



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Purificación y caracterización bioquímica de la xilanasa
TtXynA del hongo termófilo *Thielavia terrestris* Co3Bag1.
Clonación del gen *cel7A* y evaluación de su expresión en un
sistema heterólogo”**

T E S I S

Que presenta

YOLANDA GUADALUPE GARCIA HUANTE

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de Tesis:
Dra. María Eugenia Hidalgo Lara

Ciudad de México

ENERO, 2017

ESTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO 51 DE INGENIERÍA DE PROTEÍNAS, UBICADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA DEL CINVESTAV-IPN.

PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO, SE CONTÓ CON EL APOYO DE UNA BECA DE DOCTORADO CONACYT (203140).

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta Tesis estuvo conformado por:

Dra. María Eugenia Hidalgo Lara **Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV**

Dr. Rodolfo Marsch Moreno **Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV**

Dr. Roberto Ruíz Medrano **Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV**

Dr. Guillermo Aguilar Osorio **Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química-UNAM**

Dr. Ismael Bustos Jaimes **Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina-UNAM**

Dr. Jorge Campos Contreras **Unidad de Biotecnología y Prototipos FES Iztacala-UNAM**

[Escriba texto]

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quisiera agradecer a mis padres y hermanos por la culminación de este proyecto, pues sin su apoyo incondicional, este sueño no hubiese sido posible.

Asimismo, quisiera agradecer al CONACYT por la beca otorgada.

A la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, y a mis asesores, los Doctores Roberto Ruíz Medrano, Rodolfo Marsch Moreno, Jorge Campos Contreras, Guillermo Aguilar Osorio e Ismael Bustos, por el apoyo brindado, su asesoría, comentarios, críticas constructivas y su tiempo a lo largo del desarrollo de este proyecto.

Por otra parte, quisiera agradecer al M. en C. Alejandro Santiago Hernández, por su apoyo y asesoramiento para la realización de algunas de las técnicas de laboratorio utilizadas en este proyecto.

De igual forma, quisiera agradecer al Químico Fernando Maldonado García, y a la Dra. Adriana Neira González, por su asesoramiento y consejos para la realización de algunas técnicas que utilicé para el desarrollo de este proyecto.

Asimismo, quisiera agradecer a la Técnico de Laboratorio María Eugenia Zúñiga Trejo, y a las Srias. Vania Muñoz Macías, Leticia Loera pues gracias al trabajo que realizan, los estudiantes como yo podemos dedicarnos al 100% para desarrollar nuestro proyecto. Gracias por facilitarnos las cosas!!!

También quisiera agradecer de manera muy especial a mis compañeros de Posgrado la Dra. Ara Itzel Pérez de los Santos Mondragón, y al M. en C. Gerardo Reséndiz Cardiel, por sus consejos para tratar de solventar algunos problemas encontrados a lo largo de este proyecto.

[Escriba texto]

Por otro lado, me gustaría agradecer a mis compañeros del Laboratorio 51: Ara, Astrid, Marina, Moisés, Maribel, Miguel, Tere, Maru, Alex, Isabel, Claudia, Dani, Brenda, Saira, Johan, Omar, e Isaac, por su compañerismo y amistad.

Y de manera muy especial, agradezco a varios de mis amigos que con su constante presencia, me fue mucho más fácil sobrellevar los momentos complicados que se suscitaron en este período. Muchísimas gracias Jacob, Mau, Norma, Ana Laura, Caloch, Ivonne, Alba, Giuliana, Elke y Hugo.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Composición de la hemicelulosa	4
2.2 Estructura y distribución del xilano	5
2.3 Bioconversión del xilano	6
2.4 Clasificación de las xilanasas	7
2.5 Mecanismos catalíticos de las glicosilhidrolasas	8
2.5.1 Mecanismo de retención	8
2.5.2 Mecanismo de inversión	9
2.6 Aplicaciones industriales de las xilanasas	10
2.7 Xilanasas fúngicas de fuentes mesófilas y termófilas	12
2.8 Clonación y expresión de xilanasas fúngicas	13
2.8.1 <i>P. pastoris</i> como hospedero en la expresión de xilanasas fúngicas	14
2.8.1.1 El uso de promotores para la expresión de xilanasas recombinantes en <i>P. pastoris</i>	14
2.8.1.2 Vectores de expresión para <i>P. pastoris</i>	15
2.8.1.3 Secreción de xilanasas recombinantes expresadas en <i>P. pastoris</i>	15

Í	Pág.
2.8.1.4 Características de las xilanasas recombinantes expresadas en <i>P. pastoris</i>	16
2.9 Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	16
3. ANTECEDENTES	17
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVO GENERAL	20
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
8. MATERIALES Y MÉTODOS	22
8.1 Cinética de crecimiento y de actividad xilanolítica de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	22
8.2 Determinación de la biomasa de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1 por peso seco	22
8.3 Determinación de la actividad xilanolítica de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1 y análisis zimográfico	22
8.4 Análisis electroforético (SDS-PAGE) y determinación de proteína	23
8.5 Purificación de una xilanasas producida por <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	23
8.6 Determinación de carbohidratos en TtXynA	24
8.7 Desglicosilación de TtXynA	24
8.8 Determinación del pH óptimo de actividad y estabilidad al pH de TtXynA	25
8.9 Determinación de la temperatura óptima de actividad y termoestabilidad de TtXynA	25
8.10 Determinación de los parámetros cinéticos y afinidad por sustrato	25

	Pág.
8.11 Efecto de los iones metálicos y el EDTA sobre la actividad de TtXynA	26
8.12 Determinación de los productos de hidrólisis de TtXynA	26
8.13 Dicroísmo circular de TtXynA variando la temperatura	26
8.14 Identidad de TtXynA	27
8.15 Extracción del RNA total de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	27
8.16 Amplificación del ORF- <i>TtXynA</i> de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	28
8.16.1 Obtención del cDNA	28
8.16.2 Amplificación de la secuencia parcial del ORF- <i>TtXynA</i>	28
8.16.3 Amplificación y secuenciación del marco de lectura completo ORF- <i>TtxynA</i>	30
8.17 Secuenciación completa del ORF- <i>ttxynA</i> de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	31
8.18 Purificación de productos de PCR a partir de gel	31
8.19 Clonación de <i>ttxynA</i> en el vector de expresión constitutiva pGAPzαA de <i>P. pastoris</i>	32
8.20 Clonación de <i>ttxynA</i> en el vector de expresión constitutiva pGAPzαB de <i>P. pastoris</i>	33
8.21 Evaluación de la expresión constitutiva de <i>ttxynA</i> en <i>P. pastoris</i>	34
9. RESULTADOS	35
9.1 Evaluación de la actividad xilanolítica de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	35
9.2 Purificación de una xilanasas producida por <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	36
9.3 Caracterización bioquímica de TtXynA	38
9.3.1 Efecto del pH sobre la actividad de TtXynA y su estabilidad al pH	38

	Pág.
9.3.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de TtXynA y su termoestabilidad	39
9.3.3 Análisis estructural de TtXynA por dicroísmo circular	41
9.3.4 Determinación de la afinidad por sustrato y de los parámetros cinéticos de TtXynA	42
9.3.5 Efecto de diferentes iones metálicos sobre la actividad xilanolítica de TtXynA	42
9.3.6 Presencia de carbohidratos en TtXynA	43
9.3.7 Productos de hidrólisis de TtXynA	45
9.4 Identidad de TtXynA	46
9.5 Obtención de la secuencia codificante para la xilanasa TtXynA	47
9.5.1 Amplificación del ORF- <i>ttxynA</i>	47
9.5.1.1 Amplificación de la secuencia parcial del ORF- <i>ttxynA</i>	48
9.5.1.2 Amplificación del ORF- <i>ttxynA</i> completo	50
9.6 Predicción del modelo 3-D de TtXynA de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	55
9.7 Producción de TtXynA de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1 en <i>P. pastoris</i>	56
9.7.1 Clonación de <i>ttxynA</i> en el vector pGAPzαA	56
9.7.2 Evaluación de la actividad xilanolítica de células de <i>Pichia pastoris</i> /pGAPzαA- <i>ttxynA</i>	59
9.7.3 Síntesis de <i>ttxynA</i> con optimización de codones para su expresión en <i>P. pastoris</i> .	60
9.7.4 Subclonación del gen <i>ttxynA</i> op sintético en el vector de expresión pGAPzαB.	61

	Pág
9.8. Producción de la xilanasa TtXynA en <i>P. pastoris</i> -X33 transformada con pGAPzαB- <i>ttxynA_{op}</i>	69
9.8.1 Evaluación de la actividad xilanolítica de células de <i>P. pastoris</i> -pGAPzαB- <i>ttxynA_{op}</i>	69
9.9 Subclonación del gen <i>ttxynA_{op}</i> en el vector pPiczαB.	72
9.10 Evaluación de la síntesis de TtXynA transformando <i>P. pastoris</i> GS115 y KM71H con la construcción <i>pPICzαB-ttxynA_{op}</i>	74
9.11 Análisis de identidad de TtXynA de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	76
9.12 Producción de Cel7A de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1 en <i>E. coli</i>	80
9.13 Efecto de la temperatura y de la concentración de sustrato sobre la actividad de Cel7A de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	82
10. DISCUSIÓN	84
11. CONCLUSIONES	91
12. PERSPECTIVAS	92
13. BIBLIOGRAFÍA	93
14. ANEXOS	104

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Aplicaciones industriales de las xilanasas	11
Tabla 2. Resumen de la purificación de una xilanasas de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	37
Tabla 3. Parámetros cinéticos de la xilanasas TtXynA de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	42
Tabla 4. Efecto de los iones metálicos y del EDTA sobre la actividad de TtXynA	43
Tabla 5. Determinación de la actividad xilanolítica en el sobrenadante de cultivo de diferentes transformantes de <i>P. pastoris/pGAPzaA-ttxynA</i>	59
Tabla 6. Determinación de la actividad xilanolítica en la biomasa de diferentes transformantes de <i>P. pastoris/pGAPzaA-ttxynA</i>	59
Tabla 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad de Cel7A de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1	82

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura del xilano y los sitios de acción de las diferentes enzimas encargadas de su degradación.	7
Figura 2. Mecanismo catalítico de las glicosilhidrolasas. A: Mecanismo de retención; B: Mecanismo de inversión	10
Figura 3. Ciclo de PCR por gradiente utilizado para amplificar la secuencia parcial de <i>ORF-ttXynA</i> que abarca desde el sitio +18 al sitio +1578.	29
Figura 4. Mapa del vector pJET1.2/blunt, utilizado para clonar productos de PCR	30
Figura 5. Ciclo de PCR utilizado para amplificar el marco de lectura completo que codifica para TtXynA (<i>ORF-ttxynA</i>).	31
Figura 6. Ciclo de PCR utilizado para amplificar la región de <i>ttxynA</i> que codifica para la proteína madura.	32
Figura 7. Mapa del vector pGAPzαA, para la expresión de proteínas de manera constitutiva en <i>P. pastoris</i> .	33
Figura 8. A) Cinéticas de crecimiento (líneas continuas) y de actividad xilanolítica (líneas punteadas) de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1 en presencia de CMC y xilano como sustratos. B) Análisis zimográfico de la actividad xilanolítica a las 96 h de cultivo de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1 en presencia de CMC.	36
Figura 9. A) Análisis electroforético de la purificación de TtXynA.	38
Figura 10. A) Efecto del pH sobre la actividad de TtXynA. B) Estabilidad al pH de TtXynA.	39
Figura 11. A) Efecto de la temperatura sobre la actividad de TtXynA. B) Termoestabilidad de TtXynA a 85°C, 75°C y 65°C.	40

INDICE DE FIGURAS (*continuación*)

	Pág.
Fig. 12. A) Espectro de DC en el UV-lejano de TtXynA purificada y Xyn11A _{AOX1} como la proteína control, a diferentes temperaturas como se indica. B) Perfiles de transición térmica de TtXynA y Xyn11A _{AOX1} .	41
Figura 13. A) SDS-PAGE 10% teñido con Azul de Coomassie y el reactivo de Schiff.	44
Figura 14. Análisis por TLC de los productos de hidrólisis de TtXynA utilizando como sustrato xilano de haya al 1%.	45
Figura 15. Secuencia de aminoácidos de la celobiohidrolasas Cel7A (THITE_118360; Número de acceso del Genbank: AEO67172.1, y UniProtKB ID: G2QZD9) de <i>T. terrestris</i> NRRL8126.	46
Figura 16. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de Cel7A de <i>T. terrestris</i> NRRL8126, utilizando el programa Clustal W 2.0.	48
Figura 17. A) Extracción de RNA total de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1. B) Síntesis de cDNA de doble cadena a partir del RNA total extraído.	49
Figura 18. Amplificación de la región +18- 1521 del ORF- <i>ttxynA</i> de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.	50
Figura 19. Amplificación del marco de lectura abierto <i>ORF- ttxynA</i> de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1, utilizando cDNA como DNA molde.	51
Figura 20. Digestión de <i>pJET-ORFttxynA</i> con las enzimas de restricción <i>XbaI</i> y <i>NotI</i> .	52
Figura 21. Secuencia codificante traducida de Cel7A de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1, (previamente pensada para TtXynA).	54
(Continuación) Figura 21. Secuencia codificante traducida de Cel7A de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1, (previamente pensada para TtXynA).	55

INDICE DE FIGURAS (*continuación*)

	Pág.
Figura 22. Modelo de la estructura 3D de Cel7A de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1, (previamente pensado de TtXynA).	56
Figura 23. A) Amplificación de la región <i>mttxynA</i> de <i>T. terrestris</i> co3Bag1.	57
Figura 24. A) Extracción del plásmido construcción <i>pGAPzαA-ttxynA</i> de las transformantes obtenidas de <i>E. coli</i> DH5α.	58
Figura 25. A) Clonación virtual de <i>ttxynA</i> en <i>pGAPzαB</i> . B) Clonación virtual de <i>ttxynA</i> en <i>pGAPzαA</i> .	61
Figura 26. A) Extracción del plásmido <i>pUC-TtXynA</i> de clonas de <i>E. coli</i> DH5α.	62
Figura 27. A) Extracción del plásmido <i>pGAPzαB</i> de cinco diferentes clonas de <i>E.coli</i> . B) Digestión del plásmido <i>pGAPzαB</i> y purificación del fragmento <i>ttxynA_{op}</i> .	63
Figura 28. A) Digestión de <i>pGAPzαB-xynA_{op}</i> , con <i>PstI</i> y <i>XbaI</i> , extraído de diferentes clonas de <i>E. coli</i> DH5α. B) Transformantes de <i>P. pastoris</i> , obtenidas al transformarlas con el plásmido <i>pGAPzαB-ttxynA_{op}</i> y seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia de Zeocina 200 µg/mL.	64
Figura 29. Evaluación de la actividad xilanólica en el sobrenadante a las 48 h de cultivo de diferentes transformantes de <i>P. pastoris/pGAPZαB-ttxynA_{op}</i> utilizando glucosa y glicerol como fuentes de carbono.	65
Figura 30. Evaluación de la actividad xilanólica en el sobrenadante a las 48 h de cultivo de diferentes transformantes de <i>P. pastoris/pGAPZαB-ttxynA_{op}</i> utilizando glucosa y glicerol como fuentes de carbono.	66
Figura 31. Evaluación de la actividad xilanólica en el sobrenadante a las 48 h de cultivo de diferentes transformantes de <i>P. pastoris/pGAPZαB-ttxynA_{op}</i>	67

INDICE DE FIGURAS (continuación)

	Pág.
Figura 32. Evaluación de la actividad xilanolítica en el sobrenadante a las 48 h de cultivo de diferentes transformantes de <i>P. pastoris/pGAPZαB-ttxynA_{op}</i> .	67
Figura 33. Evaluación de la actividad xilanolítica en el sobrenadante a las 48 h de cultivo de diferentes transformantes de <i>P. pastoris/pGAPZαB-ttxynA_{op}</i> .	68
Figura 34. Análisis electroforético de los sobrenadantes de diferentes transformantes después de 48 h de cultivo.	69
Figura 35. A) Análisis electroforético de la biomasa de diferentes transformantes de <i>P. pastoris/pGAPzαB-ttxynA_{op}</i> . B) Análisis electroforético de la proteína intracelular a las 48 h de cultivo de diferentes transformantes de <i>P. pastoris/pGAPZαB-ttxynA_{op}</i>	70
Figura 36. “PCR-colony” de las transformantes <i>P. pastoris/pGAPzαB-ttxynA_{op}</i> 56, 307, 295, 547, 747.	71
Figura 37. Análisis electroforético del sobrenadante de cultivo de las 24, 48 y 72 h de las transformantes pGAPzαB-ttxynA _{op} 56, 295, 307, 547, 747 y control.	72
Figura 38. A) DNA plasmídico extraído de <i>E. coli/pPICzαB-ttxynA_{op}</i> .	73
Figura 39. Evaluación de la actividad xilanolítica, en placa, de varias transformantes <i>P. pastoris/pPICzαB-ttxynA_{op}</i> .	74
Figura 40. Cinética de actividad celulolítica (A) y xilanolítica (B) de las transformantes <i>P.pastoris pPICzαB-ttxynA_{op}</i> , derivadas de la cepa KM71H, utilizando 0.3% de CMC en amortiguador de acetatos 50mM y 0.3% de xilano de haya en amortiguador de citratos 50 mM, respectivamente.	75

INDICE DE FIGURAS (continuación)

	Pág.
Figura 41. Cinética de actividad celulolítica (A) y xilanolítica (B) de las transformantes <i>P.pastoris</i> pPICzαB- <i>txynA_{op}</i> , derivadas de la cepa GS115, utilizando 0.3% de CMC en amortiguador de acetatos 50 mM y 0.3% de xilano de haya en amortiguador de citratos 50 mM, respectivamente	76
Figura 42. Análisis zimográfico de la actividad celulolítica de diferentes cepas de <i>P. pastoris</i> cultivadas en presencia de glicerol (A) y de metanol (B) como única fuente de carbono.	77
Figura 43. Secuencia génica y aminoacídica de la β-1,4- xilanasas, de <i>T. terrestris</i> NRRL8126, perteneciente a la familia 10 de las glicosilhidrolasas.	79
(continuación) Figura 43. Secuencia génica y aminoacídica de la β-1,4-xilanasas, de <i>T. terrestris</i> NRRL8126, perteneciente a la familia 10 de las glicosilhidrolasas.	80
Figura 44. A) Análisis electroforético de la producción de Cel7A de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1 en la fracción soluble de los cuerpos de inclusión diferentes transformantes de <i>E. coli</i> /pQE30- <i>cel7A</i> . B) Análisis electroforético de la producción de Cel7A de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1 en la fracción soluble de los cuerpos de inclusión de diferentes transformantes de células de <i>E. coli</i> /pET38b- <i>cel7A</i> .	81
Figura 45. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad celulolítica de Cel7A de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.	83

RESUMEN

Una xilanasa hipertermofílica y termoestable de 82 kDa, llamada TtXynA, fue purificada a partir del sobrenadante de cultivo del hongo *Thielavia terrestris* Co3Bag1, cultivado en CMC. La xilanasa TtXynA se caracterizó bioquímicamente, observando que su pH óptimo es de 5.5, y presenta más del 80% de su máxima actividad en un intervalo de pH de 4 a 8.5. TtXynA presenta una temperatura óptima de 85°C, y alta termoestabilidad a 70 y 65°C, mostrando una vida media de 3.9 h y de 23 días, respectivamente. Los ensayos de dicroísmo circular (DC) sugieren que la enzima gana estructura secundaria, conforme la temperatura aumenta. TtXynA mostró mayor afinidad y eficiencia catalítica hacia xilano de haya, en comparación con xilanos de abedul y de avena, y CMC. Los principales productos de hidrólisis del xilano de haya por TtXynA fueron xilopentosa, xilobiosa y xilosa, indicando que la enzima tiene actividad de tipo endo y exo.

Por otro lado, utilizando genética reversa, se obtuvo la secuencia completa del gen (*cel7A*) que codifica para la celulasa Cel7A, comprobando que la xilanasa TtXynA y la celulasa Cel7A, fueron co-purificadas. Asimismo, el gen *cel7A* se clonó en los vectores pET38b+ y pQE30 para su expresión inducible en *E. coli*; sin embargo, la enzima se agregó en cuerpos de inclusión, y no mostró actividad. Adicionalmente, el gen *cel7A* se clonó en los vectores pGAPzαA,B y pPICzαA,B, para su expresión constitutiva e inducible, respectivamente, en *P. pastoris*; pero la expresión de la enzima no fue del todo clara, debido a la presencia de actividad celulolítica endógena de la levadura, por lo que se hacen necesarios otros experimentos para confirmar la expresión de la enzima recombinante Cel7A en *P. pastoris*.

Por lo anterior, este trabajo describe la producción, purificación y caracterización bioquímica de la xilanasa TtXynA de *T. terrestris* Co3Bag1 con gran potencial para ser utilizada en procesos biotecnológicos llevados a temperaturas elevadas. Asimismo, se describe la clonación y evaluación de la expresión del gen que codifica para la celulasa Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1, que hasta este momento, no ha sido caracterizada bioquímicamente.

ABSTRACT

A hyperthermophilic and thermostable xylanase of 82 kDa (TtXynA) was purified from the culture supernatant of *Thielavia terrestris* Co3Bag1, grown on carboxymethyl cellulose (CMC), and characterized biochemically. The optimal pH of TtXynA is 5.5 and displays more than 80% of its maximal activity in a broad range of pH (4 -8.5). TtXynA showed its maximal activity at 85°C, and is highly thermostable with a half-life of 3.9 h and 23.1 days at 70 and 65°C, respectively. Circular dichroism spectra strongly suggest the enzyme gains secondary structures when temperature increases. TtXynA displayed higher substrate affinity and higher catalytic efficiency towards beechwood xylan than towards birchwood xylan, oat-spelt xylan, and CMC. According to its final hydrolysis products, TtXynA displays endo-/exo-activity, yielded xylose, xylobiose, and xylopentose on beechwood xylan.

On the other hand, using reverse genetics, the whole sequence *cel7A*, that encodes the cellulase Cel7A, was obtained. Therefore, it was confirmed that the xylanase TtXynA and the cellulase Cel7A were co-purified. Furthermore, *cel7A* was cloned in the vectors pET38b+ and pQE30, and the enzyme was produced in a recombinant manner using *E. coli* as expression system; however, Cel7A was produced as inclusion bodies and it did not show activity. Additionally *cel7A* was cloned in the vectors pGAPzαA,B and pPICzαA,B in order to produce the enzyme Cel7A using *P. pastoris* as heterologous expression system, constitutive and inducible way, respectively, but the expression of the enzyme was unclear, due to the endogenous cellulase activity of the yeast. Therefore, it is necessary carrying out more experiments to confirm if Cel7A was produced in *P. pastoris*.

Hence, this work represents the description of the production, purification and biochemical characterization of the xylanase TtXynA from *T. terrestris* Co3Bag1 with great potential for use it in biotechnological processes that are carried out at high temperatures. In addition, this work also describes the cloning and the assessment of the cellulase Cel7A gene expression from *T. terrestris* Co3Bag1, which has not been characterized, so far.

1. INTRODUCCIÓN

El xilano es el principal componente de las hemicelulosas presente en la pared celular de las plantas. Este es un heteroglicano compuesto de una cadena lineal de residuos de xilopiranosos unidos por enlaces β -1,4, con una variedad de sustituyentes unidos a la cadena principal por enlaces glicosídicos o ésteres. Estos sustituyentes, son principalmente, acetato, metilglucuronato y residuos de L-arabinofuranosa, y la cantidad de cada uno depende de la fuente del xilano (Chávez *et al.*, 2006). Para llevar a cabo su biodegradación, se hace indispensable un complejo de enzimas que actúan de manera sinérgica, conocidas como xilanasas, dentro de las cuales se encuentran: las endoxilanasas (E.C. 3.2.1.8), las β -xilosidasas (E.C. 3.2.1.37), las α -glucuronidasas (E.C. 3.2.1.139), las α -arabinofuranosidasas (E.C. 3.2.1.55) y las acetil-xilano esterasas (E.C. 3.1.1.72) (Subramaniyan & Prema, 2002; Baldrian & Valaskova, 2008).

Estas enzimas son de gran importancia industrial, pues se utilizan en la clarificación de jugos de frutas, en la producción de xilooligómeros, en la elaboración de alimento para aves de corral, en el bioblanqueamiento de la pulpa del papel y en la sacarificación de la biomasa vegetal, entre otras (Polizeli *et al.*, 2005).

En la naturaleza, las xilanasas son producidas por una gran variedad de microorganismos, incluidos bacterias y hongos, siendo de nuestro particular interés las enzimas producidas por hongos termófilos. Cervantes (2011) aisló 27 cepas de hongos con base en su capacidad de crecer a 45°C, y producir enzimas con actividad ligninolítica a esta temperatura, utilizando bagazo de caña como fuente de carbono. De estas cepas, la identificada como *Corynascus sepedonium* Co3Bag1, produjo una enzima con actividad de lacasa, la cual fue purificada y caracterizada, determinando que es una enzima acidófila, termofílica y termoestable (López-Olguín 2011). Cabe señalar, que posteriormente, con la actualización de las bases de datos, se volvió a identificar a esta cepa como *Thielavia terrestris* Co3Bag1, y es así como se indicará a lo largo de este documento.

Se considera al hongo *T. terrestris* como un microorganismo termófilo de gran interés para la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica y como una fuente de enzimas termoestables (Langston *et al.*, 2012). Asimismo, se ha reportado que la cepa 255B de este hongo, cultivado con xilana de avena, produce dos xilanasas (xilanasas I y II); la xilanasas II fue purificada y caracterizada bioquímicamente, presentando un pH óptimo de 3.6 – 4 y una temperatura óptima de 60 – 65°C, respectivamente (Gilbert *et al.*, 1992). Sin embargo, existe poco conocimiento de las propiedades bioquímicas de las xilanasas producidas por la cepa Co3Bag1.

Es por lo anterior, y dada la importancia industrial que presentan las enzimas con actividad xilanolítica, que el interés de este trabajo sea evaluar la capacidad que tiene *T. terrestris* Co3Bag1 de producir xilanasas termofílicas y termoestables, así como la purificación y caracterización bioquímica de alguna de ellas, para su posterior clonación y expresión en el sistema heterólogo de *Pichia pastoris*, lo cual nos lleve a profundizar en el conocimiento de este microorganismo como fuente de enzimas termofílicas y termoestables, que puedan servir a la mejora de los procesos industriales, en donde estas encuentren su aplicación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Composición de la hemicelulosa

La lignocelulosa es un material orgánico renovable y es el principal componente estructural de todas las plantas. Está constituida principalmente por tres componentes: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, asimismo, contiene cenizas, proteínas y pectina en pequeñas cantidades, lo cual varía dependiendo de la planta (Sánchez, 2009).

Las hemicelulosas se conforman por polímeros de carbohidratos, en los que se incluyen al xilano, xiloglucanos (heteropolímeros de D-xilosa y D-glucosa), glucomanos (heteropolímeros de D-glucosa y D-manosa), galactoglucomanos

(heteropolímeros de D-galactosa, D-glucosa y D-manosa) y arabinogalactanos (heteropolímeros de D-galactosa y arabinosa) (Collins et al., 2005).

El principal componente de las hemicelulasas es el xilano, este el segundo polisacárido más abundante de la naturaleza, representando aproximadamente un tercio del carbón orgánico renovable que existe sobre la Tierra (Collins *et al.*, 2005). El xilano se encuentra principalmente en la pared secundaria de la pared celular vegetal, y junto con la celulosa (β -1,4-glucanos) y lignina (un complejo de compuestos polifenólicos) interactúan entre sí mediante enlaces covalentes y no-covalentes, encontrándose al xilano en la interface entre la lignina y la celulosa, siendo importante para generar cohesión entre las fibras, brindándole así, integridad a la pared celular vegetal (Motta *et al.*, 2013).

2.2 Estructura y distribución del xilano

Los β -1,4-xilanos son heteropolisacáridos ramificados con una cadena principal formada por unidades de D-xilopiranosas unidas entre sí por enlaces β -1,4 (Kulkarni *et al.*, 1999). Las cadenas laterales pueden estar sustituidas por grupos glucuronopiranosilo 4-O-metil-D-glucuronopiranosilo, α -L-arabinofuranosilo, O-acetilo, feruloilo y/o *p*-cumaroilo (Collins *et al.*, 2005).

El xilano se distribuye en diversos tipos de tejidos y de células presentes en una variedad de especies de plantas, encontrándose en grandes cantidades en maderas duras de angiospermas (15 – 30% del contenido de la pared celular) y maderas suaves (7-10%), así como en plantas anuales (<30%). El xilano existe como O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano en las plantas con madera dura, y como arabino-4-O-metilglucuronoxilano en las maderas suaves, mientras que el tipo de xilano que se encuentra en los pastos y plantas anuales, son típicamente arabinoxilanos (Collins *et al.*, 2005). Existen ciertos xilanos sin ramificaciones que han sido reportados en el pasto esparto, el tabaco y en ciertas algas marinas; el xilano presente en estas últimas, contiene residuos de xilopiranosil unidos por enlaces β -1,3 y β -1,4 (Motta *et al.*, 2013).

De manera similar a otros polisacáridos, el xilano tiene una gran polidiversidad y polimolecularidad. El grado de polimerización de los xilanos es también variable, por ejemplo, en maderas duras y suaves, los xilanos se constituyen generalmente de 150-200 y de 70-130 residuos de β -xilopiranososa, respectivamente (Motta *et al.*, 2013).

2.3 Bioconversión del xilano

Debido a su naturaleza compleja y heterogénea, la completa hidrólisis del xilano requiere de la acción de una gran variedad de enzimas. Estas enzimas pueden clasificarse en dos grupos: aquellas que hidrolizan la cadena principal del xilano y aquellas que hidrolizan las cadenas laterales o ramificaciones que presenta este sustrato. La degradación de la cadena de xilosas se lleva a cabo por las endoxilanasas, las cuales hidrolizan los enlaces internos del polímero, mientras que las β -xilosidasas liberan unidades de xilosa a partir de xilobiosa y xilooligómeros. Por otro lado, la remoción de las cadenas laterales del xilano es catalizada por arabinofuranosidasas, glucuronidasas, acetil-xilano esterasas, ácido ferúlico esterasas y p-ácido cumárico esterasas (**Figura 1**) (Pastor *et al.*, 2007).

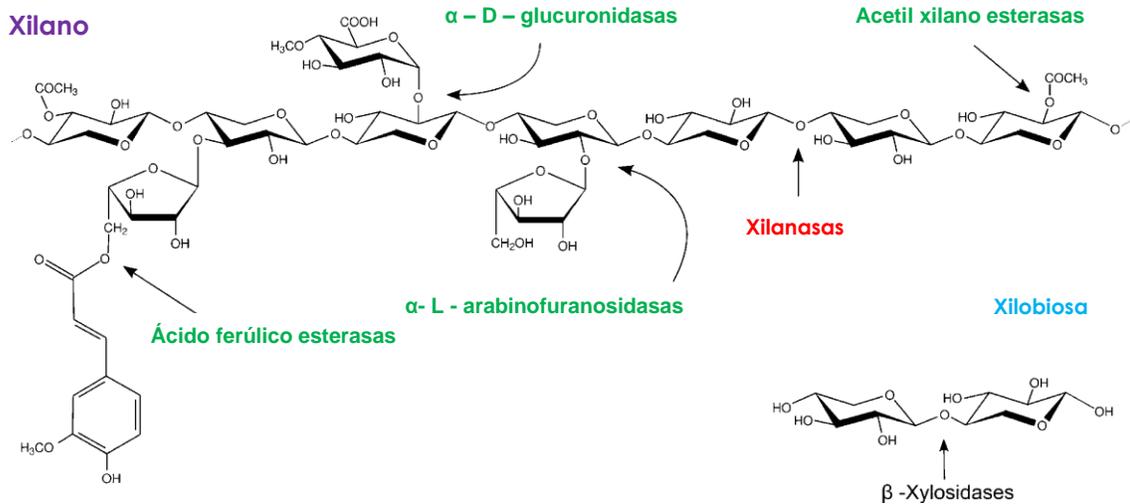


Figura 1. Estructura del xilano y los sitios de acción de las diferentes enzimas encargadas de su degradación.

