



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

**Expressió d'enzims microbians degradadors
de la paret cel·lular en les llavors del blat
de moro com a font potencial per a la
producció d'etanol cel·lulòsic**



Autora: Sílvia Àvila Cabré

Tutora: M^a Montserrat Poblet Icart

Treball de Final de Grau

Grau en Biotecnologia

7 de setembre del 2018, Tarragona

ÍNDEX

1. Resum	1
2. Introducció	2
3. Objectius	5
4. Metodologia i pla de treball	5
5. Resultats i discussió	6
6. Conclusions	34
7. Bibliografia	36
8. Autoavaluació	38

ANNEX

1. Taula sumari dels estudis	1
------------------------------------	---

1. Resum

Els enzims degradadors de la paret cel·lular (CWD) són essencials en les biorefineries per a la producció d'etanol cel·lulòsic. No obstant, la seva producció mitjançant bioreactors de microorganismes pot resultar molt cara. És per això que es planteja utilitzar les plantes com a sistemes de producció alternatius, ja que són més barats i fàcilment escalables. El blat de moro és un cultiu comercialment molt important, es disposa d'una gran quantitat de biomassa i pot produir elevats nivells de proteïnes heteròlogues amb uns costos de producció molt baixos, el que el fa perfecte per aquesta aplicació. La biomassa lignocel·lulòsica requereix pretractaments termoquímics molt agressius previs a la hidròlisi enzimàtica per obtenir sucres fermentables. És important que els enzims que s'expressen en aquesta siguin termoestables i presentin propietats de temperatura i pH òptims similars als que s'apliquen en els pretractaments, amb l'objectiu de mantenir la seva activitat enzimàtica i actuar en la següent fase del procés. Les llavors es consideren una de les millors localitzacions de la planta per a l'expressió i acumulació de grans quantitats d'enzims sense que el seu fenotip es vegi pràcticament afectat, i poden utilitzar-se directament en la producció de bioetanol com a biomassa contenidora d'enzims. Aquest treball resumeix els esforços realitzats durant els últims dotze anys en la producció d'enzims CWD en les llavors del blat de moro transgènic per a la desconstrucció de la biomassa lignocel·lulòsica. S'han descrit un seguit d'estratègies per incrementar la producció d'enzims i reduir els impactes negatius de la seva acumulació en el creixement i desenvolupament de la planta. Entre altres, s'inclouen el *targeting* dels enzims heteròlegs en compartiments subcel·lulars específics, l'ús de promotors específics de teixit o induïbles, la modificació dels enzims amb inteïnes per anul·lar la seva activitat enzimàtica durant el període de desenvolupament de la planta, l'addició de múltiples còpies d'unitats transcripcionals idèntiques en les construccions gèniques, les autopol·linitzacions o els encreuaments amb línies d'alt contingut en triacilglicerols. Tot i els grans avenços que s'han aconseguit, serà necessari perfeccionar més el procés i els enzims utilitzats per arribar a establir un sistema de producció a gran escala que sigui sostenible.

2. Introducció

El blat de moro conté carbohidrats majoritàriament en forma de midó, un polímer que s'utilitza com a matèria primera en la producció del bioetanol, resultant en la competència entre productors d'aliments i de biocombustible per l'espai agrícola. No obstant, el bioetanol també es pot produir a partir de biomassa lignocel·lulòsica procedent dels residus dels cultius, que només té valor nutricional pels remugants i és una font molt més abundant de midó i sucres. La seva producció consisteix en cinc passos principals: recol·lecció de la matèria primera i transport a la planta de processament, pretractament per reduir la lignina, hidròlisi enzimàtica per a la sacarificació (alliberació dels sucres fermentables), fermentació de la glucosa a etanol, i destil·lació (Li *et al.*, 2014). El principal problema dels polímers de la paret cel·lular com la lignocel·lulosa i l'hemicel·lulosa és que tendeixen a estar reticulats, són estructuralment heterogenis i pseudocristal·lins, fent-los recalcitrants a la hidròlisi enzimàtica si no s'utilitzen pretractaments agressius i cars. Els més efectius per a les aplicacions industrials són els químics i termoquímics. Després és necessària una combinació de diversos enzims per alliberar els sucres de la biomassa recalcitrant. La hidròlisi completa de la cel·lulosa a glucosa requereix tres enzims: una exo-1,4- β -glucanasa (o cel·lobiohidrolasa), una endo-1,4- β -glucanasa, i una β -D-glucosidasa. Les exo i endoglucanases poden hidrolitzar la cel·lulosa a cel·lobiosa, que pot ser transformada a glucosa per acció de les β -D-glucosidasas. Es pot obtenir una segona font de pentoses fermentables amb la hidròlisi del xilà utilitzant els enzims endo-1,4- β -D-xilanasa (xynA), β -xilosidasa (xyD), i α -glucuronidasa (aguA) (Li *et al.*, 2014). El cost de conversió de la lignocel·lulosa a sucre és elevat, degut a les despeses del cultiu, la recol·lecció, el transport, l'emmagatzematge, el pretractament químic i el preu dels enzims exògens. Es calcula que per a generar els 76 bilions de litres de bioetanol que els Estats Units té previstos pel 2022, seran necessàries fins a 0,6 tones d'enzim purificat amb un cost estimat d'infraestructures de gairebé 25 bilions d'€ utilitzant la fermentació microbiana per a produir-les. És per això que l'expressió d'enzims provinents de bacteris i fongs que degraden la paret cel·lular (*cell wall-degrading* o CWD) en el blat de moro podria ser una alternativa menys cara que els microorganismes; s'estima que és entre 10-50 vegades més econòmica (Park *et al.*, 2016). Així doncs, les plantes són ideals ja que són un sistema barat i molt escalable, poden produir

