{\text{min}} \right]}{\text{ml}} = \frac{\text{Abs}_{550[\text{nm}]} + n}{m} \cdot t^{-1} \cdot d = \frac{\text{Abs}_{550[\text{nm}]} + 0,0637}{0,1915} \cdot \frac{1}{60} \cdot 4$$

Dónde:

- U: Actividad enzimática, en este caso celulasa.
- $\text{Abs}_{550[\text{nm}]}$: Absorbancia del ensayo de DNS con $\lambda=550[\text{nm}]$.
- n: Valor de la curva estándar (=0,0637).
- m: Valor de la pendiente de la curva estándar (=0,1915).
- t: Tiempo de reacción (=60[min]).
- d: Dilución de la muestra en el ensayo (=4).

10. Cuantificación de proteínas

Se utilizó el protocolo de Bradford: en cubetas para espectrofotometría se agregó:

- 1,2[ml] de H_2O mili-Q.
- 50[μl] de muestra.
- 0,5[ml] de reactivo de Bradford, cuya composición se muestra en el Anexo I.

Se generó un blanco agregando 50[μl] de H_2O mili-Q en vez de muestra; y un cero, constituido por 1,75[ml] de H_2O mili-Q. Se midió la absorbancia de cada muestra en contra del cero (incluido el blanco), utilizando longitudes de onda de $\lambda=465[\text{nm}]$ y $\lambda=595[\text{nm}]$. Finalmente la concentración proteica se calculó como:

$$C_{\text{proteína}} = \frac{\left(\frac{\text{Abs}_{595}(\text{muestra})}{\text{Abs}_{465}(\text{muestra})} - \frac{\text{Abs}_{595}(\text{blanco})}{\text{Abs}_{465}(\text{blanco})} \right) + n}{m}$$

Donde m y n, se obtienen de una curva estándar construida, que puede ser vista en la sección Anexo J.

11. Geles de poliacrilamida

Se construyó geles SDS-PAGE haciendo primero la mezcla del gel de resolución, cuya composición se muestra en el Anexo I. Con la ayuda de una micropipeta se agitó y rápidamente fue incorporada dentro de una cámara para darle forma al gel. Sobre éste se agregaron 200[μl] de butanol y se dejó gelificar. Se eliminó el butanol y se generó la

mezcla del gel de apilamiento, también mostrada en el Anexo I. Al igual que el anterior, se agitó la mezcla y se cargó rápidamente en la cámara, sobre el gel de resolución. Se agregó una unidad en la parte superior del gel para darle la forma de los pocillos. Antes de cargar las muestras se juntaron 20[μ l] de cada una con 5[μ l] de buffer de carga 5x y se calentaron a 100[$^{\circ}$ C] por 5[min]. El gel fue sometido a un campo eléctrico de 200[V] durante 45[min] para lograr la migración de las proteínas.

12. Tinción con azul de Coomassie

Las tinciones se realizaron a los geles de poliacrilamida en que las proteínas cargadas ya habían migrado, el objetivo es observar las bandas obtenidas. Por lo tanto se bañaron los geles con aproximadamente 125[ml] de solución de tinción durante 30[min]. Luego se lavaron dos a tres veces con solución de destinción hasta lograr una visibilidad clara de las bandas del marcador de pesos moleculares y se realizó un último lavado con H₂O mili-Q. La composición de ambas soluciones utilizadas en esta etapa se muestra en el Anexo I.

13. Tinción con plata

Luego de realizar una tinción con azul de Coomassie y desteñir el gel, éste se lavó con H₂O mili-Q agitándolo overnight. Se descartó el H₂O y se incubó durante 30[min] con solución DTT a 0,005[mg/ml]. Se eliminó esta solución para agregar 125[ml] de una nueva de AgNO₃ a una concentración 1[mg/ml], y se cubrió debido a que el nitrato de plata es sensible a la luz. Se agitó durante 30[min], y se cambió el gel a un nuevo pocillo, dónde se bañó con 125[ml] de una solución con 36[mg/ml] de Na₂CO₃ y 0,06% de formaldehído al 37%. Cuando se observó la aparición de las bandas se agregaron 3[g] de ácido cítrico para detener la reacción.

14. Ensayo de actividad sobre paja de trigo

Los parámetros utilizados para la hidrólisis fueron definidos a través de un ensayo preliminar mostrado en el Anexo H. Las concentraciones proteicas de las muestras fueron:

Tabla 16. "Cantidad de proteína cargada de cada muestra en el ensayo de actividad frente lignocelulosa".

Enzima	Concentración stock [mg/ml]	Volumen cargado [ml]	Total de proteína cargada [mg]
T. versicolor	$112 \cdot 10^{-3}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$280 \cdot 10^{-5}$
G. trabeum	$16,1 \cdot 10^{-3}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$40,3 \cdot 10^{-5}$
G. trabeum/2	$8,06 \cdot 10^{-3}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$20,2 \cdot 10^{-5}$
G. trabeum enriquecida	$2,44 \cdot 10^{-3}$	$425 \cdot 10^{-3}$	$104 \cdot 10^{-5}$
Celluclast (Comercial)	$1,01 \cdot 10^{-3}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$2,53 \cdot 10^{-5}$

Anexo C. Medios y condiciones de cultivo

1. Medio líquido para *T. versicolor* (106):

Para generar el medio del cultivo utilizado para la especie *T. versicolor* se agrega 10[ml] de **Metales trazas 106** 100x y 10[ml] de **Solución de cobre 106** 100x, a 1[l] de **Base del medio de cultivo 106**. Cada uno de los componentes se construye como se muestra a continuación:

Base de medio de cultivo 106:

Tabla 17. “Composición de la base del medio de cultivo 106, utilizada para *T. versicolor*”.

Compuesto	Cantidad
Urea[g]	0,3
(NH ₄) ₂ SO ₄ [g]	1,4
KH ₂ PO ₄ [g]	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O[g]	0,3
CaCl ₂ ·7H ₂ O[g]	0,4
Triptona[g]	0,75
Extracto de levadura[g]	0,25
H ₂ O[l]	1

Metales trazas 106:

Tabla 18. “Composición de la solución de Metales trazas 106 y generación de stock 100x”.

Compuesto	1x	100x	para 50[ml]
FeSO ₄ ·7H ₂ O[mg]	5	500	25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O[mg]	1,4	140	7
MnSO ₄ ·7H ₂ O[mg]	1,2	120	6
CoCl ₂ ·7H ₂ O[mg]	2	200	10
H ₂ O[ml]	1000	1000	50

Solución de cobre 106:

Tabla 19. “Composición de la Solución de cobre 106 y generación de stock 100x”.

Compuesto	Concentración final [mM]	100x [g]	para 50[ml]
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,4	9,99	0,5
H ₂ O[ml]	1000	1000	50

2. Medio líquido para *G. trabeum* (117):

Para crecer esta especie se utilizaron dos medios de cultivo diferentes, el primero fue utilizado para crecer el primer y segundo cultivo, mientras que el segundo solo para el tercero. Para generar el primero, luego de autoclavarlas, se juntan la **Mezcla 117-1** con la **Mezcla 117-2**.

Mezclas:

Tabla 20. "Composición de las Mezclas 117-1 y 117-2".

Compuesto	117-1	117-2
KH ₂ PO ₄ [g]	0,46	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O[g]	0,05	-
K ₂ HPO ₄ [g]	1	-
Extracto de levadura[g]	-	2
H ₂ O[ml]	900	100

Para el medio de cultivo utilizado para esta especie se agrega 7[ml] de **Metales traza de 106** a 1[l] de **Base de medio de cultivo 117**.

Base de medio de cultivo 117:

Tabla 21. "Composición de la base de medio de cultivo 117".

Compuesto	Cantidad
D-glucosa[g]	10
KH ₂ PO ₄ [g]	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O[g]	0,5
CaCl ₂ ·2H ₂ O[g]	0,1
NH ₄ NO ₃ [g]	-
l-aspar[g]	0,093
Tiamina[mg]	0,1
extracto de levadura[g]	1
H ₂ O[ml]	1000

3. Condiciones de cultivo

Ambas especies crecieron a 28[°C] con una agitación de 80[rpm].

Anexo D. Diseño de primers

Se diseñaron *primers* para aislar y amplificar los genes en estudio: TVXYL1, GTXYL1 y GTXYL2. Para el diseño se seleccionaron secuencias que se alinean con los extremos del gen, bajo ciertas restricciones:

- Lograr la amplificación de la totalidad del gen.
- Obtener una T_m de 55-60[°C] para cada uno.
- T_m de no más de 2[°C] de diferencia entre ambas.
- No se generaran hairpins a temperaturas cercanas a las de operación.
- No generan homodímeros ni heterodímeros entre las cadenas.
- Largo entre 18 y 22 nucleótidos.
- En lo posible agregar la menor cantidad de nucleótidos extras.

Para determinar las características de cada *primer* diseñado se utilizó la herramienta "OligoAnalyzer tool" del sitio web Integrated DNA Technologies (IDT) ^[30]. Si no cumplían

con las restricciones establecidas, se procedió a rediseñarlos. La secuencia y características de los finalmente utilizados son:

Para TVXYL1:

Forward:

5' TCA CCA TGC ACT TCT CAC TCC 3'

Largo: 21[b]

Tm: 57,0[°C]

Hairpin: -10,2; -12,1 ; -9,6[°C]

Reverse:

5' TCC TCA CTG CTG GAA TCC G 3'

Largo: 19[b]

Tm: 56,9[°C]

Hairpin: 25,6; 21,8; 19,4; 11,5[°C]

Para GTXYL1:

Forward

5' GAA CAT GAT TTC TAA GAC CTT
CAC CG 3'

Largo: 26[b]

Tm: 55,7[°C]

Hairpin: 16; 14,1; 14,8 y 9,2; 11,8; -25;
7,9[°C]

Reverse

5' TTT CCA CTG CGC TCC ACC 3'

Largo: 18[b]

Tm: 58,4[°C]

Hairpin: -0,8; 3,5[°C]

Para GTXYL2:

Forward

5' GCC ATG TCC TTC AAG ACT CTC G
3'

Largo: 22[b]

Tm: 57,6[°C]

Hairpin: 33,3[°C]

Reverse:

5' CCT TTG AGT GTC TGC CTC TAG G
3'

Largo: 22[b]

Tm: 57[°C]

Hairpin: 29,8; 26,4; 23,6; 20,6[°C]

No hay formación de homopolimeros ni heteropolimeros para ninguno de los pares estudiados, ni el alineamiento de alguna de estas secuencias con otras zonas del genoma.

El alineamiento entre cada uno de estos primers, con su respectivo gen puede observarse subrayada en la secuencia de cada gen presentada en el Anexo E.

Anexo E. Secuencias genéticas y proteicas

1. Genes y xilanasas hipotéticas

En la anotación de los genomas de los hongos de los hongos *T. versicolor* y *G. trabeum* presente en la base de datos de Joint Genome Institute (JGI) se buscaron todos los genes que codifican la información de xilanasas, es decir enzimas pertenecientes a la familia 10 u 11 de las glicosil hidrolasas. Aquellos genes identificados, junto a las traducciones realizadas a través la herramienta “expasy translate tool”, se muestran a continuación.

Se anotaron las secuencias genética donde se destaca la siguiente nomenclatura:

Para las secuencias nucleotídicas:

- **Letra de color rojo:** Gen sin intrones.
- **Letra de color azul:** Zona no traducida del mRNA.
- Letra de color negro: Sección de 30 bases presentes en el genoma antes y después del gen.
- Letra subrayada: Zona de alineamiento del primer.

Para las secuencias aminoacídicas:

- **Letra gris:** Péptido señal.
- **Letra de color morado:** Dominio de unión a carbohidratos.
- Letra de color morado y subrayado: Secuencia conservada de unión a carbohidratos.
- Letra de color morado, subrayado y destacado en amarillo: Cisteínas que forman puentes di-sulfuro en el sitio de unión a carbohidratos.
- **Letra de color verde:** dominio de la familia GH10.
- Letra de color verde y subrayado: secuencias conservadas *fingerprint* que permiten clasificarla dentro de la familia GH10.
- Letra de color rojo y subrayado: Dominio catalítico de la enzima.
- Letra de color rojo, subrayado y destacado en amarillo: Aminoácido catalítico.

1.1. Genes de xilanasas descritos en el genoma de *T. versicolor*

> Gen_xilanasas_33948(TVXYL1)

TCCAGAACCACCTCCGATCGCGTTCACC**ATGCACTTCTCACTCCTCGCAGCATT**
GTCGCTCTGGCCCCGCGCGCTCGCGATCCCTGCGACACCCGTGGCCGATGCG
AGTCTTCCCGGCTCGACCGCGAACGTGCGGGCCTGCACGCCGTTGCGAAGGCG
GCGGGCAAGCTCTACCTGGGCACCGCGACGGACAACAATGAGCTCACCAACT
CAGTACACCGCTATCCTCGAGGCTCCAAACATGTTCCGGCCAGATCACGGCCGAG
AACACCATGAAATGGGATGCAACCGAGCCCAGCAGAACGTGTTACGTTCCGCG
CAGGGTGACCAGATCGCGAACCTGGCGAGGTCTCACGGAATGCTGCTGCGCGG
GCACAACGTGTCTGGCATCAACAGCTTCCGAGCTGGGTGACTGCGGGCAACTT
CAACGCACAGCAGCTGACGCAGATCATCCAAAATCACTGCGGCACTGTCGTGGG
ACACTACAGGGGACAAGTTTGGGATGTGGTCAATGAGCCTCTTAACGATGACGG
CTCGTTCCGCCAGGACGTCTTCTTCAACACCCTCGGCTCGGGATACATCGCGACG
GCGCTCCGCGCTGCCAGGGCGGCAGACCCGGCCGCGAAGCTGTACATCAACGA
ATTCAACGTAGAGGGCCTCGGCGCGAAATCGACCGCATTGAAGAACCTTGTGAC
GTCGCTGAAGCAGCAAGGCGTCCCGATTGACGGCGTCGGCTTCCAGTGCCACTT
CATCGTCCGCCAGGTCCCTACAACGCTCATCCAGAGCATGCAGCAGTTCACCGC
GCTTGGCCTCGAGGTCGCCATCACGGAACCTCGACATCCGCATGACGCTCCCCGA
GACGGCGGGCCTCTCCAGCAGCAGAAGCAGGACTTCCAGACCGTCATCCACGC
GTGCAAGTCCGTGGCGGGCTGCGTGGGCGTCACTGTGTGGGACTTCACTGATAA
GTTCTCCTTTGTCCCGAGCACATCCCGGGTCAGGGTGCTGCCACTCCTTGGGAT
CAGAACCTGGTGAAGAAGCCGGCGTTTGGTGGGATCGTCGCCGGATTCCAGCAG
TGAGGACGTGAGGGTGACGGATGGGGTTGGAGA

> Xilanasas_hipotética_33948(TVXYL1)

MHFSLLAAFVALAPAALAI PATPVADASLPGSTANVAGLHAVAKAAGKLYLGTATDNN
ELTNTQYTAILEAPNMFQITAENTMKWDATEPQQNVFTFAQGDQIANLARSHGMLL
RGHNCVWHQQLPSWVTAGNFNAQQLTQIIQNHCGTVVGHYRGQVWDVVNEPLNDD
GSFRQDVFFNTLGSYIATALRAARAADPAAKLYINEFNVEGLGAKSTALKNLVTSLK
QQGVPIDGVGFQCHFIVGQVPTTLIQSMQQFTALGLEVAITELDIRMTLPETAALLQQQ
KQDFQTVIHACKSVAGCVGVTWDFTDKFSFVPSTFPGQGAATPWDQNLVKKPAFD
GIVAGFQQ

> Gen_xilanasa_39220

ACTGTGCACTTCCATAGCCTTCCAGCCATCATGGCCGTGAACCTCCCCTTCCTGAG
GCTCGTCTCGCTCACGCCTGCTCTGTTGTTGGCCTTGGCAGTTGCCTTACAAGCC
TTAGGGCGTGCTACGCCACCCAGAGACTCTTCGACGGCGGCGACTCCATCTGAG
TTGAACCTAGCGGCTTTGGCAGCTCGCAAGCTATACTTTGGAACGGCAACCAACA
ACGTTGAGCTCAACGACACGGCATACTTCGAGATACTCGACGACTTCAAGATGTT
CGGCCAGATTACCCCTGCGAAAGGCATGAAATGGATGGAGACAGAACCGGAGA
GGGGTATCTACACCTTTGCGCAGGCCGACCAGATCGCGCAGCTTGCTAAGCAGG
GCGGGAAGCTCCTCAGAGGACACAACCTGCGTATGGTATAATGCGCTCCCCGGCT
GGGTCACGAACACCACGTGGACAGCCCCGAGTTGGCCGAGGTCGTGCAGGAG
CATTGCTTCAACATCGTTCGTCCTGGGAAGGTCAAGCCTGGGACGTCATCAATG
AGCCTTCAACGATGACGGAACGTGGCGCGAGACCATGTGGTTCAATACCCTCA
ACACGACGTACATTCCGCTCGCGTTGCACGCTGCGCGCGTCGCAGATCCGCACA
CGAAGCTGTACATCAACGAGTACAACATCACCGGCACAGGCCCGAAAGCGACGT
CCATGAAGAACCTCATCAAAGACTTGAAGCGGGCTGGAGTCCCTGTCCACGGCG
TTGGGGTTCAAGCACACGAGACCGTCGGAGAAGTGCCAACCGATATTCGCAAGA
ACCTCGAGGAGCTGGTCGCGCTTGGTATCGAGGTCGCAATCACGGAACTCGACG
TCAAGTTCAACACGCTCCCTCCCAATGCAGCGGGACTCGAACAGCAGAGGCGGG
ATTATGAGGCGATCGTGGCTGCGTGTGCGGAAGTAAAGGGATGCGTGGGAGTGA
CGGTTTGGGACTTCACGGACAAGGCGAGTTACTCGTGGATCCCTGGGACCTTCC
CTGGTACCGGCGATGCTTGTCTTGGGATGATGACTTGAACAAAAGCCGGCGT
ACTATGGCATTGTTGGACGGGTTTGGGATCGCTCGTTAGAAGAGATCCACGATTCTC
GGCAGTAGCCAA

> Xilanasa_hipotética_39220

MAVNLPFLRLVSLTPVLLLALAVALLQALGRATPPRDSSTAATPSELNLAALAARKLYF
GTATNNVELNDTAYFEILDDFKMFGQITPAKGMKWMETEPERGIYTFADQIAQLAK
QGGKLLRGHNCVWYNALPGWVTNTTWTAPELAEVVQEHCFNIVRHWEGQAWDVIN
EPFNDDGTWRETMWFNTLNNTTYIPLALHAARVADPHTKLYINEYNITGTGPKATSMKN
LIKDLKRAGVPVHGVGVQAHETVGEVPTDIRKNLEELVALGIEVAITELDVKFNTLPPN
AAGLEQRRDYEAIVAACAIEVKGCVGVTWDFTDKASYSWIPGTFPGTGDACPWDD
DLNKKPAYYGILDGFGIAR

