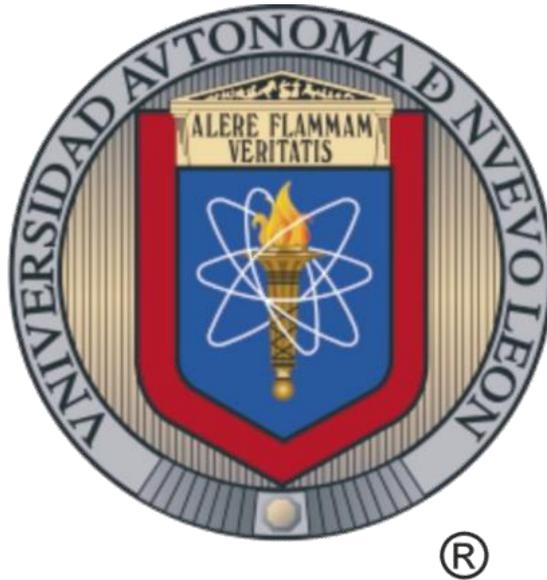


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**Clonación y expresión del ADNc que codifica para la enzima endo- β -
1,4-glucanasa de *Coptotermes formosanus* en *Pichia pastoris***

PRESENTA

L.B.G. JAVIER OMAR JARA OCHOA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

OCTUBRE, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**Clonación y expresión del ADNc que codifica para la enzima endo- β -
1,4-glucanasa de *Coptotermes formosanus* en *Pichia pastoris***

PRESENTA

L.B.G. JAVIER OMAR JARA OCHOA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

OCTUBRE, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**Clonación y expresión del ADNc que codifica para la enzima endo- β -
1,4-glucanasa de *Coptotermes formosanus* en *Pichia pastoris***

PRESENTA

L.B.G. JAVIER OMAR JARA OCHOA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

OCTUBRE, 2017

**ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

**PhD. Francisco Zavala García
Asesor Principal**

**Dr. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez
Asesor Externo**

**Dra. Sugey Ramona Sinagawa García
Co-Asesor**

**Dra. Adriana Gutiérrez Díez
Subdirección de Estudios de Posgrado**

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el laboratorio de Biotecnología en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Ph. D. Francisco Zavala García, la Co-Dirección del Dr. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez y la Dra. Sugey Ramona Sinagawa García como parte de la comisión.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis el Dr. Francisco Zavala, el Dr. Jorge Ascacio y la Dra. Sughey Sinagawa quienes con su vasta experiencia me ayudaron a culminar la tesis.

Al Dr. Francisco Zavala por sus aportaciones y sugerencias para sacar el proyecto adelante.

Al Dr. Jorge Ascacio por brindarme su amplia experiencia, apoyo incondicional y su laboratorio para mis ensayos.

A la Dra. Sughey por ayudarme siempre en todo momento y por facilitarme los medios posibles para la realización de esta tesis.

A mi amigo José Luis Nava Ríos “Cuerna” por sus valiosos aportes y ayuda que siempre estuvo y sé que estará.

A la Facultad de Agronomía, la Facultad de Medicina y en general a la Universidad Autónoma de Nuevo León por proporcionarme sus instalaciones para la realización de este proyecto.

Finalmente agradezco el apoyo de CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología), el cual hizo posible la realización de esta memoria.

DEDICATORIA

A mis padres Javier Jara y Martha Ochoa quienes sin su ayuda una sola letra de este escrito no podría haber sido plasmada.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2.OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo general.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3. REVISIÓN LITERATURA.....	6
3.1 Bioetanol.....	6
3.1.1 Problemática.....	6
3.1.2 Materia prima para uso de bioetanol.....	7
3.1.2 Beneficios.....	8
3.2 Lignocelulosa.....	8
3.2.1 Celulosa.....	12
3.2.2 Hemicelulosa.....	12
3.2.3 Lignina.....	13
3.3 Hidrólisis enzimática de la celulosa.....	14
3.4 Enzima endo- β -1,4-glucanasa.....	17
3.5 Termita <i>Coptotermes formosanus</i>	18
3.6 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión.....	20
3.7 Vector de clonación pUC57.....	22
3.8 Vector de expresión pPIC9.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1 Estrategia General.....	24
4.2 Material Biológico.....	25
4.2.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	25
4.2.2 Cepas de <i>Pichia pastoris</i>	25
4.3 Construcción del gen optimizado de la EG.....	25
4.4 Preparación de células calcio-competentes DH5 α	26
4.5 Transformación del plásmido pUC57-EG en <i>E. coli</i>	26
4.6 Extracción de ADN plasmídico con técnica TENS.....	27
4.7 Caracterización del plásmido pUC57-EG.....	28
4.8 Extracción de ADN plasmídico con kit QIAGEN.....	28

4.9 Caracterización de pUC57-EG.....	29
4.10 Resiembra de colonias transformadas con vector pUC57-EG.....	30
4.11 Preparación del vector de expresión pPIC9.....	30
4.12 Purificación del gen EG y vector pPIC9.....	30
4.13 Ligación pPIC9-EG.....	31
4.14 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α pPIC9-EG.....	32
4.15 Miniprep de <i>E. coli</i> DH5 α pPIC9-EG.....	32
4.16 Caracterización de <i>E. coli</i> DH5 α pPIC9-EG.....	32
4.17 Resiembra y almacenamiento de <i>E. coli</i> DH5 α pPIC9-EG.....	33
4.18 Linearizado del vector de expresión pPIC9.....	33
4.19 Preparación de células electrocompetentes cepa GS115.....	33
4.20 Transformación de <i>P. pastoris</i> con casete de expresión pPIC9-EG....	34
4.20.1 Linearización del vector pPIC9-EG.....	34
4.20.2 Transformación de la cepa GS115.....	34
4.21 Caracterización de levaduras transformadas GS115 pPIC9-EG.....	35
4.22 Ensayos de expresión a nivel tubo de ensayo de 10 ml.....	35
4.22.1 Inducción de la producción de la EG en <i>P. pastoris</i> GS115.....	35
4.22.2 Diálisis del medio de inducción.....	36
4.22.3 Precipitación de proteínas con método metanol-cloroformo.....	36
4.23 Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE.....	37
4.24 Cuantificación de proteínas.....	37
4.25 Ensayos enzimáticos de la enzima recombinante.....	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
5.1 Construcción del gen optimizado para EG.....	39
5.2 Síntesis del vector pUC57-EG.....	42
5.3 Secuencia del sitio múltiple de clonación del vector pPIC9.....	43
5.4 Caracterización del plásmido pUC57-EG en <i>E.coli</i>	44
5.5 Extracción de ADN plasmídico.....	44
5.5.1 Extracción con método TENS.....	45
5.5.2 Extracción con kit comercial QIAGEN.....	45
5.6 Caracterización de la construcción pUC57-EG.....	46
5.7 Preparación y cuantificación del vector pPIC9.....	47
5.8 Linearización del vector pPIC9.....	48
5.9 Purificación del gen EG y linearización de pPIC9 a partir de gel.....	49
5.10 Ligación del gen EG con el vector pPIC9.....	50
5.11 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> DH5 α pPIC9-EG.....	51
5.12 Linearización de pPIC9 con <i>SacI</i>	52
5.13 Transformación de GS115 con pPIC9-EG mediante electroporación...	53

5.14 Caracterización de las colonias transformadas.....	55
5.15 Ensayos de expresión de la EG en <i>P. pastoris</i> a mínima escala.....	56
5.16 Análisis de las proteínas producidas mediante SDS-PAGE.....	56
5.17 Cuantificación de las proteínas.....	58
5.18 Ensayos enzimáticos de la proteína recombinante.....	58
6. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	60
ANEXO I. Soluciones stock.....	61
ANEXO II. Medios de cultivo.....	62
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólisis enzimática de la celulosa.....	17
Figura 2. Producción de biomasa por <i>Pichia pastoris</i>	21
Figura 3. Vector de clonación pUC57.....	22
Figura 4. Vector de expresión pPIC9.....	23
Figura 5. Esquema de la estrategia general.....	24
Figura 6. Secuencia nucleotídica de la enzima EG.....	39
Figura 7. Secuencia nucleotídica final optimizada.....	40
Figura 8. Representación lineal de la secuencia optimizada.....	41
Figura 9. Mapa del vector pUC57 y sitio múltiple de clonación.....	42
Figura 10. Región del vector pPIC9 donde se insertará el gen de la EG...	43
Figura 11. Colonias transformadas <i>E. coli</i> DH5 α pUC57-EG.....	44
Figura 12. Reacción de digestión de pUC57.....	46
Figura 13. Muestras del vector pPIC9.....	47
Figura 14. Caracterización del vector pPIC9.....	48
Figura 15. Análisis de restricción de pUC57 y pPIC9.....	50
Figura 16. Colonias transformadas <i>E. coli</i> DH5 α pPIC9-EG.....	50
Figura 17. Caracterización de la construcción DH5 α pPIC9-EG.....	51
Figura 18. Caracterización del vector pPIC9-EG.....	52
Figura 19. Cepa GS115 pPIC9-EG en medio selectivo MD.....	53
Figura 20. Análisis de PCR de colonias GS115 pPIC9-EG.....	55
Figura 21. Gel SDS-PAGE.....	57

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas y desechos	11
Cuadro 2. Reacción de ligación entre vector pPIC9 y gen de la EG	32
Cuadro 3. Concentración de ADN plasmídico pPUC57-EG en células de <i>E. coli</i> DH5 α obtenido por el método TENS.	45
Cuadro 4. Concentración de ADN plasmídico PpUC57-EG en células de <i>E. coli</i> DH5 α obtenido mediante kit comercial	45
Cuadro 5. Concentración de ADN plasmídico de pPIC9	48
Cuadro 6. Cuantificación de proteínas de GS115-EG con el método de Lowry	58
Cuadro 7. Análisis enzimáticos con CMC	59

ABREVIATURAS

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

ADNc. Ácido desoxirribonucleico complementario al ARNm.

ADNp. Ácido desoxirribonucleico plasmídico.

Aox1. Gen de la enzima alcohol oxidasa.

ARN. Ácido ribonucleico

ARNm. Ácido ribonucleico mensajero

BG. β -glucosidasas

BMMY. Buffered Methanol-complex Medium.

CMC. Carboximetil celulosa

CO₂. Dióxido de carbono.

DO. Densidad óptica

EG. Endo- β -1,4-glucanasa.

Et al. et alii (y otros; y colaboradores).

EtOH. Etanol

GHF. Familia glicosil hidrolasa

kDa. Kilodalton.

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani

MD. Medio de cultivo Minimal Dextrose.

SDS-PAGE. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

YPD. Medio de cultivo Yeast Extract Peptone Dextrose.

RESUMEN

El agotamiento inevitable de petróleo ha despertado interés en combustibles alternativos en el mundo. Una de las opciones en la actualidad es el desarrollo de energías renovables que a su vez proporcionen un aporte positivo al medio ambiente, contrario a los combustibles fósiles utilizados en la actualidad. Las enzimas ofrecen ventajas sustanciales sobre los catalizadores químicos debido a que son derivadas de recursos renovables, son biodegradables, trabajan en condiciones relativamente moderadas, tienden a ofrecer una exquisita selectividad en la estereoquímica de reactantes como de productos. En este estudio se sintetizó el ADN complementario de una enzima involucrada en la degradación de celulosa, la endo- β -1,4-glucanasa derivada de la termita *Coptotermes formosanus*, ya que estudios sugieren que esta termita utiliza la celulosa como fuente de alimento. El ADN complementario fue modificado y clonado en el vector pPIC9 y se expresó en *Pichia pastoris* cepa GS115. La enzima se produjo y mostró actividad celulolítica sobre carboximetil celulosa, liberando productos hidrolíticos en medio líquido. Comprender el metabolismo de la celulosa en termitas podría ayudar al desarrollo de biopesticidas para este tipo de plagas. Las celulasas recombinantes podrían ser útiles en algún programa de producción de bioetanol basado en azúcares, además podría tener otro tipo de aplicaciones como en el pretratamiento de insumos en la industria fermentadora.

ABSTRACT

The inevitable depletion of oil has sparked interest in alternative fuels around the world. One option today is the development of renewable energy which in turn provide a positive contribution to the environment, contrary to fossil fuels used today. Enzymes offer substantial advantages over chemical catalysts because they are derived from renewable resources, biodegradable, working in relatively mild conditions, they tend to offer exquisite selectivity in the stereochemistry of reactants and products. In this study the complementary DNA of the endo- β -1,4-glucanase enzyme was synthesized, which is involved in the degradation of cellulose to simple sugars formation, this cDNA comes from *Coptotermes formosanus* termite because studies suggest that this termite uses cellulose as a food source. The cDNA was modified and transformed into *Escherichia coli* DH5 α and subsequently was cloned in the expression system of *Pichia pastoris* GS115 strain. The enzyme was produced and showed cellulolytic activity on CMC, releasing hydrolytic products in liquid medium. Recombinant cellulases could be useful in a bioethanol production program based on sugar, it could also have another applications such as the treatment of products in fermentation industry; besides provide extra information that could facilitate cellulolytic understanding in termites and therefore to the development of biopesticides.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la necesidad de incrementar la producción de bioetanol utilizando materias primas de fuentes renovables y sobre todo que no posean valor alimenticio como el caso del maíz y caña de azúcar, han incrementado los estudios de los procesos de hidrólisis ácida y enzimática, con el objetivo de separar la lignina de la celulosa y hemicelulosas de los materiales lignocelulósicos para disponer de estos materiales y convertirlos a bioetanol mediante una hidrólisis enzimática eficiente (Sánchez y Cardona, 2008). En la actualidad, ha surgido un creciente interés en el estudio de los sistemas enzimáticos necesarios para el metabolismo de la celulosa, polisacárido más abundante en la naturaleza (Biely, 1985). Su composición es variable y depende de la fuente vegetal del que provenga, por lo que recientemente, los estudios se han enfocado en la clonación, caracterización, expresión y purificación de enzimas celulolíticas para producirlas de manera eficiente y utilizarlas a nivel industrial en la producción de bioetanol (Cooper, 2013).

El bioetanol es el biocombustible líquido más utilizado directamente como potenciador de gasolina. Está reportado que el etanol tiene grandes propiedades amplificadores, no es tóxico y no contamina las fuentes de agua (Sánchez y Cardona, 2008). El bioetanol, no solo reduce la dependencia de las importaciones de petróleo y alivia las incertidumbres causadas por las fluctuaciones de precio, sino que también asegura las reducciones en los problemas de contaminación del medio ambiente debido a su alto contenido de oxígeno (Demain, 2009). La seguridad

energética y el cambio climático son problemas que se deben atender y la sustitución de los combustibles derivados de fuentes no renovables como el petróleo por biocombustibles de fuentes renovables es la mejor opción.

Las enzimas ofrecen ventajas sustanciales sobre los catalizadores químicos, en cuanto a que son derivadas de recursos renovables, son biodegradables, trabajan bajo condiciones relativamente moderadas de temperatura y pH, además tienden a ofrecer una exquisita selectividad en la estereoquímica tanto de reactantes como de productos (Cherry, 2003). A medida que las preocupaciones medioambientales aumentan por presión de la población y la industrialización, la necesidad de encontrar métodos más eficientes de producción de bienes y provisión de servicios da lugar a mayor interés en las enzimas (Guerrero, 2009).

Las termitas (fam. *Insecta*; subfam *Isoptera*) son las principales fuentes para degradar material orgánico en algunas regiones. Tienen una capacidad profundamente eficaz para degradar la celulosa (Ohkuma, 2003; Yamada *et al.*, 2005). Pueden digerir hasta 99% de la celulosa presente en el material vegetal que ingieren. Por lo anterior, estos organismos han sido de gran interés para los investigadores. Además, las termitas poseen un mecanismo dual de degradación de celulosa, específicamente por que presentan complejos enzimáticos como endo y exo glucanasas que trabajan de manera conjunta y que contribuyen a eficientar los procesos de degradación (Nakashima *et al.*, 2002; Watanabe y Tokuda, 2010; Scharf *et al.*, 2011).