enzims que són tòxics pels microorganismes o les cèl·lules animals, i disposen d'un sistema de modificacions postraduccionals eucariòtic. A més, els enzims es poden extreure i purificar, utilitzar com a extractes crus, o preferiblement ser expressats en la biomassa que s'utilitzarà per a produir el bioetanol. Actualment, la única hidrolasa comercialment disponible produïda en el blat de moro és una exo-1,4- β -glucanasa de *Trichoderma reesei*, propietat de l'empresa Infinite Enzymes. El seu elevat preu inclou les despeses per extracció i purificació, fent el producte inadequat per a la seva aplicació a gran escala (Tschofen *et al.*, 2016). Una altra opció que es planteja és l'autohidròlisi de la biomassa lignocel·lulòsica utilitzant enzims generats internament per la planta. En aquests casos, la biomassa és hidrolitzada únicament per acció d'aquests enzims heteròlegs, o en combinació amb altres enzims suplementaris, sense utilitzar tractaments químics. En un estudi, es va intentar dur a terme amb l'endoglucanasa Cel5A d'*Acidothermus cellulolyticus*, però la producció de glucosa va ser molt baixa (<1%). A aquest inconvenient se li ha de sumar els costos addicionals que té afegir enzims comercials de forma exògena, ja que l'endoglucanasa per si sola allibera molt poca glucosa, i requereix d'una cel·lobiohidrolasa i una β -glucosidasa per desconstruir completament la cel·lulosa (Park *et al.*, 2016). Per tant, acaba sent una estratègia poc factible quan parlem de producció a gran escala. La última alternativa és la que es planteja en aquest treball: el pretractament directe de la biomassa lignocel·lulòsica contenint els enzims. És a dir, els enzims CWD romanen en la biomassa vegetal durant el pretractament i són activats per les elevades temperatures, actuant directament durant el procés d'hidròlisi enzimàtica. D'aquesta manera s'eviten els processos d'extracció i purificació, reduint conseqüentment el cost de producció. Perquè això sigui possible, és necessari expressar enzims termostables que no presentin activitat a les temperatures de creixement de la planta. No obstant, a vegades segueixen mantenint una petita porció de l'activitat, provocant efectes nocius en el fenotip vegetal, sobretot quan són expressats de forma constitutiva. Una manera de reduir aquests efectes és l'ús de promotors específics de teixit, com el *globulin1*, que controla l'expressió del transgen en l'embrió de les llavors del blat de moro. L'expressió de cel·lulases en aquest teixit vegetal no només redueix els efectes en la salut de la planta, sinó que es considera la localització més adequada per a l'acumulació d'enzims heteròlegs, i en la que s'han aconseguit els resultats més prometedors. A més, les llavors del blat de moro es poden utilitzar directament en la

producció de bioetanol com a biomassa contenidora d'enzims (*Fig. 1*) (Tschofen *et al.*, 2016). Tot i que en aquest cas sí que es crea competència amb la producció d'aliments, els nivells d'acumulació d'enzim que s'han obtingut són molt més elevats que en altres teixits vegetals, com per exemple en les fulles, pel que també s'esperen obtenir majors rendiments en el procés de sacarificació. Els residus que sorgeixen dels diferents passos de processament del cultiu proporcionen biomassa addicional o productes secundaris de valor (*Fig. 1*). Si les cel·lulases són produïdes en l'embrió, l'endosperma pot ser separat d'aquest i utilitzat per a generar productes derivats del midó o bioetanol. De forma similar, si les cel·lulases són expressades en l'endosperma, a l'embrió se li poden extreure els triacilglicerols per obtenir oli com un valuós producte secundari (Tschofen *et al.*, 2016). Tot i que portarà temps establir la