> Gen_xilanasa_154147

AGGTAGCCCGGAGTCGCCGTGAACCTGCGTGTGTGGTCTTTGTACTCGCCCCTGCTT
CCCGCGTTGCACCTCGCCATGCTCTCTCTGTCAAAGGGGCTGCTCGCGCTTTCCA
TCTTGTCCGTGGCGCGTTTCGCTTTACCCGCTAGCGATGCGAGTAGTGCCTGTT
CCCCATCTCCGGGCTGAATTTGGCGGCGAAGAGTGCGCGGAAGCTCTACCTGGG
CACGGCGACGAACAGCGAGCAGTGGAAACGACACGACGTACCTCAACATCCTGA
AGAGCAACGCCGAGTTCGGGCAGGTTACGCCCGCGAACGTCATGAAATGGTTCC

CGACGGAGCCAGAGGAAGGGGTCTTCACGTTTCAGGACGGGGACATCATCGCG
GATTTCACTGAGAAGACGGGAAAGCTGCTGCGCGGACACAACCTGCGTGTGGCAC
AACCAGCTTCCCGACTGGCTCGAAACCGGTACATTCAGTGCGCCCGAGCTCGCG
TTCATCGTCTCGCGGCATTGCTTCAACCTCGTGAACCACTACCAAGGCCATGTGT
ACAGCTGGGACGTCATCAATGAGGCTTTCAACGACGACGGAACCTTCCGTTCTGA
TATCTTCTTCAATACGCTCAACACCACCTACATCCCGCTCGCTCTCTACGCAGCAC
GCGCAGCCGATCCCAAAGCGAAGCTCTACATCAACGACTTCAACATCGAAGGCA
TAGGCGCCAAGTCTGACGCGCTCAAGAGCCTGATCAAGGACCTGAAGAGCCAAA
ACGTCCCGATCGACGGTGTCTGGGCTGCAGTCGCACTTCGAGGTCGGCGGGCTCC
CGCCACGCTGCAGCAGAACATGGAGGAGTTCGTCGCGCTCGGGCTCGAGGTC
GCGATCACGGAGCTCGACATCCGCTTACGGCGCTCCCGCCGACGGCCGCGGG
CATTGCGCAGCAGAAGGCGGACTACGAGACCGTCGTCGCCGCGTGCAACGCGG
TCCCGAAGTGCCTCGGGGTCACGCTGTGGGACTTTACGGACAAGTACTCGTGGA
TCCCGGGCACGTTCCCTGGGCAGGGAGACGCGTGTCCCTGGACGGACGAATTTG
TGAAGAGGCCTGCGTACCAGGGGATCATCGAAGGTTTCAAGACCCACCATTAGT
CCGCGTACGATGTTAGGCACGATATACGTAATGCTATGTCTTCTGCAAGGGAC
ATGAGAATCACGAATCCGATGTGTGAGTACCCATACGCCAAT

> *Xilanasa_hipotética_154147*

MLSLSKGLLALSILLRGAFALPASDASSALFPISGLNLAAKSARKLYLGTATNSEQWND
TTYLNILKSNAEFGQVTPANVMKWFATEPEEGVFTFQDGDIIADFTEKTGKLLRGHNC
VWHNQLPDWLETGTFSAPELAFIVSRHCFNLVNHYQGHVYSWDVINEAFNDDGTFRS
DIFFNTLNTTYIPLALYAARAADPKAKLYINDFNIEGIGAKSDALKSLIKDLKSQNPIDG
VGLQSHFEVGGVPPTLQQNMEEFVALGLEVAITELDIRFTALPPTAAGIAQQKADYET
VVAACNAVPKCVGVTLWDFTDKYSWIPGTFPGQGDACPWTDEFVKRPAYQGIIEGFK
THH

> *Gen_xilanasa_48717*

GCACTCACTCCATTCCCAAGGTAACCCGTCATGAACCTCCCAGCGTCTTTTCGCAGT
GTTTGTGCTCTCATTCCGTACGCCCTCGCTCAATCCCCGGAGTGGGGTCAGTGT
GGCGGCACGGGCTGGACGGGCGCCACGACGTGTGTGTCGGGAACGGTGTGCAC
AGTCATCAACCCCTACTACTCGCAATGTCTTGCTGGCACTGCTACGTCGGCGCCC
TCTGCTCCCAGCTCCACAGTCACGACTGGCGCGCCCGCCCCGAGCGTCAGCGGT
CTCCACACGCTGGCGAAGGCTGCGGGCAAGCTCTACTTTGGCAGCGCAACGGAC
AACCTGAGCTGACGGACACCGCCTACGTCGCCAAGCTCAGCGACAACGCCGA
GTTGGCCAGATCACCCCGGCAACAGCATGAAATGGGACGCTACGGAGCCGA
CGCGCGGGACGTTACCTTCTCGGGCGGGGACGTGGTGGCGAGCCTGGCAGAG
AAGAACGGGCAGCTGCTGCGCGGGCACAACCTGCGTGTGGTACAACAGCTCCC
GAGCTGGGTTGCGAACGGACAGTTCACGGCGGCGGACCTGACGGACGTGATCA
CGACGCACTGTGGCACCCCTTGTCGGGCACTACAAGGGACAAATATTCGTAGGTA
ACAACGATACTGACTTGCACCTCAAAGACTCTTGGGATGTGATTAATGAGCCCTT
TAACGACGATGGAACCTGGCGCTCGGATGTATTCTTCAACACCCTCGGCCAATCT
TACGTGTCTATCGCGCTCAAGGCTGCGCGCGCCGACAGACCCGAACGCCAAGCTC
TACATTAACGACTACAACATCGAGCAAACCGGTGCGAAATCGACCGCGATGCTG
AACCTGGTGAAGCAGCTGCAAGCGGACGGCGTGCCGATCGACGGCGTCCGGCTT
CCAGAGCCACTTCATCGTCCGGCAGGTCCCCGGCTCGTTCCAGACCGTCCTCGA
GCAGTTCACCGCGCTCGGACTCGAGGTCGCGATCACGGAGCTCGACATCCGCAT
GACGCTCCCCGCAACGGACGCGCTCCTCGCGCAGCAGCAGAAGGACTACCAGA

GTGTGGTGCAGGCGTGCATGAACGTGAAGGGCTGTGTGGGCGTCACGATCTGGG
ACTGGACGGACAAGTACTCCTGGGTGCCGTCGACGTTCTCTGGTCAGGGCGCGG
CACTGCCTTGGGACCAGACCTTCAACAAAAAGCCCGCATAACAGCGGCATTACGG
CGGCACTGGCGTGAAGCCCGAGATCGGGAGATCCTATGCCGTAT

> Xilanasa_hipotética_48717

MNLPAFAVVFVALIPYALAQSP~~EWGQ~~GGTGWTGATT~~CVSGTV~~CTVINPYYSQLAG
TATSAPSAPSSTVTTGAPAPSVSGLHTLAKAAGKLYFGSATDNPELTDAYVAKLSDN
AEFGQITPGNSMKWDATEPTRGTF~~TFSGGDVVASLAEKNGQLLRGHNCVWYNQLPS~~
WVANGQFTAADLTDVITTHCGTLVGHYKQIFVGNNDTDLHLKDSWDVINEPFNDDG
TWRSDVFFNTLGQSYVSIALKAARAADPNAKLYINDYNIEQTGAKSTAMLNLVKQLQ
ADGVPIDGVGFQSHFIVGEVPGSFQTVLEQFTAL~~GLEVAITE~~LDIRMTLPATDALLAQQ
QKDYQSVVQACMNVKGCVGVTIWDWTDKYSWVPSTFSGQGAALPWDQTFNKKPAY
SGITAALA

> Gen_xilanasa_38102

CACTCGACCTCGCAGCCACACTCGGACACGATGCAGCTCTCGACGACCTTCACTC
TCCTCGCGGCTATTATCCCGTTCGCCCTCGGGCAGGCGGCTGAATGGGGCCAGT
GCGGCGGCATTGGCTGGACCGGCGCGACGACGTGCGTGGCGGGCACCACCTGC
ACGGTCATGAACGCGTACTACTCCAGTGCCTCCCCGGTGCCGCTGCGCCCCGCG
CCGACGACGACGCCCGTGTGCGCCCTCGAGCCCCGCGACCCCGCCGCCCGCGCC
CGCGCCGACTGGCAGCGGCCTTAACAAGCTCGCGAAGGCGGCTGGCAAGCTCT
ACCTTGGCACGGCGACGGACAACAACGAGCTCACTGACGCTGCGTATACCGCCA
TCCTCGACGACAACCTCCAGTTCGGCCAGATCACGCCCGCCAACAGCATGAAAT
GGGACGCGACGGAGCCGACGCGCGGAACATTCACGTTGCGGGGCGGTGACCAG
ATCGCGAACCTGGCGAAGACGAACGGGATGCTGCTCCGTGGACACAACCTGCGTG
TGGTACAACCAGCTCCCAAGCTGGGTGGCGAACGGCCAGTTCACCACCGCAGAC
CTCACGACCGTCATCCAGACGCACTGCAGCACCCCTCGTCAGCCACTTCAAGGGT
CAAGTTTACTCTTGGGATGTCGTCAATGAGCCGTTCAACGACGACGGTACCTGGC
GTTGCGACGTGTTCTACAACACGCTCGGCACGTGTCGTACGTCCCATCGCGCTCAA
GGCTGCACGCGCGGCGGACCCCAACGCCAAGCTATACATCAACGACTACAACAT
TGAGCAGACTGGCGCCAAGGCGACCGCGATGTTGAACCTCGTCAAGCAGCTCAT
CGCCGACGGCGTGCCAATCGACGGTGTGCGGCTTCCAGTGCCACTTCATCGTCCG
CGAGGTGCCCCCGTCTGTTCCAGACCGTCTCGAGCAGTTCACCGCGCTCGGGCT
CGAGGTTGCGATCACGGAGCTCGACATCCGCACGACGACCCCGCGTTCGCGAGTC
CGCCCTCGCGCAGCAGGAGAAGGACTACCAGACGGTTATCCAGGCGTGCATGAA
CGTCAAGGGCTGTGTTGGTGCCACTCTCTGGGACTTACCAGACAAGTACTCTTGG
GTGCCCTCGACGTTCTCCGGCCAGGGTGCAGCATGTCCTTGGGACCAGAACCTC
GTCAAGAAGCCCGCGTACACCGGTATCGTCAACGCCCTCAGCGCGTGA~~ACTCAG~~
ATGGGTGGGTTTCGGTCTCAAAAG

> Xilanasa_hipotética_38102

MQLSTTFLLAAIIPFALGQAAEWGQGGIGWTGATTCVAGTTCTVMNAYYSQCLPG
AAAPAPTTTPVSPSSPATPPPAPAPTGSGLNKLAKAAGKLYLGTATDNNELTDAAYTA
ILDDNSQFGQITPANSMKWDATEPTRGTF~~TFAGGDQIANLAKTNGMLLRGHNCVWYN~~
QLPSWVANGQFTTADLTTVIQTHCSTLVSHFKGQVYSWDVVNEPFNDDGTWRSDVF
YNTLGTSYVPIALKAARAADPNAKLYINDYNIEQTGAKATAMLNLVKQLIADGVPIDGV

GFQCHFIVGEVPPSFQTVLEQFTALGLEVAITELDIRTTTPASQSALAAQEKDYQTVIQ
ACMNVKGCVGATLWDFTDKYSWVPSTFSGQGAACPWDQNLVKKPAYTGIVNALSA

> Gen_xilanasa_144893

ATGCTAGATGATAATTCGTCTCCTCACTAGGTCGCCAGCCACACCCGGTCAGGAC
TCACTCTCGAGACAGTCACTGGAAAATGAAGGGCCTCGCCGCACTCGTCGCGCT
CGCTACCGTCGTCGCCATCCCGGCCAACGCCGTCGCGGTCTGGGGCCAATGCGG
AGGCATCGGCTTCAGCGGATCGACCACATGCGATGCCGGCACCGCATGCATCGT
GCTCAACTCTTACTACTCGCAGTGCCAGCCGTCGCGCGGCGCGCCCGCGCCCAC
GACGTCTGCGCCTCAGCCGCCCCCGACCACTCCGGCTGGTGGCTCGCCGGCGCC
CGCGGCGACTGGACTCAACGCTGCGTTCAAGAAGCACGGCAAGAAGTTCTGGGG
TACCGCGTCGGACTCGAACCGCTTCAGCAACCCGACGGACTCCGCGGTGACGGT
CCGCGAGTTCGGCCAGGTCACGCCTGAGAACTCCATGAAGTGGGACGCGACTGA
GCCCTCTCGCAACCAGTTCTCGTTCAGCGGCTCTGACGCACTCGTCAACTTTGCT
ACGACGAACGGCCTCCTCGTCCGCGCCCACACCCTCGTCTGGCACTCGCAGCTC
CCATCCTGGGTCTCCGCGATCAACGACCGCGCGACGCTCACCTCCGTCATCCAG
AACCACATCGCGAACGTCGCGGGCCGGTACAAGGGCAAGGTGTAICTCTGGGAT
GTCGTGAACGAGATCTTCAACGAGGACGGCACGTTCCGCTCGTCGGTGTCTCG
AACGTCCTCGGCCAGGACTTCGTCACGATCGCCTTCCAGGCGGCACGGGCGGGCG
GACCCGAACGCGAAGCTCTACATCAACGACTACAACCTCGACACCGTGAACCCG
AAGCTGAACGGTGTGTCAACCTCGTCAAGAAGATCAACGGCGGGCGGCACCAAG
CTGATCGACGGTATTGGTACTCAGGCTCACCTTTCTGCTGGCGGTGCTGGCGGAT
TCCAGGCCGCGCTCACGCAAGTACGCTACCGCGGGCACGGAGATCGCCATTACGG
AACTCGATATTGCGGGCGCCGCCCCCAATGACTACTCGACGCTGGTAAAGGCAT
GTCTCGCGGTGGAGAGCTGCGTGTCCATTACGAGCTGGGGTGTCCGCGACCCCG
ACTCCTGGAGGGCGTCCACAAACCCCTCTTGTTCGACGCGAACTTCAACCCGA
AGCCCGCGTACACCGCCGTCATGCAGGCGTTGGCTTGAGAGGTGCACTCTTGGT
CGTGTACATGACAGGTATCGTCTTCACGCGATGTATACTAGTGGGCTTCGTTTTTG
TTGGTATGCTTCGATTGTATCCTTGCCTCACACACCTTGTGGGGATGAACATAGC
ACGGCATCGTATTCATGCGCAGCACAGATAGATTCATATCGTACACTGATGGGAA
GAGGACAACCTGGAGAAGTCAAGGAGAAGTAGAACGGGGAGAGGTAGTTATCGG
CGTAACCGTGACAGCAGCGGATCCCTCCGCGAGACGAAGAATCACCTCCTTCAG
AGCGCCCATCATTGTCACCAATTGAGCAATGTTCTCTTCCATCCTATCCATCCTCA
TCGAGAGATCCG

> Xilanasa_hipotética_144893

MKGLAALVALATVVAIPANAVAVWQCGGIGFSGSTTDAGTACIVLNSYYSQCQPS
AGAPAPPTSAPQPPPTTPAGGSPAPAATGLNAAFKKHGKFWGTASDSNRFSNPTD
SAVTVREFGQVTPENSMKWDATEPSRNQFSFSGSDALVNFATTNGLLVRAHTLVWH
SQLPSWVSAINDRATLTSVIQNHIANVAGRYKGVYSWDVVNEIFNEDGTFRSSVFSN
VLGQDFVTIAFQAARAADPNKLYINDYNLDTVNPKNLGVVNLVKKINGGGTKLIDGIG
TQAHL SAGGAGGFQAALTQLATA GTEIAITELDIAGAAPNDYSTLVKACLAVESCVSIT
SWGVRDPDSWRASNPLLF DANFNPKPAYTAVMQALA

1.2. Genes de xilanasas descritos en el genoma de *G. trabeum*

> Gen_xilanasa_46499(GTXYL1)

ATTTCTTCGTCGGCTCATTGCATTGTGAACATGATTTCTAAGACCTTCACCGTTCTC
CTTGCCCTTGCTGCCCTTGTGCAATGCGCACCTCCTACTCCCGCCGCCTCTTCGG
CTTTGCCGACTGGTACATCTACCGTCGCCCTCAATACTGCGGCGAAGGCGGCAG
GGAAACTGTACATGGGTAAGTACTGCCACCGACAACGGGGAGCTTACTGACACCGCTT
ATACCACTATCCTGGACAACAATGCAAACCTTCGGCCAGATCACCCCTGCGAACG
CCATGAAATGGGAAAATACAGAGCCGGAGCAGGGAAACATGGACCTGGACGAAC
GCTGACCAGATCGCCAACCTCGCGAAGACCAATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCAC
AACTGTGTCTGGTACAACCAGCTCCCCAGCTGGGTGACCTCCGGGTCTTGGACC
AATGCCACACTTACTGCCGTAGTTCAGGACCATACTACGGAATTGGTTAGCCGCT
ATAAGGGACAAGTGTACGCCTGGGATGTAATCAATATGTGCGACGACTTACAATG
GTGTCATCTAGAGCCCTTCAATGACGACGGTACTTACCGCTCGGATGTCTTCTAC
AACACCATCGGCCAGCATAACATTCCCATCGCCCTGCGCGCAGCCAGAGCCGCC
GACCCTAATGCCAAGCTCTACTCCAAGGCGACAGCTATGCTGAACCTCGTGGAG
AGTCTTAAGGCAGAGGGCGTTCCCATCGACGGTGTGGTCTGCAGTCCCACTTCA
TCGTCCGGCGAAGTCCCCACCTCGCTTCAAGTCCATCATGGAGCAGTTCACCGCGCT
CGGCGTCGAGGTCGCCATCACCGAGCTGGACATCCGCATGACCCTCCCCGAAAC
TGCTGCCCTCCTGGAGCAGCAGAAGACCGATTATGACACTGTCATCTCTGCATGC
AGGGCCGTCTCCGGCTGCGTTGGCGTCACCGTTTGGGACTTCACTGACAAGTACT
CTTGGGTACCGAGCACCTTCTCCGGTCAGGGTGCCGCGACACCTTACGACTCGG
TAAGGATAGCTAACCTTGTGAAGAAGCCTGCCTACGACGGAATTGTTGCTGGCTG
CGAGTAATGGTGGAGCGCAGTGGAAAGACAAAACACT

> **Xilanasa_hipotética_46499(GTXYL1)**

MISKTFVLLALLPLVQCAPPPTAASSALPTGTSTVALNTAAKAAGKLYMGTATDNGE
LDTAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEPEQGTWWTWNADQIANLAKTNGQLLR
GHNCVWYNQLPSWVTSGSWTNATLTAAVVQDHTTELVSRYKGVYAWDVINMCDL
QWCHLEPFNDGTYRSDVFYNTIGPAYIPIALRAARAADPNKLYSKATAMLNLVESL
KAEGVPIDGVLQSHFIVGEVPTSLQSIMEQFTALGVEVAITELDIRMTLPETAALLEQ
QKTDYDTVISACRAVSGCVGVTWDFTDKYSWVPSTFSGQAATPYDSVRIANLVKK
PAYDGIVAGWQ

