

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MEZCLA DE PROTEÍNAS CON
ACTIVIDAD TIPO EXPANSINA Y XILANASAS SOBRE LA ACCIÓN
HIDROLÍTICA DE CELULASAS EN RESIDUOS
LIGNOCELULÓSICOS”***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica área de Especialización Ambiental y Memoria
para optar al Título de Bioquímica por:

JAVIERA IGNACIA SOTO-AGUILAR TAMM

Directora de Tesis: Dra. Oriana Salazar Aguirre

Santiago-CHILE

2016

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

JAVIERA IGNACIA SOTO-AGUILAR TAMM

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dra. Oriana Salazar A. _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Lobos C. _____

Dra. M. Antonieta Valenzuela P. _____

Prof. Mercedes Zaldívar S. _____

“Joy in looking and comprehending is nature’s most beautiful gift.”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecer a mi familia, Guillermo, Annemarie y Sebastian, son todo para mí. Gracias a mis padres por su gran sacrificio, el apoyo y cariño incondicional durante todos estos años de estudio, sin ustedes nada de esto hubiese sido posible. También quisiera agradecer a mi madrina Claudia por creer en mí.

A mis amigos del colegio Lalo, Mafa y Pauli por estar tantos años a mi lado, hemos pasado una vida juntos. Gracias Pauli por sacarme de la rutina cuando más lo necesité.

A todas las personas que me acompañaron durante el paso por la universidad, aunque no todos me acompañen hoy, no saben lo importantes que fueron para mí. Agradezco profundamente haber conocido a personas como uds. que me hicieron crecer como ser humano. A mis amigos Carol, Rocío, Chicho, Komal, Ale, Eli, Pali, Grillo, Johany, Pipe y pingüino.

Gracias a mi directora de tesis Oriana Salazar por darme la oportunidad de trabajar con ella. Agradezco su paciencia y buena disposición a enseñarme.

A todos los integrantes del CeBiB, gracias por acogerme en un ambiente muy grato de trabajo. En especial a Nancy por su infinita paciencia y buena voluntad, y a Juancho por su preocupación. Así también quisiera agradecer a mis compañeros, por sus consejos, ayuda e innumerables risas, Cynthia, Mayi, Calamares, DiegoL, Medardo, Diana, Cristina, Allison, Jose, Jean, Emilie. A Carlos por su ayuda con los modelos y sus conocimientos bioinformáticos.

Finalmente agradezco a Juan, nunca pensé que en la tesis te encontraría a ti. Gracias por estar en el momento preciso, por tu paciencia, cariño, ayuda y todos tus consejos. Fuiste el empuje que necesité para llegar al final del camino.

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	VIII
INDICE DE TABLAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 LIGNOCELULOSA	3
2.1.1 Celulosa.....	4
2.1.2 Hemicelulosa.....	4
2.1.3 Lignina.....	6
2.1.4 Degradación de la lignocelulosa	6
2.1.4.1 Celulasas	7
2.1.4.2 Hemicelulasas	8
2.1.4.3 Ligninasas.....	10
2.1.4.4 Expansinas	11
2.2 INVESTIGACIÓN PROPUESTA.....	13
2.3 HIPOTESIS	14
2.4 OBJETIVO GENERAL	14
2.5 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 MATERIALES	15
3.1.1 Reactivos.....	15
3.1.2 Equipos.....	16
3.1.3 Composición de medios de cultivo	17

3.1.4 Cepas.....	18
3.1.5 Plásmidos.....	19
3.1.6 Partidores.....	20
3.1.7 Enzimas.....	21
3.2 MÉTODOS.....	22
3.2.1. Condiciones de cultivo.....	22
3.2.2 Estrategia de clonamiento de los genes de swollenina y xilanasa.....	23
3.2.2.1 Diseño de partidores.....	23
3.2.2.2 Síntesis y purificación de cDNA.....	23
3.2.2.3 Clonamiento de los genes de swollenina y xilanasa.....	24
3.2.3 Inducción de proteínas recombinantes.....	27
3.2.4 Ensayo de actividad.....	28
3.2.5 Gel desnaturante de proteínas.....	29
3.2.6 Concentración de proteínas.....	29
3.2.7 Purificación de proteínas.....	29
3.2.8 Caracterización de GtXYL1.....	30
3.2.8.1 Zimograma.....	30
3.2.8.2 Ensayo de actividad a distintas temperaturas.....	31
3.2.8.3 Ensayo de actividad con disitintos amortiguadores.....	31
3.2.8.3 Ensayo de actividad a distintos pH.....	32
3.2.8.4 Ensayo de actividad a distintas concentraciones de calcio.....	33
3.2.8.5 Termoestabilidad.....	33
3.2.8.6 Tratamiento con Péptido N-Glicosidasa F (PNGasa F).....	34
3.2.8.7 Hidrólisis paja de trigo.....	34
IV. RESULTADOS.....	35
4.1 PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE XILANASA Y DE SWOLLENINA.....	35

4.1.1	Diseño de partidores	35
4.1.2	Clonamiento	36
4.1.3	Inducción de expresión de proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i>	40
4.2	DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN PARA OPTIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE TRSWO Y GTXYL1 EN <i>PICHIA PASTORIS</i>	42
4.3	PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS OBTENIDAS	44
4.3.1	Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) de inducción de TrSWO	44
4.3.2	Cromatografía de intercambio aniónico (AEC) de inducción de TrSWO	44
4.3.3	Cromatografía de intercambio aniónico de inducción de GtXYL1	46
4.3.4	Zimograma de GtXYL1	49
4.3.5	Caracterización de GtXYL1	50
4.3.5.1	Determinación de las condiciones de reacción de GtXYL1	50
4.3.5.2	Temperatura óptima	51
4.3.5.3	Efecto de distintos amortiguadores sobre GtXYL1	51
4.3.5.4	pH óptimo	52
4.3.5.5	Efecto ión calcio añadido a la reacción enzimática de GtXYL1	53
4.3.5.6	Termoestabilidad a 50°C	54
4.3.5.7	Termoestabilidad a 80°C	55
4.3.5.8	Comparación de la actividad específica y termoestabilidad de GtXYL1 con enzimas comerciales	57
4.3.5.8	Análisis de glicosilaciones con Péptido N-Glicosidasa F (PNGasa F)	59
4.4	EFFECTO DE LA ADICIÓN DE XILANASA EN LA SACARIFICACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS POR CELULASAS	60
V.	DISCUSIÓN	64
VI.	CONCLUSIONES	75
	REFERENCIAS	77
VII.	ANEXO	83

7.1 ANEXO DE RESULTADOS	83
7.1.1 Cromatografía de afinidad por metales de TrSWO	83
7.1.2 Modelo 3D de TrSWO.....	84
7.1.3 Modelo 3D de GtXYL1	85
7.1.4 Análisis de glicosilaciones en GtXYL1.....	86
7.1.5 Zimograma original de GtXYL1	87
7.2 ANEXO DE BIBLIOGRAFÍA	88
7.2.1 Mapas de vectores utilizados.....	88
7.2.2 Generación de insertos multicopia en <i>Pichia pastoris</i>	90

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE LA LIGNOCELULOSA.	3
FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LA CELULOSA.....	4
FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA HEMICELULOSA	5
FIGURA 4. DEGRADACIÓN DE CELULOSA: ENZIMAS Y SITIOS DE ACCIÓN	8
FIGURA 5. DEGRADACIÓN DE HEMICELULOSA: ENZIMAS Y SITIOS DE ACCIÓN	9
FIGURA 6. SINERGIA ENTRE XILANASA Y CELULASAS	10
FIGURA 7. MODELO DEL FUNCIONAMIENTO DE LAS EXPANSINAS EN LA RELAJACIÓN DE LA PARED CELULAR VEGETAL	11
FIGURA 8. SINERGIA ENTRE SWOLLENINA Y CELULASAS.	13
FIGURA 9. ESQUEMA DE LA ESTRATEGIA DE CLONAMIENTO DE AMBOS GENES	37
FIGURA 10. ALINEAMIENTO DE LAS CONSTRUCCIONES RESULTANTES DE LAS ETAPAS DE CLONAMIENTO DE <i>TrSWO</i>	38

FIGURA 11. ALINEAMIENTO DE LAS CONSTRUCCIONES RESULTANTES DE LAS ETAPAS DE CLONAMIENTO DE <i>GTXYL1</i>	39
FIGURA 12. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TrSWO.....	40
FIGURA 13. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GTXYL1.....	41
FIGURA 14. PROTEÍNAS RESULTANTES DE LA INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TrSWO EN <i>PICHIA PASTORIS</i>	42
FIGURA 15. PROTEÍNAS RESULTANTES DE LA INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GTXYL1 EN <i>PICHIA PASTORIS</i>	43
FIGURA 16. SEPARACIÓN DE TrSWO DESDE EL SOBRENADANTE DE <i>P. PASTORIS</i> MEDIANTE AEC	45
FIGURA 17. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS CONTENIDAS EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFÍA AEC DE TrSWO	46
FIGURA 18. SEPARACIÓN DE GTXYL1 DESDE EL SOBRENADANTE DE <i>P. PASTORIS</i> MEDIANTE AEC	47
FIGURA 19. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS CONTENIDAS EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFÍA AEC DE GTXYL1..	48
FIGURA 20. ZIMOGRAMA	49
FIGURA 21. CURVA DE PROGRESO DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE GTXYL1 A DISTINTAS TEMPERATURAS	50
FIGURA 22. TEMPERATURA ÓPTIMA DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE GTXYL1 A LOS 10 MIN DE REACCIÓN	51
FIGURA 23. ACTIVIDAD DE GTXYL1 EN DIFERENTES AMORTIGUADORES	52
FIGURA 24. PH ÓPTIMO DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE GTXYL1	53
FIGURA 25. EFECTO DEL ION Ca^{2+} AÑADIDO EN LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE GTXYL1	53
FIGURA 26. TERMOESTABILIDAD DE GTXYL1 A 50°C.	55
FIGURA 27. TERMOESTABILIDAD DE GTXYL1 A 80°C	56
FIGURA 28. TERMOESTABILIDAD DE GTXYL1 A 50°C Y 80°C.....	57
FIGURA 29. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD RESIDUAL DE GTXYL1 CON XILANASAS COMERCIALES A 50°C	59
FIGURA 30. GTXYL1 TRATADA CON PNGASA F.....	60
FIGURA 31. HIDRÓLISIS DE PAJA DE TRIGO POR CELLUCLAST® 1.5L SUPLEMENTADA CON GTXYL1.....	61

FIGURA 32. SINERGISMO ENTRE CELLUCLAST® 1.5L Y GTXYL1	63
FIGURA 33. PERFIL CROMATOGRÁFICO IMAC TrSWO.....	83
FIGURA 34. MODELO 3D DE TrSWO.....	84
FIGURA 35. MODELO 3D DE GTXYL1.....	85
FIGURA 36. ANÁLISIS DE POTENCIALES GLICOSILACIONES EN GTXYL1.....	86
FIGURA 37. ZIMOGRAMA ORIGINAL.....	87
FIGURA 38. MAPA DEL VECTOR DE CLONAMIENTO PGEM®-T EASY	88
FIGURA 39. MAPA DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN PPIC9K Y PPIC3.5K	89
FIGURA 40. GENERACIÓN DE INSERTOS MULTICOPIA EN <i>PICHA PASTORIS</i>	90

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. LISTADO DE REACTIVOS Y KITS.....	15
TABLA 2. LISTA DE LOS EQUIPOS.....	16
TABLA 3. COMPOSICIÓN MEDIOS DE CULTIVOS	17
TABLA 4. CEPAS	18
TABLA 5. PLÁSMIDOS	19
TABLA 6. PARTIDORES	20
TABLA 7. PARTIDORES CONTINUACIÓN	20
TABLA 8. ENZIMAS	21
TABLA 9. COMPOSICIÓN DE LA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN CON HIGH-FIDELITY DNA POLIMERASA	24
TABLA 10. PROGRAMA PARA AMPLIFICAR CON HIGH-FIDELITY DNA POLIMERASA	25
TABLA 11. HIDRÓLISIS PAJA DE TRIGO CON CELLUCLAST® 1.5L Y GTXYL1.....	35
TABLA 12. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE GTXYL1 Y OTRAS XILANASAS COMERCIALES A 50°C.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

BMGY	Medio complejo glicerol mínimo tamponado
BMMY	Medio complejo metanol mínimo tamponado
BSA	Albúmina de suero bovino
CBM	Módulo de unión a carbohidratos
cDNA	DNA complementario
CMC	Carboximetil celulosa
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
GH	Glicosil Hidrolasa
GtXYL1	Xilanasa 1 proveniente de <i>Gloeophyllum trabeum</i>
AEC	Cromatografía de intercambio aniónico
IMAC	Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
L _(kDa)	Estándar de peso molecular en kDa
LB	Medio Luria-Berthani
MeOH	Metanol
OD	Densidad Óptica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto Isoeléctrico
PNGasa F	Péptido N-Glicosidasa F
RBD	Medio de regeneración dextrosa
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBST	Detergente Tween [®] -20 salino tamponado con Tris
TrSWO	Swollenina proveniente de <i>Trichoderma reesei</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YPD	Medio extracto de levadura peptona dextrosa

RESUMEN

El elevado costo y el suministro no renovable del petróleo han enfocado la atención en otras alternativas para fabricar químicos, combustibles, solventes y polímeros a partir de biomasa. La lignocelulosa es un recurso primario, sustentable, de bajo costo y alta disponibilidad, que ha ganado relevancia por ser una fuente con una huella de carbono mínima. Además, suele ser un desecho de la agroindustria por lo que reutilizarlo ofrece una gran oportunidad de obtener una mayor utilidad.

La biomasa lignocelulósica como materia prima presenta un problema, la complejidad de su estructura dificulta su degradación y por consecuencia se requiere una gran concentración de enzimas celulasas, lo cual encarece el proceso. Por esta razón el objetivo de esta tesis es evaluar el efecto de la mezcla de proteínas con actividad expansina y xilanasas sobre la acción hidrolítica de celulasas en residuos lignocelulósicos. Para ello se produjo de forma recombinante una Swollenina (TrSWO) y una xilanasas (GtXYL1), obteniéndose 0,24 y 0,22 g de proteína/L de cultivo respectivamente. Ambas fueron concentradas y purificadas con cromatografía de intercambio aniónico. GtXYL1 fue caracterizada obteniéndose los parámetros óptimos 80°C y pH entre 4 - 5, además presenta una actividad específica de 11.567 U/mg y una destacable termoestabilidad a 50°C. Se realizaron ensayos de hidrólisis en paja de trigo con Celluclast® 1.5L junto a GtXYL1 y los resultados indican que se obtiene un 62% más de azúcares liberados en comparación a Celluclast® 1.5L por sí sola. Se concluye que hay un efecto de sinergismo entre ambas enzimas.

ABSTRACT

The rising cost and non-renewable supply of oil have focused the attention on alternative routes to make chemicals, fuels, and solvents from biomass instead. Lignocellulose is a unique, low-cost, highly available sustainable primary resource that has gained relevance for being a source with a minimum carbon footprint. In addition, it is usually a waste of the agroindustry so reuse it offers a great opportunity to obtain higher profits.

Lignocellulose as raw material presents a problem; the complexity of its structure hinders its degradation and consequently requires a large concentration of cellulase enzymes, which makes the process more expensive. For this reason, the aim of this thesis is to evaluate the effect of proteins with expansin-like activity and xylanase mixture on the cellulases hydrolytic action over lignocellulosic residues. For this, a Swollenin (TrSWO) and a xylanase (GtXYL1) were produced recombinantly, obtaining 0,24 and 0,22 g of protein/L of culture respectively. Both were concentrated and purified with anionic exchange chromatography. GtXYL1 was characterized obtaining its optimum parameters 80 °C and pH 4 - 5 range. It also presents a specific activity of 11,567 U/mg and a remarkable thermostability at 50°C. Hydrolysis assays were performed on wheat straw with Celluclast® 1.5L and GtXYL1. The results indicate 62% more sugars released in comparison with Celluclast® 1.5L by itself. It is concluded that there is a synergistic effect between both enzymes.

I. INTRODUCCIÓN

Para cubrir las necesidades básicas del ser humano se necesita alimento, energía y materiales. Desde la revolución industrial, la gran mayoría de los compuestos en base a carbono y la energía provienen de los combustibles fósiles. Sin embargo las fuentes de carbón fósil son finitas, de suministro variable y un precio elevado¹. Además, han tenido un efecto innegable sobre el ambiente debido a una gran generación de desechos y a la liberación de gases de efecto invernadero².

La sociedad ha tomado conciencia de estos hechos y se ha vuelto imperativo buscar fuentes alternativas a los compuestos derivados del petróleo³. Una alternativa es utilizar desechos como la biomasa, que se define como: “materia orgánica renovable de origen vegetal, animal o procedente de la transformación natural o artificial de la misma”^{4,5}. La biomasa vegetal o lignocelulósica es un recurso primario sustentable único, de bajo costo y alta disponibilidad, es la biomasa más abundante del planeta y ha ganado relevancia por ser una fuente de carbono neutral^{3,6-8}. Mediante la hidrólisis de ésta se pueden obtener principalmente lignina y carbohidratos, que posteriormente pueden ser tratados para fabricar químicos, combustibles, solventes y polímeros^{1,7}.

Los azúcares obtenidos a partir de biomasa pueden ser fermentados generando etanol o butanol para ser utilizados como biocombustible. El etanol por su parte también puede ser deshidratado para generar etileno, compuesto muy versátil con el que se puede producir óxido de etileno y etilenglicol, o ser polimerizado a polietileno, uno de los plásticos más comunes. Otro tipo de fermentación de los azúcares puede resultar en ácido

láctico, utilizado en la producción de poli-ácido láctico, un plástico biodegradable con propiedades muy similares a los polímeros derivados del petróleo utilizados hoy en día en empaque, fibras y espumas. Los azúcares también pueden pasar directamente por el proceso de deshidratación catalizada por ácido, que genera furfural y 5-hidroximetil-furfural (5-HMF) como producto. Ambos compuestos son una plataforma prometedora para moléculas orgánicas. El compuesto 5-HMF puede fácilmente convertirse en di-metilfurano que se utiliza como solvente y combustible. También se puede convertir en ácido 2,5-furanodicarboxílico, que es fácilmente utilizado como producto químico debido a su facultad de copolimerizar con etilenglicol, lo que permite fabricar un polímero renovable con propiedades similares a los polímeros PET utilizados en la industria textil y de empaque.⁷

Chile se puede beneficiar utilizando la biomasa como materia prima, debido a que una de las fuentes principales de ingresos del país es la exportación silvoagropecuaria. En la temporada agrícola 2013-2014 la superficie sembrada de cultivos anuales esenciales, que corresponden a cereales, cultivos industriales (raps, maravilla, etc.), leguminosas y tubérculos fue de 719.973 hectáreas⁹, lo cual corresponde a 8,5 veces la superficie del gran Santiago. A partir de estos cultivos se genera una gran cantidad de residuos, en la misma temporada 2013-2014 la producción de paja a partir de los cultivos esenciales fue de 5 millones de toneladas, en donde los principales contribuyentes son trigo, maíz y avena. Una parte de estos residuos tienen como destino ser forraje para animales y lo demás se elimina mediante quemas, práctica muy peligrosa, contaminante y nociva para los suelos¹⁰, por lo que reutilizarlos ofrece una gran oportunidad de obtener una mayor utilidad.

La lignocelulosa como materia prima presenta un problema, la complejidad de su estructura dificulta su degradación. Normalmente para su degradación de forma biológica se utilizan enzimas llamadas celulasas, pero se necesitan usar grandes cantidades lo cual encarece el proceso¹¹.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Lignocelulosa

La lignocelulosa es el componente de la pared celular de las plantas, que consiste en hebras de celulosa entrecruzadas con hebras de hemicelulosa y lignina formando una matriz rígida¹² (Figura 1). La composición porcentual de cada polímero varía entre especies, en el caso de las maderas duras el contenido de celulosa y hemicelulosa es mayor, en cambio las maderas blandas presentan mayor contenido de lignina. Dentro de una misma especie la composición varía según la edad, etapa de crecimiento y tejido¹³.

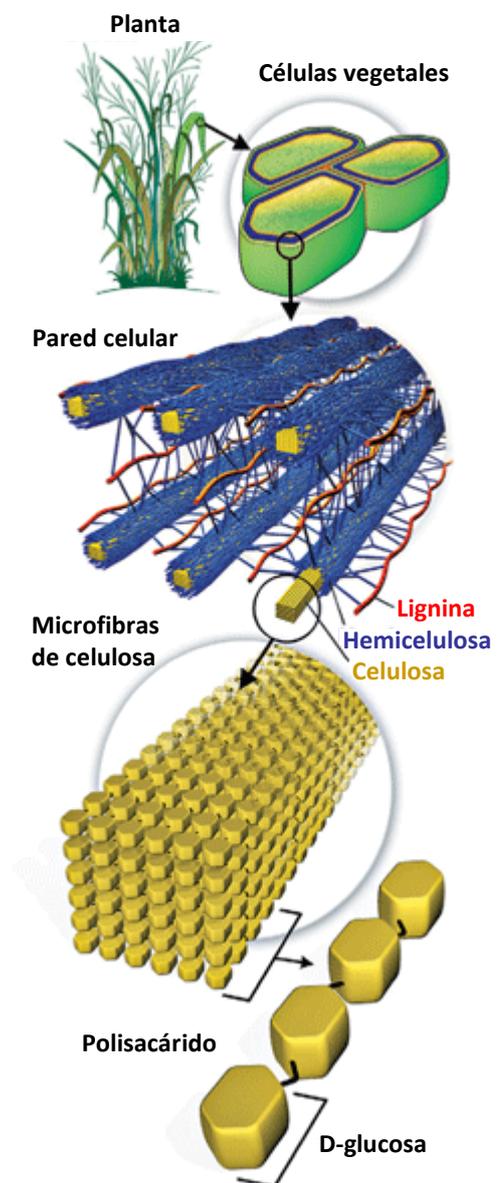


Figura 1. Estructura de la lignocelulosa. Modificado de Ritter 2008¹²

2.1.1 Celulosa

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza, altamente estable e insoluble en agua¹⁴. Es el principal componente de la pared celular y constituye el 50% del peso seco de las plantas. Consiste en unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces β 1-4 que forman un dímero llamado celobiosa, los que a su vez se estructuran en cadenas poliméricas lineales de alrededor de 8.000 – 12.000 unidades de glucosa. En la naturaleza no existen como cadenas simples, por lo que dichas cadenas o filamentos se organizan unidos por puentes de hidrógeno en microfibrillas cristalinas. Poseen un diámetro de 5 a 15 nm que contienen desde 36 a 1200 filamentos, los cuales se disponen dejando un extremo reductor y otro extremo no reductor^{13,14} (Figura 2).

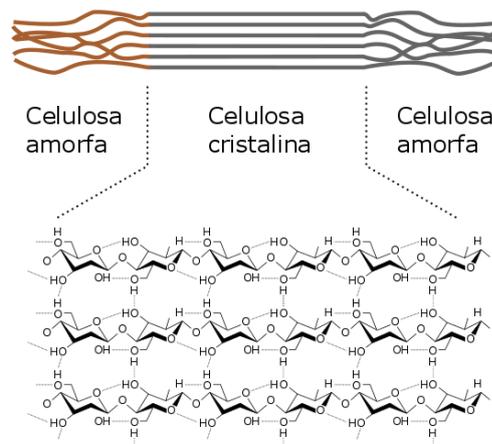


Figura 2. Estructura de la celulosa. Modificado de Quiroz-Castañeda & Folch Mallol 2011¹³

2.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polímero más abundante en la naturaleza y constituye entre el 25 al 30% del peso seco de la planta¹³. Es un polímero muy heterogéneo compuesto principalmente por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa). Usualmente se

encuentran acetiladas formando cadenas ramificadas, junto con los azúcares ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, unidos por enlaces por enlaces β 1-4 y ocasionalmente β 1-3 (Figura 3).