2.4 Clasificación de las xilanasas

La naturaleza heterogénea y compleja del xilano conlleva a la existencia de una gran variedad de xilanasas con diferente especificidad de sustrato, secuencia primaria y plegamiento, lo cual ocasiona limitaciones en la forma de clasificar a estas enzimas considerando únicamente la especificidad por sustrato (Collins *et al.*, 2005). Wong *et al.*, hicieron una clasificación de las xilanasas en base a sus propiedades fisicoquímicas, agrupándolas principalmente en dos familias de las glicosilhidrolasas; en la familia 10, se encuentran las xilanasas que poseen un bajo peso molecular, menor a los 30 kDa, y un punto isoeléctrico alcalino, mientras que en la familia 11 se pueden encontrar a las xilanasas con un peso molecular mayor a los 30 kDa y un punto isoeléctrico ácido. Sin embargo, se encuentran varias excepciones, como son las xilanasas de origen fúngico, las cuales no pueden ser clasificadas por este sistema (Collins *et al.*, 2005).

Posteriormente, se introdujo un sistema de clasificación más completo (Henrissat *et al.*, 2001), el cual permite clasificar tanto a xilanasas como a glicosidasas, basado en la comparación de la estructura primaria de los dominios catalíticos y que agrupa a las enzimas en familias de acuerdo a la relación que guarden entre sus secuencias.

Las enzimas agrupadas en una familia en particular, comparten estructuras tridimensionales y mecanismos moleculares parecidos, sugiriendo que estas podrían tener especificidades similares de acción sobre sustratos de diferentes características (Henrissat *et al.*, 2001). A pesar de las similitudes estructurales, varias familias muestran un amplio grado de diversidad, ya que una misma familia puede contener enzimas provenientes de bacterias, hongos, plantas y animales, con diferentes actividades y especificidad de sustrato. Por otro lado, una misma actividad puede ser encontrada en diferentes familias. Información actualizada de las características y clasificación de estas enzimas puede encontrarse en la base de datos CAZy (www.cazy.org), y de acuerdo con esta, las xilanasas (EC 3.2.1.8) guardan relación con las familias 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 y 62 de las glicosilhidrolasas (GH). Sin embargo, las secuencias clasificadas en las familias 16, 51 y 62, parecen ser enzimas bifuncionales que contienen dos dominios catalíticos, nada parecido a las familias 5, 7, 8, 10, 11 y 43, las cuales tienen un dominio catalítico con actividad de endo-1,4- β -xilanasas. Utilizando el mismo análisis, las familias 9, 12, 26, 30 y 44 podrían tener actividad xilanolítica residual o secundaria (Motta *et al.*, 2013).

2.5 Mecanismos catalíticos de las glicosilhidrolasas

Dos mecanismos diferentes para catalizar la hidrólisis de los enlaces glicosídicos son utilizados, el mecanismo de retención y el de inversión.

2.5.1 Mecanismo de retención

En este mecanismo se mantiene la configuración del carbono anomérico (C1) del sustrato después de la hidrólisis, por medio de un mecanismo de doble desplazamiento (**Fig. 2A**). En el primer paso, uno de los dos grupos carboxílicos del sitio catalítico actúa como un ácido, mientras que el segundo grupo carboxílico realiza un ataque nucleofílico, generando un intermediario enzima-glicosilo (E-G). En el segundo paso, el primer carboxilato ahora funciona como una base general que

activa a un nucleófilo entrante (una molécula de H₂O) al extraer un protón de esta. Este nucleófilo activo, hidroliza así el intermediario E-G, reteniendo la configuración del carbono anomérico del sustrato (Sandgren *et al.*, 2005).

2.5.2 Mecanismo de inversión

El mecanismo de inversión de las glicosilhidrolasas genera la inversión de la configuración del carbono anomérico (C1) del sustrato después de la hidrólisis, es decir, que la hidrólisis del enlace β -glicosídico resulta en un producto con la configuración α , y viceversa. El corte es llevado a cabo por un ataque nucleofílico. La maquinaria catalítica de estas enzimas también involucra a dos grupos carboxilos (Fig. 3B). De estos carboxilos uno actúa como un ácido, mientras que el otro actúa como una base. Una molécula de H₂O sufrirá un ataque nucleofílico por el segundo grupo carboxilo (base), generando la hidrólisis e inversión del enlace glicosídico (Sandgren *et al.*, 2005).

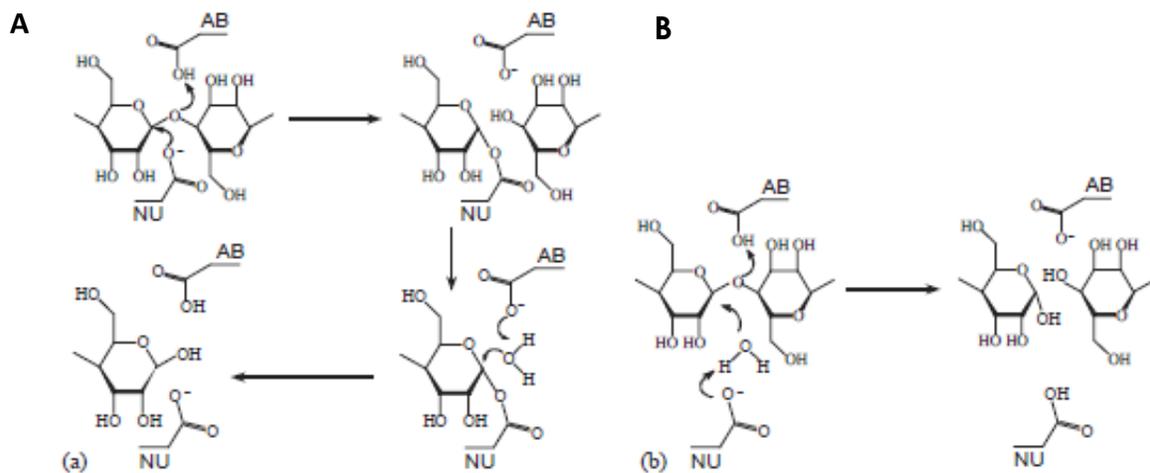


Figura 2. Mecanismo catalítico de las glicosilhidrolasas. A: Mecanismo de retención; B: Mecanismo de inversión

2.6 Aplicaciones industriales de las xilanasas

Las xilanasas encuentran su aplicación en diversos procesos como son: la bioconversión de la materia lignocelulósica y desechos agrícolas en productos fermentativos, en la clarificación de jugos, en la mejora de la consistencia de la cerveza y en la mejora de la digestibilidad del alimentos de ganado y aves de corral, entre otras, siendo la aplicación biotecnológica más importante para estas enzimas, en el proceso de bioblanqueamiento de la pulpa y el papel (Motta *et al.*, 2013). En la siguiente tabla se muestra un resumen de las diferentes aplicaciones que estas enzimas encuentran en diferentes industrias.

Tabla 1. Aplicaciones industriales de las xilanasas.

Industria	Aplicaciones
Papelera	Remoción de lignina , materia orgánica colorida y otros residuos indeseables en las fibras, ayudando en el proceso del bioblanqueamiento de la pulpa del papel, reduciendo la utilización de compuestos clorados, dañinos al medio ambiente
Agricultura	Favorecen el proceso de germinación de las semillas
Bioconversión	Conversión de material lignocelulósico a etanol y otros solventes; también para la producción de xilitol a partir de xilosa.
Fermentación	Mejora el proceso de malteado y macerado; mejora el color y el proceso de extracción del jugo de uva; mejoran el aroma de los vinos; mejoran la fermentación primaria y calidad de la cerveza; mejora el proceso de clarificación del vino
Alimentos	Clarificación de jugos de frutas y de vinos; mejora la textura y calidad de los productos de panadería; ayuda a controlar la acidez de los frutos cítricos.
Ganadera	Mejora la calidad de alimento para ganado y aves de corral, favorece una mejor digestión y absorción de los nutrientes.
Farmacéutica	En la producción de xilooligosacáridos
Textil	Ayuda en dar el aspecto de deslavado a la mezclilla; mejora la calidad, estabilidad y propiedad absorbente de las telas; remueve el exceso de colorante de las telas y restaura el brillo del color de las mismas.

Polizeli *et al.*, 2005; Motta *et al.*, 2013

2.7 Xilanasas fúngicas de fuentes mesófilas y termófilas

Con las aplicaciones comerciales de las xilanasas, surge la necesidad de identificar y purificar enzimas altamente estables bajo diversas condiciones de operación. Ventajas como la reducción al riesgo de contaminación y elevadas velocidades de reacción, han sido propuestas para el uso de termófilos en los procesos biotecnológicos. En general, los parámetros como pH y estabilidad química y enzimática, son importantes para denotar la aplicabilidad que tiene cualquier enzima (Kulkarni *et al.*, 1999). Es por esto que la investigación de microorganismos que utilizan xilano, tiende a ser cada vez más relevante en términos económicos y ecológicos, siendo los hongos filamentosos de particular interés, ya que ellos secretan las enzimas al medio y presentan niveles enzimáticos mucho mayores a los mostrados por bacterias y levaduras, además de que producen varias enzimas auxiliares requeridas para la degradación completa del xilano (Motta *et al.*, 2013; Polizeli *et al.*, 2005). En este aspecto, las xilanasas son sintetizadas por hongos mesófilos y termófilos (Smith *et al.*, 1991). Entre los hongos mesófilos, los pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma* son los predominantes en la producción de xilanasas; dentro de los hongos termófilos se incluyen a *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola grisea*, *Melanocarpus albomyces*, *Paecylomyces variotii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces emersonii*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris* (Polizeli *et al.*, 2005; Berka *et al.*, 2011). Las xilanasas de estos hongos poseen temperaturas óptimas de entre 60 y 80°C, siendo muy estables en ese intervalo de temperaturas. Asimismo, estas enzimas son usualmente glicoproteínas que generalmente, muestran su mayor actividad en pH ácidos de 4.5 a 6.5 (Polizeli *et al.*, 2005).

Varias endoxilanasas provenientes de organismos termófilos, comparten cierta homología estructural con aquellas provenientes de mesófilos, y varios autores han intentado explicar la termoestabilidad. Hakulinen *et al.* (2003) describe algunas de las posibles modificaciones responsables del incremento en la termoestabilidad de las xilanasas: 1) Mayor proporción en el contenido de Tre/Ser; 2) incremento en el

número de residuos cargados, especialmente la Arg, resultando en un aumento de interacciones polares; y 3) mejora en la estabilización de las estructuras secundarias, lo que involucra a un mayor número de residuos en las cadenas β , y estabilizando a las α -hélices. Asimismo, algunas xilanasas mejoran su estabilidad al compactar la estructura proteica con un alto número de residuos iónicos o aromáticos sobre la superficie de la proteína, generando un aumento de las interacciones. Sin embargo, no se ha llegado a una conclusión en específico, debido a que ciertos fenómenos que se presentan en algún organismo no necesariamente se presentan en otro (Polizeli *et al.*, 2005).

2.8 Clonación y expresión de xilanasas fúngicas

Debido a que los hongos están considerados como mejores productores de enzimas xilanolíticas a comparación de bacterias y levaduras, la producción a gran escala de las xilanasas se ha facilitado con la llegada de la ingeniería genética. Recientes avances en el área de la genómica han ayudado a resolver los problemas como son la disponibilidad limitada de la enzima de interés, en el ámbito del sustrato y en la estabilidad operacional (Ahmed *et al.*, 2009). Debido a la importancia industrial que tienen las xilanasas, un número significativo de genes que codifican para esta actividad han sido estudiados, clonados y expresados tanto en hospederos homólogos como heterólogos con el objetivo de aumentar la cantidad de enzima producida, llevar a cabo mejoras en la utilización del sustrato y otras propiedades comercialmente útiles (Chand y Mishra, 2003; Ahmed *et al.*, 2009). Dentro de los sistemas de expresión homólogos podemos mencionar a varias especies como son *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *Trichoderma reesei* y *Cochiobolus carbonum*; como ejemplos de hospederos heterólogos se tienen a *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia stipitis*, entre otros (Ahmed *et al.*, 2009).

2.8.1 *P. pastoris* como hospedero en la expresión de xilanasas fúngicas

Pichia pastoris es capaz de realizar varias modificaciones postraduccionales que se llevan a cabo en eucariontes, por lo que se considera un excelente sistema de expresión de proteínas heterólogas (Cheng *et al.*, 2005). Asimismo, la expresión en este sistema tiene varias ventajas sobre *S. cerevisiae*, como sistema de expresión, debido a que presenta una alta eficiencia en la secreción de la proteína, se alcanzan altas densidades celulares utilizando medios de cultivo baratos, además de que se puede realizar el escalamiento del proceso industrial con relativa facilidad (Cregg, 1999; Berrin *et al.*, 2000). Otra característica que hace particularmente atractiva a *P. pastoris* como sistema de expresión, es la disponibilidad de promotores fuertes inducibles involucrados en el metabolismo del metanol (Gellissen, 2000; Tsai y Huang, 2008; Ahmed *et al.*, 2009).

2.8.1.1 El uso de promotores para la expresión de xilanasas recombinantes en *P. pastoris*

P. pastoris es una levadura metilotrófica, y las enzimas involucradas en el metabolismo del metanol están presentes en niveles sustanciales cuando las células se cultivan en este compuesto como única fuente de carbono (Cereghino y Cregg, 2000). La alcohol oxidasa (AOX) es la enzima que cataliza el primer paso de la vía de la utilización del metanol, y está codificada por dos genes en *P. pastoris*: AOX1 y AOX2. El gen AOX1 es el que provee la mayoría de la actividad de AOX en la célula (Cregg *et al.*, 1989), y el promotor de AOX1 ha sido elegido por varios investigadores para expresar diferentes genes de xilanasas en *P. pastoris*, ya que altos niveles de expresión han sido observados al inducir el cultivo con metanol. Como ejemplo, Ruanglek *et al.*, (2007) alcanzaron una actividad enzimática de 3,676 U/ml al expresar a *xyIB* de *A. niger* bajo el control del promotor AOX1 en *P. pastoris*, de hecho este es la mayor actividad xilanólítica alcanzada, de cualquier xilanasas recombinante expresada en *P. pastoris*, reportada hasta el momento.

Sin embargo, este promotor no es el más adecuado en ciertas aplicaciones industriales. Por ejemplo, no es apropiado el uso de metanol en la inducción de genes cuyos productos son utilizados en la industria alimentaria debido a su alta toxicidad, además de que el uso de metanol puede favorecer incendios en un proceso de fermentación que se lleve a gran escala (Ahmed *et al.*, 2009). Es por ello, que el promotor constitutivo del gen *GAP* que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, ha sido empleado exitosamente para la expresión de xilanasas en *P. pastoris* por algunos autores (Lee *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2007), obteniendo un incremento en la expresión de XynB, de hasta 50 veces, al compararla con la expresión obtenida en el hospedero nativo *A. niger* (Deng *et al.*, 2006).

2.8.1.2 Vectores de expresión para *P. pastoris*

Los vectores de expresión utilizados en *P. pastoris* contienen orígenes de replicación de *E. coli* y *P. pastoris*, para que en ambos hospederos los vectores puedan ser replicados (Cereghino y Cregg, 2000). pPICzαA es el vector de elección de muchos investigadores, el cual contiene el promotor *AOX1* fuertemente regulado y al factor-α de *S. cerevisiae* como señal de secreción (Ruanglek *et al.*, 2007). En contraste, los genes expresados bajo el promotor constitutivo *GAP* suelen ser clonados en el vector pGAPzαA (Deng *et al.*, 2006). Existe otro vector, el pPIC9, el cual contiene al promotor *AOX1*, la secuencia que codifica para el péptido señal α-M y al marcador de selección HIS4 (Wakiyama *et al.*, 2008).

2.8.1.3 Secreción de xilanasas recombinantes expresadas en *P. pastoris*

La secreción de proteínas heterólogas al medio de cultivo favorece la purificación de la proteína para su posterior uso. Los niveles de secreción de proteínas endógenas en *P. pastoris* son muy bajos. En los vectores de expresión de *P. pastoris*, la señal de secreción es añadida en el extremo N-terminal de las proteínas expresadas en la levadura. El factor de apareamiento alfa (α-MF) de *S. cerevisiae*, es la señal de

secreción ampliamente utilizada en estos vectores. α -MF consiste de una (pre)secuencia de 19 aminoácidos, seguida de una (pro)secuencia formada por 66 aminoácidos, en la cual se ubican tres sitios de N-glicosilación y un sitio de procesamiento para la endopeptidasa Kex2 (Kurjan & Herskowitz, 1982; Ahmed *et al.*, 2009).

2.8.1.4 Características de las xilanasas recombinantes expresadas en *P. pastoris*

Las xilanasas recombinantes expresadas en *P. pastoris*, generalmente exhiben características similares e incluso, mejoradas de sus contrapartes nativas, por lo que esta levadura sirve como un excelente hospedero mesófilo para la expresión de xilanasas termofílicas (Ahmed *et al.*, 2009). Por ejemplo, una xilanasa termoestable de *Thermomyces lanuginosus* expresada en *P. pastoris* mostró características termoestables similares comparada con la enzima nativa (Damaso *et al.*, 2003). Asimismo, las xilanasas expresadas por el grupo de trabajo de Cheng *et al.*, (2005) mostraron elevada temperatura óptima de actividad y termoestabilidad. La xilanasa recombinante de *Thermomonospora fusca* también mostró una mayor temperatura óptima de actividad, sin embargo fue menos estable que la enzima nativa (Sun *et al.*, 2007).

2.9 Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*

E. coli es uno de los hospederos mayormente utilizados para la producción de proteínas heterólogas (Demain & Vaishnav, 2009). Entre las ventajas que este microorganismo brinda como hospedero están: mayor velocidad específica de crecimiento que las levaduras y células de mamíferos, fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento a diferencia de las células de organismos superiores y la existencia de gran variedad de vectores de expresión estables (García *et al.*, 2013).

La limitación principal de utilizar *E. coli* como sistema de expresión, es que no secreta la proteína eficientemente. Sin embargo, la sobreexpresión recombinante de enzimas utilizando a esta bacteria como hospedero, facilita el realizar ingeniería de las mismas, mediante mutagénesis dirigida, para llevar a cabo estudios de la relación estructura-función, así como para el mejoramiento de sus propiedades catalíticas (Ahmed *et al.*, 2009).

Respecto a las xilanasas fúngicas producidas en *E. coli*, la mayoría de las veces, se acumulan en el citoplasma o periplasma de la bacteria, sin embargo, se ha reportado actividad extracelular (Ahmed *et al.*, 2009). Basaran *et al.*, (2001) expresaron una β -xylanase de *Pichia stipitis* bajo el control de su propio promotor, pero la actividad de la enzima fue significativamente más baja (4 U mg^{-1}) al compararla con la actividad de la cepa silvestre (30 U/mL). A pesar de esto, también se han reportado niveles de producción más altos, utilizando sistemas de expresión del vector pET (Ahmed *et al.*, 2009). Zhou *et al.*, (2008) clonaron el cDNA del gen *xynIII* de *Aspergillus usarii* en el vector de expresión pET-28a(+) obteniendo una actividad máxima de 49.4 U/mg presente en el extracto crudo. Asimismo, el gen de una β -xylanase, *xyn2*, de *T. reesei* fue también expresado, utilizando el vector de expresión pET obteniendo una producción de la enzima de hasta 659 U/mg (Jun *et al.*, 2008).

3. ANTECEDENTES

En los últimos años, las enzimas termofílicas han ganado gran interés biotecnológico, debido a la facilidad con la que se pueden adecuar a procesos industriales que se llevan bajo condiciones extremas, además de poseer características relevantes que incluyen: una rápida cinética de reacción, buena transferencia de masa, reducen el riesgo de contaminación, e incrementan la posibilidad de ser recicladas (Turner *et al.*, 2007; Viikari *et al.*, 2007). De ahí, que el uso de tales enzimas para maximizar las reacciones necesarias en la industria alimentaria y del papel, en la manufactura de detergentes y de medicamentos, así como en la eliminación de residuos tóxicos y en la extracción del petróleo, está siendo estudiado extensivamente (Haki & Rakshit,

2003). Estas enzimas pueden ser producidas por microorganismos termotolerantes que pueden crecer de 37 a 45°C, o termófilos que pueden crecer de 45 a 80°C, dentro de los cuales se pueden encontrar algunas especies de hongos (Li *et al.*, 2005).

Por lo anterior, Cervantes en 2011 aisló 27 cepas de hongos con base en su capacidad de crecer a 45°C y producir enzimas con actividad ligninolítica a esta temperatura, utilizando como única fuente de carbono bagazo de caña. De estas 27 cepas, las denominadas como Co1Bag1 y Co3Bag1 presentaron mayor actividad de lacasa, de 212 y 738 U/L, respectivamente. Asimismo, presentaron actividad de manganeso peroxidasa al realizar una fermentación en estado sólido. En el mismo año, López-Olguín identificó a las cepas Co1Bag1 y Co3Bag1 como *Aspergillus fumigatus* y *Corynascus sepedonium*, respectivamente. Asimismo, purificó y caracterizó bioquímicamente una lacasa (Lac97) producida por *Corynascus sepedonium* Co3Bag1, y determinó que es una enzima acidófila, termotolerante y termoestable. Sin embargo, en el 2014 y con la actualización de las bases de datos, se volvió a identificar a la cepa Co3Bag1, como *Thielavia terrestris* Co3Bag1.

En la literatura, se ha reportado al hongo termófilo *T. terrestris* como un organismo de gran interés para la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica y como fuente de enzimas termoestables (Langston *et al.*, 2012), por lo que se secuenció el genoma de *T. terrestris* NRRL8126 y se comparó con el de *Myceliophthora thermophila*; adicionalmente, en este estudio ambos hongos se cultivaron en rastrojo de alfalfa, de cebada, y en glucosa, de manera separada, reportando la identidad de varias proteínas encontradas en ambos secretomas, y se midieron los niveles de expresión de los genes que codifican para cada una de estas proteínas, bajo las diferentes fuentes de carbono evaluadas (Berka *et al.*, 2011). Por otro lado, ya había sido reportado que *T. terrestris* 255B produce principalmente dos xilanasas (xilanasas I y xilanasas II) cuando es cultivado en xilano de avena, asimismo, purificaron y caracterizaron bioquímicamente a la xilanasas II de este hongo, la cual mostró una actividad óptima en valores de pH de 3.6 y 4, y de temperatura de 60 a 65°C (Gilbert *et al.*, 1992). A pesar de los estudios realizados, aún se sabe muy poco acerca de la

actividad xilanolítica producida por el hongo *T. terrestris*, y existen pocos reportes al respecto. Además, se desconocen las propiedades bioquímicas que presentan las enzimas xilanolíticas producidas por la cepa Co3Bag1. De ahí, el interés que se tiene en la purificación y caracterización bioquímica de una xilanasa producida por *T. terrestris* Co3Bag1 para su posterior expresión en *P. pastoris*.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que las xilanasas tienen varias aplicaciones en diversas industrias, se hace necesario el aislamiento y clonación de nuevos genes que codifiquen para enzimas con actividad xilanolítica que sean activas en varias condiciones de operación, buscando así, el mejoramiento de los procesos industriales en donde estas enzimas sean aplicadas.

5. HIPÓTESIS

Este trabajo consta de dos hipótesis, las cuales son:

H1: Al ser *Thielavia terrestris* Co3Bag1 un organismo termófilo, será capaz de producir xilanasas termofílicas y termoestables.

H2: La expresión heteróloga de una xilanasa termofílica de *Thielavia terrestris* Co3Bag1, facilitará la obtención de mayor cantidad de la enzima catalíticamente activa, conservando las propiedades bioquímicas de la enzima nativa.

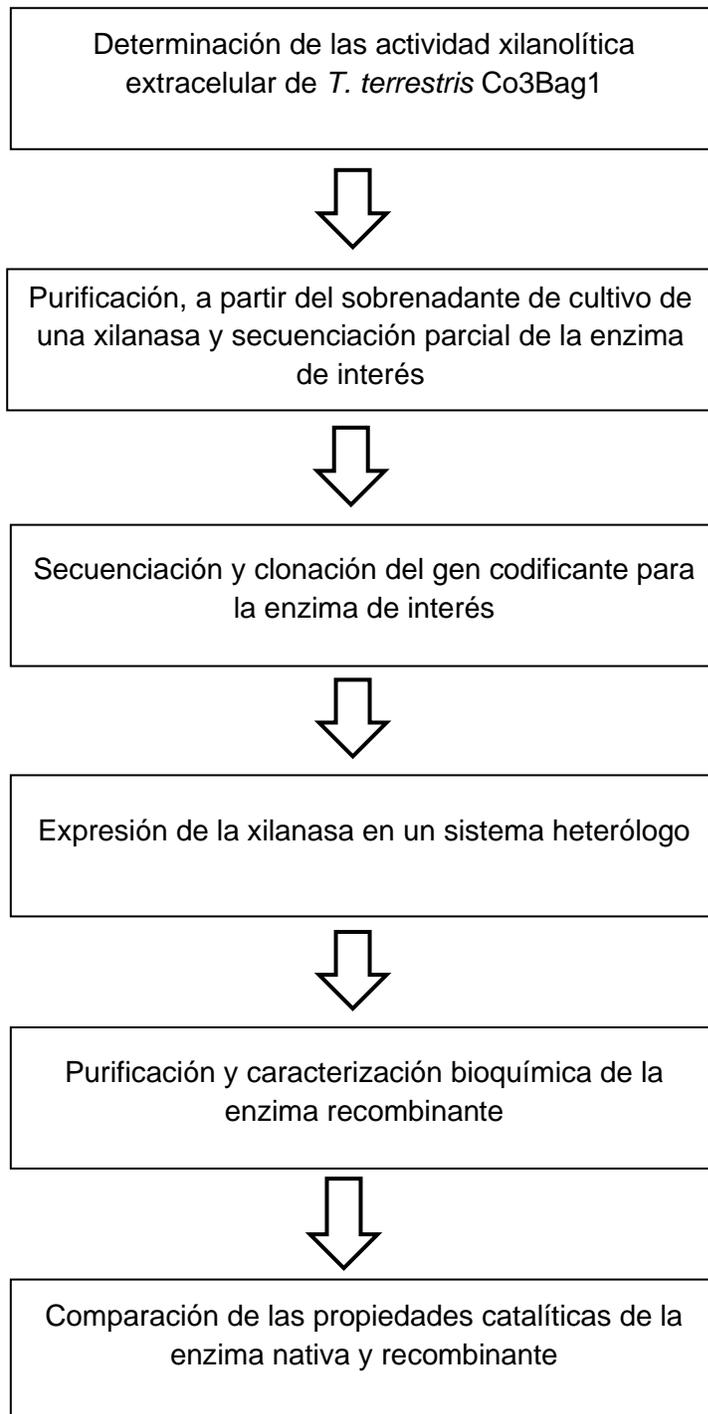
6. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar bioquímica y molecularmente una xilanasa proveniente de *Thielavia terrestris* Co3Bag1

6.1 Objetivos específicos

- Evaluar la actividad xilanolítica de *T. terrestris* Co3Bag1
- Purificar y caracterizar una xilanasa de *T. terrestris* Co3Bag1
- Clonar y expresar el gen codificante para la xilanasa de interés en un sistema heterólogo
- Determinar las propiedades bioquímicas de la xilanasa recombinante y compararlas con las de la enzima nativa.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cinética de crecimiento y de actividad xilanolítica de *T. terrestris* Co3Bag1

Para la obtención de esporas, el hongo se cultivó a 45°C durante cinco días, en el medio Tien & Kirk (1988), el cual contiene (g/L) glucosa 10; extracto de levadura 2; peptona de caseína 2; extracto de malta 10; asparagina 1; KH₂PO₄ 2; MgSO₄·7H₂O 1. Para realizar las cinéticas de crecimiento y actividad xilanolítica se emplearon 20 matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio basal Zouari-Mechichi, *et al.*, (2006), el cual contiene (g/L): peptona 5; extracto de levadura 1; tartrato de amonio 2; KH₂PO₄ 1; MgSO₄ 7H₂O 0.5; KCl 0.5. Este medio basal se suplementó con 1 ml of solución de elementos traza, y con 1% de carboximetilcelulosa (CMC) o 1% de xilano de abedul. Cada uno de los matraces se inocularon con 1x10⁶ esporas de *T. terrestris* Co3Bag1 y se incubaron durante diez días a 45°C, con agitación de 120 rpm. Cada 24 h a dos matraces se les determinó la biomasa, por peso seco, y la actividad xilanolítica.

8.2 Determinación de la biomasa de *T. terrestris* Co3Bag1 por peso seco

El crecimiento del hongo se determinó mediante la técnica de peso seco, para lo cual se sacrificó un matraz de 125 ml con 50 ml de cultivo, la biomasa se separó del sobrenadante mediante filtración, utilizando papel filtro previamente pesado y puesto a 60°C durante 24 h. Los papeles filtro con biomasa, se incubaron a 60°C por 48 h y se registró el peso. Por diferencia de peso se calculó el peso seco de la biomasa obtenida a diferentes tiempos de la fermentación. Cabe señalar que estos experimentos se realizaron por duplicado.

8.3 Determinación de la actividad xilanolítica de *T. terrestris* Co3Bag1 y análisis zimográfico

La actividad xilanolítica se determinó rutinariamente, a menos que se indique de otra forma, como se describe a continuación: se añadieron 50 µl del extracto enzimático a 950 µl de una solución al 0.3% de xilano de haya disuelto en 50 mM de amortiguador

de citratos pH 5.5. Después de 15 min de incubación a 85°C, se cuantificó la cantidad de azúcares reductores liberados por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1956), utilizando xilosa como estándar. Los resultados se expresan como el promedio \pm la desviación estándar del experimento realizado por triplicado. Una unidad de actividad xilanólítica fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcares reductores por minuto. El análisis por zimograma de la actividad xilanólítica del hongo se llevó a cabo en un SDS-PAGE 10% conteniendo 0.1% de azul brillante de remazol acoplado a xilano de abedúl (RBB-xilano), como se describió previamente por Schwarz *et al.*, (1987).

8.4 Análisis electroforético (SDS-PAGE) y determinación de proteína

Las diferentes fracciones de proteína se analizaron electroforéticamente con geles de poliacrilamida al 12% de acuerdo al método de Laemmli, 1970. Las proteínas se visualizaron en el gel al teñirlo con azul brillante de Coomassie R-250. El peso molecular de las proteínas se estimó, tomando como referencia los pesos del marcador de peso molecular (BioRad). Los geles se analizaron utilizando un sistema de fotodocumentación DigiDoc-It Imaging System, UVP. La concentración de proteína se determinó por el método descrito por Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino (BSA de Pierce) como estándar.