> **Gen_xilanasa_138785**

GCCGCAAGCAGTATCGACGGCCCACTCCCAACAGTAGCCGTGACTATGTCCTCCT
GGTTCGCTTTCAGCTTTCTCCTCGGCAACGCGTTGACGGCCTGGGCCTCACCCCT
CGCACGGCAACTGCCACGTCCCGTTTCGAGACGCTGAGGGCAGCAGCGGCAC
CGCGCTACTTTGGTGCAGCTCTGGGTGTCCCCACCTGTTGAATTTACGCATGA
TCCGCTGTTTGATGTGACTGCTGTCTTGCAGTTCAACGGTGCCACGCCGGAAGC
GAGATGAAATGGGCGTACATCGAGCCGGAGCGGAACCAAGTTCAACTTTACTGGT
GGCGACATCGTTGCTGCGTTCTCCGCCGCAACGACTATGTCCTGCGCGGTAC
AATCTCGTCTGGTACCAGGAGCTCGCACCGTGGGTGGAGACCCTGACGGGTGAG
GACCTATGGAACGCTACTGTGAATCACATCACGACTGTGATGACACACTACAAGG
AGAGCTTCAATATCTACGCTTGGGACGTTGTCAACGAGGCTTTCAACGACAACGG
TACCTACGGGAGAACGTTTGGTACACCCAGCTCGGACCGGATTACATCCCGAA
CGCGTACGCCGTAGCCAGATCCGTGAACACGCCGTCTAAGCTGTACATCAACGA
CTACAATACTGAGGGCATCAACAACAAGTCCGATGCACTGCTCGCCGTTGTGCA
GAGCATGAAAGCACATAACTTGGTTGACGGTGTGGCTTCCAATGCCACTTCTTC
GTCGGCGAGCTCCCCCGGACCTCGAGCAGAACTTCGCGCGGTTTGTGGCCGCG
GGCGTCGAGATCGCCGTCACCGAACTCGATATCAGGATGAACCTCCCGCCTTCA

CAGGCTGACATTGAGCAGCAGGCCCGCGACTACGCCACAGTCGTGAATGCATGC
AAAGCACAGGGTGTCTGCCTGCGTTGGGATCACCACCTGGGGTATCACCGACCTT
TACTCATGGATTCCCTCCACGTATCCCGGCGAGGGATATGCCCTGCTCTTCGATG
ACAATTATGTTCCCCACCCGGCATTCAATGCGACTATTCAGGCCTTGCTCGCTTG
AGTGGCGACTTCGTGGGCTATATATGGAGGG

> Xilanasa_hipotética_138785

MSSWFAFSLLGNALTAWASPLARQLPTSPFETLRAAAAPRYFGAALGVPHLLNFTH
DPLFDVTAVLQFNATPENEMKWAYIEPERNQFNFTGGDIVAAFSAAANDYVLRGHNL
VWYQELAPWVETLTGEDLWNATVNHITVMTHYKESFNIAWDVVNEAFNDNGTYRE
NVWYTQLGPDYIPNAYAVARSVNTPSKLYINDYNTEGINNKSDALLAVVQSMKAHNLV
DGVGFQCHFFVGELEPPDLEQNFARFVAAGVEIAVTELDIRMNLPPSQADIEQQARDYA
TVVNACKAQAACVGIITWGITDLYSWIPSTYPGEGYALLFDDNYVPHPAFNATIQAL
LA

> Gen_xilanasa_140289(GTXYL2)

CGAGACAAACAGTATGTCAAGGGACTCGTAGTAACAACACGCCATGTCCTTCAAG
ACTCTCGTGGCCATCCTTTGCCTGGTCCCTGTTGCCTTGGCGCAGCAGCCTGCAT
GGGCCAATGTGGCGGTGAGGGATGGACGGGTGGAACCACCTGCGTCGCTGGG
TACTCATGTGTCGCTCAGAATTCATACTATTCTCAGTGCCTGCCGACAGGCACAG
GCACAGGCAGTGGCACCGTGACCAGTACCTCGGGTGGCAGCAGCCCCAGCGCG
ACTTCGACAACCTCTCAACACCGCAGCGAAGGCGGGCGGAAAGAAGTACTTC
GGTAGCGCGACCGACAATCCTGAATTGTCGGATTCCGCCTACGTCAAGATCCTCT
CGGACAGCACCATGTTCCGGCAAATCACACCCGGGAACAGTATGAAATGGGATG
CCACGGAACTTCCAGGGGAACCTTTACTTTTACCCAGGGTGTCAAATCGCGAA
CCTCGCTAAGGCGAACGGGCAATTACTACGAGGCCATAACTGTGTTTGGCACAA
CCAGCTTCCCAGCTGGGTGACGTCGGGGAACCTCAACGCCGCTACTCTGTCGTC
GATCATCACGACCCACTGCGGGACGGTTGTCGGACATTACAAGGGACAAATGTA
CAGCTGGGATGTTGTGAACGAGCCCTTCAATGATGACGGGACTTTCCGCCAAGA
CGTTTTCTACAACACTCTGGGTGAGGATTACATTTCTATCGCTTTGAATGCCGCGC
GGGCTGCCGACCCCAACGCGAAGCTGTACATCAACGACTACAACATCGAGGGAA
CAGGTGCCAAGTCCACCGCGATGGTCAACCTCGTCAAGAGCCTCAAGGCAGCGA
ACGTGCCATCGACGGTATTGGCGTGAAGCGCATCTCATCGTCGGCCAGGTGC
CGTCCACACTCGAGGCTAACCTCAGGCAATTTACCGCGCTCGGGGTGGAGGTGC
CCATCACGGAGCTCGACATTCGCATGACGCTGCCGGCGACGGATGCGCTCCTCG
CTCAGCAGAAGAAGGATTACCAGACGGTCATTGCGGCGTGCAGGGCTGTCTCAG
GATGCATTGGAGTTACGATCTGGGATTATACCGACAAGTACTCCTGGGTTCCGGC
CACTTTCTCCGGCCAGGGAGCGGCTTTGCCTTGGGACGAGA ACTTCAACAAGAA
GCCCGCTTACGACGGGATTGTCGCTGGCTTTGCGTCCTAGAGGCAGACACTCAA
AGGCGCTTAAGCATCGTACTCAGACGTCTCGAATCTACGACTTTTATGGGACTTGC

> Xilanasa_hipotética_140289(GTXYL2)

MSFKTLVAILCLVPVALAQQPAWAQCGGQGWTTGVAGYSCVAQNSYYSQCLPT
GTGTGSGTVTSTSGGSSPSATSTTPLNTAAKAAGKKYFGSATDNPELSDSAYVKILSD
STMFGQITPGNSMKWDATEPSRGTFTTQGDQIANLAKANGQLLRGHNCVWHNQLP
SWVTSGNFNAATLSSIIITHCGTVVGHYKGMYSWDVVNEPFNDGTFRQDVFYNTL
GQDYISIALNAARAADPNAKLYINDYNIETGAKSTAMVNLVKSLKAANVPIDGIGVQA

HLIVGQVPSTLEANLRQFTALGVEVAITEELDIRMTLPATDALLAQQKKDYQTVIAACRA
VSGCIGVTIWDYTDKYSWVPATFSGQGAALPWDEFNKPAYDGIVAGFAS

> Gen_xilanasa_118998(GH11)

GACCTTGGCTGTCCTCCAGGTGGCCTAGTAATGTTCCCCCGACGAGTGCTCGCGC
CGACTGCATTCTGGCTCGCAGTAGTTGCTGTCAAGTGCCTTGCTACCTCAGATTGC
CGGTTATGACAATTCGAGATATGACAACGTGCGAGTATATTGGGGACAGAATTCA
CACGGCGCCGCTGATTCTCGGATACTGCAGACTATCAGAAGACTCTGTCTGATT
ATTGCCAAGATGATGCCATAGACGTTATCCAGTGGCCTTTGTGAATACCTTCTTC
GGAACGGGGGGCCTGCCTGTACTAAATCTTGCGAATACCTGCAACCCACAGAT
AATGCCACCTTTCCAGGTACCAATTTAGCCAATTGCCAGTCGCTGGCATCGGACA
TCGAGTATTGCCAGTCTAAAGGGAAAGTCGTCACTCTGAGTCTGGGAGGCGCCG
GTGGTTCTGTGGGTTTTACGGACGACAGCCAAGCCACTAGCTTCGCGGACACAAT
CTGGAACCTTTTCTCGGAGGCAGTAGCTCCACTCGGCCCTTCGGTGCAGCTGTT
TTGGACGGGATTGATCTCGACATAGAAGGTGGATCCTCTACCGGATATGCAGCAT
TTGTGAACCAAATACGGTCTACGCTAGCGACGCAAGTAAACCATACTATATTAC
AGCGGCTCCTCAGTGTCCCTATCCTGATGCCTCGCTGGGCGGTGTTCTGAACGG
GCGAATTTGACGCGCTCTATGTTCAATTCTATAATAACGTCTGTGGGCTCCAGA
ACTATCCTGCCGCAATGACTGGAATTTGGAATTTGGGATTACTGGGCGCAAAA
CGTCAGCCCGAATAAGAACGTGAAGATTTTTGTGGTGCTCCCGCCTCTAGTACG
GCTGCAGGCAGAGGATACGTTGACATCGGCACTCTCGAGAATATAGCGATTACT
ATGCGGAAAAGCTTCCCTTCATTTGGTGGCGTTATGTTATGGGACGCGTCACAGG
CATACGCAAATAATCGGTACGACCTTGCAATCAAGACCGCACTGCAAAATGCTG
GGGGAAGTGGGTTTACCTATCCGGCATGCACAGCGCCGGCTTACGTGCCAGGAA
CAGGCTACTCGGGTGGTTCGAACGTACATATCAAGGCTACATCTGGCAGGCCA
AATGGTACTCTTCTCGACACCATCTGCCAACGATAACGGTGATTGGAGCGCAAT
CAACGCCTGCTCCGGAAGCCCAAGTGGGAGTACGTCTAGCACCAAGACATCTAC
AACGAGCACACCCACCACGAAGTCATCCACAACGAGCACATCTACTACTAAGAC
ATCGTCAACAATCACTACTTCATCAACGAGCACCGTGCCTACGTCTACTCCGACG
TCAAGTTCCTGCTCCGGTGTTCGGCATGGTCTAGCAGTGTGCTTATACCGGAG
GGTCCCAAGTGACGTACAATGGACACCTTTGGACTGCTAAATGGTGGACGCAAG
GAGACTCCGGGAGGGAGTCCGGTGTCTGGACGGATAACGGATCATGCATTG
CCAGCAAACGGGCTCTAAACTCTCGATTCTTCCGCCTTTGATAAGCGCGGGGCAC
CTGGATATCTGTCTGTATTCTGTGCTGCAGCATATTCTGTCCAATTTAGCAACAA
TTTTAGCATTCCGGGGTCTATGATTTTGTGAAATAAATTATGATCCATGTATCT
GCATCGGTGGTAAACGTGTTTACAACGGTGAAAGAATAGCTGAAGAGCTATACA
CCAACATATACTGGCATATGCGACAAACGTTATCGCTGATATTCCACCGTACCGG
AA

> Xilanasa_hipotética_118998(GH11)

MFPRRVLAPTAFWLAVVAVSALLPQIAGYDNSRYDNVAVYWGQNSHGAADSSDTAD
YQKTLSSYYCQDDAIDVIPVAFVNTFFGTGGLPVLNLANTCNPTDNATFPGTNLANCQS
LASDIEYCQSKGKVVTLSLGGAGGSVGFDDSDQATSFADTIWNLFLGGSSSTRPFGA
AVLDGIDLDI^EEGGSSTGYAAFVNQIRSYASDASKPYITAAPQCPYPDASLGGVLNAA
NFDVAVYVQFYNNVCGLQNYPAANDWNFGIWDYWAQNVSPNKNVKIFVGAPASSTAA
GRGYVDIGTLENIAITMRKSFPSFGGVMWLDASQAYANNRYDLAIKTALQ^NAGGTGFT
YPACTAPAYVPGTGYSGGSNVTYQGYIWQAKWYSSSTPSANDNGDWSAINACSGSP

SGSTSSTKTSTTSTPTTKSSTTSTSTTKTSSTITTSSTSTVPTSTPTSSSCSGVSAWSSS
VAYTGGSQVTYNGHLWTAKWWTQGDTPGGSAGVWTDNGSCIASKRALNSRFFRL

2. Resultados del secuenciamiento

A continuación se presenta el resultado del secuenciamiento de los plasmidios presentes en cada colonia de bacterias transformadas con pGEM-T Easy/GTXYL1 y pGEM-T Easy/GTXYL2.

2.1. Secuenciamiento del plasmidio de bacterias transformadas con pGEM-T Easy/GTXYL1

> Colonia GTXYL1_B_forward

AAATTACTCCCTATAGGGCGAAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCA
TGGCGGCCGCGGGAATTGATTGAACATGATTTCTAAGACCTTCACCGTTCTCCTT
GCCTTGCTGCCCTTGTGCAATGTGCACCTCCTACTCCCGCCGCCTCTTCGGCTTT
GCCGACTGGTACATCTACCGTCGCCCTCAATACTGCGGCGAAGGCGGCAGGGAA
ACTGTACATGGGTAAGTACTGCCACCGACAACGGGGAGCTTACTGACACCGCTTACAC
CACTATCCTGGACAACAATGCAAATTTGGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCATG
AAATGGGAAAATACAGAGCCGGAGCAGGGAAACATGGACCTGGACGAACGCTGA
CCAGATCGCCAACCTCGCGAAGACCAATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCACAACCTG
TGTCTGGTACAACCAGCTCCCCAGCTGGGTGACCTCCGGGTCTTGGACCAATGC
CACACTTACTGCAGTAGTTCAGGACCATACTACGGAATTGGTTAGCCGCTATAAG
GGACAAGTTTATGCCTGGGATGTAATCAATGAGCCCTTCAATGACGACGGTACTT
ACCGCTCGGATGTCTTCTACAACACCATCGGCCAGCATAACATTCCCATCGCCCT
GCGCGCAGCCAGAGCCGCCGACCCTAATGCCAAGCTCTACATCAACGAGTACAA
CATTGAGTACACGGGTTCCAAGGCGACAGCTATGCTGAACCTCGTGGAGAGTCTT
AAGGCAGAGGGCGTTCCCATCGACGGCGTTGGTCTGCAGTCCCACCTTCACTGAC
AAGTACTCTTGGGTACCGAGCACCTTCTCCGGTCAGGGTGCCGCGACACCTTAC
GACTCGAACCTTGTGAAGAAGCCTGCCTACGACGGAATTGTTGCTGGCTGGCAG
TAATGGTGGAGCGCAGTGGAAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTC
GACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTG
TCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTA
TCGGCTCACAATTCCCAACATACAAACCGGA

> Colonia GTXYL1_B_reverse (complementaria)

CTTTTTCGTTATTACCCAGCTGGCAAAGGGGGATTTTCTCCAAGGCGATTAAGTT
GGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATT
GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGC
CATGGCGGCCGCGGGAATTTGATTGAACATGATTTCTAAGACCTTCACCGTTCTC
CTTGCTTGCTGCCCTTGTGCAATGTGCACCTCCTACTCCCGCCGCCTCTTCGG
CTTTGCCGACTGGTACATCTACCGTCGCCCTCAATACTGCGGCGAAGGCGGCAG
GGAAACTGTACATGGGTAAGTACTGCCACCGACAACGGGGAGCTTACTGACACCGCTT
ACACCACTATCCTGGACAACAATGCAAATTTGGCCAGATCACCCCTGCGAACG
CCATGAAATGGGAAAATACAGAGCCGGAGCAGGGAAACATGGACCTGGACGAAC
GCTGACCAGATCGCCAACCTCGCGAAGACCAATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCAC
AACTGTGTCTGGTACAACCAGCTCCCCAGCTGGGTGACCTCCGGGTCTTGGACC
AATGCCCACTTACTGCAGTAGTTCAGGACCATACTACGGAATTGGTTAGCCGCT

ATAAGGGACAAGTTTATGCCTGGGATGTAATCAATGAGCCCTTCAATGACGACGG
TACTTACCGCTCGGATGTCTTCTACAACACCATCGGCCAGCATAATTCCCATC
GCCCTGCGCGCAGCCAGAGCCGCCGACCCTAATGCCAAGCTCTACATCAACGAG
TACAACATTGAGTACACGGGTTCCAAGGCGACAGCTATGCTGAACCTCGTGGAG
AGTCTTAAGGCAGAGGGCGTTCCCATCGACGGCGTTGGTCTGCAGTCCCCTTCA
CTGACAAGTACTCTTGGGTACCGAGCACCTTCTCCGGTCAGGGTGCCGCGACAC
CTTACGACTCGAACCTTGTGAAGAAGCCTGCCTACGACGGAATTGTTGCTGGCTG
GCAGTAATGGTGGAGCGCAGTGGAAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCA
GGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTAT
AGTGTCACCTAAATAGCTGGCGTAATTCATGTAATTTTT

> Colonia GTXYL1_C_forward

TGGGAAAATCATATAGGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCA
TGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGATCATGATTTCTAAGACCTTCGCCGTTCTCCTT
GCCTTGCTGCCCTTGTGCAATGTGCACCTCCTACTCCCGCCGCTCTTCGGCTTT
GCCGACTGGTACATCTACCGTCGCCCTCAATACTGCGGCCGAAGGCGGCACGGAAA
CTGTACATGGGTACTGCCACCGAGGACGGGGAGCTTACTGACACCGCTTACACCA
GTATCCTGCACAACAATGCACACTTTGGCCAGATCACCCCTGCAAACGCCATGAAT
TGGTAAAGTACAGAGCCGGAGAAGGGAACATGCACCTGGAGAACCGATGACCAA
TCTCCACCTCACGAAAACCACTGGGCCGCTCCTGAGAGGCCACAACCTGTGGCTG
GTCCCACAGCTGCCACGCTGGATCACCTCGGGGTCTCGGACCAATGACGCAATG
ACAGCTCTAGGACAGCCGCTACAACGGAATTGGCTAGACGATCCAGTGGATAAG
TTCATGGCTGAAATGTAAACCATCAGCACTGCAGTTATCACCGGACTTACCGCACG
GATGTCTACCACAACCCGATCAACACACAAAAAGTACCCATCGCCGAGGGCGCGA
ACAAAGCCGCCGACTCCAGTGACCACCTCGACGTCAACAAGGTAAACAATGAAGA
CACTGCCTTCAATGCGAGTGCTATTCTGAACCACATGGATACTCTTAGGGCAGACG
GCGTGAACAGCTACGGCGCTGGACGGGCGACCCGACTTCACCCACCGACACGAT
CACCCCGCACCTAACCCATCCGGCGAGATATGTCTCCGCTCACCATCCCGGTG
GACTCAACTAAGTGGCACTCCGGTGGACCCTCCGCAAAAGGGCTGGCCATGTGAA
GAAAATTAGAAGGACTATCAACCTGGAATTCGGTGGCCAAGGCCCATACCGCTGA
ATTAA