La hemicelulosa usualmente se clasifica según el azúcar que se encuentra en mayor proporción formando el esqueleto principal del polímero en xilano, xiloglucano, mananos, glucomananos y glucanos¹⁴. El xilano es el componente más abundante (70%) que corresponde a la unión de 2 moléculas de D-xilosa unidas por un enlace glicosídico β 1-4 y se ramifican por medio de enlaces glicosídicos β 1-2. El xilano puede estar sustituido y originar arabinoxilanos, glucoxilanos y glucuronoarabinoxilanos.

La función más importante de la hemicelulosa es ser el puente que une a la celulosa y la lignina, lo cual otorga mayor estabilidad y rigidez a la lignocelulosa. La lignina y la hemicelulosa se unen a través de enlaces del tipo éster entre la arabinosa de la hemicelulosa y los hidroxilos presentes en la lignina, mientras que la unión de celulosa y hemicelulosa está dada por una unión mediante puentes de hidrógeno^{13,14}.

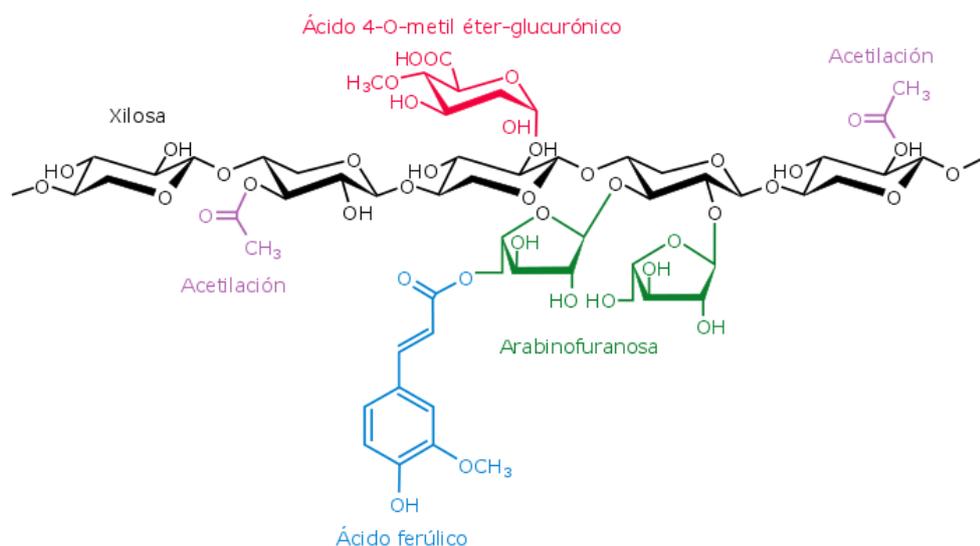


Figura 3. Estructura de la hemicelulosa. Modificado de Menon and Rao 2012¹⁵

2.1.3 Lignina

Este polímero da rigidez y protege a los polisacáridos estructurales de la celulosa y hemicelulosa confiriendo soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque de microorganismos, por lo cual es el componente más difícil de degradar de la lignocelulosa¹⁶. Constituye del 20 al 30% de la madera de los árboles.

La lignina es un heteropolímero irregular, insoluble y ramificado, formado por la polimerización de 3 alcoholes aromáticos del tipo fenilpropano: alcohol cumarínico, conifetílico y sinapílico unidos por enlaces C-C y enlaces del tipo éter entre los anillos aromáticos. El constituyente principal de las maderas suaves es el alcohol coniferílico y en las maderas duras es el alcohol cumarínico y sinapílico¹⁶.

2.1.4 Degradación de la lignocelulosa

Existen organismos que tienen la capacidad de utilizar compuestos lignocelulósicos como fuente de carbono, como por ejemplo, bacterias aerobias del tipo actinomicetales y bacterias anaerobias del tipo clostridiales¹³. También encontramos hongos anaerobios como los chitrimiocetos que habitan el tracto gastrointestinal de los rumiantes y los hongos aerobios ascomicetos y basidiomicetos siendo los últimos los más eficientes en el proceso de descomposición. Dentro de los ascomicetos y basidiomicetos hay varios géneros celulolíticos como *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Schizophyllum*, *Volvariella*, *Pycnoporus* *Bjerkandera*, *Gloeophyllum*. Los más estudiados por

su importancia industrial son *Trichoderma reesei* y *Phanerochaete chrysosporium*^{8,13,17}.

Dichos organismos para poder realizar la degradación de la celulosa, componente principal de la lignocelulosa, requieren a las enzimas celulasas pero además, son necesarias enzimas especializadas para cada componente de la matriz, a las cuales se les denomina enzimas auxiliares, por el papel que ejercen liberando el entramado que protege a la celulosa. Dentro de este grupo encontramos a las hemicelulasas, ligninasas, expansinas entre otras⁸. Estas enzimas son brevemente descritas a continuación.

2.1.4.1 Celulasas

Las celulasas se clasifican en tres grupos según su actividad catalítica: exoglucanasas, endoglucanasas y β -glucosidasas¹⁴ (Figura 4). Las exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH) (EC 3.2.1.74; 1,4- β -D-glucano-glucanohidrolasa y EC 3.2.1.91; 1,4- β -D-glucano-celobiohidrolasa) actúan sobre los extremos reductor y no reductor de las cadenas del polisacárido de celulosa, liberando celobiosa como producto principal. Estas enzimas representan del 40 al 70% del sistema de celulasas.

Las endoglucanasas (EG) (EC 3.2.1.4; 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasa) fragmentan aleatoriamente en sitios amorfos internos de la cadena de celulosa, generando oligosacáridos de diferentes longitudes y nuevos extremos susceptibles a ser hidrolizados por exoglucanasas. Por esta razón se considera que estas enzimas son las que comienzan con el ataque azaroso¹³.

Las β -glucosidasas (BGL) (EC 3.2.1.21) se encargan de la hidrólisis de la celobiosa liberando dos moléculas de glucosa, la cual es fuente de carbono fácilmente metabolizable^{13,14}.

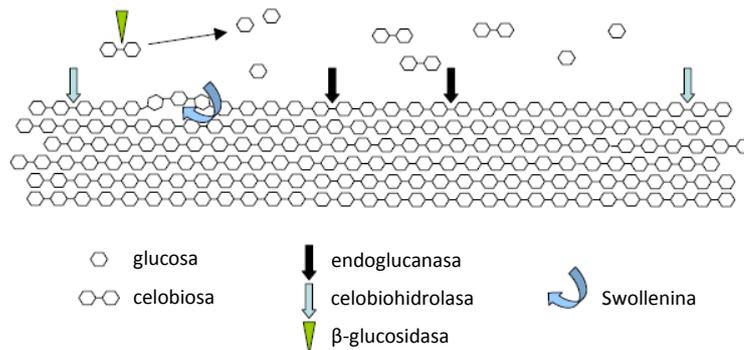


Figura 4. Degradación de celulosa: enzimas y sitios de acción. Modificado de Aro, Pakula and Penttilä 2005¹⁴

2.1.4.2 Hemicelulasas

La hemicelulosa se biodegrada para formar azúcares monoméricos y ácido acético¹⁴ (Figura 5). El xilano es su componente principal, por lo tanto las xilanasas son las principales enzimas encargadas de la degradación de la hemicelulosa. En este grupo se encuentran las endoxilanasas (EC 3.2.1.8; endo-1,4- β -D-xilanasas) que actúan sobre la cadena principal y las β -xilosidasas (EC 3.2.1.37; xilano 1,4- β -xilosidasas) que liberan xilosa a partir del rompimiento de los oligosacáridos de xilano^{13,14}.

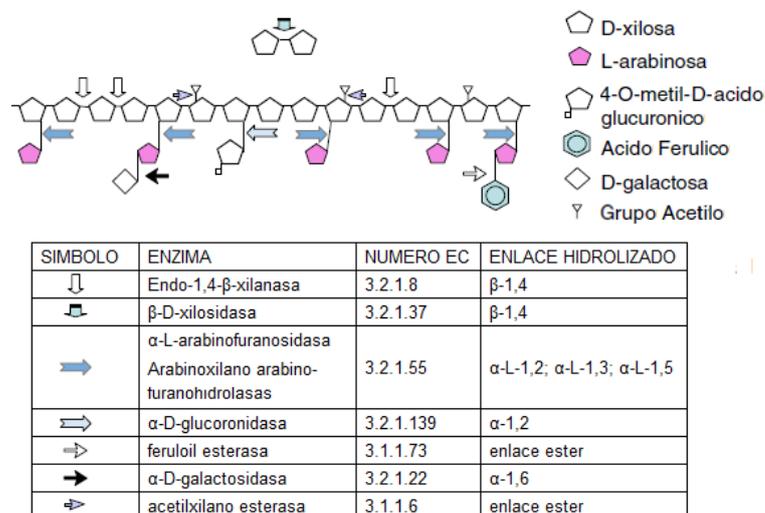


Figura 5. Degradación de hemicelulosa: enzimas y sitios de acción. Modificado de Aro, Pakula and Penttilä 2005¹⁴

Las xilanasas se encuentran clasificadas en las familias de glicosil hidrolasas (GH) 5, 8, 10, 11, 30 y 43, basado en su estructura y modo de acción^{18,19}. Sin embargo, la gran mayoría de los estudios están centrados en las xilanasas de las familias GH10 y GH11¹⁸, las que difieren en la afinidad por el sustrato, en su sitio activo y su mecanismo de acción. Las xilanasas GH11, conocidas como las verdaderas xilanasas, tienen una gran especificidad por sustratos que contienen D-xilosa y se caracterizan por actuar en zonas sin ramificaciones del polímero hemicelulosa. Estas enzimas se caracterizan por tener un bajo peso molecular (<30 kDa) y un alto pl. Las xilanasas GH10 tienen menor especificidad por el sustrato xilano y son capaces de degradar las zonas sustituidas o ramificadas de la estructura de hemicelulosa. Los miembros de esta familia por lo general tienen alto peso molecular (>30 kDa) y un bajo pl.¹⁹

Se ha podido apreciar en algunos estudios que las xilanasas mejoran la hidrólisis de la lignocelulosa por parte de las celulasas (Figura 6). Esto se

explica porque las xilanasas cumplirían un rol muy importante al momento de facilitar el acceso de las celulasas a la celulosa, puesto que como se mencionó anteriormente, la hemicelulosa está compuesta principalmente por xilano y tiene como función estabilizar la unión entre celulosa y lignina²⁰.

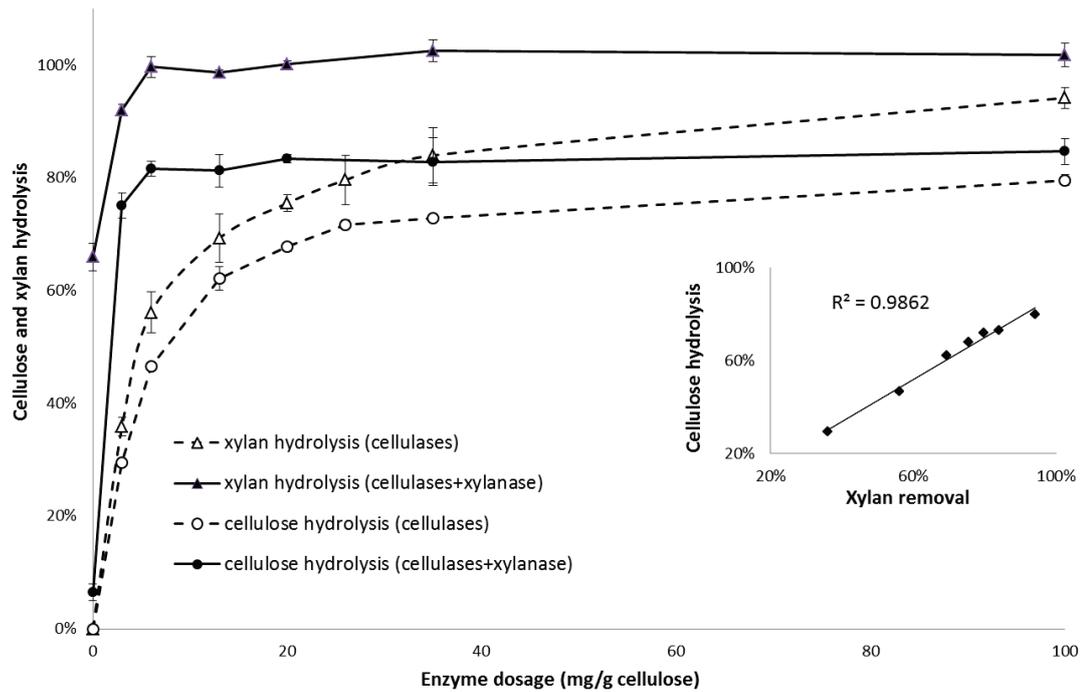


Figura 6. Sinergia entre xilanasa y celulasas. Conversión de rastrojo de maíz pretratado al vapor (SPCS en inglés) a distintas dosis de celulasa con o sin suplementación de xilanasa (60 mg/g de celulosa) después de 72 h de hidrólisis. Relación entre la remoción de xilano y conversión de celulosa luego de 72 h de hidrólisis a distintas dosis de enzima. Línea continua: hidrólisis en presencia de xilanasa, línea punteada: hidrólisis en ausencia de xilanasa. Modificado de Hu, Arantes and Saddler 2011²⁰.

2.1.4.3 Ligninasas

La despolimerización de la lignina involucra enzimas oxidativas extracelulares que liberan productos altamente inestables y que luego sufren reacciones oxidativas¹³. Los hongos de pudrición blanca son los degradadores de lignina más eficientes, que poseen lacasas y peroxidasas. Estas últimas se dividen en dos grupos: Ligninoperoxidasa (LiP, EC 1.11.1.14) y peroxidasa dependiente

de magnesio (MnP; EC 1.11.1.13), ambas son oxidoreductasas que catalizan reacciones oxidativas de compuestos fenólicos y no fenólicos dependientes de peróxido de hidrógeno, necesarias para la degradación de la lignina. Las lacasas (EC 1.10.3.1; p-difenol dioxígeno oxidoreductasa) son polifenoloxidasas que catalizan la oxidación de muchos compuestos fenólicos y no fenólicos en presencia de mediadores, acoplado la reducción de oxígeno molecular en agua^{13,14}.

2.1.4.4 Expansinas

Las expansinas son proteínas que están involucradas en la remodelación de la pared celular de las plantas induciendo la extensibilidad y el relajamiento de las paredes. No tienen actividad hidrolítica, por lo cual se ha propuesto que las expansinas rompen los puentes de hidrógeno que se encuentran entre los filamentos de celulosa o entre glucosas y otros polisacáridos mediante un mecanismo no enzimático²¹ (Figura 7). Estas proteínas están compuestas por dos dominios (dominio I y dominio II). Se considera que son parte de una superfamilia que está dividida en cuatro familias: α expansinas (EXPA), β expansinas (EXPB), proteínas tipo α

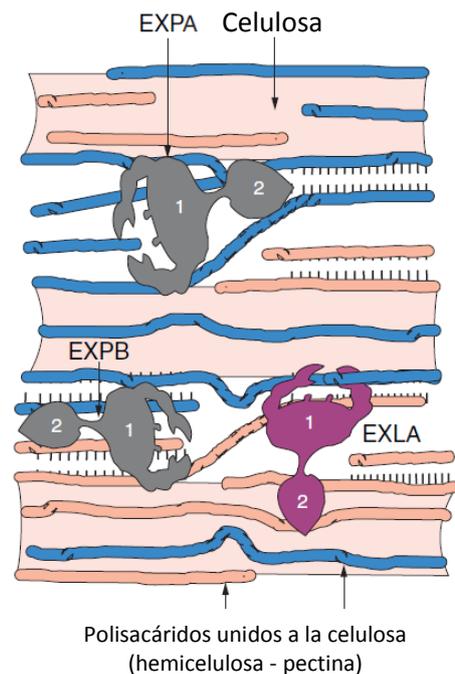


Figura 7. Modelo del funcionamiento de las expansinas en la relajación de la pared celular vegetal. Modificado de Sampedro and Cosgrove 2005²¹

expansinas (EXLA) y proteínas tipo β expansina (EXLB)^{13,21,22}.

Fueron aisladas por primera vez desde semillas de pepino y se les asoció con el crecimiento celular dependiente del pH conocido como “crecimiento ácido”, además se vio que al aplicarlas sobre tejido celular de plantas producen relajación de la pared^{21,22}. En otros estudios se mostró que bajo el efecto de las hormonas giberalina y auxina había un aumento en el mRNA de expansinas, y al utilizar un antisentido para el gen de expansina se inhibía el crecimiento. Luego se descubrió que alérgenos del polen de pasto, llamados alérgenos del grupo-1, tenían cierta similitud con las expansinas. En algunos estudios se vio que estos alérgenos poseían la actividad característica de las expansinas de relajar la pared celular, pero sólo en el estigma de pasto facilitando así la polinización. A estos alérgenos se les denominó β expansinas para diferenciarlas de las anteriores, a las cuales se les llamó α expansinas²².

Posteriormente se descubrieron a las proteínas tipo expansina (α y β), que difieren de las EXPA y EXPB, porque carecen de un motivo His-Phe-Asp (HFD) presente en el dominio I¹³. Existe un último grupo de proteínas tipo expansina llamadas tipo expansina X (EXLX) que tienen una homología con las EXLA y EXLB pero pertenecen a otros organismos como hongos y bacterias¹³.

Existen también proteínas que presentan solo uno de los dominios, ya sea el I o II, que no pueden ser clasificadas como expansinas propiamente tal, pero presentan una actividad similar²¹. Este es el caso de Swollenina, que tiene actividad tipo expansina y posee el dominio II junto con un dominio de unión a celulosa (CBD)^{13,21,23}.

Hay estudios en donde se ha visto que las expansinas mejoran la hidrólisis de la lignocelulosa por parte de las celulasas²⁴. Con Swollenina también se han visto dichos efectos²⁵ como se muestra en la Figura 8, esto puede deberse a que Swollenina al relajar la estructura cristalina de la celulosa genera más puntos de ataque para que actúen las celulasas.

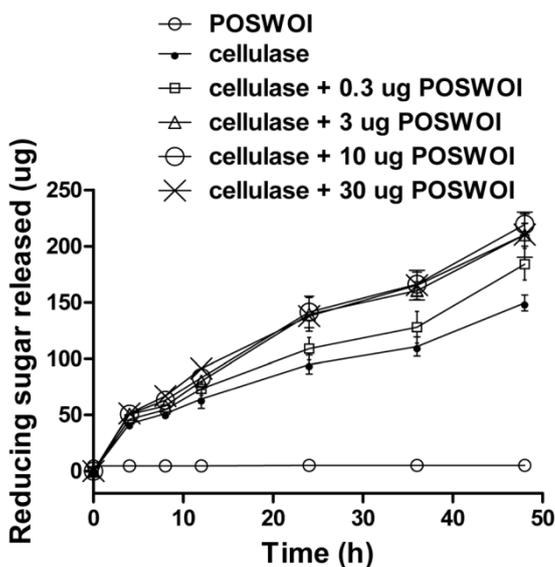


Figura 8. Sinergia entre Swollenina y celulasas. Distintas cantidades de POSWOI purificada (0,3; 3; 10; 30 μ g) y a una cantidad fija de celulasas (0,002 FPU) fueron incubadas con 2.5 mg de Avicel en 250 μ L de acetato de sodio 0,005 M a 50°C. Se recolectaron muestras a 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h respectivamente y los azúcares reductores fueron evaluados con DNS. Las reacciones que contienen solo celulasas y solo POSWOI sirven de controles. Cada reacción fue realizada en triplicado y se muestra la desviación estándar. Modificado de Kang et al. 2013²⁵.

2.2 Investigación propuesta

Debido a la recalcitrancia de la materia prima se propuso utilizar enzimas auxiliares que degraden al entramado de lignocelulosa y dejen más expuesta a la celulosa, para que luego las celulasas realicen la sacarificación y así poder liberar una mayor cantidad de azúcares. Se propuso utilizar a los una xilanas GH10 proveniente de *Gloeophyllum trabeum* y Swollenina proveniente de *Trichoderma reesei*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la mezcla de proteínas con actividad tipo expansina y xilanasas sobre la acción hidrolítica de celulasas en residuos lignocelulósicos.

2.3 HIPOTESIS

La adición de xilanasas y proteínas con actividad expansina mejora la acción hidrolítica de celulasas sobre lignocelulosa.

2.4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la mezcla de proteínas con actividad expansina y xilanasas sobre la acción hidrolítica de celulasas en residuos lignocelulósicos.

2.5 OBJETIVO ESPECÍFICOS.

1. Producir de forma recombinante Swollenina y Xilanasas.
2. Identificar las mejores condiciones para la producción de Swollenina y Xilanasas en *Pichia pastoris*.
3. Realizar caracterización de las proteínas purificadas.
4. Evaluar el efecto de la adición de Swollenina y Xilanasas en la sacarificación de residuos lignocelulósicos por celulasas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

Tabla 1. Listado de reactivos y kits utilizados en esta tesis. Todos los reactivos son para análisis.

Proveedor	Reactivos y kits
BD and Company	LB broth base Miller, bacto agar, bacto triptona, extracto de levadura.
Bio-Rad	Dye Reagent Concentrate for Protein Assay,
Merck	cloroformo (99-99,4%), isopropanol (99,8%), etanol (99,9%), hidróxido de sodio, acetato de sodio, ácido acético, citrato de sodio, sulfato de amonio, ácido clorhídrico, cloruro de sodio, SDS, nitrato de plata, carbonato de sodio, formaldehido, ácido cítrico, urea, potasio dihidrógenofosfato, cloruro de calcio dihidratado, di-potasio hidrógenofosfato trihidratado.
Fermentas	IPTG, x-gal.
Fermelo	Agarosa Lafken.
Geneaid	Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit.
Life Technologies	SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Multi-Copy Pichia Expression Kit, 1 Kb Plus DNA Ladder, TRIzol.
Megazyme	D-xylose assay kit.
Promega	Wizard® Genomic DNA Purification kit, pGEM®-T and

	pGEM®-T Easy Vector Systems.
Randox	GLUC-PAP kit.
Santa Cruz Biotechnology	Geneticina.
Sigma	Bromuro de etidio, xilano (de madera de haya), CMC, tween 20, avicel.
Thermo Scientific	GeneJET Plasmid Miniprep Kit, SuperSignal® West HisProbe™ Kit.
Winkler	Ampicilina, glicerol, tris, acilamida-bispoliacrilamida.

3.1.2 Equipos

Tabla 2. Lista de los equipos utilizados en esta tesis.

Equipo	Modelo	Fabricante
Centrifugas	Sorvall RC 6 Plus	Thermo Scientific
	Centrifuge 5804 R	Eppendorf
	Centrifuge 5403	Eppendorf
Termocicladores	Smart Gradient PCR Thermal Cycler T960 Gradient Thermal Cycler PCR K960	Hangzhou Jingle Scientific Instruments Co.
Cámara de flujo laminar	SHC-4AX	Steamline Laboratory products
Incubadora	SI6R-2	Shel Lab

Lector de placas	Asys UVM340	Biochrom Ltd.
FPLC	AKTA Purifier 10	GE Healthcare Life Sciences

3.1.3 Composición de medios de cultivo

Tabla 3. Composición medios de cultivos utilizados para el crecimiento de todos los microorganismos utilizados en este trabajo.

