Fusión de proteína codificada por el gen CEL7A de Trichoderma reesei expresado en Pichia pastoris para incrementar actividad celulasa en la producción de biocombustibles

Fusion protein coded by the gene CEL7A from Trichoderma ressei expressed in Pichia pastoris to increase cellulose activity in the production of biofuels

Beatriz Jacqueline Solis Cordova,*
Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey,
Campus Estados de México, México
A01165072@itesm.mx

Juan Yasser Martínez Ojeda,
Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey,
Campus Estados de México, México
A01350764@itesm.mx

Recibido 15, diciembre, 2017 Aceptado 20, marzo, 2018

Resumen

La preocupación mundial por cambiar los combustibles fósiles a alternos, para poder suplir la demanda de la energía requerida es creciente. Se ha sabido del bioetanol desde años atrás, y la necesidad de la enzima celulasa presenta costos altos; por tanto, se buscan maneras de reducir y hacer más eficiente y viable un proceso de este tipo. La celulasa es una enzima que se encarga de la hidrólisis de la celulosa, rompiendo los enlaces glicosídicos β-1,4 de la celulosa transformándola en glucosa. El gen cel7a codifica para la proteína de interés, conocida como celulosa 1,4-beta-celobiosidasa (EC 3.2.1.91). Se propone la unión in silico de dos secuencias iguales del gen codificante de la celulasa de interés, a partir de Trichoderma reesei, creando una proteína de fusión unida por un linker, mismo que será tomado de una proteína quimérica patentada. Posteriormente se inserta en un vector que será expresado en una levadura, Pichia pastoris, con el fin de incrementar la actividad catalítica que será útil en la producción de biocombustible. Dicho proceso se basa en el diseño de primers, ciclos de Polymerase Chain Reaction estándar y overlap, así como transformación y transfección mediante electroporación y posterior análisis estructural utilizando herramientas bioinformáticas.

Palabras clave: bioetanol, celulasa, proteína de fusión, linker, primer

Mathematics Subject Classification (2010): 94D05

Abstract

The increasing concern regarding the change of fossil fuels to alternate ones in order to supply the required energy around the world is significant. Bioethanol has been in development for years, and the participation of the enzyme cellulase dictates elevated prices, so the need to reduce and make processes of this nature more efficient and viable is a must. Cellulase is an enzyme that catalyses the hydrolysis of cellulose, breaking glycosidic β-1,4 bonds turning it into glucose monomers. The gene cel7a encodes the protein of interest, known as cellulose 1,4-beta-cellobiosidase (EC 3.2.1.91). An in-silico merger of two identical sequences of the gene for this particular cellulase is proposed, using Trichoderma reesei, in order to create a fusion protein that will be joined by a linker, taken from a patented chimeric protein, which would then be inserted in a vector and

*Autor corresponsal

expressed in a yeast, Pichia pastoris, with the purpose of increasing catalytic activity and applying it in the production of biofuels. This process is based on the design of primers, normal and overlap Polymerase Chain Reaction, as well as transformation and transfection by electroporation, with further structural analysis by means of bioinformatics tools.

Keywords: bioethanol, cellulase, fusion protein, linker, primer

1. Introducción

Las enzimas son proteínas catalizadoras de reacciones enzimáticas que disminuyen la energía de activación requerida y por tanto aceleran la velocidad de la reacción. Algunas de las ventajas de las mismas incluyen una alta especificidad del sustrato, estereoselectividad y una menor producción de desechos o productos secundarios a comparación de reacciones químicas normales (Pena, 2004). Esto conlleva a que los procesos biotecnológicos sean mejores en cuanto a costos y procedimientos (Devlin, 2004).

Los microorganismos, tales como bacterias y hongos, son utilizados en la producción industrial de enzimas. La descomposición de biomasa celulolítica a monómeros para la posterior producción de biocombustibles resulta una de las principales aplicaciones que requiere acción de enzimas que puedan cortar enlaces glucosídicos dentro de la cadena de celulosa (PQBio, 2007).

La celulosa es un polisacárido lineal formado por residuos de glucosa unidos por enlaces beta 1-4. La configuración beta le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales están unidas entre sí por enlaces de puentes de hidrógeno, dando lugar a la formación de microfibrillas conocidas como regiones cristalinas. Estas son altamente ordenadas y le dan características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático (PQBio, 2007).

