

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE FIGURAS	vi
ÍNDICE TABLAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Bioetanol de primera y segunda generación	1
1.2 Ventajas y desventajas del uso de etanol	2
1.3 Composición del material lignocelulósico	2
1.4 Proceso de producción de bioetanol	3
1.5 Modo de acción de las celulasas	4
1.6 Sinergismo	5
1.7 Hongos productores de celulasas	5
1.8 Expresión recombinante de celulasas	6
1.9 Sistema de expresión en <i>E. coli</i> Rosetta-gami™ B	6
1.10 Motivación y descripción del proyecto	7
II HIPÓTESIS	9
III OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo general	9
3.2 Objetivos específicos	9
IV MATERIALES Y MÉTODOS	10
MATERIALES	10
MÉTODOS	14
4.1 Cultivo del hongo de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> para la producción de celulasas.	14
4.2 Separación cromatográfica.	14
4.3 Ensayos de actividad enzimática	15
4.4 Determinación de azúcares reductores.	15
4.5 Ensayos de sacarificación del residuo forestal de <i>N. pumilio</i>	16
4.6 Ensayos de sinergismo de CBH-I de <i>P. chrysosporium</i> con una endoglucanasa y una β -glucosidasa.	16
4.7 Ensayo de determinación de proteínas mediante Bradford.	17
4.8 Electroforesis de proteínas en SDS- PAGE.	17
4.9 Análisis zimográfico	18

4.10 Isoelectroenfóque de la fracción purificada de CBH-I	18
4.11 Extracción del DNA genómico desde el hongo <i>P. chrysosporium</i>	18
4.12 Obtención de la secuencia de celobiohidrolasa CBH-I cel 7-2 del hongo <i>P. chrysosporium</i>	19
4.13 Clonamiento de las secuencias de cDNA de CBH-I cel 7 y rDNA 18S	21
4.14 Transformación de la cepa <i>E. coli</i> Rosetta-gami™ B con pET22 CBH-I cel7-1 y pET22 CBH-I cel7-2	23
4.15 Expresión de las proteínas CBH-I cel 7-1 y CBH-I cel 7-2 en <i>E. coli</i> Rosetta-gami™ B	23
V RESULTADOS	
5.1 Producción de actividad celobiohidrolasa en un cultivo de <i>P. chrysosporium</i>	25
5.2 Comparación de la actividad sacarolítica de un extracto crudo de un cultivo de <i>P. chrysosporium</i> con la de un preparado comercial de <i>T. reesei</i> .	26
5.3 Purificación de la celobiohidrolasa CBH-I de <i>P. chrysosporium</i> .	28
5.4 Comparación de la sacarificación de <i>N. pumilio</i> con CBH-I de <i>P. chrysosporium</i> y una endoglucanasa comercial versus un preparado comercial de celulasas de <i>T. reesei</i> .	34
5.5 Ensayos de sinergismo de la CBH-I obtenida desde un extracto de <i>P. chrysosporium</i> con una endoglucanasa y una β- glucosidasa comercial.	36
5.6 Expresión recombinante de la celobiohidrolasa CBH-I de <i>P. chrysosporium</i> .	40
V DISCUSIÓN	48
VII CONCLUSIONES	57
VIII BIBLIOGRAFIA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la estructura de la lignocelulosa y el pretratamiento de la biomasa.	3
Figura 2. Vector pGEM-T Easy.	12
Figura 3. Vector de expresión pET 22-b(+).	13
Figura 4. Cinética de producción de actividad celobiohidrolasa con sustrato pNPLac 1 mg/ml del extracto crudo del medio de cultivo de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> N=2.	25
Figura 5. Sacarificación de residuos forestales de <i>N. pumilio</i> por el tratamiento con 20 µg de proteínas enriquecido con un extracto enzimático de <i>P. chrysosporium</i> y <i>T. reesei</i> .	27
Figura 6. Sacarificación de residuos forestales de <i>N. pumilio</i> por el tratamiento con 40 µg de proteínas enriquecido con un extracto enzimático de <i>P. chrysosporium</i> y <i>T. reesei</i> .	27
Figura 7. Cromatografía de intercambio aniónico aplicada a las proteínas del extracto crudo de <i>P. chrysosporium</i> .	29
Figura 8. Análisis electroforético de las distintas fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico.	30
Figura 9. Análisis mediante cromatografía de exclusión molecular del concentrado de proteínas de las fracciones con alta actividad CBH.	31
Figura 10. Análisis electroforético SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular (A) y zimografía con sustrato CMC de las mismas fracciones (B).	32
Figura 11. Punto isoeléctrico de CBH-I de la preparación purificada de CBH-I en <i>P. chrysosporium</i> .	33
Figura 12. Cinética de hidrólisis de <i>N. pumilio</i> por enzimas de <i>P. chrysosporium</i> y <i>T. reesei</i> con 150 µg/ml de proteínas por 100 mg de madera.	35
Figura 13. Cinética de hidrólisis de <i>N. pumilio</i> por enzimas de <i>P. chrysosporium</i> y <i>T. reesei</i> con 200 µg/ml de proteínas por 100 mg de madera.	35
Figura 14. Sacarificación de <i>N. pumilio</i> por el tratamiento con diferentes concentraciones de un extracto enriquecido de CBH-I con diferentes concentraciones de una endoglucanasa comercial y con un preparado comercial de <i>T. reesei</i> .	38
Figura 15. Análisis del RNA total extraído del hongo <i>P. chrysosporium</i> .	41
Figura 16. Esquema para la obtención del cDNA de la celobiohidrolasa CBH-I.	42
Figura 17. Amplificación del cDNA del gen de celobiohidrolasa CBH-I por PCR.	43

Figura 18. Dominios conservados para la secuencia de la celobiohidrolasa CBH-I cel 7-2 determinados usando la herramienta CDD.	44
Figura 19. Traducción de la secuencia CBH-I.	45
Figura 20. Digestión de CBH-I cel 7-2 con las enzimas de restricción <i>Nco</i> I y <i>Eco</i> R1.	46
Figura 21. Electroforesis en condiciones desnaturalantes de diferentes fracciones proteicas de la expresión de CBH-I cel 7-1 con <i>E. coli</i> Rosetta-Gami™ B.	47
Figura 22. Etapas para la obtención de CBH-I de <i>P. chrysosporium</i> .	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Herramientas Bioinformáticas.	13
Tabla 2. Mezcla de celulasas utilizadas en el ensayo de sinergismo.	17
Tabla 3. Partidores utilizados para la amplificación de la secuencia génica del gen ribosomal 18S.	19
Tabla 4. Partidores utilizados para la amplificación de la secuencia génica de la celobiohidrolasa cel 7.	21
Tabla 5. Etapas de la purificación de CBH-I.	32
Tabla 6. Grado de sinergismo con diferentes concentraciones de CBH-I y una endoglucana comercial.	39
Tabla 7. Análisis de la secuencia CBH-I cel7-2 mediante la herramienta BLAST (p)	43
Tabla 8. Porcentaje de identidad en secuencia aminoacídica entre las diferentes CBH-I (A-F) de <i>P. chrysosporium</i> .	54
Tabla 9. Porcentaje de identidad entre las diferentes celobiohidrolasas de <i>P. chrysosporium</i> y las celobiohidrolasas estudiadas en esta tesis.	55