Las principales enzimas involucradas en la degradación de la celulosa son la endo- β -1,4-glucanasa (EG), exoglucanasas y β -glucosidasas (BG). Las EG pertenecen a la familia glicosil hidrolasa 9 (GHF) (Watanabe *et al.*, 1998; Nakashima *et al.*, 2002; Tokuda *et al.*, 2004; Watanabe y Tokuda, 2010). En la actualidad existen estudios donde han aislado el ARN total de la enzima endo- β -1,4-glucanasa de la termita *Coptotermes formosanus* (Zhang *et al.*, 2009) y se ha clonado el ADN complementario (ADNc) de las enzimas endo- β -1,4 glucanasa y β -glucosidasa en *Escherichia coli* y se ha analizado la actividad de la enzima marcada con etiquetas de histidina (HisTag) en el extremo C-terminal y posteriormente la enzima sin HisTag; la actividad de la enzima construida sin HisTag fue mejor que la de forma nativa, concluyendo que las etiquetas de histidina posiblemente afectaron la estructura tridimensional de la proteína y se propuso entonces que en un futuro se llevara a cabo la clonación con HisTag en el extremo N-terminal. También se demostró que la enzima EG endógena de *C. formosanus*, se expresó en *E. coli* y fue activa al digerir papel filtro compuesto de celulosa, liberando principalmente celotriosa y celobiosa (Zhang *et al.*, 2009). La función de esta celulasa también implica que la celulosa puede convertirse en glucosa cuando una β -glucosidasa está presente, sin la ayuda de 1,4- β -glucan celobiohidrolasa (exoglucanasa), la cual se pensaba que era necesaria para la hidrólisis efectiva de celulosa a glucosa en hongos y sistemas bacterianos (Nakashima *et al.*, 2002).

Clarificar los mecanismos moleculares que permiten a las termitas degradar la madera para utilizar la lignocelulosa como única fuente de alimento, hace una tentadora área de investigación en la cual se explora el potencial para optimizar la

producción de enzimas recombinantes en la conversión de biomasa (Ni *et al.*, 2005, 2007; Todaka *et al.*, 2009).

La levadura *P. pastoris* y su cepa GS115 es un sistema de expresión que produce altos niveles de proteínas heterólogas, entre uno a dos órdenes de magnitud encima de *Saccharomyces cerevisiae* (Faber *et al.*, 1995), por lo que las levaduras juegan un papel importante para obtener altos rendimientos de las proteínas de interés. Además, son capaces de secretar proteínas heterólogas al medio de cultivo (Veana *et al.*, 2014) y puede cultivarse a altas densidades celulares de más de 450 g/L en peso húmedo y de 130 g/L de peso seco (Siegel y Brierley, 1989; Wegner, 1990), logrando concentraciones hasta de gramos de la proteína recombinante por litro de medio de cultivo (Romanos *et al.*, 1991). El vector comúnmente utilizado por *P. pastoris* para la sobreexpresión de proteínas es el pPIC9, es por estas razones que hacen a *P. pastoris* un sistema de expresión ideal para la producción de proteínas recombinantes, tanto para investigación básica como para fines industriales (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2002).

En base a lo anterior, el propósito de la presente investigación fue clonar y caracterizar la enzima EG modificada de *C. formosanus* y evaluar su actividad en el sistema de expresión de *P. pastoris* con la finalidad de obtener información acerca del mecanismo de degradación de la celulosa que pueda utilizarse en programas de producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos, además podría tener otro tipo de aplicaciones como en el pretratamiento de insumos en la industria fermentadora de azúcares.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Identificar, modificar y clonar la secuencia genética de la enzima endo- β -1,4-glucanasa (EG) derivada de la termita *Coptotermes formosanus* y producirla en el sistema de expresión de *Pichia pastoris* cepa GS115.

2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar especies de organismos productores de enzimas capaces de degradar sustratos de celulosa insoluble.
2. Identificar enzimas relacionadas con el metabolismo de la celulosa.
3. Diseñar *in silico* la secuencia génica que codifica para la enzima endo- β -1,4-glucanasa y añadir elementos génicos que faciliten su clonación.
4. Sintetizar y clonar el gen que codifica para la endo- β -1,4-glucanasa en el vector pUC57 de *E. coli* DH5 α (compañía GeneScript).
5. Construir el vector de expresión pPIC9 para *P. pastoris* conteniendo la secuencia génica de la enzima endo- β -1,4-glucanasa.
6. Transformar *P. pastoris* GS115 con la construcción pPIC9-EG y con el casete sin el gen de la EG como control negativo del ensayo.
7. Realizar análisis enzimáticos de la proteína recombinante.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Bioetanol

3.1.1. Problemática

El problema en la demanda de combustibles líquidos es más crítico en países cuya economía se basa en el transporte vehicular; el uso de combustibles fósiles ha traído como consecuencia una masiva emisión de gases contaminantes, dióxido y monóxido de carbono, los cuales han sido asociados al llamado efecto invernadero (Mercer, 1971).

Existen preocupaciones sobre el suministro de petróleo y las consecuencias ambientales del consumo del combustible a gran escala por lo que se están impulsando la explotación de alternativas más sustentables (Berlin *et al.*, 2006). El bioetanol es una de las opciones que podrían sustituir a los combustibles para vehículos. En general, las diversas materias primas utilizadas para la producción de bioetanol por fermentación podrían clasificarse en tres tipos de materias primas: azúcares, almidones y materiales lignocelulósicos (Liu y Shen, 2008).

Los combustibles fósiles oxigenados con etanol han jugado un papel importante dentro de la política de tecnologías limpias para la obtención de energías renovables, ya que el uso de mezclas de etanol-combustible fósil, permiten una oxidación más

eficiente, por lo cual se disminuye la emisión de monóxido de carbono y aromáticos a la atmósfera (Álvarez, 2006).

3.1.2 Materia prima para uso de bioetanol

El uso de materias primas pertenecientes a la cadena alimenticia ha generado controversias y aseveraciones como la de Jean Zigler (Relator especial de la alimentación para la ONU), quien afirmó que el uso de cultivos alimenticios para la conversión en combustible constituía un “crimen contra la humanidad tomando en cuenta que mil millones de personas sufren hambre en el mundo”. La complicación radica en que algunos países como Estados Unidos, obligan a competir los centros de suministro de alimentos con las estaciones de combustible, debido a que ambos demandan el maíz ya sea como producto alimenticio o como materia prima para la producción de bioetanol. (González *et al.*, 2008).

El mundo encara el agotamiento progresivo de sus recursos energéticos basados mayoritariamente en combustibles no renovables. Por otro lado, el consumo global de combustibles genera enormes cantidades de gases contaminantes que son liberados a la atmósfera (Carrero, 2007). Este tipo de contaminación ha causado cambios en el clima, por lo que se ha convertido en una de las problemáticas que más preocupan a los gobiernos, las comunidades y la opinión pública en general (FNB, 2004). La única forma de encarar esta problemática es mediante recursos energéticos renovables; para ello, la biotecnología ofrece múltiples alternativas tecnológicas. Una solución renovable es el uso de energía solar y aprovecharla en forma de biomasa, la cual está representada en los materiales lignocelulósicos y los

cultivos de plantas ricas en energía. Las emisiones de CO₂ generadas por la producción y uso de biocombustibles son compensadas por la absorción de CO₂ durante el crecimiento de las plantas y de otros materiales vegetales, a partir de los cuales dichos combustibles se producen (Cardona y Sánchez, 2005). Cannell (2003) destacó que una hectárea de cultivo usado para la producción de biocombustibles líquidos (bioetanol, biodiesel), puede evitar la emisión de 0.2-2.0 ton de carbono a la atmósfera en comparación con el empleo de combustibles fósiles.

3.1.3 Beneficios

Para un país como Estados Unidos, la producción masiva de biocombustibles representaría el "regreso" de dinero y puestos de trabajo a la economía, sin mencionar que el desarrollo de cultivos energéticos implicaría un impulso al sector rural (Sheehan y Himmel, 1999). Este argumento es aún más válido para la mayoría de los países latinoamericanos, considerando la perspectiva de una reducción de las reservas comprobadas de petróleo en un plazo de 5-10 años. Una parte importante del PIB de cada país tendría que destinarse a la compra de petróleo, cuya perspectiva de precios es muy incierta, a lo que hay que agregar la feroz competencia que encaran los productos agrícolas de los países latinoamericanos frente a los enormes subsidios destinados al sector primario por los países desarrollados (Cardona y Sánchez, 2005).

3.2 Lignocelulosa

En la actualidad, el bioetanol se utiliza como combustible alternativo para vehículos en Estados Unidos, Brasil y China, se produce principalmente a partir de almidón de

maíz o caña de azúcar (Macedo *et al.*, 2008). Aunque el bioetanol producido a partir de maíz o de caña de azúcar domina los mercados de biocombustibles en la actualidad, su espacio de desarrollo ha sido limitado por el recurso de tierra y el suministro de alimentos. El proceso para la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos es más complicado que producirlo a partir de azúcar o almidón. La estructura cristalina recalcitrante de la biomasa lignocelulósica, que dota a la pared de la célula de planta con resistencia a la biodegradación, impide su hidrólisis a azúcares monoméricos para la posterior conversión de bioetanol (Wen *et al.*, 2009).

La lignocelulosa de residuos agrícolas, industriales y forestales representa la mayor parte de la biomasa total presente en el mundo y son consideradas como la más grande fuente de hidratos de carbono renovable conocido. Esto ha puesto atención en la utilización de los azúcares fermentables a partir de lignocelulosa fuente para la producción de biocombustibles (Jørgensen *et al.*, 2007).

Una tecnología prometedora es la de convertir la biomasa lignocelulósica en etanol a partir de un proceso a base de enzimas (Sánchez y Cardona, 2008; Niño *et al.*, 2013). Una amplia variedad de técnicas de pretratamiento físico (trituration, hidrotermólisis), químicos (ácido, alcalino, solventes, ozono, etc.), fisicoquímicos (vapor, explosión con fibra de amonio) y biológicos han sido desarrollados para mejorar la accesibilidad de las enzimas a las fibras del material lignocelulósico (Mosier *et al.*, 2005; Niño *et al.*, 2013).

De acuerdo con los resúmenes de las últimas revisiones en el pretratamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol, todos han probado que la hemicelulosa y lignina tenían los obstáculos para completar la hidrólisis enzimática (Hendriks y Zeeman, 2009).

El principal reto en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento e hidrólisis de la materia prima. El complejo lignocelulósico está compuesto principalmente de una matriz de carbohidratos compuesta de celulosa y lignina enlazada por cadenas de hemicelulosa (Zumalacárregui-De Cárdenas *et al.*, 2015).

El pretratamiento tiene como objetivo desintegrar esta matriz de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático. Adicionalmente, la mayor parte de la hemicelulosa se hidroliza durante el pretratamiento y la lignina se libera o puede incluso descomponerse. En una etapa posterior, la celulosa liberada es sometida a hidrólisis enzimática con celulasas exógenas, lo cual hace que se obtenga una solución de azúcares fermentables que contiene principalmente glucosa, así como pentosas resultantes de la hidrólisis inicial de la hemicelulosa. Estos azúcares son posteriormente convertidos en etanol (EtOH) mediante microorganismos que pueden utilizar uno o varios de los azúcares presentes en el material lignocelulósico pretratado e hidrolizado. El bagazo seco contiene aproximadamente 50% de celulosa, 30% de hemicelulosa y 20% de lignina (Zumalacárregui-De Cárdenas *et al.*, 2015).

El pretratamiento permite que los rendimientos en la hidrólisis de celulosa aumenten al menos 20% de los rendimientos teóricos a valores mayores al 90% (Lynd, 1996). Para el pretratamiento se han propuesto y desarrollado diferentes métodos (Sun y Cheng, 2002); sin embargo, ninguno de los métodos de pretratamiento propuestos se puede aplicar en forma genérica a las diferentes materias primas. Esto justifica la realización de análisis detallados de estas tecnologías en cada caso en particular. La síntesis de procesos puede aportar las herramientas necesarias para descartar las opciones con menos perspectivas en forma preliminar, teniendo en cuenta nuevos procedimientos, esquemas y alternativas que se planteen en la etapa de diseño (Claassen *et al.*, 1999).

La composición de los materiales lignocelulósicos consta de tres principales tipos de polímeros llamados celulosa, hemicelulosa y lignina, que se asocian entre sí (Fengel y Wegener, 1984). En el Cuadro 1 se muestran los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina en desechos agrícolas (Sun y Cheng, 2002).

Cuadro 1. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas y desechos (Sun y Cheng, 2002; Guerrero, 2009).

Material lignocelulósico	Celulosa [%]	Hemicelulosa [%]	Lignina [%]
Tallos de madera dura	40-55	24-40	18-25
Tallos de madera blanda	45-50	25-35	25-35
Cáscaras de nueces	25-30	25-30	30-40
Mazorcas de maíz	45	35	15
Pastos	25-40	35-50	10-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	20	20
Papel de diario	40-55	25-40	18-30
Papel de desecho de pulpas químicas	60-70	10-20	5-10
Sólidos primarios de aguas de desecho	8-15	N/A	24-29
Desechos de puercos	6	28	N/A
Estiércol sólido de ganado	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7

En la lignocelulosa la mayor parte de la glucosa se encuentra dentro de los polímeros cristalinos de la celulosa. La hemicelulosa también los contiene, pero en forma de copolímeros conformados por glucosa, xilosa y otros. Sin embargo, la lignina que es el tercer componente mayoritario en la lignocelulosa dificulta los procesos de hidrólisis al estar integrado por un polímero aromático complejo (Binder y Raines 2010). Por lo anterior, es necesario incorporar tratamientos de hidrólisis que disminuyan la formación de compuestos inhibitorios que afecten el proceso de fermentación (Jiménez *et al.*, 2011).

3.2.1 Celulosa

Existe celulosa en subunidades de D-glucosa, unidas por β -1,4 enlaces glicosídicos (Fengel y Wegner, 1984). La celulosa en una planta consta de partes con una estructura cristalina organizada, y partes con una estructura amorfa no muy bien organizada. La celulosa se encuentra empaquetada formando fibrillas de celulosa o manojos de celulosa. Estas fibrillas son en su mayoría independientes y débilmente unidas a través de enlaces de hidrógeno (Laureano-Pérez *et al.*, 2005).

3.2.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es una estructura de carbohidrato complejo que se compone de diferentes polímeros como pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (como manosa, glucosa y galactosa), y ácidos de azúcar; el componente dominante de la hemicelulosa de madera y plantas agrícolas, como hierbas y paja es xilano y para la madera blanda es glucomanano (Fenger y Wegener, 1984).

La hemicelulosa tiene un peso molecular inferior a la celulosa y ramas con cadenas laterales cortas que consisten de diferentes azúcares, que son polímeros hidrolizables fáciles (Fengel y Wegener, 1984). La hemicelulosa sirve como una conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y da mayor rigidez a la célula (Laureano-Perez *et al.*, 2005).

La solubilidad de los diferentes compuestos de hemicelulosa es en orden descendente: manosa, xilosa, glucosa, arabinosa y galactosa; aumento de la solubilidad, está relacionada con el aumento a la temperatura (Gray *et al.*, 2003). La solubilidad de los polímeros moleculares superiores no se pueden predecir, debido a puntos de fusión desconocidos. La solubilización de compuestos de hemicelulosa comienza a los 180 °C bajo condiciones neutrales (Bobleter *et al.*, 1994). La solubilización de los componentes de lignocelulosa no sólo depende de la temperatura, sino también en otros aspectos como el contenido de humedad y pH (Fengel y Wegener, 1984). El xilano parece ser la parte que se puede extraer más fácilmente. De la celulosa, hemicelulosa y lignina las hemicelulosas son las más sensibles a tratamiento térmico y químico. Durante el pretratamiento térmico-químico primeramente los grupos laterales de la hemicelulosa reaccionan, seguidos por la columna vertebral de hemicelulosa (Sweet y Winandy, 1999).

3.2.3 Lignina

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-

hidratos de carbono. La composición o distribución de los tres componentes en esas redes varía dependiendo del tipo de planta. En el caso de la composición de la madera, los rangos más comúnmente encontrados son: Celulosa: 38-50%; Hemicelulosa: 23-32% y Lignina: 15-25% (Chávez y Sinfontes, 2013).

Es un heteropolímero amorfo no-soluble en agua y ópticamente inactivo, todo esto hace que la degradación de la lignina sea muy difícil (Fengel y Wegener, 1984). La lignina, al igual que la hemicelulosa, normalmente empieza a disolverse en agua a los 180° bajo condiciones neutrales (Bobleter, 1994). La solubilidad de la lignina en ambientes ácidos, alcalinos o neutrales dependen del precursor (p-cumaril, coniferílico, alcohol sinapílico o combinaciones de ellos) de la lignina (Grabber, 2005).

3.3 Hidrólisis enzimática de la celulosa

Los principales programas de investigación se inclinan por la hidrólisis enzimática, puesto que en esta vía se considera que existen mayores posibilidades de reducción de costos, en detrimento de los procedimientos que utilizan la hidrólisis ácida que se consideran tecnologías más desarrolladas y donde las opciones de mejora son más limitadas. La hidrólisis enzimática presenta, al menos, tres ventajas potenciales frente a los procesos catalizados por ácidos: mayores rendimientos, no existe producción de sustancias tóxicas como consecuencia de la degradación de los azúcares que pudieran comprometer la fermentación posterior (Mesa *et al.*, 2008). La hidrólisis enzimática presenta ventajas frente a la hidrólisis química, entre las cuales

pueden mencionarse que no genera gran corrosión, bajo consumo de enzima y baja toxicidad de los hidrolizados (Taherzadeh y Karimi, 2007).