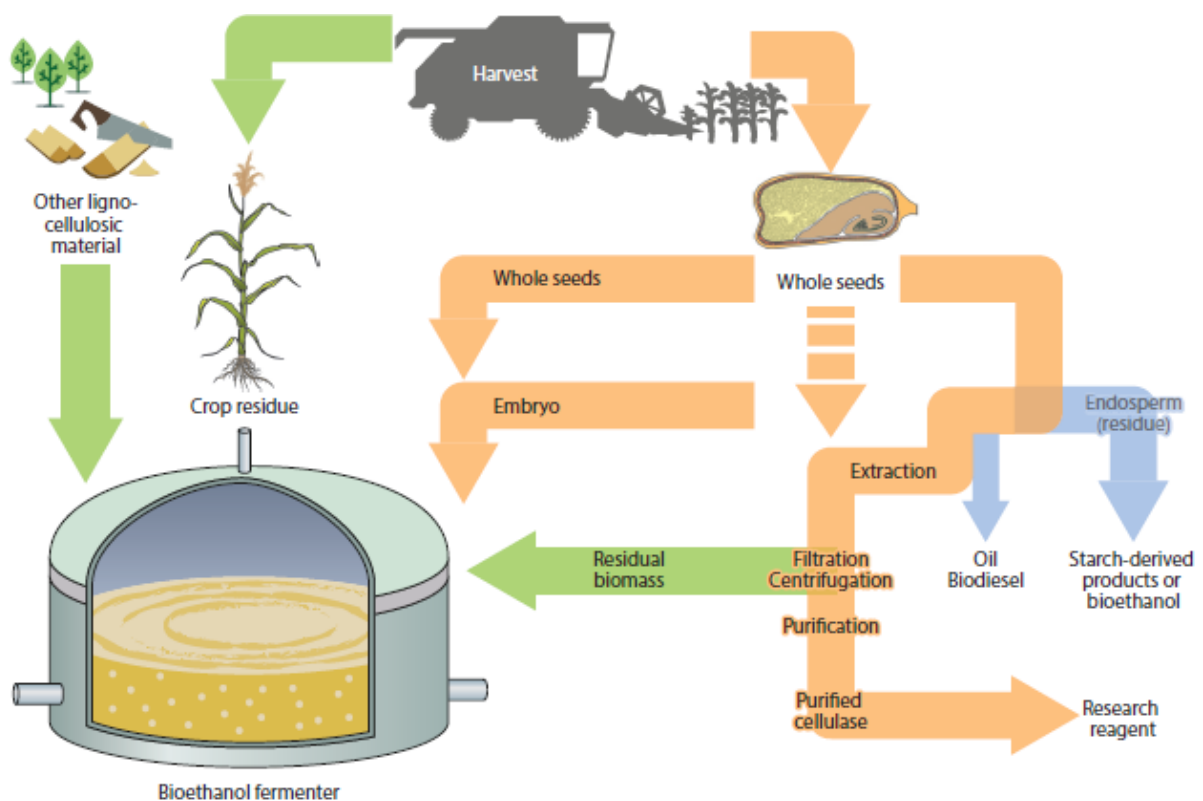


Fig. 1: Expressió d'enzims CWD en les llavors del blat de moro per a la producció de bioetanol. Es representen els fluxos de biomassa (fletxes verdes), els productes secundaris de valor (fletxes blaves) i les fraccions que contenen enzims (fletxes taronges) des del moment de la collita fins el final del processament del cultiu. Imatge extreta de la *Review* de Tschofen *et al.* (2016).

producció de bioetanol a partir de biomassa lignocel·lulòsica a escala global, els objectius actualment són optimitzar el procés mitjançant l'increment de la producció dels enzims i intentar evitar al màxim possible els efectes nocius que pot tenir la seva expressió en les plantes. Algunes de les estratègies per assolir aquests objectius inclouen: l'expressió dirigida dels enzims heteròlegs en compartiments

subcel·lulars específics mitjançant pèptids senyal, l'ús de promotors específics de teixit o promotors induïbles per a reduir les alteracions de les funcions cel·lulars, i la fusió de seqüències d'amplificació en la zona *upstream* de la regió codificant per augmentar l'expressió, entre altres. El motiu pel qual he escollit el blat de moro és que es tracta d'un cultiu comercialment molt important i disposem d'una gran quantitat de biomassa. Per tant, té grans aplicacions pràctiques, entre elles la que es presenta en aquest treball. El blat de moro compta amb molts avantatges pel que fa a la producció de proteïnes recombinants, incloent uns costos de producció molt baixos, facilitat de transformació, estabilitat del transgen al llarg de les generacions, disponibilitat de promotors adequats i efectius, i producció d'una bona quantitat de biomassa (Park *et al.*, 2016). Quan l'objectiu és expressar proteïnes heteròlogues en grans quantitats i amb un baix cost, la millor opció són els cereals transgènics (Egelkrout *et al.*, 2013).

3. Objectius

El que plantejo en aquest treball és fer una revisió dels resultats que han obtingut diversos autors en els seus estudis, basats en l'expressió de diferents tipus d'enzims degradadors de la paret cel·lular en les llavors del blat de moro. El primer objectiu serà comparar els diferents articles per detectar les possibles diferències de procediment que hi puguin haver, i així donar una explicació justificada als resultats obtinguts. El següent objectiu serà donar una visió personal dels estudis, detectar els punts crítics del procés i plantejar possibles estratègies que puguin solucionar-los. Per últim, també em proposo realitzar alguna proposta original per intentar optimitzar el procés. Les dues qüestions principals a resoldre són: "Quina estratègia és la més adequada per aconseguir una elevada producció d'enzims reduint al màxim els efectes nocius en la salut de la planta?" i "Les solucions que es plantegen als punts crítics són efectives per aconseguir l'anterior objectiu?".

4. Metodologia i pla de treball

El punt de partida d'aquest treball va ser la recerca d'informació sobre el tema *Plant Molecular Farming*. A partir de l'article de Tschofen *et al.* (2016), vaig començar a interessar-me pels productes no farmacèutics produïts a partir de sistemes vegetals, com els enzims degradadors de matèria lignocel·lulòsica. Donat que els enzims