En ciertas regiones del haz de microfibrillas, las cadenas se rompen en los puentes de hidrógeno formando regiones amorfas, las cuales se hidratan permitiendo que ciertas enzimas ataquen y degraden a la celulosa. En el ámbito industrial, existe una gran variedad de utilidades que se le pueden dar a la celulasa, pues al ser sometida a algunas modificaciones se generan diversos compuestos con múltiples propiedades funcionales. En la industria alimentaria, por ejemplo, es común encontrarse con la carboximetil celulosa, la cual es utilizada como espesante, así como su contraparte, la celulosa microcristalina, que funciona como anticompactante. Por otro lado, en la industria farmacéutica, esta es una enzima comúnmente utilizada en la elaboración de tabletas. Se sabe que esta tiene la capacidad de degradar la celulosa, con potenciales aplicaciones en la producción de biocombustibles; sin embargo, esta rama se ha visto limitada por los elevados costos que actualmente representa su uso (PQBio, 2007).

La celulasa es una enzima que se encarga de la hidrólisis de la celulosa, al tener la capacidad de actuar rompiendo los enlaces glicosídicos β-1,4 de la celulosa transformándola en glucosa (Vázquez López et al., 2011). La celulasa funciona como material de refuerzo en el tejido de las plantas, y representa su compuesto orgánico más extendido en términos de cantidad. Por esta actividad es que estas enzimas tienen numerosas aplicaciones en la industria, por ejemplo, en la alimentaria, es común su empleo para la extracción y clarificación de zumos vegetales, la obtención de aceite de oliva y la mejora de la calidad de los productos de panificación, entre otros. Asimismo, al combinarse con otras enzimas, es importante en la producción de bebidas como el vino, ya que tiene la capacidad de extraer sustancias no deseadas como taninos y compuestos aromáticos. Se tiene registro de que su aplicación es común también en campos como la producción de detergentes, textil y papel. Específicamente, se utiliza la enzima con el nombre celulosa 1,4-beta-celobiosidasa (EC 3.2.1.91), la cual se conforma de dos dominios, estructural y funcionalmente diferentes, el primero siendo el dominio catalítico y el otro es un dominio de unión a celulosa, los cuales se encuentran unidos por un linker flexible (Seiboth, Ivanova, & Seidl-Seiboth, 2011).

La preocupación mundial por cambiar de combustibles fósiles a alternos, para poder suplir la demanda de la energía requerida es creciente. De esta manera, a pesar de que se ha sabido del bioetanol desde años atrás, la etapa de hidrólisis que debe llevarse a cabo para su producción, catalizada por la enzima de interés: celulasa, presenta altos costos, por tanto, se buscan maneras de reducir y hacer más eficiente lo necesario para que sea viable un proceso de este tipo. Se quiere entonces desarrollar nuevas maneras de producción de celulasas con bajo costo e implementar su uso en la producción de bioetanol (Fatma & Fadel, 2010).

En 2007 en México comenzaron a realizar estudios sobre la producción de bioetanol a partir del sorgo. Se escogió esta planta porque es fácil de cultivar, es el segundo cultivo más importante del país después del maíz, requiere menos cantidad de agua, es resistente a la sequía, es un 20% más barato que el maíz y se utiliza exclusivamente en la alimentación animal. La producción de bioetanol utilizando sorgo y tratándolo con amilasa termo-resistente mejoró el rendimiento de bioetanol comparado con el maíz. Sin embargo, a pesar de los estudios que realiza México para la producción de bioetanol, aún no se ha logrado una producción importante de este (González Merino & Castañeda Zavala, 2008).

El propósito de este artículo recae en una propuesta in silico de una unión de dos secuencias iguales del gen codificante de la celulasa de interés, en este caso, conocido como cel7a, a partir de Trichoderma reesei, creando una proteína de fusión unida por un linker, y posteriormente clonarla en un vector que será expresado en una levadura, Pichia pastoris, con el fin de incrementar la actividad catalítica que será útil en la producción de biocombustible. Así, se pretende aplicar en la producción de bioetanol utilizando desechos agrícolas y forestales ya que son ricos en celulosa, abundantes y baratos.