Los factores que afectan a la susceptibilidad al ataque enzimático incluyen la cristalinidad de la celulosa, la protección que ejercen tanto la hemicelulosa como la lignina y, en menor medida, la superficie accesible de la celulosa y el grado de acetilación de la hemicelulosa (Hsu, 1996).

El objetivo de la hidrólisis enzimática de la celulosa se basa en la capacidad de las enzimas de liberar polisacáridos de glucosa y moléculas de glucosa. La hidrólisis enzimática de residuos celulósicos parece ser uno de los caminos más prometedores. El alto costo de las enzimas celulolíticas es, sin embargo, la principal barrera para hacer competitivo un proceso de obtención de etanol a partir de residuos lignocelulósicos, frente a otros procesos.

La hidrólisis enzimática de la celulosa se lleva a cabo con enzimas celulasas, catalizadores altamente específicos. La hidrólisis se lleva a cabo bajo condiciones suaves (pH 4.5, 50°C, agitación suave) (Taherzadeh y Karimi, 2007) el complejo enzimático se encuentra conformado principalmente por: endoglucanasas (1,4-β-D glucan glucanohidrolasas; EC 3.2.1.4) que actúan hidrolizando uniones internas de la molécula de celulosa, exoglucanasas, (1,4-β-D glucan celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91), que actúan presumiblemente sobre los extremos de la cadena de celulosa, liberando moléculas de celobiosa y D-glucosa y las β-glucosidasas (o celobiasas cuando actúan sobre la celobiosa; EC 3.2.1.21), muestran gran actividad sobre dímeros solubles de bajo peso molecular (Watanabe y Tokuda, 2001, 2010). La

hidrólisis enzimática es claramente preferida a partir de un proceso orientado y desde el punto de vista medio ambiental. Sin embargo, la viabilidad económica requiere el desarrollo de celulasas activas a altas temperaturas, tolerantes a bajos pH, con actividad altamente específica y resistente a la inhibición por glucosa (Mesa *et al.*, 2008).

La fracción mayoritaria de la biomasa es la celulosa, compuesta por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces β (1-4) que, a su vez, se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad. Esta estructura cristalina es la que dificulta la hidrólisis de la celulosa para la obtención de azúcares fermentables. Mientras que las hemicelulosas, componentes minoritarios, presentan una estructura amorfa de fácil acceso (Dagninoa *et al.*, 2010).

La etapa de hidrólisis provoca la ruptura de los polímeros de celulosa y hemicelulosa, obteniéndose los monómeros respectivos; la hidrólisis completa de celulosa da exclusivamente el monómero D-glucosa, mientras que a partir de las hemicelulosas se obtienen un conjunto de pentosas y hexosas, como manosa, glucosa, xilosa, etc. Los azúcares de cinco carbonos son difíciles de fermentar por los microorganismos comunes (Thaerzadeh y Karimi, 2008). La etapa de hidrólisis (Figura 1) puede realizarse mediante catálisis química o enzimática; lo ideal es el pretratamiento enzimático ya que da lugar a productos más puros, aunque existen otros métodos menos utilizados y poco estudiados como la irradiación gamma y la utilización de microondas, entre otros (Dagninoa *et al.*, 2010).

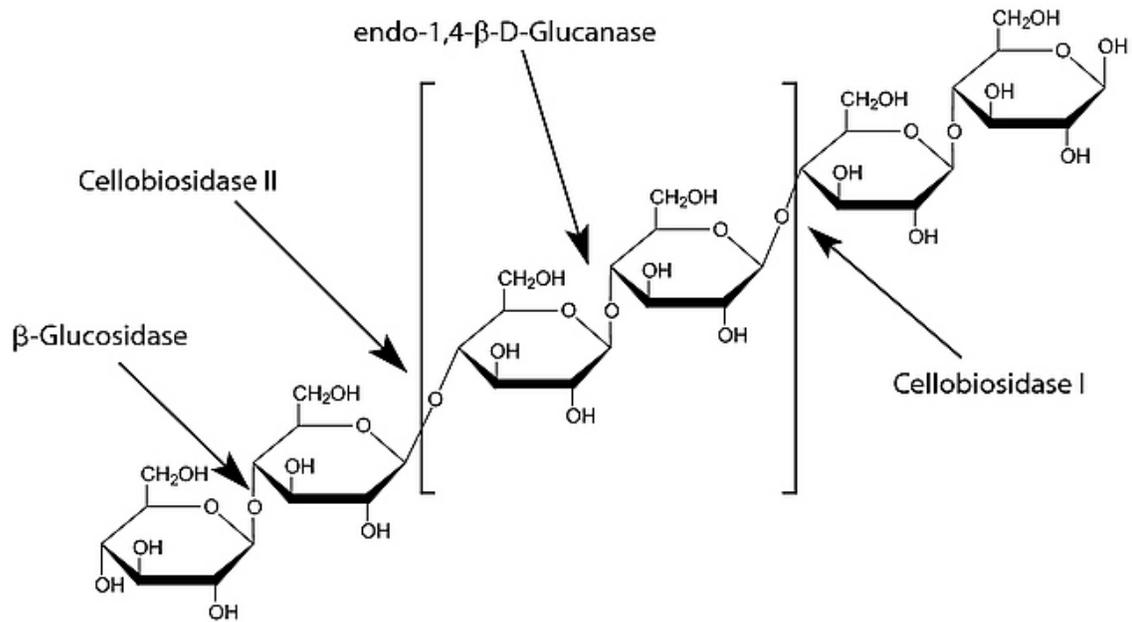


Figura 1. Hidrólisis enzimática de celulosa. Esquema del mecanismo de degradación de celulosa de las celulasas endo- β -1,4-glucanasas, celobiasas y β -glucosidasas (SIGMA-ALDRICH).

3.4 Enzima endo- β -1,4-glucanasa

La enzima endo- β -1,4-glucanasa pertenece a la familia 9 de las enzimas glicosil hidrolasas, también llamadas “endoglucanasas”, son enzimas hidrolíticas que escinden los enlaces β -glucosídicos en los polímeros de glucosa, llamado celulosa. Las endoglucanasas trabajan en conjunto con otras enzimas celulasas para liberar glucosa monomérica a partir de polímeros de celulosa. Las dos enzimas más comunes que trabajan colectivamente con las endoglucanasas son las exoglucanasas y las β -glucosidasas (Watanabe y Tokuda, 2010).

Zhang *et al.*, (2009) demostraron que una endo- β -1,4-gluconasa endógena de *C. Formosanus* expresada en *E. coli*, puede digerir papel filtro compuesto de celulosa y liberar predominantemente celotriosa (polisacárido de tres glucosas) y celobiosa (disacárido de glucosa). Incluso se encontró glucosa como producto cuando aumentaron el tiempo de la reacción.

La función de esta celulasa también implica que la celulosa puede convertirse a glucosa cuando una BG adicional está presente, aún sin la presencia de la enzima 1,4- β -D-gluconocelobiohidrolasa (una exogluconasa), la cual se cree que es necesaria para la hidrólisis efectiva de celulosa a glucosa en sistemas bacterianos y fúngicos (Béguin y Aubert, 1994).

Las celulasas son enzimas extremadamente comunes con actividad importante en la naturaleza como en la degradación de biomasa, como celulosa y hemicelulosa, en la defensa contra las bacterias, en mecanismos de patogénesis y en el normal funcionamiento celular. Junto con las glucotransferasas, las glucosidasas forman la mayor maquinaria catalítica para la síntesis y rotura de enlaces glucosídicos (Jeng *et al.*, 2010).

3.5 Termita *Coptotermes formosanus*

Las termitas juegan un papel clave en la descomposición de material lignocelulósico, ingiriendo una variedad de materiales vegetales en diferentes etapas de humificación, se considera que todos los tipos de alimentación derivan de un hábito primitivo de alimentación de madera (Noirot, 1992; Nakashima y Azuma, 2000).

Inicialmente la digestión de celulosa en termitas se atribuyó a bacterias en su intestino delgado, pero no se encontró evidencia de esto (Schultz y Breznak, 1978; O'Brien y Slaytor, 1982). Se consideró entonces la posibilidad de un sistema endógeno de digestión de celulosa (Potts y Hewitt, 1973; Hogan *et al.*, 1988a; Slaytor, 1992; Breznak y Brune, 1994; Tokuda *et al.*, 1997) y se confirmó que la actividad celulolítica en el intestino medio cumplía los requisitos metabólicos de las termitas (Slaytor *et al.*, 1997) y que la expresión de los ARN mensajeros (ARNm) de la endo- β -1,4-glucanasa endógena se produjeron en el epitelio del intestino medio (Tokuda *et al.*, 1999).

Las termitas *C. formosanus* son insectos naturales que se alimentan de madera. La invasión de esta especie de termita en estructuras de madera y árboles en zonas urbanas han causado daños que requieren costo de reparación de alrededor de un billón de dólares anuales en los Estados Unidos (Lax y Osbrink, 2003). Se han intentado nuevos métodos para controlar la población de esta especie, uno de los esfuerzos es apuntar y entender el mecanismo por el cual las termitas logran metabolizar materiales basados en celulosa (Zhang *et al.*, 2009). El hallazgo de la actividad celulolítica (Watanabe *et al.*, 1997) y un gen de la celulasa (Watanabe *et al.*, 1998) en la glándula salivar e intestino medio de *Reticulitermes speratus* (Kolbe) condujo a la hipótesis de que las termitas inferiores incluyendo *C. formosanus*, puede contener una celulasa endógena, que puede desempeñar un papel específico en el procesamiento de celulosa de madera en el intestino medio antes de la fermentación posterior en el intestino posterior por simbiosis (Zhang *et al.*, 2009).

3.6 *Pichia pastoris* como sistema de expresión

La levadura *Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica (capaz de crecer en metanol como única fuente de carbono), produce niveles de proteínas recombinantes de uno a dos órdenes de magnitud por encima de *Saccharomyces cerevisiae* (Faber *et al.*, 1995), es capaz de secretar proteínas heterólogas al medio de cultivo (donde los niveles de proteínas nativas son muy bajos) y que en contraste con esta última, puede cultivarse a altas densidades celulares de más de 450 g/L en peso húmedo y de 100 g/L de peso seco (Siegel y Brierley, 1989), haciéndola por mucho una de las más productivas, logrando concentraciones hasta de gramos del recombinante por litro de medio de cultivo (Romanos *et al.*, 1991; Clare *et al.*, 1991).

La temperatura y el pH son parámetros importantes de controlar en la producción de proteínas en *P. pastoris*. (Fuentes-Garibay *et al.*, 2015) lograron producir la enzima tanasa recombinante estable mostrando actividades máximas a los 20 °C y un pH de 5.0 en *P. pastoris* y se han documentado numerosos ensayos de producción de proteínas heterólogas biológicamente activas a distintos pH. En general, para la producción de proteínas recombinantes uno de los sistemas más usados es *P. pastoris* debido a sus modificaciones post-traduccionales y su promotor inducible con metanol.

El promotor del gen de la alcohol oxidasa 1 (*aox1*) de *P. pastoris* es uno de los que más se emplean para dirigir la síntesis de proteínas recombinantes. Es tan específica su regulación, que en presencia de otra fuente de carbono que no sea metanol (como glicerol o glucosa), el sistema está apagado completamente (Ascacio-

Martínez, 2004) y basta reemplazar dicha fuente por metanol para encenderlo (Figura 2).



Figura 2. Producción de biomasa por *Pichia pastoris*. Esta levadura alcanza altas densidades celulares en biorreactores. Se muestran dos botellas que contienen medio de cultivo con biomasa a diferente densidad celular. El de la izquierda corresponde a uno crecido en matraz con deflectores con una Densidad Óptica (DO) a 600 nm = 1.0. Mientras que el de la derecha corresponde a uno crecido en un biorreactor y tiene una DO a 600 nm = 500 (Ascacio-Martínez, 2004).

P. pastoris se ha utilizado comúnmente como sistema de expresión de proteínas recombinantes provenientes de distintos organismos como bacterias, levaduras, hongos y de células eucariotas, como proteínas de fusión que actúan como antígenos inmunogénicos eficientes y vacunas (Martínez-Hernández *et al.*, 2017), también se ha utilizado para la producción de una variante recombinante de la hormona de crecimiento humano HGH-V, la cual está involucrada en la coordinación del metabolismo fetal y maternal durante el embarazo (Palma-Nicolás *et al.*, 2005),

así como la producción de la hormonas de crecimiento canino *C. familiaris* (Ascacio-Martínez y Barrera-Saldaña, 2004).

La producción de hormonas de crecimiento recombinantes inicialmente y actualmente se producen en bacterias, principalmente en *E. coli*. Su procesamiento no es simple debido a su desnaturalización y precipitación como cuerpos de inclusión cuando es expresada en el citosol y se obtienen pobres rendimientos cuando se secretan al espacio periplasmático. Estas limitaciones han llevado a los biotecnólogos a buscar nuevos sistemas de producción de proteínas (Ascacio-Martínez y Barrera-Saldaña, 2004).

3.7 Vector de clonación pUC57

El vector de clonación pUC57 (Figura 3) es utilizado para multiplicar los genes de interés en bacterias con el fin de obtener numerosas copias. El vector se obtuvo en la compañía Genscript.

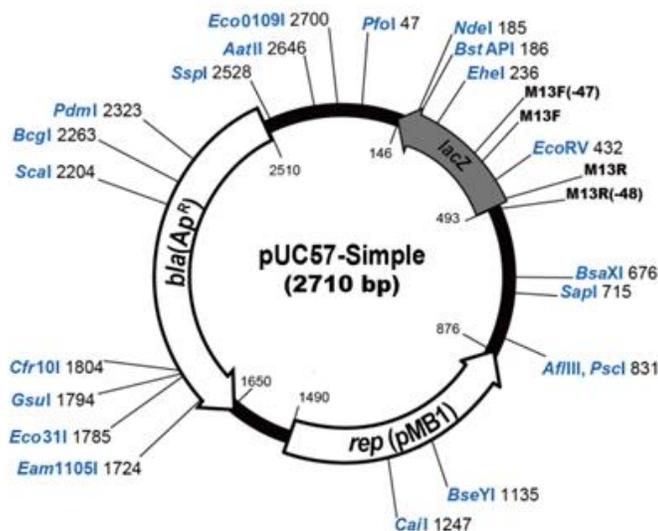


Figura 3. Vector de clonación pUC57. Se muestra el mapa de 2710 pb, el sitio múltiple de clonación y el gen de resistencia a ampicilina de la Compañía Genscript.

3.8 Vector de expresión pPIC9

El vector de expresión pPIC9 es un vector el cual se integra al genoma de la levadura *P. pastoris*, consta de 8,023 pb (Figura 4). Las cepas de *P. pastoris* utilizadas comúnmente para expresar este tipo de vectores son la GS115 y KM71. El vector pPIC9 permite la expresión de las proteínas clonadas y su secreción, debido a que la secuencia codificante se fusiona a la señal de secreción obtenida de *Saccharomyces cerevisiae*. La producción de proteínas en el vector es inducida mediante el promotor AOX1 el cual se activa en presencia de metanol. La selección de transformantes se realiza mediante el marcador de selección de HIS4 (Ascacio-Martínez, 2004).

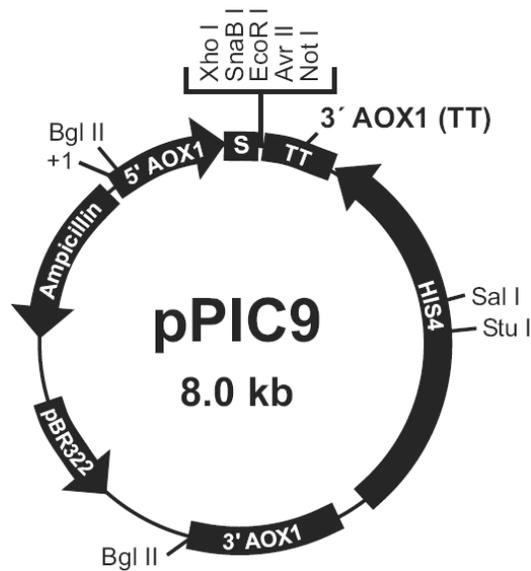


Figura 4. Vector de expresión pPIC9. Mapa del vector de expresión pPIC9 donde se muestran elementos genéticos como el promotor 5' AOX1, secuencia señal de *S. cerevisiae*, sitio múltiple de clonación y resistencia a ampicilina (Invitrogen, 2014).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia general

El presente trabajo se desarrolló en base a las siguientes etapas (Figura 5):

1. Diseño, optimización y síntesis de secuencia codificante para la enzima endo- β -1,4-glucanasa de la termita *C. formosanus*.
2. Transformación de *E. coli* con la construcción pUC57-EG
3. Construcción del vector pPIC9-EG y propagación en *E. coli*
4. Transformación de *P. pastoris* GS115 con el vector de expresión pPIC9-EG.
5. Evaluación de la expresión de la EG a pequeña escala de *P. pastoris* cepa GS115.
6. Análisis enzimático.