recombinants per produir bioetanol són generalment massa cars quan són generats per microorganismes, les plantes em van semblar una bona alternativa. En aquest mateix article mencionaven diversos autors que ho havien dut a terme, i consultant la bibliografia, vaig començar la recerca en la base de dades PubMed. Això també em va portar a consultar diverses *Reviews* de la revista *Plant Biotechnology Journal*, ja que citaven els articles dels mateixos autors. En aquestes revisions vaig trobar algunes taules resum amb els resultats dels estudis de molts autors que havien treballat no només amb el blat de moro, sinó amb altres sistemes vegetals com la planta del tabac, de l'arròs, la canya de sucre, etc. A partir d'aquí em vaig decidir centrar en el blat de moro com a sistema de producció, per diverses raons ja explicades en la introducció. Un altre criteri per a seleccionar els estudis definitius va ser que la producció d'enzims fos com a mínim d'un 4% TSP, ja que assolir elevades acumulacions de la proteïna heteròloga és un dels principals interessos. En aplicar aquest criteri, vaig trobar que la majoria d'estudis amb elevades produccions coincidien en utilitzar les llavors com a teixit d'expressió. També es repetien alguns enzims com les cel·lulases, les cel·lobiohidrolases i les xilanases com les més adequades. Així doncs, amb tots aquests criteris vaig seleccionar els estudis exposats en aquest treball, que es troben ordenats pel tipus d'enzim expressat (veure *Annex 1*). Tots estan extrets de la base de dades PubMed, incloent aquells que vaig utilitzar posteriorment com a font d'informació per a plantejar solucions als punts crítics. El període de recerca ha estat entre el maig i l'agost del 2018, sent el 26 d'agost l'última data.

Keywords: *cell wall-degrading enzymes, lignocellulosic biomass, bioethanol production, transgenic maize seed, cellulase, glycoside hydrolase, cellobiohydrolase*

5. Resultats i discussió

Clough *et al.* (2006) van aconseguir expressar l'enzim manganès peroxidasa (MnP) del fong *Phanerochaete chrysosporium* de forma activa i acumular-lo en grans quantitats en llavors transgèniques de blat de moro. Aquest enzim es caracteritza per contenir un grup hemo i requereix un agent oxidant com el peròxid d'hidrogen per catalitzar l'oxidació del Mn(II) a Mn(III). Està implicat en la degradació de la lignina. Tot i que ja s'havia expressat exitosament en l'alfàbrega, la salut de la planta havia resultat afectada negativament. És per aquest motiu que Clough *et al.* es van

dedicar a examinar altres estratègies per expressar proteïnes heteròlogues en sistemes vegetals. Per a fer-ho, van construir diversos vectors d'expressió (Fig. 2);



Fig. 2: Vectors d'expressió de la manganès peroxidasa (MnP). El vector MPA és l'únic que no presenta el pèptid senyal BAASS ni cap altre, i per aquest motiu l'enzim s'acumula en el citoplasma, on els ribosomes sintetitzen les proteïnes. Imatge extreta de l'article de Clough *et al.* (2006).

tots incloïen l'ORF de la manganès peroxidasa sense el seu pèptid senyal natiu, però alguns presentaven un promotor constitutiu i altres un promotor específic de llavors *globulin1* (Glb1), i el mateix amb el pèptid senyal BAASS (*barley α -amylase signal sequence*), encarregat de dirigir la secreció de la proteïna a la paret cel·lular. Amb aquest experiment es volia comprovar quina era la millor combinació per assolir un major rendiment en l'expressió i acumulació de la proteïna i per minimitzar els efectes nocius sobre la salut de la planta. Van demostrar que el *targeting* a la paret cel·lular provocava la secreció de la MnP en la seva longitud total, mentre que la localització citoplasmàtica resultava en múltiples polipèptids truncats de la peroxidasa. A més, l'ús del promotor específic de teixit va incrementar exageradament els nivells d'expressió i va reduir els efectes negatius en el fenotip de la planta, ja que l'expressió constitutiva de la manganès peroxidasa en els teixits vegetatius causava impactes negatius molt severos, com lesions i la mort cel·lular. Cada esdeveniment transgènic independent (ITE) expressant el vector MPD (Fig. 2) va produir línies que acumulaven com a mínim un 6% de TSP. No obstant, la gran majoria presentaven nivells de MnP d'almenys un 11%, amb les millors plantes acumulant més d'un 14%. Degut als elevats nivells d'expressió i la bona salut de les plantes MPD, es van utilitzar les línies dels dos ITEs amb millors resultats i les de dos ITEs alternatius per estudis addicionals sobre l'herència i expressió de la MnP. Es van realitzar diverses pol·linitzacions, incloent retrocreuaments per transferir el gen de la manganès peroxidasa a diferents línies endogàmiques d'elit, autopol·linitzacions i encreuaments amb línies d'alt contingut en triacilglicerols per avaluar si incrementava l'acumulació d'enzim. Les panotxes van ser recol·lectades i la MnP mesurada en mostres derivades d'una barreja de 50 llavors per planta. A banda d'una excepció, les panotxes resultants de les autopol·linitzacions eren les

que contenien més MnP, presentant màxims al voltant d'un 10% TSP. Això era d'esperar, ja que en aquestes hi hauria d'haver més còpies del transgen, al contrari que en les resultants d'un retrocreuament amb una línia endogàmica. Algunes línies autopol·linitzades van presentar aproximadament el doble de contingut en MnP que l'observat quan les mateixes eren retrocreuades amb línies d'elit. A banda de les autopol·linitzacions, els continguts més alts de MnP es van observar en esdeveniments resultat d'encreuaments successius amb línies d'alt contingut en triacilglicerols, més que amb línies d'elit. En cada estació, la quantitat de MnP per pes sec en aquestes panotxes era aproximadament el doble que en les resultants de retrocreuaments amb línies endogàmiques. A més, no es van observar efectes negatius en la salut de les plantes.