2. Materiales y Métodos

Materiales

Secuencia correspondiente al gen cel7a por duplicado. Las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción (ER) KpnI y XbaI (New England Biolabs, 2012) así como una secuencia correspondiente a una serie de primers diseñados acorde a los ciclos de PCR. Esto incluye un total de 4 primers, dos de ellos contienen un linker previamente diseñado y utilizado en una patente para la creación de una proteína quimérica funcional (se utiliza el linker dado en http://www.researchgate.net/publication/228097563). Secuencia del vector de pPICZα A utilizado en un futuro sistema de expresión de P. pastoris (los materiales están basados meramente en una propuesta in sillico).

Tabla 1. Primers utilizados en PCR in silico (los sitios de restricción subrayados y el linker en negritas)

Nombre	Secuencia
ER-F	CAGGTACCATGTATCGGAAGTTGGCC
ER-R	GTCTAGAGCAGGCACTGAGAGTAGTA
OL-F	CAGTCCCTGCAAGGACAAGGTCAAATGTATCGG
OL-R	CCGATACATTTGACCTTGTCCTTGCAGGGACTG

2.1. Gen cel7a

El gen que codifica la proteína de interés lleva por nombre Glycoside hydrolase family 7, conocido como cel7a, proveniente del organismo T. ressei QM6A (hace referencia a la cepa del organismo). Tiene un tamaño de 2023 pares de bases e incluye tres exones y dos intrones. El producto que codifica dicho gen es la proteína de interés conocida como celulosa1, 4-beta-celobiosidasa (EC 3.2.1.91) (NCBI, 2016, 2017) de quinientos catorce aminoácidos con dos dominios: dominio glucanasa/lectina tipo concavalina

A, que abarca del aminoácido diecinueve al cuatrocientos cuarenta y siete, y el dominio de unión a celulosa que va del aminoácido cuatrocientos setenta y ocho al quinientos catorce.

2.2. Pichia pastoris como sistema de expresión

La levadura metilotrófica llamada Pichia pastoris se ha convertido en un organismo utilizado importantemente para la producción elevada de proteínas recombinantes, biofarmacéuticos y enzimas utilizadas en la industria (Spohner, Müller, Quitmann, & Czermak, 2015). Tiene un sistema de producción característico durante su crecimiento a una densidad elevada de células. Esto es, tiene promotores regulados estrictamente, y la producción de las proteínas de interés por litro de cultivo es significante, tanto de manera intracelular como secretadas. Resulta ventajoso debido a su manipulación genética sencilla, así como las modificaciones postraduccionales que, a comparación de expresión en bacterias tal como E. coli que hasta ahora ha sido la más usada, presenta la capacidad de producir proteínas complejas que requieren de dichas modificaciones, o bien, contienen puentes disulfuro (Krainer et al., 2012). Estas conllevan a un plegamiento favorable de la proteína, y cuando se expresa extracelularmente, permite una fácil purificación de la misma. Además, tiene estabilidad génica que conlleva al escalamiento de procesos. Se ha demostrado que Pichia pastoris produce aproximadamente 15 gramos de proteína recombinante soluble por litro de cultivo tanto de manera intracelular, o igualmente en modo de secreción. Esto se debe primordialmente a la habilidad de esta levadura de desarrollarse a altas densidades celulares, llegando hasta 150 gramos de peso seco celular por litro de caldo nutritivo, esto en biorreactores. Cabe mencionar que, con esta alta densidad celular, incluso las proteínas que se expresan de manera limitada por célula se pueden producir en volúmenes significativos cuando se usa esta levadura para su expresión (Ahmad, Hirz, Pichler, & Schwab, 2014).

2.3. pPICZα A como vector de expresión

El pPICZα A es un plásmido usado comúnmente en P. pastoris debido principalmente a la existencia de un promotor fuerte AOX1 para regulación estricta, de expresión inducida por metanol, así como su expresión y secreción de proteínas recombinantes gracias al factor de señal de secreción alfa que dirige a la proteína producida. Cuenta con un gen de resistencia a Zeocina para selección, así como un Péptido C-terminal que contiene el epítopo c-myc y un tag de histidinas para la detección y purificación de la proteína de interés (ThermoFisher Scientific, 2015).