> Colonia GTXYL1_C_reverse (complementaria)

GGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCATGAAATGGGAAAATACAGAGCCGGAGCA
GGGAACATGGACCTGGACGAACGCTGACCAGATCGCCAGCCTCGCGAAGACCA
ATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCACAACCTGTGTCTGGTACAACCAGCTCCCCAGCT
GGGTGACCTCCGGTCTTGGACCAATGCCACACTTACTGCAGTAGTTCAGGACC
ATACTACGGAATTGGTTAGCCGCTATAAGGGACAAGTTTATGCCTGGGATGTAAT
CAATGAGCCCTTCAATGACGACGGTACTTACCGCTCGGATGTCTTCTACAACACC
ATCGGCCAGCATAATTCCATCGCCCTGCGCGCAGCCAGAGCCGCCGACCCT
AATGCCAAGCTCTACATCAACGAGTACAACATTGAGTACACGGGTTCCAAGGCG
ACAGCTATGCTGAACCTCGTGGAGAGTCTTAAGGCAGAGGGCATTCCCATCGAC
GGCGTTGGTCTGCAGTCCCCTTTCATCGTCGGCGAAGTCCCACCTCGCTTCAGT
CCATCATGGAGCAGTTCACCGCGCTCGGCGTCGAGGTCGCCATCACCGAGCTGG
ACATCCGCATGACCCTCCCCGAAACTGCTGCCCTCCTGGAGCAGCAGAAGACCG
ATTATGACACTGTCATCTCTGCATGCAGGGCCGTCTCCGGCTGCGTTGGCGTCAC
CGTTTGGGACTTCACTGACAAGTACTCTTGGGTACCGAGCACCTTCTCCGGTCAG
GGTGCCGCGACACCTTACGACTCGAACCTTGTGAAGAAGCCTGCCTACGACGGA

ATTGTTGCTGGCTGGCAGTAATGGTGGAGCGCAGTGGAAAAATCACTAGTGAATTC
CGGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAG
CTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTGGTGTATACTGTCATTTTT

> Colonia GTXYL1_D_forward

GGGATACATCCTTATAGGGCGAAATTGGGCCCCGACGTGCGCATGCTCCCGGCCGCC
ATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGAAC**ATGATTTCTAAGACCTTCACCGTTCTCT**
TGCCTTGCTGCCCTTGTGCAATGTGCACCTCCTACTCCCGCCGCCTCTTCGGCTT
TGCCGACTGGTACATCTACCGTCGCCCTCAATACTGCGGCGAAGGCGGCAGGGA
AACTGTACATGGGTACTGCCACCGACAACGGGGAGCTTACTGACACCGCTTACA
CCACTATCCTGGACAACAATGCAAACCTTTGGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCAT
GAAATGGGAAAATACAGAGCCGGAGCAGGGAACATGGACCTGGACGAACGCTG
ACCAGATCGCCAACCTCGCGAAGACCAATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCACAAC
GTGTCTGGTACAACCAGCTCCCCAGCTGGGTGACCTCCGGGTCTTGGACCAATG
CCACACTTACTGCAGTAGTTCAGGACCATACTACGGAATTGGTTAGCCGCTATAA
GGGACAAGTTTATGCCTGGGATGTAATCAATGAGCCCTTCAATGACGACGGTACT
TACCGCTCGGATGTCTTCTACAACACCATCGGCCAGCATAATTCCCATCGCCC
TGCGCGCAGCCAGAGCCGCCGACCCTAATGCCAAGCTCTACATCAACGAGTACA
ACATTGAGTACACGGGTTCCAAGGCGACAGCTATGCTGAACCTCGTGGAGAGTC
TTAAGGCAGAGGGCGTTCCCATCGACGGCGTTGGTCTGCAGTCCCACTTCATCGT
CGGCGAAGTCCCACCTCGCTTCAGTCCATCATGGAGCAGTTCACCGCGCTCGG
CGTCGAGGTCGCCATCACCGAGTTGGACATCCGCATGACCCTCCCCGAAACTGC
TGCCCTCCTGGAGCAGCAGAAGACCGATTACGACACTGTCATCTCTGCATGCAG
GGCCGTCTCCGGCTGCGTTGGCGTCACCGTGTGGGACTTCACTGACAAGTACTCT
TGGGTACCGAGCACCTTCTCCGGTCAGGGTGCCGCGACACCTTACGACTCGAAC
CTTGTGAAGAAGCCTGCCTACGACGGAATTGT

> Colonia GTXYL1_D_reverse (complementaria)

CTTTCCCGTTTCTCTTGCTTGCCCTTGTGCAATGGCCCCCTCCTACTCCCGC
CGCTTTTTCGGCTTGGCCGACTGGTACATCTACCGTCGCCCTCAATACTGCGGCG
AAGGCGGCAGGGAAACTGTACATGGGTACTGCCACCGACAACGGGGAGCTTACT
GACACCGCTTACACCACTATCCTGGACAACAATGCAAACCTTTGGCCAGATCACCC
CTGCGAACGCCATGAAATGGGAAAATACAGAGCCGGAGCAGGGAACATGGACC
TGGACGAACGCTGACCAGATCGCCAACCTCGCGAAGACCAATGGCCAGCTCCTG
AGAGGCCACAACCTGTGTCTGGTACAACCAGCTCCCCAGCTGGGTGACCTCCGGG
TCTTGGACCAATGCCACACTTACTGCAGTAGTTCAGGACCATACTACGGAATTGG
TTAGCCGCTATAAGGGACAAGTTTATGCCTGGGATGTAATCAATGAGCCCTTCAA
TGACGACGGTACTTACCGCTCGGATGTCTTCTACAACACCATCGGCCAGCATAAC
ATTCCCATCGCCCTGCGCGCAGCCAGAGCCGCCGACCCTAATGCCAAGCTCTAC
ATCAACGAGTACAACATTGAGTACACGGGTTCCAAGGCGACAGCTATGCTGAAC
CTCGTGGAGAGTCTTAAGGCAGAGGGCGTTCCCATCGACGGCGTTGGTCTGCAG
TCCCACTTCATCGTCGGCGAAGTCCCACCTCGCTTCAGTCCATCATGGAGCAGT
TCACCGCGCTCGGCGTCGAGGTCGCCATCACCGAGTTGGACATCCGCATGACCC
TCCCCGAAACTGCTGCCCTCCTGGAGCAGCAGAAGACCGATTACGACACTGTCA
TCTCTGCATGCAGGGCCGTCTCCGGCTGCGTTGGCGTCACCGTGTGGGACTTCAC
TGACAAGTACTCTTGGGTACCGAGCACCTTCTCCGGTCAGGGTGCCGCGACACC
TTACGACTCGAACCTTGTGAAGAAGCCTGCCTACGACGGAATTGTTGCTGGCTGG
CAGTAATGGTGGAGCGCAGTGGAAAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAG

GTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATA
GTTACCTAAATAGCTGGCGTAATTCATGTCATTTTTT

> Colonia GTXYL1_E_forward (complementaria)

TGCCCACTTTTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGC
CTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCC
TTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC
CGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA
GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
GCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCG
GGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGG
CTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT
TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATA
GAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGC
AGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTGAACATGATTCTAAGACCTTCACCGGTTT
TCTCCGCCTCGATGTTACCGGCCTGACCGTCTGCGCTATTCCCCTCCTCTAGGAC
CTTCTCACTTACTCCACTACCCGACTTCGCGCATCTTTTTCTGCCTCAGGAGTTCCT
CGGCTGCTTTCTTCAATTCATCGTCATCCGCCCTTTCAACTCGTGCTGCTGTATG
AGGAAGACGGCAGCGAGCGTTGCGATGATCGTATACGCGACCGTAAGATAGAAC
ACCCGCGTGAACCCCTTCGAATATCCCGCAACTATAGCGCTTCGGTCAGCGTCAC
TTAGCTGTATCGTGATGTGGAGTATGAATTGGCATTGATGATCGTGGGATCGTT
GAGAATAGCGGAAAGTTGGTCACTCGACAGGTTGAGAGGCTGCAGGGCGGTCC
GGAGAGTATTGTTGATGATGGTGGCACAGATAGCGAGCGTGAATGGTGGAGCGCA
GTGGAAAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCCG
GGCCAATTCGCCCTATAGGGAGTAATCC

> Colonia GTXYL1_E_reverse

CAAAATTACATGAATTACGCCAGCTATTTAGGTGAACTATAGAATACTCAAGCTATG
CATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATT
CACTAGTGATTGAACATGATTCTAAGACCTTCACCGGTTTTCTCCGCCTCGATGT
TACCGGCCTGACCGTCTGCGCTATTCCCCTCCTCTAGGACCTTCTCACTTACTCCA
CTACCCGACTTCGCGCATCTTTTTCTGCCTCAGGAGTTCCTCGGCTGCTTTCTTCAA
TTCATCGTCATCCGCCCTTTCAACTCGTGCTGCTGTATGAGGAAGACGGCAGCG
AGCGTTGCGATGATCGTATACGCGACCGTAAGATAGAACACCCGCGTGAACCCC
TTCGAATATCCCGCAACTATAGCGCTTCGGTCAGCGTCACTTAGCTGTATCGTGG
ATGTGGAGTATGAATTGGCATTGATGATCGTGGGATCGTTGAGAATAGCGGAAAG
TTGGTCACTCGACAGGTTGAGAGGCTGCAGGGCGGTCCGGAGAGTATTGTTGAT
GATGGTGGCACAGATAGCGAGCGTGAATGGTGGAGCGCAGTGGAAAATCGAATT
CCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCCGGCCCAATTCGCCCTA
TAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAA
ACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGG
CGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGA
ATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGT
TACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCT
TTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCG
GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAC
TGATTAGGGTGTGTTACAGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCC

TTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACCTGGAACACAC
TCAACCCTATTCCGGGCTATTCTTT

> **Colonia GTXYL1_F_forward**

GGGCTACTCCTTATAGGGCGAAATTGGGCCCGACGTGCGCATGCTCCC GGCCGCCA
TGGCGGCCGCGGGAATTGATTGAACATGATTTCTAAGACCTTCACCGTTCTCCTT
GCCTTGCTGCCCTTGTGCAATGCGCACCTCCTACTCCCGCCGCCTCTTCGGCTT
TGCCGACTGGTACATCTACCGTCGCCCTCAATACTGCGGCGAAGGCGGCAGGGA
AACTGTACATGGGTACTGCCACCGACAACGGGGAGCTTACTGACACCGCTTATA
CCTACTCCTGGACAACAATGCAAACCTTCGGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCA
TGAAATGGGAAAATACAGAGCCGGAGCAGGGAACATGGACCTGGACGAACGCT
GACCAGATCGCCAACCTCGCGAAGACCAATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCACAAC
TGTGTCTGGTACAACCAGCTCCCCAGCTGGGTGACCTCCGGGTCTTGGACCAATG
CCACACTTACTGCAGTAGTTCAGGACCATACTACGGAATTGGTTAGCCGCTATAA
GGGACAAGTTTATGCCTGGGATGTAATCAATGAGCCCTTCAATGACGACGGTACT
TACCGCTCGGATGTCTTCTACAACACCATCGGCCAGCATACTCAATCACTAG
TGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTCCAACGCGTTGG
ATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTC
ATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAG
CCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACAT
TAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCT
GCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTC
TTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCG
GAATCAGGTCACTCAAAGGCGGTAATACGGGTATCCACAAAATCAGGGGATAAC
GCAGGAAGAACATGTGACCAAAGGCGCGGCAAAGGCCTGAAACGGTAAAAGG
CACGGCTGGTGGGGGTTTTCTTTGGGTCCGCC

> **Colonia GTXYL1_F_reverse (complementaria)**

AAAAACCTTTTTTTCGGGGGGTGGCCCCATTAGTGAACCCTCCCCCTAAATCAATTTT
TTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCCTTAATTGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATT
TAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGC
GAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAAC
CACCACACCCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTGCCATTC
AGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCC
AGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTT
TTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTAT
AGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGA
ATTCGATTGAACATGATTTCTAAGACCTTCACCGTTCTCCTTGCTGCCCTT
GTGCAATGCGCACCTCCTACTCCCGCCGCCTCTTCGGCTTTGCCGACTGGTACAT
CTACCGTCGCCCTCAATACTGCGGCGAAGGCGGCAGGGAAACTGTACATGGGTA
CTGCCACCGACAACGGGGAGCTTACTGACACCGCTTATACCACTATCCTGGACA
ACAATGCAAACCTTCGGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCATGAAATGGGAAAATA
CAGAGCCGGAGCAGGGAACATGGACCTGGACGAACGCTGACCAGATCGCCAAC
CTCGCGAAGACCAATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCACAACCTGTGTCTGGTACAAC
CAGCTCCCCAGCTGGGTGACCTCCGGGTCTTGGACCAATGCCACACTTACTGCA
GTAGTTCAGGACCATACTACGGAATTGGTTAGCCGCTATAAGGGACAAGTTTATG
CCTGGGATGTAATCAATGAGCCCTTCAATGACGACGGTACTTACCGCTCGGATGT
CTTCTACAACACCATCGGCCAGCATACTCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCG

CCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAG
TATTCTATAGTTCACCTAAATAGCTGGCGTAATCCATGTTCAATTTG

2.2. Resumen de clones GTXYL1

> Gen GTXYL1_B

GAACATGATTTCTAAGACCTTACCGTTCTCCTTGCCTTGCTGCCCTTGTGCAAT
GTGCACCTCCTACTCCCGCCGCCTCTTCGGCTTTGCCGACTGGTACATCTACCGT
CGCCCTCAATACTGCGGCGAAGGCGGCAGGGAACTGTACATGGGTACTGCCAC
CGACAACGGGGAGCTTACTGACACCGCTTACACCACTATCCTGGACAACAATGC
AACTTTGGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCATGAAATGGGAAAATACAGAGCC
GGAGCAGGGAACATGGACCTGGACGAACGCTGACCAGATCGCCAACCTCGCGA
AGACCAATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCACAACCTGTGTCTGGTACAACCAGCTCC
CCAGCTGGGTGACCTCCGGGTCTTGGACCAATGCCACACTTACTGCAGTAGTTCA
GGACCATACTACGGAATTGGTTAGCCGCTATAAGGGACAAGTTTATGCCTGGGAT
GTAATCAATGAGCCCTTCAATGACGACGGTACTTACCGCTCGGATGTCTTCTACA
ACACCATCGGCCAGCATAACATTCCCATCGCCCTGCGCGCAGCCAGAGCCGCCG
ACCCTAATGCCAAGCTCTACATCAACGAGTACAACATTGAGTACACGGGTTCCAA
GGCGACAGCTATGCTGAACCTCGTGGAGAGTCTTAAGGCAGAGGGCGTTCCCAT
CGACGGCGTTGGTCTGCAGTCCCCTTCACTGACAAGTACTCTTGGGTACCGAGC
ACCTTCTCCGGTCAGGGTGCCGCGACACCTTACGACTCGAACCTTGTGAAGAAG
CCTGCCTACGACGGAATTGTTGCTGGCTGGCAGTAATGGTGGAGCGCAGTGGAA

A

> Traducción GTXYL1_B

MISKTFVLLALLPLVQCAPPPTPAASSALPTGTSTVALNTAAKAAGKLYMGTATDNGELT
DTAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEPEQGTWWTWNADQIANLAKTNGQLLRGHN
CVWYNQLPSWVTSGSWTNATLTAVVQDHTTELVSRYKGQVYAWDVINEPFNDGTY
RSDVFYNTIGPAYIPIALRAARAADPNKLYINEYNIETGSKATAMLNLVESLKAEGVPI
DGVGLQSHFTDKYSWVPSTFSGQGAATPYDSNLVKKPAYDGIVAGWQ

> Gen GTXYL1_C

GGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCATGAAATGGGAAAATACAGAGCCGGAGCA
GGGAACATGGACCTGGACGAACGCTGACCAGATCGCCAGCCTCGCGAAGACCA
ATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCACAACCTGTGTCTGGTACAACCAGCTCCCCAGCT
GGGTGACCTCCGGGTCTTGGACCAATGCCACACTTACTGCAGTAGTTCAGGACC
ATACTACGGAATTGGTTAGCCGCTATAAGGGACAAGTTTATGCCTGGGATGTAAT
CAATGAGCCCTTCAATGACGACGGTACTTACCGCTCGGATGTCTTCTACAACACC
ATCGGCCAGCATAACATTCCCATCGCCCTGCGCGCAGCCAGAGCCGCCGACCCT
AATGCCAAGCTCTACATCAACGAGTACAACATTGAGTACACGGGTTCCAAAGGCG
ACAGCTATGCTGAACCTCGTGGAGAGTCTTAAGGCAGAGGGCATTCCCATCGAC
GGCGTTGGTCTGCAGTCCCCTTCACTCGTGGCGAAGTCCCACCTCGCTTCAGT
CCATCATGGAGCAGTTCACCGCGCTCGGCGTGCAGGTCGCCATCACCGAGCTGG
ACATCCGCATGACCCTCCCCGAACTGCTGCCCTCCTGGAGCAGCAGAAGACCG
ATTATGACACTGTCATCTCTGCATGCAGGGCCGTCTCCGGCTGCGTTGGCGTCAC
CGTTTGGGACTTCACTGACAAGTACTCTTGGGTACCGAGCACCTTCTCCGGTCAG
GGTGCCGCGACACCTTACGACTCGAACCTTGTGAAGAAGCCTGCCTACGACGGA
ATTGTTGCTGGCTGGCAGTAATGGTGGAGCGCAGTGGAAA

> Traducción GTXYL1_C

MKWENTEPEQGTWTWTNADQIASLAKTNGQLLRGHNCVWYNQLPSWVTSGSWTNA
TLTAVVQDHTTELVSRYKQVYAWDVINEPFNDGTYRSDVFYNTIGPAYIPIALRAAR
AADPNAKLYINEYNIETGSKATAMLNLVESLKAEGIPIDGVLQSHFIVGEVPTSLQSIM
EQFTALGVEVAITELDIRMTLPETAALLEQQKTDYDTVISACRAVSGCVGVTVWDFTDK
YSWVPSTFSGQGAATPYDSNLVKKPAYDGIVAGWQ