8.5 Purificación de una xilanasa producida por *T. terrestris* Co3Bag1

Para producir a la enzima, un total de veinte matraces Erlenmeyer de 125 ml de volumen nominal conteniendo 50 ml del medio Zouari-Mechichi *et al.*, (2006), suplementado con 1% de CMC como fuente de carbono, fueron inoculados con 1×10^6 esporas, cada uno; se incubaron por diez días a 45°C y 120 rpm. El cultivo se filtró para separar el micelio del sobrenadante y la proteína total presente en este último se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% de saturación, toda la noche a 4°C. Posteriormente, la proteína precipitada se recuperó por centrifugación (8500 rpm, 4°C, 20 min) y se resuspendió en 5 ml de amortiguador de citratos 50 mM, pH 5.5. Después, se dializaron 3 ml del precipitado contra el amortiguador A (25 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5% glicerol, 1 mM PMSF), durante toda la noche a 4°C; la

proteína dializada se cargó en una columna de intercambio catiónico (UNOsphere S de BioRad) conectada en serie a una columna de intercambio aniónico (UNOsphere Q de BioRad), previamente equilibradas con el amortiguador A. Las proteínas adsorbidas se eluyeron al aplicar un gradiente lineal de KCl (25 mM – 1 M) y un flujo constante de 2 ml/min. Se recolectaron fracciones de 2 ml y se analizaron por electroforesis en geles de acrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 12%. Posteriormente, las fracciones con la mayor actividad xilanólítica se reunieron y se concentraron tres veces con un centrífugo de polietersulfona, cuya membrana tiene un corte molecular de 10 kDa (Pall®). De este concentrado, se tomaron 2 ml y se cargaron a una columna de filtración en gel (Bio-Gel® P-100) de 60 ml de volumen de empaque, equilibrada con el amortiguador A. La cromatografía de filtración en gel se llevó a cabo a un flujo constante de 0.25 ml/min, y las fracciones colectadas fueron de 1 ml. Las fracciones que mostraron actividad xilanólítica se analizaron por SDS-PAGE, utilizando geles al 12%, y las fracciones con la enzima purificada se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

8.6 Determinación de carbohidratos en TtXynA

Para detectar la presencia de carbohidratos, las preparaciones proteicas se separaron por SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida al 10%. Posteriormente, los geles se tiñeron con el reactivo de Schiff, siguiendo la metodología descrita por Segrest y Jackson (1972). Asimismo, se cuantificaron los carbohidratos totales, presentes en la enzima purificada, por el método de la antrona (Dimler *et al.*, 1952).

8.7 Desglicosilación de TtXynA

Para desglicosilar a la xilanasa TtXynA, se utilizó el kit Protein deglycosilation Mix de Biolabs®, siguiendo las indicaciones del proveedor, bajo condiciones desnaturalizantes. Los productos de la desglicosilación se analizaron por SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida al 10%.

8.8 Determinación del pH óptimo de actividad y estabilidad al pH de TtXynA

Para determinar el pH óptimo de TtXynA, la actividad enzimática de la enzima pura se determinó a diferentes valores de pH, desde 3 hasta 10.5, utilizando amortiguador de citratos-fosfatos 50 mM (pH 3 – 7); amortiguador de citratos 50 mM (pH 4 – 6); amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 6 – 8) y amortiguador de Gly-NaOH 50 mM (8.5 – 10.5). Cada amortiguador contenía 0.3% de xilano de haya como sustrato. La reacción se incubó 15 min a 70°C y los azúcares liberados se cuantificaron por el método de Miller (1956).

Para determinar la estabilidad al pH, la enzima pura se incubó durante 2 h a 25°C, a diferentes valores de pH desde 4 a 9; se utilizó el amortiguador de Citratos 50 mM (pH 4 – 6); el amortiguador de Fosfatos 50 mM (pH 7 – 8) y el amortiguador de Gly-NaOH 50 mM (pH 9). Después del tiempo de incubación, la actividad residual de TtXynA se determinó bajo las condiciones óptimas.

8.9 Determinación de la temperatura óptima de actividad y termoestabilidad de TtXynA

La temperatura óptima se determinó al medir la actividad de TtXynA pura, en el amortiguador de citratos 50 mM, pH 5.5 conteniendo 0.3% de xilano de haya, en el intervalo de 65 a 90°C con incrementos de 5°C, durante 15 min. Para determinar la termoestabilidad de TtXynA, la enzima se incubó a 85°C, 75°C y 65°C en el amortiguador de Citratos 50 mM, pH 5.5, sin sustrato. Se tomaron alícuotas de 50 µl a diferentes intervalos de tiempo, y la actividad residual se determinó bajo condiciones estándar. El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de TtXynA para cada temperatura se determinó utilizando el método gráfico.

8.10 Determinación de los parámetros cinéticos y afinidad por sustrato

El efecto de la concentración de diferentes sustratos como son el xilano de haya, xilano de abedul, xilano de avena, CMC y Avicel sobre la actividad de TtXynA fue evaluada bajo las condiciones óptimas (85°C, pH 5.5 y 15 min). La velocidad máxima

(V_{max}) y la constante de afinidad (K_M) fueron estimadas por el método de Lineweaver-Burk y la k_{cat} para cada sustrato se calculó con los datos obtenidos de la cinética enzimática correspondiente.

8.11 Efecto de los iones metálicos y el EDTA sobre la actividad de TtXynA

Se evaluó el efecto que tiene la presencia de diferentes iones metálicos (Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2}) y del EDTA⁺, a concentraciones de 1 y 5 mM, sobre la actividad de TtXynA, bajo las condiciones óptimas (85°C, pH 5.5 y 15 min). Los resultados se expresaron como el porcentaje de la actividad relativa de la enzima en presencia del compuesto respecto a la actividad de la enzima sin ningún aditivo.

8.12 Determinación de los productos de hidrólisis de TtXynA

Para determinar los productos de hidrólisis de TtXynA, se incubaron 3.2 U de la enzima pura a 65°C en amortiguador de citratos 50 mM, pH 5.5 conteniendo 1% xilano de haya. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se analizaron por cromatografía de capa fina (TLC). Se cargaron alícuotas de 2 μ l de cada muestra en la placa de sílica gel y se fraccionaron en un sistema de solventes de butanol-etanol-agua (50:30:20 v/v). Posteriormente, la placa se asperjó con una solución de H₂SO₄ 15% (v/v) y se calentó a 90°C hasta que las manchas de los carbohidratos fueron visibles. Se utilizaron como estándares xilosa, xilobiosa, xilotreosa y xilohexosa, a una concentración de 3 mg/ml cada uno.

8.13 Dicroísmo circular de TtXynA variando la temperatura

Utilizando un espectropolarímetro Jasco J-815, se obtuvieron los espectros del UV-lejano a diferentes temperaturas, desde 25 a 90°C con incrementos de 5°C, en una longitud de onda de 210-250 nm, utilizando una celda de 0.1 cm de paso de luz; la temperatura se reguló empleando un sistema Peltier. Todas las muestras se prepararon a una concentración de 0.18 g/ml de TtXynA pura, disuelta en amortiguador de citratos 5 mM, pH 5.5. Asimismo, se obtuvieron las curvas de desnaturalización térmica de TtXynA a 230 nm, y a 220 nm para la proteína control

Xyn11A_{AOX} (Cayetano *et al.*, 2016); la señal de Dicroísmo Circular para cada una de las proteínas se monitoreó de manera continua, mientras la muestra se calentaba de 25 a 85°C a una velocidad de 2°C/min. Los datos de Dicroísmo Circular se reportaron como el valor promedio de la elipticidad de la proteína $[\theta]_{MRW}$. El gráfico mostrado de la señal de Dicroísmo Circular, es el promedio de cinco espectros tomados a la condición evaluada.

8.14 Identidad de TtXynA

La enzima purificada se secuenció parcialmente utilizando la técnica de cromatografía líquida, acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), servicio provisto por la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM) y por la Unidad de Proteómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

8.15 Extracción del RNA total de *T. terrestris* Co3Bag1

Para la obtención del RNA total del hongo, se inocularon 50 ml de medio de cultivo Zuoari-Mechichi, suplementado con 1% de CMC, como fuente de carbono, con 1×10^6 esporas de *T. terrestris* Co3Bag1. El cultivo se incubó por 48 horas a 45°C, 120 rpm. Después de este tiempo, el cultivo se centrifugó en frío a 8500 rpm por 20 min, se descartó el sobrenadante y el micelio se lavó con 50 ml de solución salina isotónica estéril (NaCl al 0.85%); al micelio se le agregó N₂ líquido y se le maceró. Se almacenaron alícuotas de aproximadamente 100 mg de micelio triturado en tubos Eppendorf a -70°C, hasta su posterior uso. A los 100 mg de micelio triturado se les extrajo el RNA total utilizando el RNeasy Plant mini kit de Qiagen®, siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

8.16 Amplificación del ORF-*TtXynA* de *T. terrestris* Co3Bag1

8.16.1 Obtención del cDNA

Para amplificar parcialmente el gen *ttxynA* de *T. terrestris* Co3Bag1, a partir del RNA total del hongo se sintetizó cDNA utilizando el kit In-Fusion® SMARTer™ de Clontech®, siguiendo las indicaciones del proveedor.

8.16.2 Amplificación de la secuencia parcial del ORF-*TtXynA*

De manera paralela, se diseñaron los siguientes iniciadores, en base a la secuenciación parcial de *TtXynA* de los péptidos obtenidos al secuenciar parcialmente la proteína, a partir de una banda de gel de poliacrilamida teñida con azul de Coomassie.

Oligo Directo: 5'-GACCCTCGCCGCCCTTGTGG-3' oligo directo que amplifica a partir del sitio +18 del gen reportado de *T. terrestris* NRRL 8126 en el GenBank

Oligo Reverso: 5'-GAGGCACTGGTAGTACCAGTC-3' oligo que abarca el final del gen de *T. terrestris* NRRL 8126 reportado en el GenBank, y cuya secuencia se obtuvo al secuenciar parcialmente *TtXynA* (péptido No.5; ver la sección de resultados).

Los cuales fueron utilizados para la reacción de PCR, utilizando cDNA como DNA molde y la polimerasa de alta fidelidad Pfu (Thermo Scientific®).

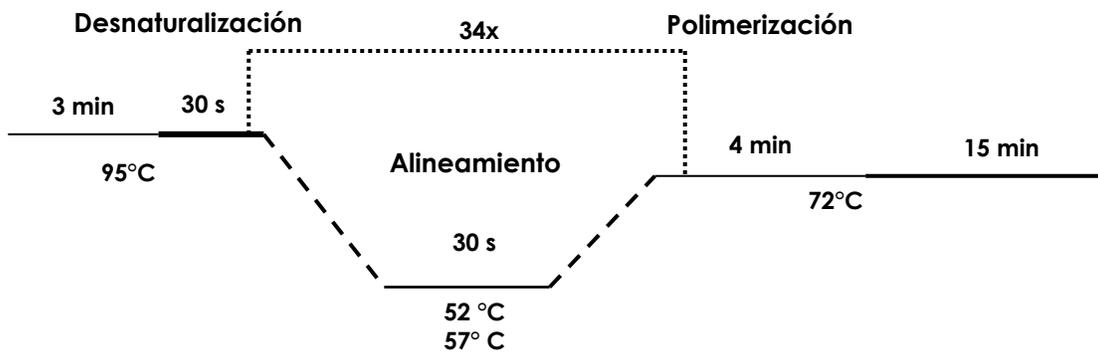


Figura 3. Ciclo de PCR por gradiente utilizado para amplificar la secuencia parcial de *ORF-ttXynA* que abarca desde el sitio +18 al sitio +1578.

El producto de PCR amplificado se purificó a partir de gel y se clonó en el vector pJET1.2/blunt (Life-Technologies®), especial para clonar productos de PCR, generando el vector pJET-*ttxynA*_p. Asimismo, se mandó a secuenciar para conocer la secuencia del gen *ttxynA*.

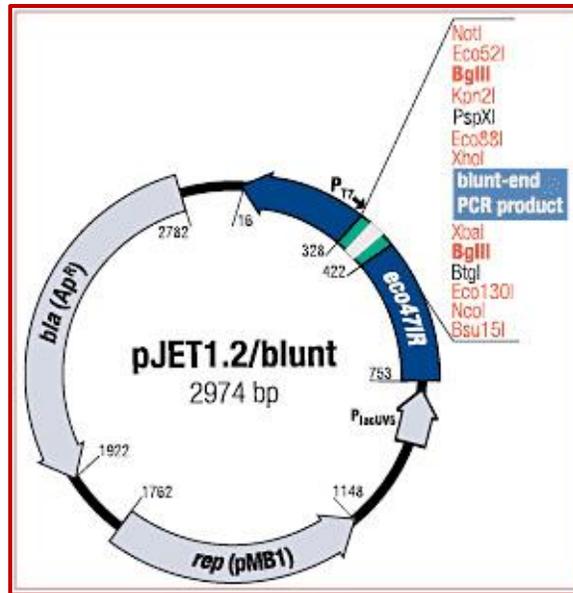


Figura 4. Mapa del vector pJET1.2/blunt, utilizado para clonar productos de PCR

8.16.3 Amplificación y secuenciación del marco de lectura completo ORF-*TtxynA*

Para amplificar el marco de lectura completo ORF-*TtXynA*, se realizó una PCR, utilizando cDNA como DNA molde, la polimerasa de alta fidelidad Pfu (Thermo Scientific), y los siguientes oligos:

Oligo directo: SmarterV del kit In-Fusion® SMARTer™

Oligo reverso: 5'-GAGGCACTGGTAGTACCAGTC-3' (oligo utilizado en la PCR anterior)

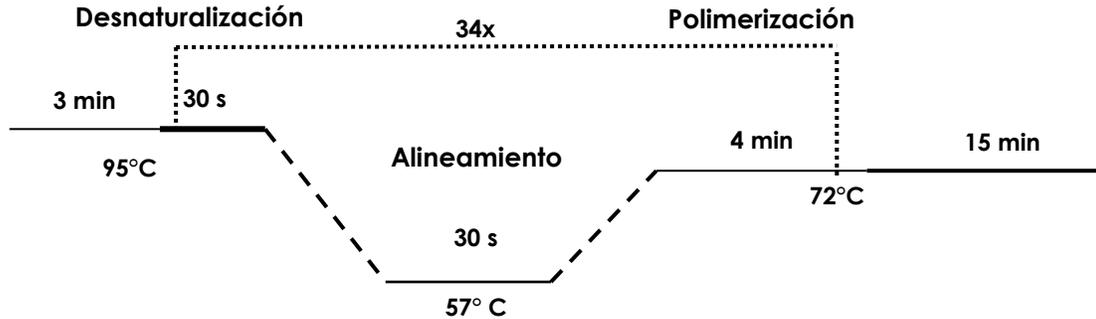


Figura 5. Ciclo de PCR utilizado para amplificar el marco de lectura completo que codifica para TtXynA (ORF-*ttxynA*).

El producto de PCR se clonó en el vector pJET1.2/blunt (Life-Technologies®), siguiendo las indicaciones del proveedor y se generó el vector pJET-*ttxynAc*, el cual se utilizó para experimentos posteriores.

8.17 Secuenciación completa del ORF-*ttxynA* de *T. terrestris* Co3Bag1

De manera rutinaria, se realizó una serie de reacciones de PCR, utilizando diferentes juegos de oligos, diseñados conforme se iba conociendo la secuencia del ORF-*ttxynA*.

Cada uno de los productos de PCR obtenidos a lo largo de este proyecto se mandó a secuenciar al Laboratorio de Bioquímica Molecular UBIPRO de la Facultad de Estudios Superiores de la UNAM, campus Iztacala (FESI-UNAM).

8.18 Purificación de productos de PCR a partir de gel

Los productos de PCR obtenidos en este trabajo se purificaron utilizando el kit QIAquick Gel Extraction de Qiagen®, de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

8.19 Clonación de *ttxynA* en el vector de expresión constitutiva pGAPzαA de *P. pastoris*

La región que codifica para la proteína madura de *ttxynA* se amplificó utilizando al vector pJet-*ttXynA* como DNA molde, la polimerasa Pfu y los siguientes oligos:

PMTtXYNAFw: 5' – CGgaattcCAGCAGGCCTGCACGCTCACG -3' con el sitio de corte *EcoRI* señalado en cursivas

PMTtXYNARv: 5' – GCtctagaTTAGAGGCACTGGTAGTACCAG-3' con el sitio de corte *XbaI*, en cursivas, y un codón de término que se subraya.

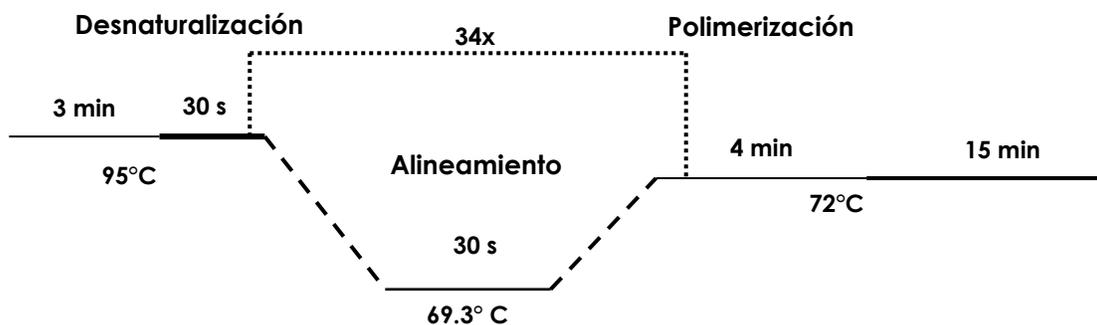


Figura 6. Ciclo de PCR utilizado para amplificar la región de *ttxynA* que codifica para la proteína madura.

El producto de PCR se purificó a partir de gel y este así como el vector pGAPzαA (**Fig. 7**) se digirieron con las enzimas *EcoRI* (NEB) y *XbaI* (NEB), y se ligaron utilizando a la enzima DNAT4-ligasa (NEB), de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Generando el vector pGAPzαA-*ttxynA*.

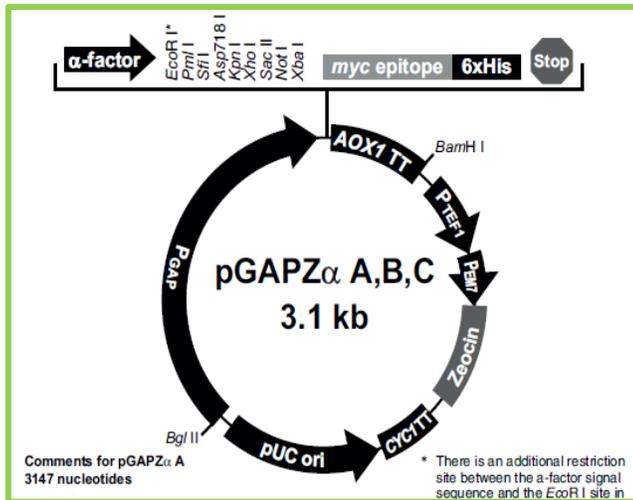


Figura 7. Mapa del vector pGAPZαA, para la expresión de proteínas de manera constitutiva en *P. pastoris*. Nota: En el vector B, el sitio de corte de *EcoRI* se sustituye por el sitio *PstI*.

8.20 Clonación de *ttxynA* en el vector de expresión constitutiva pGAPZαB de *P. pastoris*

Por otro lado, se mandó sintetizar a la empresa GeneScript el gen *ttxynA* optimizando el uso de codones para *P. pastoris*, y también para que el gen se clonara en el vector pGAPZαB, por complementariedad con los sitios de corte, *PstI* y *XbaI*.

La empresa envió el gen clonado en el vector pUC51, generando el vector pUC51-TtXynA. Con este vector se transformaron células de *E. coli*-DH5α para la propagación y mantenimiento del mismo. A las células se les extrajo el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando el kit GeneElute™ Plasmid midiprep (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se digirió el vector pUC51-TtXynA con las enzimas *PstI* y *XbaI*, para liberar *ttxynA* optimizado (*ttxynA_{op}*), y este se purificó a partir de gel. Se subclonó a *ttxynA_{op}* en el vector pGAPZαB (**Fig. 7**) por complementariedad, el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas con las que se digirió al inserto, generando el vector pGAPZαB-*ttxynA*.

8.21 Evaluación de la expresión constitutiva de *ttxynA* en *P. pastoris*

Se obtuvieron células electrocompetentes de *P. pastoris* X-33 y se transformaron por electroporación con 20 µg del vector a utilizar linearizado, de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Manual pGAP Invitrogen®). Posteriormente, las clonas que crecieron se resembraron en medio sólido YPD-Zeocina (1000 µg/ml). Y a las clonas que crecieron, se les resembró en medio YPD sólido suplementado con 0.3% xilano de haya y se incubaron 48 h a 29°C para la generación de biomasa. Posteriormente, las placas se incubaron a 45°C durante tres horas y la actividad xilanolítica se detectó mediante la técnica de Rojo Congo descrita por Teather & Wood (1982).

9. RESULTADOS

9.1 Evaluación de la actividad xilanolítica de *T. terrestris* Co3Bag1

Para evaluar la capacidad que tiene *T. terrestris* Co3Bag1 de producir enzimas con actividad xilanolítica, el hongo se cultivó en el medio Zouari-Mechichi *et al.* (2006), suplementado con 1% de xilano de haya o 1% de CMC como fuente de carbono. En ambas fuentes de carbono, la biomasa fue similar y el hongo tuvo actividad xilanolítica, sin embargo, la mayor actividad xilanolítica se obtuvo, cuando *T. terrestris* se cultivó en presencia de CMC (**Fig. 8A**).

De acuerdo a la cinética de crecimiento, la síntesis de enzimas con actividad xilanolítica comenzó a las 48 h de cultivo en ambas fuentes de carbono, alcanzando un máximo de actividad a las 96 h de alrededor de 0.8 U/mL en xilano y de 1.6 U/mL en CMC, manteniéndose constante en los siguientes seis días de cultivo.

Por otro lado, el análisis por zimograma, utilizando 1% de RBB-Xilano como sustrato, del sobrenadante de cultivo de *T. terrestris* Co3Bag1 en presencia de CMC, a las 96 h de incubación puso en evidencia la presencia de al menos tres enzimas con actividad xilanolítica (**Fig.8B**).

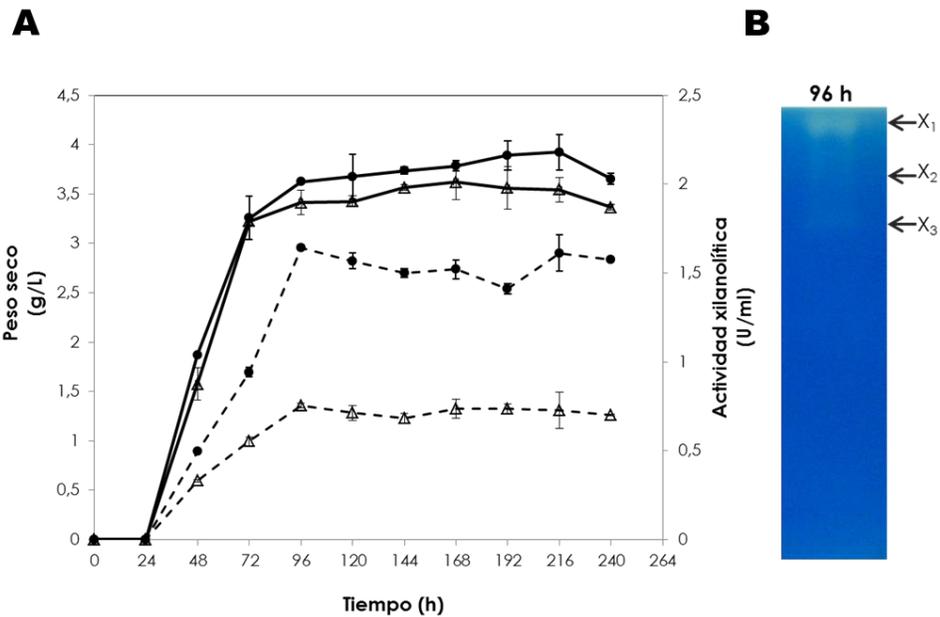


Figura 8. A) Cinéticas de crecimiento (líneas continuas) y de actividad xilanolítica (líneas punteadas) de *T. terrestris* Co3Bag1 en presencia de CMC (●), y xilano (Δ) como sustratos. **B)** Análisis zimográfico de la actividad xilanolítica a las 96 h de cultivo de *T. terrestris* Co3Bag1 en presencia de CMC.

9.2 Purificación de una xilanasa producida por *T. terrestris* Co3Bag1

Se purificó una proteína con actividad xilanolítica, a partir del sobrenadante de cultivo de *T. terrestris* Co3Bag1, producida en presencia de CMC como única fuente de carbono. Las etapas de purificación se resumen en la siguiente Tabla.

Tabla 2. Resumen de la purificación de una xilanasa de *T. terrestris* Co3Bag1

Etapas de purificación	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Sobrenadante de cultivo	216	12	18	100	1
Precipitación al 80% de (NH₄)₂SO₄	80.76	2.4	33.65	37.4	1.86
C.I.O^a	33.5	0.596	56.42	15.5	3.13
M.E.C^b	23.4	0.138	169.57	10.8	9.42

^a Cromatografía de intercambio iónico

^b Cromatografía de exclusión molecular

La enzima se purificó a homogeneidad con un factor de purificación de 9.4 y un rendimiento del 10.8%. El análisis electroforético mostró una sola banda con un peso molecular estimado de 86 kDa (**Fig. 9A**), la cual presentó actividad xilanolítica, evidenciada por zimograma (**Fig. 9B**), a esta enzima se le nombró TtXynA.

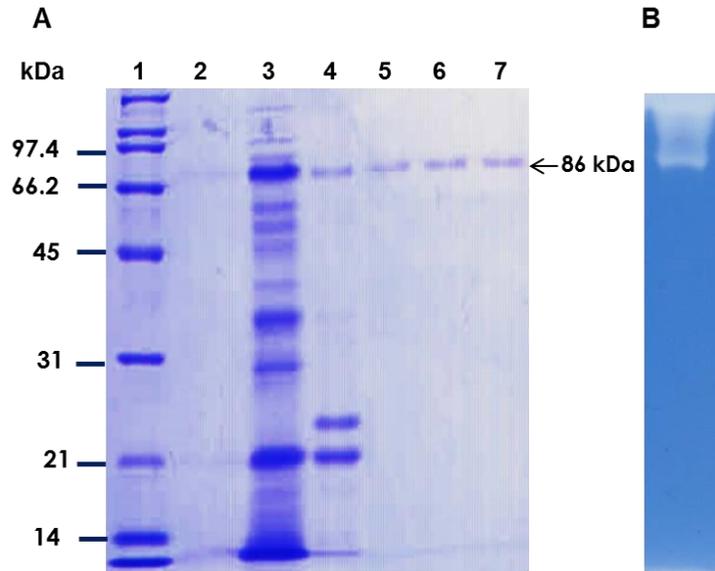


Figura 9. A) Análisis electroforético de la purificación de TtXynA. **Carril1:** Marcador de peso molecular; **Carril 2:** sobrenadante de cultivo; **Carril 3:** Proteína precipitada al 80% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **Carril 4:** Fracción de TtXynA semipurificada, de ClO. **Carriles 5 -7:** TtXynA pura. **B)** Zimograma de TtXynA pura, utilizando como sustrato xilano de haya 0.1%

9.3 Caracterización bioquímica de TtXynA

9.3.1 Efecto del pH sobre la actividad de TtXynA y su estabilidad al pH

Se determinó el efecto que tiene el pH sobre la actividad de TtXynA (**Fig. 10A**), para lo cual la enzima purificada se incubó a diferentes valores de pH, desde 3 hasta 10.5, a 70°C por 15 min, observando que la enzima presentó la máxima actividad a pH 5.5, además presenta más del 60% de actividad en un intervalo amplio de pH (4 – 9).

Por otro lado, los ensayos de estabilidad al pH (**Fig. 10B**), muestran que TtXynA retiene más del 50% de su actividad en un amplio intervalo de pH (5 -9).

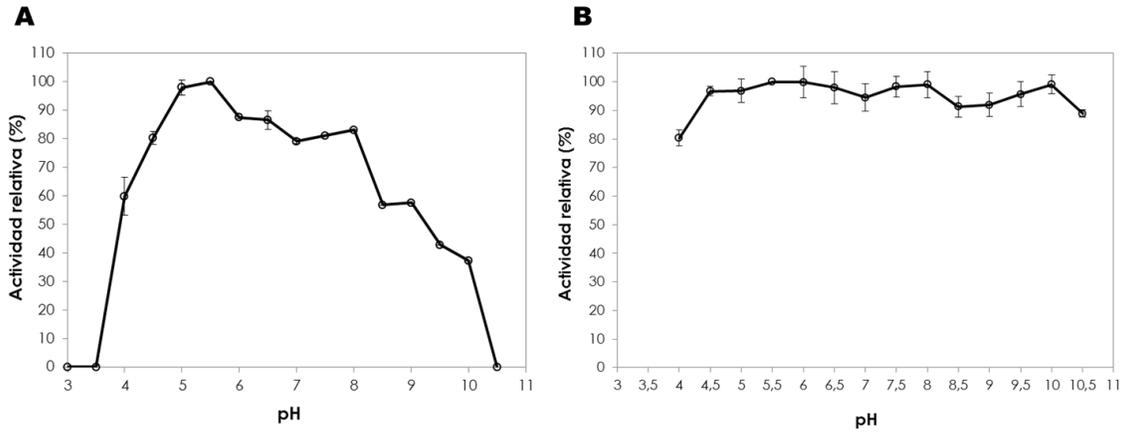


Figura 10. A) Efecto del pH sobre la actividad de TtXynA. **B)** Estabilidad al pH de TtXynA.

9.3.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de TtXynA y su termoestabilidad

Se evaluó el efecto que tiene la temperatura sobre la actividad de TtXynA (**Fig. 11A**). La enzima presentó su máxima actividad a 85°C, mientras que en el intervalo de temperaturas de 65 – 90°C presenta del 70 - 80% de su actividad.

Por otro lado, los ensayos de termoestabilidad de TtXynA mostraron que la enzima tiene una vida media ($t_{1/2}$) de 36 min, 3.8 h y 18.6 días a 85°C, 75°C y 65°C, respectivamente (**Fig. 11B**).