Métodos

2.4. Proteína de Fusión

Como producto de la tecnología recombinante de ADN, las proteínas de fusión o quiméricas se han desarrollado como biomoléculas novedosas que pueden tener propiedades multi-funcionales. Se fusionan dos o más dominios de proteínas obteniendo un número de funciones distintas que se derivan de cada componente agregado. Requiere de dos elementos esenciales, siendo las proteínas de interés y los linkers (Chen, Zaro, & Shen, 2013). Las proteínas se toman acorde a las funciones que se desean que tenga el producto, y el linker que juntará las proteínas es importante ya que puede conllevar a un mal plegamiento del producto, o bioactividad limitada. Investigaciones experimentales de la preferencia de residuos de aminoácidos de linkers naturales que se presentan en proteínas multi-dominio (aquellas que existen de manera natural) establecen que la prolina (Pro), treonina (Thr) y glutamina (Gln) son los más comunes en linkers naturales (Chen et al., 2013). Con la finalidad de incrementar la eficiencia y actividad catalítica de la proteína de interés, se propone la inserción de una proteína de fusión que consta de dos secuencias idénticas de la proteína, unidas mediante un linker que consta de cinco aminoácidos, en el siguiente orden: Glutamina (Glu)-Glicina (Gly)-Glu-Gly-Glu, de acuerdo con una patente correspondiente a una proteína quimérica bifuncional, reportada como proteína

aldolasa/quinasa (Bastida Codina, Iturrate Montoya, & García-Junceda Redondo, 2011). Se toma esta secuencia de unión debido a que ya resulta experimentalmente funcional, y por tanto existe alta probabilidad de que resulte adecuada para la propuesta descrita.

2.5. Amplificación del gen de interés

Se eligen las ER acorde al Sitio de Clonación Múltiple (MCS) del vector elegido. Dichas enzimas cuentan con sitios de reconocimiento específicas, así como una cantidad de nucleótidos necesarios para que exista un corte adecuado (Nucleótidos característicos de cada ER con el fin de que presenten cortes no asimétricos y lleven a cabo su acción de manera más eficiente, dado por New England Biolabs). Esto se incluye en el diseño de primers. Los primers se hacen con secuencias previas al codón de paro con el fin de que durante la traducción se llegue al codón proporcionado por el tag de histidinas. Asimismo, se cuida que tengan los nucleótidos necesarios para que se respete el marco de lectura y exista una fusión del c-myc con la proteína quimérica. La amplificación se lleva a cabo con PCR estándar.

2.6. PCR Overlap

Es una variación de la PCR, útil para mutagénesis y splicing de genes. Las PCR iniciales generan segmentos de genes superpuestos que posteriormente se usan como templado para la creación de un producto con longitud mayor. Los primers internos generan términos 3’ complementarios superpuestos en los amplificados intermedios, y es en este punto que se pueden introducir sustituciones de nucleótidos, inserciones o deleciones para mutagénesis, o bien, para splicing. Las hebras superpuestas de estos productos intermedios hibridan en la región 3’ en una PCR posterior, y se extienden a un producto de longitud completa (Heckman & Pease, 2007). Los primers diseñados para este paso son usados con el fin de unir ambas proteínas mediante un linker, descrito en el apartado 2.4.

2.7. Inserción del gen en pPICZα A y transformación en Escherichia coli

Inserción del producto de PCR en el vector elegido pPICZα A mediante el uso de las ER que comparte el MCS del vector y el producto a insertar. Análisis de la inserción para comprobar que se respeta el marco de lectura y se traduce a la proteína deseada. Se propone una transformación en células de E. coli mediante electroporación con el fin de seleccionar aquellas células en las que se haya insertado el plásmido exitosamente. Dicha selección se basa en la existencia de zeocina en el medio de crecimiento de las células ya que el plásmido contiene un gen de resistencia a dicho antibiótico; esto se hace con el fin de obtener múltiples copias del plásmido de interés. La electroporación es un método de transfección físico que utiliza un pulso eléctrico para crear poros temporales en membranas celulares con el fin de que material como ácidos nucleicos puedan entrar a la célula (ThermoFisher Scientific, n.d.).