Medio de cultivo	Composición
LB	Luria-Berthani extracto de levadura 0,5% p/v triptona 1% p/v cloruro de sodio 0,5% p/v
YPD	Extracto de levadura peptona dextrosa extracto de levadura 1% p/v glucosa 2% p/v peptona 2% p/v
RBD	Medio de regeneración dextrosa Sorbitol 1M glucosa 2% p/v YNB 1,34% p/v biotina 0,0004% p/v aminoácidos (- histidina) 0,005% p/v

BMGY	Medio complejo glicerol mínimo tamponado extracto de levadura 1% p/v peptona 2% p/v fosfato de potasio 100 mM pH 6 YNB 1,34% p/v biotina 0,0004% p/v glicerol 1% v/v
BMMY	Medio complejo metanol mínimo tamponado extracto de levadura 1% p/v peptona 2% p/v fosfato de potasio 100 mM pH 6 YNB 1,34% p/v biotina 0,0004% p/v metanol 0,5 - 1,5% v/v
Placas	Al medio liquido se le agrega agar-agar 2% p/v

3.1.4 Cepas

Tabla 4. Cepas utilizadas para clonar y para expresar.

Cepa	Genotipo	Fuente
E coli	$F' \{proAB, lacI^q, lacZ\Delta M15, Tn10(Tet^R)\}$	referencia ²⁶
TOP10F'	$mcrA, \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC), \phi 80lacZ\Delta M15, \Delta lacX74, deoR, recA1, \lambda^- araD139, \Delta(ara-leu)7697, galU, galK,$	

<i>rpsL(Str^R), endA1, nupG</i>			
P	pastoris	arg4 his4 aox1::ARG4	referencia ²⁶
KM71			
Gloeophyllum trabeum	Silvestre		Donación del profesor René Carmona de la Facultad de Ciencias forestales y de la Conservación de la Naturaleza
Trichoderma reesei	Silvestre		

3.1.5 Plásmidos

Tabla 5. Plásmidos. Vectores de clonamiento y expresión. Vector pPIC 3.5K no posee péptido señal de exportación, pPIC 9K incluye el péptido señal de levadura.

Plásmido	Característica	Uso	Referencia
pGEM-T easy	<i>lacZ</i> , ori f1, Amp ^R	Vector de clonamiento	referencia ²⁷
pPIC 3.5K	<i>his4 aox1</i> ori pBR322, Amp ^R , Kan ^R	Vector de expresión	referencia ²⁶
pPIC 9K	señal de secreción factor α <i>his4 aox1</i> ori pBR322, Amp ^R , Kan ^R	Vector de expresión	referencia ²⁶

3.1.6 Partidores

Tabla 6. Partidores utilizados en esta tesis

Partidor	Secuencia
TrSwoFull_FwAvrII_2	5'- CGCGGCGCGACCTAGGTATAATGTCTGGTAAGC TTATCCTC - 3'
TrSwoMad_FwAvrII_2	5'- GCGGCGCGACCTAGGTTATTTGGCCAATGT -3'
TrSwo_RvHisNotI	5'- GCGGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGATTC TGGCTAAACTG -3'
XGT1_PS_Fw_BamHI	5'- GGATCCTATAATGTCTATTTCTAAGACCT - 3'
XGT1_FwEcoRI	5'- GAATTCGCACCTCCTACTCCCGCC -3'
XGT1_Rev_AvrII	5'- CCTAGGTTACTGCCGCCAGCAAC -3'
5' AOX1	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
3' AOX1	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

Tabla 7. Partidores utilizados en esta tesis (continuación).

Partidor	Característica	Uso
TrSwoFull_FwAvrII_2	Sitio enzima restricción AvrII, TATA box, codón de inicio, TCT codón de preferencia en <i>P. pastoris</i> ²⁸ .	Clonar desde el hongo de origen
TrSwoMad_FwAvrII_2	Sitio enzima restricción AvrII	(XM_006969163.1),
TrSwo_RvHisNotI	Secuencia para cola de polihistidina, codón de	expresar

	término, sitio enzima de restricción NotI.	
XGT1_Ps_Fw_BamHI	Sitio enzima restricción BamHI, TATA box, codón de inicio, TCT codón de preferencia en <i>P. pastoris</i> ²⁸ .	Clonar desde el hongo de origen
XGT1_FwEcoRI	Sitio enzima restricción EcoRI.	(JN971032.1),
XGT1_Rev_AvrII	Codón de término, sitio enzima restricción AvrII.	expresar
5' AOX1	Partidores para gen <i>AOX1</i> de <i>P. pastoris</i> (sitio de inserción del gen recombinante).	Secuenciar <i>P. pastoris</i> transformadas
3' AOX1		

3.1.7 Enzimas

Tabla 8. Enzimas utilizadas en esta tesis

Enzima	Proveedor
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Life Technologies
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England biolabs
Enzimas de restricción AvrII, BamHI, NotI, Sall	New England biolabs
Rapid PNGase F	New England biolabs
Cellobiase <i>Aspergillus niger</i>	Sigma

cellulase <i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921 (Celluclast® 1.5L (Novozyme))	Sigma
Xylanase <i>Trichoderma viridae</i>	Sigma
Xylanase <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Sigma

3.2 Métodos

Los métodos utilizados para llevar a cabo este trabajo se encuentran especificados a continuación:

3.2.1. Condiciones de cultivo

Las bacterias se cultivaron rutinariamente a 37°C en caldo LB (Tabla 3). Para los cultivos con antibiótico se utilizó ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL. Para los medios de selección se utilizó al indicador cromogénico sustrato de la β-galactosidasa X-Gal a 40 µg/mL e IPTG a 0,5 mM.

Las levaduras se cultivaron rutinariamente a 30°C en medio YPD. Para los cultivos con antibiótico se utilizó geneticina a una concentración variable entre 0,25 – 2 mg/mL.

En ambos casos los cultivos en medio sólido se prepararon adicionando 15 g/L de agar-agar al medio líquido.

3.2.2 Estrategia de clonamiento de los genes de swollenina y xilanasa

El método utilizado para clonar fue amplificación por PCR junto con la utilización del vector de clonamiento pGEM-T easy. A partir de RNA se sintetizó cDNA y se amplificaron los genes desde los hongos *Trichoderma reesei* para Swollenina y *Gloeophyllum trabeum* para xilanasa. A continuación se explica detalladamente los pasos que se siguieron para clonar ambos genes.

3.2.2.1 Diseño de partidores específicos para el gen *Trsw*

Se diseñaron partidores específicos para amplificar Swollenina [XM_006969163.1], con la ayuda de la herramienta en línea *OligoAnalyzer® Tool* (Integrated DNA Technologies). Las características de cada partidore se encuentran detalladas en la Tablas 6 y 7. Para el diseño se considera utilizar el gen completo que incluye el péptido señal de exportación al cual se le denomina fragmento completo y la zona del gen que solo considera la proteína madura el cual se denomina fragmento maduro.

3.2.2.2 Síntesis y purificación de cDNA

La síntesis de cDNA a partir del RNA total de *Trichoderma reesei* se realizó con el kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante²⁹. El cDNA obtenido es purificado con el kit Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) siguiendo las indicaciones del fabricante para PCR Clean up³⁰.

3.2.2.3 Clonamiento de los genes de swollenina y xilanasa

Las amplificaciones para el clonamiento fueron realizadas con Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) y los PCR de colonias con GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega). A continuación se presenta la Tabla 9 con la composición de la reacción de amplificación y la Tabla 10 con el programa de amplificación utilizado:

Tabla 9. Composición de la reacción de amplificación con High-Fidelity DNA Polimerasa. El volumen total de reacción es de 25 μ L.

Reactivo	Cantidad [μ L]
Amortiguador 5X Phusion HF	5
dNTP's [10 mM]	0,5
Partidor directo [20 μ M]	1,25
Partidor reverso [20 μ M]	1,25
DMSO	0,75
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	0,25
DNA templado	0,5
H ₂ O	15,5

Tabla 10. Programa para amplificar con High-Fidelity DNA Polimerasa. Para Swollenina en los primeros 3 ciclos se utilizó una baja temperatura para que aparearan las zonas complementarias y luego en los siguientes 30 ciclos se subió para poder generar la adición de la cola de poli histidina.

		Temperatura	tiempo
3 ciclos	Desnaturación inicial	98°C	30 s
	Desnaturación	98°C	10 s
	Apareamiento	46°C	30 s
	Elongación	72°C	1 min
30 ciclos	Desnaturación	98°C	10 s
	Apareamiento	62°C	30 s
	Elongación	72°C	1 min
	Elongación final	72°C	5 min

A partir del cDNA de *Trichoderma reesei*, el gen de Swollenina se amplificó bajo las condiciones indicadas y se ligó al vector clonamiento pGEM-T easy. Se transformó *E. coli* qTOP10 con el producto de ligación. El sistema pGEM-T easy permite la selección de colonias blancas y azules mediante complementación de la beta-galactosidasa por lo tanto se seleccionaron las colonias blancas y con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific)³¹ se extrajeron los vectores pGEMT_Swo_f4.6, pGEMT_Swo_m2.25. A partir de dichos vectores se obtuvieron los fragmentos de interés mediante cortes del vector con las enzimas de restricción AvrII y NotI, el fragmento completo se ligó al vector de expresión pPIC 3.5K y el fragmento maduro se ligó al vector pPIC 9K con los cuales se transformó *E. coli* qTOP10. Se seleccionaron las colonias transformantes

mediante PCR de colonias con los partidores específicos para cada fragmento (Tabla 6) y nuevamente con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific)³¹ se extrajeron los vectores pPIC_Swo_f4.6_28 y pPIC_Swo_m2.25_14.

El gen de Xilanasa, proveniente del hongo *Gloeophyllum trabeum*, se encontraba en el vector pGEM-T easy resultado del trabajo de tesis realizado en el laboratorio por el alumno Javier Devia, por lo tanto se siguió el mismo procedimiento que con Swollenina, se utilizaron las enzimas de restricción AvrII, BamHI, EcoRI, y el fragmento maduro se ligó al vector pPIC9K resultando el vector de nombre Xyl_GH10-pPIC9Kc15.

Se transformó la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* KM71 (kit Multi-Copy *Pichia* Expression de Invitrogen)²⁶ con las construcciones pPIC_Swo_f4.6_28, pPIC_Swo_m2.25_14 para Swollenina y Xyl_GH10-pPIC9Kc15 para Xilanasa, todos linealizados con la enzima de restricción Sall. Las células transformadas fueron sembradas en placas con medio de selección deficiente de histidina RBD (Tabla 3), y se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias. Este paso permitió la primera selección de células transformantes mediante complementación de la mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa. Luego, las células fueron cambiadas al segundo medio de selección YPD (Tabla 3) con concentraciones de geneticina de 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 mg/mL y se eligieron los clones que fueron capaces de crecer en altas concentraciones del antibiótico.

Los distintos clones transformantes fueron corroborados mediante PCR, con partidores para el gen de la alcohol oxidasa 1 (*AOX1*) o con los partidores

específicos para cada gen (Tabla 6). Para ello se realizó una extracción de DNA genómico con el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega).

Todas las construcciones anteriormente mencionadas junto con la amplificación a partir del DNA genómico de los clones transformantes positivos de *P. pastoris* fueron enviados a secuenciar con el fin de corroborar que las secuencias fuesen las correctas.

3.2.3 Inducción de la expresión de GtXYL1 y TrSWO

Una vez corroborados los clones positivos se procede a realizar la inducción de las proteínas recombinantes. Para ello se comenzó con un preinóculo de *P. pastoris* transformada crecido en medio líquido YPD (Tabla 3) que se dejó crecer durante la noche. Al día siguiente 1 L de medio complejo glicerol mínimo tamponado BMGY (Tabla 3) se inoculó y las células se dejaron crecer hasta alcanzar la fase exponencial. Luego son cambiadas a 200 mL de medio complejo metanol mínimo tamponado BMMY (Tabla 3) para realizar la inducción con metanol. Se evaluaron las condiciones de inducción sobre *P. pastoris* a distintas concentraciones de metanol, temperaturas e intervalos de tiempo. Las condiciones son: concentraciones de metanol entre 0,5 – 1,5%, temperatura entre 20° – 30°C y los intervalos de tiempo de toma de muestra fueron 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h. Como control se utilizó a *P. pastoris* transformada con los vectores pPIC 3.5 K y 9K sin el inserto²⁶.

Alícuotas de 1mL fueron recolectadas cada 24h para verificar si la inducción fue exitosa mediante ensayos de actividad y electroforesis de geles en condiciones desnaturalantes.

3.2.4 Ensayo de actividad xilanásica

Rutinariamente los ensayos de actividad se realizan según el siguiente protocolo: todos se efectúan en una proporción de 25% enzima y 75% sustrato, en una placa de 96 pocillos. A 60 μ L de xilano 1% en amortiguador citrato 50 mM pH 5 se le agregan 20 μ L de enzima a la concentración deseada y se dejan reaccionar a 50°C por 10 min, como blanco no enzimático se reemplazan los 20 μ L de enzima por amortiguador citrato 50 mM pH 5,3. Luego para determinar la cantidad de azúcares reductores liberados se utiliza el método de DNS³², en el cual se agrega ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en una proporción 1 : 1 y se calienta a 100°C por 10 min, a continuación 100 μ L de las muestras se traspasan a una placa transparente de 96 para leer en un lector de placas su absorbancia a 550 nm. Las lecturas resultantes se comparan con una curva estándar realizada con distintas concentraciones de glucosa que va desde los 1,88 a 0,24 mg/mL.

Para calcular actividad se define una unidad [U] como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de glucosa equivalente por minuto bajo las condiciones de ensayo. Actividad se expresó como unidades por mL de reacción [U/mL] y actividad específica se expresó como unidades por mg de proteína [U/mg].

3.2.5 Gel desnaturalante de proteínas

Para fines de verificación de varios procedimientos como la inducción o purificación de proteínas se realizaron rutinariamente electroforesis de geles de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalantes a 200 V por 45 min. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie y/o con nitrato de plata dependiendo de la cantidad de proteínas cargadas inicialmente en el gel³³. Cuando fue necesario se utilizó el método de tinción con plata debido más sensible por lo que permite detectar bandas de proteína en bajas concentraciones³⁴.

3.2.6 Concentración de proteínas

Las proteínas del sobrenadante fueron concentradas por ultrafiltración en centricon (Vivaspin 20 VS2001) o concentrador tangencial (Amicon stirred ultrafiltration cell 8200) según las indicaciones del fabricante.

3.2.7 Purificación de proteínas

La purificación de xilanas se realizó por cromatografía de intercambio aniónico (AEC) con una columna de Q-sepharose de 20 mL. Se efectuó una gradiente de cero a 1 M de NaCl con 10 volúmenes de columna en amortiguador Tris-HCl 20 mM a pH 7.

La purificación de Swollenina se realizó por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) con una columna de Níquel – ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) de 2 mL. Se efectuó una gradiente de 20 mM a 250 mM

de imidazol con 20 volúmenes de columna en amortiguador fosfato 20 mM a pH 8 con NaCl 500 mM. Debido a que no fue posible purificar mediante IMAC se ejecutó el mismo procedimiento AEC que se hizo con xilanasas.

Ambos procedimientos se llevaron a cabo en un equipo AKTA-FPLC.

3.2.8 Caracterización de GtXYL1

La caracterización de GtXYL1 se llevó a cabo con los métodos que se describen a continuación:

3.2.8.1 Zimograma

Se realizó un gel de proteínas en condiciones nativas al 10% de poliacrilamida reemplazando la porción de agua por xilano de haya quedando al 0,4% final.

Todos los pasos previos al ensayo de actividad a 50°C se realizaron en frío. Se cargan dos geles, para realizar el experimento en duplicado, con GtXYL1 purificada y BSA como proteína control.

La corrida se hizo a 200 V por 45 min en frío. Una vez terminada se lavan los geles con Tritón X-100 2,5% por 30 min con agitación suave, este paso se ejecutó 2 veces y luego se lavó con agua desionizada por 5 min con agitación.

Se quitó el agua para agregar amortiguador citrato 50mM pH5 e incubar por 10 min. Se cambió el amortiguador y se incubó a 50°C por 45 min.

Inmediatamente se realizaron 4 lavados de 10 min cada uno con agua desionizada en agitación.

Un gel fue teñido con Rojo Congo al 0,1% por 20 min y en seguida se lavó con NaCl 1M hasta observar bandas traslúcidas.

El otro gel fue teñido con Azul de Coomassie y luego con nitrato de plata.

3.2.8.2 Ensayo de actividad a distintas temperaturas

Al igual que los ensayos anteriores, se llevan a cabo en una proporción de 25% enzima y 75% sustrato a distintas temperaturas, las cuales van de 10 en 10 grados Celsius desde los 40°C a los 100°C. En un tubo eppendorf de 1,5 mL a 900 µL de xilano 1% en amortiguador citrato 50 mM pH 5,3 se le agregan 300 µL de enzima a 4 ng/mL y se dejan reaccionar a la temperatura deseada por una hora tomando alícuotas cada 5 min, como blanco no enzimático se utiliza amortiguador citrato 50 mM pH 5,3. Luego para determinar la cantidad de azúcares reductores liberados en una placa de 96 pocillos a 80 µL de muestra se le agregan 80 µL de DNS y se calienta a 100°C por 10 min. A continuación 100 µL de las muestras se traspasan a una placa transparente de 96 pocillos para leer en un lector de placas su absorbancia a 550 nm, las lecturas resultantes se comparan con la curva estándar de glucosa.

3.2.8.3 Ensayo de actividad con disitintos amortiguadores

En este ensayo se prueban los amortiguadores acetato 50 mM pH 5, citrato 50 mM pH 5 y 6, fosfato 50 mM pH6, Tris-HCl 20 mM pH7. Para adecuarse a

reacciones con sustratos en diferentes amortiguadores el sustrato tiene una preparación distinta. Éste se prepara añadiendo amortiguador 4 veces concentrado al xilano 1,33% disuelto en agua quedando finalmente al 1% al pH deseado.

El ensayo de actividad se realiza de igual forma que la sección 3.2.4 con el amortiguador que se desea evaluar.

3.2.8.3 Ensayo de actividad a distintos pH

En este ensayo se prueban los pH 3; 4; 4,5; 5; 5,3; 6; 6,5; 7; 8. Para realizar las reacciones con sustratos a varios pH diferentes el sustrato se prepara añadiendo amortiguador 4 veces concentrado al xilano 1,33% disuelto en agua quedando finalmente al 1% al pH deseado. Para cubrir el rango de pH de 3 a 8 se utilizaron dos amortiguadores, citrato 50 mM para el rango de 3 a 6,5 y Tris-HCl 20 mM para el rango 7 y 8.

El resto del ensayo prosigue de la misma forma que los anteriormente realizados, con una proporción de 25% enzima y 75% sustrato. En una placa de 96 pocillos a 60 μ L de xilano 1 % un pH determinado se le agrega 20 μ L de enzima a una concentración de 40 ng/mL y se dejan reaccionar a 50°C por 10 min, como blanco no enzimático se utiliza amortiguador citrato 50 mM pH 5. Una vez terminados los ensayos se les agregan 10 μ L de amortiguador citrato 500 mM pH 5,3 con el fin de realizar todas las lecturas al mismo pH, porque el reactivo DNS se ve afectado por el pH. Para la determinación de azúcares reductores se procede de igual forma que los ensayos anteriores.

3.2.8.4 Ensayo de actividad a distintas concentraciones de ion calcio

El ensayo de actividad se realiza a las mismas condiciones anteriores adicionando a la reacción distintas concentraciones de CaCl_2 de 0, 10, 70 y 100 mM. En este ensayo para proporcionar el CaCl_2 a la reacción la dilución de la enzima se realiza en amortiguador citrato 200 mM pH5 mas CaCl_2 4 veces concentrado. En una placa de 96 pocillos a 60 μL de xilano 1% en amortiguador citrato 50 mM pH5 se le agregan 20 μL de enzima + CaCl_2 y se dejan reaccionar a 50°C por 10 min, como blanco no enzimático se reemplazan los 20 μL de enzima por amortiguador citrato 50 mM pH5. Para la determinación de azúcares reductores se procede de igual forma que los ensayos anteriores mediante el método de DNS.

3.2.8.5 Termoestabilidad

La termoestabilidad de la xilanasa se determinó mediante preincubación de la proteína a las temperaturas de 50°C u 80°C y midiendo la actividad residual a diferentes tiempo de preincubación. Para determinar la actividad residual a 50°C de la enzima a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se incubó en amortiguador citrato de sodio 50 mM pH 5 por hasta 17 días tomándose alícuotas cada cierto tiempo y midiendo su actividad sobre xilano 1% a pH 5 a 50°C por 10 min. Para comparar se realizó el mismo experimento con xilanasa comercial pura del hongo termófilo *Thermomyces lanuginosus*³⁵.

En el caso de la actividad a 80°C la enzima a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se incubó amortiguador citrato de sodio 50 mM pH 5 por 60 min tomándose

alícuotas cada 5 min y midiendo su actividad sobre xilano 1% a pH 5 a 50°C por 10 min al igual que en los ensayos de actividad anteriores.

3.2.8.6 Tratamiento con Péptido N-Glicosidasa F (PNGasa F)

A 20 µg de proteína se le trató con la enzima PNGase F (New England Biolabs) según las indicaciones del fabricante³⁶.

Para analizar los resultados se cargó 1 µg de proteína en un gel de proteínas en condiciones desnaturalantes, descrito en la sección 3.2.5.

3.2.8.7 Hidrólisis paja de trigo

La paja de trigo que se utilizó fue previamente picada, tamizada a 500 µm y pretratada con NaOH al 10%³⁷. La hidrólisis se realizó con paja de trigo al 1% (p/v) en amortiguador citrato 50 mM pH 5 con distintas concentraciones de Celluclast® 1.5L. Por cada concentración se realizaron dos reacciones, una adicionando GtXYL1 y otra adicionando BSA como proteína inerte para mantener la misma concentración de proteínas final. Se toman muestras cada 24 h hasta las 96 h, para medir la liberación de azúcares. Azúcares reductores se miden al igual que los ensayos de actividad anteriores con DNS, la xilosa se mide con el kit D-xylose assay (Megazyme) y la glucosa se mide con el kit GLUC-PAP (Randox) según las indicaciones de los fabricantes. Azúcares reductores, glucosa y xilano liberados se presentan como mmoles por mg de proteína en la reacción.

Tabla 11. Hidrólisis paja de trigo con Celluclast® 1.5L y GtXYL1. Concentraciones de Celluclast® 1.5L y GtXYL1 utilizadas para la hidrólisis de paja de trigo al 1% en amortiguador citrato 50 mM pH 5. Porcentaje de adición de GtXYL1 a Celluclast® 1.5L.

Celluclast® [µg/mL]	3,66	3,25	2,84	2,4	2,03	1,63	1,22	0,8	0,4	0
GtXYL1 [µg/mL]	1 0	2 0	3 0	4 0	5 0	6 0	7 0	8 0	9 0	10 0
% Adición	27	61	107	167	250	375	583	1000	2250	-

IV. RESULTADOS

4.1 Producción recombinante de xilanasa y de Swollenina

Para lograr realizar la producción recombinante se diseñó una estrategia de clonamiento obteniéndose los resultados que se muestran a continuación.