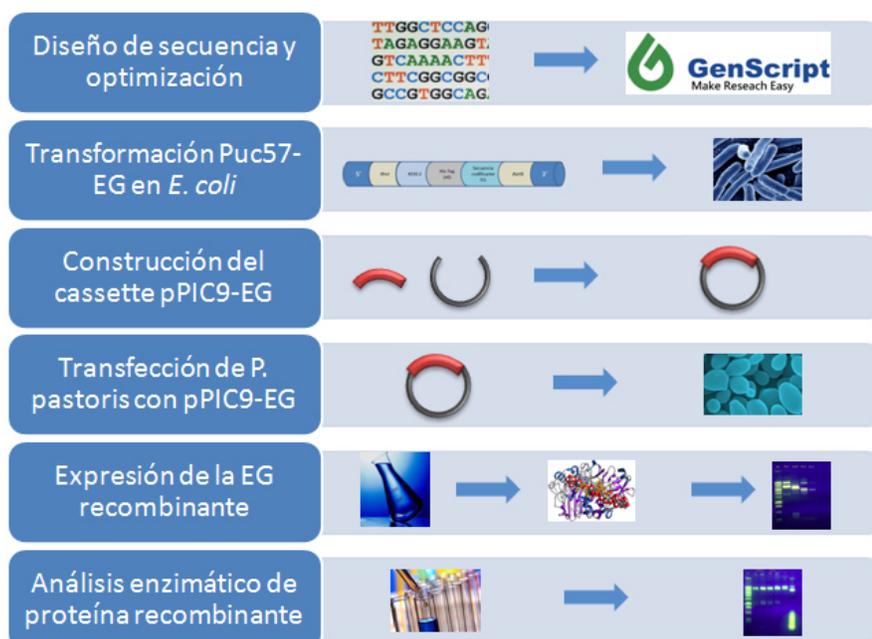


Figura 5. Esquema de la estrategia general. La estrategia general abarca desde el diseño y síntesis del gen, hasta análisis enzimáticos de la EG.

4.2 Material Biológico

4.2.1 Cepas de *Escherichia coli*

Se utilizaron dos cepas de *E. coli*: DH5 α donde se clonó el plásmido pPUC57 conteniendo la secuencia del gen de la EG (pUC57-EG) para su propagación natural, y la cepa Top10 con el plásmido pPIC9.

4.2.2 Cepas de *Pichia pastoris*

Se utilizaron dos cepas de levadura *P. pastoris*, la cepa *Pichia* GS115, como control negativo con EG. La cepa *P. pastoris* 22K con el casete del gen de la Prolactina Humana como el control positivo.

4.3 Construcción del gen optimizado de EG

La construcción del gen se llevó a cabo en base a la secuencia que codifica para la EG de la termita *C. formosanus* obtenida del GeneBank del NCBI (EU853671.1). La secuencia codificante para la proteína madura, abarca del nucleótido 48 al 1321 (1273 nucleótidos) además del codón de terminación TAA.

A la secuencia se le añadieron sitios de reconocimiento para las enzimas *XhoI* en el extremo 5' y *AvrII* en el extremo 3' para facilitar su manipulación y aislamiento. En seguida del sitio de reconocimiento para *XhoI* se incluyó la secuencia de KEX2 para remover el factor de secreción alfa, en seguida se incluyó una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal de la proteína codificada.

La síntesis de la secuencia optimizada se llevó a cabo por la compañía GeneScript Inc., la secuencia fue sintetizada y clonada en el vector de clonación pUC57 (pUC57-EG).

4.4 Preparación de células calcio-competentes DH5 α

Se utilizaron células DH5 α para la transformación. Se inocularon en medio Luria Bertani (LB) sólido, después se dejaron crecer 24 hr a 37°C, posteriormente se tomó una asada para inocular 1ml de medio LB líquido, después se tomó 1 ml para inocular un matraz de 90 ml de medio LB líquido por 3 hr a 37°C y se observó la densidad óptica, después se distribuyeron en dos tubos de 45 ml y se centrifugaron a 3,500 *g* durante 8 min, tras la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se añadieron 5 ml de MgCl₂ a ambos tubos y se mezclaron por inmersión, posteriormente las células se centrifugaron a 3,500 rpm, se decantaron y se resuspendieron con 5 ml de CaCl₂ 85 mM, 15% glicerol. Se centrifugaron nuevamente a 3,500 rpm durante 5 min, se decantaron y se resuspendieron nuevamente en 500 μ l de CaCl₂ 85 mM, 15% glicerol, después se alicuotaron 10 tubos de 1.5 ml estériles con 50 μ l cada uno y se almacenaron a -80°C en el ultracongelador.

4.5 Transformación de plásmido pUC57-EG en *E. coli*

Para la transformación de la bacteria *E. coli* se utilizó la cepa DH5 α calcio competentes preparadas anteriormente. Se utilizó el plásmido pUC57 con el gen de la EG sintetizado por la compañía GeneScript. El vector se disolvió en 10 μ l de agua estéril. Se transfirieron 50 μ l de la cepa DH5 α calcio competentes a dos tubos de 1.5

ml previamente enfriados y se añadió 1 µl del plásmido en el tubo 1 y 3 µl en el tubo 2, se dejó en hielo durante 20 min. Transcurrido el tiempo, las células se sometieron a un choque térmico de 45 segundos a 42°C en baño maría, posteriormente se colocaron en hielo durante 5 min. Después, en campana de flujo laminar, se añadieron 500 µl de medio de cultivo LB líquido, se incubaron 1 hr a 37°C en agitación. Posteriormente se centrifugaron por 1 min a 13,000 rpm, en campana de flujo se desecharon 250 µl de medio. Se colocaron las células transformadas sobre dos placas de ampicilina a una concentración de 100mg/l y se dispersaron con ayuda de una varilla de vidrio. Se añadieron 20 µl de células transformadas en una placa y en otra 200 µl. Se incubaron toda la noche a 37°C.

4.6 Extracción de ADN plasmídico mediante la técnica TENS

Para la obtención de ADN plasmídico se realizó un miniprep con células DH5α crecidas en cajas Petri con medio LB. Primeramente se recolectaron todas las células presentes en la placa y se resuspendieron en un tubo de 1.5 ml con 70 µl de agua estéril. Se agregaron 300 µl de TENS y se invirtió ocho veces para mezclar. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 3 min. Se agregaron 150 µl de NaOAc 3M pH 5.2. Se agitó para mezclar y se centrifugó a 13,200 rpm por 5 min. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml y se añadieron 700 µl de EtOH absoluto. Se colocaron en vortex para mezclar y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13,200 rpm durante 11 minutos para precipitar el ADN. Se retiró el sobrenadante. Se lavó con 500 µl de EtOH 70% y se dejó reposar 5 min para posteriormente remover el sobrenadante. Se dejó secar al aire por 10 min a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió en 20 µl de agua

estéril. La cuantificación del ADN plasmídico (ADNp) se realizó a una absorbancia de 260 nm en el equipo Nanodrop.

4.7 Caracterización del plásmido pUC57-EG mediante análisis de restricción

Para la digestión del vector pUC57-EG se realizó un análisis de restricción por medio de NEB cutter para descartar corte de las enzimas en la secuencia de la EG.

Se realizaron reacciones de digestión distintas, la primera se realizó con la enzima de restricción *HindIII*, ajustándose los siguientes parámetros a 20 μ l: 16 μ l H₂O, buffer *HindIII* 2 μ l, enzima *HindIII* 1 μ l, ADNp 1 μ l. La segunda digestión se realizó con *EcoRI* exactamente igual que la anterior. La tercera digestión se realizó con *XhoI* y *EcoRI*; se colocó 1 μ l de ADNp pUC57-EG, 2 μ l de buffer para *XhoI*, 1 μ l de enzima *XhoI*, 16 μ l de agua Milli-Q para un volumen total de 20 μ l; para la digestión con *EcoRI*, se colocó 1 μ l de ADNp pUC57-EG, 2 μ l de buffer para *EcoRI*, 1 μ l de enzima *EcoRI*, 16 μ l de agua Milli-Q, para un total de 20 μ l. Todos los mix de reacciones enzimáticas en este trabajo se ajustaron a las concentraciones recomendadas por el fabricante.

4.8 Extracción de ADN plasmídico con kit comercial QIAGEN

Se procedió a hacer crecer *E. coli* cepa DH5 α transformada con el vector pUC57 conteniendo el gen de la EG, a partir de colonias aisladas crecidas en medio con ampicilina (1mg/ml). Se dejó incubando a 37° durante 20 hr. Se realizó un Miniprep con el kit comercial de la compañía QIAGEN por su alta pureza.

Se inoculó una nueva placa con medio LB con ampicilina (1mg/l) y se dejó incubando a 37 °C. Se tomó el total de la bacteria resembrada y se resuspendió en 70 µl de agua estéril, se transfirió a un tubo de 1.5 ml, agregándole 70 µl de agua estéril. Posteriormente, se resuspendió en buffer P1 (buffer de resuspensión al momento de purificar ADN, de la compañía de QIAGEN ®) con 250 µl. Se agregaron 250 µl de buffer P2 y se mezcló por inversión siete veces mientras la solución se volvía transparente.

Se añadieron 350 µl de Buffer N3 (Buffer de neutralización basado en intercambio aniónico, QIAGEN ®) y se mezcló inmediatamente invirtiéndolo seis veces. Se centrifugó 10 min a 13,000 rpm. Se aplicó el sobrenadante resultante decantando o con pipeta. Se lavó la columna agregando 700 µl de buffer PE. Se centrifugó por 1 min y se procedió a remover los residuos, posteriormente se centrifugó por 1 min. Se dejó eluir el ADN y se agregaron 30 µl con agua y se analizó en Nanodrop.

4.9 Caracterización de pUC57-EG

Para la digestión de pUC57 se utilizaron las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Para ambas se utilizaron 13 µl de H₂O, Buffer CutSmart 2 µl, enzima *EcoRI* 1 µl, enzima *XhoI* y del plásmido 4 µl, dando un volumen final de la reacción de 20 µl. Las concentraciones de cada reactivo del mix de reacción se ajustaron a las concentraciones recomendadas por el fabricante de las enzimas.

4.10 Resiembra de colonias transformadas con el vector pUC57-EG

Se resembró la placa utilizada para extracción de ADN plasmídico mediante Miniprep con el kit de QIAGEN®. (Se crecieron nuevamente en medio LB sólido y líquido para tener un stock de estos plásmidos pUC57 en la cepa DH5α). Después de haber comprobado que el inserto se hizo exitosamente, a partir de las cepas DH5α resultantes de la transformación con el plásmido pUC57, se seleccionó una colonia aislada y se resembró en medio sólido en placa con 300 µl de ampicilina (1mg/ml) en 500 ml de medio LB y se dejó crecer por 24 hr a 37°C y se resembró en tres placas de Petri que se dejaron crecer 18 hr a 37° C.

4.11 Preparación del vector de expresión pPIC9

En base a Minipreps anteriores a *E. coli* Top10 se caracterizaron los plásmidos pPIC9 purificados en un gel de agarosa al 1% y se realizó una selección de los plásmidos con los cuáles se prosiguió a trabajar.

4.12 Purificación del gen de la EG y pPIC9 lineal a partir del gel de electroforesis

La purificación del gen de la EG se realizó mediante una digestión del plásmido pUC57 con el gen. Se aisló a partir de la electroforesis en gel de agarosa al 1%. El vector pUC57 se digirió con las enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII*. La reacción se ajustó a un volumen total de 20 µl, donde se colocaron 2 µl de ADNp pUC57-EG, 2 µl de buffer CutSmart, 1 µl de enzima *XhoI*, 1 µl de enzima *AvrII* y 14 µl de agua estéril.

Al mismo tiempo el vector pPIC9 se linearizó con la enzima de restricción *XhoI* con el fin de tener sitios de reconocimiento disponible para su posterior ligación con el gen

de la EG. La reacción de digestión se llevó a cabo de la siguiente manera: 1 µl de ADNp pUC57-EG, 2 µl de buffer para enzima *XhoI*, 1 µl de enzima *XhoI*, 16 µl de agua estéril Mili-Q, para dar un volumen total de reacción de 20 µl.

Posteriormente, para la purificación de la EG y pPIC9 a partir del gel primeramente se cortó la banda de ADN del gel de agarosa con un bisturí. Después, se pesó el fragmento cortado (164 g gen EG y pPIC9 linearizado: 170 g) y se puso en un tubo de 1.5 ml. Se le añadieron 100 µl de Buffer QG (QIAquick® Gel Extraction Kit). Se incubó a 50°C durante 10 min, se llevó al vortex cada 2 min para ayudar a disolver el gel; una vez que la porción de gel se disolvió completamente, se comprobó que el color de la solución fuera amarillo. Se agregaron 100 µl de isopropanol a la muestra y se mezcló. Se transfirió a una columna y se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm. Para lavar se agregaron 750 µl de Buffer PE y se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm. Se transfirió la columna a un tubo de 1.5 ml. Para eluir el ADN, se agregaron 30 µl de agua en el centro de la columna y se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm.

4.13 Ligación pPIC9-EG

La ligación del gen de la EG y el plásmido pPIC9 (pPIC9-EG), se llevó a cabo con el kit comercial Anza™ T4 ADN Ligase Master Mix de la compañía ThermoFisher Scientific. La reacción de ligación se realizó a temperatura ambiente por 20 min. La proporción del vector:inserto fue de 1:3 (Cuadro 2). Se utilizaron 5 µl de reacción de ligación resultante para transformar células calcio competentes de *E. coli* DH5α. En la reacción se incluyó un control negativo (agua) y un control positivo (vector pPIC9 sin inserto).

Cuadro 2. Reacción de ligación entre vector pPIC9 y el gen de la EG. La reacción se ajustó a un volumen total de 20 µl como indica el kit comercial y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min.

Reactivo	Concentración
Agua libre de nucleasas	-
Gen aislado EG	90 ng
Vector pPIC9 linearizado	30 ng
Anza™ T4 DNA Ligase Mix	1000 u/µl

4.14 Transformación de *E. coli* DH5α pPIC9-EG

Se utilizaron las células almacenadas de *E. coli* DH5α calcio competentes utilizadas previamente para la transformación de la construcción pUC57-EG y se utilizó el mismo protocolo que se aplicó para la transformación de *E. coli* DH5α con el casete pUC57-EG.

4.15 Miniprep *E. coli* DH5a pPIC9-EG

La extracción de ADN plasmídico se realizó con el kit comercial de la compañía QIAGEN, de la misma manera que el Miniprep utilizado con las transformantes *E. coli* DH5α pUC57-EG.

4.16 Caracterización *E. coli* DH5α pPIC9-EG

Para la caracterización pPIC9-EG se utilizaron las enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII* para generar extremos cohesivos. La reacción se ajustó a un volumen total de 20 µl, colocando 4 µl de ADNp pPIC9-EG, 2 µl de buffer CutSmart, 1 µl de enzima *XhoI*, 1 µl de enzima *AvrII* y 12 µl de agua Mili-Q.

4.17 Resiembra y almacenamiento de *E. coli* DH5 α pPIC9-EG

Después de haber comprobado la construcción pPIC9-EG, se seleccionó una colonia aislada y se resembró en medio sólido en placa con 300 μ l de ampicilina (1mg/ml) en 500 ml de medio LB y se dejó crecer por 24 h a 37 °C y se resembró en placas petri que se dejaron crecer 18 h a 37° C. Posteriormente se sembraron en medio LB-glicerina al 15% durante 12 h y se almacenaron a -80 °C en el ultracongelador.

4.18 Linearizado del vector de expresión pPIC9

El vector pPIC9 sin casete de expresión integrado, se obtuvo de un Miniprep realizado previamente a colonias de *E. coli* Top 10 transformadas con el vector de expresión pPIC9. Se caracterizó y linearizó el vector con la enzima de restricción *Xho*I, se ajustó la reacción a un volumen de 20 μ l, colocando 4 μ l de ADNp pPIC9, 2 μ l de buffer CutSmart, 1 μ l de enzima *Xho*I y 12 μ l de agua Mili-Q.