2.8. Transfección en Pichia pastoris y detección de la proteína de interés

El proveedor del vector (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf, ThermoFisher) recomienda la linearización del constructo dentro de la región 5’ AOXI. Se propone el uso de la ER PmeI con un sitio de reconocimiento ubicado en la posición 414. Una vez linearizado, se recomienda la transfección en P. pastoris mediante electroporación. El proveedor recomienda también la realización de SDS-PAGE, Western blot o Ensayo Funcional con el propósito de identificar y confirmar la expresión de la proteína recombinante correcta (ThermoFisher Scientific, 2015).

2.9. Purificación de proteína de fusión

Se propone una cromatografía de afinidad con una resina de Níquel (Ni-NTA Agarose). De este modo, el grupo funcional proporcionado por el tag de histidinas interactúa con la columna. La proteína recombinante se separa del resto de las proteínas al unirse a la resina, mientras que las demás pasan a

través de la columna. La columna se lava para eliminar interacciones inespecíficas y eluir la proteína de interés mediante competencia con el uso de gradientes de buffer (Bornhorst & Falke, 2000).

3. Resultados

En la Figura 1 se observa la construcción del vector de expresión conteniendo las secuencias idénticas de la proteína de interés codificada por cel7a unidas mediante el linker, es decir pPICZα A con la proteína de fusión (para la visualización de dicho mapa se utiliza el programa de SnapGene).

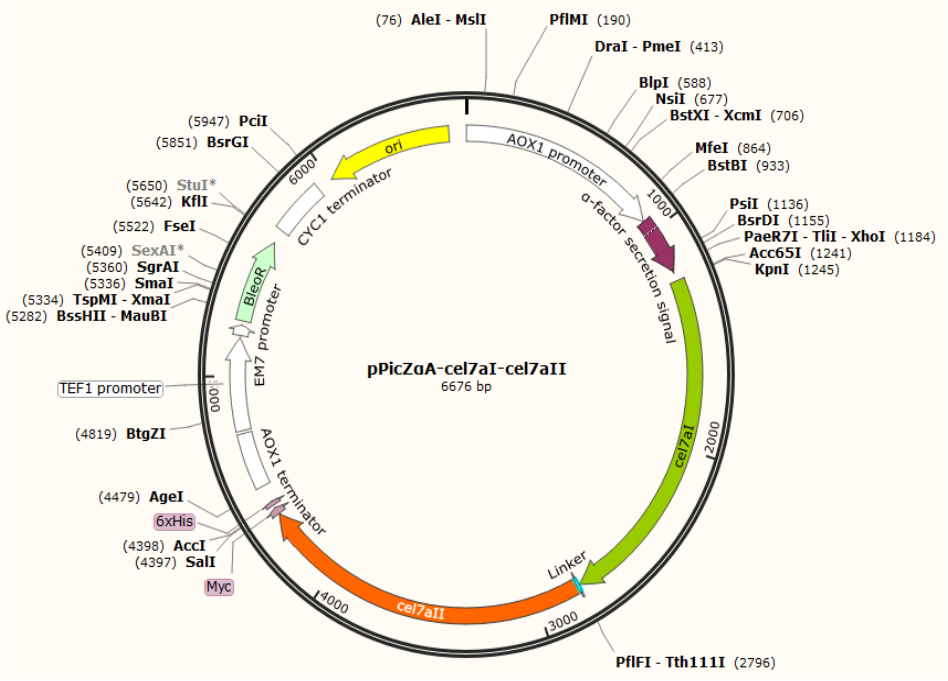

Figura 1. Mapa de restricción de pPICZα A con proteína de fusión cel7a.

La estructura terciaria de la proteína codificada por el gen cel7a se utiliza para el análisis posterior de la estructura y plegamiento de la proteína de fusión descrita en el apartado 2.4. Se utiliza Swiss Model de Expasy para construir el modelo de la proteína de interés y se realizan modificaciones de color y visualización utilizando Chimera de Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, obteniendo el modelo de la Figura 2.

Figura 2. Estructura terciaria de celulosa 1,4-beta-celobiosidasa: en azul, el dominio glucanasa/lectina y en rosa, el dominio de unión a celulosa.