Un any després, Hood *et al.* (2007) confirmaven que el *targeting* subcel·lular és una condició clau per aconseguir grans nivells d'acumulació de cel·lulases en el teixit embrionari de les llavors del blat de moro transgènic. Convertir biomassa lignocel·lulòsica pretractada en monòmers de sucre requereix, com a mínim, una endoglucanasa i una exoglucanasa. Els requisits que havien de complir aquestes cel·lulases eren: (i) exhibir activitat sinèrgica en substrats lignocel·lulòsics; (ii) ser termostables com a mínim a 45°C; i (iii) ser compatibles pel que fa al seu pH òptim. Per aquest motiu, els enzims escollits pels autors van ser la cel·lulasa E1, una endo-1,4-β-glucanasa termofílica d'*Acidothermus cellulolyticus*, i la cel·lobiohidrolasa I (CBH I), una exoglucanasa de *Trichoderma reesei*. Ambdós enzims presenten temperatures òptimes molt més elevades que la temperatura a la qual creix la planta (30°C), motiu pel qual és menys probable que tinguin efectes perjudicials per al blat de moro durant el seu desenvolupament. E1 i CBH I mostren activitat sinèrgica en substrats lignocel·lulòsics que han estat pretractats amb àcid i vapor. L'enzim E1 escindeix internament els polímers de cel·lulosa per alliberar extrems lliures que després seran degradats per l'exoglucanasa. Tot i que E1 té una activitat òptima a 81°C, segueix sent molt activa a 45-50°C, la temperatura òptima de la CBH I. A més, aquesta última segueix mostrant una activitat sostinguda a temperatures per sobre dels 50°C. També comparteixen pH òptim (5-6). Els autors van crear tres vectors d'expressió per a cada cel·lulasa, amb tres *targets* subcel·lulars diferents: apoplast, reticle endoplasmàtic i vacuola. Una de les principals diferències amb l'estudi de Clough *et al.* (2006), a banda de que els enzims a expressar tenen activitats

totalment diferents, és que en aquest cas van construir tots els vectors directament amb un fragment d'1.4 kb del promotor específic *globulin1* (Glb1) enlloc de fer-ho amb un promotor constitutiu, havent vist que una expressió generalitzada dels enzims comporta efectes nocius en la salut de la planta. Un altre fet a destacar és que els autors van optimitzar els primers 40 codons de cada seqüència codificant, incloent el pèptid senyal, per a la seva expressió en el blat de moro. Les construccions per a RE i apoplast tenien el pèptid senyal BAASS fusionat en l'extrem N-terminal. A banda, per aconseguir el *targeting* al RE, al vector també se li va afegir una senyal de retenció KDEL en l'extrem 3'. Per últim, per assolir el *targeting* a la vacuola, es va utilitzar una seqüència derivada de la vacuola lítica del blat de moro (VT). Els resultats que van obtenir es mostren en la *Taula 1*. Pel que fa a la cel·lulasa E1 (requadre vermell), el màxim % TSP en una llavor (17.9%) es va detectar en una línia transgènica transformada amb el vector BCF, que contenia el pèptid senyal BAASS i la seqüència KDEL; per tant, la diana era el RE. Cal destacar que l'enzim E1 localitzat en el RE va mostrar poca o nul·la expressió en dos ITes. No obstant, totes les llavors positives dels ITes amb major expressió en el RE mostraven valors per a E1 iguals o superiors al 3% de TSP, presentant la gran majoria valors per sobre del 10%. El *targeting* d'E1 a la vacuola també va donar resultats molt positius, obtenint una línia transgènica que presentava un % TSP màxim del 16%. Una avaluació inicial d'un *pool* de llavors amb l'E1 dirigida a la paret cel·lular (vector BCD) va mostrar que els nivells d'expressió es trobaven per sota dels de la vacuola i el RE, motiu pel qual els autors ja no van realitzar *screenings* addicionals de les llavors individuals (en la *Taula 1* es mostra com ND). Cal evidenciar que la cel·lulasa E1 recuperada dels extractes de les llavors estava

Taula 1: Esdeveniments i plantes resultants de la transformació amb diferents vectors per a l'expressió d'enzims degradadors de la paret cel·lular en el blat de moro. Es mostren els resultats de les llavors individuals amb major nivell d'expressió, així com la mitjana de TSP de totes les llavors positives per a cada vector en particular. També es mostren els valors per a la segona generació (T2), en mostres de 50 llavors. Taula extreta de l'article de Hood *et al.* (2007).

Gen	Orgànul diana	Nom del vector	Nº d'ITes	Nº total de plantes	TSP màxim en llavors T1 (%)	Mitjana TSP en T1 (%)	TSP en T2 (%)
E1	Paret cel·lular	BCD	16	154	ND	0.5	ND
	RE	BCF	6	42	17.9	6.1 ± 4.8	3.5-4.5
	Vacuola	BCH	3	31	16	5.6 ± 2.7	8-9
CBH I	Paret cel·lular	BCC	8	69	17.8	3.2 ± 1.8	3.7-5.1
	RE	BCE	13	107	16.3	4.1 ± 2.6	3.2-3.8
	Vacuola	BCL	10	96	0	0	ND