> Gen GTXYL1_D

GAACATGATTTCTAAGACCTTCACCGTTCTCCTTGCTGCCCTTGTGCAAT
GTGCACCTCCTACTCCCGCCGCTCTTCGGCTTTGCCGACTGGTACATCTACCGT
CGCCCTCAATACTGCGGCGAAGGCGGCAGGGAAACTGTACATGGGTACTGCCAC
CGACAACGGGGAGCTTACTGACACCGCTTACACCACTATCCTGGACAACAATGC
AACTTTGGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCATGAAATGGGAAAATACAGAGCC
GGAGCAGGGAACATGGACCTGGACGAACGCTGACCAGATCGCCAACCTCGCGA
AGACCAATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCACAACCTGTGTCTGGTACAACCAGCTCC
CCAGCTGGGTGACCTCCGGGTCTTGACCAATGCCACACTTACTGCAGTAGTTCA
GGACCATACTACGGAATTGGTTAGCCGCTATAAGGGACAAGTTTATGCCTGGGAT
GTAATCAATGAGCCCTTCAATGACGACGGTACTTACCGCTCGGATGTCTTCTACA
ACACCATCGGCCAGCATAACATTCCCATCGCCCTGCGCGCAGCCAGAGCCGCCG
ACCCTAATGCCAAGCTCTACATCAACGAGTACAACATTGAGTACACGGGTCCAA
GGCGACAGCTATGCTGAACCTCGTGGAGAGTCTTAAGGCAGAGGGCGTTCCCAT
CGACGGCGTTGGTCTGCAGTCCCCTTCATCGTCCGCGAAGTCCCCACCTCGCTT
CAGTCCATCATGGAGCAGTTCACCGCGCTCGGCGTCGAGGTCGCCATCACCGAG
TTGGACATCCGCATGACCCTCCCCGAACTGCTGCCCTCCTGGAGCAGCAGAAG
ACCGATTACGACACTGTCATCTCTGCATGCAGGGCCGTCTCCGGCTGCGTTGGCG
TCACCGTGTGGGACTTCACTGACAAGTACTCTTGGGTACCGAGCACCTTCTCCGG
TCAGGGTGCCGCGACACCTTACGACTCGAACCTTGTGAAGAAGCCTGCCTACGA
CGGAATTGTTGCTGGCTGGCAGTAATGGTGGAGCGCAGTGGAAA

> Traducción GTXYL1_D

MISKTFVLLALLPLVQCAPPPTPAASSALPTGTSTVALNTAAKAAGKLYMGTATDNGELT
DTAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEPEQGTWTWTNADQIANLAKTNGQLLRGHN
CVWYNQLPSWVTSGSWTNA TLTAVVQDHTTELVSRYKQVYAWDVINEPFNDGTY
RSDVFYNTIGPAYIPIALRAARAADPNAKLYINEYNIETGSKATAMLNLVESLKAEGVPI
DGVGLQSHFIVGEVPTSLQSIMEQFTALGVEVAITELDIRMTLPETAALLEQQKTDYDTVI
SACRAVSGCVGVTVWDFTDKYSWVPSTFSGQGAATPYDSNLVKKPAYDGIVAGWQ

> Gen GTXYL1_E

GAACATGATTTCTAAGACCTTCACCGTTTTCTCCGCCTCGATGTTACCGGCCTGA
CCGTCTGCGCTATTCCTCCTCTAGGACCTTCTCACTTACTCCACTACCGACTT
CCGCATCTTTTTCTGCCTCAGGAGTTCCTCGGCTGCTTTCTTCAATTCATCGTCAT
CCGCCCTCTTCAACTCGTGCTGCTGTATGAGGAAGACGGCAGCGAGCGTTGCGA
TGATCGTATACGCGACCGTAAGATAGAACACCCGCGTGAACCCCTTCGAATATCC
CGCAACTATAGCGCTTCGGTCAGCGTCACTTAGCTGTATCGTGGATGTGGAGTAT
GAATTGGCATTGATGATCGTGGGATCGTTGAGAATAGCGGAAAGTTGGTCACTCG
ACAGGTTGAGAGGCTGCAGGGCGGTCCGGAGAGTATTGTTGATGATGGTGGCAC
AGATAGCGAGCGTGATGGTGGAGCGCAGTGGAAA

> Traducción GTXYL1_E
MISKFTGFLRLDVTGLTVCAIPLL

> Gen GTXYL1_F

GAACATGATTTCTAAGACCTTACCGTTCTCCTTGCCTTGCTGCCCTTGTGCAAT
GCGCACCTCCTACTCCCGCCGCCTCTTCGGCTTTGCCGACTGGTACATCTACCGT
CGCCCTCAATACTGCGGGCAAGGCCGGCAGGGAAACTGTACATGGGTACTGCCAC
CGACAACGGGGAGCTTACTGACACCGCTTATACCACTATCCTGGACAACAATGC
AAACTTCGGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCATGAAATGGGAAAATACAGAGCC
GGAGCAGGGAACATGGACCTGGACGAACGCTGACCAGATGCCAACCTCGCGA
AGACCAATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCACAACCTGTGTCTGGTACAACCAGCTCC
CCAGCTGGGTGACCTCCGGGTCTTGGACCAATGCCACACTTACTGCAGTAGTTCA
GGACCATACTACGGAATTGGTTAGCCGCTATAAGGGACAAGTTTATGCCTGGGAT
GTAATCAATGAGCCCTTCAATGACGACGGTACTTACCGCTCGGATGTCTTCTACA
ACACCATCGGCCAGCATAATTC

> Traducción GTXYL1_F

MISKFTVLLALLPLVQCAPPTPAASSALPTGTSTVALNNTAAKAAGKLYMGTATDNGELT
DTAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEPEQGTWTWTNADQIANLAKTNGQLLRGHN
CVWYNQLPSWVTSGSWTNATLTAVVQDHTTELVSRYKGQVYAWDVINEPFNDGTY
RSDVFYNTIGPAYI

2.3. Secuenciamiento del plasmidio de colonias transformadas con pGEM-T Easy/GTXYL2

> Colonia GTXYL2_A_forward

ATAATATAGGAAGGATAGTATAAGGGCGAATTGCGGCCCGACGACGCATGCTCCC
GGGCGCCATGGCGGCCGCGGGAAGCGACTTTTAGGATTATTGGTCCCTCCATCTTC
TCCCTGCACTACTTGCTATACCGTTCGTGGACGTTGCGCAGCCAAAGCCACGGAGA
GTGACTGGCCATATCTCTGTACATGACCCGACGAT

> Colonia GTXYL2_A_reverse

AAAAACAATAACATTAATACGCCAGCTATTTAGGAGACCTATAGAATACTCGAGC
TATGCATCCAACGCGTTGCCAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCCGGCCGCT
AATTCAGTAGTGATTGAGGGTATGATCGGCCGATGGCGATCTGGTTGATGACAAAA
GGTGATTAGTGCCATTTTATGACCGTCTCAT

> Colonia GTXYL2_B_forward

AAGAAAAAAGTAAAATAGTTAAGGGTGATGGCCGACGGCGACGCATGCGCCCGGC
CGCCATGGCGGCCCGCTGGGAAGACCCCTTTACGAGATGAATGGTACGACCGTC
TACTCTATATGTTGTACCCATATATGACCGTCGTGTCGTCGGGTGCGTAGCTAACTGC
CCGAGAGAGAGTGTGGTCCTATCTCTATTCCACACGACCCGAC

> Colonia GTXYL2_B_reverse

AACAATTGACATGGATTACGCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTA
TGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCCGGCCGCGAA
TTCAGTAGTATTTTGGCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACA
AAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATT

TTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATCAGGTGGCACTTTTCGGGG
AAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
CTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATG
AGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCCT
GTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGG
TGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTT
TTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCG
CGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCGCCATACACTAT
TCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGG
CATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGG
CCAACCTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAC
AACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAG
CCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTT
GCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGA
CTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCT
GGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCAT
TGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGAAGTATCTACACGACGG
GGAGTCAGGCACTATT

> Colonia GTXYL2_C_forward

CTTACTCCTGTAGGGGCGAAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCTGC
AGGTGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTA
TAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTAAAT
TGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGC
CTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCG
CTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGC
GGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCG
CTGCGCTCGGTGCTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAA
TACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGG
CCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG
CTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA
ACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCG
CTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGG
GAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGGTGTAGGT
GTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCG
CCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCA
CTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA
CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGT
ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATC
CGGCAAAACAACCACCGCTGGTAGCGGGGGTTTTTTTTGTTTGAAGCACCAAATT
ACCCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGAACCTTTGATCTTTTCTCCGGGGCTGAA
CCTCATTGGAACAAAAATTCCCTTAAGGGAA

> Colonia GTXYL2_C_reverse

CGAAATGAACATGGATTACGCCAGCTATTTAGGTGAACTATAGAATACTCAAGCTAT
GCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGGAG
CATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCC
GTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCT

TGCAGCACATCCCCCTTTGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGAT
CGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGG
CGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC
AGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGC
CGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTG
CTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGG
CCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAAT
AGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTT
GATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAA
CAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTA
TTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATCAGGTGGCACTTTTCGG
GGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATC
CGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTA
TGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTC
CTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTG
GGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGA
GTTTTCCCCCAAGAAAGTTTTCCAAGAAGAAGCCTTTTAAATCTGCTATTGGGCG
CGGGTATATCCCCTATTTACCCCGGCA

> Colonia GTXYL2_D_forward

GACATACTACCTATAGGGCGAAATTGGGCCCGACGTGCGCATGCTCCCGGCCGCCA
TGGCGGCCGCTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCAT
AGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG
TTCTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGC
ATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT
GCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAA
TCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTC
GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAC
TCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAT
GTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGC
GTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTC
AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAG
CTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCT
TTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGT
TCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGC
CCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG
TAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGA
ACAGTATTTGGGATCTGCGCTCTGCTGAAACCAGTTACCTTCGGAAAAAAGATTG
GTAGGTCTTTGTTCCGGCAAAAAACAACCGCTGGTAGCGGGGGTT

> Colonia GTXYL2_D_reverse

AAAAATGAACATGGATTACGCCAGCTATTTAGGTGAACTATAGAATACTCAAGCTAT
GCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCCATG
GCGGCCGGGAGCATGCGACGTCCGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAC
AATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCA
ACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCG

CCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACC
GCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCT
CGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGG
TTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGG
TTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGT
CCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCT
CGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAA
TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAATATTAACGCTTACAATT
TCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACACCCGCATCAGGT
GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACAT
TCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAA
AAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGG
CATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGAAGCTG
AAGAACAATTGGGTGCACCAAAGGGGTTCATCCAAATGGATCTCACACCGGGAAAA
ACCTTGAGAT

> Colonia GTXYL2_E forward

AGATAAATCCCTATAGGGCGAAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCA
TGGCGGCCGCCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCAT
AGCTTGAGTATTCTATAGTGCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG
TTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGC
ATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT
GCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAA
TCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTC
GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAC
TCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAT
GTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGC
GTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTC
AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAG
CTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCT
TTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGT
TCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGC
CCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG
TAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGA
ACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAATTGG
TAGCTCTTGATCCGGCAAACAACACCGCTGGTAA

> Colonia GTXYL2_E reverse

AAAAATTGAACATGAATTACGCCAGCTATTTAGGTGAACTATAGAATACTCAAGCTA
TGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCCAT
GGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGCGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA
CAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCC
AACTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGC
GCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGAC
CGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTC
TCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGG

GTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATG
GTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAG
TCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATC
TCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAA
ATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAAT
TTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATCAGG
TGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACA
TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGA
AAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGG
GCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCT
GAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTA
AGATCCTTGAAA

Anexo F. Cultivos de hongos y manejo de proteínas

Durante el trabajo se prepararon cultivos sólidos en medio PDA como stocks de las distintas especies fúngicas. A partir de éstos se inocularon los medios líquidos y las nuevas placas que se utilizaron a lo largo de la memoria de título. En ellos se ve a simple vista el crecimiento del micelio y es posible identificar si las placas resultaron contaminadas.

Se realizaron un total de 6 cultivos líquidos en distintas fechas, a los que se agregó paja de trigo pre-tratada, para inducir la producción de xilanasas. El pre-tratamiento elimina la lignina presente en el sustrato. Solo tres de los cultivos resultaron relevantes para los estudios, más adelante se detalla las condiciones de cada uno de ellos.

1. Manejo general de proteínas

Como las proteínas en estudio son secretadas por los hongos, se recolectan rescatando el medio extracelular. Se obtiene las enzimas en ausencia de las células fúngicas o de la paja de trigo.

Para concentrar y preservar las proteínas, se precipitan con sulfato de amonio. Al guardarlas por prolongados periodos, se agrega además un inhibidor de proteasas.

Las proteínas fueron separadas a través de variadas técnicas, que comprendieron cromatografías por FPLC, además de técnicas alternativas.

La separación representa el proceso más arduo del trabajo, es necesario un profundo estudio de cada etapa para generar un protocolo que permita una separación eficiente de una determinada proteína. Cada paso se asocia a pérdidas de proteína por lo tanto es necesario utilizar un protocolo eficiente con pocas etapas.

En algunos casos fue necesario eliminar sales presentes en las muestras, debido a que producen problemas para la unión de proteínas a la resina de columnas cromatográficas. La presencia de sulfato de amonio provoca además una inhibición de la actividad enzimática. A través del protocolo de eliminación de sal (Métodos), se logró disminuir la sal a aproximadamente un 6% de su concentración inicial.

A continuación se detalla completamente las características de los tres cultivos líquidos, relevantes para los estudios:

2. Primer cultivo

Se crecieron las especies *T. versicolor* y *G. trabeum*, en 100[ml] del medio de cultivo correspondiente y se agregó una unidad de inóculo. Las proteínas obtenidas fueron usadas para dos cromatografías en el caso de *G. trabeum*: un de intercambio aniónico (Figura 39) y otra de interacción hidrofóbica (Figura 41).

Adicionalmente se cuantificó la cinética de producción enzimática a través de ensayos de actividad del medio extracelular, frente a xilano y CMC.

Las proteínas del cultivo sirvieron para estudiar el desempeño de distintos tipos de separación. La intención era hacer otro cultivo de mayor volumen para utilizar un protocolo de purificación esbozado durante esta etapa.

2.1. Cinética de producción enzimática

La producción de enzimas de *T. versicolor* y *G. trabeum* fueron monitoreadas a través de ensayos de actividad de los medios extracelulares frente a xilano y CMC. Con esto se determinó que los hongos producían efectivamente enzimas involucradas en la degradación de carbohidratos.

La Figura 38 muestra el resultado del monitoreo de la actividad enzimática del primer cultivo en función de los días.

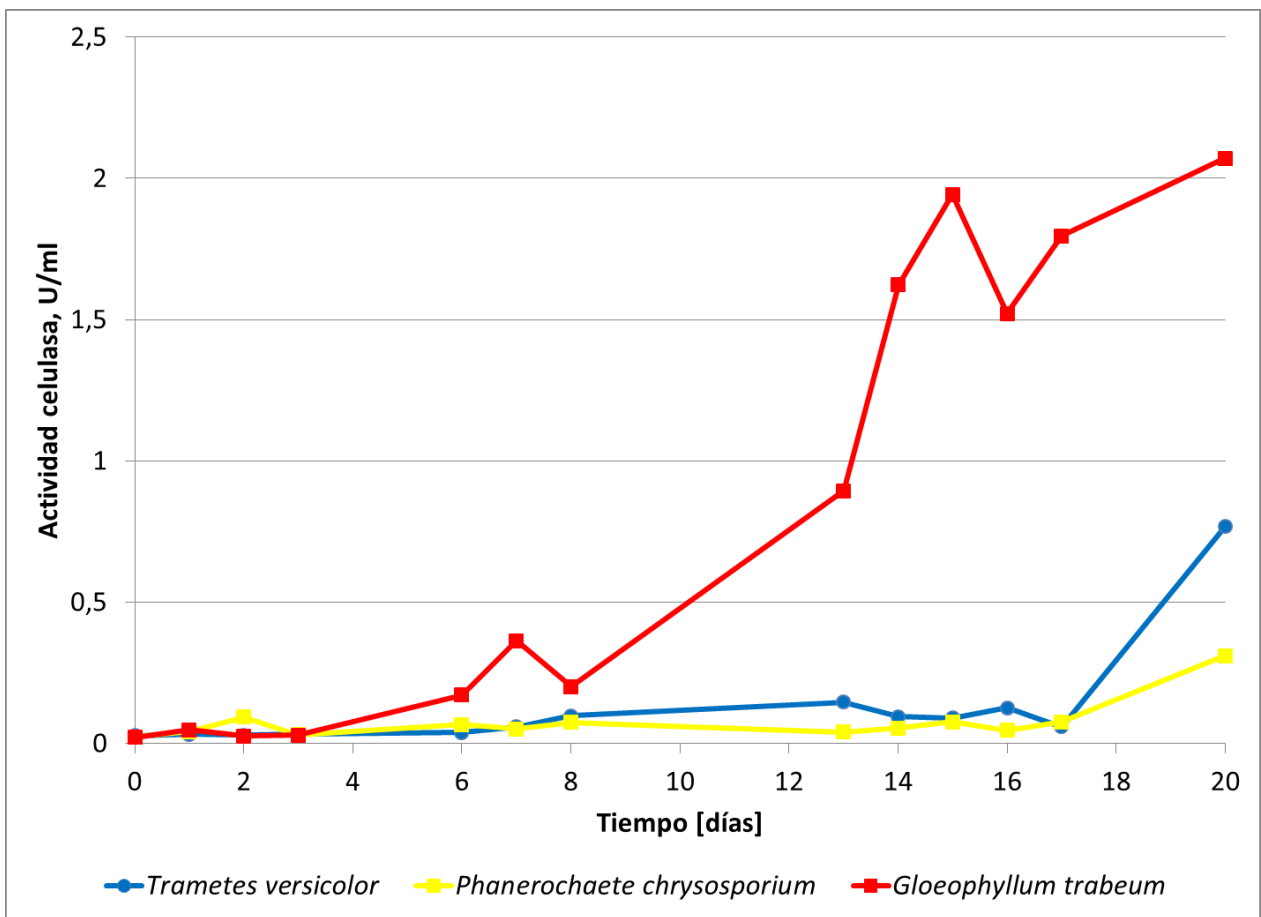


Figura 38. "Cinética de la producción de enzimas del cultivo N°1 de los distintos hongos, para asegurar la secreción de ellas al medio extracelular".

La presencia de enzimas que degradan CMC, puede ser una señal de que se producen otras enzimas que degradan lignocelulosa.

Se observa la mayor actividad el día 20[días] y se destaca que existió un gran aumento entre las actividades de los días 17 y 20 para *T. versicolor*.

2.2. Cromatografía de intercambio aniónico *G. trabeum*

Se cargaron directamente 10[ml] del medio extracelular de *G. trabeum* en una columna Q-sefarosa de 1[ml]. El cromatograma de dicho experimento se muestra en la Figura 39.