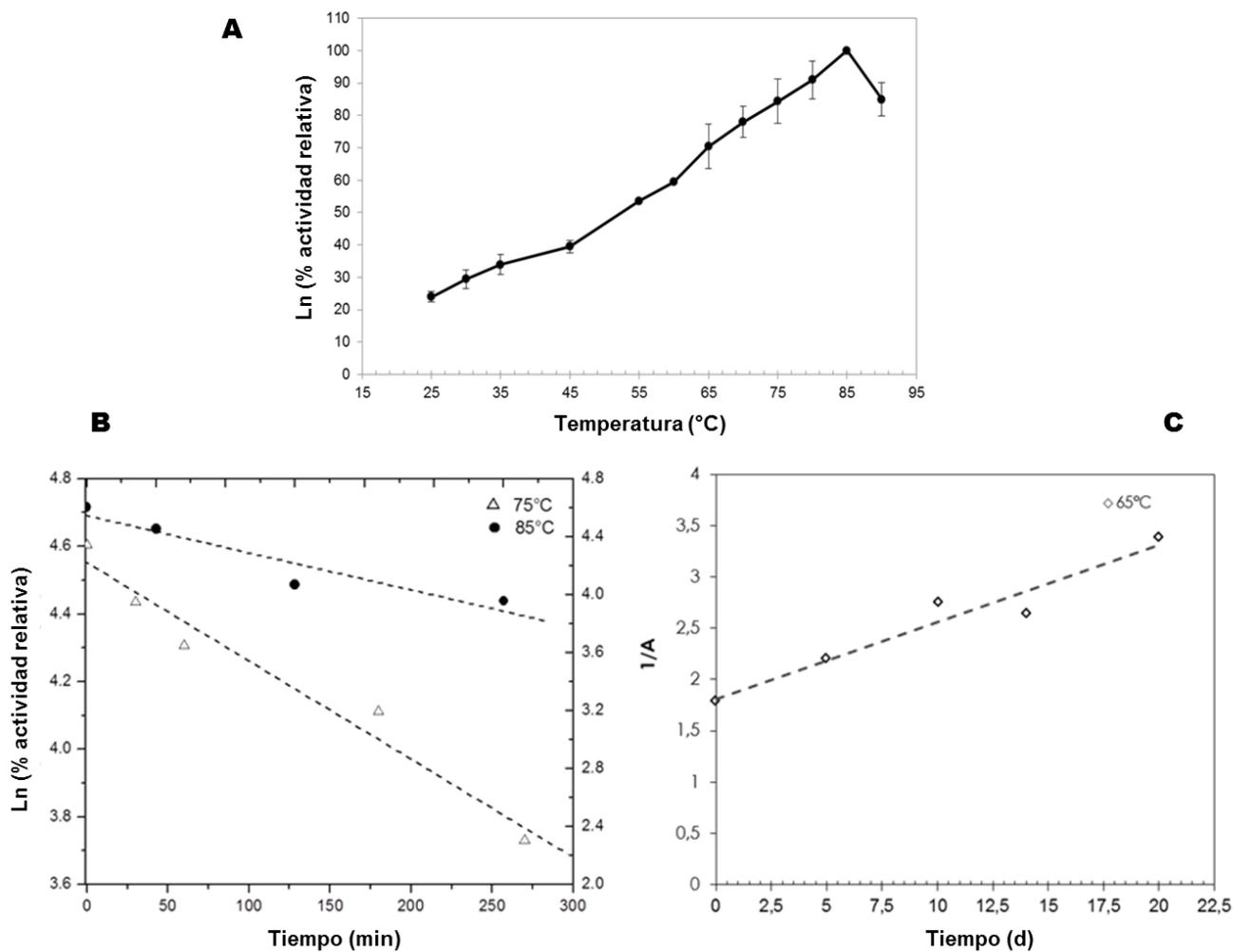


Figura 11. A) Efecto de la temperatura sobre la actividad de TtXynA. **B)** Termoestabilidad de TtXynA a 85°C, 75°C y 65°C.

9.3.3 Análisis estructural de TtXynA por dicroísmo circular

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la estructura secundaria de TtXynA, se determinaron los espectros del UV-lejano desde 25 hasta 85°C, con incrementos de 5°C (**Fig. 12A**). El espectro de TtXynA a 25°C muestra un pico negativo alrededor de los 228 nm, el cual se va haciendo más negativo conforme la temperatura aumenta, indicando que la enzima gana estructura. En contraste, no hubo cambio en

la señal de DC para la proteína control al incrementar la temperatura (**Gráfica interna A**). Por otro lado, estos resultados se confirmaron y concordaron con los experimentos de los perfiles de transición térmica a 230 nm de TtXynA y de Xyn11A_{AOX1} (**Fig. 12B**).

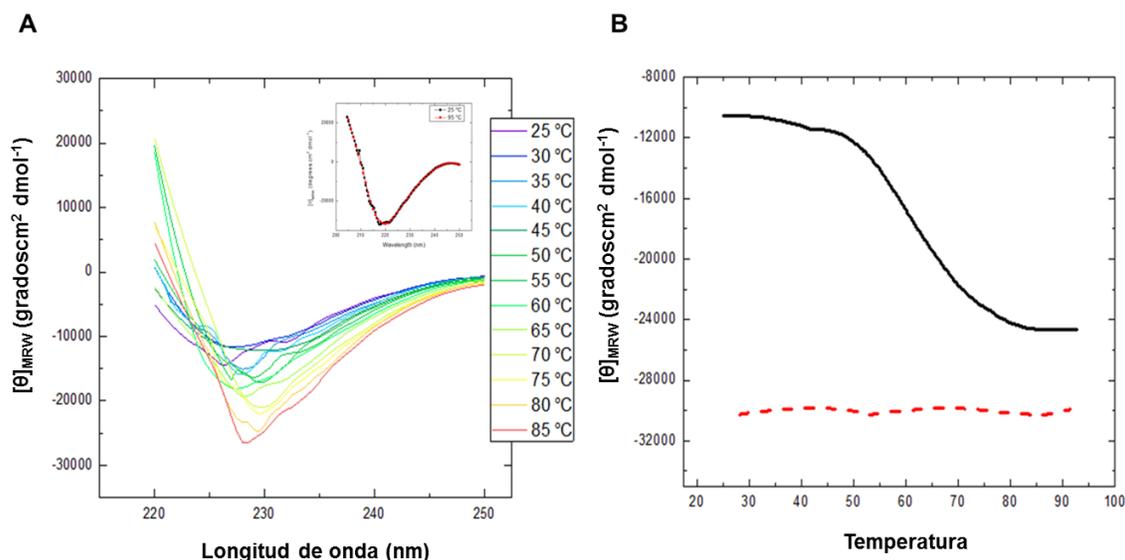


Fig. 12. A) Espectro de DC en el UV-lejano de TtXynA purificada y Xyn11A_{AOX1} como la proteína control (gráfica interna), a diferentes temperaturas como se indica. Los espectros se tomaron empleando una celda de 0.1 cm, cada 4 s en intervalos de 0.5 nm de 250 - 210 nm y se utilizó un ancho de banda de 1 nm. La señal de los amortiguadores se sustrajo de todos los espectros. **B)** Perfiles de transición térmica de TtXynA (línea negra) y Xyn11A_{AOX1} (línea punteada roja). La señal de DC fue tomada a 220 y 230 nm, respectivamente. Las muestras fueron calentadas a una velocidad constante de 2°C/min.

9.3.4 Determinación de la afinidad por sustrato y de los parámetros cinéticos de TtXynA

Con el fin de conocer los parámetros cinéticos de TtXynA, se determinó la actividad de la enzima sobre diferentes sustratos: xilano de haya, xilano de abedul, xilano de avena, CMC y avicel, a diferentes concentraciones desde 0.25 hasta 6 mg/mL, para cada uno de los sustratos evaluados. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3**, y de acuerdo a estos, TtXynA presenta mayor afinidad para hidrolizar xilano de haya. Asimismo, tiene la capacidad de hidrolizar CMC, aunque en menor proporción, comparado con los diferentes xilanos utilizados. Sin embargo, no fue capaz de hidrolizar a la celulosa cristalina (Avicel).

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la xilanasa TtXynA de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1				
Sustrato	V_{max} (U · mg⁻¹)	K_M (mg·mL⁻¹)	k_{cat} (s⁻¹)	k_{cat} / K_M (mg·mL⁻¹ · s⁻¹)
Xilano de haya	21.52 ± 0.026	0.41 ± 0.036	479.41	1172.15
Xilano de abedul	20.86 ± 0.036	0.549 ± 0.061	464.85	846.72
Xilano de avena	24.68 ± 0.012	0.575 ± 0.002	549.93	956.4
CMC	11.8 ± 0.023	6.62 ± 0.065	262.87	39.70
Avicel	N.A.	N.A.	---	---
N.A.: No se detectó actividad				

9.3.5 Efecto de diferentes iones metálicos sobre la actividad xilanólica de TtXynA

Para conocer si algún ion metálico divalente aumenta o disminuye la actividad de TtXynA, se determinó la actividad xilanólica en presencia de diferentes iones metálicos y de EDTA, evaluando las concentraciones de 1 y 5 mM de cada

compuesto (**Tabla 4**). Se puede ver que la presencia de Ca (1 y 5 mM), Co y Fe (1 mM) no tuvo ningún efecto sobre la actividad de TtXynA, mientras que el Cu, Mn (1 y 5 mM), Mn (5 mM), Mg y Hg (1 mM), disminuyeron su actividad alrededor de un 50%. Por otro lado, el Hg (5 mM) abatió por completo la actividad de TtXynA. Asimismo, el resto de los iones metálicos y el EDTA, en ambas concentraciones, disminuyeron la actividad de TtXynA de 20 – 30%.

Tabla 4. Efecto de los iones metálicos y del EDTA sobre la actividad de TtXynA		
	Actividad relativa (%)	
	1 mM	5 mM
Control ^a	100	100
CuSO₄	47.43 ± 1.19	40.31 ± 0.29
CaCl₂	99.05 ± 1.62	93.40 ± 0.44
FeSO₄	99.08 ± 3.12	98.76 ± 2.72
HgCl₂	54.76 ± 3.85	0
MgCl₂	69.42 ± 2.07	54.24 ± 2.52
NiCl₂	76.54 ± 8.29	58.53 ± 0.29
MnCl₂	57.27 ± 2.07	46.07 ± 6.07
CoCl₂	102.13 ± 7.57	75.29 ± 2.19
ZnSO₄	96.95 ± 3.81	71.59 ± 2.07
EDTA⁺	78.32 ± 1.62	72.25 ± 2.51
^a Actividad de la xilanasa sin adición de metales		

9.3.6 Presencia de carbohidratos en TtXynA

Debido a que la mayoría de las xilanasas fúngicas extracelulares son glicoproteínas, se investigó si TtXynA presenta esta característica, por lo que un gel SDS-PAGE al 10%, con una fracción de enzima semipurificada, se le tiñó con el reactivo de Schiff (**Fig. 13A**), confirmando que TtXynA es una glicoproteína. Por otra parte, la enzima pura fue tratada con una mezcla de enzimas desglicosilantes. Las preparaciones de TtXynA, glicosilada y desglicosilada (denominada d-TtXynA), se analizaron electroforéticamente (**Fig. 13B**). De acuerdo al peso molecular estimado para la enzima d-TtXynA, el tratamiento de desglicosilación permitió la remoción de alrededor de un 5% de carbohidratos. Cabe señalar que las tres proteínas que se observan en la preparación de la proteína desglicosilada (**Figura 13B, carril 3**) corresponden a enzimas presentes en el kit, O-glicosidasa (147 kDa), Neuraminidasa (43 kDa) y PNGasa (36 kDa).

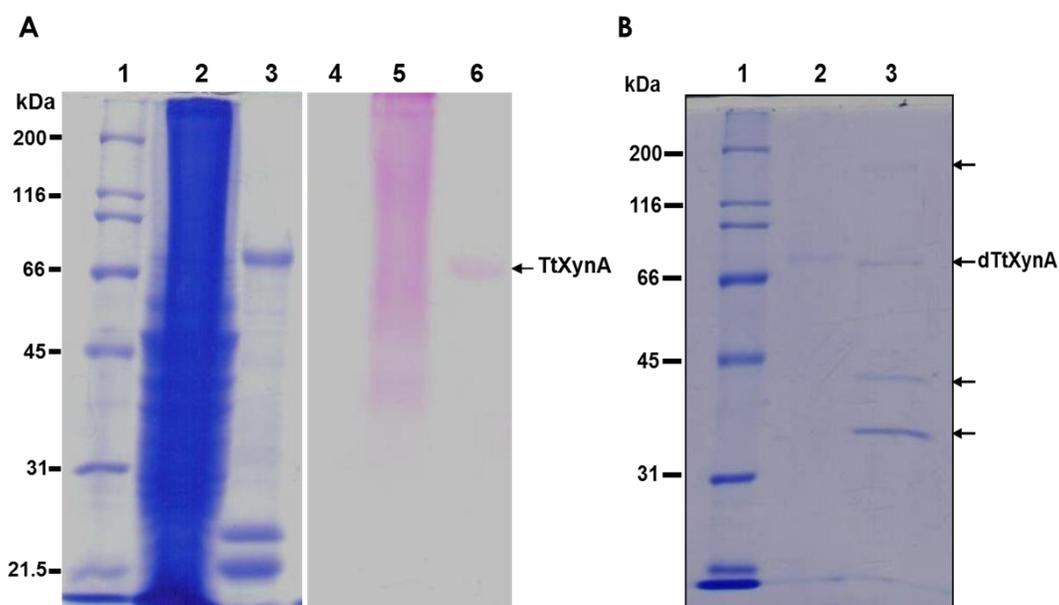


Figura 13. A) SDS-PAGE 10% teñido con Azul de Coomassie y el reactivo de Schiff. Carriles 1 y 4: Marcador de peso molecular, como control negativo; carriles 2 y 5: Invertasa de *S. cerevisiae*, como control positivo; carriles 3 y 6: Fracción semipurificada de TtXynA. **B)** Análisis electroforético de la desglicosilación de TtXynA. **Carril 1:** Marcador de peso molecular; **Carril 2:** TtXynA purificada; **Carril 3:** TtXynA desglicosilada (dTtXynA).

Sin embargo, al utilizar el método de Antrona (Dimler *et al.*, 1952) la cantidad estimada de carbohidratos presentes en TtXynA fue de 20%. Por lo que, es muy probable que con la mezcla de enzimas desglicosilantes no se haya podido retirar la cantidad completa de carbohidratos.

9.3.7 Productos de hidrólisis de TtXynA

De acuerdo al ensayo de TLC, los principales productos de hidrólisis generados por TtXynA, son xilobiosa y xilopentosa (**Fig.14**), estos se produjeron a partir de las 24 y hasta las 72 h, que se hizo este análisis.

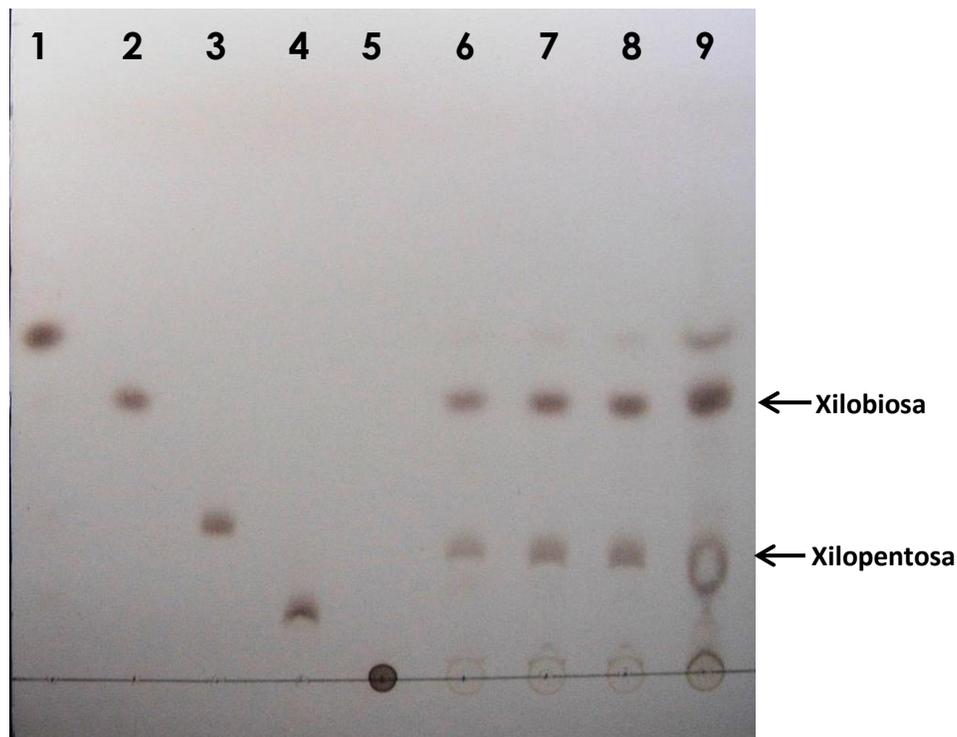


Figura 14. Análisis por TLC de los productos de hidrólisis de TtXynA utilizando como sustrato xilano de haya al 1%. Carril 1: xilosa; carril 2: xilobiosa; carril 3: xilotetraosa; carril 4: xilohexosa; carril 5: xilano de haya; carriles 6 – 9: productos de hidrólisis a las 24, 48, 72 y 144 h, respectivamente.

9.4 Identidad de TtXynA

Para conocer la secuencia del gen que codifica para TtXynA, la proteína se secuenció parcialmente, obteniéndose los siguientes cinco péptidos:

- NGEANNVGWTPSSNDK,
- YAGECDPDGCDNFNSYR,
- FTVVTQFLTDSSGNLSEIKRFYVQNGVVIPNSNSNIAGVSGNSITQAFCDQAQKTAFGD
TNVFDQK,
- GTCPTTSGVPADVESQAPNSKVIYSNIR, y
- LNDWYYQCL

El análisis de similitud de estos péptidos se hizo utilizando el programa BLAST que se encuentra disponible en el servidor de la NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), y dicho análisis mostró que los péptidos tienen un 100% de identidad con una celobiohidrolasa de *T. terrestris* NRRL 8126, denominada Cel7A (THITE_118360; Número de acceso del Genbank: AEO67172.1; número de acceso UniProtKB: G2QZD9) (**Fig. 15**).

```
MHAKFATLAALVASAAAQACTLTAENHPTLSWSKCTSGGCTSVSGSVT
IDANWRWTHQVSSSTNCYTGNEWDTSICTDGASCAAACCLDGADYSGTY
GITTSGNALSLQFVTQGPYSTNIGSRTYLMASDTKYQMFTLLGNEFTFDV
DVSGLGCGLNGALYFVSMDEDGGLSKYSGNKAGAKYGTGYCDSQCPRD
LKFINGEANNVGWTPSSNDKNAGLGNYGSCCSEMDVWEANSISAAYTPH
PCTTIGQTRCEGDDCGGTYSTDRYAGECDPDGCDNFNSYRMGNTTFYK
GMTVDTSKKFTVVTQFLTDSSGNLSEIKRFYVQNGVVIPNSNSNIAGVS
GNSITQAFCDQAQKTAFGDTNVFDQKGGLAQMGKALAQPMVLVMSLWDD
HAVNMLWLDSTYPTDAAGKPGAARGTCPTTSGVPADVESQAPNSKVIYS
NIRFGPIGSTVSGLPGGGNSPGGGSSSTTTTTRPATSTTSSASSGPTGGG
TAAHWGQC GGIGWTGPTVCASPYTCQKLNDWYYQCL Stop
```

Figura 15. Secuencia de aminoácidos de la celobiohidrolasas Cel7A (THITE_118360; Número de acceso del Genbank: AEO67172.1, y UniProtKB ID: G2QZD9) de *T. terrestris* NRRL8126. Subrayado se muestran los cinco péptidos obtenidos al secuenciar parcialmente, por LC-MS, a TtXynA de *T. terrestris* Co3Bag1.

9.5 Obtención de la secuencia codificante para la xilanasa TtXynA

9.5.1 Amplificación del ORF-*ttxynA*

Debido a que la secuencia parcial de aminoácidos de TtxynA mostró una gran similitud con la proteína Cel7A de *T. terrestris* NRRL8126, se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de Cel7A (**Fig. 16**), utilizando el programa Clustal W disponible en la web. Con base en dicho alineamiento, se identificaron las regiones altamente conservadas de las secuencias aminoacídicas comparadas, y se diseñaron oligonuclótidos degenerados para secuenciar el marco de lectura abierto de *ttxynA*, mediante genética reversa. En la **Figura 16**, las secuencias peptídicas de TtXynA son señaladas en amarillo, mientras que las regiones utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos, son señaladas en azul y rojo. Cabe mencionar que de acuerdo al alineamiento, el péptido “LNDWYYQCL” corresponde a la secuencia carboxilo terminal de la xilanasa TtXynA, por lo que a partir de esa región se diseñó un oligonucleótido reverso. Asimismo, es de importancia destacar que para el momento en el que se hizo el alineamiento múltiple y la secuenciación del gen, todavía se pensaba que la cepa con la que se estaba trabajando era *Corynascus sepedonium* Co3Bag1 (López-Olguín, 2011), ya que, posteriormente, se mandó identificar al hongo a la empresa Charles River, cuyos resultados señalaron que la cepa con la que se trabajó es *Thielavia terrestris*.



Figura 16. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de Cel7A de *T. terrestris* NRRL8126, utilizando el programa Clustal W 2.0. En amarillo se señalan los péptidos obtenidos al secuenciar parcialmente a TtXynA; en azul se indican las regiones utilizadas para diseñar los oligonucleótidos directos, mientras que en rojo se señala la región utilizada para diseñar el oligonucleótido reverse.

9.5.1.1 Amplificación de la secuencia parcial del ORF-*ttxynA*

Para amplificar parcialmente, el marco de lectura abierto de *ttxynA*, se extrajo el RNA total de *T. terrestris* Co3Bag1 (**Fig. 17A**). Con el RNA extraído se sintetizó cDNA (**Fig.17B**) y éste se utilizó como DNA molde para hacer la reacción de PCR.

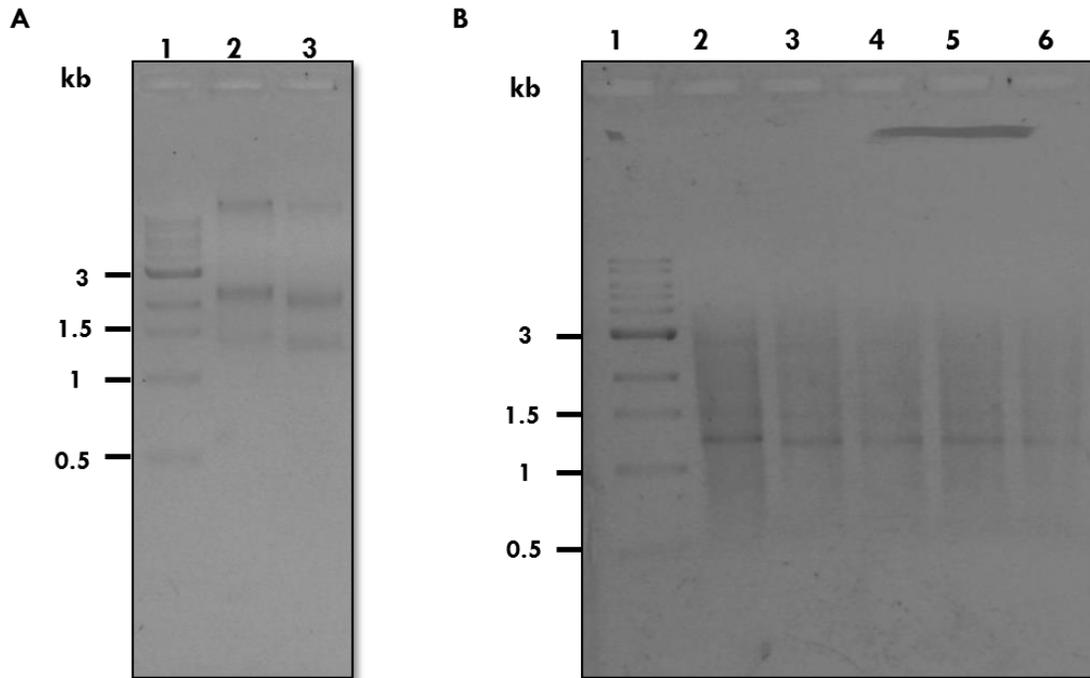


Figura 17. A) Extracción de RNA total de *T. terrestris* Co3Bag1. **Carril 1:** Marcador 1 kb Ladder; **Carriles 2 y 3:** Análisis del RNA extraído. **B)** Síntesis de cDNA de doble cadena a partir del RNA total extraído, **Carril 1:** 1 kb Ladder, **Carriles 2-6:** cDNA sintetizado a 15, 18, 21, 24 y 27 ciclos, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, del alineamiento de Cel7A de *T. terrestris* NRRL8126 con otras cinco proteínas similares, nos basamos en las zonas altamente conservadas, para diseñar oligonucleótidos que nos permitieran amplificar el *ORF-ttxynA*. Los oligonucleótidos directos se diseñaron a partir de los sitios +18 y +820 del gen *cel7A*, hasta el sitio 1527, que corresponde a la región carboxilo terminal de la proteína. En la **Fig. 18** se puede observar que fue posible amplificar un fragmento de aproximadamente 1,500 pb que corresponde a la región +18 – 1527; por medio de secuenciación, se confirmó que dicho fragmento corresponde a *ttxynA*.

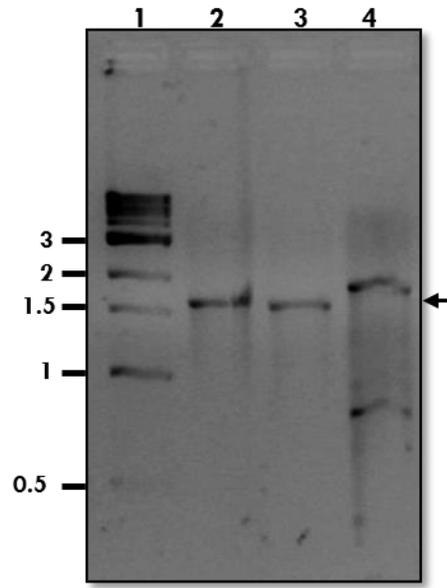


Figura 18. Amplificación de la región +18- 1521 del ORF-*txynA* de *T. terrestris* Co3Bag1. **Carril 1:** 1 kb DNA Ladder; **Carriles 1-3:** Temperaturas de alineamiento de 57, 55.1 y 52°C, respectivamente.

9.5.1.2 Amplificación del ORF-*txynA* completo

Para amplificar el marco de lectura completo de *txynA* (ORF_c-*txynA*) se siguió como estrategia utilizar el oligonucleótido directo SMART V contenido en el kit InFusion de Clontech® y el oligonucleótido reverso previamente diseñado (**ver Materiales y Métodos**). En la **Figura 17** se muestra la amplificación de un fragmento de tamaño esperado, aproximadamente 1580 pb, correspondiente al ORF_c-*txynA*.

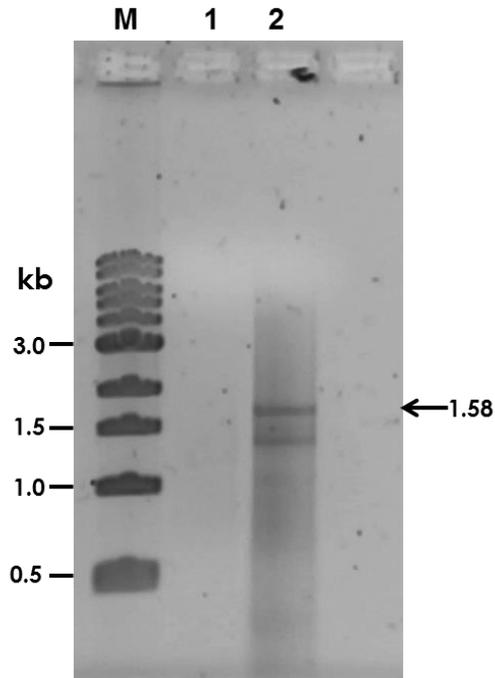


Figura 19. Amplificación del marco de lectura abierto *ORF-ttxynA* de *T. terrestris* Co3Bag1, utilizando cDNA como DNA molde. Carril 1: Marcador de tamaño 1kb ladder; Carril 2: Amplicón de 1.58 kb correspondiente al *ORF-ttxynA*, utilizando el oligoSmarter5' como oligonucleótido directo y el oligonucleótido reverso diseñado a partir del alineamiento múltiple.

La secuencia amplificada se clonó en el vector pJET1.2/blunt, obteniendo la construcción *pJET-ORFttxynA*, con la cual se transformaron células de *E. coli* DH5 α . Al menos a diez de las transformantes obtenidas se les extrajo el DNA plasmídico y mediante un análisis de restricción se evidenció que la clona 3 contiene la construcción deseada (**Fig. 20**). Asimismo, se secuenció completamente el *ORF-ttxynA* de *T. terrestris* Co3Bag1. A continuación se muestra la secuencia codificante y de aminoácidos probable de TtXynA, ya que posteriormente, se comprobó que esta secuencia corresponde a una endoglucanasa producida por la cepa Co3Bag1 y que fue copurificada con TtXynA (**ver apartado 9.10**).

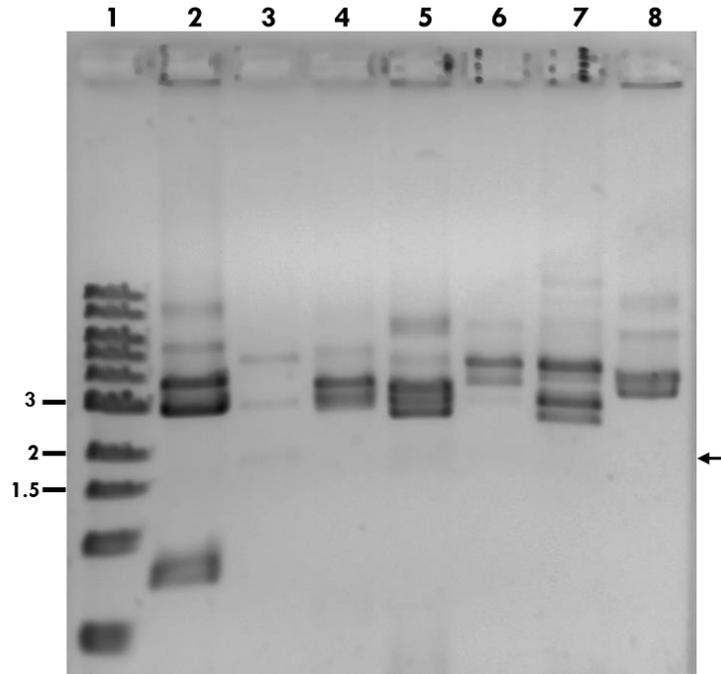


Figura 20. Digestión de *pJET-ORFtxynA* con las enzimas de restricción *Xba*I y *Not*I. **Carril 1:** Marcador 1 kb Ladder; **Carriles 2 – 8:** construcciones digeridas de las clonas 1, 3, 11, 12, 15, 19 y 21, respectivamente.