truncada a ~40 kDa, que coincideix amb la mida del seu domini catalític. No obstant, la cel·lulasa era enzimàticament activa. Pel que fa a la cel·lobiohidrolasa I, els autors van destacar la gran variància que es produïa en referència a l'acumulació de proteïna entre els diversos ITEs obtinguts amb un mateix vector, i fins i tot entre les plantes clons dins un mateix esdeveniment. Per aquest motiu, és essencial fer un *screening* individual de les llavors de cada línia transgènica. Parlant en termes generals, la millor expressió de CBH I (requadre blau) es va observar en les línies que contenen l'enzim en el RE, encara que el màxim % de TSP per llavor es va detectar quan la CBH I es trobava localitzada en la paret cel·lular (17.8%). L'activitat enzimàtica de la CBH I va ser nul·la en les línies transgèniques que havien estat transformades amb el vector BCL, el *targeting* del qual era la vacuola. Per últim, en alguns ITEs per a la CBH I dirigida a la paret cel·lular i al RE no es van detectar llavors positives.

En aquests dos primers experiments podem detectar un problema en comú, que és l'aparició d'enzims truncats. Tot i que en el cas de Hood no va resultar un inconvenient perquè la cel·lulasa seguia sent catalíticament activa, no sempre és així. La truncació dels enzims és deguda a la pèrdua de mòduls d'unió a carbohidrats (CBMs), uns dominis proteics que es troben en enzims actius en carbohidrats, com les hidrolases glicosídiques. Els CBMs es troben units al domini catalític de l'enzim a través d'un *linker* i faciliten la seva unió i moviment al llarg del polisacàrid. No tots els enzims en tenen de forma natural, però fins i tot aquests mostren una major activitat enzimàtica quan se'ls hi afegeix un mitjançant l'enginyeria de proteïnes. Existeixen diverses estratègies per evitar l'eliminació dels CBMs per acció de proteases endògenes:

- **Escollir un enzim que només presenti un domini i no tingui CBMs.**
- **Dirigir els enzims que presentin CBMs al reticle endoplasmàtic i els cloroplasts.** En diverses ocasions s'ha demostrat que la retenció dels enzims en aquestes dues localitzacions subcel·lulars pot resultar beneficiosa perquè es produeix una barreja d'enzim truncat i de longitud completa, mentre que el *targeting* a l'apoplast dona lloc exclusivament a l'enzim truncat (Klose *et al.*, 2015). Crec que aquesta última afirmació no es pot utilitzar de forma generalitzada, ja que en l'estudi de Clough *et al.* (2006) el *targeting* de la manganès peroxidasa a l'apoplast va permetre la secreció de la proteïna en la

seva longitud total, però podria ser que depengués del tipus d'enzim expressat. Sigui com sigui, sembla que el *targeting* en el reticle endoplasmàtic aporta més beneficis, tenint en compte que també presenta una sèrie de xaperones moleculars que impedeixen el transport de molècules proteiques immadures (Park *et al.*, 2016).

- **Fusionar el domini catalític de l'endoglucanasa amb un CBM.** Per exemple, l'any 2011 es va aconseguir l'expressió intacta de l'enzim TmCel5A de *Thermotoga maritima* en els cloroplasts fusionant el seu domini catalític amb el CBM6 de *Clostridium stercorarium*. No obstant, encara no està molt clar quines característiques de la proteïna de fusió van provocar que aquesta fos més estable a la degradació per proteases (Park *et al.*, 2016).

Egelkroun *et al.* (2013) van dur a terme un experiment molt similar al de Hood *et al.*, però limitant-se a l'expressió de la cel·lulasa E1 en la vacuola i la CBH I en l'apoplast de les llavors, que eren dues de les localitzacions subcel·lulars on Hood havia demostrat que es produïen grans nivells d'acumulació específicament per a cada enzim. Si comparem els resultats obtinguts pels dos autors, podem observar que tot i haver utilitzat la mateixa localització de *targeting* per a cada cel·lulasa i el mateix fragment d'1.4 kb del promotor específic *globulin1*, els percentatges de TSP obtinguts van ser notòriament diferents (Taula 2), sobretot en el cas de la CBH I de *Trichoderma reesei*. Pel que fa a l'enzim E1, Egelkroun *et al.* van aconseguir una acumulació màxima del 7.1% TSP en la vacuola de les llavors del blat de moro, mentre que Hood va assolir una acumulació del 16% en les mateixes condicions. El % TSP per a la cel·lulasa CBH I en l'apoplast de les llavors també va ser major en l'experiment de Hood (17.8%) que en el d'Egelkroun (3.2%). Cal destacar que no es pot dur a terme una comparació exacta entre els dos estudis degut a que els *backgrounds* genètics de les plantes utilitzades eren diferents i que Egelkroun i col·laboradors no van obtenir un nombre suficient de llavors en la generació T1 com per a poder donar resultats més concloents. A banda de repetir l'experiment de Hood *et al.*, Egelkroun va voler comprovar l'efecte que tenia utilitzar un fragment més llarg del promotor *Glb1* i incrementar el nombre de còpies d'unitats transcripcionals idèntiques, al igual que múltiples còpies de l'enzim sota el control de diferents promotors específics d'embrió. Els promotors utilitzats van ser: el gen de *globulin2*

(Glb2), dos gens amb funció desconeguda *ABI promoter 36* (pr36) i *ABI promoter 26* (pr26), i un fragment de 3 kb del promotor *globulin1* (Glb1). S'ha demostrat que cada

Taula 2: Comparativa de les condicions i els resultats obtinguts en els experiments realitzats per Hood *et al.* (2007) i Egelkrou *et al.* (2013). En vermell, valors de % TSP informats per cada autor en el mateix experiment. Cal destacar que només Egelkrou va afegir una altra prova en la seva investigació per a comprovar l'efecte que tenia utilitzar una combinació de diferents promotors en una mateixa construcció. En aquest cas, no hi ha resultats de Hood per a comparar.