4.19 Preparación de células electrocompetentes cepa GS115

Para la preparación de células electrocompetentes de *P. pastoris* GS115 primeramente se incubó 5 ml de la cepa GS115 en dos tubos de 50 ml en medio YPD (Yeast extract Dextrose Peptone) estéril en agitación durante 20 h. Transcurrido el tiempo se tomaron 200 μ l de cultivo y se inocularon 200 ml de medio fresco YPD y se dejó en agitación hasta que alcanzó una D.O. 600= 0.8. Cuando la O.D. llegó a 0.8 el medio se dividió en cuatro tubos de 50 ml, y estos se centrifugaron durante 10 min a 3,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente cada tubo con 20 ml de agua destilada. Posteriormente se transfirieron a dos tubos

de 40 ml cada uno, se centrifugó de nuevo a 3,000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 10 ml sorbitol 1 M cada tubo y se juntó en un solo tubo. Se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min, se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml 1 M de sorbitol frío. Se utilizaron 60 μ l de células electrocompetentes para la transformación.

4.20. Transfección *P. pastoris* con casete de expresión pPIC9-EG

4.20.1. Linearización del vector pPIC9-EG

Para la recombinación homóloga del gen de la EG en el genoma de la levadura fue necesaria la digestión con la enzima *SacI*, debido a que estos sitios son los que están involucrados en la recombinación. Se procedió a linearizarlo mediante una digestión por 8 h, al finalizar el tiempo de digestión se tomaron 2 μ l y se analizaron en geles de agarosa al 1%. La reacción se ajustó a un volumen total de 20 μ l, a la cual se le colocó 4 μ l de ADNp pPIC9-EG, 2 μ l de buffer CutSmart, 1 μ l de enzima *SacI* y 12 μ l de agua Mili-Q.

4.20.2. Transformación de la cepa GS115

Para la transformación de *P. pastoris* GS115-pPIC9-EG, se añadieron 5 μ l de plásmido linearizado a alícuotas de 80 μ l de levaduras electrocompetentes de la levadura. En la reacción se incluyó un control positivo (pPIC9 vacío) y un control negativo (transformación con agua). Los parámetros de electroporación se ajustaron a 400 Ω , 25 μ F y 1.5k V en un equipo de electroporación BIO-RAD Micropulser Electroporation System TM ®. Primeramente se tomaron 60 μ l de células

electrocompetentes y se mezclaron con 5 µl de plásmido linearizado y se transfirieron a una celda de electroporación de 0.2 cm previamente enfriada en hielo. Se incubó la celda con las células por 5 min en hielo. Tras el pulso con los parámetros especificados inmediatamente se agregó 1 ml de sorbitol 1 M a la celda, posteriormente el contenido de las celdas se transfirió a tubos Eppendorf ® de 1.5 ml, después se dispersaron 300 µl de contenido en placas con medio selectivo mínimo con dextrosa (MD). Por último se incubaron las placas a 30 °C hasta que las colonias aparecieron.

4.21 Caracterización de levaduras transformadas GS115-pPIC9-EG

Las colonias crecidas en el medio de selección MD, se inocularon en medio YPD líquido (5 ml), durante 24 h a 30 °C con una agitación de 150 rpm.

4.22 Ensayos de expresión a nivel tubo de ensayo de 10 ml

Se llevaron a cabo ensayos de expresión de la proteína EG con controles positivos de cepas transformadas previamente con el gen de la prolactina 23 humana y control negativo el plásmido pPIC9 vacío.

4.22.1 Inducción de la producción de la EG en *P. pastoris* cepa GS115

Para la inducción de la proteína EG y producción de biomasa se prepararon tubos de ensayo de 50 ml con 10 ml de medio YPD. Los tubos inoculados con las cepas productoras se incubaron por 24 h a 30 °C con una agitación de 150 rpm. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. Se decantó el medio y se lavó la pastilla con 10 ml de agua destilada fría. Se repitió el proceso y la pastilla

resultante se resuspendió en 10 ml de medio BMMY (1% extracto de levadura, 2% peptona, 100 mM de buffer de fosfatos y potasio, 1.34 % YNB, 200 µl biotina) con 0.5 ml de metanol, el cual se añadió cada 24 hr y se dejó incubando por 72 h a 30 °C con una agitación de 200 rpm.

4.22.2 Diálisis del medio de inducción

Una vez finalizado el periodo de producción de biomasa de la cepa GS115-pPIC9-EG, se recuperó el medio de cultivo por centrifugación durante 5 min a 12,000 rpm, y se desechó la pastilla celular. El medio se dializó en membranas marca Spectra/Por® Membrane Dialysis de un tamaño de 14 kDa. El proceso de diálisis se realizó con agua destilada fría y agitación cada 24 h en el cuarto frío (4 °C). El agua se cambió cada 8 h. Al terminar el proceso de dializado se almacenó a -20 °C para análisis posteriores.

4.22.3 Precipitación de proteínas con el método metanol-cloroformo

Para la precipitación de las proteínas obtenidas en el proceso de diálisis, se mezclaron en un tubo de 2 ml: 500 µl de medio dializado, 600 µl de metanol y 450 µl de cloroformo y se mezcló suavemente por inversión durante 1 min; posteriormente se centrifugó 2 min a 12,000 rpm, se decantó la fase superior (cloroformo) con cuidado debido a que en la interfase se encontraban las proteínas, después se agregaron 450 µl de metanol y se mezcló nuevamente por inversión durante 1 min, se centrifugó 5 min a 12,000 rpm. Transcurrido el tiempo se descartó el sobrenadante con una pipeta sin tirar la pastilla y se dejó secando en el equipo

Savant ® durante 10 min. La pastilla resultante se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

4.23 Análisis de las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en 50 µl de agua y desnaturalizadas durante 10 min a 95 °C. Posteriormente, las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida (13 µl por muestra resuspendida con 5 µl de buffer de carga de proteínas), en una cámara de electroforesis a 100v durante 2 h (Compañía BIORAD). El gel se tiñó durante 24 h con azul de Coomassie y se destiñó con solución de metanol (50%) y ácido acético (20%).

4.24 Cuantificación de proteínas

El ensayo de cuantificación de proteínas se llevó a cabo con la técnica de Lowry con un reactivo de Lowry comercial de la empresa Sigma-Aldrich y los estándares de albúmina sérica bovina (BSA). Las lecturas en el espectrómetro de masas se realizaron a 595 nm con 750 µl de reactivo de Lowry 25 µl de muestra y se calculó la concentración de proteína en base a la absorbancia registrada.

4.25 Ensayos enzimáticos de la proteína recombinante

La actividad de celulasa total se estimó mediante el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), utilizado para la cuantificación de azúcares reductores liberados a partir de la hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC), expresados como unidades de glucosa. La mezcla de reacción se preparó con 100 µl

de carboximetilcelulosa (Sigma Chemical Co. Type P7276) al 1% en buffer de citratos 100 mM y 100 µl de extracto de proteína precipitada previamente con el método de metanol-cloroformo. La mezcla de reacción se incubó durante 1 h. Posteriormente, se añadió 100 µl del reactivo DNS y se colocó por 5 min a 90° C seguido de 5 min en hielo. Finalmente, se adicionó 900 µl de agua y se leyó a 540 nm con un espectrofotómetro (Bio-Rad), utilizando como blanco la mezcla de reacción sin enzima.

El ensayo se realizó a diferentes temperaturas (40, 65 y 100 °C) y distintos valores de pH (4, 5 y 7) con el objetivo de analizar la estabilidad de la celulasa frente a estos factores.

La concentración de azúcares reducidos presentes en la reacción se comparó con una curva de concentración medida a 540 nm. Un control positivo de celulasa de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich) se utilizó bajo las mismas condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresó como unidades por mg de TSP (U/mg), donde la unidad (U) de celulasa se definió como la cantidad de enzima que libera un µmol de glucosa por minuto bajo las condiciones del ensayo.

La actividad enzimática se obtuvo con la siguiente relación:

$$U/ml = \frac{Conc * FD}{t}$$

Donde Conc corresponde a la concentración de glucosa producida (expresada en µmol/ml), FD al factor de dilución y t al tiempo de incubación en min.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Construcción del gen optimizado para EG