4.1.1 Diseño de partidores específicos para el gen *Trsw0*

Al momento de diseñar los partidores además de considerar la homología con el templado se consideraron otros aspectos importantes para obtener proteínas recombinantes de forma exitosa. Uno de ellos fue la adición de sitios de enzimas de restricción para poder ligar el gen a los vectores de expresión pPIC3.5K y pPIC9K. Con *Trsw0* se utilizan las enzimas *AvrII* y *NotI*, con *Gtxyl1* se utilizan las enzimas *AvrII*, *BamHI* y *EcoRI*.

Otro aspecto importante es que para proteínas recombinantes que son secretadas se debe probar qué péptido señal de exportación es el que funciona mejor para la secreción de la proteína, si el péptido señal del organismo hospedero que producirá la proteína o el péptido señal del organismo de donde proviene la proteína. Por lo tanto se diseñó un partidador directo sin señal de exportación para utilizar la de *Saccharomyces cerevisiae* contenida en el vector de expresión pPIC9K y otro con la señal de exportación propia del hongo de donde proviene el gen, al cual se le denominó partidador completo debido a que se considera la secuencia completa del gen. Además a este partidador se le añadió el codón TCT porque es un codón de preferencia en *P. pastoris*²⁸.

Por último en el caso de *Trswo* el partidador reverso contempla la secuencia de una cola de polihistidina para que se añada en extremo amino terminal de la proteína y así simplificar la detección y purificación.

4.1.2 Clonamiento de los genes *Trswo* y *Gtxyl1*

La estrategia de clonamiento se llevó a cabo en varias etapas que se detallan en el esquema de la Figura 9. De ella se obtienen las construcciones pGEM-T easy con gen de TrSWO madura (pGEMT_Swo_m2.25), pGEM-T easy con gen de TrSWO completa (pGEMT_Swo_f4.6), pPIC9K con gen de TrSWO madura (pPIC_Swo_m2.25_14), pPIC3.5K con gen de TrSWO completa (pPIC_Swo_f4.6_28), pPIC9K con gen de GtXYL1 madura (Xyl_GH10-pPIC9Kc15). Como resultado final se obtienen clones transformantes de *P. pastoris* resistentes a 2mg/mL de geneticina.

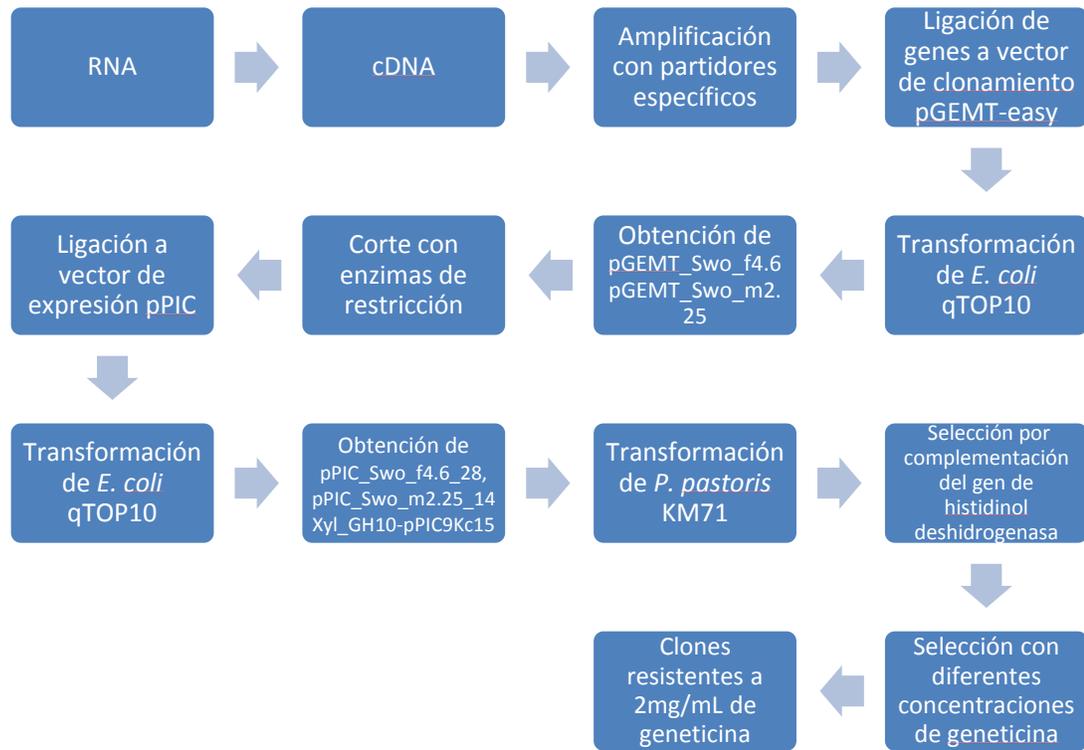


Figura 9. Esquema de la estrategia de clonamiento de ambos genes. Detalle de la estrategia con las distintas construcciones obtenidas en cada etapa. Con *Gtxyl1* se trabaja a partir de pGEM-T que anteriormente se clonó con la misma estrategia que se utilizó con *Trsw0*.

Todas las construcciones anteriormente mencionadas junto con la amplificación a partir del DNA genómico de los clones transformantes positivos de *P. pastoris* fueron enviados a secuenciar. Las secuencias obtenidas se tradujeron a proteína y se ejecutó el alineamiento de todas las etapas del clonamiento realizado junto con la secuencia nativa de cada proteína. En la Figura 10 se muestra el alineamiento de las etapas del clonamiento de *Trsw0* y en la Figura 11 se muestra el alineamiento de las etapas del clonamiento de *Gtxyl1*

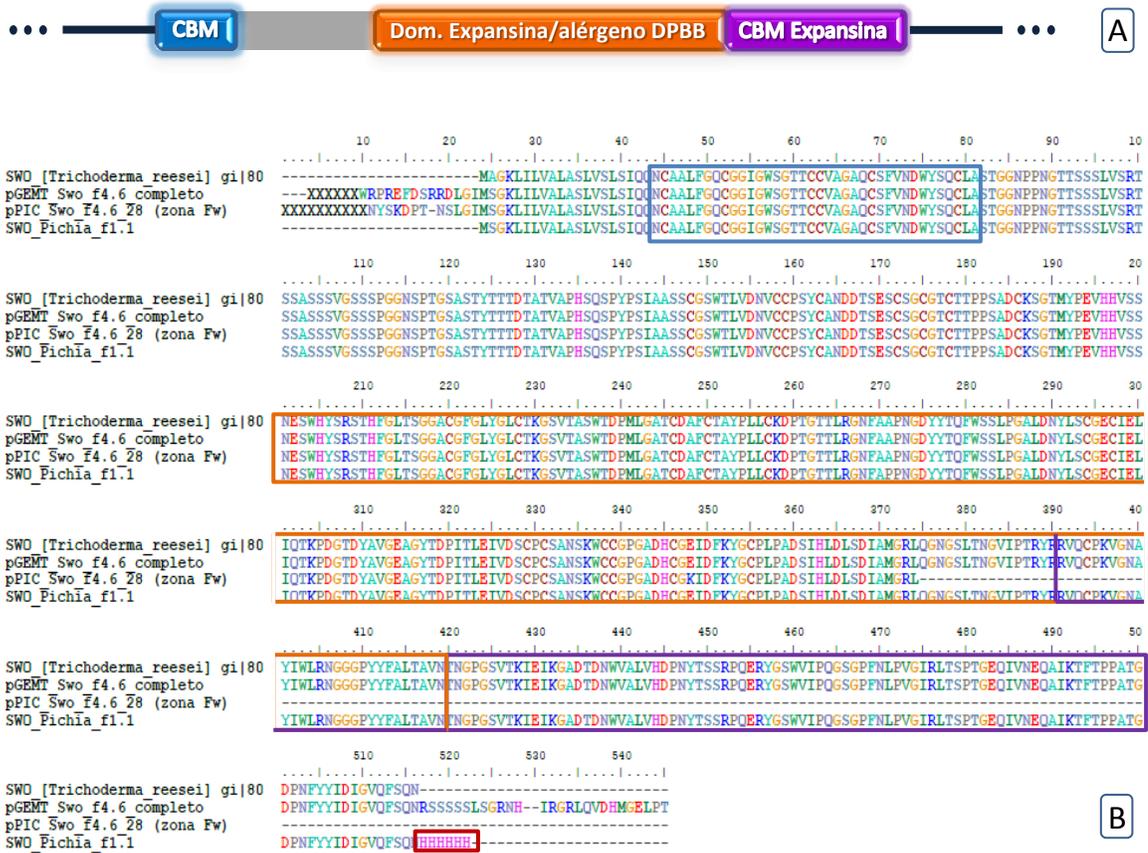


Figura 10. Alineamiento de las construcciones resultantes de las etapas de clonamiento de *Trsw*. A. Dominios de Swollenina nativa XP_006969225.1: dominio de unión a celulosa (CBM) en color azul, dominio Expansina/alérgeno DPBB en color naranja y dominio Expansina C-terminal tipo CBM en color morado. **B.** Alineamiento múltiple ClustalW en orden descendente de: Swollenina nativa XP_006969225.1 que incluye su péptido señal de exportación (los primeros 23 aminoácidos), pGEMT_Swo_f4.6, pPIC_Swo_f4.6_28 (zona directa), *P. Pastoris* transformante (Swo_Pichia_f1.1). Se destacan los dominios de la proteína en colores correlativos a **A.**, además el recuadro rojo resalta la cola de polihistidina.

En el alineamiento de las secuencias de las construcciones resultantes de las etapas del clonamiento de *Trsw* se destaca la integridad de la secuencia en todas las construcciones, no hay mutaciones que resulten en un cambio en el marco de lectura, los dominios catalíticos se encuentran conservados y se

observa la cola de polihistidina en el clon *P. pastoris* transformante (recuadro rojo).

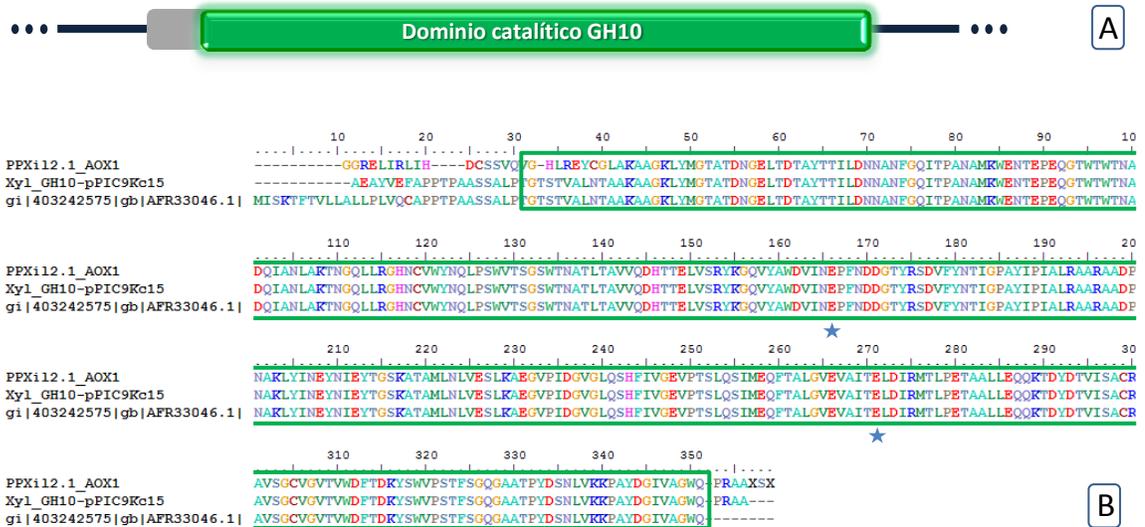


Figura 11. Alineamiento de las construcciones resultantes de las etapas de clonamiento de *Gtxyl1*. **A.** Xilanasa nativa AFR33046.1 posee el dominio catalítico de las glicosil hidrolasa de la familia 10 (GH10). **B.** Alineamiento múltiple ClustalW en orden descendente de: *P. Pastoris* transformante (PPXi12.1_AOX1), Xyl_GH10-pPIC9Kc15, xilanasa nativa AFR33046.1 que incluye su péptido señal de exportación (los primeros 18 aminoácidos). Se destacan el dominio catalítico GH10 en v y los aminoácidos catalíticos ácido glutámico en estrellas azules.

En el alineamiento de las secuencias de las construcciones resultantes de las etapas del clonamiento de *Gtxyl1* las secuencias no presentan mutaciones importantes que cambien su marco de lectura. Pero se ven diferencias en los primeros aminoácidos de la secuencia de GtXYL1 de *P. Pastoris* transformante, que incluyen 8 aminoácidos del dominio catalítico con respecto a la secuencia de la proteína nativa y la traducción de la construcción Xyl_GH10-pPIC9Kc15.

4.1.3 Inducción de expresión de GtXYL1 y TrSWO en *Pichia pastoris*

Se realizó la inducción de la expresión de cada una de las proteínas recombinantes, las condiciones para TrSWO fueron 0,5% de metanol a 28°C por 4 días y para GtXYL1 fueron 1% de metanol a 28°C por 3 días. Para ambas proteínas la inducción fue exitosa y con un comportamiento muy similar. En la Figura 12 se muestra la inducción de TrSWO, en donde se observa que a las 24 horas de inducción aparece una banda muy marcada a los 48 kDa aproximadamente y que se mantiene hasta el tercer día de inducción. Al comparar con el carril del control no se observa ninguna banda con un peso molecular similar, lo cual confirma que la banda predominante de 48 kDa corresponde a TrSWO. La concentración de TrSWO obtenida luego de tres días de inducción es de 0,24 g/L de cultivo y con el control se obtienen 0,04 g/L de cultivo.

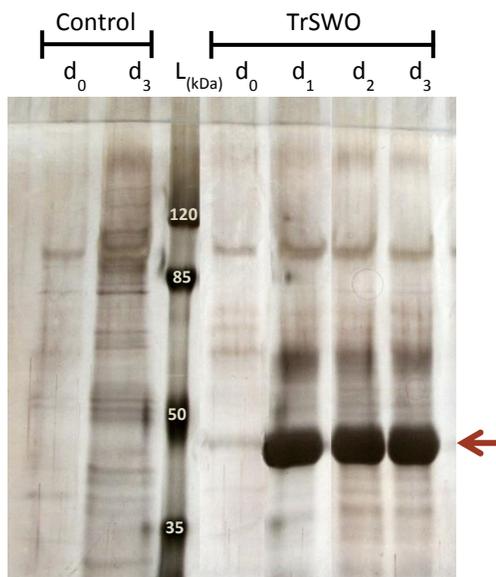


Figura 12. Inducción de la expresión de TrSWO. Proteínas del sobrenadante de *P. pastoris* resultantes de la inducción de TrSWO. La inducción se realizó a 28°C con metanol 0,5% durante 3 días tomándose alícuotas cada día. Como control se utiliza a *Pichia pastoris* transformada con el vector parental. Con flecha roja se indica a TrSWO. Gel desnaturalante de poliacrilamida al 10% con tinción plata. Se cargó un 1 µg de proteína total.

Por otra parte en la Figura 13 se muestra la inducción de GtXYL1, que presenta una tendencia muy similar, en donde también se observa que a las 24 horas de inducción aparece una banda muy marcada a los 42 kDa aproximadamente y que se mantiene hasta el tercer día de inducción. Al comparar con el carril del control no se observa ninguna banda con un peso molecular similar lo cual también confirma que la banda predominante de 42 kDa corresponde a la proteína recombinante GtXYL1. La concentración de GtXYL1 obtenida luego de tres días de inducción es de 0,22 g/L de cultivo, con el control se obtienen 0,04 g/L de cultivo.

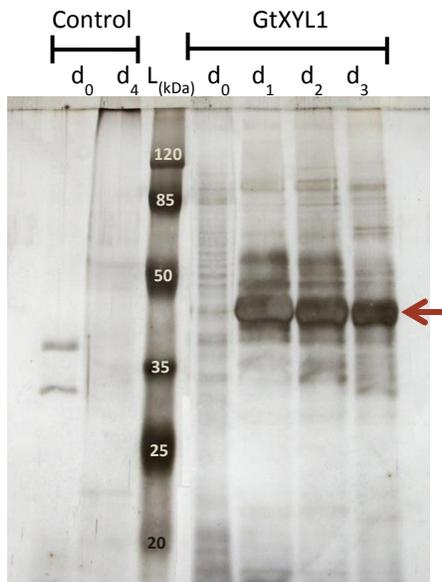


Figura 13. Inducción de la expresión de GtXYL1. Proteínas del sobrenadante de *P. pastoris* resultantes de la inducción de GtXYL1. La inducción se realizó a 28°C con metanol 1% durante 4 días tomándose alícuotas de cada día. Como control se utiliza a *Pichia pastoris* transformada con el vector parental. Con flecha roja se indica a GtXYL1. Gel desnaturalante de poliacrilamida al 12,5% con tinción plata. Se cargó 1 µg de proteína total.

4.2 Determinación de las mejores condiciones de inducción de la expresión para optimizar la producción de TrSWO y GtXYL1 en *Pichia pastoris*.

Para determinar la mejores condiciones de inducción se probaron tres concentraciones de metanol (0,5%, 1% y 1,5%) y tres temperaturas (20°, 25° y 30°C) con las nueve combinaciones posibles durante 5 días. Se tomaron alícuotas cada día las que se analizaron por electroforesis en geles desnaturalantes de poliacrilamida al 12,5%.

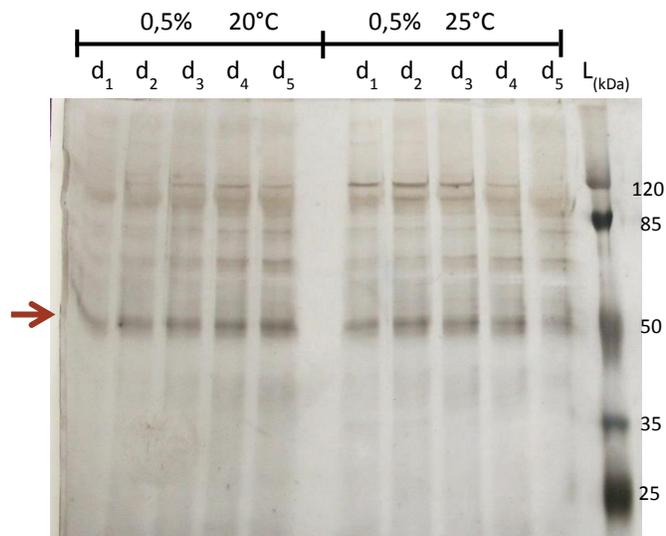


Figura 14. Proteínas resultantes de la inducción de la expresión de TrSWO en *Pichia pastoris* La inducción se realizó con metanol 0,5%, a 20°C y 25°C, los tiempos (t) indican días de inducción y como control se utiliza a *Pichia pastoris* transformada con el vector parental digerido con la enzima de restricción Sal I. Con flecha roja se indica a TrSWO. Gel desnaturalante de poliacrilamida al 12,5% con tinción plata. Volumen de muestra cargado es 15 μ L.

Para el caso de TrSWO al comparar los geles desnaturantes con las distintas condiciones, no se observan grandes diferencias entre diferentes combinaciones testeadas pero como se observa en la Figura 14, en la combinación 0,5% de metanol a 20°C se nota un leve aumento en la producción de la proteína recombinante, por lo que se decidió trabajar bajo esas condiciones para producirla en siguientes inducciones.

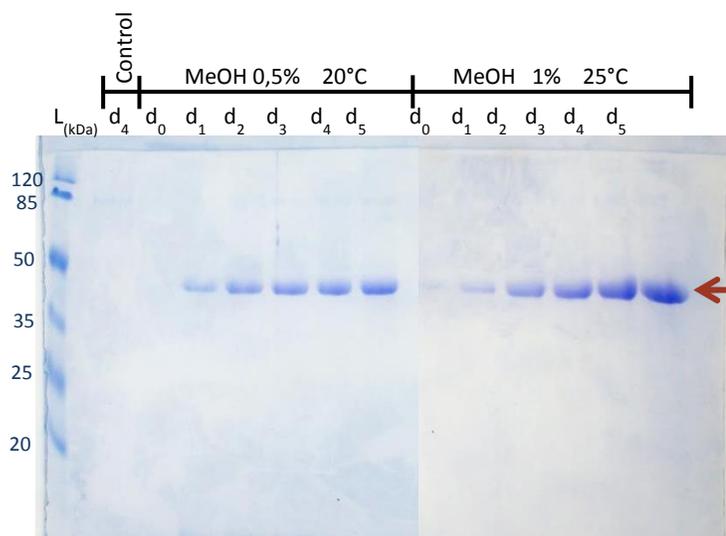


Figura 15. Proteínas resultantes de la inducción de la expresión de GtXYL1 en *Pichia pastoris*. La inducción con metanol 0,5% a 20°C y 25°C, d indican días de inducción y como control se utiliza a *Pichia pastoris* transformada con el vector parental digerido con la enzima de restricción Sal I. Con flecha roja se señala a GtXYL1. Gel desnaturante de poliacrilamida al 12,5% con tinción Azul de Coomassie. Volumen muestra cargado es 15 µL.

Al comparar los geles desnaturantes en el caso de GtXYL1 se observa que 0,5% de metanol a cualquiera de las tres temperaturas se obtiene la menor producción de proteína xilanasa recombinante y como se observa en la Figura 15 la mayor producción se logra con 1% de metanol a 25°C. Dichos resultados también se corroboran con los ensayos de actividad realizados a las alícuotas de sobrenadantes tomadas diariamente.

4.3 Purificación y caracterización de las proteínas obtenidas

A partir del sobrenadante de inducción de producción recombinante, ambas proteínas fueron purificadas obteniéndose los resultados que aquí se presentan.

4.3.1 Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) de inducción de TrSWO

Con una columna de Níquel – ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) de 2 mL se efectuó una gradiente de 20 mM a 250 mM de imidazol con 20 volúmenes de columna en amortiguador fosfato 20 mM a pH 8 con NaCl 500 mM.

Con esta cromatografía no se retuvo ninguna proteína en la columna (Anexo Figura 33) por lo tanto se procedió a purificar con Cromatografía de intercambio aniónico (AEC).

4.3.2 Cromatografía de intercambio aniónico (AEC) de la inducción de TrSWO

Con una columna de Q-sepharose de 20 mL se efectuó una gradiente de 0 a 1 M de NaCl con 10 volúmenes de columna en amortiguador Tris-HCl 20 mM a pH 7.

En el cromatograma de la Figura 16 se observan 5 *peaks* importantes, el primero bastante considerable de proteínas que no se unieron a la columna en el momento de la carga. Se realizó una electroforesis, que se muestra en gel desnaturalante de la Figura 17, de las distintas fracciones y es posible observar

una banda de aproximadamente 48 kDa en las fracciones 47, 49 y 51, que corresponde a TrSWO. Al relacionar la electroforesis (Figura 17) con el cromatograma (Figura 16) se puede aseverar que la proteína de interés comienza a eluir a una conductividad de 16,58 mS/cm y su *peak* se ve enmascarado entre dos *peaks* que denotan la gran cantidad de proteínas que coeluyen con TrSWO.