Organisme font de l'enzim	Nom de l'enzim	Localització targeting	Pèptid senyal	Promotor	% TSP	Ref.
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	E1	Vacuola	VT	Glb1 (1.4 kb)	16%	Hood et al., 2007)
				Glb1 (1.4 kb)	7.1%	(Egelkrou et al., 2013)
				Glb2 + Glb1 (3 kb) + pr26	18.8%	
<i>Trichoderma reesei</i>	CBH I	Apoplast	BAASS	Glb1 (1.4 kb)	17.8%	Hood et al., 2007)
				Glb1 (1.4 kb)	3.2%	(Egelkrou et al., 2013)
				Glb1 (3 kb) + pr36 + Glb2	4.1%	

un d'aquests promotors és capaç de mantenir l'expressió del gen reporter GUS a nivells similars o superiors que el promotor Glb1 d'1.4 kb. Per avaluar la seva efectivitat en l'expressió i acumulació d'E1 i CBH I en el blat de moro transgènic, els autors van preparar una sèrie de construccions substituïnt el gen GUS pels gens de les cel·lulases E1 (d'*A. cellulolyticus*) o bé CBH I (de *T. reesei*) sota el control de diverses combinacions d'aquests promotors. Tot i que totes les construccions amb E1 d'aquest estudi tenien la seva diana en la vacuola, Egelkrou *et al.* van preparar-ne una que contenia dues còpies de l'enzim E1, una dirigida al reticle endoplasmàtic (amb una seqüència de terminació KDEL) i l'altra a la vacuola (amb la senyal VT). L'objectiu era comprovar un altre fet que Hood havia demostrat en el seu estudi: que

la cel·lulasa E1 s'acumulava a elevats nivells quan era dirigida a la vacuola, però també en el RE. De fet, si ens tornem a fixar en la *Taula 1*, Hood va reportar un major % TSP d'aquesta cel·lulasa en el reticle endoplasmàtic (17.9%). També va demostrar que era una bona localització subcel·lular per a l'acumulació de la cel·lulasa de *T. reesei*, però el que sobta de l'estudi d'Egelkroust és que en aquest cas no van preparar cap construcció per a comprovar-ho, sinó que totes tenien la seva diana en l'apoplast. A continuació es mostra la *Figura 3*, on podem observar un diagrama de les diferents construccions gèniques i els resultats de l'assaig enzimàtic