El diseño del gen optimizado de la EG se llevó a cabo *in silico* mediante programas y bases de datos como BRENDA, NEBcutter y NCBI. La secuencia que codifica para la enzima EG de la termita *C. formosanus* se obtuvo de la base de datos *NCBI* del número de acceso EU853671.1 La secuencia reportada consta de 1,514 pb y un total de 448 aminoácidos (ACI45756.1). Se utilizó esta secuencia de base y se diseñó *in silico* para su síntesis en el vector pUC57 (Figura 6).

```
CACTTCTCAGTGAGCAACCACTACCCGGCCACCATGAGGGTCTTCGTTTGCCTTCTCTCTGCGCTCGCGC
TTTGCCAAGCTGCTTACGACTACAAGACAGTACTGAAGAATTGCTGCTTTTCTACGAGGCTCAGCGATC
GGGAAAATTGCCCGCTGATCAGAAGGTCACGTGGAGGAAGGATTCGCCCTTAACGACAAGGGCCAGAAG
GGCGAGGACCTGACAGGGGGATACTATGACGCTGGTGAATTTGTGAAGTTTCGGCTTCCCTATGGCGTACA
CCGTCACCGTCTTGGCTTGGGGCCTTGTAGACTACGAATCGGGCGTATTCTACAGCAGGCGCTCTGGATGA
TGGTCGCAAGGCTCTTAAATGGGGCACGGACTACTTCTCAAGGCCACACGGCCGCAATGAATTCTAC
GGACAAGTGGGTGAGGAGATGTGGACCACGCCTACTGGGGACGTCCAGAAGACATGACGATGTCCAGAC
CTGCCTACAAGATCGACACGTCCAAACCAGGGTCGGACCTTGCCGCGAGACAGCCGCCCTCGCTGC
AACTGCCATCGCCTACAAGAGTGTGACTCCACTTATTCCAACAACCTTGATCACCCACGCCAAGCAGCTT
TTCGACTTCGCCAACAATTATCGCGGCAAATACAGTGATTCCATCACTGACGCGAAGAATTTCTATGCGT
CTGGAGACTACAAGGATGAGTTAGTATGGGCAGCCGCATGGCTCTACAGGGCGACCAACGACAACACCTA
TCTGACTAAAGCTGAGTCGCTCTACAACGAATTCGGCCTTGGAAGCTGGAATGGTGCCTTCAACTGGGAT
AACAAGATCTCCGGTGTACAGGTTCTACTGGCCAAGCTCACAAGCAAGCAGGCATACAAGGACAAGGTAC
AAGGCTACGTCGATTACTTGGTTTTCGTCTCAGAAGAAGACACCCAAGGGTCTCGTATACATCGACCAGTG
GGGCACCTTGCAGCATGCTGCTAATAGTGCTCTCATCGCTCTGCAGGCAGCCGACCTGGGTATCAATGCT
GCTAGTTATCGCCAGTATGCCAAGAAGCAGATCGATTACGCATTGGGTGACGGTGGTTCGACGCTACGTCG
TAGGGTTTTGGTACTAACCCACCTGTACGCCCTCACCCACAGATCCAGCTCCTGCCCTGATGCACCAGCAGC
ATGTGACTGGAACACGTACAACAGTGCCGGCCCCAATGCCACGTACTCACCGGTGCCTTGGTGGGTGGT
CCAGATAGCAATGATAGCTACACGGACTCTCGCAGCGATTACATCTCCAACGAAGTGGCCACAGATTACA
ACGCAGGCTTCCAATCAGCTGTCCCGGTCTCCTCAAGGCAGGCGTGTAACCTCACACAGCACTCACTTT
CTACCTATCACTGCGCGTGTGTACAATTTGACAACAAAGATGTAATATTCTTCAGAAAAGTGAATAAAA
GTTTACACTTCAACACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Figura 6. Secuencia nucleotídica de la enzima EG. Se muestra la secuencia del ADNc (Zhang *et al.*, 2009) donde se muestra en color verde el codón de inicio de la transcripción ATG ubicado en la posición 34. La secuencia codificante del ADNc de la EG en celeste. En rojo se ubica el codón de paro de transcripción TAA y la cola de poliadenilación en amarillo. El péptido señal de la termita se muestra subrayado.

A esta secuencia se le añadieron elementos génicos con el fin de facilitar su manipulación y purificación posterior. Se le añadieron sitios de restricción *XhoI* (5') y *AvrII* (3'), además de secuencia regenerada para KEX2 que es la secuencia donde ocurre la ruptura de la secuencia señal, etiquetas de histidinas (6 His-Tag) y se le removieron fragmentos como el péptido señal de propio del gen y la cola de poly A, además se comprobó el marco de lectura en base al marco de lectura del plásmido pPIC9 como establece la compañía Invitrogen (Figura 7).



Figura 7. Secuencia nucleotídica final optimizada. Se añadieron elementos génicos agregados a la secuencia de la EG. La región 5' y 3' se muestran en azul, el sitio de reconocimiento de la enzima *XhoI* se muestra en morado, la secuencia regenerada para KEX2 se muestra en negro con rojo, las etiquetas de histidina intercaladas (CAU y CAT) se muestran en tonalidades de gris, la secuencia del gen está en celeste, el codón de paro TAA se muestra en rojo, el sitio de corte para *AvrII* se muestra en morado.

Se decidió que la adición de las etiquetas de histidina se realizara en el extremo amino terminal (N-terminal) como mencionan estudios reportados anteriormente (Woestenenk *et al.*, 2004) para evitar afectar la solubilidad de la proteína. La secuencia que pertenece a la secuencia señal nativa de la termita (NCBI: AB058670): atgagggctct tcttttgct tctctctgcg ctcgcgcttt gccaaagct fue suprimida ya que el vector de expresión pPIC9 ya cuenta con secuencia señal para *P. pastoris*. La secuencia regenerada, consta de 1,347 pb y 449 aminoácidos y fue sintetizada en el vector pUC57 por la compañía GeneScript (Figura 8).



Figura 8. Secuencia optimizada. Representación lineal de los elementos génicos añadidos a la secuencia original de la EG.

Las etiquetas de histidina agregadas facilitarán la purificación de la proteína para posteriores análisis enzimáticos (Woestenenk *et al.*, 2004), incluso la adición del sitio de corte de la secuencia señal (KEX2) podría aumentar la estabilidad de la proteína cuando esta fuera escindida. De esta manera la enzima puede ser sobre expresada, purificada y posteriormente realizar análisis y eliminar la etiqueta de histidina y volver a su forma nativa, que teóricamente tendría actividad similar (Muza, 2014).

5.3 Secuencia del sitio múltiple de clonación del vector pPIC9

Con el fin de una óptima clonación en el vector pPIC9 se debe localizar el sitio donde se integrará el gen de la EG (Invitrogen, 2014). A continuación la Figura 10 muestra los sitios del polylinker de pPIC9 donde se insertará el gen:

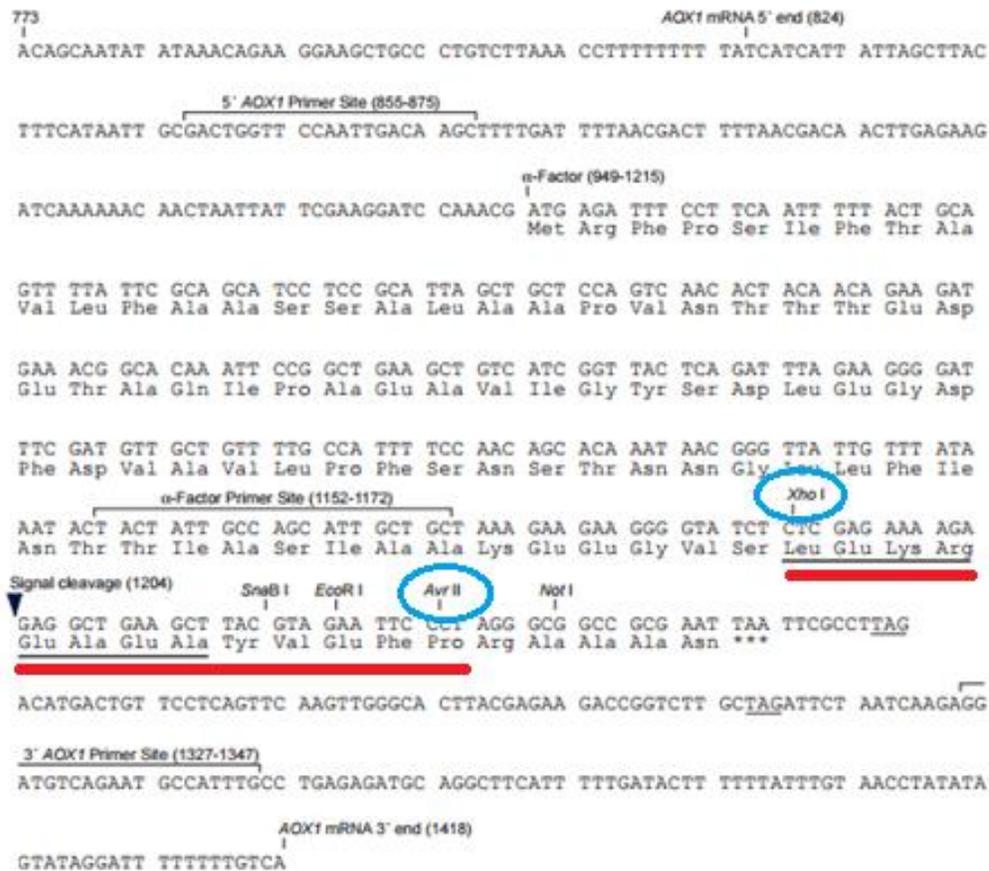


Figura 10. Región de pPIC9 donde se insertó el gen de EG. Encerradas en azul se muestran las enzimas de restricción elegidas *XhoI* y *AvrII* para clonar el gen en pPIC9.

5.4 Caracterización del plásmido pUC57-EG en *E. coli*

Para la selección de bacterias calcio competentes, se añadieron controles negativos y positivos a la transformación. Las colonias transformadas fueron sembradas en medio LB-Ampicilina (1mg/ml) para la selección de transformantes (Figura 11).

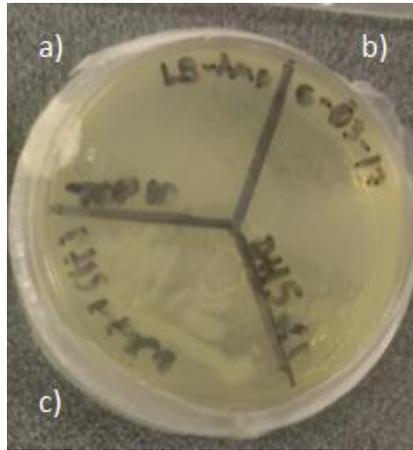


Figura 11. Colonias transformadas DH5 α -pUC57-EG. En la placa se muestra a) y b) el control negativo (-) donde no crecen colonias debido a que no poseen resistencia a ampicilina conferida por el vector PpUC57, c) Colonias que contienen el vector pUC57-EG.

Se procedió a resembrar ocho colonias transformadas con el vector pUC57-EG en ocho cajas petri individuales en medio LB-Ampicilina (1mg/ml). La cepa DH5a fue transformada con el gen de la EG mediante el método de calcio competencia, que es un método relativamente sencillo y económico (Sambrook, 1989).

5.5 Extracción de ADN plasmídico

Se procedió a extraer ADN plasmídico de las ocho colonias transformadas, con la técnica TENS y con el kit comercial de la empresa QIAGEN con el fin de observar la

mejor calidad y menor contaminación en el ADN plasmídico para su posterior transformación, además de tener en stock.

5.5.1 Método TENS

Se realizó un miniprep a ocho colonias resembradas de las colonias transformadas DH5 α con el vector pUC57-EG. Los resultados de las lecturas del equipo Nanodrop se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Concentración de ADN plasmídico pUC57-EG en células de *E. coli* DH5 α obtenido por el método TENS

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type
1	Muestra 1	Nanodrop	27/10/2016 01:32 p.m.	1000.3	ng/ μ l	20.005	10.312	1.94	1.49	DNA
2	Muestra 2	Nanodrop	27/10/2016 01:34 p.m.	47.1	ng/ μ l	0.941	0.431	2.18	1.65	DNA
3	Muestra 3	Nanodrop	27/10/2016 01:37 p.m.	2422.2	ng/ μ l	48.444	26.068	1.86	1.29	DNA
4	Muestra 4	Nanodrop	27/10/2016 01:40 p.m.	678	ng/ μ l	13.56	6.751	2.01	1.85	DNA
5	Muestra 5	Nanodrop	27/10/2016 01:41 p.m.	215.5	ng/ μ l	4.309	2.143	2.01	1.65	DNA
6	Muestra 6	Nanodrop	27/10/2016 01:42 p.m.	1138.6	ng/ μ l	22.771	12.275	1.86	1.18	DNA
7	Muestra 7	Nanodrop	27/10/2016 01:44 p.m.	346.8	ng/ μ l	6.935	3.515	1.97	2.2	DNA
8	Muestra 8	Nanodrop	27/10/2016 01:46 p.m.	3364	ng/ μ l	67.281	32.999	2.04	1.9	DNA

6.5.2 Extracción con Kit comercial QIAGEN

Debido a la variación de concentraciones de ADN plasmídico con la técnica de TENS, se procedió a extraer el ADN plasmídico de las colonias DH5 α transformadas con el casete pPIC9-EG mediante el kit comercial de la compañía QIAGEN. Se cuantificaron dos muestras en el equipo Nanodrop y se obtuvieron las lecturas mostradas en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Concentración de ADN plasmídico pUC57-EG en células de *E. coli* DH5 α obtenido mediante kit comercial

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	260/230	Sample Type
1	Muestra 1	Nanodrop	27/010/2016 03:08 p.m.	242	ng/ μ l	1.89	1.94	DNAP
2	Muestra 2	Nanodrop	27/010/2016 03:09 p.m.	74.1	ng/ μ l	1.87	1.88	DNAP

Se procedió a utilizar las muestras de ADN plasmídico obtenidas con el kit comercial QIAGEN, para caracterizarlas y posterior construcción y transformación en *E. coli* y *P. pastoris*.

5.6 Caracterización de la construcción pUC57-EG

Para la obtención del gen de la EG se realizó un análisis de restricción en el vector pUC57 sintetizado y se obtuvieron los fragmentos mostrados en la Figura 12. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular. En el segundo carril se observa una digestión parcial con *XhoI*. *EcoRI* en el tercer carril da el bandeo esperado con enzima reciente y los carriles cuatro y cinco corresponden al plásmido sin digerir a distintas concentraciones (800 ng/μl y 500 ng/μl respectivamente).

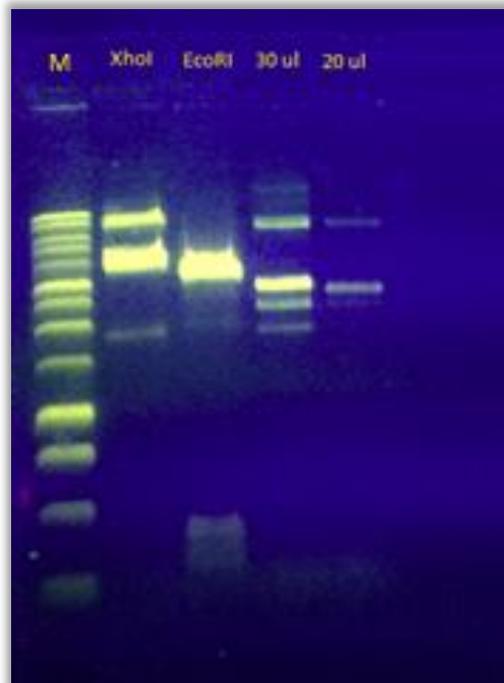


Figura 12. Digestión de pUC57. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular, el segundo carril se observa una degradación parcial con *XhoI*, en el tercer carril se observa el plásmido pUC57 digerido con *EcoRI*, el cuarto y quinto

carril son controles positivos (+) del vector pUC57 sin digerir a distintas concentraciones.

Las colonias transformadas se resembraron en cajas *Petri* y se almacenaron a 4 °C. Alícuotas de tubos de 2 ml fueron almacenados a -80°C con glicerina 70% (Ausubel, 1994).

5.7 Preparación y cuantificación del vector pPIC9

Se realizó una extracción de ADN plasmídico a colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector de clonación pPIC9 vacío. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% y se seleccionó la muestra que corresponde al quinto carril (encerrada en rojo) como se muestra en la Figura 13.

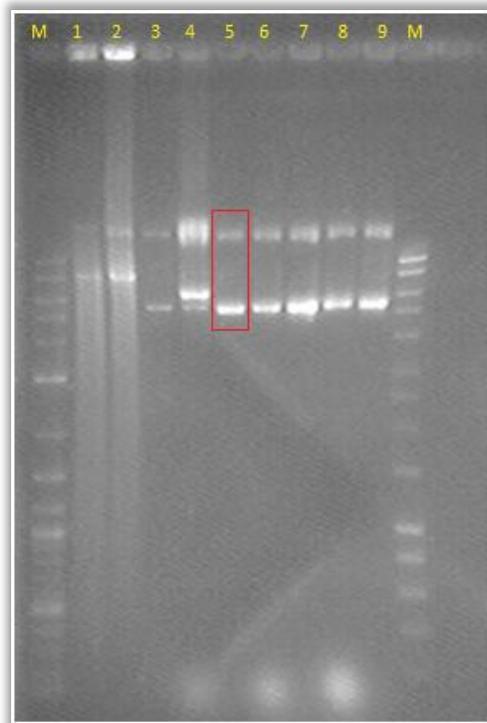


Figura 13. Muestras de pPIC9. Gel de electroforesis para visualizar los patrones correspondientes al vector de expresión pPIC9 sin digerir.

La muestra elegida se cuantificó en el Nanodrop y se obtuvieron los valores mostrados en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Concentración de ADN plasmídico de pPIC9

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	260/230	Sample Type
1	Muestra 1	Nanodrop	28/010/2016 10:08 a.m.	2356	ng/μl	1.99	2.56	DNAp

5.8 Linearización del vector pPIC9

La muestra elegida de pPIC9 se digirió con *XhoI* y *AvrII* durante 12 hr y posteriormente se corrió un gel de electroforesis el cual se muestra en la Figura 14.

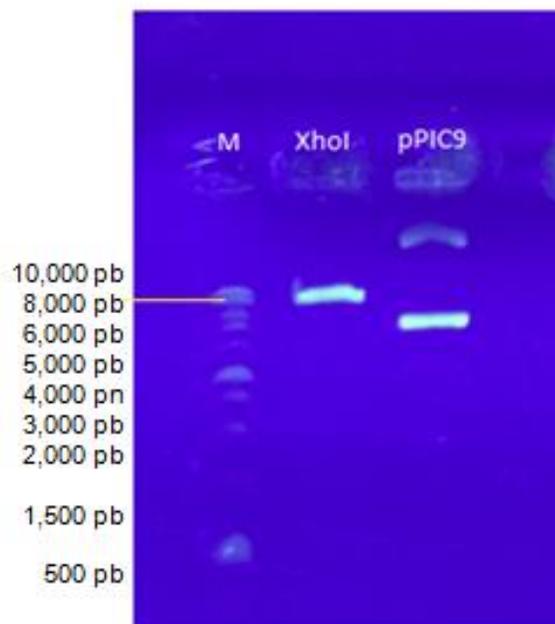


Figura 14. Caracterización de pPIC9. Marcador de peso molecular (carril 1), el vector de expresión pPIC9 digerido con *XhoI* y *AvrII* (carril 2) y el plásmido sin digerir (carril 3)

5.9 Purificación del gen de la EG y linearización de pPIC9 a partir del gel de agarosa

Las bandas obtenidas corresponden con las esperadas, el primer carril corresponde al marcador de peso molecular, el segundo corresponde a la digestión secuencial del vector pPIC9 (primero con la enzima *AvrII* durante 18 hrs y después con *XhoI* por 3 h. La banda observada corresponde al tamaño del vector pPIC9 sin inserto (8kb). El carril pPIC9 corresponde a la digestión del vector pPIC9 con ambas enzimas durante 18 hr, la banda obtenida corresponde al tamaño del vector sin injerto (8kb). El cuarto carril corresponde a la digestión secuencial del vector pUC57 (primero con la enzima *AvrII* durante 18 hrs y después con *XhoI* por 3 hr). La banda observada en el cuarto carril corresponde a una banda de 5kb, la cual creemos que se debe a que la digestión no fue eficiente, otra banda de 2.7kb esperada correspondiente al vector pUC57 linearizado sin el injerto y otra banda de 1.3kb correspondiente al gen de la EG el cual se purificó para ligarlo al vector pPIC9. En el quinto carril se observan las bandas esperadas, una banda de 2.7kb correspondiente al vector pUC57 sin injerto y otra banda de 1.3kb correspondiente al gen de la EG. El gel se muestra en la Figura 15 mostrada a continuación:

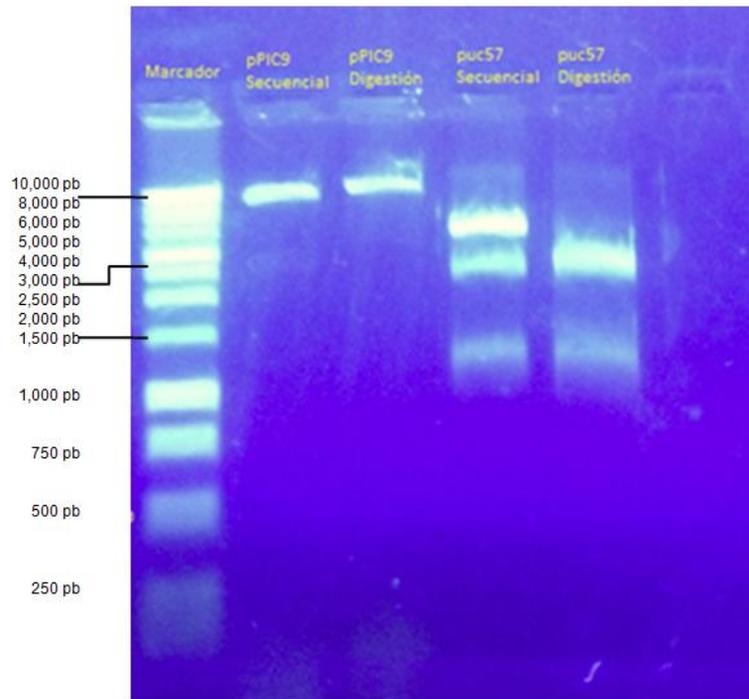


Figura 15. Análisis de restricción. Digestión de los vectores pPIC9 y pUC57 con las enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII*.

5.10 Ligación del gen de la EG con el vector pPIC9

El plásmido pPIC9 y el gen de la EG aislados a partir del gel de agarosa se ligaron y propagaron en *E. coli* DH5 α , se seleccionaron las colonias transformadas en medio selectivo LB con ampicilina (1mg/ml) y colonias se sembraron en placas *Petri* individuales (Figura 16).



Figura 16. Colonias transformantes DH5 α pPIC9-EG. Caja *Petri* con colonias recombinantes en medio selectivo (Amp 1mg/ml) con el casete de clonación pPIC9-EG.

5.11 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* DH5 α pPIC9-EG

Posteriormente se realizó una extracción de ADN plasmídico del cultivo de células transformadas y se caracterizó el ADN plasmídico obtenido (Figura 17).

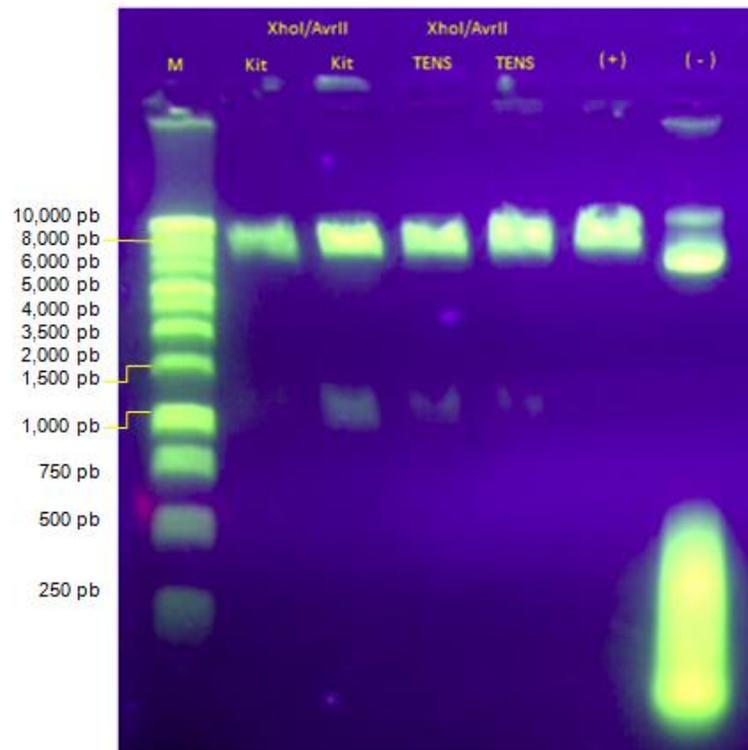


Figura 17. Caracterización de la construcción DH5 α pPIC9-EG. Extracción de ADN plasmídico con el kit comercial de la compañía QIAGEN.

5.12 Linearización de pPIC9 con *SacI*

Se procedió a linearizar el vector pPIC9-EG con la enzima *SacI* la cual genera generalmente cepas con el fenotipo Mut+ en la cepa GS115 (Figura 18).

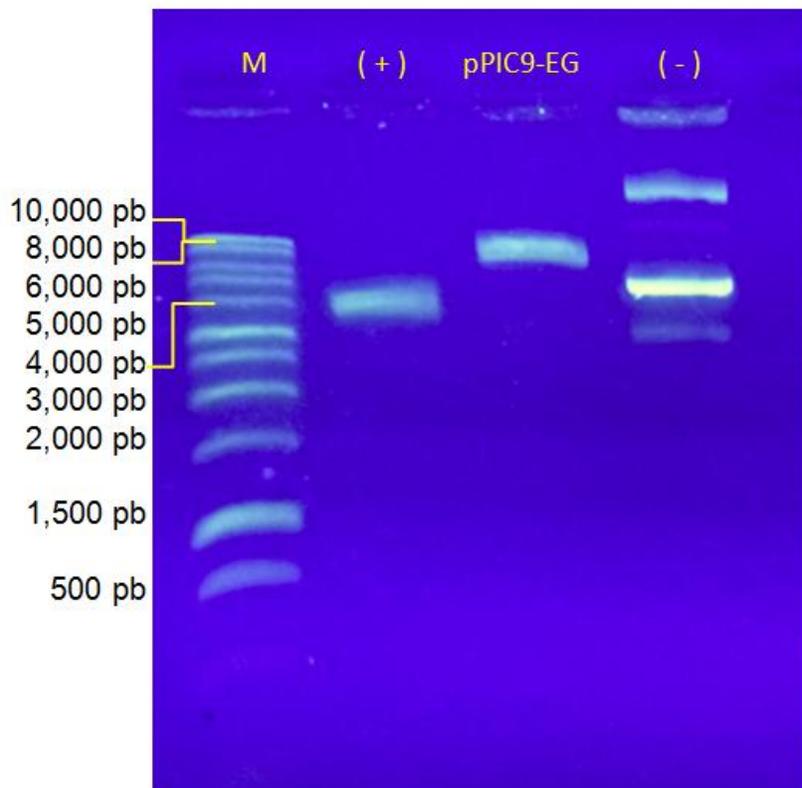


Figura 18. Caracterización del vector pPIC9-EG. Marcador de peso molecular (carril 1), digestión del vector pBAD/D-TOPO que mide 4.4 kb como control positivo (carril 2), construcción pPIC9-EG digerido con la enzima de restricción *SacI* (carril 3), vector pPIC9 sin digerir como control negativo (carril 4).