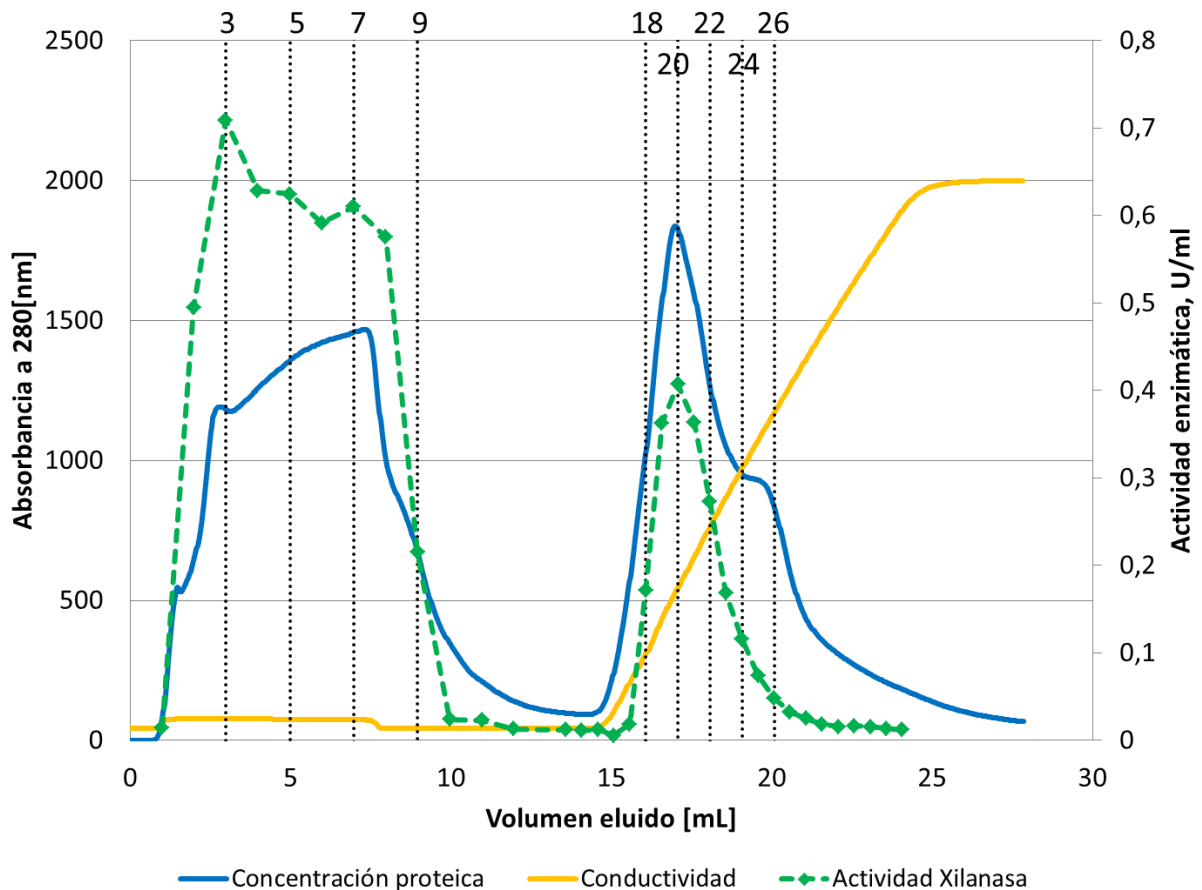


Figura 39. "Cromatografía de intercambio aniónico realizada sobre las proteínas provenientes del primer cultivo de *G.trabeum*. Se utilizó una columna Q-sefarosa de 1[mL]. El protocolo de separación consistió en ambientar la columna con buffer tris 20[mM] a pH 7, cargar la muestra, hacer un lavado con el mismo buffer utilizando tres volúmenes de columna, luego realizar un gradiente lineal de cloruro de sodio hasta alcanzar una concentración 1[M] en 10 volúmenes de columna para eluir las proteínas adheridas a la resina".

Se ve dos picos de actividad xilanasa: el primero en las fracciones que no se une a la resina y el otro en la zona de elución por efecto de la sal. Las proteínas presentes en las fracciones marcadas en la parte superior de la figura fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 12%, al teñir con azul de Coomassie no se observaron bandas. Un mes después se teñió el mismo gel con nitrato de plata, una fotografía del gel teñido de esta manera se muestra en la Figura 40.

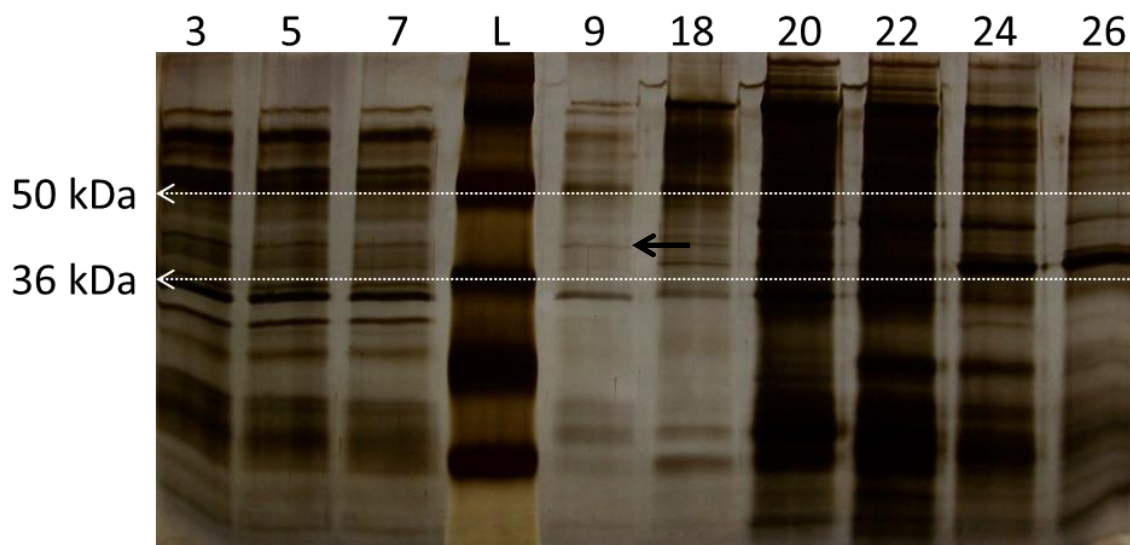


Figura 40. "Gel de poliacrilamida con fracciones de: Cromatografía de intercambio aniónico realizada sobre las proteínas provenientes del primer cultivo de *G.trabeum*".

Se observa una gran cantidad de bandas, mayoritariamente en las fracciones donde las proteínas se adsorben en la columna (18 a la 26). Como las xilanasas tienen un tamaño entre 36 y 50[kDa], el análisis se centra en la zona delimitada por las flechas punteadas. Las fracciones 3, 5, 7 y 9 presentan muchas bandas en el rango estudiado, aun así, se piensa que la banda señalada corresponde a una xilanasas.

2.3. Cromatografía de interacción hidrofóbica *G. trabeum*

Se cargaron directamente 10[ml] del medio extracelular de *G. trabeum* en una columna Butil-sefarosa de 1[ml]. Se agregó previamente sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración final de 1[M]. En la Figura 41 se presenta el cromatograma obtenido.

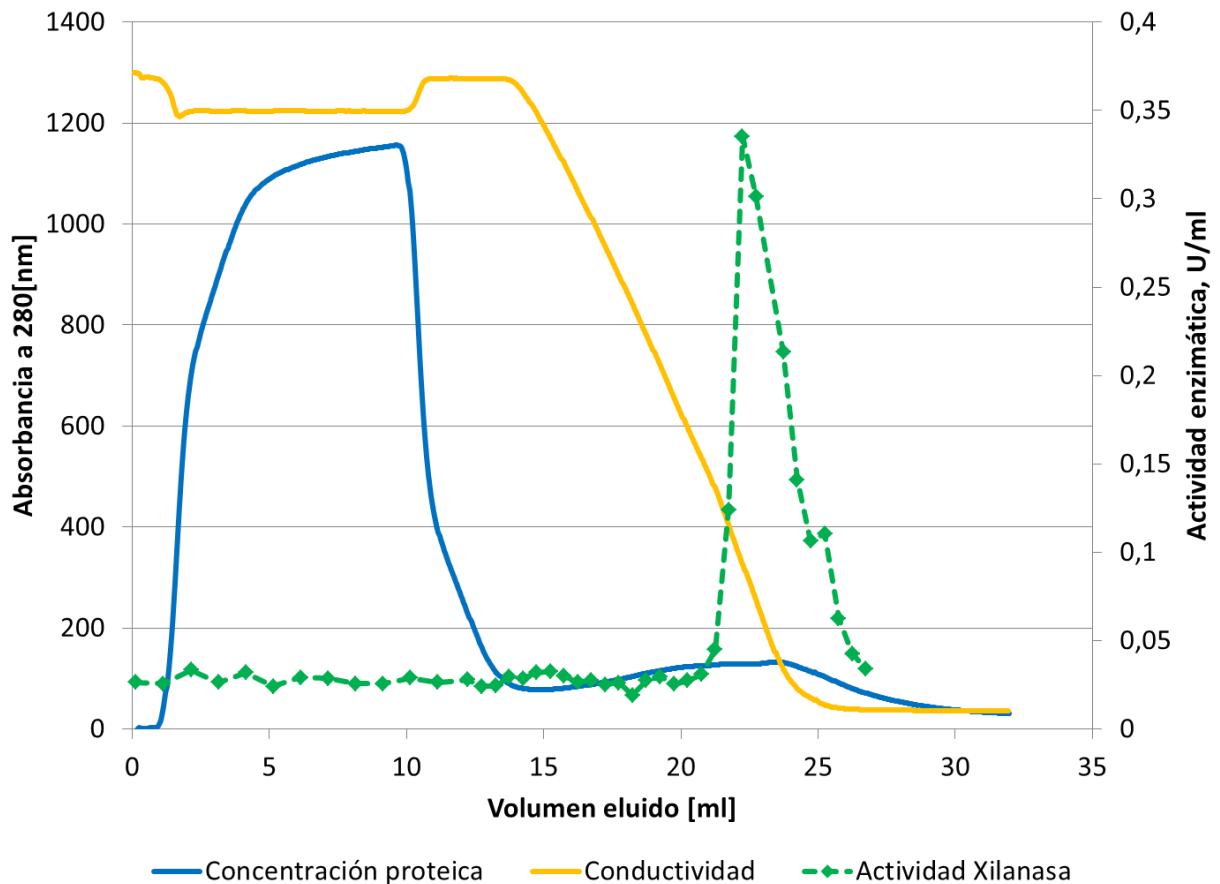


Figura 41. "Cromatografía de interacción hidrofóbica realizada sobre las proteínas provenientes del primer cultivo de *G.trabeum*. Se utilizó una columna butil-sefarosa de 1[ml] .El protocolo de separación consistió en ambientar la columna con buffer acetato de sodio 50[mM] a pH 6 con sulfato de amonio 1[M], cargar la muestra, hacer un lavado con el mismo buffer utilizando tres volúmenes de columna y luego realizar un gradiente lineal de sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración 0[M] en 10 volúmenes de columna para eluir las proteínas adheridas a la resina".

Se obtiene solo un pico de actividad xilanasas, donde existe una reducida concentración proteica, por lo tanto, se espera obtener xilanasas bastante purificada.

En las Figuras 42 y 43 se muestra un zoom de la Figura 41 con las fracciones seleccionadas y un gel de poliacrilamida al 12% donde fueron cargadas respectivamente.

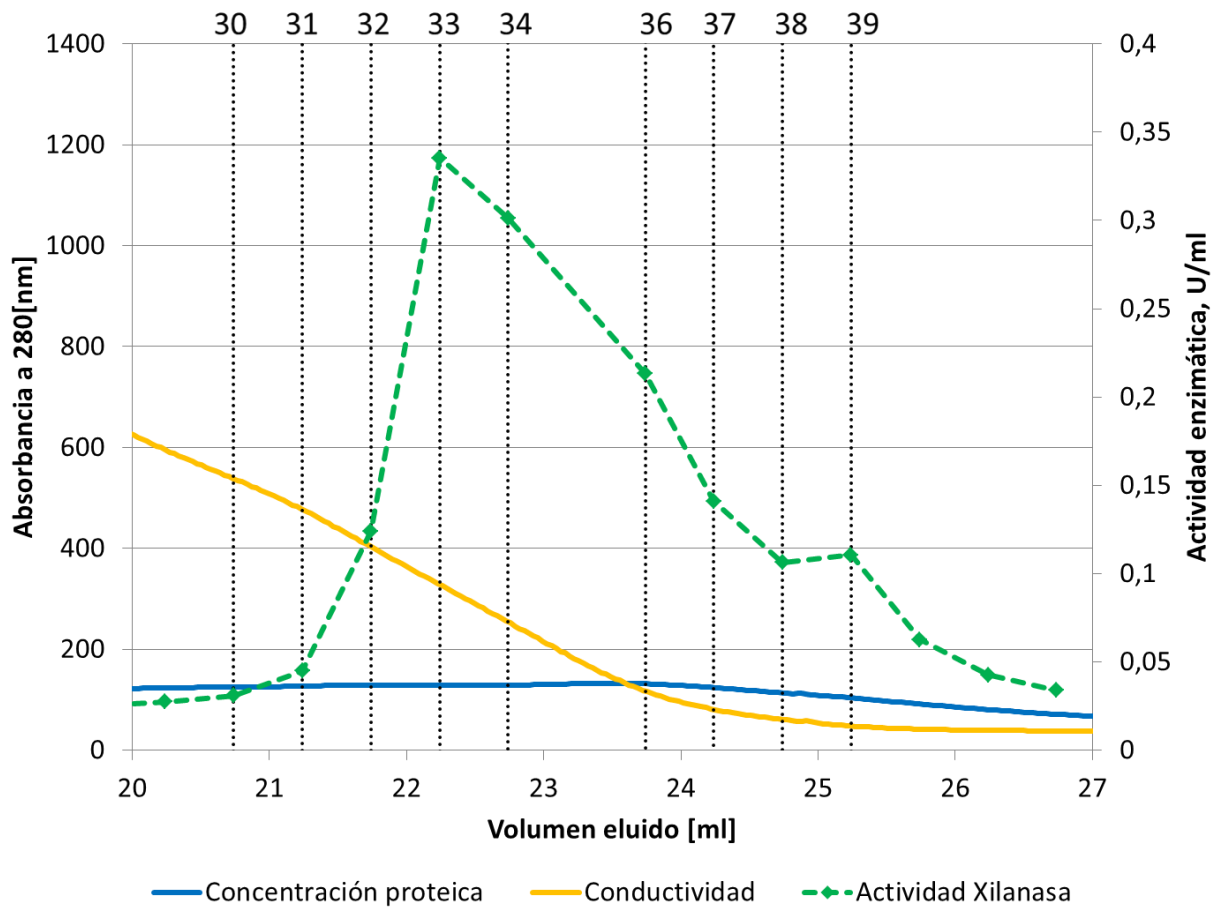


Figura 42. "Selección de fracciones de Cromatografía de interacción hidrofóbica realizada sobre las proteínas provenientes del primer cultivo de *G.trabeum* para cargar en gel de poliacrilamida al 12%".

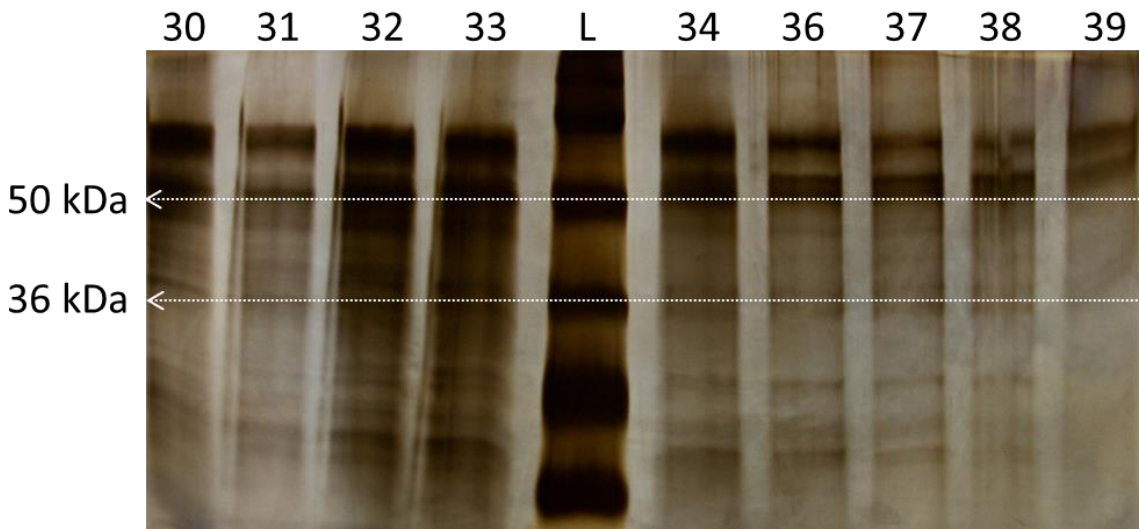


Figura 43. "Gel de poliacrilamida con fracciones de: Cromatografía de interacción hidrofóbica realizada sobre las proteínas provenientes del primer cultivo de *G.trabeum*".

Nuevamente se estudió el rango entre los 36 y 50[kDa], pero la resolución es bastante pobre, se cree que por tiempo transcurrido entre las tinciones con azul de Coomassie y con nitrato de plata.

2.4. Repetición de la cinética de producción enzimática

Se volvió a monitorear la generación de enzima, pero cuantificando también la actividad xilanasa. Las mediciones se realizaron aproximadamente dos meses después de la cosecha de los cultivos, y fueron conservadas durante ese periodo a -20°C . El resultado fue el siguiente.

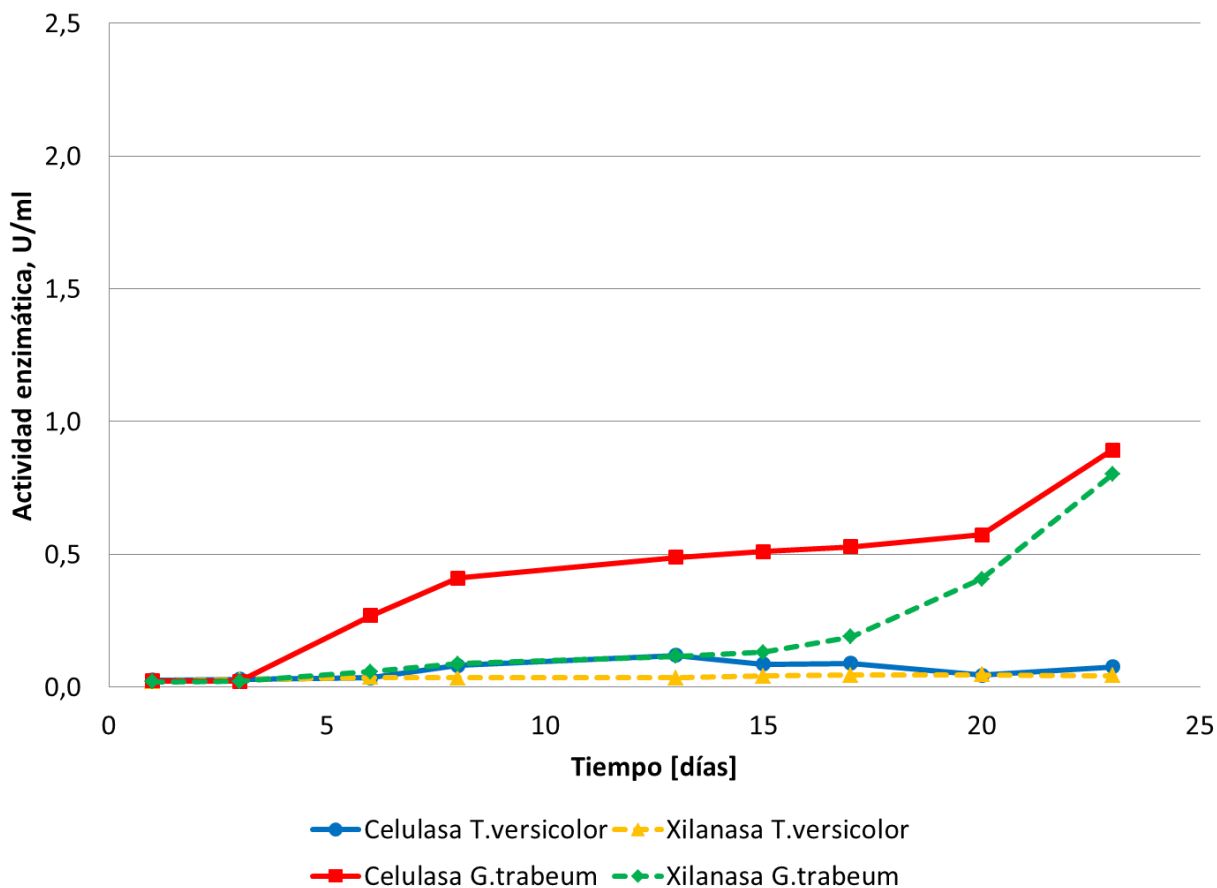


Figura 44. “Cinética de la producción de enzimas del primer cultivo de los distintos hongos, para asegurar su presencia en el medio extracelular. La medición se realizó dos meses después de la mostrada en la Figura 38”.