La proteína cuenta con dos dominios estructural y funcionalmente diferentes, el de mayor número de aminoácidos, descrito en el apartado 2.1 resulta ser el catalítico y el de menor tamaño es de unión de celulosa; estos se encuentran unidos por un linker flexible. El sitio activo está posicionado de tal forma que la celobiosa queda encerrada por el túnel. Se estima que el túnel tiene siete sitios de unión glucosil (Divne et al., 1994).

La proteína de fusión obtenida se modela con la misma herramienta de Swiss Model, posteriormente visualizando en Chimera con el fin de analizar el plegamiento y estructura resultante (Figura 3). Se observa homología en cuanto a las estructuras secundarias, es decir, hojas plegadas beta y hélices alfa. Debido al análisis in silico de dicha proteína, no se puede determinar la estabilidad y funcionalidad de la misma, sino se toma como base el linker patentado que es característico de mantener la funcionalidad de cada proteína.

Figura 3. Estructura terciaria de proteína de fusión con dos celulosas 1,4-beta-celobiosidasa, en naranja el dominio glucanasa/lectina y en amarillo el dominio de unión a celulosa.

La proteína de fusión, representada a manera de recuadros en la Figura 4, se compone de aminoácidos no pertenecientes a dominio, seguido del dominio glucanasa/lectina tipo Concavalina A (DA), aminoácidos no pertenecientes a dominio, dominio de unión a celulosa (DC), secuencia del linker, seguido por el mismo arreglo, correspondiente a la segunda proteína.

Figura 4. Diagrama de la configuración de la proteína de fusión, señalando el dominio numéricamente con respecto a la proteína unidos por linker (L). Los recuadros amarillos son regiones no pertenecientes a dominios.

4. Discusión

En la Figura 5, se visualiza la sobrepuesta de la proteína original y la de fusión resultante con el fin de determinar la homología en cuanto a estructura y plegamiento, mismo dado por el software Chimera.

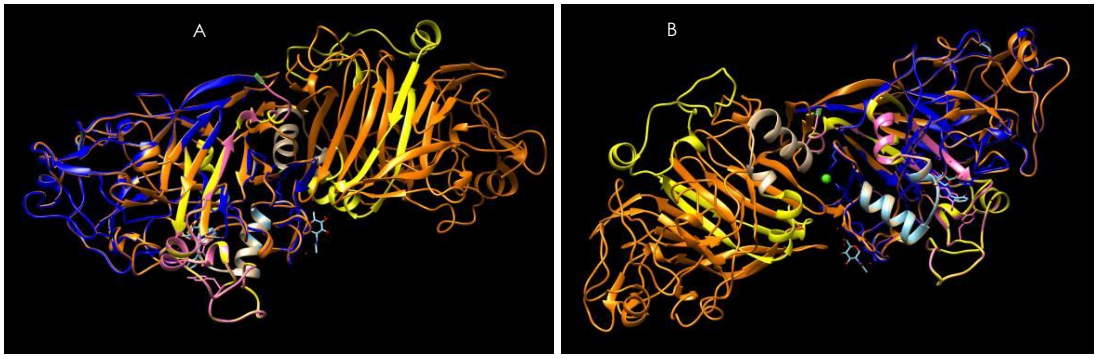

Figura 5. Representación de la proteína original sobrepuesta en la proteína de fusión. En azul el DA de la proteína original, en naranja el DA de la proteína de fusión, en amarillo el DC de la proteína de fusión y en rosa el DC de la proteína original. A) Se sobrepone la proteína original a la primera proteína, B) se sobrepone la proteína original a la segunda proteína posterior al linker.

Se observa que los dominios de la proteína original codificada por cel7a se conservan y pliegan de la misma forma en la proteína de fusión resultante. Esto sugiere que la actividad catalítica y funcionalidad se verá conservada igualmente y al tener dominios duplicados, la actividad se verá incrementada. El número de recambio cambia acorde al sustrato utilizado, en este caso, si el número es de 4.1 s^{-1} con celotetraosa como sustrato (NCBI, 2016), se espera que se duplique al tener dos proteínas funcionales.