5.13 Transformación de la cepa GS115 de *Pichia pastoris* con el vector pPIC9-EG mediante electroporación

Para la transformación de la cepa GS115 se prepararon células electro competentes y una vez caracterizado y linearizado el vector pPIC9-EG, se procedió a transformarlas mediante electroporación y posteriormente inocularlas en placas de medio selectivo MD, el cual carece de histidina (Figura 19). El control negativo de la transformación en el cual no aparecen colonias debido a que estas no integran el marcador de auxotrofia (HIS4) presente en pPIC9, el control positivo presenta colonias con el casete pPIC9 vacío.



Figura 19. Cepa GS115-pPIC9-EG en medio selectivo MD.

Ratificando los datos obtenidos con la literatura, la producción de biomasa en la levadura *P. pastoris* fue rápida en medios líquidos relativamente económicos y sencillos, algo que ayuda significativamente la viabilidad de la producción de proteínas recombinantes en este sistema de expresión (Muza, 2014), además, gracias a la ayuda del plásmido pPIC9, la selección de clonas transformadas fue relativamente sencillo y rápido, que es otro valor agregado al trabajar con esta cepa.

Sin embargo, la producción a nivel matraz presenta algunas desventajas en la producción de enzimas recombinantes o ajenas al hospedador, una de ellas es la incapacidad de mantener el pH a un valor constante determinado. En este caso el pH ideal recomendado para este tipo de enzimas es entre 5 y 6 (Zhang *et al.*, 2009), lo cual no fue posible de mantener constante ya que las levaduras generalmente acidifican el medio de cultivo durante la fermentación. Lo ideal es llevar la producción con sus respectivas repeticiones con distintos protocolos de precipitación de proteínas, y escalar a nivel biorreactor (Ascacio-Martínez, 2004).

6.14 Caracterización de las colonias transformadas

Posterior a la transformación de la cepa DH5 α se llevó a cabo una extracción de ADN plasmidico para la caracterización de las colonias que insertaron el vector pPIC9 con la secuencia de la EG, mediante la técnica de PCR con los iniciadores AOX1 (Figura 20). Las cepas que presentaron una banda de 1345 pb corresponden a la amplificación del fragmento de la EG, las bandas que presentan una banda de 492 pb corresponden al vector pPIC9 vacío.

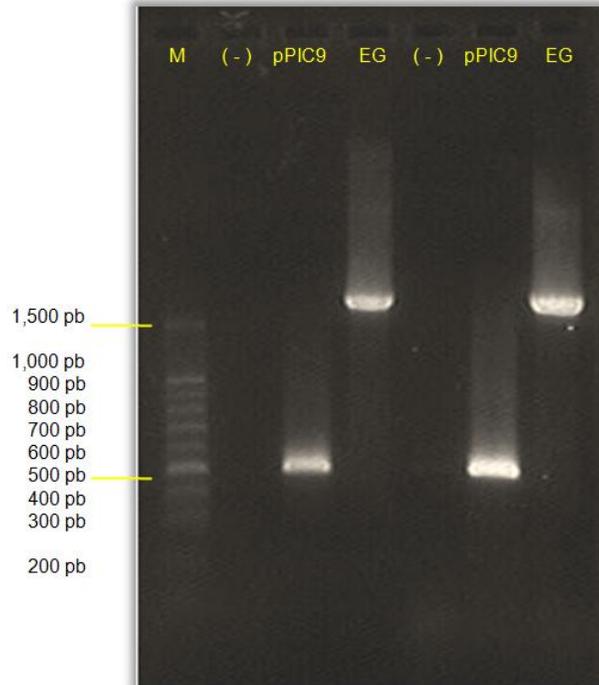


Figura 20. Análisis de PCR de las colonias DH5 α transformadas con pPIC9-EG. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, el segundo carril corresponde al control negativo, el tercer carril corresponde a la colonia transformada con pPIC9 vacío, el cuarto carril corresponde a la amplificación con iniciadores AOX.

5.15 Ensayos de expresión de la proteína endo- β -1,4-glucanasa en *Pichia pastoris* a mínima escala

Una vez seleccionadas las clonas que portan la secuencia de la enzima EG, se procedió a sobre expresar la EG recombinante. El ensayo de expresión se realizó con las etapas de inducción, dializado del medio, precipitación de las proteínas totales con cloroformo-metanol y análisis de las proteínas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

La precipitación de proteínas se llevó a cabo con el método de metanol-cloroformo, este método es ampliamente utilizado en la precipitación de proteínas en general, sin embargo, en el caso de las enzimas se pueden ver afectadas por la acción de este tipo de solventes, provocando su desnaturalización e inactivación (Ausubel *et al.*, 1994). La desnaturalización por solventes se debe a que las moléculas del solvente interfieren con las interacciones hidrofóbicas en el interior de las proteínas, por lo que lo ideal es realizar ensayos repetitivos para evaluar la mejor opción como agente que precipite la enzima EG sin afectar su actividad (Glatz, 1990).

5.16 Análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE

Las enzimas producidas por las cepas recombinantes transformadas (Figura 21) fueron analizadas en geles de SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie y desteñidos con la solución de acetona 1M para destinción. Encerrados en cuadros rojos se encuentran las proteínas sobre expresadas (EG1, EG3 y EG4 y 22k como control positivo).

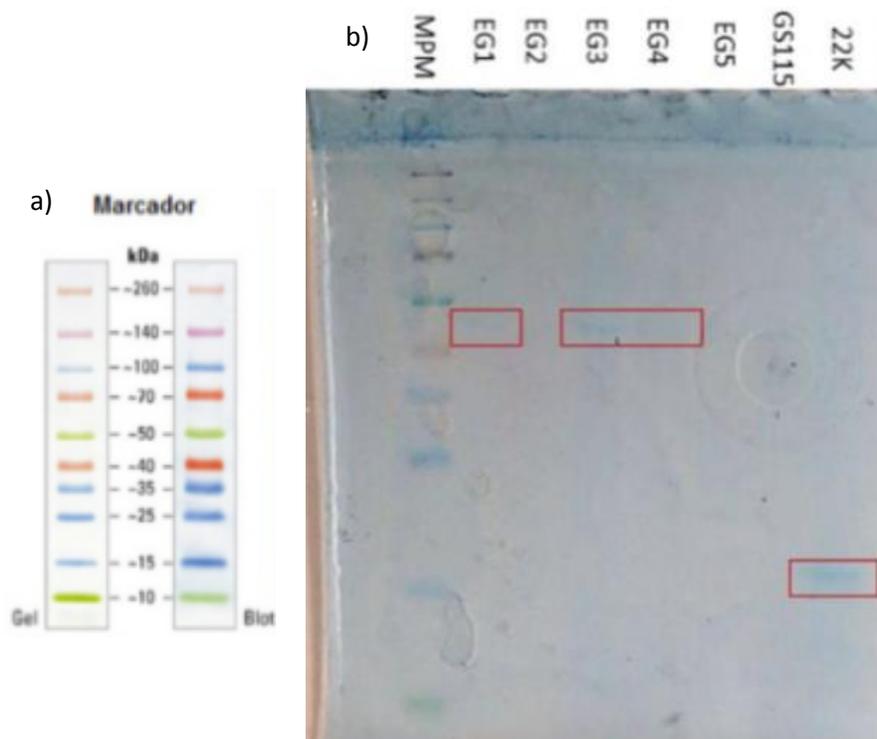


Figura 21. a) Marcador de peso molecular de proteínas. b) Gel SDS-PAGE: el primer carril corresponde al marcador de peso molecular de proteínas (MPM), del segundo carril al sexto corresponden a la cepa recombinante con EG colonia 1, 2, 3, 4 y 5, el séptimo carril corresponde al GS115 sin casete de expresión como control negativo del ensayo y el octavo carril corresponde a la cepa GS115 con el casete de expresión de la Prolactina Humana de 22 kDa como control positivo.

Mediante el ensayo de SDS-PAGE se encontró que la proteína recombinante producida en *P. pastoris* GS115 fue de 45 kDa de peso molecular. Estudios anteriores donde sobre expresan la enzima EG en *E. coli* encontraron un tamaño de 47 kDa en su forma nativa y 48.1 kDa producida con etiquetas de histidina (Zhang *et al.*, 2009). Nuestra enzima recombinante producida tuvo un peso molecular de alrededor de 46 kDa de acuerdo al marcador de peso molecular (Figura 21a), la cual corresponde con lo reportado previamente.

5.17 Cuantificación de proteínas

Se cuantificó la proteína total en el medio dializado de inducciones de 72 hr en tubos de 10 ml, tanto de la cepa GS115 sin casete, como para las cepas EG1, EG3, EG4 y EG5. La curva de calibración para cuantificar usando la técnica de Lowry va desde 0 μg hasta 1000 μg (Cuadro 6). La lectura de las muestras fue tomada a 595 nm y se calculó la concentración en base a la absorbancia calculada por el espectrofotómetro.

Cuadro 6. Cuantificación de proteínas en GS115-EG con el método de Lowry.

Cepa	Repetición 1	Repetición 2
1EG	0.801	0.767
3EG	0.792	0.795
4EG	0.703	0.664
5EG	0.63	0.605
GS115	0.586	0.602

La cepa sin casete de expresión GS115 reflejó menor concentración de proteínas totales, a diferencia del resto de colonias transformadas con el casete de expresión pPIC9-EG, lo cual es indicativo de que hay expresión de la enzima recombinante (Lowry *et al.*,1951).

5.18 Ensayos enzimáticos de la proteína recombinante

El ensayo enzimático para la enzima EG recombinante se realizó mediante el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) obtuvo los siguientes datos analizados en el espectrofotómetro de masas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis enzimático con CMC.

Cepa	Repetición 1	Repetición 2
Blanco	0	0
Control (+)	0.293	0.29
Control (-)	0.082	0.084
1EG	0.176	0.132
3EG	0.15	0.153
5EG	0.186	0.22

El análisis enzimático realizado determinó que la celulasa recombinante producida en *P. pastoris* GS115 mostró actividad celulítica contra CMC líquido incluso cambiando de color ligeramente los tubos eppendorf donde se realizó el ensayo, de forma similar que el control + (la celulasa comercial del hongo *Aspergillus*; Compañía PROMEGA). Y aunque hubo actividad de la enzima recombinante, la productividad de cepas con casete de expresión clonado puede variar dependiendo el tipo de vector utilizado y las condiciones de cultivo usado para la generación de biomasa e inducción de las proteínas recombinantes producidas (Cos *et al.*, 2006).

Es necesario seguir optimizando el proceso de producción de este tipo de celulasas y escalar la cepa recombinante en biorreactor para controlar parámetros clave para su producción óptima y estable como pH, temperatura y concentración de O₂, incluso se podría considerar la producción en biorreactor tipo airlift para proporcionar menor estrés provocado por la agitación mecánica del impulsor del biorreactor.

6. CONCLUSIONES

La óptima producción de las proteínas heterólogas y cepas super productoras en el ámbito industrial y científico es de gran importancia para la innovación y mejoramiento de procesos. En este trabajo, la enzima recombinante endo- β -1,4-glucanasa de 45 kDa proveniente de la termita *Coptotermes formosanus* se logró producir en el sistema de expresión de *P. pastoris* a mínima escala; aprovechando la rapidez en que *P. pastoris* como levadura genera biomasa y a su vez la capacidad de secreción de proteínas recombinantes al medio externo, evitando encarecer el proceso sin la necesidad de lisar la célula para obtener el producto, la cepa GS115 resultó ser adecuada para la producción de esta enzima.

La proteína cuenta con etiquetas de histidina para su purificación, en un futuro se podría clonar esta proteína sin las etiquetas de histidina y evaluar su funcionalidad en el sistema de expresión de *P. pastoris*. Además, desarrollar una estrategia en base a mejorar la producción industrial de proteínas en esta cepa en biorreactores y a su vez, buscar producir en nuevas cepas super productoras sería una ventajosa alternativa para el pretratamiento de malta e insumos en la industria cervecera y también para la producción de biocombustibles basados en materiales lignocelulósicos.

Anexo 1. Soluciones stock preparadas para el proyecto

10X YNB (13.4 de yeast nitrogen base con sulfato de amonio sin aminoácidos). Se disolvió 134 g de YNB con sulfato de amonio y sin aminoácidos en 1 L de agua. Posteriormente se usaron 34 g de YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos y 100 g de sulfato de amonio. Se filtró y almacenó a 4°C.

500X B (0.02% de biotina). Se disolvió 20 mg de biotina en 100 ml de agua y se esterilizó por filtro. Se almacenó a 4°C.

100X H (0.04% Histidina). Se disolvió 400 mg de L-histidina en 100 ml de agua. Se calentó la solución a 50°C.

10X D (20% dextrosa). Se disolvieron 200 g de D-glucosa en 1 L de agua. Se colocó en la autoclave durante 15 minutos.

10X M (5% metanol). Se mezcló 5 ml de metanol en 95 ml de agua. Se esterilizó por filtro y se almacenó a 4°C.

10X GY (10% glicerol). Se mezcló 100 ml de glicerol con 900 ml de agua. Se esterilizó el medio con autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

100X AA (0.5% de cada aminoácido). Se disolvieron 500 mg de cada aminoácido: ácido L-glutámico, L-metionina, L-lisina, L-leucina y L-isoleucina en 100 ml de agua.

1M buffer de fosfato y potasio, pH 6.0. Se combinó 132 ml de K₂HPO₄, 868 ml de 1 M KH₂PO₄ y se confirmó que el pH fuera de pH=6.0. Se esterilizó por autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

Anexo 2. Preparación de medios de cultivo (INVITROGEN, *Pichia* Expression kit, 2014)

Se prepararon distintos medios de cultivo para *Escherichia coli* con el fin de tener un reservorio para nuestro vector de clonación y para *Pichia pastoris*:

Medio LB: medio nutricionalmente rico para el crecimiento de bacterias. Se disolvieron 950 ml de agua desionizada con 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl; se ajustó la solución a un pH 7.0 y posteriormente se llevó a la autoclave por 20 minutos para posteriormente dejarla enfriar a 55°C y agregar los antibióticos.

Medio MD: se agregaron 15 g de agar a 800 ml de agua y se colocó en la autoclave durante 20 minutos, se enfrió a 60°C y se agregaron 100 ml de solución 10X YNB (Anexo 1), 2 ml de 500X B (Anexo 1), 100 ml de 10X D (Anexo 1).

Medio YPD: se agregaron 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 900 ml de agua (para placas se agregaron 20 g de agar), posteriormente se llevó a la autoclave por 20 minutos y se añadieron 100 ml de solución stock 10X D.

Medio BMMY: Buffered Methanol-complex Medium. Se disolvió 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona en 700 ml de agua. Se esterilizó en autoclave durante 20 min, después de eso se enfrió a temperatura ambiente y se agregó el siguiente mix: 100 ml de buffer de fosfato y potasio 1 M (pH=6), 100 ml 10X YNB, 2 ml 500X B, 100 ml 10X GY. El medio BMMY se prepara para inducir proteínas recombinantes. Cada 24 horas se añade metanol al 5% con el fin de potenciar la inducción y sembrar las dos cepas que se usaron como controles: negativo (GS115) y positivo (PRL23)

para la expresión de proteínas recombinantes en el medio BMMY líquido. Cada 24 horas se estuvo monitoreando el crecimiento.

7. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, P. (2006). Efecto del etanol en la degradación de BTEX: Implicaciones microscópicas y macroscópicas. Curso Contaminantes emergentes. Bogotá: Universidad de los Andes.

Ascacio-Martínez, J. A. y Barrera-Saldaña H. A. (2004). Production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormone by *Pichia pastoris*. *Gene* 340: 261–266.

Ascacio-Martínez, J. A. I. (2004). Producción en biorreactor, purificación y bioensayo de hormonas recombinantes del crecimiento. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina. 59 p.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York. 230 p.

Berlin A., Balakshin M., Gilkes N., Kadla J., Maximenko V., Kubo S., Saddler J. (2006). Inhibition of cellulase, xylanase and b-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology* 125: 198–209.

Béguin P. and Aubert J., P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev.* 13 (1): 25-58.

Biely, P. (1985). Review: Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology.* 3 (11): 286-290.

Binder J. B. y Raines R. T. (2010). Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. *PNAS* 107: 4516-4521.

Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *ORTWIN Prog. Polym. Sci.*, 19: 797-841.

Bobleter, O., Bonn, G. and Prutsch, W. (1991). Steam explosion-hydrothermolysis organosolv. A comparison. In: Focher, B., Marzetti, A., Crescenzi, V. (Eds.), *Steam explosion techniques*. Gordon and Breach, Philadelphia, pp. 59–82.

Breznak, J. A. and Brune, A., (1994). Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 453– 487.

Cannell M., G. R. (2003). Carbon sequestration and biomass energy offset: theoretical, potential and achievable capacities globally, in Europe and UK. *Biomass Bioenergy*, 24: 97-116.