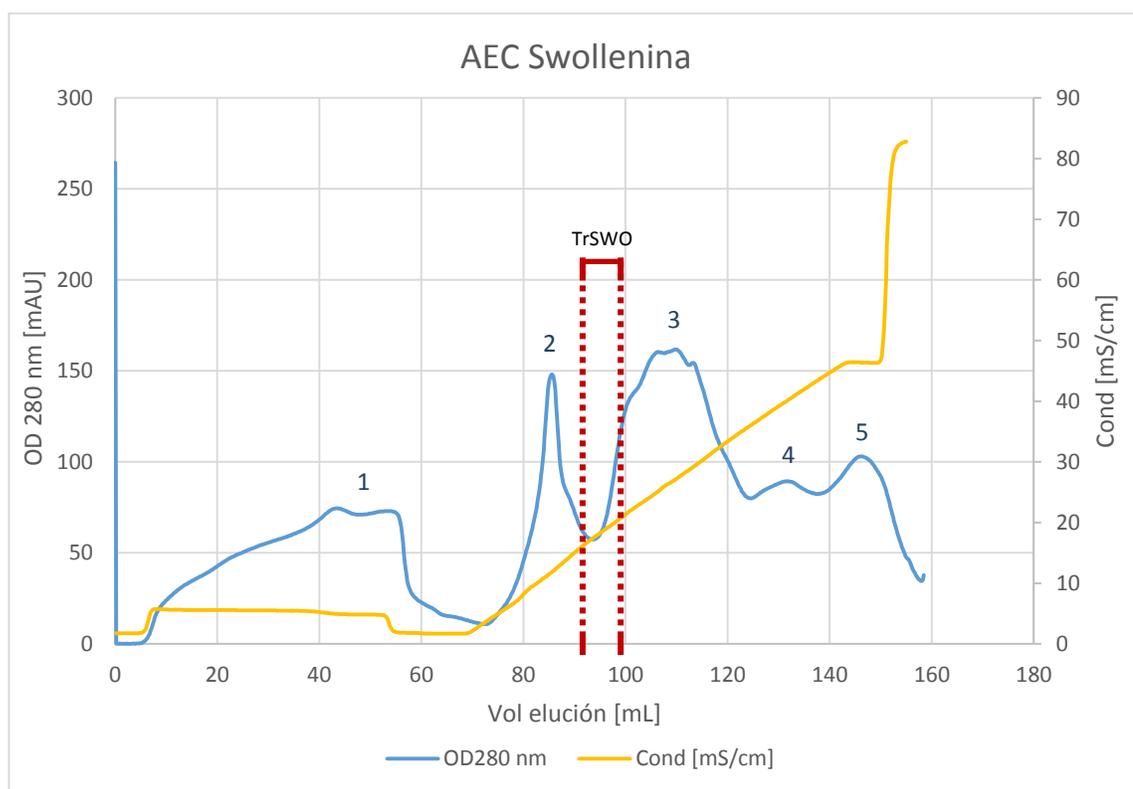


Figura 16. Separación de TrSWO desde el sobrenadante de *P. pastoris* mediante AEC. Se efectuó una gradiente de 0 a 1 M de NaCl con 10 volúmenes de columna en amortiguador Tris-HCl 20 mM a pH 7. En azul se muestra absorbancia a 280 nm con su escala en el eje principal y en amarillo la gradiente de sal presentada como conductividad con su escala en el eje secundario. En rojo se delimitan las fracciones que presentan TrSWO. Se numeran los 5 *peaks* relevantes en este perfil cromatográfico.

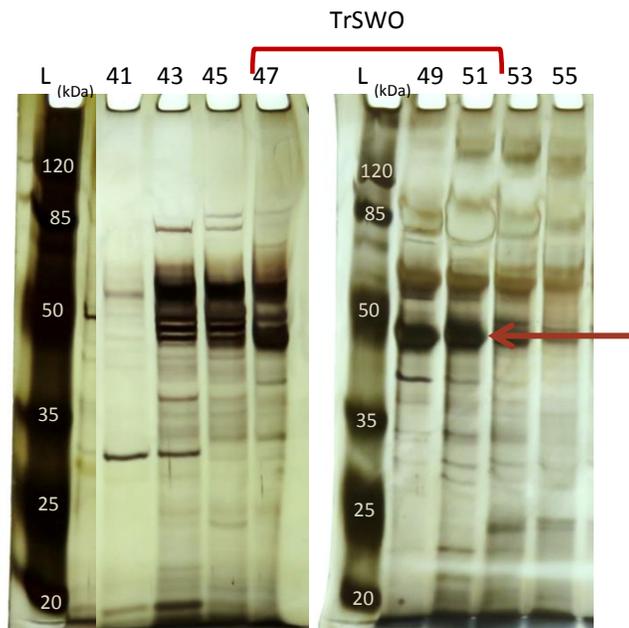


Figura 17. Análisis electroforético de las proteínas contenidas en las fracciones obtenidas de la cromatografía AEC de TrSWO. Se muestra de izquierda a derecha estándar de peso molecular (en kDa), fracciones 41, 43, 45, 47, estándar de peso molecular (en kDa), fracciones 49, 51, 53, 55. En rojo se demarcan las fracciones donde se encuentra TrSWO y con flecha roja se indica la banda que corresponde a TrSWO. Gel de poliacrilamida al 12,5% con tinción plata. Volumen de muestra cargado es 15 μ L.

4.3.3 Cromatografía de intercambio aniónico de inducción de GtXYL1

Con una columna de Q-sepharose de 20 mL se ejecutó una gradiente de 0 a 1 M de NaCl con 10 volúmenes de columna en amortiguador Tris-HCl 20 mM a pH 7.

En el cromatograma de la Figura 18 se observan 5 *peaks* importantes, de los cuales el primero corresponde a las proteínas no retenidas en la columna durante la carga y el último a las proteínas fuertemente unidas a la columna, que eluyen a alta concentración de NaCl. Al relacionar la actividad xilanasas de las fracciones con la absorbancia a 280 nm se determina que la proteína de interés

comienza a eluir a una conductividad de 15,76 mS/cm y se encuentra contenida en el tercer *peak*.

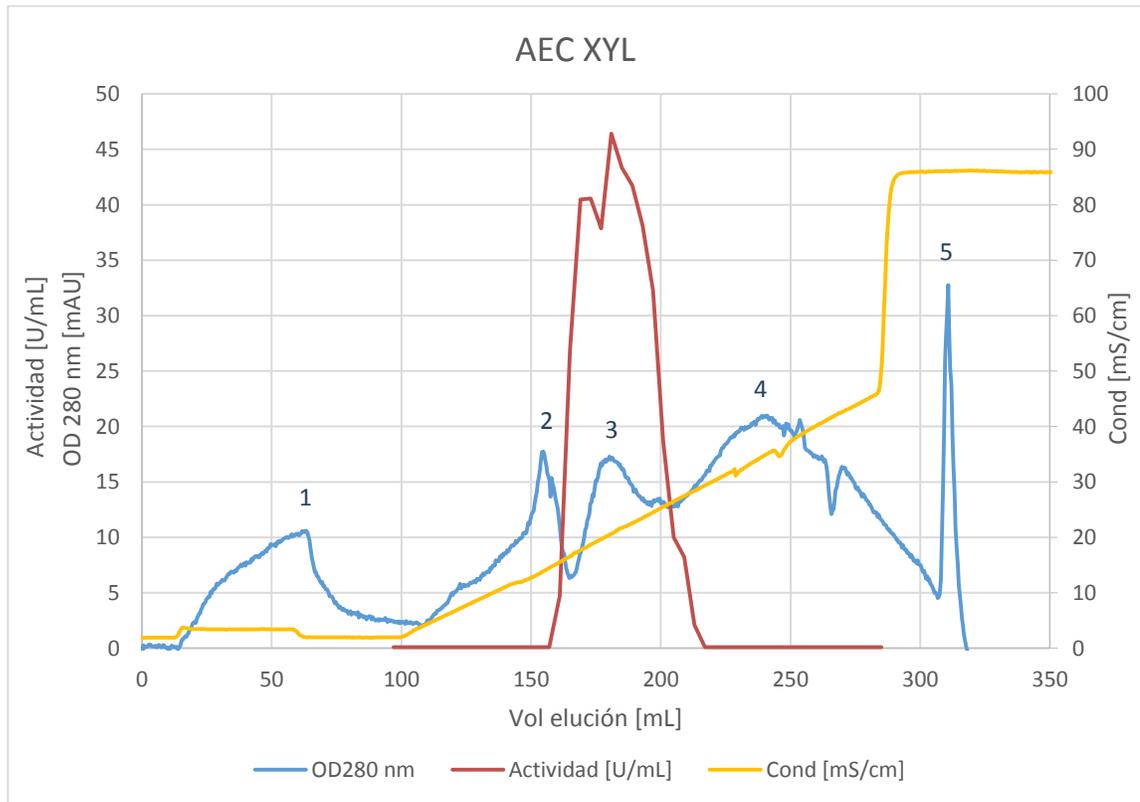


Figura 18. Separación de GtXYL1 desde el sobrenadante de *P. pastoris* mediante AEC. Se efectuó una gradiente de 0 a 1 M de NaCl con 10 volúmenes de columna en amortiguador Tris-HCl 20 mM a pH 7. En azul se muestra absorbancia a 280 nm con su escala en el eje principal (izquierda), en amarillo la gradiente de NaCl presentada como conductividad con su escala en el eje secundario (a la derecha) y en rojo se muestra la actividad xilanasas con su escala en el eje primario. Se numeran los 5 *peaks* relevantes en este perfil cromatográfico.

Además, se realizó una electroforesis en gel desnaturante de las fracciones de la cromatografía, cuyo resultado se muestra la Figura 19. En esta corrida de cromatografía es posible observar una única banda de aproximadamente 42 kDa

en las fracciones 40, 44, 46, 48, 50, 54, que son las mismas fracciones en que se concentra la actividad xilanasa. Este resultado permite aseverar que se trata de la proteína de 42 kDa es GtXYL1 y que se encuentra bastante pura.

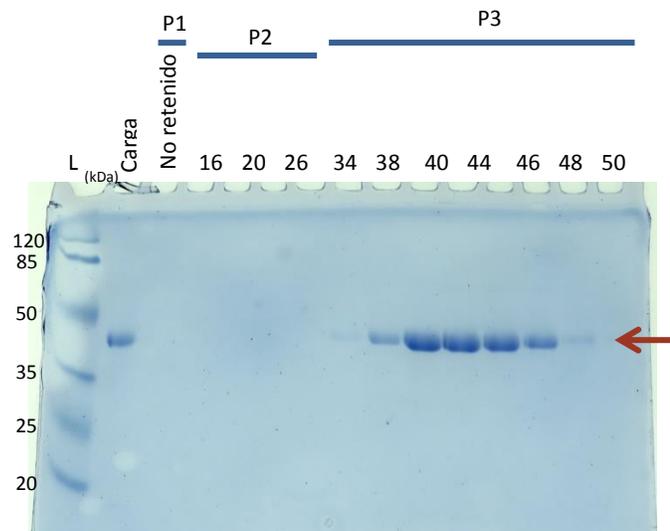


Figura 19. Análisis electroforético de las proteínas contenidas en las fracciones obtenidas de la cromatografía AEC de GtXYL1. Se muestra de izquierda a derecha estándar de peso molecular (L, en kDa), la muestra de proteínas totales cargadas en la cromatografía (carga), la fracción de proteínas no retenidas en la columna después de la cromatografía, las fracciones 16, 20, 26, 34, 38, 40, 44, 46, 48, 50, 54 y 56. P1, P2 y P3 corresponden a los *peak* 1, 2 y 3 del perfil cromatográfico. Con flecha roja se indica a GtXYL1. Gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalantes con tinción Azul de Coomassie. Volumen de muestra cargado 15 μ L.

Luego de terminado el proceso de purificación para GtXYL1 se observa que hay una recuperación de un 24% de las unidades totales y un factor de purificación de 0,545. Al momento de concentrar la proteína se pierde gran parte de la producción, de 158 mg de proteínas iniciales sólo se recuperan 3,859 mg. Como resultado final de la purificación se obtienen 0,71 mg de proteína.

4.3.4 Zimograma de GtXYL1

Como el tamaño teórico esperado para GtXYL1 es de 38 kDa se hizo un zimograma para comprobar que la banda de 42kDa corresponde a GtXYL1. Se realizaron zimogramas en duplicado: un gel se tiñó con Rojo Congo y el otro con nitrato de plata. En el zimograma con tinción Rojo Congo (Figura 20 A) se puede apreciar un halo de degradación de xilano en el carril donde fue cargada la proteína GtXYL1 purificada. Dicho halo se ve perfectamente delimitado en la zona inferior a los 40 kDa aproximadamente, en donde se encuentra GtXYL1, lo cual se corroboró con el duplicado teñido con plata (Figura 20 B). El control negativo (BSA), como es de esperar, no presentó un halo de degradación de xilano.

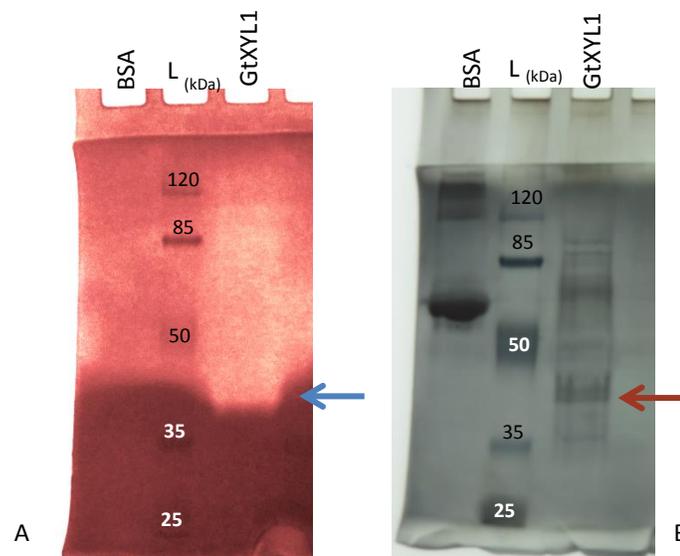


Figura 20. Zimograma con tinción Rojo Congo (A) y tinción plata (B) de GtXYL1 purificada. Ambos geles son de poliacrilamida al 10% y xilano al 0,4%. Orden de carga de izquierda a derecha se encuentran: BSA como control negativo, estándar de peso molecular (L, en kDa) y GtXYL1 purificada. Con flechas azul y roja se indica a GtXYL1. El gel con tinción Rojo Congo fue modificado con el programa PAINT.NET con el fin de mostrar más contraste, original en Anexo Figura 37.

4.3.5 Caracterización de GtXYL1

Para realizar la caracterización, la enzima fue evaluada bajo diversas condiciones que son detalladas en esta sección.

4.3.5.1 Determinación de las condiciones de reacción de GtXYL1

Se realizó la reacción enzimática con GtXYL1 sobre xilano 1% a pH 5,3 a seis temperaturas de reacción 50°, 60°, 70°, 80°, 90° y 100° C por 50 min, tomando alícuotas cada 5 min con el fin de realizar una curva de progreso de la reacción. En la Figura 21 se observa que todas las temperaturas ensayadas la enzima presenta actividad xilanásica y va en aumento hasta los 80°C donde se alcanza el máximo que luego cae abruptamente a partir de los 90°C. Además se establece que el tiempo para determinar temperatura óptima de la enzima es 10 min.

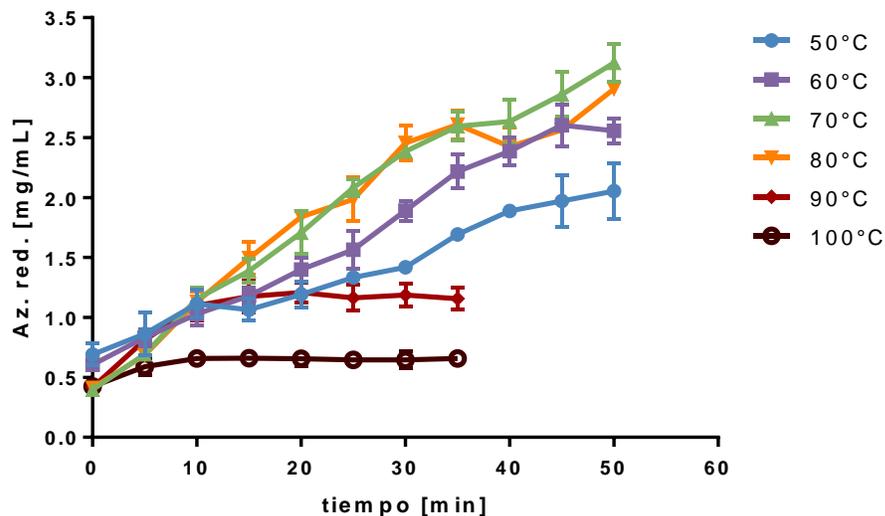


Figura 21. Curva de progreso de la reacción enzimática de GtXYL1 a distintas temperaturas con xilano 1% en amortiguador citrato de sodio pH 5,3. Cada reacción fue realizada en triplicado y se muestra la desviación estándar.

4.3.5.2 Temperatura óptima

A partir de los datos obtenidos de la sección 4.3.5.1 se hizo el cálculo de pendiente para calcular la velocidad inicial de cada temperatura a los 10 min de reacción. En la Figura 22 se obtiene que a pH 5.3 a los 10 min de reacción la temperatura óptima es 80°C.

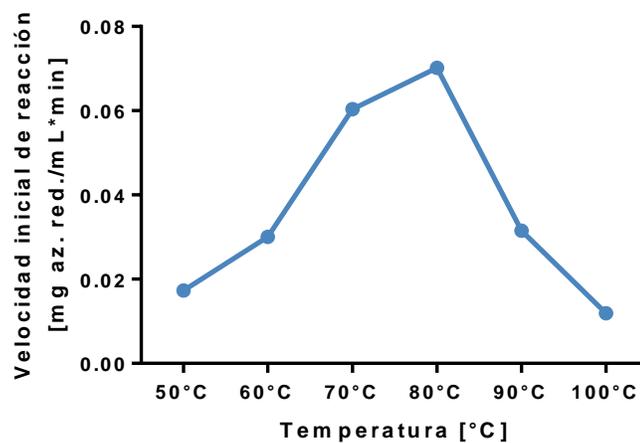


Figura 22. Temperatura óptima de la reacción enzimática de GtXYL1 a los 10 min de reacción. Con xilano 1% en amortiguador citrato de sodio pH 5.3.

4.3.5.3 Efecto de distintos amortiguadores sobre GtXYL1

Se evaluó el efecto de los amortiguadores acetato 50 mM pH 5, citrato 50 mM pH 5 y 6, fosfato 50 mM pH6, Tris-HCl 20 mM pH7 sobre GtXYL1 para elegir los amortiguadores que se utilizaron en el ensayo de actividad a distintos pH.

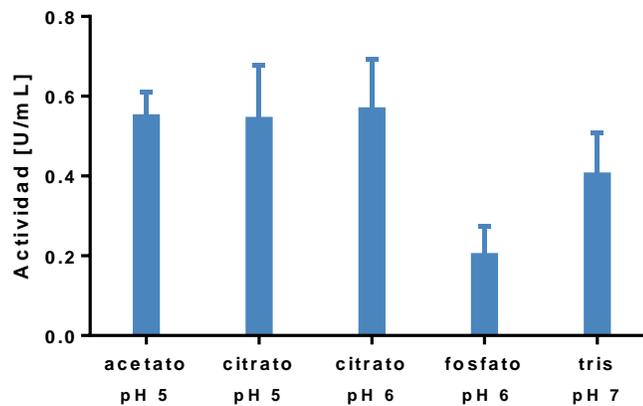


Figura 23. Actividad de GtXYL1 en diferentes amortiguadores. Ensayo de actividad de GtXYL1 en xilano 1% en los amortiguadores acetato 50 mM pH 5, citrato 50 mM pH 5 y 6, fosfato 50 mM pH6, Tris-HCl 20 mM pH7 a 50°C por 15 min. Cada condición fue realizada en triplicado y se muestra la desviación estándar.

En la Figura 23 se aprecia que la enzima tiene un comportamiento similar en los amortiguadores acetato, citrato y tris. Si se observa el comportamiento a pH 6 con los amortiguadores citrato y fosfato, la actividad de la enzima es la mitad en amortiguador fosfato.

4.3.5.4 pH óptimo

Para determinar el pH óptimo la reacción enzimática con GtXYL1 se hizo sobre sustrato xilano 1% con nueve pHs de reacción diferentes, 3, 4, 4.5, 5, 5.3, 6, 6.5, 7, 8 por 10 min. Los resultados se informan en actividad relativa, que consiste en tomar como 100% de actividad el pH que presenta mayor actividad y se graficaron en la Figura 24 donde se aprecia que el pH óptimo para la reacción es pH 5.

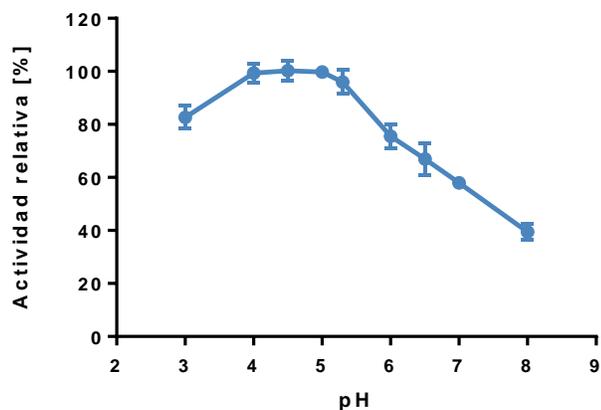


Figura 24. pH óptimo de la reacción enzimática de GtXYL1 con xilano 1% a 50°C por 10 min. Cada reacción a distintos pH fue realizada en triplicado y se muestra la desviación estándar.

4.3.5.5 Efecto ión calcio añadido a la reacción enzimática de GtXYL1

Se realizó la reacción enzimática con GtXYL1 en xilano 1% en amortiguador citrato pH5 a 50°C agregando diferentes concentraciones de CaCl₂: 0, 1, 10, 70 y 100 mM, durante 10 min.

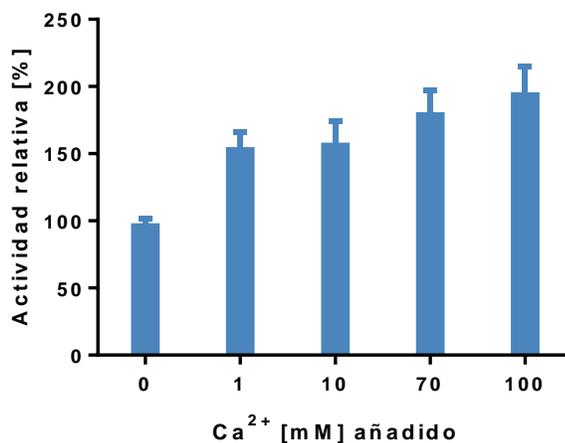


Figura 25. Efecto del ion Ca²⁺ añadido en la reacción enzimática de GtXYL1. Sobre xilano 1% en amortiguador citrato pH 5 a 50°C por 10 min. Reacción sin calcio añadido se considera 100% actividad. Cada condición fue realizada en triplicado y se muestra la desviación estándar.