Una vez clonado el ORF_c-*txynA* este se secuenció para obtener la secuencia codificante completa de *txynA* (**Figura 21**). Como he mencionado, más adelante se comprobó que el gen que se secuenció corresponde a *cel7A*, en lugar de *txynA* de *T. terrestris* Co3Bag1, por lo tanto, se puede decir que *cel7A* tiene un marco de lectura abierto de 1,584 pb, con un contenido de GC del 65.7%, que codifica para una proteína de 527 aminoácidos, con un péptido señal de 17 residuos. De acuerdo a estos datos, la enzima madura tiene un pI teórico de 4.76 y un peso molecular esperado de 53.25 kDa. La secuencia traducida, muestra la siguiente organización estructural modular: un dominio catalítico presente en el extremo N-terminal (desde la Q18 hasta la S466), seguido de un brazo espaciador rico en Pro/Thr/Ser (desde la T468 hasta la A493), seguido por un módulo de unión a carbohidrato (CBM), tipo fúngico de la Familia 1 (desde la P494 hasta la L527). Los residuos de aminoácidos E230 y E235, se identificaron como el donador de protones y el nucleófilo,

respectivamente, por similitud a las celobiohidrolasas Cel7A de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (UniProtKB ID: Q12621), Cel7A de *Trichoderma reesei* (UniProtKB ID: P62694), y CHB1 (GH7) de *Daphnia pulex* (PDB ID: 4xxn), respectivamente, las cuales han sido cristalizadas. Asimismo, se predijeron dos sitios probables de N-glicosilación y 39 sitios probables de O-glicosilación, utilizando los programas NetNGlyc y NetOGlyc, respectivamente, disponibles en el servidor Expasy (www.expasy.org).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de *cel7A* mostró un 97% de identidad con la celobiohidrolasa Cel7A de *T. terrestris* NRRL 8126 (Berka *et al.*, 2011), un 77% de identidad con una glicosil hidrolasa de la familia 7 (GH7) de *Myceliophthora thermophile* ATCC42464 (Berka *et al.*, 2011) y de *Chaetomium luteum* (GenBank: AGV05131.1) y de igual forma, mostró un 77% de identidad con una celulosa- β -1,4-celobiosidasa de *Acremonium thermophilum* (GenBank: CAM98445.1) (Voutilainen *et al.*, 2008).

atgcacgccaagttcgcgaccctcgccgccttgtggcggtccgcccgggcccagcaggcc
 M H A K F A T L A A L V A S A A A Q Q A
 tgcacgctcacggctgagaaccaccccaccctgtcgtgggtccaagtgcacgtctggcggc
 C T L T A E N H P T L S W S K C T S G G
 agctgcaccagcgtctcgggcgccgtcaccatcgatgccaactggcggtggactcaccag
 S C T S V S G A V T I D A N W R W T H Q
 gtctcgagctcgaccaactgctacacgggcaacgagtgggacacgtccatctgcaccgac
 V S S S T N C Y T G N E W D T S I C T D
 ggtgcttcgtgcgccgcccgtgctgctcogatggcgccgactactcgggacctatggc
 G A S C A A A C C L D G A D Y S G T Y G
 atcaccaccagcggcaacgcctcagcctccagttcgtcacccaaggcccctactcgacc
 I T T S G N A L S L Q F V T Q G P Y S T
 aacattggctcgcgtacctacctgatggcctcggacaccagtagcaggttcaactctg
 N I G S R T Y L M A S D T Q Y Q T F T L
 ctcggaacgagttcaccttcgacgtggacgtctcaggcctcggctgcggtctgaacggc
 L G N E F T F D V D V S G L G C G L N G
 gccctctacttcgtctccatggacgcggacgggtggtctttccaagtactcgggcaacaag
 A L Y F V S M D A D G G L S K Y S G N K
 gccggtgccaagtacggcaccggctactgcgactcgcagtgccccgcgacctcaagttc
 A G A K Y G T G Y C D S Q C P R D L K F
 atcaacggcgaagctaacaacgtcgggtggaccccgtcgtccaacgacaagaacgccggc
 I N G E A N N V G W T P S S N D K N A G
 ttgggcaactacggcagctgctgctccgagatggatgtctgggaggccaacagcatctcg
 L G N Y G S C C S E M D V W E A N S I S
 gcggcctacacgccccatccttgcaactaccatcggccagacgcgctgcgagggcgacgcc
 A A Y T P H P C T T I G Q T R C E G D A
 tgtggtggcacctacagcaccgaccgctacgccggtgagtgcgaccctgacggatgcgac
 C G G T Y S T D R Y A G E C D P D G C D
 ttcaactcgtaccgcatgggcaacacgaccttctacggcaagggttgacctcgacacc
 F N S Y R M G N T T F Y G K G L T V D T
 agcaagaagttcacgggtgggtgaccagttcctgacggactcgtctggcaacctgtccgag
 S K K F T V V T Q F L T D S S G N L S E
 atcaagcgttctacgtccagaacggcgtcgtcattccaactcgaactccaacatcgcg
 I K R F Y V Q N G V V I P N S N S N I A

Figura 21. Secuencia codificante traducida de Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1, (previamente pensada para TtXynA). En verde se muestra el péptido señal; en naranja y en azul se señalan el dominio catalítico y el dominio de unión a celulosa, respectivamente; en gris se señalan los dos probables residuos de ácido glutámicos presentes en el sitio activo; y finalmente, en turquesa y en magenta, se señalan los sitios probables de N- y O-glicosilación, respectivamente.

ggcgctctcgggcaactccatcaccaggccttctgogatgctcagaagaccgctttcggc
 G V S G N S I T Q A F C D A Q K T A F G
 gacaccaacgtcttcgaccaaaggcgccctggcccagatgggcaaggctcttgcccag
 D T N V F D Q K G G L A Q M G K A L A Q
 cccatggctcctcgtcatgtccctctgggacgaccacgcccgtcaacatgctctggctcgac
 P M V L V M S L W D D H A V N M L W L D
 tcgacctacccgaccgacgcgccggcaagccggggcgccgcccgcggtacctgccccacc
 S T Y P T D A A G K P G A A R G T C P T
 acctcgggctccccgcccagctcgagtcaccaggcgcccaactccaaggctcatctactcc
 T S G V P A D V E S Q A P N S K V I Y S
 aacatccgcttcggccccatcggctccaccgtctccggcctgcccggcgggcgagcaac
 N I R F G P I G S T V S G L P G G G S N
 cccggcgggcgggtccagctccaccaccaccagaacctccaccaccaccagaaccaccacc
 P G G G S S S T T T R T S T T T R T T T
 tcctcctcggccggcaccagcccgaccggtggcacggctcccactggggccagtgcggc
 S S S A G T S P T G G T A P H W G Q C G
 ggcacggctggaccggcccgaccgtctgcgcctcgccctacacctgccagaagctgaac
 G I G W T G P T V C A S P Y T C Q K L N
 gactggtactaccagtgcctctaa
 D W Y Y Q C L -

(Continuación) **Figura 21.** Secuencia codificante traducida de Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1, (previamente pensada para TtXynA). En verde se muestra el péptido señal; en naranja y en azul se señalan el dominio catalítico y el dominio de unión a celulosa, respectivamente; en gris se señalan los dos probables residuos de ácido glutámicos presentes en el sitio activo; y finalmente, en turquesa y en magenta, se señalan los sitios probables de N- y O-glicosilación, respectivamente.

9.6 Predicción del modelo 3-D de TtXynA de *T. terrestris* Co3Bag1

A partir de la secuencia de aminoácidos, la cual se pensaba pertenecía a TtXynA, se generó un modelo estructural 3D, con un valor de C-score de -1.52, utilizando el programa I-TASSER (**Fig. 22**). El modelo 3D es parecido estructuralmente a la celobiohidrolasas Cel7A de *H. grisea* var. *thermoidea* (PDB ID: 4csi) con un valor de TM-score de 0.826 y un valor de cobertura de alineamiento de 0.827. Asimismo, el modelo 3D obtenido es muy rico en estructuras de tipo coil (aproximadamente un 71%), y solamente 19% forma β -plegadas y alrededor de un 10% corresponden a α -hélices. Estos porcentajes fueron calculados con base en el contenido de

aminoácidos de Cel7A (previamente se pensaba que correspondía a TtXynA) de *T. terrestris* Co3Bag1.



Figura 22. Modelo de la estructura 3D de Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1, (previamente pensado de TtXynA). El modelo se obtuvo utilizando el servidor I-TASSER, y se basó en el modelo 3D de Cel7A del hongo *H. grisea* var. *thermoidea* (PDB ID: 4csi). Las β -plegadas son indicadas en amarillo y las α -hélices en rojo.

9.7 Producción de TtXynA de *T. terrestris* Co3Bag1 en *P. pastoris*

9.7.1 Clonación de *ttxynA* en el vector pGAPz α A

Antes de describir los resultados obtenidos, considero que es de gran importancia, señalar que al momento de desarrollar los experimentos mostrados en este capítulo, la idea que se tenía era la de que el ORF obtenido, codificaba para la xilanasa TtXynA. Fue más adelante, cuando se comprobó una copurificación. Escrito esto, comienzo con la descripción de los resultados obtenidos.

Para producir a la xilanasa TtXynA de *T. terrestris* Co3Bag1 de manera recombinante, primeramente se amplificó la región que codifica para la proteína madura (1530 pb), utilizando un oligonucleótido directo con el sitio de corte *EcoRI* y un oligonucleótido reverso con el sitio *XbaI* y el codón “taa” de término de la traducción, con los cuales se amplificó un fragmento de 1545 nucleótidos (*mtxynA*) (**Fig. 23A**), utilizando como DNA molde pJET-*ttxynA* obtenido de la clona 3, anteriormente analizada (**Fig. 20**). Los sitios de corte seleccionados, se utilizaron para clonar por complementariedad en el vector de expresión constitutiva de *Pichia pastoris* pGAPzαA (**Fig. 23B**). Cabe señalar que este plásmido contiene la secuencia que codifica para el factor α de *Saccharomyces cerevisiae*, con el cual, la proteína que se desee expresar se envía al exterior de la célula.

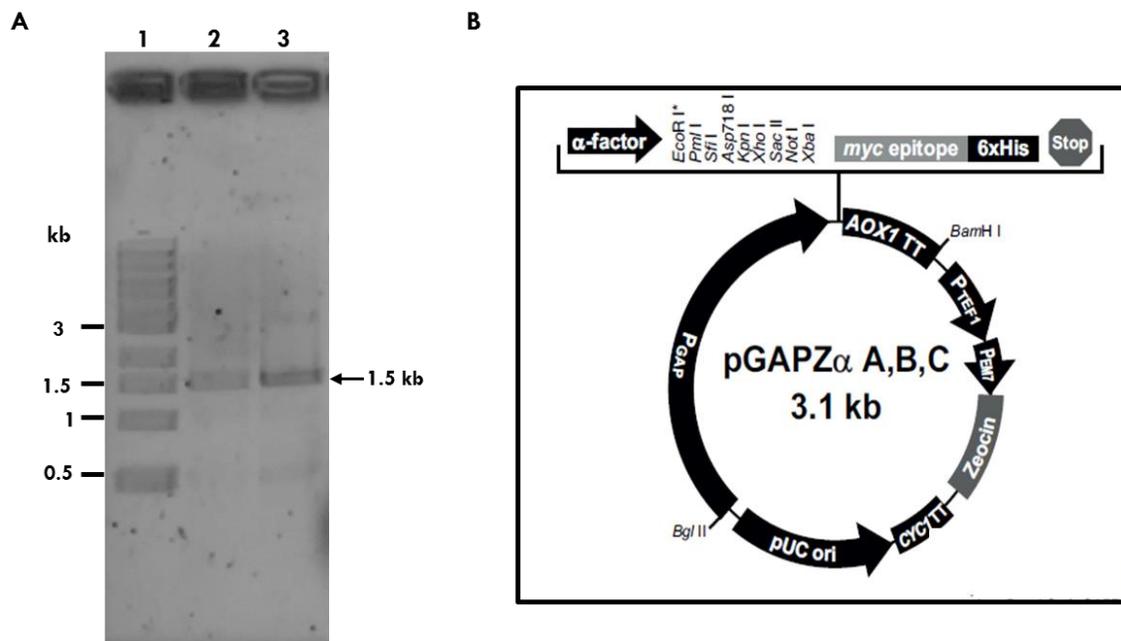


Figura 23. A) Amplificación de la región *mtxynA* de *T. terrestris* co3Bag1. **Carril 1:** 1 kb Ladder; Carriles 2 y 3: temperaturas de alineamiento de 71 y 69.3°C, respectivamente. **B)** Mapa del vector de expresión constitutiva pGAPzαA.

Posteriormente, el amplificado de poco más de 1500 pb, se purificó a partir de gel; y tanto *mtxynA* como el vector pGAPzαA se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*, y después ambas moléculas de DNA se ligaron por complementariedad, generando la construcción *pGAPzαA-XynA*. Con esta construcción se transformaron células de *E. coli* DH5α, y a las transformantes obtenidas se les extrajo el DNA plasmídico (**Fig.24A**), el cual se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* para liberar el fragmento correspondiente. Observando que de las transformantes analizadas, la clona 8 liberó el fragmento de 1.5 kb (**Fig. 24B**), confirmándose por secuenciación que corresponde a *mtxynA*.

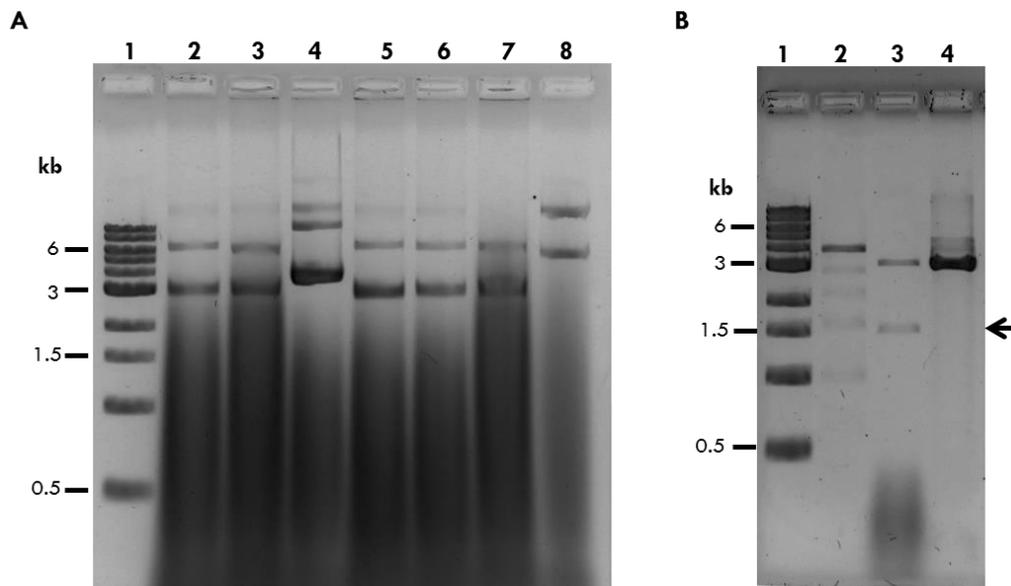


Figura 24. A) Extracción del plásmido construcción *pGAPzαA-XynA* de las transformantes obtenidas de *E. coli* DH5α. **Carril 1:** Marcador 1 kb Ladder; **Carriles 2 – 8:** DNA plasmídico de las clonas 2 a 8, respectivamente. **B)** Digestión del plásmido *pGAPzαA-ttxynA* con *EcoRI* y *XbaI*. **Carril 1:** Marcador 1kb Ladder; **Carril 2:** *pGAPzαA-ttxynA* extraído de la clona 3; **Carril 3:** *pGAPzαA-ttxynA* extraído de la clona 8. **Carril 4:** *pGAPzαA* digerido con *EcoRI* y *XbaI* como control.

9.7.2 Evaluación de la actividad xilanolítica de células de *Pichia pastoris*/pGAPzαA-ttxynA

Células de *P. pastoris* X-33 fueron transformadas con la construcción pGAPzαA-ttxynA. A continuación, en las **Tablas 5 y 6**, se muestran los datos de la actividad xilanolítica presente en el sobrenadante de cultivo y en la biomasa, respectivamente, de algunas de las diferentes transformantes evaluadas.

Tabla 5. Determinación de la actividad xilanolítica en el sobrenadante de cultivo de diferentes transformantes de *P. pastoris*/pGAPzαA-ttxynA

Transformante	U/ml	Transformante	U/ml
1	0.270 ± 0.004	23	0.273 ± 0.006
2	0.273 ± 0.016	24	0.272 ± 0.004
12	0.274 ± 0.007	25	0.272 ± 0.008
15	0.278 ± 0.001	30	0.319 ± 0.021
17	0.276 ± 0.002	31	0.349 ± 0.005
18	0.323 ± 0.018	Control	0.379 ± 0.023

Tabla 6. Determinación de la actividad xilanolítica en la biomasa de diferentes transformantes de *P. pastoris*/pGAPzαA-ttxynA

Transformante	U/ml	Transformante	U/ml
1	1.89 ± 0.04	23	1.95 ± 0.020
2	1.92 ± 0.034	24	1.97 ± 0.039
12	1.84 ± 0.002	25	1.90 ± 0.039
15	2.04 ± 0.055	30	2.48 ± 0.009
17	2.05 ± 0.058	31	2.37 ± 0.010
18	2.36 ± 0.052		
19	2.22 ± 0.010	CONTROL	2.13 ± 0.042

Cabe señalar que en este documento solo se muestran algunos de los datos obtenidos, pues se obtuvieron más de 100 colonias transformantes, que en su mayoría fueron evaluadas, pero la actividad presente en las transformantes no mostró diferencia con la actividad xilanolítica del control, que en este caso es la levadura transformada con el vector sin inserto.

9.7.3 Síntesis de *ttxynA* con optimización de codones para su expresión en *P. pastoris*.

Debido a los resultados anteriores, el gen que codifica para la xilanasas TtXynA se mandó sintetizar a la empresa GenScript, optimizando los codones para aquellos que utiliza *P. pastoris*, ya que se ha visto que algunas proteínas se logran expresar de manera eficiente en esta levadura mediante esta estrategia (Scorer *et al.*, 1993). Por otro lado, se decidió subclonar este gen en el plásmido pGAPzαB, ya que los aminoácidos que se adicionarán a la proteína recombinante en su extremo amino, por la secuencia del vector, serán alanina y glicina (**Fig. 25A**), los cuales son pequeños a comparación del glutamato y fenilalanina que se codifican al utilizar el vector pGAPzαA (**Fig. 25B**), pensando en la posibilidad de que el añadir aminoácidos relativamente grandes, pudiera afectar al plegamiento de la proteína, y por lo tanto, afectar negativamente a la actividad enzimática.

A

MetRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAE
AVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIASI
AAKEEGVSLEKREAEA**AG**QQACTLTAENHPTLSWS
KCTSGGSCTSVSGAVTIDANWRWTHQVSSSTNCYT
GNE...

B

MetRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAE
AVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIASI
AAKEEGVSLEKREAEA**EF**QQACTLTAENHPTLSWS
KCTSGGSCTSVSGAVTIDANWRWTHQVSSSTNCYT
GNE...

Figura 25. A) Clonación virtual de *txynA* en pGAPzαB. **B)** Clonación virtual de *txynA* en pGAPzαA. En rosa se señala la secuencia peptídica del factor alfa que contienen los vectores pGAPzα, en azul se señalan los aminoácidos que se agregan a la proteína recombinante; en verde se señala la secuencia que corresponde a *mtxynA*.

9.7.4 Subclonación del gen *txynA_{op}* sintético en el vector de expresión pGAPzαB.

Una vez que contamos con el gen sintético, se transformaron células de *E. coli* DH5α con el plásmido pUC-TtXynA, enviado por la empresa GenScript, el cual se originó al clonar la secuencia *txynA* con los codones optimizados (*txynA_{op}*), en el vector pUC57 (ver Anexo). Posteriormente, se seleccionaron cinco clonas y a estas se les extrajo el plásmido (**Fig. 26A**), el cual se digirió con las enzimas *Pst*I y *Xba*I, generando dos fragmentos, uno de 2.7 kb correspondiente al plásmido pUC57 y otro de 1551 pb que corresponde a *txynA_{op}* (**Fig. 26B**). El fragmento de 1551 pb, se purificó a partir de gel para su posterior subclonación en el vector pGAPzαB.

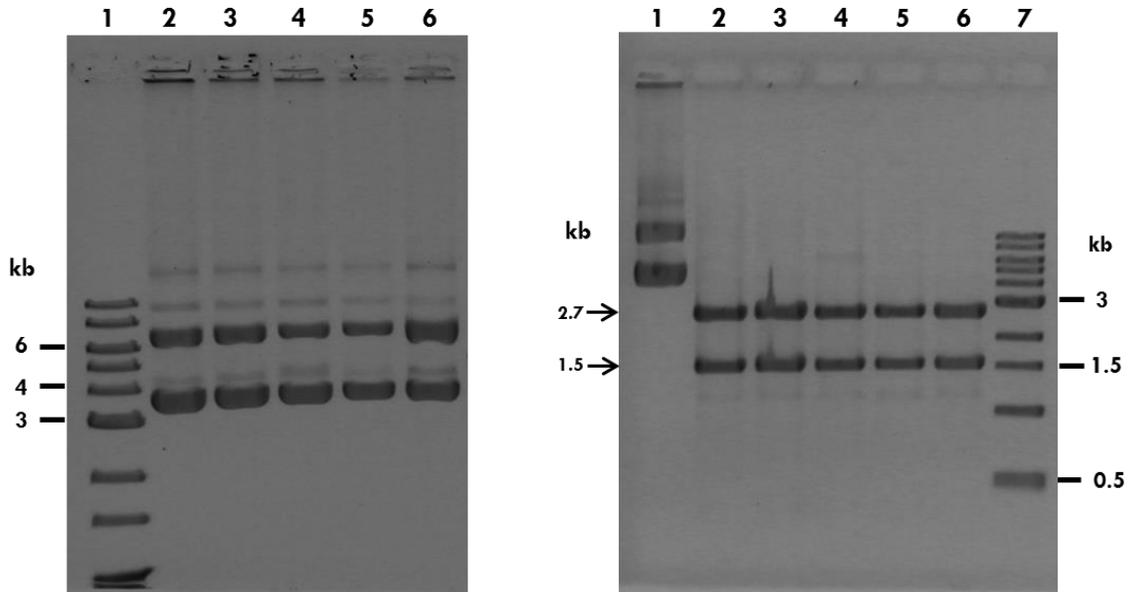


Figura 26. A) Extracción del plásmido pUC-TtXynA de clonas de *E. coli* DH5 α . **Carril 1:** 1 kb Ladder; **Carriles 2 – 6:** plásmido extraído de las clonas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. **B)** Digestión del plásmido pUC-TtXynA con las enzimas *Pst*I y *Xba*I. **Carril 1:** pUC-TtXynA sin digerir; **Carriles 2 – 6:** pUCX86 digerido, clonas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. **Carril 7:** 1 kb Ladder.

Por otro lado, se transformaron células de *E. coli* DH5 α con el vector de expresión constitutiva pGAPz α B y a cinco clonas se les extrajo el plásmido (**Fig. 27A**). Posteriormente, se digirió con las enzimas *Pst*I y *Xba*I (**Fig. 27B**). Para la reacción de ligación se utilizó el plásmido extraído de la clona 5, ya que este presentó el tamaño que corresponde al pGAPz α B linearizado (3.1 kb) y no se observó liberación de fragmentos de tamaño diferente como lo fue el caso de la clonas 2 y 4. De forma paralela, la región *ttxynA*_{op}, purificada de gel, se digirió con *Pst*I y *Xba*I (**Fig. 27B**) para subclonar por complementariedad en el vector pGAPz α B.

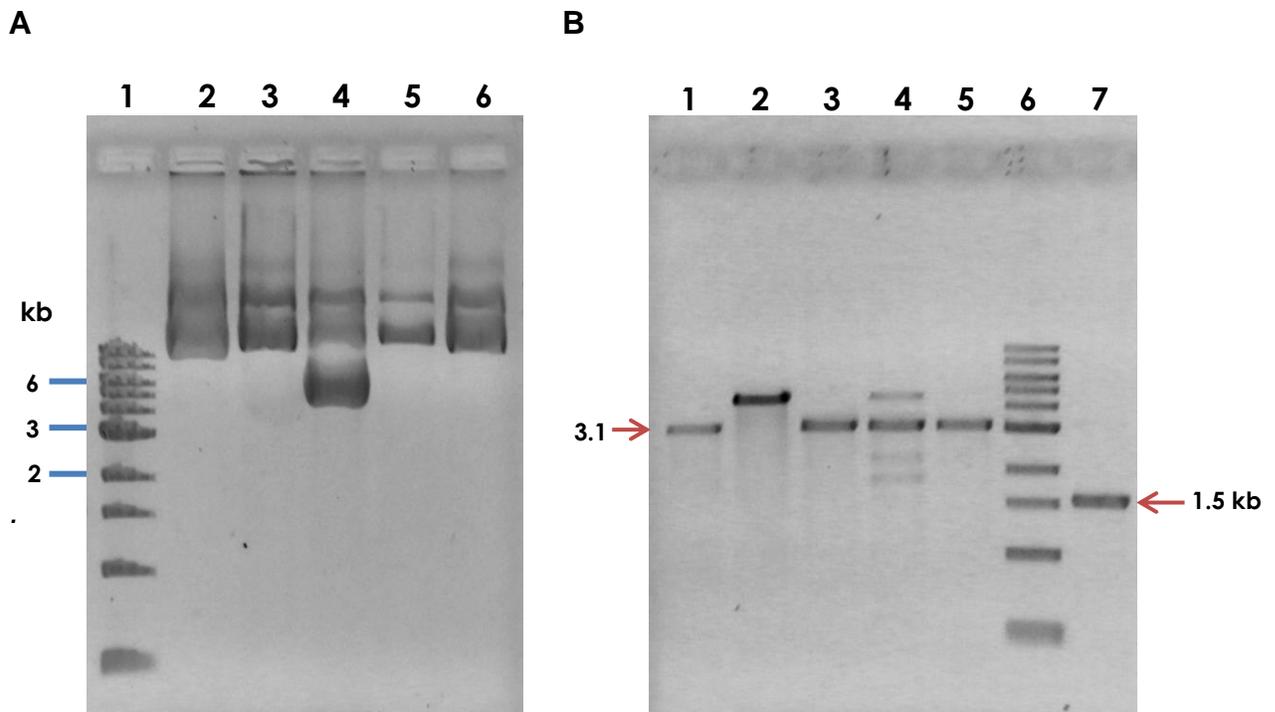


Figura 27. A) Extracción del plásmido pGAPzαB de cinco diferentes clones de *E.coli*. **Carril1:** 1 kb Ladder; **carriles 2 – 6:** pGAPzαB extraído de las clonas 4, 3, 2, 1 y 5, respectivamente. **B)** Digestión del plásmido pGAPzαB y purificación del fragmento *ttxynAop*. **Carriles 1 – 5:** pGAPzαB digerido con las enzimas *Pst*I y *Xba*I de las clonas 1 – 5, respectivamente. **Carril 6:** 1 kb Ladder; **Carril 7:** *ttxynAop* purificado de gel.

Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de ligación entre el vector pGAPzαB y *ttxynAop*, generando el plásmido pGAPzαB-*xynAop*, con el cual se transformaron células de *E. coli* DH5α. A cuatro clonas DH5α/pGAPzαB-*xynAop* se les extrajo el plásmido, se les digirió con las enzimas *Pst*I y *Xba*I, para liberar el inserto y se observó que las cuatro clonas evaluadas presentaron la construcción deseada (**Fig. 28A**). Con dicha construcción, se transformaron células electrocompetentes de *P. pastoris* X-33, obteniéndose colonias transformantes seleccionadas en medio YPD con Zeocina a una concentración final de 200 µg/mL (**Fig. 28B**).

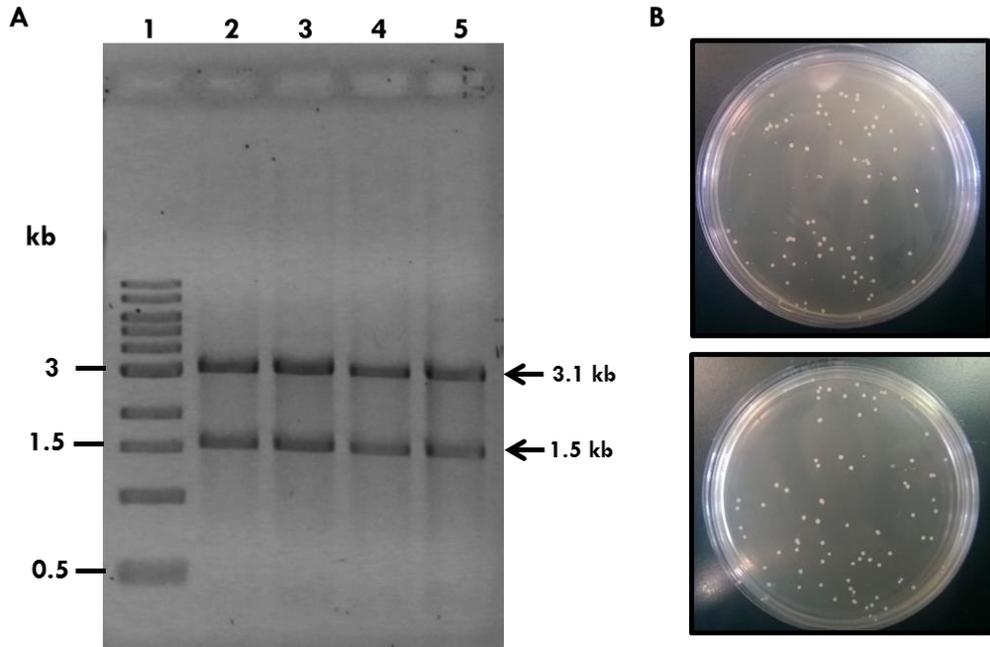


Figura 28. A) Digestión de pGAPzαB-*xynAop*, con *PstI* y *XbaI*, extraído de diferentes clonas de *E. coli* DH5α. **Carril1:** 1 kb Ladder; **Carriles 2 – 5:** pGAPzαB-*ttxynAop* digerido con *PstI* y *XbaI*, extraído de las clonas 1, 3, 4 y 5. **B)** Transformantes de *P. pastoris*, obtenidas al transformarlas con el plásmido pGAPzαB-*ttxynAop* y seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia de Zeocina 200 µg/mL.

9.8. Producción de la xilanasa TtXynA en *P. pastoris*-X33 transformada con pGAPzαB-*ttxynAop*

9.8.1 Evaluación de la actividad xilanolítica de células de *P. pastoris*-pGAPzαB-*ttxynAop*

Las transformantes de *P. pastoris*/pGAPzαB-*XynAop* obtenidas, se sembraron en medio YPD-Zeo (500 µg/mL) y se incubaron a 29°C durante 3 – 5 días. Después de este tiempo, a las transformantes que presentaron mayor crecimiento a esa concentración de antibiótico, se les evaluó la actividad xilanolítica en el sobrenadante a las 48 y 72 h de cultivo.

Debido a que se han obtenido resultados variables en cuanto a los rendimientos de proteína recombinante producida, evaluando a la glucosa y al glicerol como fuentes de carbono en la expresión guiada por el promotor GAP (Varnai *et al.*, 2014), a

cuarenta transformantes obtenidas se les determinó actividad xilanolítica (**Fig. 29 y 30**) utilizando los medios YPD y YPG, los cuales contienen glucosa y glicerol como fuentes de carbono, respectivamente. En ambas gráficas se puede apreciar que no hubo diferencia entre la actividad xilanolítica en sobrenadante producida por las diferentes transformantes evaluadas respecto a la del control al utilizar glucosa o glicerol como fuente de carbono.

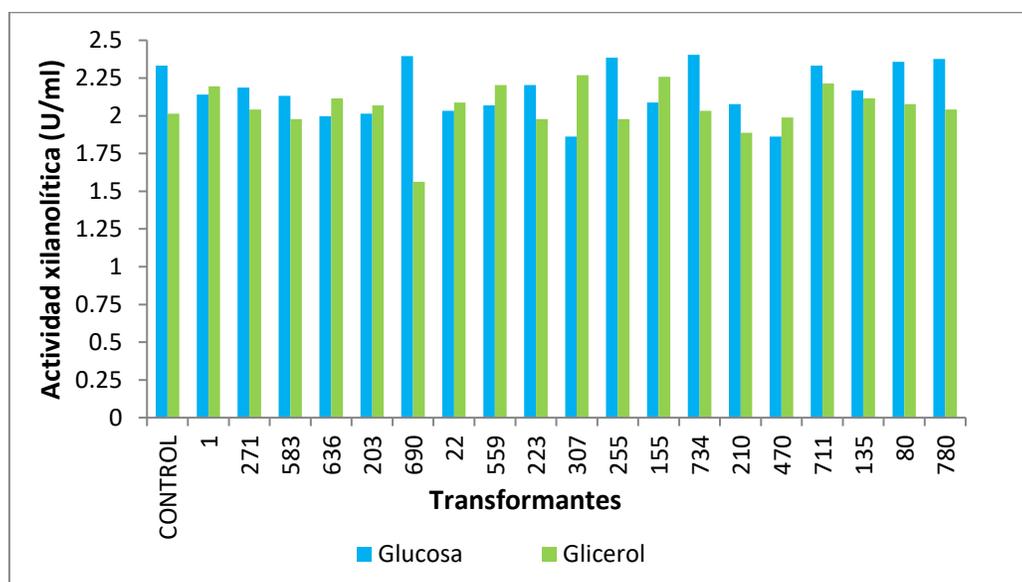


Figura 29. Evaluación de la actividad xilanolítica en el sobrenadante a las 48 h de cultivo de diferentes transformantes de *P. pastoris/pGAPZaB-ttxynA_{op}* utilizando glucosa y glicerol como fuentes de carbono.