Cardona A. y O. Sánchez (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I Obtencion a partir de diferentes materias primas. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América* 30:671-678.

Carrero, G. (2007) Factores que afectan la transformación de biomasa en bioetanol. *Ingeniería y Sociedad UC*. 8 (1): 53-60.

Chávez-Sinfuentes, M. y M. E. Domine (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: Métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4 (4): 15-46.

Cherry, J. R. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 438-443.

Claassen, P., B. van Lier, J., Lopez Contreras, A., J. van Niel, E., Sijtsma, L., Stams, A., S. de Vries, S. and Weusthuis R. A. (1999). Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52 (6): 741–755.

Clare J., J., Romanos M. A., Rayment F. B., Rowedder J. E., Smith M. A., Payne M. M., Sreekrishna K. and Henwood C. A. (1991). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*. 105 (2): 205-212.

Cooper, B. L. (2013). Enzimas xilanólíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 16(1): 19-22.

Cos O., Ramón R., Montesinos J., Valero F. (2006) —Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories* 5: 1-20.

Dagnino E., P., Roggero S., F., Moralesa G., W., y Chamorroa R., E. (2010). Hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada con ácido diluido para evaluar la eficacia de la etapa de pretratamiento. *UTN. II Jornadas de Investigación en Ingeniería del NEA y países limítrofes*. 5 p.

Demain A. (2009). *Microbes Fuel Energy Debate* from Drew University in New Jersey, USA. *ScienceDaily*: <http://www.sciencedaily.com/releases/2009/01/090122093923.htm>.

Faber, K. N., Harder W., Ab G. and Veenhuis M. (1995). Review: Methylo-trophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast*, 11: 1331–1344.

Fenger, D. and Wegener, G. (1984). *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter De Gruyter, Berlin and New York. 613 p.

FNB. (2004) ABC de los alcoholes Carburantes. Federación Nacional de Biocombustibles. www.minminas.gov.co/minminas/pagesweb.nsf/0/6ac90c0c61c39de005257005004e2edc?OpenDocument.

Fuentes-Garibay, J., A., Aguilar R., C. N. Rodríguez-Herrera, Guerrero-Olazarán, M., y Viader-Salvado, J. M. (2015). Tannase Sequence from a Xerophilic *Aspergillus niger* Strain and Production of the Enzyme in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*. 57:439–447.

Glatz, C. E. (1990). Precipitation. En: *Separation Processes in Biotechnology*. Asenjo, J. A. (Ed.) Marcel Dekker. New York. pp 329-356.

Grabber, J. and Ronald, D. (2005). Methyl Esterification Divergently affects the Degradability of Pectic Uronosyls in Nonlignified and Lignified Maize Cell Walls. *J. Agric. Food Chem*. 53: 1546–1549.

Gray M., C., Converse, A. O. and Wyman, C. E. (2003). Sugar monomer and oligomer solubility. Data and predictions for application to biomass hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 3: 179–193.

Guerrero, A. N. (2009). Identificación y clonación de glicosil hidrolasas para uso en producción de bioetanol. Tesis de Licenciatura. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas: p. 59.

Guerrero-Olazarán, M., Barrera-Saldaña, H. A. and Viader-Salvadó J. M. (2002). Modified methylo-trophic *Pichia pastoris* yeast which secretes human growth hormone. U.S. patent 6,342,375 B1.

González, F., A., Rodríguez, M., Restrepo, S., Gómez, M. (2008). Biocombustibles de segunda generación y Biodiesel: Una mirada a la contribución de la Universidad de los Andes. *Revista de Ingeniería* 28: 70-82.

Hendriks, A. and Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100: 10–18.

Hogan, M., Veivers, P. C., Slaytor, M. and Czolij, R.T. (1988a). The site of cellulose breakdown in higher termites (*Nasutitermes walker* and *Nasutitermes exitiosus*). *J. Insect Physiol*. 34: 891–899.

Hsu, T. (1996). Pretreatment of biomass. En: Handbook on bioethanol. Wyman, C.E. (ed.). Taylor & Francis. Washington. pp. 179-212.

Invitrogen Co. (2014). *Pichia* Expression kit. For expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Catalog Number K1710-01.

Jeng, W. Y., Wang N. C., Lin M. H., Lin C. T., Liaw Y. C., Chang, W., J., Liu C. I., Liang P., H. and Wang, A. J. (2010). Structural and functional analysis of three beta-glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. J.Struc.Biol. 173 (1): 46–56.

Jiménez I., D, Abreu C., A., López, V. E., Tellez J., A., y Garcida R., J. N. (2011). Obtención de azúcares fermentables mediante hidrólisis ácida de *Beta vulgaris*. Rev. Int. Contam. Ambie. 28(2): 151-158.

Jørgensen, H., Kristensen, J. B. and Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. Biofuels Bioproducts and Biorefining.1(2): 119-134.

Laureano-Pérez; Teymouri F., Alizadeh H. and Dale B. E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. Appl. Biochem. Biotechnol. 17: 1081–1099.

Lax A., R. and Osbrink W., L. A. (2003). Research on targeted management of the Formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: *Rhinotermitidae*). Pest Management Science, 59: 788–800.

Liu, R. and Shen, F. (2008). Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). Bioresource Technology 99: 847–854.

Lynd L., R. (1996). Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy. Annual Review of energy and the environment. 21:403-465.

Lowry, O. H., Rosebrough N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol Chem. 193 (1): 265-75.

Macedo, I., Seabra, J. and Silva, J. (2008). Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: the 2005/2006 averages and a prediction for 2020. Biomass and Bioenergy 32: 582–595.

Martínez-Hernández, S. L., D. Cervantes-García, D., Muñoz-Ortega, M., Aldaba-Muruato, L. R., Loera-Muro, V. M., Ascacio-Martínez, J. A. I., Loera-Arias, M., Montes de Oca-Luna, R. and Ventura-Juárez, J. (2017). An anti-amoebic vaccine: generation

of the recombinant antigen LC3 from *Entamoeba histolytica* linked to mutated exotoxin A (PEDIII) via the *Pichia pastoris* system. *Biotechnol Lett* 39:1149–1157.

Mercer J. (1971). West Antarctic ice sheet and CO₂ greenhouse effect: a threat of disaster. *Nature*, 271: 321-325.

Mesa G., L., González S., E., González C., M., Lopretti, M. y Castro G., E. (2008). La producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos. Estado del arte. 132.248.9.34/hevila/Centroazucar/2008/vol35/no2/5.pdf.

Miller L., G. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3) 426-428.

Mosier, N., R. Hendrickson, N. Ho, M. Sedlak and M. Ladisch. (2005). Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96: 1986-1993.

Muza B., C. (2014). Producción, caracterización y escalamiento en bioreactor de la isoforma de 23 kDa de la Prolactina Humana. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina. 52 p.

Nakashima, K. and Azuma, J. I. (2000). Distribution and properties of endo- β -1,4-glucanase from a lower termite *Coptotermes formosanus* (Shiraki). *Biotechnol. Biochem.* 64: 1500–1506.

Nakashima, K., Watanabe, H., Saitoh, H., Tokuda, G. and Azuma, J.I. (2002). Dual cellulose- digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 777–784.

Ni, J., Takehara, M., and Watanabe H. (2005) Heterologous overexpression of a mutant termite cellulase gene in *Escherichia coli* by DNA shuffling of four orthologous parental cDNAs. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69: 1711– 1720.

Niño L., L., A. Acosta C. y R. Gelves Z. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia.* 69: 317-326.

Noirot, C. (1992). From wood- to humus-feeding: an important trend in termite evolution. In: Billen, J. (Ed.), *Biology and Evolution of Social Insects*. Leuven University Press, Leuven, Belgium, pp. 107–119.

O' Brien, R. W. and Slaytor, M., (1982). Role of microorganisms in the metabolism of termites. *Aust. J. Biol. Sci.* 35: 239–262.

Ohkuma, M. (2003). Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 1–9.

- Palma-Nicolás, J. P., Ascacio-Martínez, J. A., and Barrera-Saldaña, H. A. (2005). Production of recombinant human placental variant growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters* 27: 1695–1700.
- Potts, R. C. and Hewitt, P. H. (1973). The distribution of intestinal bacteria and cellulase activity in the harvester termite *Trinervitermes trinervoides* (Nasutitermitinae). *Insectes Soc.* 20: 215–220.
- Romanos, M. A., Beeseley, K. M., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Makoff A. J., Dougan, G., Fairweather, N.F. and Charles IG. (1991). Recombinant *Bordetella pertussis pertactin* (P69) from the yeast *Pichiapastoris*: high level production and immunological properties. *Vaccine*, 9: 901-906.
- Sánchez, O. and Cardona (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99: 5270–5295.
- Scharf, M. E., Karl, Z. J., Sethi, A., Sen, R., Raychoudhury, R. and Boucias, D. G. (2011). Defining host-symbiont collaboration in termite lignocellulose digestion: “The view from the tip of the iceberg”. *CommunIntegrBiol*, 4: 761–763.
- Schultz, J. E. and Breznak, J. A. (1978). Heterotrophic bacteria present in hindguts of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)]. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 930–936.
- Sheehan J. and Himmel M. (1999). Enzymes, Energy, and the Environment: A Strategic Perspective on the U.S. Department of Energy’s Research and Development Activities for Bioethanol. *Biotechnol Prog.* 15 (5): 817-827.
- Siegel, R. S. and Brierley, R.A. (1989). Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentation with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 403-404.
- Slaytor, M. (1992). Cellulose digestion in termites and cockroaches: what role do symbionts play? *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 775–784.
- Slaytor, M., Veivers, P. C. and Lo, N. (1997). Aerobic and anaerobic metabolism in the higher termite *Nasutitermes walkeri* (Hill). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 291–303.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York. 14: 325-330.
- Sweet, M. S. and Winandy, J. E., (1999). Influence of degree of polymerization of cellulose and hemicellulose on strength loss in fire-retardant-treated southern pine. *Holzforschung* 53 (3): 311–317.

Sun, Y. and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, 83 (1): 1-11.

Taherzadeh, M. J. and Karimi, K. (2007). Acid-Based hydrolysis processes for ethanol lignocellulosic material: a review. *BioResouces*. 2: 472-479.

Taherzadeh, M. J. and Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Inter J Molecular Science*. 9: 1621-1651.

Tokuda, G., Watanabe, H., Matsumoto, T. and Noda, H. (1997). Cellulose digestion in the wood-eating higher termite, *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki): distribution of cellulases and properties of endo- β -1,4-glucanase. *Zool. Sci.* 14: 83–93.

Tokuda, G., Lo, N., Watanabe, H., Slaytor, M., Matsumoto and T., Noda, H. (1999). Metazoan cellulase genes from termites: intron/exon structures and sites of expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1447: 146–159.

Tokuda, G., Lo, N., Watanabe, H., Arakawa, G., Matsumoto, T. and Noda, H. (2004). Major alteration of the expression site of endogenous cellulases in members of an apical termite lineage. *MolEcol*. 13: 3219–3228.

Todaka, N., Lopez, C. M., Inoue, T., Saita, K., Maruyama, J., Arioka, M., Kitamoto, K., Kudo, T. and Moriya, S. (2009). Heterologous expression and characterization of an endoglucanase from a symbiotic protist of the lower termite, *Reticulitermes speratus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160: 1168-1178.

Veana, F., Fuentes-Garibaya, J. A., Aguilar C. N., Rodríguez-Herrera R., Guerrero-Olazarán, M., Viader-Salvadó, J. M. (2014). Gene encoding a novel invertase from a xerophilic *Aspergillus niger* strain and production of the enzyme in *Pichia pastoris* *Enzyme and Microbial Technology* 63: 28–33.

Watanabe, H., Nakamura, M., Tokuda, G., Yamaoka, I., Scrivener, A. M. and Noda, H. (1997). Site of secretion and properties of endogenous endo-b-1,4-glucanase components from *Reticulitermes speratus* (Kolbe), a Japanese subterranean termite. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 305–313.

Watanabe, H., Noda, H., Tokuda, G. and Lo, N. (1998). A cellulase gene of termite origin. *Nature*, 394: 330–331.

Watanabe, H. and Tokuda G. (2010). Cellulolytic systems in insects. *Annu Rev Entomol*, 55: 609–632.

Wegner, G.H. (1990). Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microb Rev*, 87: 279-284.

Wen, F., Nair, N. and Zhao, H. (2009). Protein engineering in designing tailored enzymes and microorganisms for biofuels production. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 412–419.

Woestenenk E.A., Hammarström M., van den Berg S., Härd T., Berglund H., (2004). His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vector. *Journal of Structural and Functional Genomics*. 5 (3): 217-29.

Yamada, A., Inoue, T., Wiwatwitaya, D., Ohkuma, M., Kudo, T., Abe, T., Sugimoto A. (2005). Carbon mineralization by termites in tropical forests, with emphasis on fungus combs. *Ecol Res*, 20: 453–460.

Zhang, D., Lax, A. R., Raina, A.K. and Bland, J.M. (2009). Differential cellulolytic activity of native-form and C-terminal tagged-form cellulase derived from *Coptotermes formosanus* and expressed in *E. coli*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 516–522.

Zhang, T., Chi, Z., Zhao, C. Chi, Z. and Gong, F. (2010). Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces* sp. W0. *Bioresour Technol.* 101 (21): 8166-70.

Zumalacárregui-De Cárdenas, L., Pérez-Ones. O., Rodríguez-Ramos, Zumalacárregui-De Cárdenas, P., Lombardi, G. (2015). Potencialidades del bagazo para la obtención de etanol frente a la generación de electricidad. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 5: 407-418.