El ion calcio tiene un efecto positivo sobre la actividad de GtXYL1, como se aprecia en la Figura 25, a medida que aumenta la concentración de calcio añadido aumenta la actividad de la enzima. Los resultados se informan en actividad relativa y se considera como 100% de actividad la condición sin calcio añadido. Con la adición de 1 mM de CaCl_2 a la reacción la actividad aumenta en un 53% más, con 10 mM en un 56%, con 70 mM en un 79% y con 100 mM en un 94%. El aumento no es un aumento directamente proporcional a la concentración de calcio ya que al comparar 1 mM con 100 mM de CaCl_2 , al agregar 100 veces más de calcio la actividad aumentó de 153% a 194%, por lo tanto no se necesitan altas concentraciones de calcio para que se ejerza un efecto considerable sobre la enzima

4.3.5.6 Termoestabilidad a 50°C

Se decide determinar la termoestabilidad de la enzima a 50°C porque esta temperatura es la temperatura de trabajo de Celluclast® 1.5L para realizar las hidrolisis del material lignocelulósico. La enzima se incubó en amortiguador citrato de sodio pH 5 a 50°C por hasta 17 días tomándose alícuotas cada cierto tiempo y a cada alícuota se le midió su actividad sobre xilano 1% en citrato pH 5 a 50°C por 10 min.

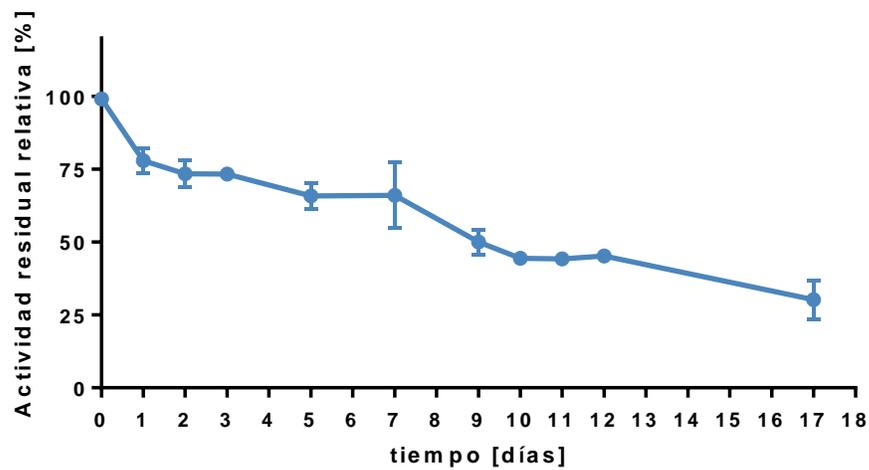


Figura 26. Termoestabilidad de GtXYL1 a 50°C. La enzima se incubó en amortiguador citrato de sodio pH 5 a 50°C por 17 días tomándose alícuotas cada cierto tiempo midiendo su actividad sobre xilano 1% a 50°C por 10 min. Cada reacción fue realizada en triplicado y se muestra la desviación estándar.

Los resultados se expresan como actividad residual considerando 100% de actividad el tiempo cero. En el gráfico de la Figura 26 se puede apreciar que GtXYL1 mantiene su actividad en un 75% por alrededor de 5 días, en el noveno día su actividad llega a un 51% y en el día 17 aún mantiene su actividad en un 31%.

4.3.5.7 Termoestabilidad a 80°C

Ya que anteriormente se determinó que la temperatura óptima de la enzima es 80°C se decide analizar la termoestabilidad de la enzima a esa temperatura. Se incubó en amortiguador citrato de sodio pH 5 por 60 min a 80°C, tomándose alícuotas cada 5 min y midiendo su actividad sobre xilano a 50°C por 10 min.

Los resultados se expresan como actividad residual considerando 100% de actividad el tiempo cero. Se observa en la Figura 27 que a 80°C la enzima a los 10 min disminuye su actividad a un 60% y a los 25 min la pierde por completo.

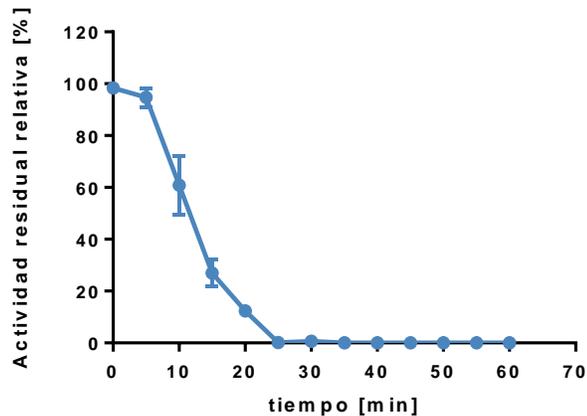


Figura 27. Termoestabilidad de GtXYL1 a 80°C. La enzima se incubó en amortiguador citrato de sodio 50 Mm pH 5 a 80°C por 60 min tomándose alícuotas cada 5 min. La reacción enzimática de GtXYL1 se realizó con xilano 1% pH 5 a 50°C por 10 min. Cada punto fue realizado en triplicado y se muestra la desviación estándar.

Ambas temperaturas fueron graficadas en un solo gráfico de la Figura 28 para fines comparativos. A 80°C en tiempo cero la actividad de la enzima es casi dos veces mayor que a 50°C, a los 10 min de reacción la enzima presenta la misma actividad, la cual se mantiene a 50°C a diferencia de la actividad de la enzima a 80°C que se pierde prontamente a los 25 min.

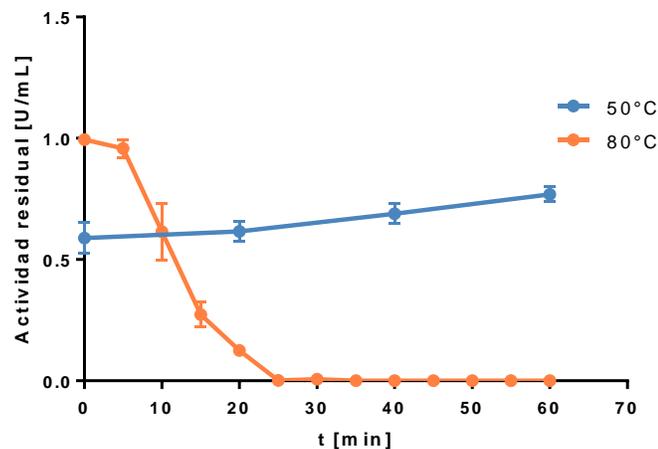


Figura 28. Termoestabilidad de GtXYL1 a 50°C y 80°C. Enzima se incubó en amortiguador citrato 50 mM pH 5 por una hora tomándose alícuotas cada 5 min para la temperatura de 80°C y cada veinte min para la temperatura de 50°C. Se midió su actividad sobre xilano 1% pH 5 a 50°C por 10 min. Cada reacción fue realizada en triplicado y se muestra la desviación estándar.

4.3.5.8 Comparación de la actividad específica y termoestabilidad de GtXYL1 con enzimas comerciales

Se decidió hacer la comparación con enzimas comerciales en el laboratorio bajo las mismas condiciones, se eligió xilanasa de *Trichoderma viride* por ser una especie conocida por su producción de celulasas y hemicelulasas que utiliza para colonizar las raíces de plantas^{13,38} y xilanasa de *Thermomyces lanuginosus* por ser un hongo termófilo que produce enzimas termoestables³⁵.

Las actividades específicas de cada una se muestran en la Tabla 12. El resultado de esta comparación es que GtXYL1 tiene una mayor actividad específica que ambas enzimas comerciales.

Tabla 12. Actividad específica de GtXYL1 y otras xilanasas comerciales a 50°C. La reacción enzimática se realizó con xilano 1% pH 5 a 50°C por 10 min.

Enzima	Actividad específica [U/mg]
GtXYL1	11.567
Xilanasas de <i>Trichoderma viride</i>	8.284
Xilanasas de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	3.824

Al comparar la termoestabilidad de GtXYL1 con las enzimas comerciales en la Figura 29 se observa una mayor estabilidad en GtXYL1, mantiene su actividad en más de un 50% hasta por nueve días. Xilanasas de *T. lanuginosus* a un día de incubación mantiene su actividad en un 82%, pero al segundo día cae abruptamente a un 27% manteniéndose en alrededor de un 20% hasta el quinto día, luego al séptimo día cae a un 15% manteniéndose en el tiempo. La actividad de xilanasas de *T. viride* con un día de incubación cae abruptamente a un 14% por lo que se descarta continuar con el ensayo de termoestabilidad.

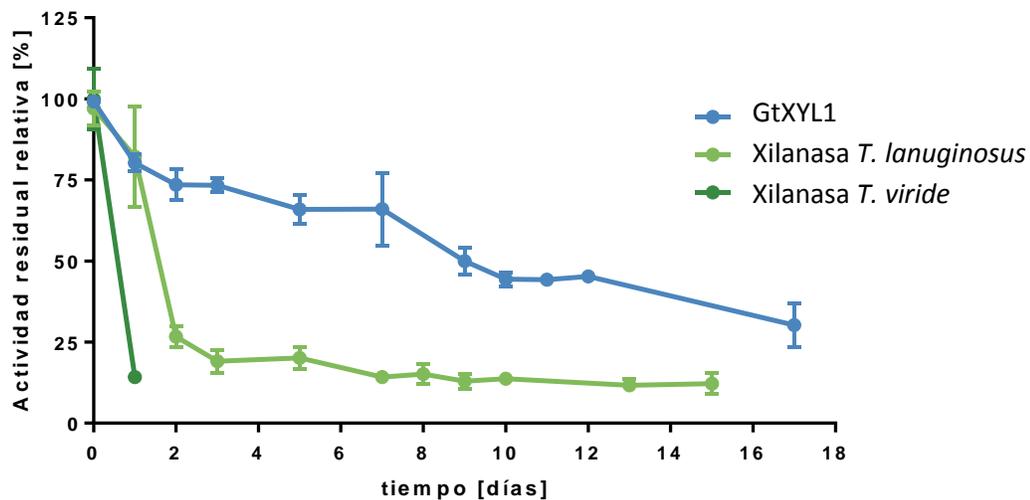


Figura 29. Comparación de la actividad residual de GtXYL1 con xilanasas comerciales a 50°C. Se compara con la xilanasas comerciales de *Thermomyces lanuginosus* y *Trichoderma viride*. Las enzimas se incubaron en amortiguador citrato de sodio pH 5 a 50°C por días tomándose alícuotas cada cierto tiempo midiendo su actividad sobre xilano 1% a 50°C por 10 min. Cada reacción fue realizada en triplicado y se muestra la desviación estándar.

4.3.5.8 Análisis de glicosilaciones con Péptido N-Glicosidasa F (PNGasa F)

Para analizar experimentalmente el grado de glicosilación de GtXYL1, se procedió a tratar la proteína con N-glicosidasa F. En la figura 30 se observa que la PNGasa F produce una reducción del peso molecular aparente de la GtXYL1, de 42 kDa disminuye a 38 kDa aproximadamente.

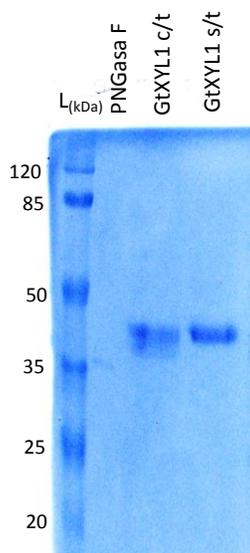
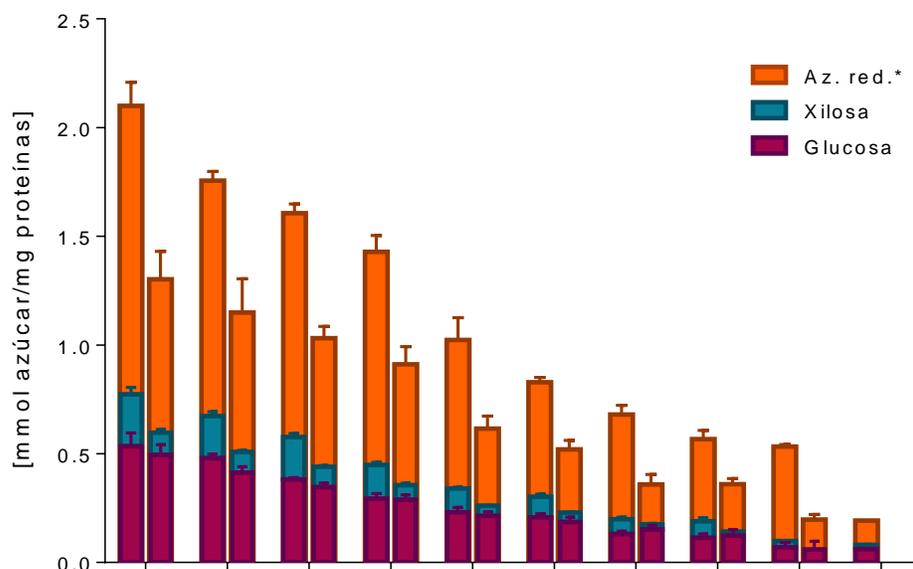


Figura 30. GtXYL1 tratada con PNGasa F. Se realizó tratamiento de GtXYL1 con la enzima Péptido N-Glicosidasa F (PNGasa F) y se analizó en un gel desnaturalante de poliacrilamida 12,5% con tinción Azul de Coomassie, el orden de carga de izquierda a derecha es: estándar de peso molecular (en kDa), PNGasa F, GtXYL1 con tratamiento con PNGasa F, GtXYL1 sin tratamiento.

4.4 Efecto de la adición de xilanasas en la sacarificación de residuos lignocelulósicos por celulasas

Se hicieron reacciones de hidrólisis de paja de trigo al 1% en amortiguador citrato de sodio 50 mM pH 5 con distintas concentraciones de Celluclast® 1.5L, con y sin la adición de GtXYL1. Se tomaron muestras cada 24 h hasta las 96 h.



GtXYL1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1	0	2	0	3	0	4	0	5	0	6	0	7	0	8	0	9	0	10	0
Celluclast [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	3,66		3,25		2,84		2,40		2,03		1,63		1,22		0,80		0,40		0	

Figura 31. Hidrólisis de paja de trigo por Celluclast® 1.5L suplementada con GtXYL1. Hidrólisis de paja de trigo al 1% (p/v), pretratada previamente con NaOH, en amortiguador citrato de sodio 50 mM pH5 con distintas concentraciones de Celluclast® 1.5L y GtXYL1 durante 48 horas. En el recuadro se indica la cantidad de proteína añadida de GtXYL1 y Celluclast® 1.5L en [$\mu\text{g}/\text{mL}$], se indica con cero cuando se hace el reemplazo de GtXYL1 por BSA para mantener la misma concentración final de proteínas. Az. red.* corresponde a los azúcares reductores sin incluir glucosa y xilano. La adición de las barras naranja, azul y morada corresponde a los azúcares reductores totales por miligramos de proteínas en la reacción. El ensayo se realizó en triplicado, el análisis estadístico indica que al comparar presencia y ausencia de GtXYL1 para cada concentración de Celluclast® 1.5L hay diferencias significativas en azúcares reductores totales y xilosa, en cambio en glucosa no observan diferencias significativas.

En el gráfico de la Figura 31 se presenta los resultados obtenidos después de 48 h de incubación a 50°C. Azúcares reductores, glucosa y xilosa liberados se presentan como mmoles/mg de proteína en la reacción. El análisis estadístico indica que al comparar presencia y ausencia de GtXYL1 para cada concentración

de Celluclast® 1.5L hay diferencias significativas en azúcares reductores totales y xilosa, en cambio en glucosa no observan diferencias significativas.

Los resultados en la Figura 31 muestran que a medida que aumenta la concentración de Celluclast® 1.5L, aumentan los azúcares liberados indicando una relación directamente proporcional. Se observa además, que el comportamiento general de las reacciones es que la mayor liberación de azúcares reductores se produce al adicionar GtXYL1 si se compara con la reacción en ausencia de GtXYL1, obteniéndose entre un 50% y un 60% más de azúcares reductores en casi todos los casos. Al analizar los monómeros liberados, xilosa presenta el mismo comportamiento con una liberación de más del doble en casi todos los casos cuando se añade GtXYL1, pero en cuanto a glucosa no hay diferencias significativas entre presencia y ausencia de GtXYL1.

Xilanasa por si sola produce una baja liberación de azúcares, 10 µg/mL de GtXYL1 presenta una liberación de azúcares reductores muy similar a 0,4 µg/mL de Celluclast® 1.5L, por lo tanto se necesita 25 veces más xilanasa para obtener el mismo efecto que Celluclast® 1.5L.

La combinación que produce una mayor liberación de azúcares reductores por cantidad de proteína agregada es la combinación de 1 µg/mL de GtXYL1 + 3,66 µg/mL de Celluclast® 1.5L, con la cual se liberan 2,1 mmoles de azúcares reductores por mg de proteína agregada.

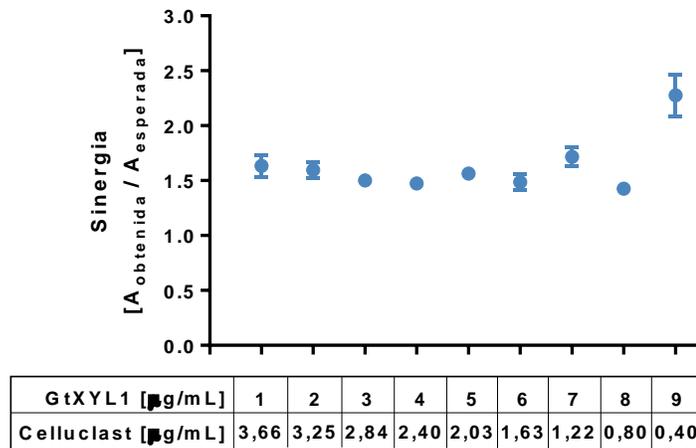


Figura 32. Sinergismo entre Celluclast® 1.5L y GtXYL1. Razón entre las Actividades obtenidas vs las actividades esperadas resultado de 48 h de hidrolisis de paja de trigo al 1% (p/v) con distintas concentraciones de Celluclast® 1.5L y GtXYL1. En el recuadro se indica la cantidad de proteína de GtXYL1 y Celluclast® 1.5L en [µg/mL]. Valores sobre 1,0 indican sinergismo, valores bajo 1,0 indican un efecto sumatorio de las actividades de cada una de las enzimas. Se muestra la desviación estándar.

En la Figura 32 se grafica la razón entre las Actividades obtenidas vs las Actividades esperadas, resultado de 48 h de hidrolisis de paja de trigo al 1% (p/v) con distintas concentraciones de Celluclast® 1.5L y GtXYL1. Valores sobre 1,0 indican sinergismo, valores bajo 1,0 indican un efecto sumatorio de las actividades de cada una de las enzimas. En todas las condiciones analizadas en este trabajo hay sobre un 50% de sinergia.

V. DISCUSIÓN

Varios estudios se han enfocado en la búsqueda de enzimas capaces de degradar lignocelulosa, que precisamente provienen de microorganismos capaces de hidrolizar los polisacáridos presentes en la biomasa. Incluso se han probado diferentes mezclas de enzimas para obtener los mejores resultados de hidrólisis^{39,40}.

En este trabajo se propuso utilizar a los microorganismos *Gloeophyllum trabeum* y *Trichoderma reesei* para obtener una xilanasa y una Swollenina respectivamente, con el fin de probar si estas proteínas tienen un efecto sobre la acción hidrolítica de Celluclast® 1.5L. *Gloeophyllum trabeum* es un hongo de pudrición parda y *Trichoderma reesei* un hongo saprófito de las plantas. Se logró llevar a cabo el clonamiento de los genes a partir del cDNA de ambos hongos y luego la producción recombinante de ambas proteínas, GtXYL1 y TrSWO. El clonamiento fue exitoso logrando construcciones con las secuencias correctas y en las transformaciones en *Pichia pastoris* se obtienen clones resistentes a altas concentraciones de geneticina [2mg/mL], por lo que se supone se insertó un gran número de copias del gen.

En el caso de la producción recombinante de GtXYL1 es posible decir que se obtuvo una alta tasa de producción recombinante con 1% de metanol a 25°C. Luego de tres días de inducción se obtiene 0,22 g de GtXYL1/L de cultivo, con el control se obtienen 0,04 g/L de cultivo. En la Figura 13 se observa que la proteína que se obtuvo del sobrenadante de cultivo tiene un peso de aproximadamente 42 kDa, que difiere de los 36 kDa teóricos estimados a partir

de la secuencia de la proteína madura. Esta diferencia puede deberse a que la proteína se encuentre glicosilada. Se hizo un análisis para estimar las potenciales glicosilaciones que podría presentar la proteína, con las herramientas en línea NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) y NetOGlyc 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). Como se observa en la Figura 36 del Anexo, GtXYL1 posee sitios de posibles glicosilaciones. Se encontró la secuencia NAT donde la asparagina tiene probabilidades de estar N-glicosilada; además se podrían producir O-glicosilaciones en las treoninas 33, 35, 138, 331. En la literatura se ha encontrado que *P. pastoris* no produce proteínas con grandes cantidades de O-glicosilaciones⁴¹. Por lo tanto, para analizar experimentalmente el grado de glicosilación de GtXYL1, se procedió a tratar la proteína con N-glicosidasa F. Se observó que la N-glicosidasa F produce una reducción del peso molecular aparente de la GtXYL1, lo cual permite suponer que ésta se encuentra glicosilada (Figura 30).

GtXYL1 presenta un punto isoeléctrico teórico de 4,51, por lo que se decidió purificar mediante cromatografía de intercambio aniónico. En el perfil cromatográfico de la Figura 18, al relacionar la actividad xilanásica de las fracciones con la absorbancia a 280 nm se determina que la proteína de interés eluye a una conductividad de 15,76 mS/cm. En la electroforesis de las fracciones obtenidas, en la Figura 19, es posible observar una única banda de aproximadamente 42 kDa bastante pura, sin la presencia de otras proteínas que coeluyen con ella.

Con la caracterización de GtXYL1 se determinaron sus propiedades moleculares, tales como: temperatura óptima de actividad, dependencia del pH, actividad

específica, actividad frente a diferentes sustratos y termoestabilidad. En un principio se realizó la reacción enzimática con GtXYL1 sobre xilano 1% en citrato 50mM pH 5,3 a seis temperaturas de reacción: 50°, 60°, 70°, 80°, 90° y 100° C por 50 min con el fin de realizar una curva de progreso de la reacción. A partir de ella se definió el tiempo de reacción para los siguientes ensayos en 10 min y se calculó la velocidad inicial. Se determinó que la temperatura óptima de actividad es 80°C (Figura 22).

Para determinar el pH óptimo se evaluaron diferentes amortiguadores para disponer de un amplio rango de pH. Los amortiguadores a evaluar fueron acetato pH 5, citrato pH 5 y 6, fosfato pH 6 y tris pH 7. La enzima presentó una actividad similar en todos los amortiguadores exceptuando al amortiguador fosfato pH 6, en donde la actividad cayó a la mitad (Figura 23). Se resolvió utilizar amortiguador citrato y tris, los cuales cubrieron el rango entre pH 3 y 8 para realizar los ensayos de actividad. El resultado del experimento fue que el rango de pH óptimo para GtXYL1 es entre pH 4 - 5.