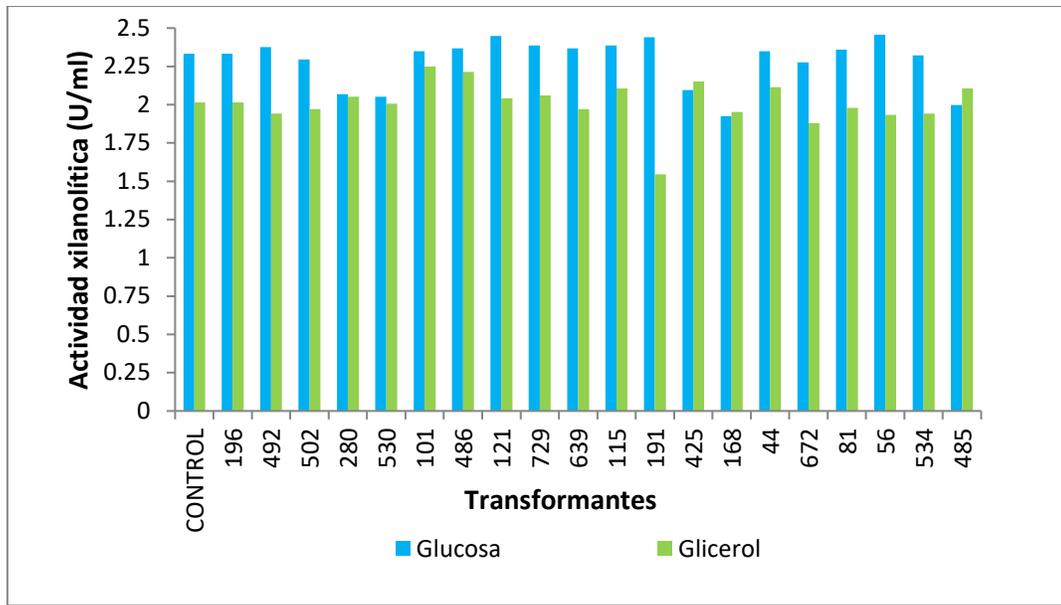


Figura 30. Evaluación de la actividad xilanolítica en el sobrenadante a las 48 h de cultivo de diferentes transformantes de *P. pastoris/pGAPZaB-ttxynA_{op}* utilizando glucosa y glicerol como fuentes de carbono.

Debido a los resultados anteriores, y a que no se observó un efecto de la fuente de carbono sobre la producción de la enzima recombinante, las transformantes que se evaluaron posteriormente se cultivaron en YPD. Las **Figuras 31, 32 y 33** muestran que tampoco hubo diferencia entre la actividad xilanolítica de diferentes transformantes evaluadas respecto a la del control, por lo que aparentemente, la proteína no se está expresando.

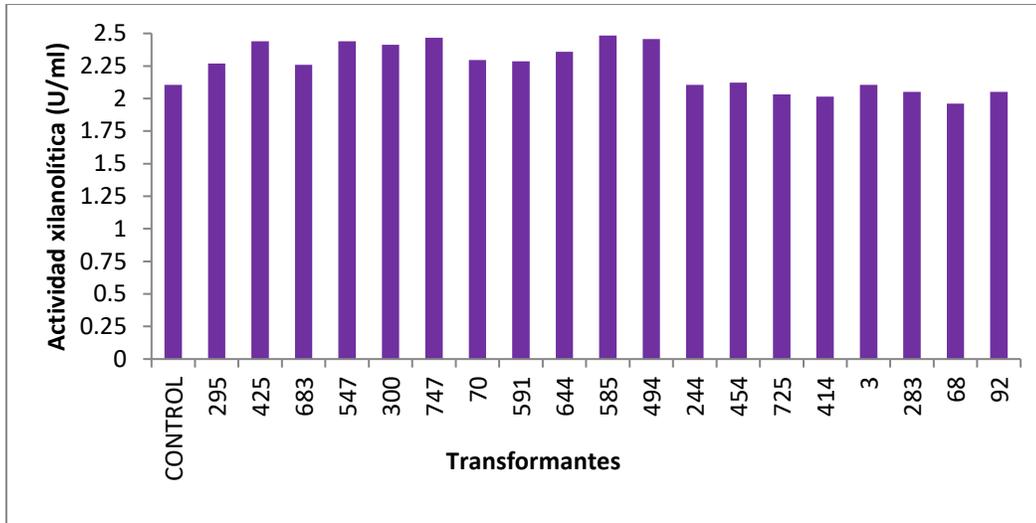


Figura 31. Evaluación de la actividad xilanolítica en el sobrenadante a las 48 h de cultivo de diferentes transformantes de *P. pastoris/pGAPZαB-ttxynA_{op}*

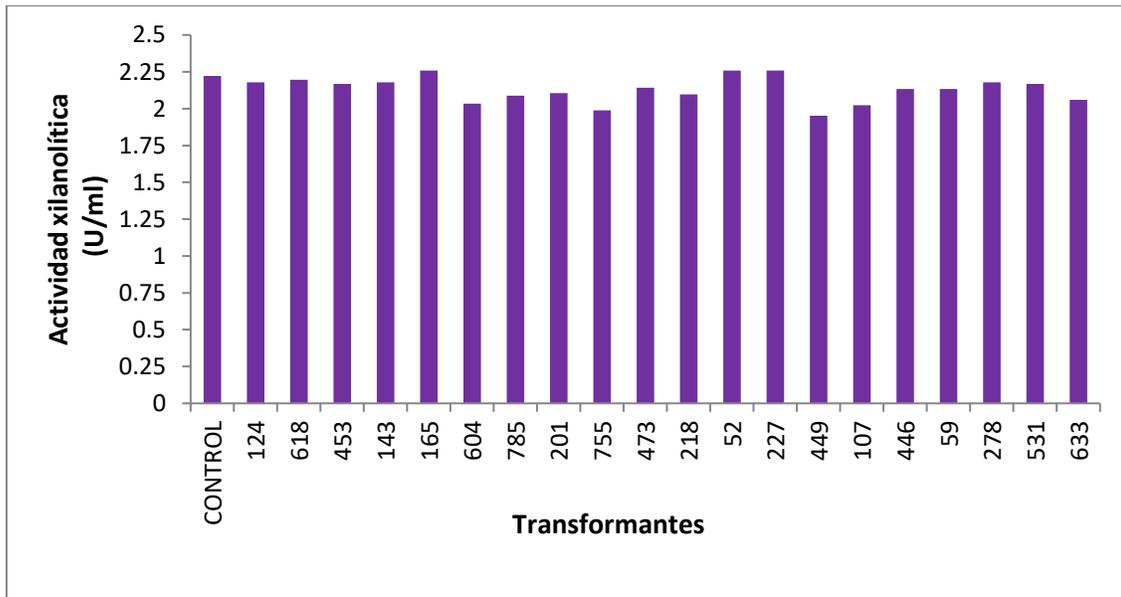


Figura 32. Evaluación de la actividad xilanolítica en el sobrenadante a las 48 h de cultivo de diferentes transformantes de *P. pastoris/pGAPZαB-ttxynA_{op}*.

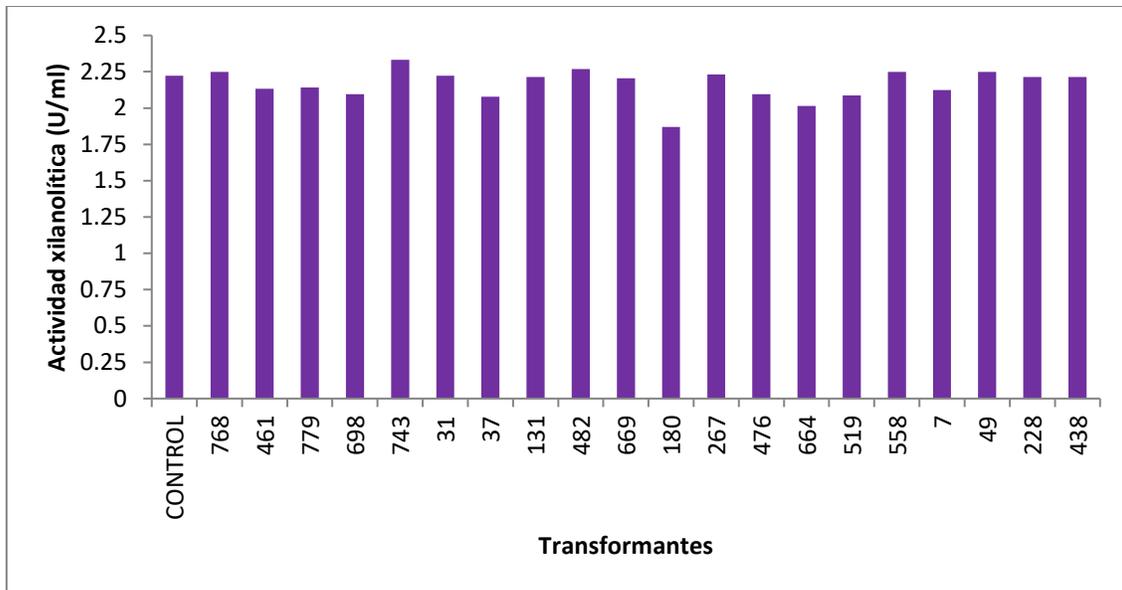


Figura 33. Evaluación de la actividad xilanólítica en el sobrenadante a las 48 h de cultivo de diferentes transformantes de *P. pastoris/pGAPZαB-ttxynA_{op}*.

Asimismo, los sobrenadantes de diferentes transformantes se analizaron mediante una SDS-PAGE 12% teñidos con plata (**Figura 34**). En ninguno de los sobrenadantes analizados se observó el enriquecimiento de alguna de las bandas proteicas que pudiera indicar la producción de Xyl86, comparándola con el sobrenadante del control, sugiriendo que la xilanasa no se está produciendo. Cabe señalar que la cepa control es *P. pastoris*-X33, transformada con el vector pGAPZαB sin inserto.

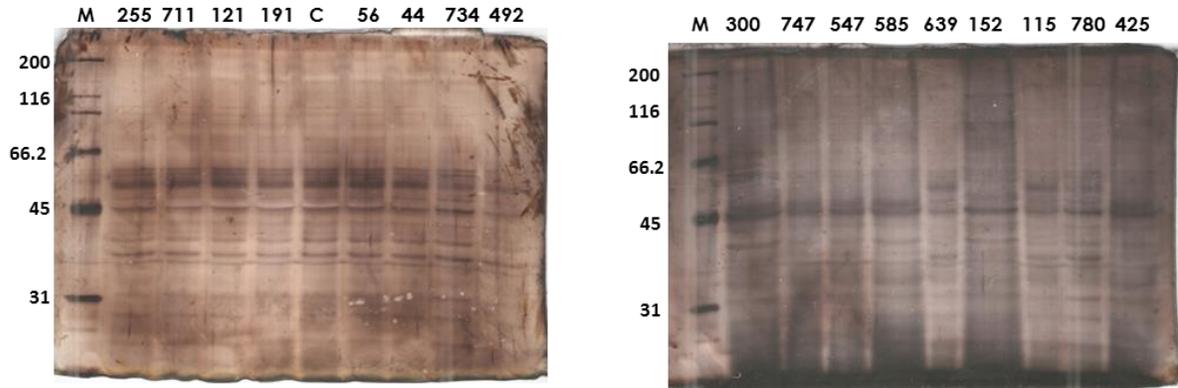


Figura 34. Análisis electroforético de los sobrenadantes de diferentes transformantes después de 48 h de cultivo. **Carriles M:** marcador de peso molecular; el número de carril indica el número de la transformante analizada. Carril C: sobrenadante de la cepa control (*P.pastoris/pGAP α B-ttxynA_{op}*).

Además del sobrenadante de las 48 h de cultivo, también se analizó la biomasa y la proteína intracelular de algunas de las transformantes (**Figura 35**), en donde tampoco se observó una diferencia en el perfil proteico respecto al control.

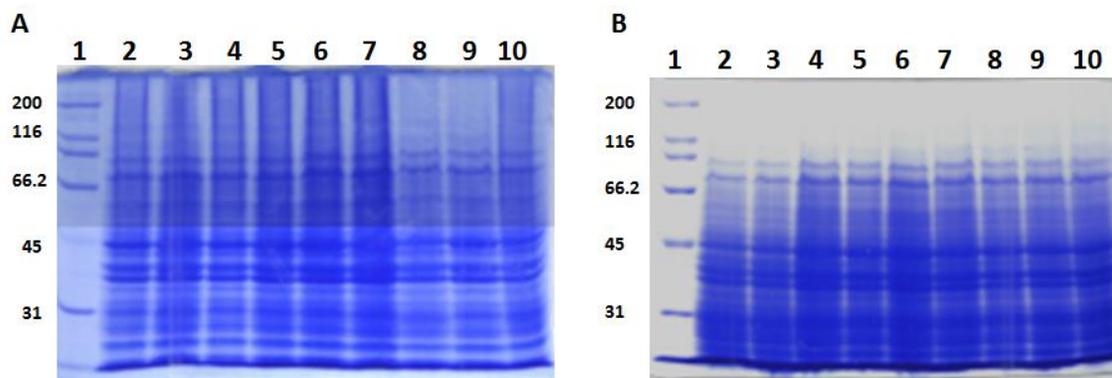


Figura 35. A) Análisis electroforético de la biomasa de diferentes transformantes de *P. pastoris/pGAPzαB-ttxynA_{op}*. **Carril 1:** Marcador de peso molecular. **Carriles 2 -6:** Transformantes 56, 295, 307, 547 y 347 (48 h de cultivo), respectivamente. **Carril 7:** Control; **Carriles 8 y 9:** Proteína intracelular de las transformantes 307 y 56 (24 h), respectivamente. **Carril 10:** Biomasa de la transformante 307 (24 h). **B)** Análisis electroforético de la proteína intracelular a las 48 h de cultivo de diferentes transformantes de *P. pastoris/pGAPZαB-ttxynA_{op}*. **Carril 1:** Marcador de peso molecular. **Carril 2:** Control; **Carriles 3 – 10:** Transformantes 56, 295, 307, 547, 747, 280, 583 y 690, respectivamente.

Por otro lado, se eligieron al azar cinco de las transformantes para verificar la presencia del gen *xyI86* mediante “PCR-colony” utilizando los oligonucleótidos del vector pGAPzαB (**Fig. 36**), en donde se puede observar la amplificación de un fragmento de tamaño esperado. Asimismo, se confirmó, mediante secuenciación, que este producto de amplificación corresponde al gen *xynA_{op}*.

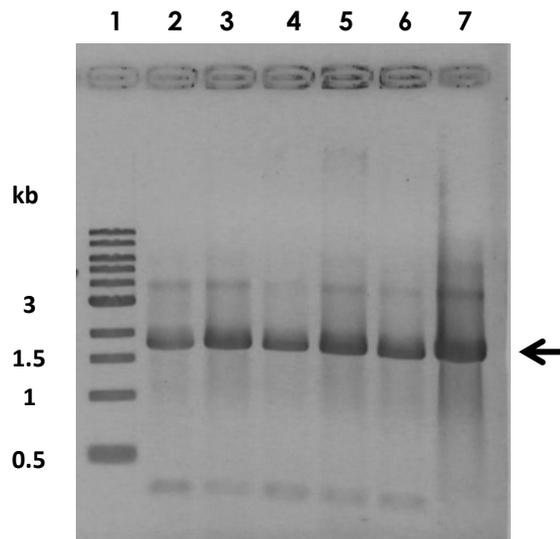


Figura 36. “PCR-colony” de las transformantes *P. pastoris/pGAPzαB-ttxynA_{op}* 56, 307, 295, 547, 747. **Carril 1:** 1 kb Ladder; **Carril 2:** Clona 747; **Carril 3:** Clona 547; **Carril 4:** Clona 307; **Carril 5:** Clona 295; **Carril 6:** Clona 56; **Carril 7:** Vector pGAPzαB-XynAop como DNA molde.

Debido a que las cinco transformantes evaluadas, presentaron el gen *ttxynA_{op}*, se les analizó electroforéticamente el sobrenadante de 24, 48 y 72 h de cultivo concentrado seis veces, así como al control, utilizando un centrifugón con una membrana de corte de 10 kDa. Sin embargo, no se observó la sobreexpresión de alguna proteína, al compararlas con el control (**Fig. 37**).

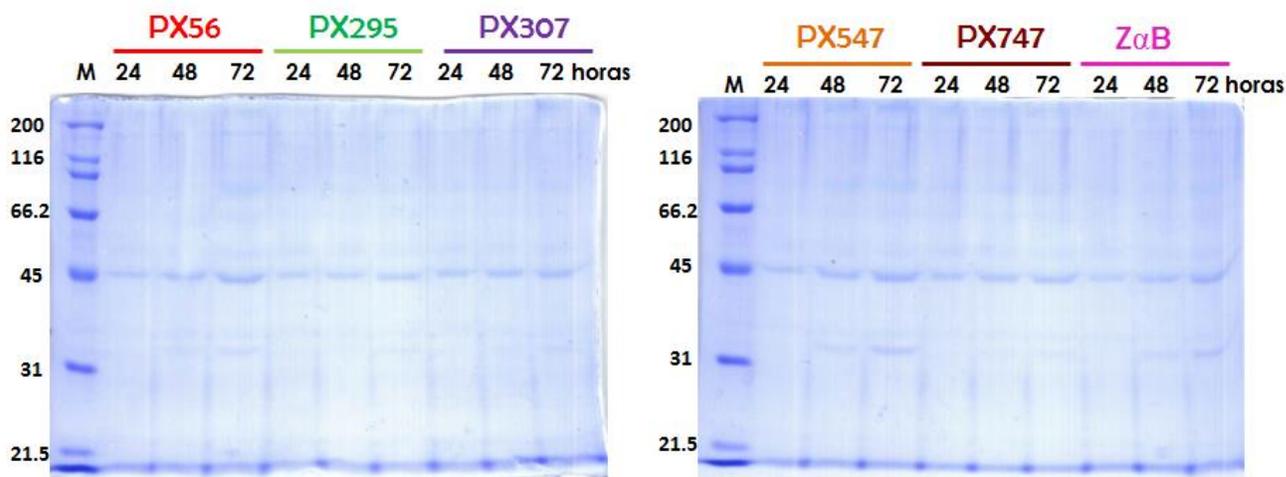


Figura 37. Análisis electroforético del sobrenadante de cultivo de las 24, 48 y 72 h de las transformantes pGAPzαB-*ttxynA_{op}* 56, 295, 307, 547, 747 y control.

9.9 Subclonación del gen *xynAop* en el vector pPiczαB.

Debido a que no se observó producción ni actividad de la xilanasas TtXynA de *T. terrestris* Co3Bag1 utilizando el vector de expresión pGAPzαB, se optó por evaluar el vector de expresión inducible por metanol pPICzαB, cuyo sitio múltiple de clonación, está formado por los mismos sitios de restricción en el SMC del pGAPzαB. Por lo que el gen *ttxynA_{op}*, se subclonó en dicho vector, generando la construcción pPICzαB-*ttxynAop*. Con este plásmido, se transformaron células de *E. coli* DH5α, y a partir de algunas colonias transformantes se obtuvo DNA plasmídico (**Fig. 38A**). Posteriormente, este plásmido se digirió con las enzimas *Pst*I y *Xba*I para liberar el fragmento de 1.5 kb correspondiente a *ttxynAop* (**Fig. 38B**), en donde se puede apreciar que las cinco clonas evaluadas presentaron el inserto.

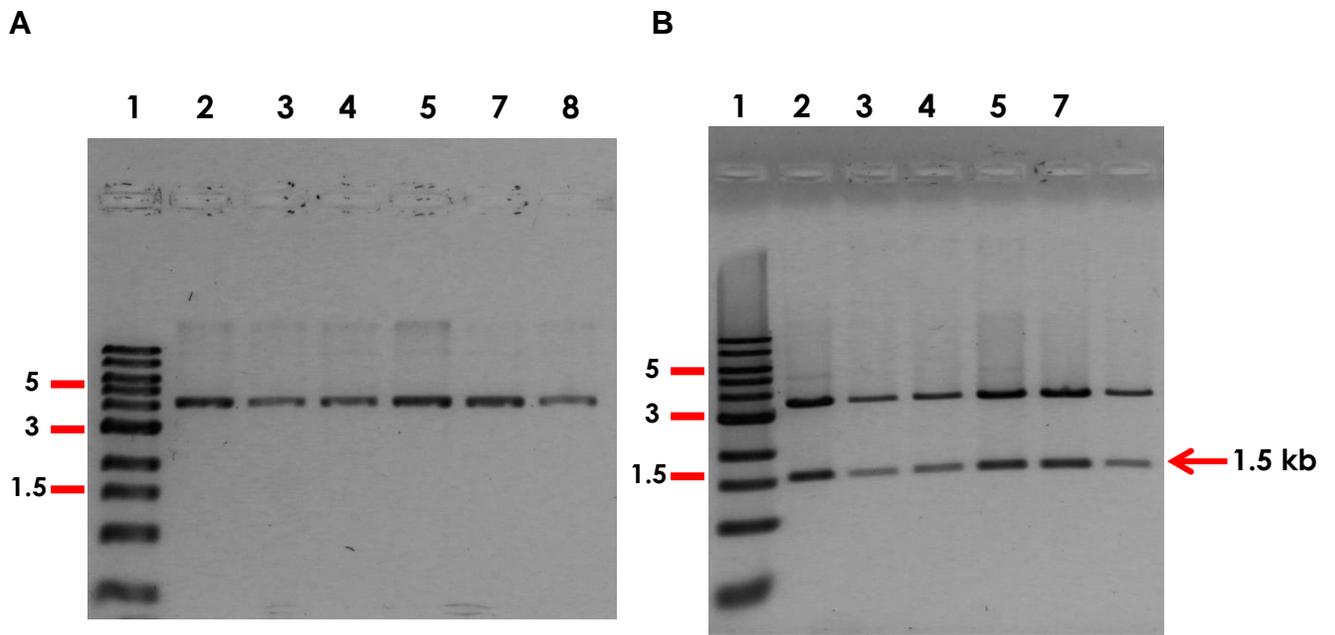


Figura 38. A) DNA plasmídico extraído de *E. coli*/ pPICzαB-*txynA_{op}*. **Carril 1:** 1 kb DNA Ladder. **Carriles 2-6:** DNAp extraído de las clona 1-5, 7 y 8, respectivamente. **B)** Digestión de pPICzαB-*txynA_{op}* con *Pst*I y *Xba*I, de las diferentes clonas evaluadas de *E. coli*/ pPICzαB- *txynA_{op}*. **Carril 1:** 1 kb DNA Ladder. **Carriles 2-6:** DNAp extraído de las clona 1-5, 7 y 8, respectivamente.

Una vez corroborada la construcción, células competentes de *P. pastoris* X-33 fueron transformadas por electroporación, y cultivadas en medio YPDS con zeocina 200 µg/ml, incubándose a 29°C durante 2 - 3 días.

Después de este tiempo, se obtuvieron 42 transformantes *P. pastoris*/ pPICzαB-*xynA_{op}*, y se sembraron en el medio BMGY, el cual contiene glicerol como fuente de carbono, y se les incubó a 29°C durante 48 h. Posteriormente, toda la colonia, de cada transformante, se sembró en el medio sólido mínimo con metanol (MM), para inducir la producción de la enzima, y suplementado con 0.3% de xilano de haya para evaluar la actividad xilanolítica en placa; se incubaron a 29°C durante 24 h. Pasado este tiempo, las placas se incubaron a 45°C durante 2 h y se les añadió rojo Congo al 1%, haciendo lavados con 1 M de NaCl, para revelar halos de hidrólisis. Asimismo, cabe señalar, que en este ensayo se utilizó como control positivo la cepa de *P. pastoris* / pPICzαB-*xyn11A* (Cayetano-Cruz *et al.*, 2016), y como se puede observar

en la **Fig. 39**, ninguna de las transformantes obtenidas presentó un halo de hidrólisis, a comparación de la cepa utilizada como control positivo, sugiriendo que TtXynA no está siendo producida por *P. pastoris*/pPICzaB-ttxynA_{op} derivadas de la cepa X-33.

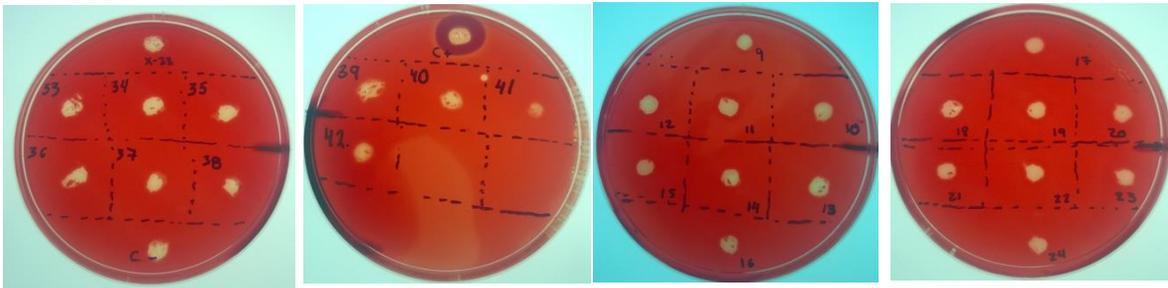


Figura 39. Evaluación de la actividad xilanolítica, en placa, de varias transformantes *P. pastoris*/pPICzaB-ttxynA_{op}. Los controles negativos utilizados fueron la cepa X-33 y *P. pastoris*-pGAPzaB (C⁻); Control positivo (C⁺) *P. pastoris*-pPICzaB-xyn11A.

9.10 Evaluación de la síntesis de TtXynA transformando *P. pastoris* GS115 y KM71H con la construcción pPICzaB-xynA_{op}

Debido a que no se observó actividad xilanolítica en las transformantes *P. pastoris*/pPICzaB-ttxynA_{op}, derivadas de la cepa X-33, se decidió evaluar la expresión de la xilanasas en las cepas de *P. pastoris* GS115 y KM71H, pues existen varios reportes, en donde se señala la producción exitosa de enzimas recombinantes, utilizando estas cepas (Ahmed *et al.*, 2009). Por lo anterior, ambas cepas, se transformaron por electroporación con la construcción pPICzaB-ttxynA_{op}, y las colonias transformantes se seleccionaron, en medio YPDS con 500 µg/mL de Zeocina. A las transformantes obtenidas, se les cultivó en medio BMMY líquido, el cual contiene metanol al 1% para inducir la producción de la enzima.

Dado que, para el momento en que se realizaron estos experimentos ya se había confirmado que la cepa de la que se aisló la enzima, corresponde a *T. terrestris*, y que la enzima purificada y secuenciada presentó 97% de identidad con la enzima

Cel7A, que pertenece a la familia 7 de las glicosil-hidrolasas, y que dicha familia está conformada solo por celulasas, se realizaron cinéticas de actividad celulolítica y xilanolítica de las transformantes obtenidas con las cepas KM71H (**Fig. 40**) y GS115 (**Fig. 41**), pensando en que el gen clonado codifique para una celulasa bifuncional. Observando que en las diferentes transformantes evaluadas y derivadas de la cepa KM71H, no se observó una diferencia de actividad celulolítica ni xilanolítica, respecto a la cepa control, *P. pastoris* KM71H (KM⁻) sin transformar. No siendo así para las transformantes, derivadas de la cepa GS115, las cuales mostraron actividad celulolítica al menos tres veces mayor, comparada al control (**Fig. 41A**), y no mostraron diferencia de la actividad xilanolítica, respecto al control (**Fig. 41B**). Señalando que probablemente, la proteína TtXynA nativa, se copurificó con la celulasa Cel7A, y lo que se secuenció y clonó fue el gen *cel7A*.

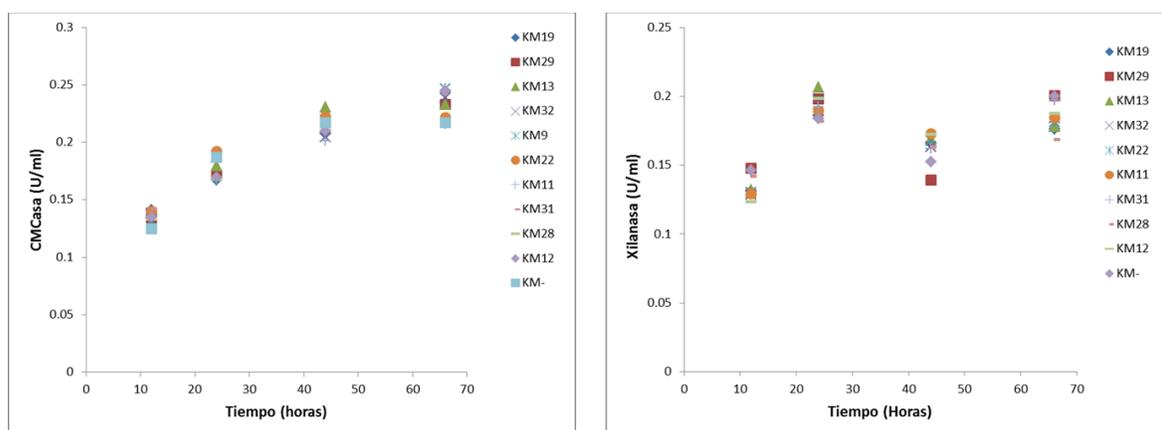


Figura 40. Cinética de actividad celulolítica (**A**) y xilanolítica (**B**) de las transformantes *P.pastoris* pPICzαB-*txynA*_{op}, derivadas de la cepa KM71H, utilizando 0.3% de CMC en amortiguador de acetatos 50mM y 0.3% de xilano de haya en amortiguador de citratos 50 mM, respectivamente. La reacción enzimática se incubó a 55°C por 20 min. KM⁻ es el control negativo.

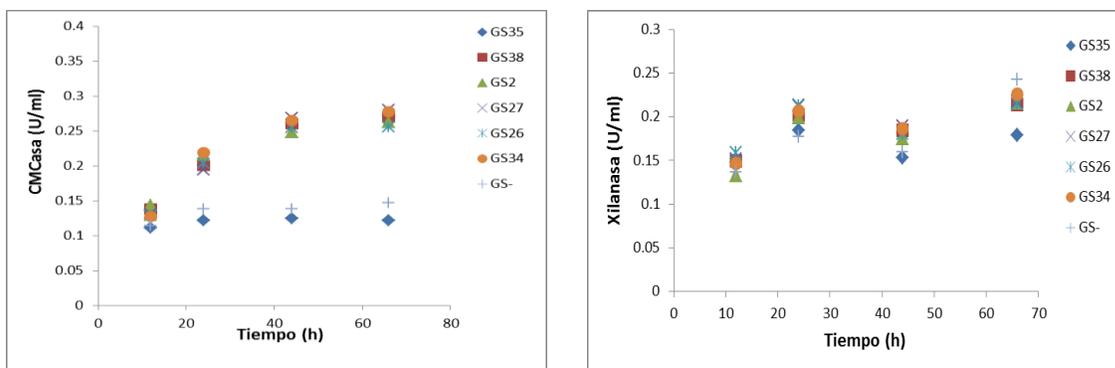


Figura 41. Cinética de actividad celulolítica (A) y xilanolítica (B) de las transformantes *P.pastoris* pPICzαB-*txynA_{op}*, derivadas de la cepa GS115, utilizando 0.3% de CMC en amortiguador de acetatos 50 mM y 0.3% de xilano de haya en amortiguador de citratos 50 mM, respectivamente. La reacción enzimática se incubó a 55°C por 20 min. KM⁻ es el control negativo.