Mediante el uso de la herramienta Alignment de Expasy, se determina el porcentaje de homología entre la proteína original y el constructo obtenido con el fin de analizar los dominios conservados, que al ser una identidad de >99% indican una probabilidad alta de tener la misma función, esto es, la deseada, de la proteína original (Figura 6).

```
100.0% identity in 514 residues overlap; Score: 2822.0; Gap frequency: 0.0%

Original        1 MYRKLAVISAFLATARAQSACTLQSETHPPLTWQKCSSGGTCTQQTGSVVIDANWRWTHA
FusionProt      1 MYRKLAVISAFLATARAQSACTLQSETHPPLTWQKCSSGGTCTQQTGSVVIDANWRWTHA
                  ************************************************************

Original       61 TNSSTNCYDGNTWSSTLCPDNETCAKNCCLDGAAYASTYGVTTSGNSLSIGFVTQSAQKN
FusionProt     61 TNSSTNCYDGNTWSSTLCPDNETCAKNCCLDGAAYASTYGVTTSGNSLSIGFVTQSAQKN
                  ************************************************************

Original      121 VGARLYLMASDTTYQEFTLLGNEFSFDVDVSQLPCGLNGALYFVSMDADGGVSKYPTNTA
FusionProt    121 VGARLYLMASDTTYQEFTLLGNEFSFDVDVSQLPCGLNGALYFVSMDADGGVSKYPTNTA
                  ************************************************************

Original      181 GAKYGTGYCDSQCPRDLKFINGQANVEGWEPSSNNANTGIGGHGSCCSEMDIWEANSISE
FusionProt    181 GAKYGTGYCDSQCPRDLKFINGQANVEGWEPSSNNANTGIGGHGSCCSEMDIWEANSISE
                  ************************************************************

Original      241 ALTPHPCTTVGQEICEGDGCGGTYSDNRYGGTCDPDGCDWNPYRLGNTSFYGPGSSFTLD
FusionProt    241 ALTPHPCTTVGQEICEGDGCGGTYSDNRYGGTCDPDGCDWNPYRLGNTSFYGPGSSFTLD
                  ************************************************************

Original      301 TTKKLTVVTQFETSGAINRYYVQNGVTFQQPNAELGSYSGNELNDDYCTAEEAEFGGSSF
FusionProt    301 TTKKLTVVTQFETSGAINRYYVQNGVTFQQPNAELGSYSGNELNDDYCTAEEAEFGGSSF
                  ************************************************************

Original      361 SDKGGLTQFKKATSGGMVLVMSLWDDYYANMLWLDSTYPTNETSSTPGAVRGSCSTSSGV
FusionProt    361 SDKGGLTQFKKATSGGMVLVMSLWDDYYANMLWLDSTYPTNETSSTPGAVRGSCSTSSGV
                  ************************************************************

Original      421 PAQVESQSPNAKVTFSNIKFGPIGSTGNPSGGNPPGGNPPGTTTTRRPATTTGSSPGPTQ
FusionProt    421 PAQVESQSPNAKVTFSNIKFGPIGSTGNPSGGNPPGGNPPGTTTTRRPATTTGSSPGPTQ
                  ************************************************************

Original      481 SHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYSQCL
FusionProt    481 SHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYSQCL
                  *********************************
```

Figura 6. Homología entre la proteína original y la de fusión.

5. Conclusión

La producción de bioetanol se ve limitada por el costo y bajo rendimiento de las enzimas utilizadas en la actualidad por lo que la propuesta de un proteína de fusión basada en la unión de dos secuencias idénticas de la misma celulasa mediante un linker que permite el correcto plegamiento y conservación de la actividad catalítica con el fin de incrementar la cantidad de producto obtenido a partir de sustrato, resulta novedoso y atiende la necesidad de incrementar la eficiencia y rendimiento de la enzima necesaria. La propuesta y análisis in silico requiere de experimentación y análisis in vivo con el fin de determinar la estabilidad y correcta funcionalidad de la proteína de fusión aquí propuesta, obteniendo datos más específicos en cuanto al alcance y beneficio que trae a procesos de producción de bioetanol y posiblemente una expansión a otras áreas.

7. Referencias

Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in Pichia pastoris: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Applied Microbiology and Biotechnology. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5

Bastida Codina, A., Iturrate Montoya, L., & García-Junceda Redondo, E. (2011). Proteína quimérica aldolasa/quinasa, procedimiento de obtención y sus aplicaciones. España.

Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. Methods in Enzymology, 326, 245–254. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8

Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W. C. (2013). Fusion protein linkers: Property, design and functionality. Advanced Drug Delivery Reviews. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039

Devlin, T. (2004). Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. Bioquímica: Libro de Texto Con Aplicaciones Clínicas, 758–760.

Divne, C., Ståhlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J. K., … Jones, T. A. (1994). The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei. Science, 265(5171), 524–528. https://doi.org/10.1126/science.8036495

Fatma, H. A. E.-Z., & Fadel, M. (2010). Production of Bioethanol Via Enzymatic Saccharification of Rice Straw by Cellulase Produced by Trichoderma Reesei Under Solid State Fermentation. New York Science, 3(4), 72–78. Retrieved from http://www.sciencepub.net/newyork

González Merino, A., & Castañeda Zavala, Y. (2008). Biocombustibles, biotecnología y alimentos. Impactos sociales para México. Argumentos Nueva Epoca, 21(57), 55–83.

Heckman, K. L., & Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. Nature Protocols, 2(4), 924–932. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.132

Krainer, F. W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O., & Glieder, A. (2012). Recombinant protein expression in Pichia pastoris strains with an engineered methanol utilization pathway. Microbial Cell Factories, 11. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-22

NCBI. (2016). glycoside hydrolase family 7 [Trichoderma reesei QM6a].

NCBI. (2017). cel7a glycoside hydrolase family 7 [Trichoderma reesei QM6a]. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=18483782

New England Biolabs. (2012). Cleavage Close to the End of DNA Fragments. BioLabs, 1–3. Retrieved from https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/cleavage-close-to-the-end-of-dna-fragments#chart-X

Pena, A. (2004). Bioquímica. (L. N. Editores, Ed.).

PQBio. (2007). Cuaderno no. 102: celulosa y celulasa. Consejo Argentino Para La Información Y El Desarrollo de La Biotecnología (ArgenBio).

Seiboth, B., Ivanova, C., & Seidl-Seiboth, V. (2011). Trichoderma reesei: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. In Biofuel Production-Recent Developments and Prospects. https://doi.org/10.5772/16848

Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H., & Czermak, P. (2015). Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with Pichia pastoris. Journal of Biotechnology, 202, 118–134.

https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.027

ThermoFisher Scientific. (n.d.). Electroporation. Retrieved from https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/electroporation.html

ThermoFisher Scientific. (2015). pPICZα A, B, & C Pichia Vectors. Retrieved from https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V19520

Vázquez López, C., Rodríguez Lage, C., Álvarez Payero, M., Yáñez González, I., Ucha Samartín, M., & Álvarez Seoane, J. (2011). Celulasa en el tratamiento de fitobezoares. Nutricion Hospitalaria, 26(6), 1490. https://doi.org/10.3305/nh.2010.26.6.5375

Este artículo puede citarse de la siguiente forma:

Citación estilo APA sexta edición
Solís Cordova, B.J., & Martínez Ojeda, J.Y. (enero-abril de 2018). Fusión de proteína codificada por el gen CEL7A de Trichoderma reesei expresado en Pichia pastoris para incrementar actividad celulasa en la producción de biocombustibles. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 4(1), 34-43.

Citación estilo Chicago decimoquinta edición
Solís-Cordova, Beatriz Jacqueline & Martínez-Ojeda, Juan Yasser. Fusión de proteína codificada por el gen CEL7A de Trichoderma reesei expresado en Pichia pastoris para incrementar actividad celulasa en la producción de biocombustibles. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 4 No. 1 (enero-abril de 2018): 34-43.

Citación estilo Harvard Anglia
Solís Cordova, B.J., & Martínez Ojeda, J.Y., 2018. Fusión de proteína codificada por el gen CEL7A de Trichoderma reesei expresado en Pichia pastoris para incrementar actividad celulasa en la producción de biocombustibles. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, enero-abril, 4(1), pp. 34-43.

Citación estilo IEEE
[1] B.J. Solís-Cordova y J.Y. Martínez-Ojeda. Fusión de proteína codificada por el gen CEL7A de Trichoderma reesei expresado en Pichia pastoris para incrementar actividad celulasa en la producción de biocombustibles. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, vol. 4 No. 1, pp. 34-43, enero-abril de 2018.