Es conocido que las xilanasas se ven activadas o inhibidas en presencia de iones y en especial que el ion calcio, por lo general, tiene un efecto activador sobre xilanasas⁴²⁻⁴⁴. En los trabajos de Bastawde 1992, Plant et al. 1986, Matte & Forsberg 1992 se han hecho pruebas sobre xilanasas con ion calcio a las concentraciones de 1, 10 y 70 mM, entonces se dispuso probar el efecto de estas concentraciones y de 100 mM de CaCl₂. Como resultado del ensayo se observó que el ion calcio tiene un efecto positivo sobre la actividad de GtXYL1. En la Figura 25 se aprecia que a medida que aumenta la concentración de calcio aumenta la actividad de la enzima. Con la concentración de calcio más baja

evaluada en este trabajo, 1 mM de CaCl_2 , se ejerce un efecto importante sobre la enzima aumentando su actividad en un 54% más y al agregar 100 veces más aumenta en un 94%, lo cual corresponde casi al doble. En el trabajo de Matte & Forsberg 1992 realizaron el ensayo sobre 2 endoxilanasas, al utilizar 1 mM de CaCl_2 las enzimas aumentaban su actividad en un 3% y un 14%, lo cual permite destacar la activación que experimenta GtXYL1 en presencia del ion calcio. Además, en la Figura 23 se ve un efecto sobre la actividad de GtXYL1 en presencia de amortiguador fosfato a pH 6, si se compara con el amortiguador citrato a pH 6 la actividad es dos veces menor. Las sales de fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) son de baja solubilidad ($K_{ps} 1,2 \times 10^{-26}$ a 25°C), la cual además disminuye con el aumento de la temperatura⁴⁵. Por lo tanto el fosfato podría estar secuestrando el calcio presente en la reacción, este efecto también se vio en el trabajo de Abou-Hachem, Olsson, and Karlsson 2003⁴⁶.

Continuando con la caracterización se evaluó la termoestabilidad de la enzima. Se estudió la termoestabilidad a 80°C porque es la temperatura óptima de actividad, y a 50°C , puesto que es la temperatura a la cual usualmente se realiza la hidrólisis de la paja de trigo con celulasas. En el ensayo a 80°C la enzima a los 10 min disminuye su actividad a un 60% y a los 25 min la pierde por completo (Figura 27). A 50°C GtXYL1 mantiene un 75% de su actividad por alrededor de 5 días, en el noveno día su actividad llega a un 51% y en el día 17 aún mantiene su actividad en un 31% (Figura 26). Si bien la enzima es más estable a 50°C , a 80°C en tiempo cero la actividad de la enzima es 70% mayor que a 50°C , a los 10 min de reacción la enzima presenta la misma actividad en ambas temperaturas y a los 25 min se pierde por completo. Al comparar la estabilidad de la enzima a

80°C en presencia de sustrato, resultado de la sección 4.3.5.1, con la ausencia de sustrato, sección 4.3.5.7, se observa que en presencia de sustrato la enzima se mantiene estable durante los 50 minutos de ensayo, en cambio en ausencia de sustrato la enzima pierde su actividad prontamente. Esto indica que la interacción con el sustrato estabiliza notablemente a la enzima.

Las características de termoestabilidad de esta enzima son bastante destacables, por lo tanto se dispuso compararla con enzimas comerciales en el laboratorio bajo las mismas condiciones. Para esto se eligió xilanasa de *Trichoderma viride* por ser una especie destacada por su producción de celulasas y hemicelulasas que utiliza para colonizar las raíces de plantas³⁸, y xilanasa de *Thermomyces lanuginosus*, por ser un hongo termófilo que produce enzimas termoestables³⁵. Un primer resultado de esta comparación es que la actividad específica de GtXYL1 es de 11.567 [U/mg], superior a las 8.284 [U/mg] de *Trichoderma viride* y a las 3.824 [U/mg] de *Thermomyces lanuginosus*. En cuanto a la termoestabilidad GtXYL1 también es muy superior a ambas enzimas comerciales. La actividad de la xilanasa de *T. viride* con un día de incubación cae abruptamente a un 14%, por lo que se descartó seguir con su ensayo, y la actividad de la xilanasa de *T. lanuginosus* fluctúa entre un 27% y un 15% por alrededor de 15 días. En cambio GtXYL1 que mantiene su actividad en más de un 50% hasta por nueve días que luego alcanza el mínimo a los 17 días con un 31% de actividad (Figura 29).

Es posible comparar los resultados obtenidos con GtXYL1 de esta Tesis con los obtenidos por Sydenham et al. 2014, para la misma enzima. Estos autores la denominaron GtXyn10A e indican que es una proteína de peso molecular de

36 kDa. Los resultados de condiciones óptimas que ellos reportan son temperatura de 50°C y pH 3.4 en azo-xilano, lo cual difiere de los parámetros obtenidos en este trabajo con una temperatura óptima de 80°C y pH óptimo de 5 determinados en xilano de haya. Es posible que GtXYL1 presente mejoras en sus condiciones óptimas en comparación con la enzima publicada⁴⁷ porque GtXYL1 presenta una mutación de 23 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal, de los cuales 8 se encuentran en el dominio catalítico de la enzima. Otra posible causa es que las enzimas se expresaron de forma recombinante en organismos diferentes, la publicada se expresó en *A. niger* a diferencia de GtXYL1 que se expresó en *P. pastoris*. En la literatura se ve una preferencia por producir enzimas recombinantes en *P. pastoris* por sus características como son el rápido crecimiento, posibilidad de fermentaciones con una alta densidad celular, baja secreción de proteínas propias por lo tanto la proteína recombinante es la que se encuentra en mayor proporción en los sobrenadantes de inducción, modificaciones post traduccionales de las proteínas producidas entre otras^{26,48,49}. Es más, se prefiere producir de forma recombinante en *P. pastoris* que sobre expresar en *A. niger*⁴⁹⁻⁵². Por ejemplo se ha visto que una xilanasa de *A. niger* producida de forma recombinante en *P. pastoris* tienen mayor actividad específica que la misma enzima sobre expresada en *A. niger*⁵³, esto se puede deber a diferencias en las modificaciones post traduccionales como lo son las glicosilaciones, ya que dos microorganismos pueden producir un patrón diferente de glicosilaciones^{41,54}. Información disponible en la literatura indica que las glicosilaciones afectan la termoestabilidad de las enzimas^{55,56} y como se mencionó al principio de esta discusión GtXYL1 se encuentra glicosilada.

No es posible realizar una comparación de GtXYL1 con la enzima publicada porque Sydenham, R. *et al.* no entregan la información de actividad específica de la enzima.

Una vez purificada y caracterizada GtXYL1 se procedió a realizar distintos ensayos de hidrólisis en paja de trigo en conjunto con Celluclast® 1.5L. Las hidrólisis se realizaron con paja de trigo al 1% (p/v) en amortiguador citrato 50 mM pH 5 con distintas concentraciones de Celluclast® 1.5L. Por cada concentración se realizaron dos reacciones, una adicionando GtXYL1 y otra adicionando BSA como proteína inerte para mantener la misma concentración de proteínas final. El resultado general de las hidrólisis, presentado en la Figura 31, muestra que la relación entre la concentración de Celluclast® 1.5L y los azúcares liberados es directamente proporcional. Al añadir GtXYL1 se produce una mayor liberación de azúcares en comparación a Celluclast® 1.5L por sí sola, aproximadamente entre un 50 y un 60% más. La mayor liberación de azúcares reductores, glucosa y xilosa se obtiene con 3,66 µg/mL de Celluclast® 1.5L mas la adición de 1 µg/mL de GtXYL1, lo que corresponde a una adición de un 27%, el menor porcentaje de adición utilizado en las hidrólisis.

Xilanasas por sí sola produce una baja liberación de azúcares, 10 µg/mL de GtXYL1 presenta una liberación de azúcares reductores de 0,19 mmoles de azúcares reductores/mg de proteína, la misma liberación que producen 0,4 µg/mL de Celluclast® 1.5L. Por lo tanto es posible decir que se necesita 25 veces más xilanasas para obtener el mismo efecto que Celluclast® 1.5L.

A pesar de ir aumentando la cantidad de GtXYL1 añadida a la reacción los azúcares reductores no aumentaron de la misma forma, se mantuvieron entre un 50 y un 60% más comparado a la condición de ausencia de GtXYL1. El efecto auxiliar se produce añadiendo bajas concentraciones de GtXYL1 y se presume que con adiciones sobre un 27% se produce una saturación del efecto auxiliar.

Por último, se puede aseverar que hay un efecto de sinergismo entre Celluclast® 1.5L y GtXYL1. En la Figura 32 se aprecia que en todas las condiciones analizadas en este trabajo hay sobre un 50% de sinergia.

En el caso de la producción recombinante de Swollenina de *T. reesei*, es posible mencionar que se obtuvo una alta tasa de producción recombinante. Luego de tres días de inducción se obtiene 0,24 g de TrSWO/L de cultivo, con el control se obtienen 0,04 g/L de cultivo. En la Figura 12 se observa que la proteína que se obtuvo del sobrenadante de cultivo tiene un peso de aproximadamente 49 kDa lo cual concuerda con el peso molecular teórico. En algún punto en este trabajo la producción de TrSWO ya no fue la misma que la inicial bajando considerablemente, se reinició el clonamiento, transformación e inducción obteniéndose los mismos resultados. Estos llevaron a hipótesis como inestabilidad del clon o estrés metabólico.

Este sistema de expresión heteróloga funciona insertando varias copias en tándem del llamado *cassette* de expresión en el genoma, proceso que se ilustra en la Figura 40 del Anexo. Dicho *cassette* incluye al promotor del gen *AOX1*, al gen de histidinol deshidrogenasa (*HIS4*), al gen de resistencia a geneticina (Kan) y al gen de interés. El nivel de resistencia al antibiótico se encuentra ligado al

número de copias insertado en el genoma, por lo tanto a mayor resistencia mayor número de copias del gen hay inserto en el genoma de *P. pastoris*²⁶. Estas múltiples inserciones en el genoma puede generar clones inestables que pueden escindir el gen en forma de loop que se forma por homología y se pierde el gen en cuestión⁵⁷. Para determinar si los clones que dejaron de expresar la proteína recombinante habían perdido el gen desde el genoma, se les realizó un PCR con partidores específicos del gen *TrswO*. Se obtuvo un amplificado del tamaño gen, por lo tanto se descartó la posibilidad de la pérdida del gen. Además, en dichos clones se mantuvo la resistencia al antibiótico geneticina, que debería eliminarse junto al gen *TrswO*.

Otra posibilidad es que el clon que expresa TrSWO sufriera estrés metabólico. Las células pueden sufrir estrés metabólico al encontrarse en condiciones de inducción agresivas, como un exceso de metanol o en altas temperaturas⁵⁸. La sobreexpresión de una proteína bajo un promotor fuerte, como es el caso de *AOX1*, puede llevar a una sobrecarga metabólica que puede activar a la respuesta por proteína mal plegada (UPR por sus iniciales en inglés). UPR es un vía de señalización que se activa en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático (RE), que puede silenciar diversos genes con tal de recuperar la homeostasis del RE⁵⁷. Dicho esto se podría postular que la proteína se degradó debido a su mal plegamiento y/o que se silenció el gen por el estrés que significa su producción. Sin embargo, esta hipótesis también se descartó porque al probar condiciones de inducción que desfavorecen el estrés metabólico tampoco se observó diferencias importantes en la producción de

TrSWO. Por ejemplo se podría haber esperado una mejora al disminuir la temperatura de 30°C a 20°C y la concentración de metanol de 1% a 0,5%.

A pesar del bajo nivel de producción, se procedió a purificar TrSWO. Terminada la inducción con metanol, las proteínas del sobrenadante del medio de cultivo se concentraron y se realizó la cromatografía de metales inmovilizados (IMAC). En este procedimiento se obtuvo resultados negativos, ya que no fue posible detectar a TrSWO mediante detección por afinidad a la cola de polihistidina (Figura 31 del Anexo). Una posible explicación para este resultado se deriva de la posición que la cola de histidina adopte en la estructura tridimensional de la proteína. Si la cola está en el interior de la estructura de la proteína es posible que no se pueda unir a la resina. Para averiguar esta posibilidad, se mandó a hacer un modelo 3D de TrSWO a partir de la secuencia obtenida de la inserción en el genoma de *P. pastoris* al servidor RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>). El modelo resultante sugiere que la cola de polihistidina no está internalizada en la estructura de la proteína (Anexo Figura 34), lo que permite entonces descartar esta posibilidad como causa de la imposibilidad de detectar la proteína por afinidad a metales. Se puede confiar en este modelo ya que hay medidas que indican si un modelo es de buena calidad y los valores de éste lo avalan. Cuando los valores uGDT (GDT) son mayores a 50 el modelo es de buena calidad, lo mismo se puede aseverar si los valores de p-value son menores a 1e-03. Para este modelo los valores son: uGDT (GDT) global de 264 (55), p-value para los dominios de 2,10e-04; 2,33e-05 y 2,35e-10.

Debido a que no se pudo aplicar la técnica de cromatografía por afinidad a metales se procedió a realizar una cromatografía de intercambio aniónico, ya

que el punto isoeléctrico teórico de TrSWO es 4,74. Mediante esta técnica, como se observa en la Figura 17, se logró obtener fracciones enriquecidas en TrSWO en las que también coeluyen otras proteínas contaminantes. La cantidad de TrSWO es muy baja, por lo que se decide no continuar con la caracterización de la proteína.

No se conoce con claridad la función natural de Swollenina en *Trichoderma reesei*. Se supone que cumple un rol al momento de colonizar las raíces de plantas por el hecho de relajar la pared celular⁵⁹ pero también es posible que la proteína sea perjudicial para otros hongos, ya que en la literatura también se ha visto que Swollenina de *Aspergillus fumigatus* es capaz de unirse a quitina⁶⁰, un polímero presente en la pared celular de hongos. Este hecho adquiere relevancia porque se describe que el género *Trichoderma* presenta micoparasitismo sobre hongos patógenos de las plantas y por esta razón se utiliza en la agricultura como agente de control biológico de otros hongos³⁸. Es probable que Swollenina sea perjudicial para *Pichia pastoris* en particular y deje de producirla.

VI. CONCLUSIONES

Se logró llevar a cabo el clonamiento y producción recombinante de ambas proteínas GtXYL1 y TrSWO. El clonamiento fue exitoso logrando construcciones con las secuencias correctas. En las transformaciones de *Pichia pastoris* se consiguieron clones transformantes resistentes a altas concentraciones de geneticina [2mg/mL], por lo que se supone que un gran número de copias de ambos genes se insertó en el genoma de *Pichia pastoris*.

Con la expresión de ambas proteínas de forma recombinante se alcanzó una alta tasa de producción, 0,22 g de GtXYL1/L de cultivo y 0,24 g de TrSWO/L de cultivo. Las proteínas producidas tienen masas moleculares de 49 kDa para TrSWO y 42 kDa para GtXYL1. La masa molecular de GtXYL1 no coincide con su masa molecular teórica de 36 kDa porque se encuentra glicosilada.

Las mejor condición para la inducción de la expresión de GtXYL1 en *Pichia pastoris* fue metanol 1% a 25°C.

La producción recombinante de TrSWO no es estable en *P. pastoris* en el tiempo, por lo que se recomienda la utilización de otro huésped, como por ejemplo *Aspergillus niger*.

Con la caracterización de GtXYL1 es posible concluir que sus parámetros óptimos de trabajo son temperatura de 80°C y un rango de pH 4 - 5. También se observó que esta enzima es activada con calcio logrando casi doblar su actividad al agregar CaCl₂ 100 mM a la reacción.

Además, xilanasa GtXYL1 presenta una notable termoestabilidad a 50°C, recién a los 9 días de incubación su actividad baja en un 50% y se mantiene activa durante los 17 días que duró el ensayo. Al compararla con las xilanasas comerciales de *Trichoderma viride*, especie destacada por su producción de celulasas y hemicelulasas, y de *Thermomyces lanuginosus*, hongo termófilo que produce enzimas termoestables, muestra un desempeño muy superior.

La adición de GtXYL1 mejora la acción hidrolítica de Celluclast® 1.5L sobre paja de trigo al 1% p/v. Se observa un efecto sinérgico sobre la celulasa comercial y los mejores resultados se obtienen al agregar bajas cantidades de GtXYL1.

De acuerdo a los resultados expuestos, GtXYL1 es una enzima con muy recomendable para ser utilizada en la hidrólisis de paja de trigo en conjunto con celulasas, ya que añadiendo bajas concentraciones de GtXYL1 se obtiene un aumento de más del 60% de los azúcares liberados por parte de la celulasa comercial Celluclast® 1.5L.

REFERENCIAS

1. Amidon, T. E. & Liu, S. Water-based woody biorefinery. *Biotechnol. Adv.* **27**, 542–550 (2009).
2. International Energy Agency (IEA). Energy Supply Security: The emergency response of IEA countries. 601 (2014). Available at: <https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/energy-supply-security-the-emergency-response-of-iea-countries-2014.html>. (Accessed: 28th July 2014)
3. Liu, S. Woody biomass: Niche position as a source of sustainable renewable chemicals and energy and kinetics of hot-water extraction/hydrolysis. *Biotechnol. Adv.* **28**, 563–582 (2010).
4. McCormick, K. & Willquist, K. *The Bioeconomy*. (Lund University, 2015).
5. Gobierno de Chile. Ministerio de Energía. Energía 2050. Política energética de Chile. (2015). Available at: http://www.energia2050.cl/uploads/libros/libro_energia_2050.pdf. (Accessed: 15th November 2016)
6. Peng, F., Peng, P., Xu, F. & Sun, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol. Adv.* **30**, 879–903 (2012).
7. Tuck, C. O., Perez, E., Horvath, I. T., Sheldon, R. a. & Poliakoff, M. Valorization of Biomass: Deriving More Value from Waste. *Science (80-.)*. **337**, 695–699 (2012).
8. Gupta, V. K. *et al.* Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 633–645 (2016).
9. Instituto Nacional de Estadísticas. Informe Anual 2013. Agropecuarias. 124 (2013). Available at: http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/informe_anual_agropecuarias_2013.pdf. (Accessed: 22nd November 2016)
10. Ruiz, C. Boletín INIA n°308: Rastrojos de cultivos anuales y residuos forestales. 193 (2015). Available at: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR40196.pdf>. (Accessed: 21st November 2016)
11. Mussatto, S. I., Fernandes, M., Milagres, A. M. F. & Roberto, I. C. Effect of

- hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme Microb. Technol.* **43**, 124–129 (2008).
12. Ritter, S. K. Lignocellulose: A Complex Biomaterial. *Chem. Engineering News* **86**, 15 (2008).
 13. Quiroz-castañeda, R. E. & Folch-mallol, J. L. Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Biotechnol. Apl.* **28**, 1–11 (2011).
 14. Aro, N., Pakula, T. & Penttilä, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 719–739 (2005).
 15. Menon, V. & Rao, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* **38**, 522–550 (2012).
 16. Boerjan W., Ralph J., B. M. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 519–546 (2003).
 17. Cohen, R., Suzuki, M. R. & Hammel, K. E. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2412–7 (2005).
 18. Moreira, L. R. S. & Filho, E. X. F. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 5205–5214 (2016).
 19. Collins, T., Gerday, C. & Feller, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 3–23 (2005).
 20. Hu, J., Arantes, V. & Saddler, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnol. Biofuels* **4**, 36 (2011).
 21. Sampedro, J. & Cosgrove, D. J. The expansin superfamily. Protein family review. *Genome Biol.* **6**, 242 (2005).
 22. Cosgrove, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**, 321–326 (2000).
 23. Saloheimo, M. *et al.* Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4202–4211 (2002).
 24. Wei, W. *et al.* Synergism between cucumber α -expansin, fungal endoglucanase

- and pectin lyase. *J. Plant Physiol.* **167**, 1204–1210 (2010).
25. Kang, K., Wang, S., Lai, G., Liu, G. & Xing, M. Characterization of a novel swollenin from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose. *BMC Biotechnol.* **13**, 42 (2013).
 26. Life Technologies Corporation. Multi-Copy Pichia Expression Kit. *User Manual* 101 (2010). Available at: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichmulti_man.pdf. (Accessed: 30th June 2014)
 27. Promega Corporation. pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems. *Technical Manual #TM042* 1–14 (2009). Available at: [https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/TechnicalManuals/0/pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems Protocol.pdf](https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/TechnicalManuals/0/pGEM-T%20and%20pGEM-T%20Easy%20Vector%20Systems%20Protocol.pdf). (Accessed: 30th June 2014)
 28. Bai, J. *et al.* A Gene Optimization Strategy that Enhances Production of Fully Functional P-Glycoprotein in *Pichia pastoris*. *PLoS One* **6**, e22577 (2011).
 29. Thermo Fisher Scientific Inc. SuperScript™ III Reverse Transcriptase. *Manual* 1–4 (2004). Available at: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/superscriptIII_man.pdf. (Accessed: 4th August 2014)
 30. Geneaid Biotech Ltd. Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit. *Manual* 1–4 (2008). Available at: <http://www.geneaid.com/sites/default/files/DF13.pdf>. (Accessed: 30th June 2014)
 31. Thermo Scientific. Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit. *Manual* 1–9 (2014). Available at: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012655_GeneJET_Plasmid_Miniprep_UG.pdf. (Accessed: 30th June 2014)
 32. Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428 (1959).
 33. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5 (1970).
 34. Switzer, R. C., Merrill, C. R. & Shifrin, S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **98**, 231–237 (1979).

35. Singh, S., Madlala, A. M. & Prior, B. A. Thermomyces lanuginosus: Properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 3–16 (2003).
36. New England Biolabs. Rapid PNGase F. 1–2 Available at: <https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/C40E92893C2D4762B0133BDE43E1F350/Datacards> or [Manuals/P0710Datasheet-Lot0011410.pdf](https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/C40E92893C2D4762B0133BDE43E1F350/Manuals/P0710Datasheet-Lot0011410.pdf). (Accessed: 15th May 2015)
37. Sun, Y. & Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.* **83**, 1–11 (2002).
38. Druzhinina, I. S. *et al.* Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 749–759 (2011).
39. Suwannarangsee, S. *et al.* Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design. *Bioresour. Technol.* **119**, 252–261 (2012).
40. Van Dyk, J. S. & Pletschke, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1458–1480 (2012).
41. Grinna, L. S. & Tschopp, J. F. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* **5**, 107–115 (1989).
42. Bastawde, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 353–68 (1992).
43. Plant, A. R., Morgan, H. W. & Daniel, R. M. A highly stable pullulanase from *Thermus aquaticus* YT-1. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 668–672 (1986).
44. Matte, A. & Forsberg, C. W. Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 157–68 (1992).
45. Chang, R. *Raymond Chang Quimica General 7Th Edicion. McGrawHill* (2002).
46. Abou-Hachem, M., Olsson, F. & Karlsson, E. N. Probing the stability of the modular family 10 xylanase from *Rhodothermus marinus*. *Extremophiles* **7**, 483–491 (2003).

47. Sydenham, R. *et al.* Cloning and enzymatic characterization of four thermostable fungal endo-1,4- β -xylanases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3613–3628 (2014).
48. Rabert, C., Weinacker, D., Pessoa, A. & Farías, J. G. Recombinants proteins for industrial uses: Utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Brazilian J. Microbiol.* **44**, 351–356 (2013).
49. Juge, N. *et al.* High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res* **1**, 127–132 (2001).
50. CHEN, X. *et al.* Enhancing the expression of *Aspergillus niger* β -mannanase in *Pichia pastoris* by coexpression of protein disulfide isomerase. *Turkish J. Biol.* **39**, 312–319 (2015).
51. Qiu, Z. *et al.* Expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase in yeast *Pichia pastoris* SMD1168. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2818**, 1–8 (2016).
52. Promdonkoy, P. *et al.* Expression and characterization of *Aspergillus* thermostable phytases in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Lett.* **290**, 18–24 (2009).
53. Berrin, J. G. *et al.* High-level production of recombinant fungal endo-beta-1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **19**, 179–187 (2000).
54. Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W. & Grinna, L. High-Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylotrophic Yeast, *Pichia Pastoris*. *Nat. Biotechnol.* **5**, 1305–1308 (1987).
55. Fonseca-Maldonado, R. *et al.* Engineering the pattern of protein glycosylation modulates the thermostability of a GH11 xylanase. *J. Biol. Chem.* **288**, 25522–25534 (2013).
56. Anbarasan, S. *et al.* Effect of glycosylation and additional domains on the thermostability of a family 10 xylanase produced by *thermopolyspora flexuosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 356–360 (2010).
57. Aw, R. & Polizzi, K. M. Can too many copies spoil the broth? *Microb. Cell Fact.* **12**, 128 (2013).
58. Zhong, Y. *et al.* High-temperature cultivation of recombinant *Pichia pastoris* increases endoplasmic reticulum stress and decreases production of human

interleukin-10. *Microb. Cell Fact.* **13**, 163 (2014).

59. Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. & Chet, I. Role of Swollenin, an Expansin-Like Protein from *Trichoderma*, in Plant Root Colonization. *Plant Physiol.* **147**, 779–789 (2008).
60. Chen, X. a. *et al.* Promotion of Efficient Saccharification of Crystalline Cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swo1. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2556–2561 (2010).

VII. ANEXO

7.1 Anexo de resultados

7.1.1 Cromatografía de afinidad por metales de TrSWO

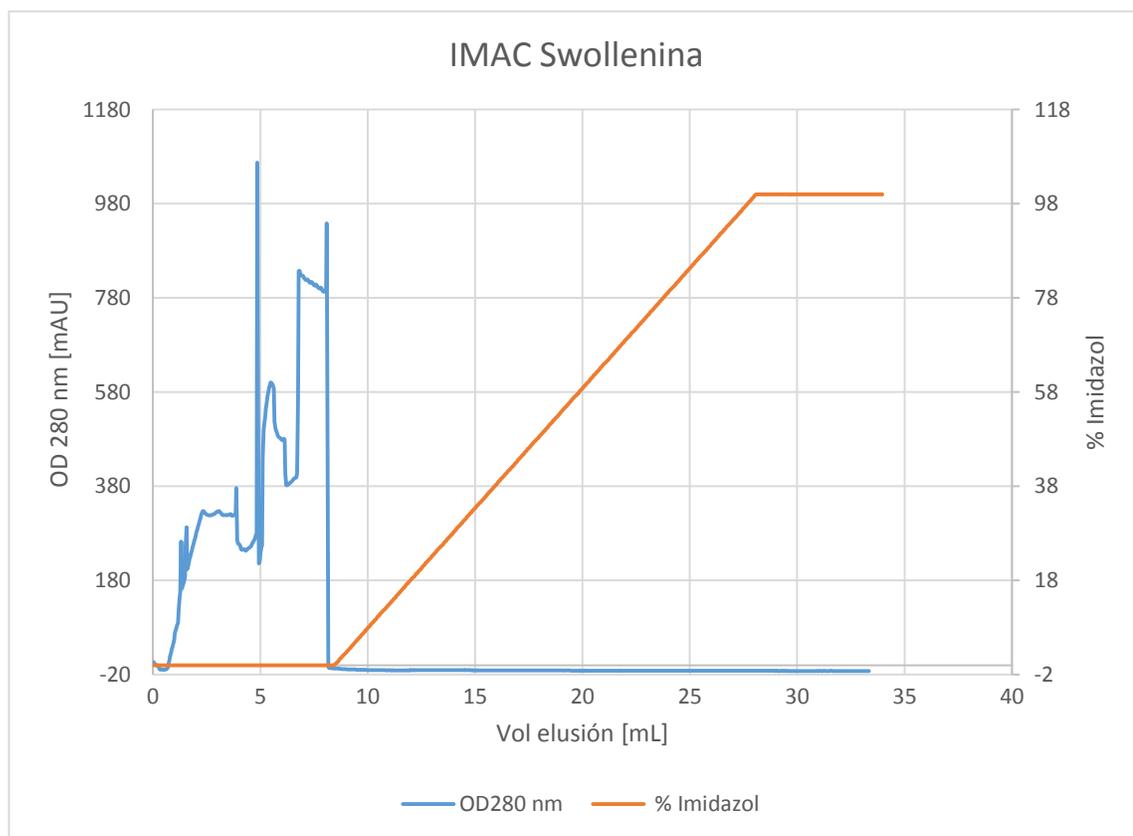


Figura 33. Perfil cromatográfico IMAC TrSWO. Se efectuó una gradiente de 20 mM a 250 mM de imidazol con 20 volúmenes de columna en amortiguador fosfato 20mM a pH 8 con NaCl 500 mM. En azul se muestra absorbancia a 280 nm con su escala en el eje principal, en amarillo la gradiente de sal presentada como conductividad con su escala en el eje secundario y en naranja la gradiente realiza indicando el porcentaje de imidazol 250 mM añadido con su escala en el eje secundario.

7.1.2 Modelo 3D de TrSWO

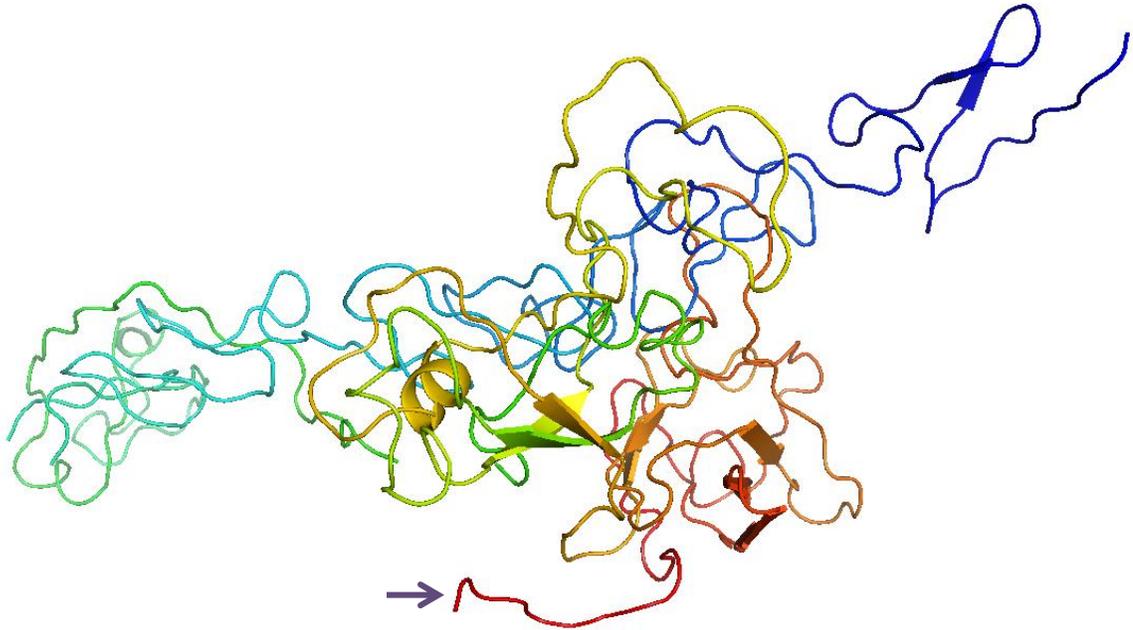


Figura 34. Modelo 3D de TrSWO. Zona amino terminal se muestra en azul y zona carboxilo terminal en rojo. Con la flecha morada se indica la cola de polihistidina. Modelo obtenido desde servidor RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>), que presenta los siguientes parámetros: uGDT (GDT): 264 (55), 36 (7%) de posiciones predichas como desordenadas, 475 (100%) de los residuos modelados, además posee tres dominios que presentan los siguientes valores: dominio 1: templados 2vj2A, 4cbzA, 4xl1B, p-value de 2,10e-04, score 26; dominio 2: templados 2hczX, 1n10A, 2bh0A, 4jcwA, p-value 2,33e-05; score 17; dominio 3: templado 1wc2:A; p-value 2,35e-10; score 126.

7.1.3 Modelo 3D de GtXYL1

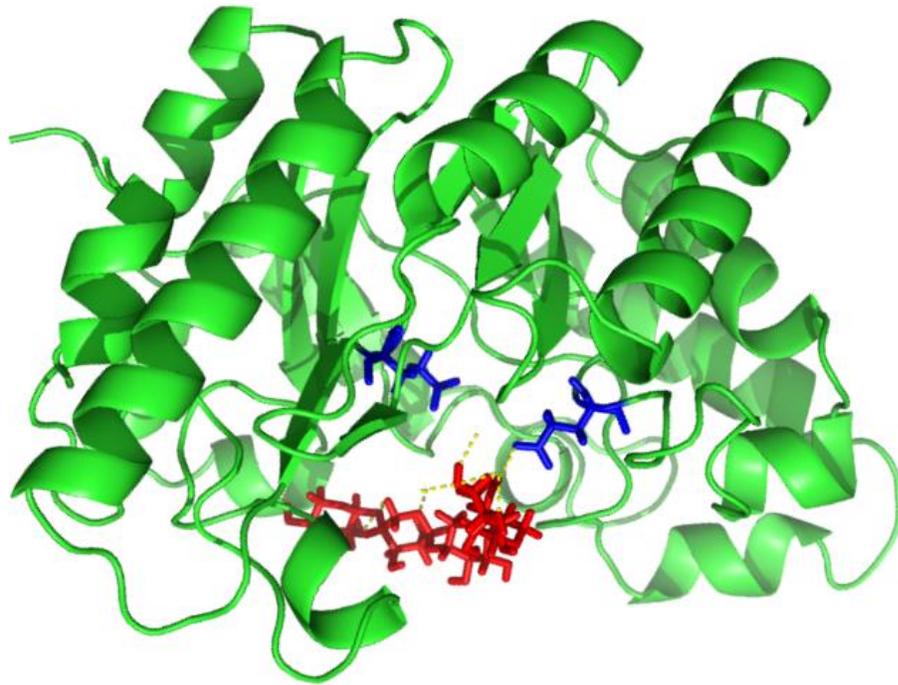


Figura 35. Modelo 3D de GtXYL1. Enzima GtXYL1 en interacción con su sustrato. En verde se muestra modelo tridimensional de la enzima, en azul los aminoácidos ácidos glutámicos presentes en el sitio activo (E151, E256) y en rojo el sustrato de la enzima. Modelo obtenido desde servidor RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>), fue modelado a partir del templado 3wuf:A y presenta los siguientes parámetros: uGDT (GDT): 276(87), p-value 2,21e-11; score 338; 0 (0%) de posiciones predichas como desordenadas; 316 (100%) residuos modelados.

7.1.4 Análisis de glicosilaciones en GtXYL1

```

Name: Sequence          Length: 336
GGRELIRLIHDCSSVQVGHGREYCGLAKAAGKLYMGATDNGELTDAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEPEQGTW      80
TWTNADQIANLAKTNGQLLRGHNCVWYNQLPSWVTSGSWNTATLAVVQDHTTELVSRYPKGVYAWDVINEPFNDGTYR      160
SDVFYNTIGPAYIPIALRAARAADPNKLYINEYNIETGSKATAMLNLVESLKAEGVPIDGVGLQSHFIVGEVPTSLQS      240
IMEQFTALGVEVAITELDIRMTLPETAALLEQKKTDYDVISACRAVSGCVGVTWDFDVKYSWVPSTFSGQGAATPYDS      320
NLVKKPAYDGVVAGWQ
.....
.....N.T.T.....
.....
.....T.....
.....
(Threshold=0.5)
-----
SeqName      Position  Potential  Jury      N-Glyc
              agreement result
-----
Sequence     121 NATL    0.6576    (9/9)    ++
-----
##gff-version 2
##source-version NetOGlyc 4.0.0.13
##date 16-11-18
##Type Protein
#seqname      source  feature start  end  score  strand  frame  comment
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  13   13   0.392704  .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  14   14   0.208467  .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  37   37   0.230011  .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  39   39   0.183997  .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  45   45   0.0241517 .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  118  118  0.307749  .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  120  120  0.287175  .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  123  123  0.525625  .    . #POSITIVE
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  125  125  0.5        .    . #POSITIVE
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  132  132  0.162928  .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  133  133  0.236889  .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  137  137  0.0423162 .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  158  158  0.00546681 .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  161  161  0.0421526 .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  167  167  0.0861535 .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  199  199  0.0219352 .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  201  201  0.0910562 .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  204  204  0.0574576 .    .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  316  316  0.626892  .    . #POSITIVE
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  320  320  0.176554  .    .

```

Figura 36. Análisis de potenciales glicosilaciones en GtXYL1. Primero se observa la secuencia de la proteína GtXYL1 con las posibles glicosilaciones destacando en rojo probabilidades de N-glicosilación y en azul O-glicosilaciones. Luego se destacan los aminoácidos con potenciales glicosilaciones. Se considera un resultado positivo a un valor sobre 0,5. En el análisis se aprecia la secuencia NAT, donde hay probabilidades de N-glicosilación en la asparagina 121 y también se observa que en las treoninas 123, 125, 316 se pueden producir O-glicosilaciones. El análisis se realizó con las herramientas en línea NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) y NetOGlyc 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>).

7.1.5 Zimograma original de GtXYL1

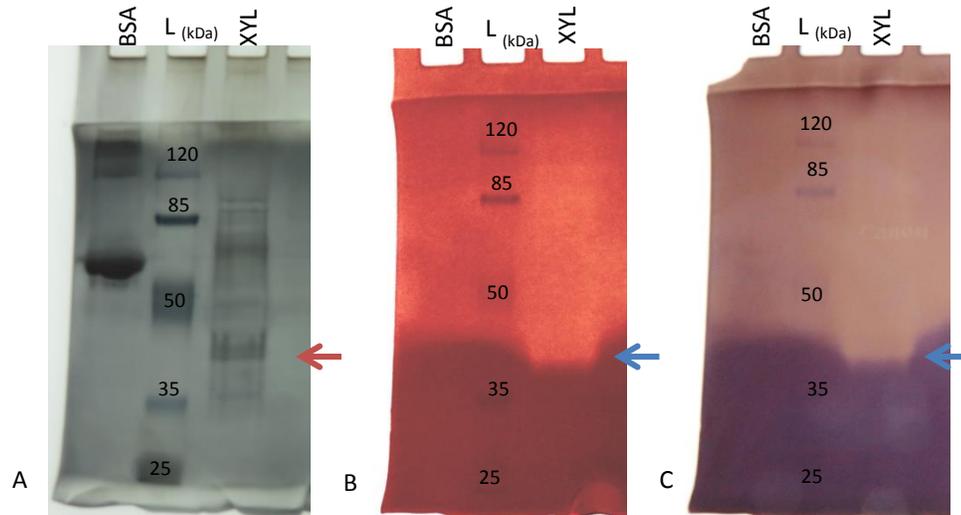
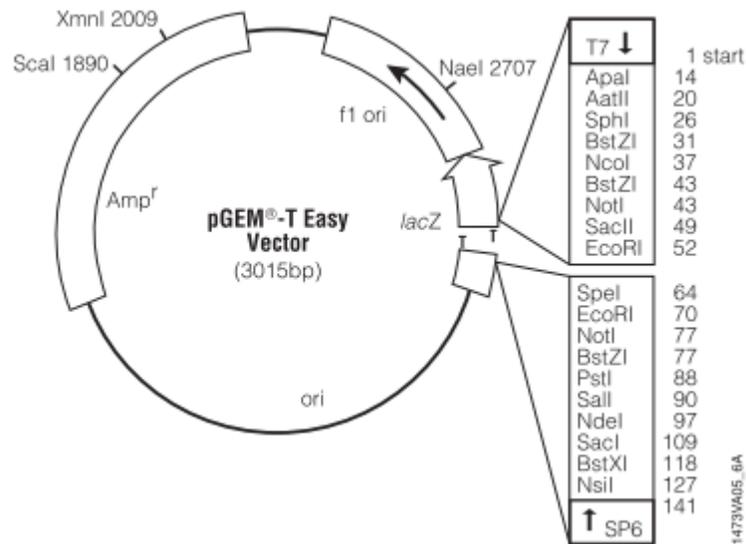


Figura 37. Zimograma original con tinción plata (A), tinción Rojo Congo (B) y Rojo Congo – ácido acético 10% (C) de GtXYL1 purificada. Ambos gels son de poliacrilamida al 10% y xilano al 0,4% (B y C son el mismo gel con distinta tinción). Orden de carga de izquierda a derecha se encuentran: BSA como control negativo, estándar de peso molecular (L, en kDa) y GtXYL1 purificada. El gel con tinción Rojo Congo es la versión original sin modificaciones y (C) es el mismo gel teñido con Rojo Congo que luego se dejó unos segundos en ácido acético 10%. Con flechas roja y azules se indica a GtXYL1.

7.2 Anexo de bibliografía

7.2.1 Mapas de vectores utilizados



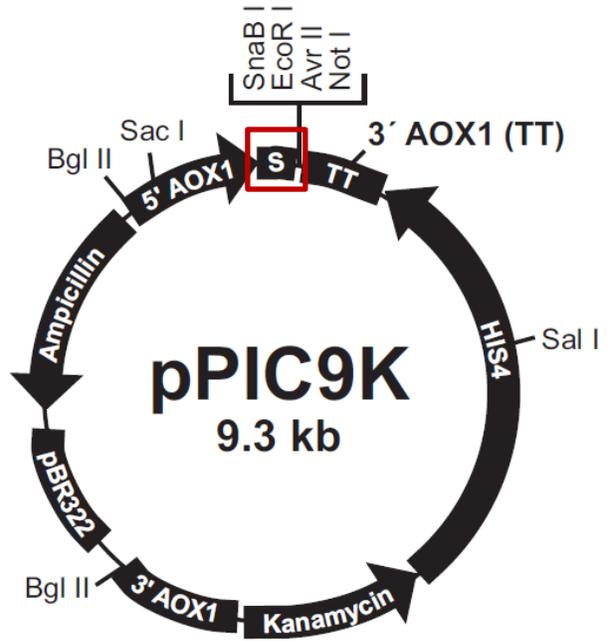
pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200-216
β -lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3

Figura 38. Mapa del vector de clonamiento pGEM®-T Easy. Descripción de la ubicación de los componentes del vector. Se destaca región de múltiple clonamiento con las posibles enzimas de restricción junto a su ubicación en el vector.²⁷

Comments for pPIC9K:
9276 nucleotides

5' AOX1 promoter fragment: bases 1-948
 5' AOX1 primer site: bases 855-875
 α-Factor secretion signal(s): bases 949-1218
 α-Factor primer site: bases 1152-1172
 Multiple Cloning Site: bases 1216-1241
 3' AOX1 primer site: bases 1327-1347
 3' AOX1 transcription termination (TT):
 bases 1253-1586
 HIS4 ORF: bases 4514-1980
 Kanamycin resistance gene: bases 5743-4928
 3' AOX1 fragment: bases 6122-6879
 pBR322 origin: bases 7961-7288
 Ampicillin resistance gene: bases 8966-8106



Comments for pPIC3.5K:
9004 nucleotides

5' AOX1 promoter fragment: bases 1-937
 5' AOX1 primer site: bases 855-875
 Multiple Cloning Site: bases 938-968
 3' AOX1 primer site: bases 1055-1075
 3' AOX1 transcription termination (TT):
 bases 981-1314
 HIS4 ORF: bases 4242-1708
 Kanamycin resistance gene: bases 5471-4656
 3' AOX1 fragment: bases 5850-6607
 pBR322 origin: bases 7689-7016
 Ampicillin resistance gene: bases 8694-7834

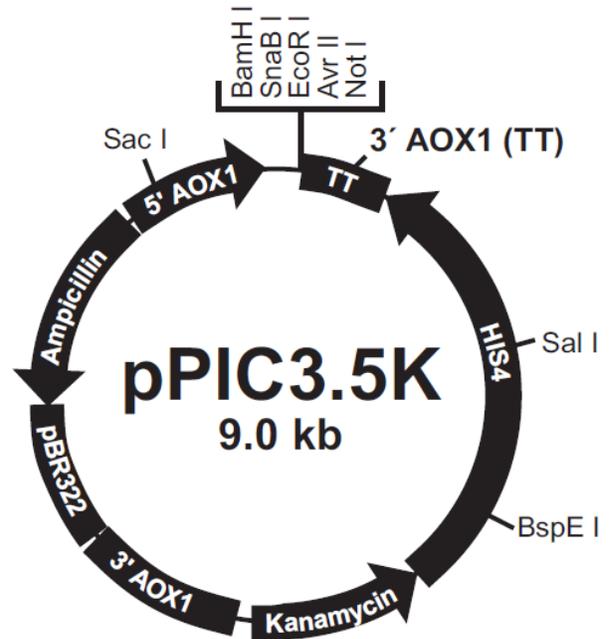


Figura 39. Mapa de los vectores de expresión pPIC9K y pPIC3.5K. Descripción de la ubicación de los componentes del vector. Con corchete se indica la región de múltiple clonamiento con las posibles enzimas de restricción a utilizar. En recuadro rojo se destaca secuencia del péptido señal de *S. cerevisiae* presente en vector pPIC9K.²⁶

7.2.2 Generación de insertos multicopia en *Pichia pastoris*

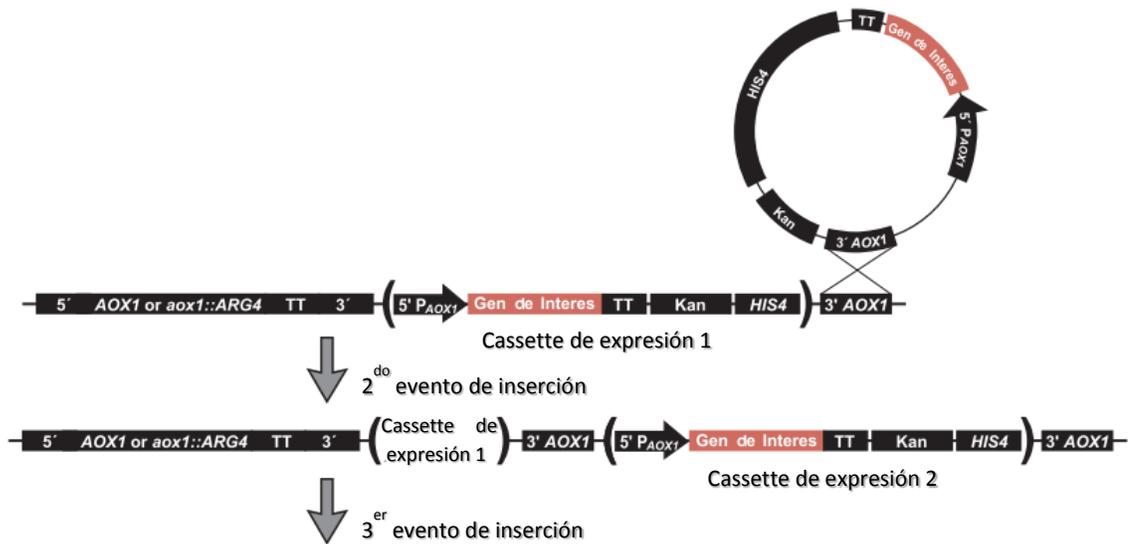


Figura 40. Generación de insertos multicopia en *Pichia pastoris*. Inserción múltiple en el genoma de *Pichia pastoris* del cassette de expresión. El cassette incluye al promotor del gen *AOX1*, gen de interés, resistencia a geneticina (Kan) y gen de histidinol deshidrogenasa (*HIS4*). Modificado de referencia²⁶