En este punto, es de gran importancia señalar que a partir de este momento, el gen que se había nombrado anteriormente como *txynA_{op}*, se renombró como *cel7A_{op}*.

Con el fin de producir una mayor cantidad de proteína Cel7A, se preparó un mayor volumen de cultivo de las transformantes 27 y 35 de *P. pastoris* pGAPzαB- *cel7A_{op}*, el cual fue de 50 mL de medio BMMY contenidos en matraces bafleados, sin embargo, al aumentar el volumen de cultivo no se observó diferencia entre la actividad de las transformantes evaluadas respecto al control, por lo que este experimento no es concluyente.

Asimismo, es de importancia mencionar que también se evaluaron transformantes *P. pastoris* pPICzαA-*cel7A*, es decir, transformadas con la secuencia nucleotídica nativa de *T. terrestris* Co3Bag1, sin obtener clonas que presentaran actividad xilanolítica y celulolítica, respecto a la cepa control *P. pastoris*/pPICzαA (datos no mostrados).

Por otro lado, el M. en C. Alejandro Santiago, nos apoyó en la evaluación de la actividad celulolítica de las diferentes transformantes de *P. pastoris* pGAPzαB-*cel7A_{op}*, y lo que se observó fue que todas las cepas transformantes y el control negativo, presentaban actividad CMCasa similar *in vitro* (datos no mostrados).

Debido a lo observado anteriormente, se evaluó la actividad celulolítica extracelular intrínseca de *P. pastoris*, mediante un análisis zimográfico, de las cepas X-33, GS115 y KM71H, cultivadas en glicerol y en metanol como fuentes de carbono, copolimerizando el CMC en el gel de poliacrilamida.

Aunque se ha reportado que *P. pastoris* no secreta al medio proteínas con actividad lignocelulolítica (Varnai *et al.*, 2014), el análisis zimográfico confirmó lo observado al medir actividad *in vitro*, que la levadura produce enzimas con actividad CMCasa en presencia de glicerol (**Fig. 42A**) y de metanol (**Fig. 42B**), y aparentemente, en menor proporción cuando el metanol es la fuente de carbono. Por lo que, en el caso de la expresión constitutiva, la actividad de Cel7A recombinante podría estar siendo enmascarada por la propia actividad del hospedero, por lo tanto, es necesario hacer otros experimentos para confirmar si Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1, está siendo producida por *P. pastoris*.

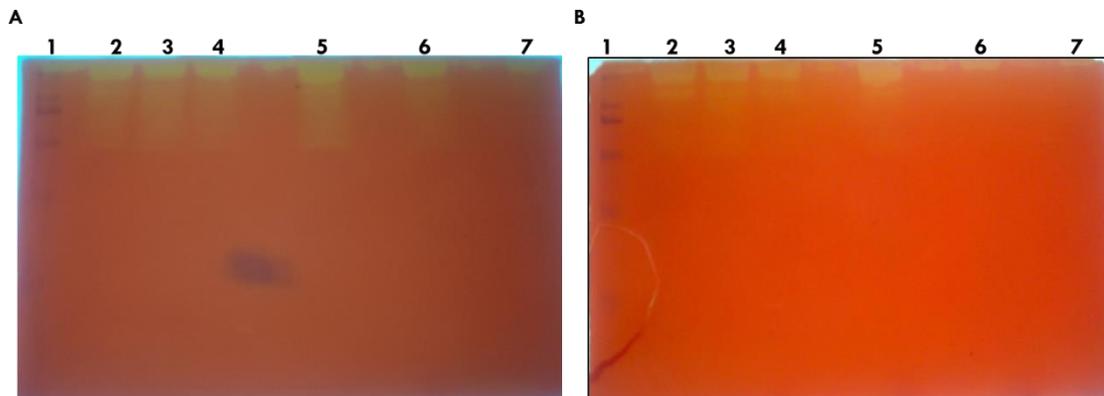


Figura 42. Análisis zimográfico de la actividad celulolítica de diferentes cepas de *P. pastoris* cultivadas en presencia de glicerol (**A**) y de metanol (**B**) como única fuente de carbono. En **A**) **Carril1:** marcador de peso molecular; carriles 2-4: cepas X-33; KM71H y GS115, respectivamente. **Carriles 5 y 6:** Transformantes 27 y 35 de *P. pastoris/pPICzaB-cel7A_{op}*, respectivamente; **carril 7:** *P. pastoris/pPICzaB*. **B)** **Carril1:** marcador de peso molecular; carriles 2 y 3: cepas X-33 y KM71H, respectivamente. **Carriles 4 y 5:** Transformantes 35 y 27 de *P. pastoris/pPICzaB-cel7A_{op}*, respectivamente. **Carriles 6 y 7:** cepas GS115 y *P. pastoris/pPICzaB*.

9.11 Análisis de identidad de TtXynA de *T. terrestris* Co3Bag1

Con la finalidad de conocer la identidad de la xilanasa TtXynA, se volvió a secuenciar parcialmente a la banda de 82 kDa en donde se encuentran co-purificadas TtXynA y Cel7A. Esta vez, la muestra fue procesada en la Unidad de Proteómica del INMEGEN, identificando los péptidos siguientes: AWDVVNEAIADDGTWR y TCQKLNWYYQCL. El análisis bioinformático de ambos péptidos mostró un 100% de identidad con una β -xilanasas de *T. terrestris* NRRL8126 (THITE_2116333; UniprotKB ID: G2R5G6) perteneciente a la familia 10 de las glicosil-hidrolasas. El primer péptido, también mostró un 92% de identidad con una β -xilanasas de *Achaetomium* sp. Xz-8 (UniProtKB accession number V9XZ28); mientras que el segundo péptido mostró un 92% de identidad con una β -xilanasas del hongo *Scedosporium apiospermum* (Acession number A0A084GH03). Cabe señalar, que la secuencia del segundo péptido también corresponde al extremo carboxilo terminal de la proteína y su secuencia es 100% idéntica al de la proteína Cel7A de *T. terrestris* NRRL8126, previamente identificada y secuenciada por genética reversa en este trabajo. Dicha secuencia, pertenece a una región conservada de un dominio de unión a carbohidrato de tipo fúngico y de la familia 1 (CBM1).

Estos resultados, sugieren que los péptidos encontrados pertenecen a TtXynA y esta es similar a la β -xilanasas de *T. terrestris* NRRL8126, UniProt ID: G2R5G6, la cual es una proteína con un punto isoeléctrico y peso molecular teóricos de 5.48 y 44.3 kDa, conformada por 414 residuos de aminoácidos y que presenta un péptido señal probable, conformado por los primeros 18 residuos de aminoácidos de la proteína.

En la **Figura 43**, se muestra la secuencia de la β -xilanasas de *T. terrestris* NRRL8126 (UniProt ID: G2R5G6), señalando, en amarillo, a los dos péptidos que se identificaron al volver a secuenciar parcialmente a la proteína.

atgcgctcccaggctgtgtgggcccgcgataactcgcgccggccaccgtgtggccacgctc
 M R S Q A V W A A I L A P A T V S A T L
 aacgacctcgccgtccggggccgggtcaagtacttcggcacctgcctcagcgagagttac
 N D L A V R A G L K Y F G T C L S E S Y
 atcaacagcgaatagccagtatgcccgcctcatcaatgacaagaccgagttcggcgggctc
 I N S D S Q Y A A L I N D K T E F G G L
 gtgcctgagaacggcatgaagtgggacgccaccgagcccagccagggccagttcagcttc
 V P E N G M K W D A T E P S Q G Q F S F
 agccagggcgacatcacggogaacacggccaagaagaacggccaggtcctgcgctgccac
 S Q G D I T A N T A K K N G Q V L R C H
 accctggtctggtacagccagcttcaggatgggtgacgtcgggctcctggaccaggagc
 T L V W Y S Q L P G W V T S G S W T R S
 acgctgcagtcggtcatgcagacgcacatcacgaacgtcatgggccactacaagggccag
 T L Q S V M Q T H I T N V M G H Y K G Q
 tgctatgctgggacgtggtgaacgaggccatcgccgacgacggcacgtggcgcaccagc
 C Y A W D V V N E A I A D D G T W R T S
 gtgttctacaacaccttctcgaccgactacatcccgttgccttcaacatcgccaagacg
 V F Y N T F S T D Y I P L A F N I A K T
 gccgacccaacgccaagctgtactacaacgactacaacctcgagtacaacggcgccaag
 A D P N A K L Y Y N D Y N L E Y N G A K
 acggacacggccgtgcagctcgtgcagctcgtgcagtcggccggcgccccatcgacggc
 T D T A V Q L V Q L V Q S A G A P I D G
 gtcggcttcaggggccacctgatcgtcggcagcacgcccggccgacgagcctggcgacc
 V G F Q G H L I V G S T P G R S S L A T
 gcgctcaagegcttcaccgccctcggcctggaggtggcctacacggagctcgacatccgg
 A L K R F T A L G L E V A Y T E L D I R
 cactccagcctgccgcccgtccacctcggcgctcgcgacgcagggcaacgacttcgccaac
 H S S L P P S T S A L A T Q G N D F A N
 gtggctcggctcgtgcctcgcagctcgcgggtgcatcggcggtgaccgtctggggcggtgacc
 V V G S C L D V A G C I G V T V W G V T
 gacaagtactcgtggatcccgcagaccttcccggggcggcgacgccctgctctacgac
 D K Y S W I P Q T F P G A G D A L L Y D
 gacaactacaacaagaagcccgcctggacctcgggtctcgtccgtcctcgcggccaaggcc
 D N Y N K K P A W T S V S S V L A A K A

Figura 43. Secuencia génica y aminoacídica de la β -1,4- xilanasas, de *T. terrestris* NRRL8126, perteneciente a la familia 10 de las glicosilhidrolasas. En amarillo se señalan los péptidos encontrados al secuenciar parcialmente a TtXynA, mientras que en verde, anaranjado y azul se señalan: las secuencias del péptido señal, el dominio catalítico y el dominio de unión a carbohidrato, respectivamente.

```

accagcccggccgctcgtcgtccaccaccctcaccaccgcatcaccacggccccaacc
T S P P A S S S T T L T T V I T T A P T
tccaccccgacgagcaccaccgcccaccaccacgctcgtcctcgaacggcgcccagcag
S T P T S T T A P T T T S S S N G A Q Q
accactggggccagtgcggtggcattggctggaccggcgctacgcagtgccagagcccg
T H W G Q C G G I G W T G A T Q C Q S P
tacacctgccagaagctgaacgactggtactatcagtgccctgtaa
Y T C Q K L N D W Y Y Q C L -

```

(continuación) **Figura 43.** Secuencia génica y aminoacídica de la β -1,4- xilanasas, de *T. terrestris* NRRL8126, perteneciente a la familia 10 de las glicosilhidrolasas. En amarillo se señalan los péptidos encontrados al secuenciar parcialmente a TtXynA, mientras que en verde, anaranjado y azul se señalan: las secuencias del péptido señal, el dominio catalítico y el dominio de unión a carbohidrato, respectivamente.

9.12 Producción de Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1 en *E. coli*

Simultáneamente, se evaluó la producción de Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1 en células de *E. coli*, debido a que se ha reportado la producción de enzimas fúngicas utilizando a esta bacteria como sistema de expresión heteróloga (Ahmed *et al.*, 2009). Para lo cual, *cel7A* se clonó en los vectores de expresión inducible pET38b+ y pQE30, obteniendo las construcciones pET-*cel7A* y pQE30-*cel7A*, con las cuales, células de *E. coli* BL-21 fueron transformadas.

Varias clonas fueron obtenidas, y se les evaluó la capacidad de producir a Cel7A, al inducir el cultivo con IPTG. Después de cinco horas de inducción, la parte soluble de los cuerpos de inclusión, de las clonas *E. coli* /pET-*cel7A*/ (**Fig. 44A**) y *E. coli* /pQE30-*cel7A*/ (**Fig. 44B**), fue analizada en un SDS-PAGE al 10%. En ambos tipos de clonas, se observó una proteína de 57 kDa, presente en las células inducidas, y ausente en las no inducidas, correspondiente al peso molecular teórico de Cel7A sin glicosilaciones (**Fig. 44**).

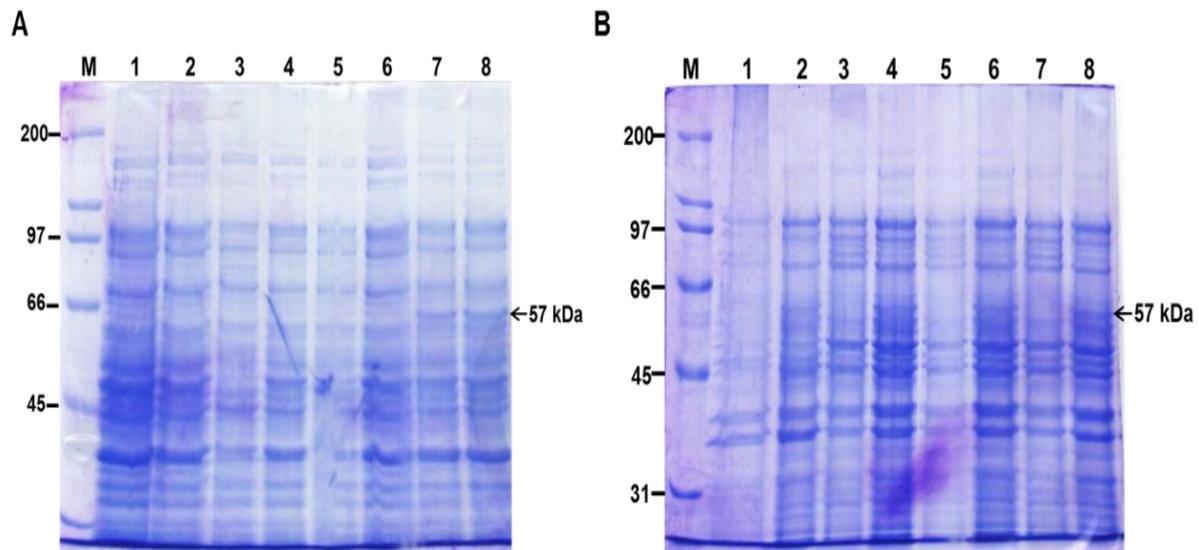


Figura 44. A) Análisis electroforético de la producción de Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1 en la parte soluble de los cuerpos de inclusión de diferentes transformantes de *E. coli* /pQE30-*cel7A*/ **Carril M:** marcado de peso molecular; **carriles 1-6:** fracción soluble de los cuerpos de inclusión antes de la inducción con IPTG; **carriles 7 y 8:** fracción soluble de los cuerpos de inclusión después de cinco horas de inducción. **B)** Análisis electroforético de la producción de Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1 en la fracción soluble de los cuerpos de inclusión de diferentes transformantes de células de *E. coli* /pET38b-*cel7A*/ **Carril M:** marcador de peso molecular; **carriles 1, 3, 5 y 7:** fracción soluble de los cuerpos de inclusión de diferentes transformante, antes de la inducción; **carriles 2, 4, 6 y 8:** fracción soluble de los cuerpos de inclusión de diferentes transformante, después de cinco horas de inducción con IPTG.

A estas fracciones se les evaluó la actividad celulolítica, utilizando 1% de CMC solubilizado en amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5.5, y no se detectó actividad, debido probablemente al mal plegamiento de la proteína. Asimismo, los resultados sugieren que es necesario que Cel7A esté glicosilada para que sea activa.

9.13 Efecto de la temperatura y de la concentración de sustrato sobre la actividad de Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1

Debido a los resultados anteriores, se determinó el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de Cel7A, para lo cual la fracción que contiene copurificadas a las enzimas TtXynA y a Cel7A se le determinó la actividad celulolítica a diferentes temperaturas (65-85°C). En la **Tabla 7** se muestran los resultados obtenidos, observando que la temperatura óptima de actividad celulolítica es de 70°C, y que a 75 y a 80°C, la enzima conserva más del 90 y del 75% de su actividad, respectivamente. Cabe señalar que las determinaciones se llevaron a cabo utilizando CMC al 5% disuelto en amortiguador de acetatos 50mM, pH 5.5, y 50µL de Cel7A copurificada. La reacción se incubó durante 15 min a la temperatura a evaluar.

Tabla 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad de Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1

Temperatura (°C)	Actividad CMCasa (U/L)	Actividad relativa (%)
65	1.14 ± 0.001	91
70	1.26 ± 0.008	100
75	1.20 ± 0.015	96
80	0.96 ± 0,026	76
85	0.77 ± 0.028	61

Asimismo, se evaluó la actividad celulolítica de Cel7A en presencia de diferentes concentraciones de sustrato. De acuerdo a los resultados, se puede observar un comportamiento lineal hasta los 10 mg/mL de CMC; mientras que a partir de 1.5 mg/mL de CMC, comienzan a haber efectos de inhibición de la actividad enzimática (**Fig. 45**). Cabe señalar que la actividad enzimática se determinó a la temperatura óptima, pH 5.5, incubando la reacción durante 15 min.

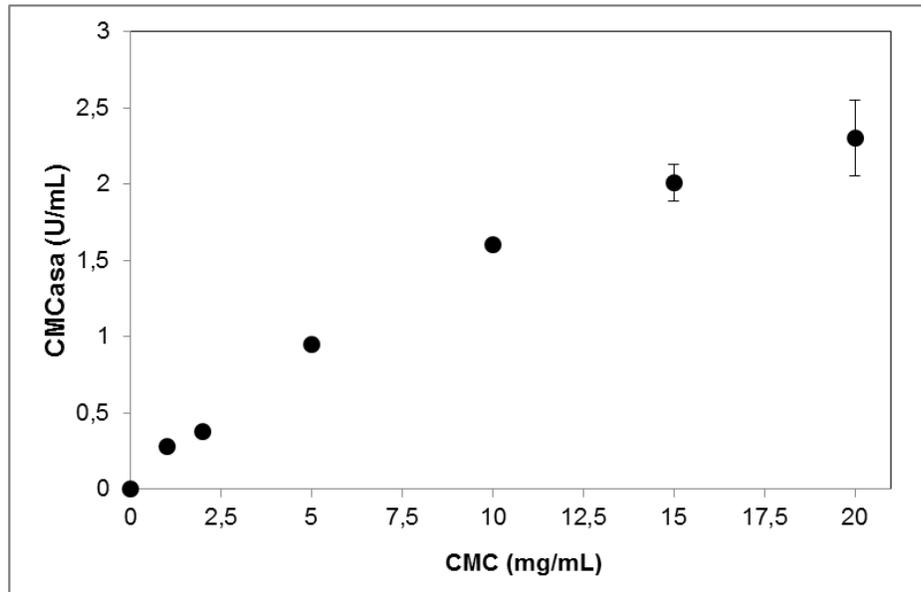


Figura 45. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad celulolítica de Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1.

10. DISCUSIÓN

Debido a la importancia, que las xilanasas termofílicas y termoestables han ganado en los últimos años, en este trabajo nos dimos a la tarea de purificar, identificar y caracterizar, al menos a una de las enzimas involucradas en la actividad xilanolítica del hongo termófilo *T. terrestris* Co3Bag1. Para ello, se evaluó la actividad xilanolítica extracelular del hongo *T. terrestris* cultivado en xilana de haya y en CMC, por separado, como únicas fuentes de carbono, encontrando que la actividad fue mayor al utilizar CMC. Esto indica, que el CMC es mejor inductor de la actividad xilanolítica que la xilana de haya, bajo las condiciones probadas. De acuerdo a nuestros resultados, se ha reportado que el hongo *Neurospora crassa*, al ser cultivado en Avicel como única fuente de carbono, produce celulasas y xilanasas, mostrando un nivel de expresión, de genes que codifican para estas enzimas, mucho mayor que el observado cuando se le cultiva en xilana (Sun *et al.*, 2012; Amore *et al.*, 2013). Asimismo, la producción de xilanasas por hongos cultivados en CMC, ya se ha reportado, por ejemplo, el hongo *T. reesei* presenta actividades xilanolíticas y celulolíticas en la presencia de celulosa, xilana, o mezclas de los polímeros de la planta (Amore *et al.*, 2013). Del mismo modo, en *Aspergillus terreus* se ha reportado que la celulosa, celobiosa, y heterodisacáridos de glucosa y xilosa, inducen la producción de enzimas xilanolíticas (Hrmova *et al.*, 1989; Amore *et al.*, 2013).

TtXynA se purificó del sobrenadante del cultivo, y mostró un peso molecular de 83 kDa, y un contenido de carbohidratos del 20%. Xilanasas fúngicas con pesos moleculares desde 8.5 (Silva *et al.*, 1999) hasta 252 kDa (Anthony *et al.*, 2003) han sido caracterizadas. Asimismo, se ha reportado que la mayoría de las xilanasas fúngicas son glicoproteínas con un variado contenido en carbohidratos (Wong *et al.*, 1988; Kulkarni *et al.*, 1999), por ejemplo, la proporción de carbohidratos presentes en β -xilosidasas contribuye de un 10 a un 30% de su peso molecular (Juturu & Wu, 2012). Además, se ha encontrado que el grado y la heterogeneidad de las glicosilaciones depende de las condiciones de crecimiento y de la presencia de enzimas que glicosilan, en el secretoma de los organismos productores (Beckham *et al.*, 2012).

Por otro lado, al evaluar el efecto del pH sobre la actividad de TtXynA, se observó que el pH óptimo es de 5.5, el cual se encuentra dentro del intervalo de los valores de pH óptimos de varias xilanasas fúngicas. Un pH óptimo de 5.5 fue reportado para una de las xilanasas purificadas de *H. brevis* var. *thermoidea* (Masui *et al.*, 2012). Asimismo, TtXynA exhibe más del 60% de su actividad a valores de pH de 4-9. Acorde con estos resultados, existen xilanasas producidas por el hongo *Chaetomium* sp., que tienen más del 50% de su máxima actividad a valores de pH que van desde 4.5 a 11 (Jiang *et al.*, 2010); y producidas por *Paecilomyces thermophile*, que presentan 70% de su actividad máxima a valores de pH de 5 a 9.5 (Li *et al.*, 2006). Sin embargo, TtXynA fue dos veces más activa a pH 7, que una xilanasas producida por *A. ficcum* AF-98, que presenta el 30% de su máxima actividad a este pH (Lu *et al.*, 2008). Mientras que los resultados de estabilidad al pH de TtXynA fueron similares a los reportados para las xilanasas producidas por *Chaetomium* sp. (Jiang *et al.*, 2010) y *Paecilomyces thermophile* (Li *et al.*, 2006), las cuales fueron estables en un intervalo de pH de 4–11 y de 6.5–10.5, respectivamente; mientras que una xilanasas de *T. lanuginosus* (Li *et al.*, 2005) fue estable tan solo en el intervalo de 5–6.

De acuerdo a su temperatura óptima, las enzimas pueden ser clasificadas como mesofílicas, termofílicas e hipertermofílicas, en donde este último grupo de enzimas presentan su mayor actividad a temperaturas mayores de 80°C (Vieille & Zeikus, 1996; Polizeli *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009). Utilizando este criterio, TtXynA puede clasificarse como una enzima hipertermofílica, siendo la xilanasas fúngica más termofílica reportada hasta ahora, ya que las temperaturas óptimas máximas de actividad reportadas, corresponden a las xilanasas producidas por *P. thermophile* (Li *et al.*, 2006) y por *L. sulphureus* (Lee *et al.*, 2009) cuyas temperaturas óptimas son de 80°C, señalando así, la importancia de los resultados encontrados en este trabajo. Cabe señalar que xilanasas producidas por arqueas, tales como *Dictyoglomus thermophilum* (Li *et al.*, 2013) y *Thermotoga maritima* (Jia *et al.*, 2012), presentan temperaturas óptimas de actividad mayores de 85°C.

Por otro lado, la gran termoestabilidad de TtXynA a 75 y 65°C es similar a la reportada para xilanasas producidas por *T. lanuginosus* (Li *et al.*, 2005), *P.*

thermophiles (Li *et al.*, 2006), y *L. sulphureus* (Lee *et al.*, 2009). Además, TtXynA fue notablemente más termoestable a 65°C ($t_{1/2}$ de 23.1 días) que una xilanasa producida por *Chaetomium* sp. ($t_{1/2}$ de 14.9 min), a la misma temperatura (Jiang *et al.*, 2010), y que una xilanasa producida por *A. japonicus*, la cual perdió completamente su actividad después de incubarla a 55°C (Wakiyama *et al.*, 2010). Con base en que TtXynA es altamente activa a temperaturas mayores de 75°C y altamente estable a 65 y 75°C, esta enzima podría ser muy útil en procesos biotecnológicos que se lleven a cabo a altas temperaturas. Los espectros de dicroísmo circular, sugieren fuertemente que TtXynA gana estructura secundaria cuando la temperatura incrementa. Estos cambios fueron observados principalmente de 50 – 80°C, alcanzando el máximo de elipticidad a los 85°C, lo cual coincide con la temperatura a la cual, la enzima muestra su actividad óptima. Los cambios estructurales inducidos por la temperatura, pueden ser atribuidos a rearrreglos conformacionales que involucren a estructuras β -plegadas, principalmente. Existen proteínas que han ganado elipticidad al modificar las condiciones fisicoquímicas. Por ejemplo, la disminución del pH es responsable de un gran incremento en la elipticidad negativa de la xilanasa A de la bacteria hipertermofílica *T. marítima*; asimismo, el dominio de unión a celulosa de esta enzima también ganó elipticidad al incrementar la temperatura (Wassenber *et al.*, 1997). De manera contraria, otras proteínas como la β -1,3-1,4-glucanasa (liquenasa) de *P. thermophile*, pierde su estructura secundaria a elevadas temperaturas (Yuan *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha reportado que algunos metales y reactivos afectan significativamente la actividad enzimática (Juturu & Wu, 2012). De ahí, que el efecto de los iones metálicos y del EDTA sobre la actividad de TtxynA, se haya evaluado. La enzima mostró de 40 – 100% de su actividad original en presencia de varios iones metálicos (Cu^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} y Zn^{+2}) utilizados en este estudio a concentraciones de 1 y 5 mM. Sin embargo, la actividad enzimática fue parcial (46%) y completamente inhibida por Hg^{+2} a 1 y 5 mM, respectivamente; sugiriendo así que los grupos tiol de los residuos de cisteína están presentes en la vecindad del sitio activo, lo cual ya había sido señalado anteriormente (Bastawde, 1992; Knob & Carmona, 2010). De forma contraria, la enzima retuvo más del 70% de su actividad

en la presencia de EDTA (1 y 5 mM), sugiriendo que los iones metálicos no se requieren para su actividad. En este aspecto, se ha observado que las xilanasas no presentan un comportamiento similar entre sí, sin embargo, lo observado para TtXynA encuentra similitud con xilanasas de *L. sulphureus* (Lee *et al.*, 2009), *P. sclerotiorum* (Knob & Carmona, 2010), *A. gemina* (Dhiman *et al.*, 2013), *Achaetomium* sp. (Zhao *et al.*, 2013), *Penicillium funiculosum*, y *P. occitanis* (Driss *et al.*, 2013).

El valor que se determinó de los parámetros cinéticos de TtXynA (K_M de 0.41 mg/mL y V_{max} de 21.52 U/mg) es similar a los obtenidos para otras xilanasas fúngicas, pues se han reportado valores de K_M de 0.15 a 49.5 mg/mL y valores de V_{max} que van desde los 0.106 a 6300 U/mg (Beg *et al.*, 2001; Knob & Carmona 2010). Por otra parte, se ha reportado que más del 90% del xilano de abedul y de haya están compuestos de xilosa. En el xilano de abedul, las xilosas están unidas principalmente por enlaces β -1,4, mientras que en el xilano de haya, las xilosas están unidas principalmente por enlaces de tipo β -2,4 y β -1,4. Asimismo, se ha descrito que la mayor parte del xilano de avena está constituido por xilosa y arabinosa, así como de glucosa y galactosa en menor cantidad (Li *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2009). Por lo anterior, nuestros resultados sugieren que TtXynA tiene una mayor afinidad hacia los enlaces β -1,4 presentes entre las moléculas de xilosa encontradas en la xilana de haya y de abedul. Cuando la cantidad de xilosas disminuye, entonces la afinidad de la enzima también disminuye. Por otro lado, TtXynA mostró una afinidad 16 veces menor hacia CMC que hacia xilana de haya, lo cual indica que la enzima tiene menor afinidad hacia enlaces β -1,4 entre glucosas que entre xilosas. Este comportamiento es característico de varias xilanasas que son activas sobre CMC y β -glucanos (Kulkarni *et al.*, 1999; Grishutin *et al.*, 2004; Viikari *et al.*, 2007).

Por otro lado, se analizaron los productos de hidrólisis de la enzima TtXynA sobre xilana y CMC. Cabe señalar que la enzima muestra actividad de tipo endo y exo, debido a su capacidad de liberar xilopentosa, xilobiosa y xilosa al utilizar xilana de haya como sustrato. En la literatura, ya han sido reportadas endo-xilanasas que liberan xilosa como uno de los principales productos de hidrólisis; y, de acuerdo a

nuestros resultados, se ha reportado que xilanasas de *Cryptococcus albidus* y *Streptomyces lividans*, pertenecientes a la familia GH10, muestran varias actividades catalíticas, las cuales son compatibles con la actividad de β -xilosidasa (Biely *et al.*, 1997). Asimismo, la endoxilanasas XYNIV de *T. reesei*, perteneciente a la familia GH30, muestra actividades de tipo exo y endo, pues sus principales productos de hidrólisis son xilosa, xilobiosa, ácido aldotetraurónico, y otros ácidos de xilooligosacáridos a partir de xilanas de diferentes fuentes (Tenkanen *et al.*, 2013).

Debido a que la enzima TtXynA mostró características bioquímicas interesantes, como lo fueron su naturaleza hipertermofílica, alta termoestabilidad a 65°C, capacidad de mantenerse activa en un amplio intervalo de pH, y alta afinidad por su sustrato, fue de nuestro interés secuenciar el gen codificante para esta enzima, para posteriormente clonar dicha secuencia, y evaluar la expresión de la enzima en un sistema heterólogo. En este aspecto, el sistema heterólogo elegido fue la levadura metilotrófica *P. pastoris*, debido a que se sabe que este microorganismo secreta bajas cantidades de proteínas endógenas, facilitando así el proceso de purificación, además de que tiene la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales, como son las glicosilaciones y la generación de puentes disulfuro, además de crecer relativamente rápido y de manera unicelular, y se han reportado rendimientos altos de la proteína recombinante producida en este sistema heterólogo (Varnái *et al.*, 2014).