Al comparar ambas cinéticas de producción de enzimas, se observa un abrupto descenso de los valores medidos. Este efecto se asocia al tiempo transcurrido, que genere una degradación o inactivación de las enzimas. De todos modos las muestras presentan actividad xilanasa, con lo que se comprueba la secreción de estas enzimas por ambas especies fúngicas.

3. Segundo cultivo

Se crecieron las especies *T. versicolor* y *G. trabeum* en 5 matraces de 100[ml]. Se introdujo 2 unidades de inóculo en cada matraz y se incubaron durante 10 días en las condiciones descritas. No se monitoreó la cinética de producción enzimática de estos cultivos.

A diferencia del cultivo anterior, las proteínas provenientes de los cultivos fueron concentradas a través de la precipitación con sulfato de amonio y luego resuspendidas para ser cargadas a las columnas cromatográficas.

Las proteínas obtenidas de *G. trabeum* fueron sometidas a una cromatografía de interacción hidrofóbica (Figura 29) mostrada en la sección Resultados y Discusión.

Las proteínas obtenidas de *T. versicolor* se usaron para una cromatografía de intercambio aniónico (Figura 26) mostrada en la sección Resultados y Discusión, y una de interacción hidrofóbica que se muestra a continuación.

3.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica *T. versicolor*

Una fracción de las proteínas resuspendidas de *T. versicolor* fue purificada a través de una cromatografía de interacción hidrofóbica usando una columna butil-sefarosa de 8[ml]. El cromatograma de esta etapa se muestra en la Figura 45.

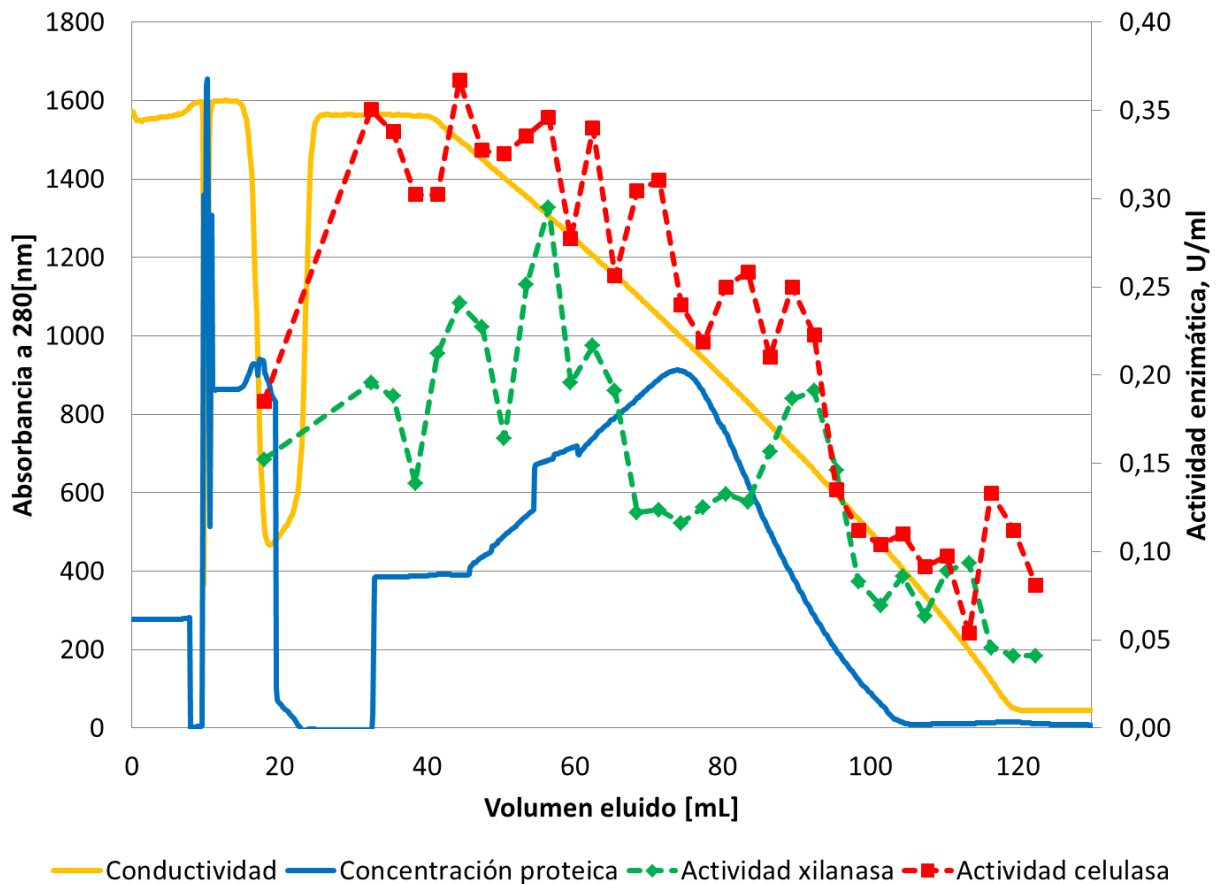


Figura 45. "Cromatografía de interacción hidrofóbica realizada sobre las proteínas provenientes del segundo cultivo de *T. versicolor*. Se utilizó una columna butil-sefarosa de 8[mL]. El protocolo de separación consistió en ambientar la columna con buffer acetato de sodio 50[mM] a pH 6 con sulfato de amonio 1[M], cargar la muestra, hacer un lavado con el mismo buffer utilizando tres volúmenes de columna y luego realizar un gradiente lineal de sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración 0[M] en 10 volúmenes de columna para eluir las proteínas adheridas a la resina".

El descenso de la conductividad al comienzo de la cromatografía (junto a la elución de proteínas) se debe a que la muestra cargada contenía una concentración de sulfato de amonio menor a 1[M].

Los ensayos de actividad celulasa y xilanasas presentados en el gráfico fueron incubados durante 10[*min*] en vez de 1[h] y luego el valor fue multiplicado por un factor 6. Se obtuvo valores bajos de actividad que fueron luego amplificadas, pero esta misma amplificación, producto del factor 6, también aumenta el valor de los errores, por lo tanto es difícil discriminar los reales valores de actividad de los resultados de la amplificación de los errores. Aun así, se puede ver difusamente dos picos de actividad xilanasas.

4. Tercer cultivo

Se crecieron las especies *T. versicolor* y *G. trabeum* en un matraz con 500[*ml*] del medio de cultivo y se les agregaron 10 unidades de inóculo. En este caso se utilizó un medio de cultivo distinto para *G. trabeum*.

Una fracción de 10[ml] de cada cultivo fue guardada a 4[°C] y el volumen restante fue sometido al proceso de precipitación de proteínas por adición de sulfato de amonio. Se dividió el total de muestra de *G. trabeum* en tres volúmenes iguales, la de *T. versicolor* en cuatro. Las proteínas precipitadas fueron guardadas en 10[ml] del buffer saturado que resultó del proceso de precipitación. Estas muestras fueron procesadas luego de algunas semanas, por lo tanto se les agregó el inhibidor de proteasas.

Una fracción de las proteínas precipitadas de cada cultivo fue utilizada para el ensayo de hidrólisis frente paja de trigo pre-tratada (Resultados y discusión). Las proteínas de *G. trabeum* también fueron sometidas a una cromatografía de interacción hidrofóbica y luego a una de intercambio aniónica mostradas en Resultados y discusión (Figuras 31 y 32).

4.1. Cinética de producción enzimática

La cinética de producción enzimática de estos cultivos se muestra en la Figura 46.

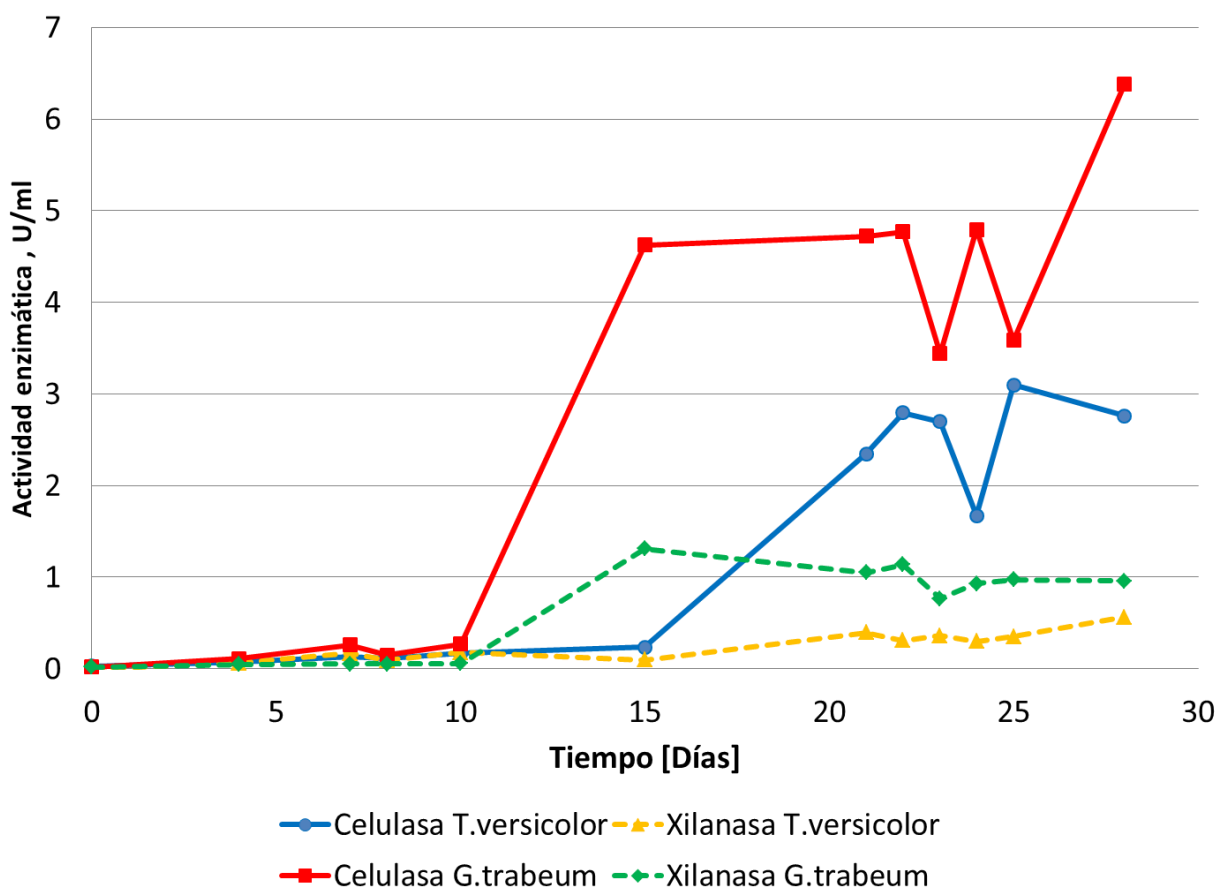


Figura 46. "Cinética de la producción de enzimas del tercer cultivo, para asegurar la secreción de ellas al medio extracelular".

Como los cultivos crecieron condiciones diferentes al primer cultivo: distinto medio de cultivo (para *G. trabeum*), tipo de matraz y volumen, no se obtuvo una secreción enzimática equivalente en ambos. El día óptimo de cosecha para *G. trabeum* correspondió al día 15, pero no fue posible manipular los cultivos en esa fecha.

Anexo G. Estrategias alternativas de separación

Con el fin de obtener muestras con xilanasas y libres de celulasas se decidió eliminar las celulasas presentes en algunas muestras utilizando técnicas alternativas, tras el fundamento de que estas últimas presentan un sitio de unión a carbohidratos en su estructura, lo que no se encontró para GTXTL1 ni TVXYL1.

1. Separación a través de algodón

La primera estrategia consistió en pasar la muestra a través de una matriz de algodón hidrofílico. Se esperaba que las celulasas se adhirieran al algodón, con lo que se obtendría una muestra carente de ellas a la salida de la matriz. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 22 y 23.

Tabla 22. "Actividad xilanasa medida en las distintas etapas de separación a través de la matriz de algodón".

	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Nivel de purificación
Cargado	0,0561	2,12	37,8	100%	1
Purificado	0,0271	1,07	39,5	50%	1,045
Lavado	0,0109	0,433	39,7	20%	1,051

Tabla 23. "Actividad celulasa medida en las distintas etapas de separación a través de la matriz de algodón".

	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Nivel de purificación
Cargado	0,0561	4,58	81,7	100%	1
Purificado	0,0271	2,64	97,4	58%	1,19
Lavado	0,0109	0,903	82,7	20%	1,01

Se concluye que la técnica no cumple su objetivo ya que a través de ella se enriquece de mayor manera las celulasas, de todos modos este enriquecimiento no supera el 20% ni en el mejor de los casos y provoca una pérdida de un 30% de la actividad xilanasa y un 23% de la actividad celulasa. Se desecha este método debido a su poca efectividad en el enriquecimiento, asociada a altas pérdida de enzimas.

2. Separación incubando con avicel

Se incubó la muestra con avicel, esperando que el sobrenadante contubiera una menor cantidad de celulasas, basado en la teoría que estas enzimas precipitarían junto al avicel. El resultados fue el siguiente.

Tabla 24. "Actividad enzimática medida antes y después del protocolo de separación con avicel".

	Cargada	Obtenida	Recuperada
Actividad xilanasa	0,0145 [U]	0,0127[U]	89,3%
Actividad celulasa	0,0478[U]	0,0432[U]	90,4%

Tampoco resulta una técnica eficiente debido a que la recuperación de la actividad xilanasa resulta similar a la de celulasa, se obtiene un enriquecimiento mayor para éstas últimas, por lo tanto, también se descarta.

Anexo H. Ensayo preliminar de actividad sobre paja de trigo

Para determinar los parámetros de la hidrólisis de paja de trigo, se realizó una prueba preliminar. En ésta, se cargaron tres concentraciones distintas de cada proteína y se incubaron durante 16 y 24 horas.

Se cuantificaron azúcares reductores totales, a través de un ensayo de DNS. Con las absorbancias medidas, se construyeron gráficos para determinar la concentración proteica que se cargaría de cada muestra, además del tiempo que duraría el ensayo final.

Se hizo dos gráficos con los resultados obtenidos luego de incubar durante 16 y 24 horas. Los resultados para los ensayos de 16 y 24 horas se muestran en las Figuras 47 y 48 respectivamente.

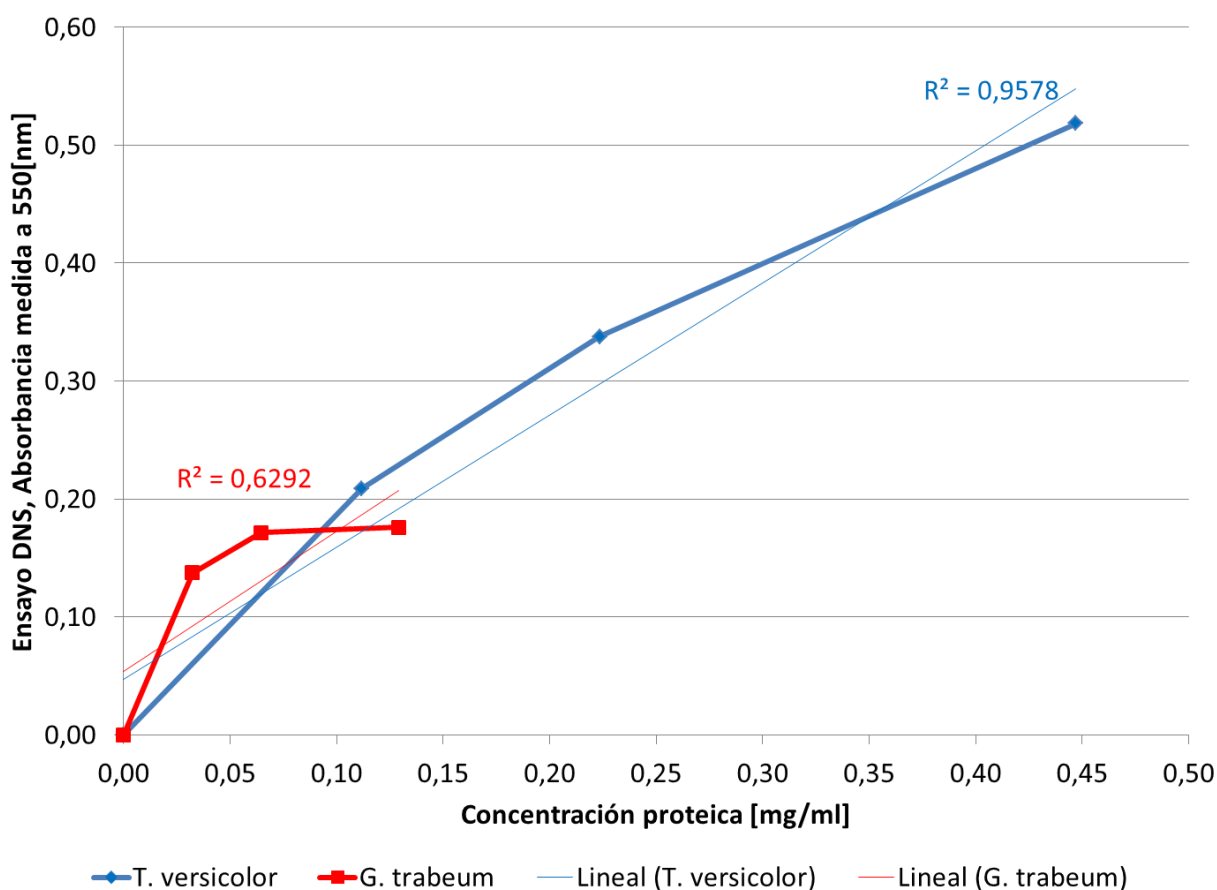


Figura 47. "Ensayo DNS realizado sobre muestras incubadas con sustrato lignocelulósico durante 16 horas".