La estrategia experimental por seguir para secuenciar la región codificante del gen *ttxynA* fue utilizando genética reversa. Para lo cual se diseñaron oligonucleótidos con base en las secuencias conservadas de las enzimas que presentaron mayor similitud con la GH7 de *T. terrestris* NRRL8126, debido a que los péptidos obtenidos por primera vez mostraron 100% de similitud con la proteína Cel7A de este microorganismo. Y a partir de la secuencia génica codificante y correspondiente a las zonas más conservadas de varias proteínas, se diseñaron los oligonucleótidos con los cuales, utilizando cDNA como molde, se amplificó el marco de lectura completo de la proteína Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1. Cabe señalar que al hacer un alineamiento de ambos ORF's que codifican para la Cel7A, es decir, el de la cepa

NRRL8126 y Co3Bag1, la secuencia de la segunda cepa es un codón mayor, por lo que en secuencia traducida produce una proteína de 527 aminoácidos, mientras que la cepa NRRL8126 es de 526 aminoácidos, además de presentar, entre ambas proteínas, un 97% de similitud, por lo que se puede decir que son proteínas diferentes.

Es por esto, que después de haber realizado ensayos evaluando la actividad xilanolítica en el sobrenadante de las diferentes clonas pGAPzαB-*txynA* de *P. pastoris*, y sin haber encontrado indicio alguno de esta actividad, se decidió evaluarles la actividad de celulasa utilizando CMC como sustrato.

Respecto a la evaluación de la actividad celulolítica de las diferentes clonas obtenidas, tanto con el vector constitutivo como con el inducible, la expresión de *cel7A* y la producción de la proteína correspondiente no son del todo claros, debido a que se ha reportado que *P. pastoris* produce una β-glucosidasa intracelular, cuando se le cultiva en glicerol y en metanol. Dicha proteína, es un tetrámero de 275 kDa, formada por subunidades idénticas de 70 kDa; con temperatura y pH óptimos de 40°C y 7.3, respectivamente (Turan & Zheng, 2005).

Por otro lado, se ha reportado la dificultad de producir endoglucanasas modulares, completas, pertenecientes a la familia GH9, en *P. pastoris* (Tawde & Freimuth, 2012). En este trabajo, Tawde y Freimuth observaron que al producir dos celulasas modulares de *Arabidopsis*, estas no fueron detectadas cuando se les intentó producir de manera completa, es decir, incluyendo el dominio catalítico y el dominio de unión a carbohidrato; y fue hasta que expresaron de manera independiente cada dominio, cuando observaron una producción detectable de las celulasas truncadas, disminuyendo la temperatura de incubación del cultivo a 16°C. Sin embargo, el dominio catalítico de una de las celulasas no pudo ser expresado de manera independiente y bajo ninguna estrategia que los autores evaluaron. Lo anterior es atribuido a un efecto citotóxico al producir las celulasas completas, resultado de la incapacidad de la levadura por plegar correctamente a las enzimas, y sugiriendo que, de alguna forma, el CBM bloquea la translocación del polipéptido, en el retículo

endoplásmico (Tawde & Freimuth, 2012). Estos resultados concuerdan con otro estudio en donde una celulasa modular de tomate de la GH9 no pudo ser detectada en el sobrenadante de cultivo, cuando se expresó de manera completa en *P. pastoris*. Y fue hasta que expresaron la región codificante para el dominio catalítico cuando lograron detectarla en el sobrenadante de cultivo (Urbanowicz *et al.*, 2007).

Por todo lo anterior, y con los resultados obtenidos hasta el momento, en este trabajo Doctoral no es concluyente que la proteína Cel7A haya sido producida de manera recombinante por *P. pastoris*, ya que habrá que evaluar si la actividad CMCasa ocasionada por Cel7A es enmascarada por la actividad endógena de la levadura, por lo que se requieren hacer más estudios al respecto para confirmar esto.

Respecto a la producción de Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1 en *E. coli*, el hecho de que la enzima sea producida pero sin presentar actividad, sugiere que el sistema de plegamiento de *E. coli* no es el necesario para producir a la enzima con el plegamiento correcto, asimismo, sugiere que las glicosilaciones de Cel7A es importante para conferirle actividad. De acuerdo con esto, se ha reportado que existen proteínas que necesitan estar glicosiladas para que puedan ser plegadas correctamente y mantener su actividad, como por ejemplo: la eritropoyetina y la gonadotropina coriónica humana. Sin embargo, es posible producir proteínas de origen eucariótico en *E. coli* como sistema de expresión, y que no pierden su actividad al no estar glicosiladas, un ejemplo de ello es el interferón γ (Demain A. & Vaishnav, 2009).

11. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que:

- El hongo termófilo *T. terrestris* Co3Bag1 produce mayor actividad xilanolítica que celulolítica utilizando CMC como fuente de carbono bajo las condiciones de cultivo utilizadas en el presente trabajo.
- A partir del sobrenadante de cultivo de *T. terrestris* Co3Bag1, utilizando CMC como fuente de carbono, se copurificaron la xilanasas TtXynA y la endoglucanasa Cel7A.
- Respecto a las características bioquímicas de la xilanasas TtXynA, se puede decir que esta enzima es una glicoproteína hipertermofílica, acidófila y altamente termoestable a 65 y 75°C.
- Es muy probable que TtXynA de *T. terrestris* Co3Bag1 sea una β -xilanasas perteneciente a la familia GH10.
- Se secuenció y clonó el gen que codifica para la celulasa Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1.
- El marco de lectura abierto *cel7A* está formado por 1584 nucleótidos, los cuales traducen una proteína modular de 527 aminoácidos, con un peso estimado de 57.9 kDa.
- La enzima Cel7A es una celulasa termofílica, cuya secuencia aminoacídica presenta varios sitios potenciales de O-glicosilación y dos de N-glicosilación.
- La expresión en *E. coli* sugiere que las glicosilaciones presentes en Cel7A son de gran importancia para que la enzima conserve su actividad.

12. PERSPECTIVAS

- Terminar de caracterizar bioquímicamente a la celulasa Cel7A presente en la fracción copurificada con TtXynA, de manera que se pueda tener un panorama más amplio, de las aplicaciones posibles que se le puedan dar a esta enzima.
- Evaluar la capacidad de sacarificación, utilizando sustratos naturales, de la fracción que contiene copurificadas a las enzimas TtXynA y Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1.
- Evaluar la producción de TtXynA de manera recombinante en algún sistema de expresión heterólogo.
- Evaluar la expresión de la región que codifica para el dominio catalítico de Cel7A de *T. terrestris* Co3Bag1 en *P. pastoris*.
- Confirmar la producción de Cel7A recombinante, optimizando las condiciones de cultivo de las clonas de *P. pastoris* pPICzαB-*cel7A* y pGAPzαA-*cel7A*, así como las condiciones del ensayo enzimático.

13. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed S, Riaz S and Jamil A (2009) Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:19–35. doi 10.1007/s00253-009-2079-4

Amore A, Giacobbe S, Faraco V (2013) Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Curr Genom* 14:230–249.

Anthony T, Chandra Raj K, Rajendran A, Gunasekaran P (2003) High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. *Enzyme Microb Technol* 32:647–654.

Atkins P, de Paula J (2006) *Physical chemistry for the life sciences*, second. Oxford University Press

Baldrian P. & Valasková V. (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev* 32: 501-521.

Basaran P, Hang YD, Basaran N, Worobo RW (2001) Cloning and heterologous expression of xylanase from *Pichia stipitis* in *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 90:248–255.

Bastawde KB (1992) Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World J Microbiol Biotechnol* 8:353–368.

Beckham GT, Dai Z, Matthews JF, Momany M, Payne CM, Adney WS, Baker SE, Himmel ME (2012) Harnessing glycosylation to improve cellulase activity. *Curr Opin Biotechnol* 23:338–345.

Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:326–338.

Berka RM, Grigoriev IV, Otilar R, Salamov A, Grimwood J, Reid I, Ishmael N, John T, Darmond C, Moisan M-C, Henrissat B, Coutinho PM, Lombard V, Natvig DO,

Lindquist E, Schmutz J, Lucas S, Harris P, Powlowski J, Bellemare A, Taylor D, Butler G, de Vries RP, Allijn IE, van den Brink J, Ushinsky S, StormsR, Powell AJ,

Berrin JG, Williamson G, Puigserver A, Chaix JC, McLauchlan WR, Juge N (2000) High level production of recombinant fungal endo- β -1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 19:179–187.

Biely P, Vrsanska M, Tenkanen M, Kluepfel D (1997) Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J Biotechnol* 57:151–166.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

Cao Y, Qiao J, Li Y, Lu W (2007) De novo synthesis, constitutive expression of *Aspergillus sulphureus* beta-xylanase gene in *Pichia pastoris* and partial enzymatic characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:579–585.

Cayetano-Cruz M, Santos PDL Itzel A, García-Huante Y, Santiago-Hernández A, Pavón-Orozco P, López y López EV, Hidalgo-Lara ME (2016) High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* cultured in a bioreactor with methanol as the sole carbon source: purification and biochemical characterization of the enzyme. *Biochem Eng J* 112:161–169.

Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24:45–66.

Cervantes Rodríguez AT. 2011. Aislamiento y selección de hongos termotolerantes degradadores de lignina, que participan en el composteo de cachaza y bagacillo de la industria cañera. Tesis de Maestría. CIBA-IPN.

Chand S, Mishra P (2003) Research and application of microbial enzymes-India's contribution. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 85:95–124

Chavez R, Bull P, Eyzaguirre J (2006) The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. J. Biotechnol. 123: 413-433.

Cheng YF, Yang CH, Liu WH (2005) Cloning and expression of *Thermoibifida* xylanase gene in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Enzyme Microb Technol 37:541–546.

Collins T, Gerday C, Feller G (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol Rev 29:3-23.

Cregg JM (1999) Expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: Fernandez JM, Hoeffler JP (eds) Gene expression systems Academic, New York, pp 157–191

Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. Mol Cell Biol 9:1316–1323

Damaso MCT, Almeida MS, Kurtenbach E, Martins OB, Pereira N, Andrade CMMMC, Albano RM (2003) Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. Appl Environ Microbiol 69:6064–6072

Demain AL and Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv 27: 297–306.

Deng P, Li D, Cao Y, Lu W, Wang C (2006) Cloning of a gene encoding an acidophilic endo- β -1,4-xylanase obtained from *Aspergillus niger* CGMCC1067 and constitutive expression in *Pichia pastoris*. Enzyme Microb Technol 39:1096–1102

Dhiman SS, Kalyani D, Jagtap SS, Haw JR, Kang YC, Lee JK (2013) Characterization of a novel xylanase from *Armillaria gemina* and its immobilization onto SiO₂ nanoparticles. Appl Microbiol Biotechnol 97:1081–1091.

Dimler RJ, Schaefer WC, Wise CS, Rist CE (1952) Quantitative paper chromatography of d-glucose and its oligosaccharides. Anal Chem 24:1411–1414

Driss D, Berrin JG, Juge N, Bhiri F, Ghorbel R, Chaabouni SE (2013) Functional characterization of *Penicillium occitanis* Pol6 and *Penicillium funiculosum* GH11 xylanases. *Protein Expr Purif* 90:195–201.

García J, Santana Z, Zumalacárregui L, Quintana M, González D, Furrázola G y Cruz O. 2013. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Vacci Monitor* 22(2):30-39.

Gellissen G (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:741–750

Gilbert M, Breuil C, Yaguchi M, Saddler JN (1992) Purification and characterization of a xylanase from the thermophilic Ascomycete *Thielavia terrestris* 255b. *Appl Biochem Biotechnol* 34–5:247–259.

Grishutin SG, Gusakov AV, Markov AV, Ustinov BB, Semenova MV, Sinitsyn AP (2004) Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1674:268–281.

Haki GD and Rakshit SK. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technol.* 89: 17-34.

Hakulinen N, Turunen O, Janis J, Leisola M, Rouvinen J (2003) Three-dimensional structures of thermophilic beta-1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*. Comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability. *Eur J Biochem* 270:1399–1412.

Henrissat, B. and Coutinho, P.M. (2001) Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles. *Methods Enzymol.* 330, 183–201.

Hrmova M, Biely P, Vrsanska M (1989) Cellulose- and xylandegrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Technol* 11:610–616.

Jia H, Fan G, Yan Q, Liu Y, Yan Y, Jiang Z (2012) High-level expression of a hyperthermostable *Thermotoga maritima* xylanase in *Pichia pastoris* by codon optimization. J Mol Catal B Enzym 78:72–77.

Jiang Z, Cong Q, Yan Q, Kumar N, Du X (2010) Characterisation of a thermostable xylanase from *Chaetomium* sp. and its application in Chinese steamed bread. Food Chem 120:457–462.

Jun H, Bing Y, Zhang K, Ding X, Daiwen C (2008) Expression of a *Trichoderma reesei* β -xylanase gene in *Escherichia coli* and activity of the enzyme on fiber-bound substrates. Protein Expr Purif 67:1–6.

Juturu V, Wu JC (2012) Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. Biotechnol Adv 30:1219–1227.

Knob A, Carmona EC (2010) Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. Appl Biochem Biotechnol 162:429–443.

Kulkarni N, Shendye A, Rao M (1999) Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiol Rev 23:411–456. doi:10.1016/S0168-6445(99)00006-6

Kurjan J, Herskowitz I (1982) Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. Cell 30:933–943

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685. doi:10.1038/227680a0

Langston JA, Brown K, Xu F, Borch K, Garner A, Sweeney MD (2012) Cloning, expression, and characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Thielavia terrestris* induced under cellulose growth conditions. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom 1824:802–812. doi:10.1016/j.bbapap.2012.03.009

Lee CC, Wong DW, Robertson GH (2005) Cloning and characterization of the xyn11A gene from *Lentinula edodes*. *Protein J* 24:21–26

Lee JW, Park JY, Kwon M, Choi IG (2009) Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. *J Biosci Bioeng* 107:33–37. doi:10.1016/j.jbiosc.2008.09.006

Li H, Kankaanpää A, Xiong H, Hummel M, Sixta H, Ojamo H, Turunen O (2013) Thermostabilization of extremophilic *Dictyoglomus thermophilum* GH11 xylanase by an N-terminal disulfide bridge and the effect of ionic liquid [emim]OAc on the enzymatic performance. *Enzyme Microb Technol* 53:414–419. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.09.004

Li K, Azadi P, Collins R, Tolan J, Kim JS, Eriksson KEL (2000) Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme Microb Technol* 27:89–94. doi:10.1016/S0141-0229(00)00190-3

Li L, Tian H, Cheng Y, Jiang Z, Yang S (2006) Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*. *Enzyme Microb Technol* 38:780–787. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.08.007

Li X, Jiang Z, Lil Yang S, Feng W, Fan J, Kusakabe I (2005) Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Bioresour Technol* 96:1370–1379. doi:10.1016/j.biortech.2004.11.006

López – Olgún, N. 2011. Purificación y caracterización bioquímica de la lacasa Lac97 de *Corynascus sepedonium* Co3Bag1. Tesis de Maestría. CINVESTAV.

Lu F, Lu M, Lu Z, Bie X, Zhao H, Wang Y (2008) Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresour Technol* 99:5938–5941. doi:10.1016/j.biortech.2007.10.051

Masui DC, Zimbardi ALRL, Souza FHM, Guimarães LHS, Furriel RPM, Jorge JA (2012) Production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *thermoidea* under solid state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 28:2689–2701. doi:10.1007/s11274-012-1079-1

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent. *Anal Chem* 31:426–428.

Motta F, Andrade C, Santana M (2013) A Review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. *Intech. Chapter 10* 251–275. doi:10.5772/53544.

Pastor JFI, Gallardo O, Sanz-Aparicio J and Díaz P. 2007. Xilanases: Molecular properties and Applications. J Polaina and AP MacCabe (eds.), *Industrial Enzymes*, pp. 65 – 82.

Paulsen IT, Elbourne LDH, Baker SE, Magnuson J, LaBoissiere S, Clutterbuck AJ, Martinez D, Wogulis M, de Leon AL, Rey MW, Tsang A (2011) Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nat Biotechnol* 29:922–927. doi:10.1038/nbt.1976

Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:577–591. doi:10.1007/s00253-005-1904-7

Ruanglek V, Sriprang R, Ratanaphan N, Tirawongsaroj P, Chantasigh D, Tanapongpipat S, Pootanakit K, Eurwilaichitr L (2007) Cloning expression, characterization and high cell density production of recombinant endo 1,4- β -xylanases from *Aspergillus niger* in *Pichias pastoris*. *Enzyme Microb Technol* 41:19–25

Sambrook J and Russell D (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3ed Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sánchez C (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.* 27: 185-194.

Sandgren M, Ståhlberg J, Mitchinson C (2005) Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog Biophys Mol Biol* 89: 246 – 291.

Schwarz WH, Bronnenmeier K, Gräbnitz F, Staudenbauer WL (1987) Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage beta-glucans. *Anal Biochem* 164:72–77.

Segrest JP, Jackson RL (1972) Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *Methods Enzymol* 28:54–63. doi:10.1016/0076-6879(72)28007-7

Silva CHC, Puls J, Sousa MV, Filho EXF (1999) Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Rev Microbiol* 30:114–119. doi:10.1590/S0001-37141999000200005

Smith DC, Bhat KM, Wood TM (1991) Xylan-hydrolysing enzymes from thermophilic and mesophilic fungi. *World J Microbiol Biotechnol* 7:475–484

Subramaniyan S. and Prema P. (2002) Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. *Crit Rev Biotechnol* 22(1): 33–46

Sun J, Tian C, Diamond S, Louise Glassa N (2012) Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 11:482–493. doi:10.1128/EC.05327-11

Sun YJ, Liu MQ, Wang XY, Qian LC, Gu SH (2007) Expression of recombinant *Thermomonospora fusca* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosachharides released from xylan by it. *Food Chem* 104:1055–1064

Tawde M. D., Freimuth P (2012) Toxic misfolding of Arabidopsis cellulases in the secretory pathway of *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 85: 211–217.

Teather RM, Wood PJ (1982) Use of Congo red polysaccharides interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* 43:777–780

Tenkanen M, Vršanská M, Siika-Aho M et al (2013) Xylanase XYN IV from *Trichoderma reesei* showing exo- and endo-xylanase activity. *FEBS J* 280:285–301. doi:10.1111/febs.12069

Tien M, Kirk TK (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Method Enzymol* 161:238–249. doi:10.1016/0076-6879(88)61025-1

Tsai CT, Huang CT (2008) Overexpression of the *Neocallimastix frontalis* xylanase gene in the methylophilic yeasts *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*. *Enzyme Microb Technol* 42:459–465

Turan Y. and Zheng M (2005) Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from the methylophilic yeast *Pichia pastoris* *Biochemistry (Moscow)* 70: 1656 – 1663.

Turner P, Mamo G, Karlsson E (2007) Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb Cell Fact* 6: 9.

Urbanowicz R, Catala C, Irwin D, Wilson DB, Ripoll DR, Rose JK (2007) A tomato endo-beta-1,4-glucanase, SICel9C1, represents a distinct subclass with a new family of carbohydrate binding modules (CBM49) *J. Biol. Chem.*, 282: 12066–12074.

Varnái A, Tang C, Bengtsson O, Atterton A, Mathiesen G and Eijsink V GH. 2014.. Expression of Endoglucanases in *Pichia* under GAP promoter

Vieille C, Zeikus JG (1996) Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *Trends Biotechnol* 14:183–190. doi:10.1016/0167-7799(96)10026-3

Viikari L, Alapuranen M, Puranen T, Vehmaanperä J, Siika-Aho M (2007) Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108:121–145. doi:10.1007/10_2007_065

Wakiyama M, Tanaka H, Yoshihara K, Hayashi S, Ohta K (2008) Purification and properties of family-10 endo-1,4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* and structural organization of encoding gene. *J Biosci Bioeng* 105:367–374

Wakiyama M, Yoshihara K, Hayashi S, Ohta K (2010) An extracellular endo-1,4-beta-xylanase from *Aspergillus japonicus*: purification, properties, and characterization of the encoding gene. *J Biosci Bioeng* 109:227–229. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.09.005

Wassenberg D, Schurig H, Liebl W, Jaenicke R (1997) Xylanase XynA from the hyperthermophilic bacteria *Thermotoga maritima*: structure and stability of the recombinant enzyme and its isolated cellulose binding-domain. *Protein Sci* 6:1718–1726. doi:10.1002/pro.5560060812

Wong KK, Tan LU, Saddler JN (1988) Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev* 52:305–317

Yuan SF, Wu TH, Lee HL, Hsieh HY, Lin WL, Yang B, Chang CK, Li Q, Gao J, Huang CH, Ho MC, Guo RT, Liang PH (2008) Biochemical characterization of a novel thermostable beta-1,3-1,4-glucanase (lichenase) from *Paecilomyces thermophila*. *J AgricFood Chem* 56:5345–5351. doi:10.1021/jf800303b

Zhao Y, Meng K, Luo H, Huang H, Yuan T, Yang P, Yao B (2013) Molecular and biochemical characterization of a new alkaline active multidomain xylanase from alkaline wastewater sludge. *World J Microbiol Biotechnol* 29:327–334. doi:10.1007/s11274-012-1186-z

Zhou C, Bai J, Deng S, Wang J, Zhu J, Wu M, Wang W (2008) Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol* 99:831–838

Zouari-Mechichi H, Mechichi T, Dhouib A, Sayadi S, Martínez AT, Martínez MJ (2006) Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme Microb Technol* 39:141–148.

14. ANEXOS

I. Determinación de azúcares reductores con DNS (Miller, 1959)

Para determinar la cantidad de azúcares residuales liberados por la actividad enzimática, se realizaron las siguientes curvas tipo disolviendo la glucosa y la xilosa en el amortiguador de acetatos 50mM pH5.5 y de citratos 50mM, pH 5.5, respectivamente, para tener la concentración deseada en cada punto de la curva.

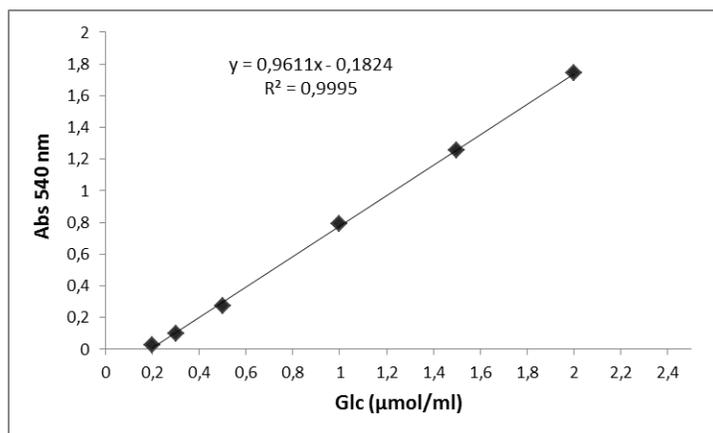


Gráfico 1. Curva tipo de glucosa (Glc) para la determinación de azúcares reductores utilizando CMC como sustrato en el ensayo enzimático. La glucosa se disolvió en amortiguador de acetatos 50mM, pH 5.5. Ecuación de la curva: $Abs=0.9611[Glc]-0.1824$

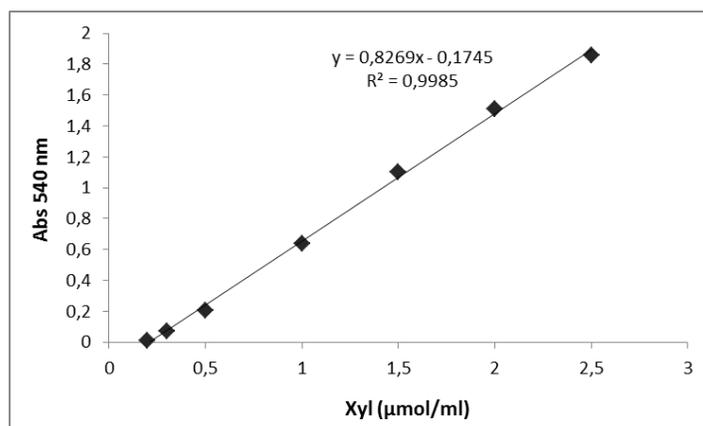


Gráfico 2. Curva tipo de xilosa (Xyl) para la determinación de azúcares reductores utilizando xilano como sustrato en el ensayo enzimático. La xilosa se disolvió en amortiguador de citratos 50mM, pH 5.5. Ecuación de la curva: $Abs=0.8269[Xyl]-0.1745$.

II. Curva tipo para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry

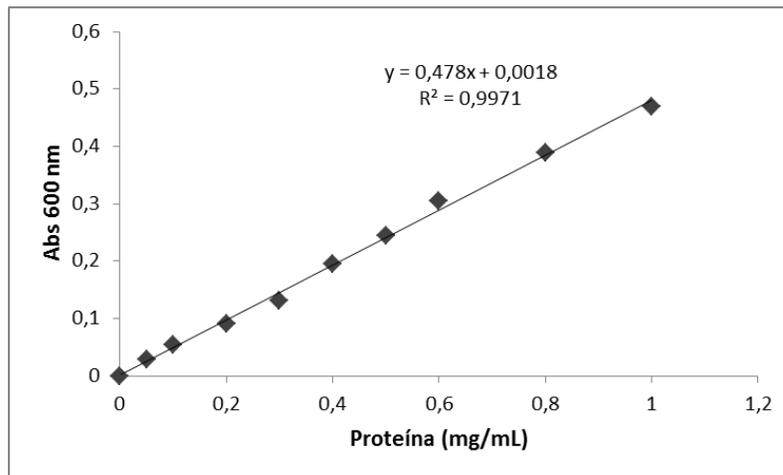


Gráfico 3. Curva tipo de seroalbumina (BSA) para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

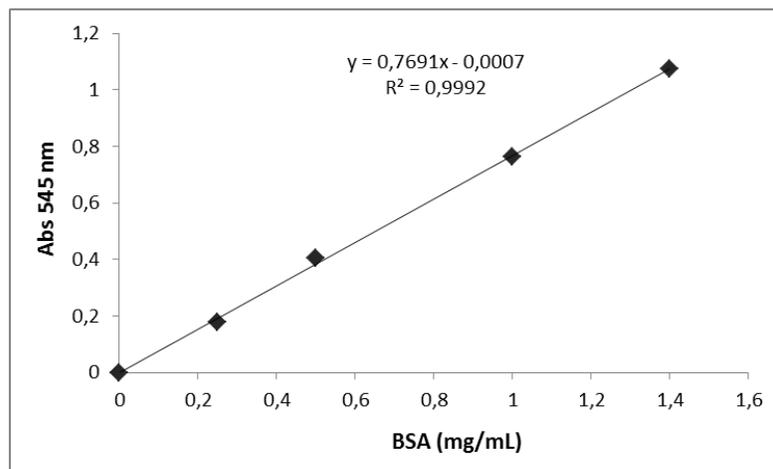


Gráfico 4. Curva tipo de seroalbumina (BSA) para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

III. Determinación de azúcares totales por el método de la antrona.

Tomado del Manual de Prácticas de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). 4ª Edición. 1987.

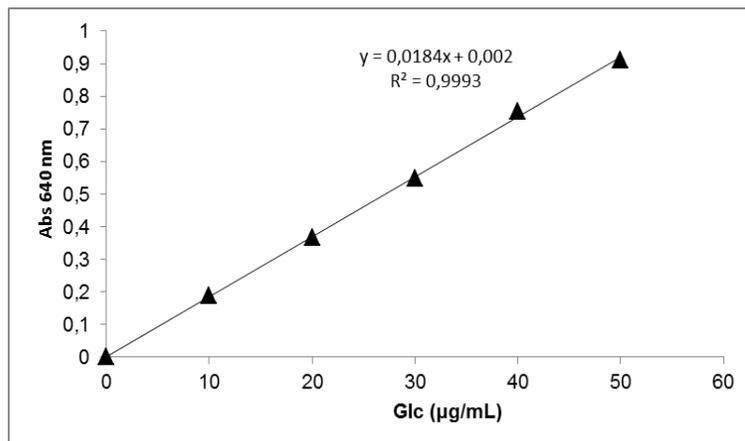


Gráfico 5. Curva tipo utilizando glucosa (Glc) como estándar. Ecuación de la curva $Abs=0.0184[Glc]+0.002$

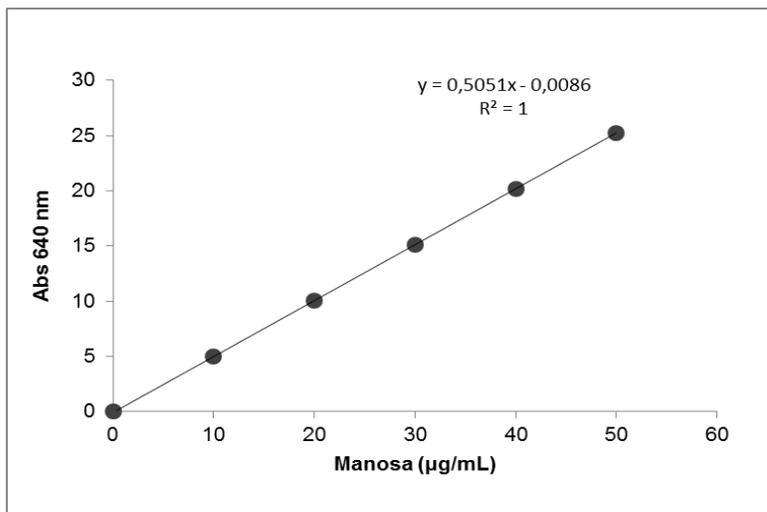


Gráfico 6. Curva tipo utilizando manosa (man) como estándar. Ecuación de la curva: $Abs=5051[Man]+0.0086$

IV. Vector pUC57

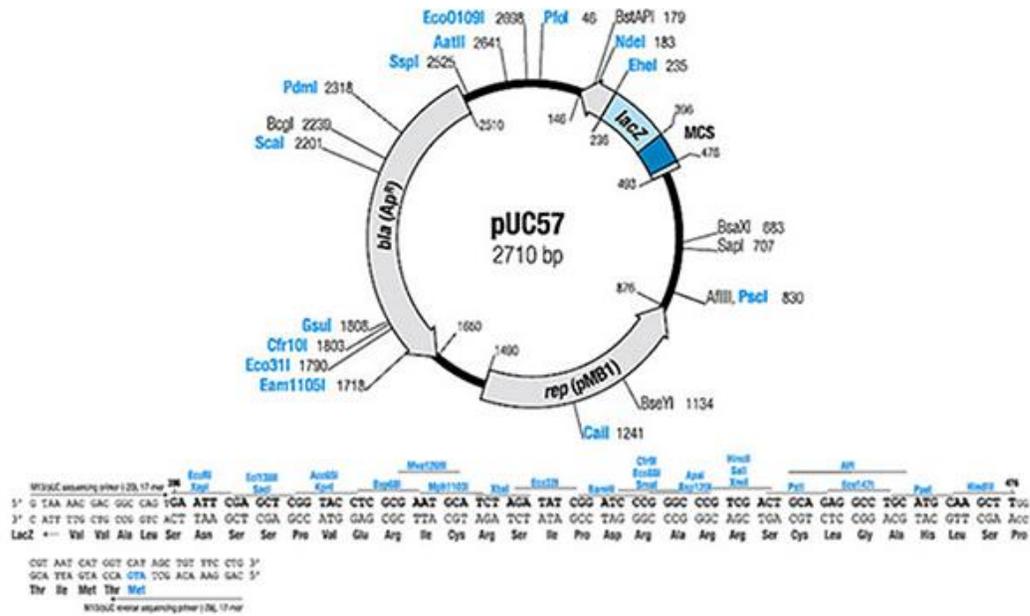


Gráfico 7. Mapa del vector pUC57 utilizado por la empresa GenScript para clonar el gen que codifica la región madura de Cel7A (primeramente pensado era *ttxynA_{op}*), y con optimización del uso de codones para *P. pastoris*