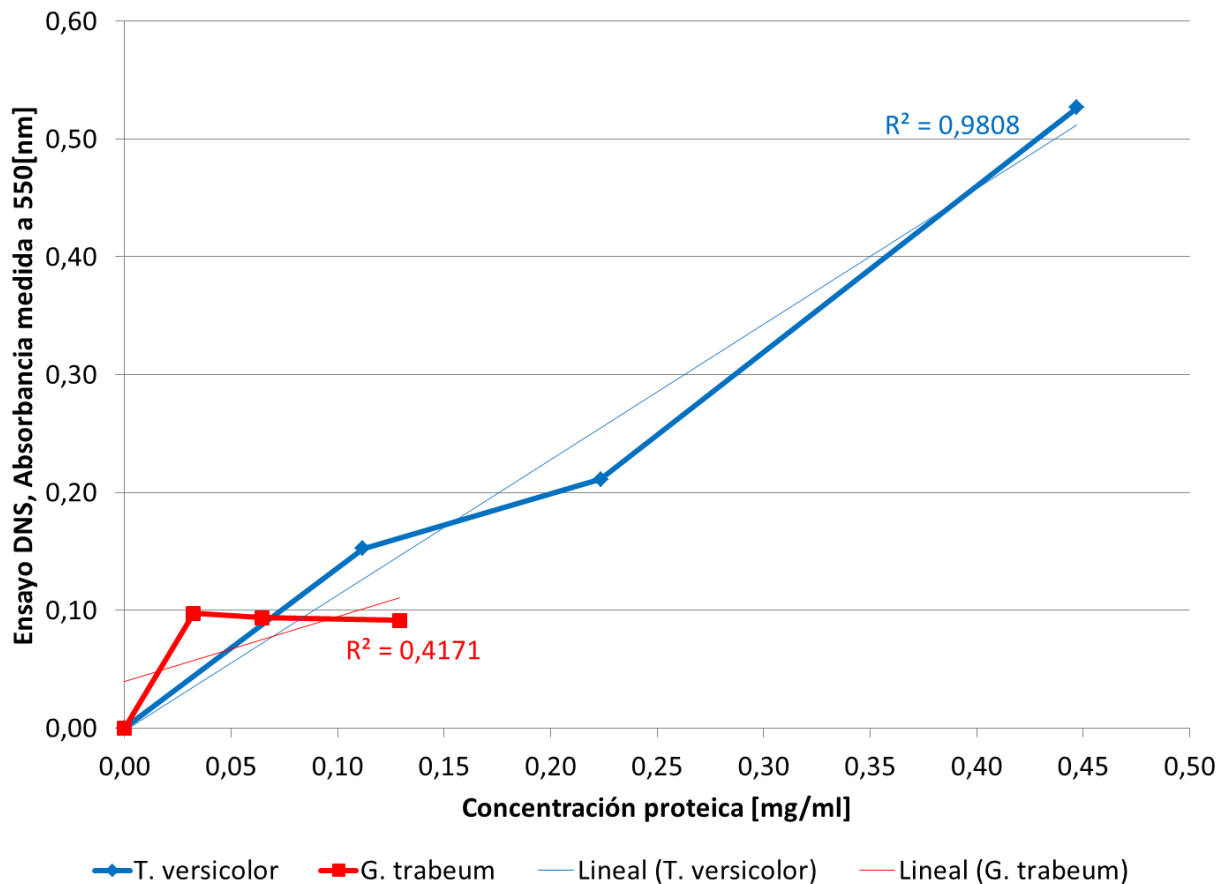


Figura 48. “Ensayo DNS realizado sobre muestras incubadas con sustrato lignocelulósico durante 24 horas”.

Al buscar una relación lineal entre la absorbancia medida y la concentración proteica cargada, se observa este fenómeno luego de 16 horas en la muestra de *T. versicolor*, cosa que no fue posible detectar en ninguna de las concentraciones de proteínas de *G. trabeum*, debido a ello, se propuso cargar una concentración aún más baja que todas las estudiadas para este hongo.

Las muestras cargadas para la hidrólisis de paja de trigo fueron:

“**T. versicolor**”: proteínas precipitadas y resuspendidas en buffer acetato de sodio 50[mM] y pH 6, provenientes de un cultivo de *T. versicolor* con una concentración de 0,112[mg/ml].

“**G. trabeum**”: proteínas precipitadas y resuspendidas en buffer acetato de sodio 50[mM] y pH 6, provenientes de un cultivo de *G. trabeum* con una concentración de 0,0161[mg/ml].

“**G. trabeum/2**”: proteínas precipitadas y resuspendidas en buffer acetato de sodio 50[mM] y pH 6, provenientes de un cultivo de *G. trabeum* con una concentración de 0,00806[mg/ml].

“**G. trabeum enriquecido**”: proteínas purificadas a través de una cromatografía de interacción hidrofóbica y luego una de intercambio aniónico, provenientes de un cultivo de *G. trabeum*, con una concentración de 0,00244[mg/ml].

Anexo I. Composición de reactivos

Buffer TAE 50x:

- 242[g] de Tris.
- 57,1[ml] de ácido acético glacial.
- 100[ml] de EDTA a una concentración 0,5[M].

Reactivo DNS:

- 3,53[g] de 3-5-ácido dinitrosalecílico.
- 6,60[g] de hidróxido de sodio.
- 472[ml] de H₂O destilada.
- 102[g] de Na-K tartrato.
- 2,53[ml] de fenol.
- 2,77[g] de metabisulfito de sodio.

Reactivo de Bradford:

- 5[mg] de azul de coomassie G-250.
- 2,5[ml] de etanol.
- 5[ml] de ácido fosfórico.
- 42,5[ml] de H₂O mili-Q.

Gel de apilamiento:

- 1,58[ml] de acrilamida-bisacrilamida 29:1.
- 0,95[ml] de solución tris/HCl 1,5[M] a pH 8,8 + 0,4% de SDS.
- 1,27[ml] de H₂O mili-Q.
- 2[μl] de TEMED.
- 20[μl] de PSA 10%.

Gel de resolución:

- 0,1675[ml] de acrilamida-bisacrilamida 29:1.
- 0,25[ml] de solución tris/HCl 0,5[M] a pH 6,8 + 0,4% SDS.
- 0,575[ml] de H₂O mili-Q.
- 1,25[μl] de TEMED.
- 7,5[μl] de PSA 10%.

Solución de tinción con azul de Coomassie:

- 1[g] de Coomassie.
- 450[ml] de H₂O mili-Q.
- 450[ml] de metanol.
- 100[ml] de ácido acético.

Solución de destinción:

- 450[ml] de metanol.
- 100[ml] de ácido acético.
- 450[ml] de H₂O mili-Q.

Anexo J. Curvas estándar

Se construyeron diversas curvas estándar a través de ensayos propios, con ellas se logró correlacionar distintos valores.

1. Curva de Bradford

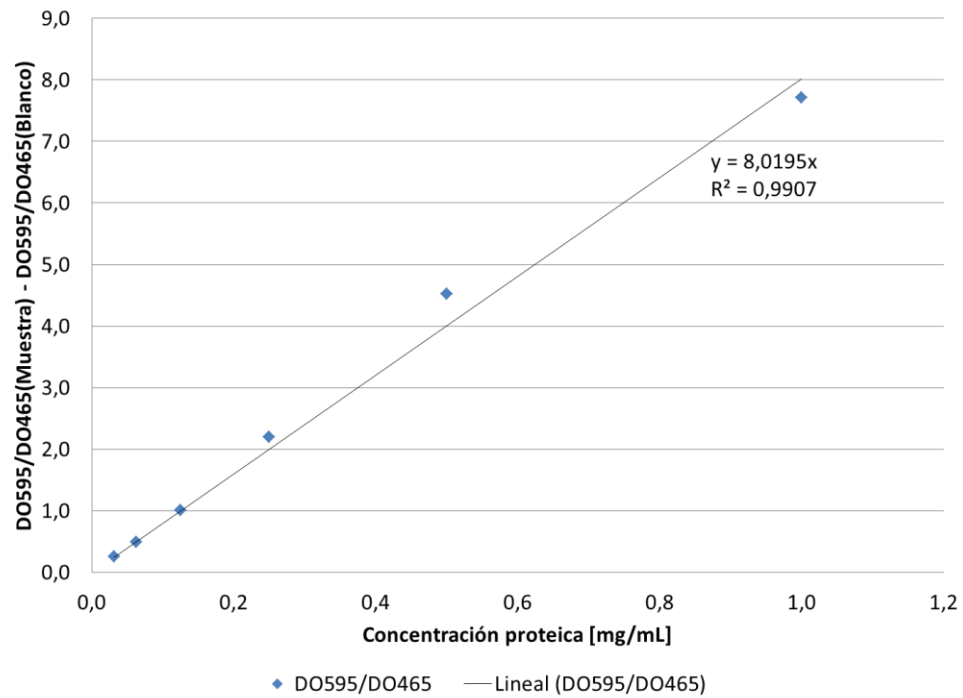


Figura 49. "Curva estándar para el ensayo de Bradford".

2. Curvas de calibración del ensayo de azúcares reductores para xilosa

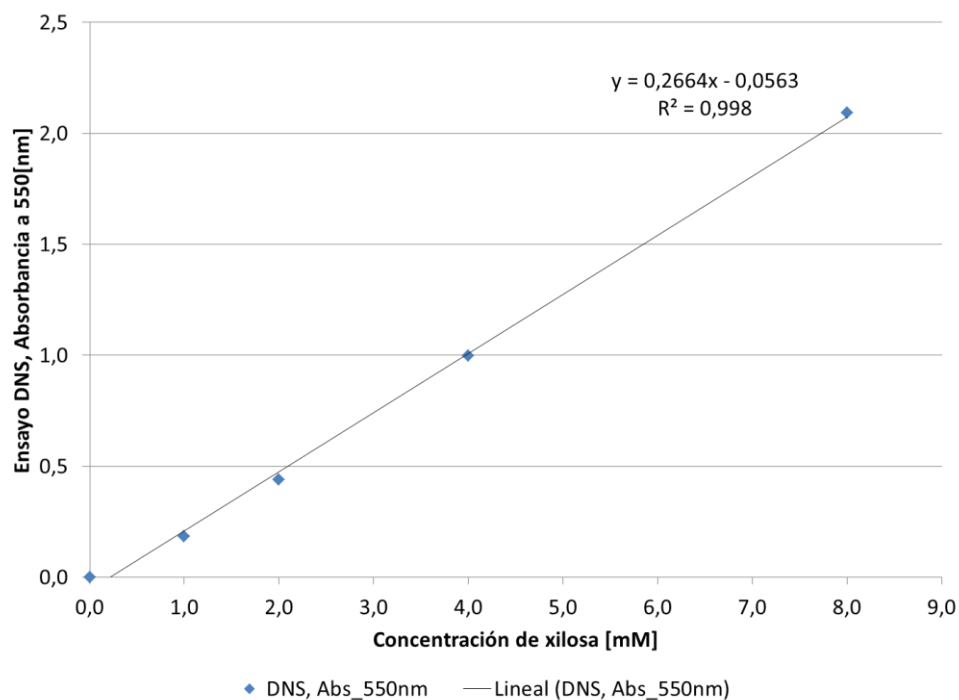


Figura 50. “Curva de calibración de concentración de xilosa liberada en ensayo de DNS en unidades de [mM]”.

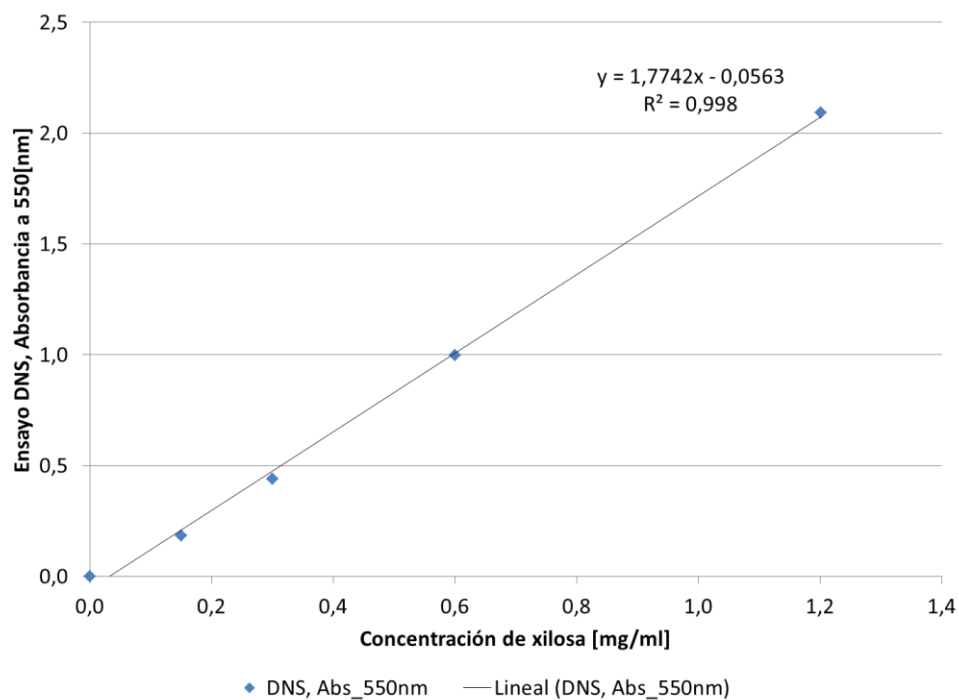


Figura 51. “Curva de calibración de concentración de xilosa liberada en ensayo de DNS en unidades de [mg/ml]”.

3. Curvas de calibración del ensayo de azúcares reductores para glucosa

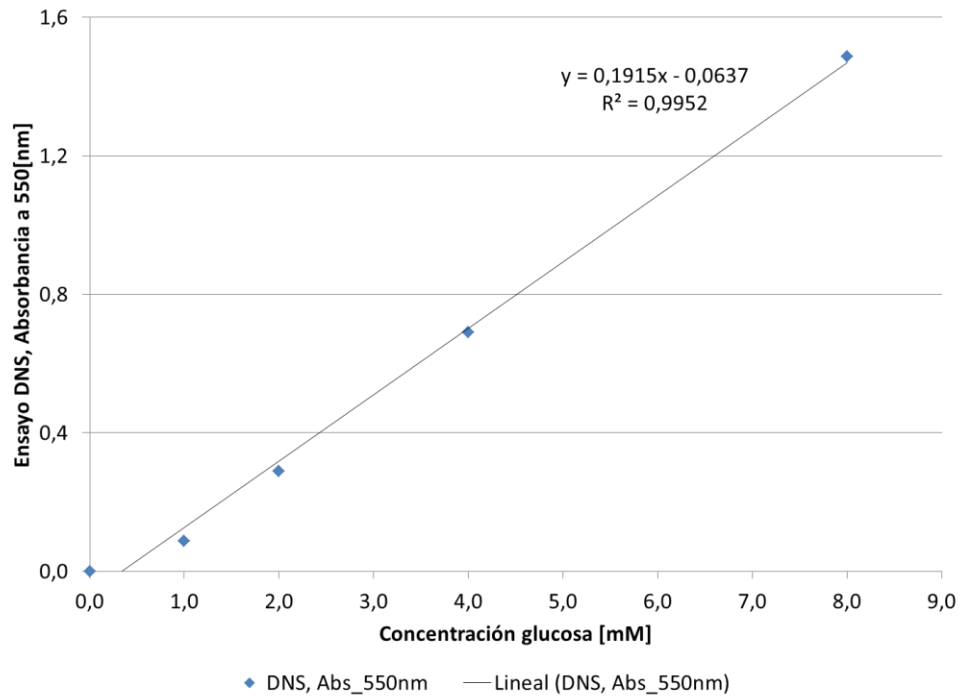


Figura 52. “Curva de calibración de concentración de glucosa liberada en ensayo de DNS en unidades de [mM]”.

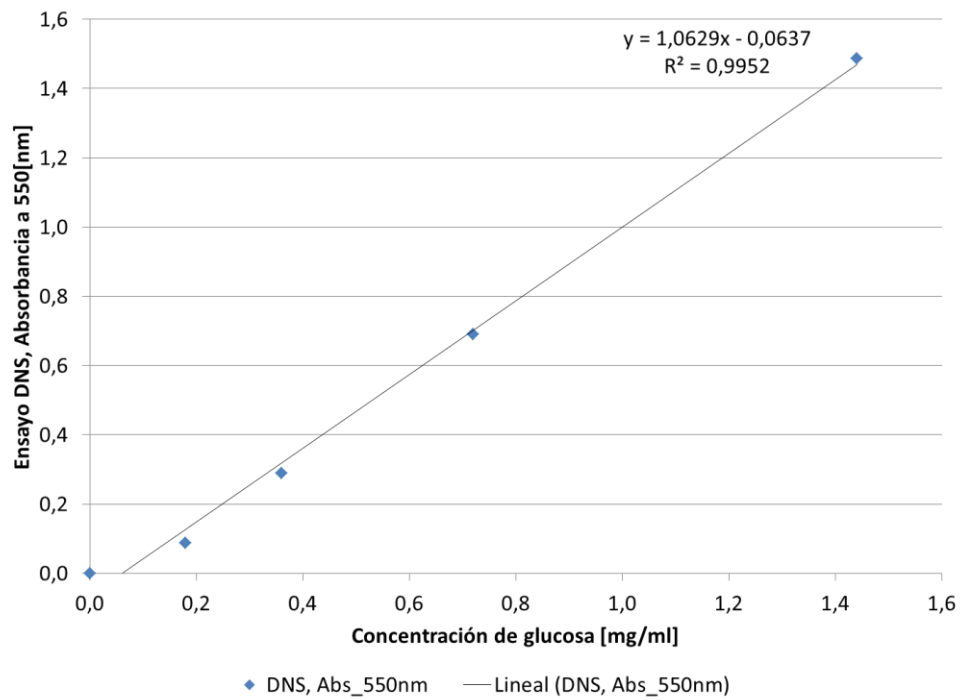


Figura 53. “Curva de calibración de concentración de glucosa liberada en ensayo de DNS en unidades de [mg/ml]”.

Anexo K. Constantes cinéticas de xilanasas de *G. trabeum*

Tabla 25. “Valores de las constantes cinéticas de las xilanasas de *G. trabeum* ^[28]. Calculadas a través de un ensayo sobre xilano de madera de abedul”.

	V_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]	K_M [mg/ml]	K_{cat} [s^{-1}]	K_{cat}/K_M
GTXYL1	180	0,40	109	272
GTXYL2	130	0,27	84,5	395