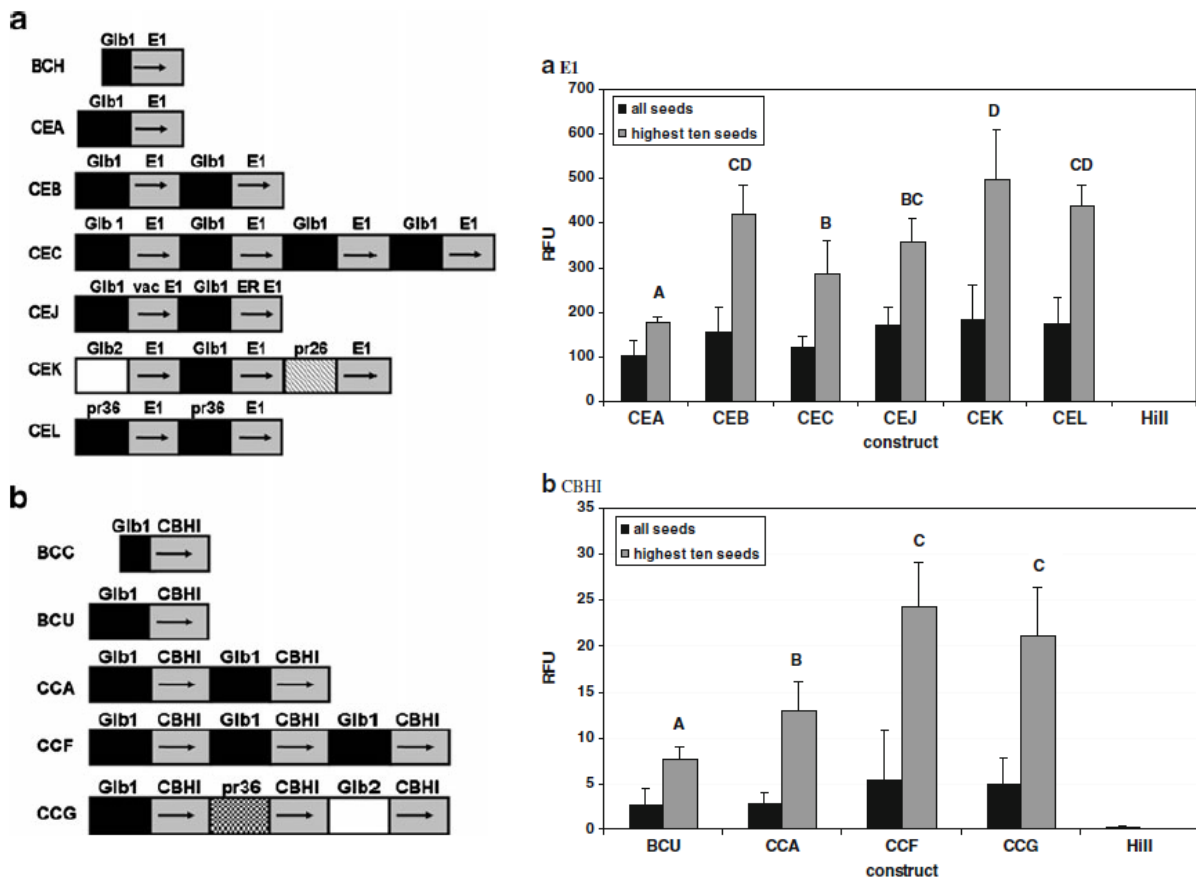


Fig. 3: A l'esquerra, diverses combinacions de la regió codificant d'E1 (a) o de CBH I (b) sota el control de diferents promotors per a la seva expressió en l'embrió de la llavor del blat de moro. Les construccions BCH i BCC contenen el fragment d'1.4 kb del promotor *globulin1* (rèplica de l'experiment de Hood), mentre que en la resta de construccions el promotor Glb1 és un fragment de 3 kb. A la dreta, activitat enzimàtica de les cel·lulases E1 (a) i CBH I (b) en les llavors positives T1. Es mostra la RFU mitjana i la desviació estàndard per a cada construcció, tant per a totes les llavors positives (*en negre*) com per a les deu llavors amb major expressió (*en gris*). Control negatiu: plantes no transformades Hill. Figures extretes de l'article d'Egelkroust *et al.* (2013).

de fluorescència amb el substrat MUC per a determinar l'activitat enzimàtica en les llavors positives de la generació T1. Típicament, per a determinar la quantitat absoluta d'activitat enzimàtica en els extractes de llavors, s'utilitzen quantitats conegudes d'enzim purificat com a patrons. No obstant, la disponibilitat dels enzims

E1 i CBH I purificats és limitada, pel que és complicat fer una quantificació precisa d'un gran nombre de mostres en assajos d'alt rendiment. Per aquesta raó, l'autor va utilitzar una mesura de l'activitat de les cel·lulases basada en les unitats de fluorescència relativa (RFU) per microgram de TSP dels extractes de les llavors T1, amb l'objectiu de poder avaluar un gran nombre de plantes i identificar les línies amb major expressió. Per tenir en compte qualsevol variació entre assajos, es va utilitzar una preparació comercial de cel·lulases de *T. reesei* (a 40 ng per CBH I o 800 ng per E1), i d'aquesta manera normalitzar les unitats de fluorescència. Aquest extracte va ser analitzat en una corba estàndard generada per patrons purificats de les dues cel·lulases. La quantitat absoluta de cel·lulasa en els extractes es determinava comparant les RFU de les llavors representatives amb les dels estàndards purificats i s'expressava en % TSP. Hood també va realitzar l'assaig MUC per a determinar l'activitat de les cel·lulases, però no especifica quina mesura va utilitzar, sinó que presenta directament diverses gràfiques amb el % TSP per a cada línia transgènica i localització subcel·lular de l'enzim (figures no mostrades). Tampoc presenta la desviació estàndard per a cap valor, a diferència d'Egelkroun. És per això que penso que l'estudi d'aquest últim autor és molt més precís i complet, encara que els seus resultats en % TSP siguin menys destacables que els de Hood. Una altra observació és que cap dels dos autors fa cap comentari respecte al fenotip de les llavors que expressen les cel·lulases, o si la seva acumulació té algun tipus d'efecte nociu sobre el desenvolupament de la planta. Deixant de banda els resultats en % TSP obtinguts per ambdós, Egelkroun va descriure algunes evidències importants que es poden observar en la *Figura 3*. L'addició d'una segona còpia de la unitat transcripcional d'E1, va incrementar en un 50% l'acumulació de l'enzim pel que fa a la mitjana de totes les llavors positives i en 2.4 vegades pel que fa a la mitjana de les deu llavors amb major expressió (*Fig. 3*; construcció CEA vs. CEB). En canvi, l'addició d'una segona còpia en el cas de l'enzim CBH I no va comportar cap diferència d'expressió pel que fa a la mitjana de les llavors positives, però sí que va incrementar en 1.8 vegades pel que fa a les deu llavors amb més expressió (*Fig. 3*; construcció BCU vs. CCA). Això significa que en afegir una altra còpia de la unitat transcripcional l'expressió va incrementar només en aquelles llavors en les quals ja s'estava acumulant una major quantitat d'enzim, però no de forma generalitzada en totes les positives. Amb l'objectiu de comprovar si l'expressió dels enzims seguiria sent major en afegir més de dues còpies de la unitat transcripcional, van preparar una

construcció amb quatre còpies de la unitat promotor-E1 (CEC) i una altra amb tres còpies de la unitat promotor-CBHI (CCF). En el cas de la CCF, l'activitat enzimàtica mitjana va ser el doble d'elevada que la determinada en la construcció amb dos còpies. En canvi, quatre còpies de la unitat transcripcional d'E1 resultaven en nivells d'activitat enzimàtica més baixos que en el cas de dos còpies, i tan sols 1.2 vegades majors que en el cas d'una sola còpia. Els autors van plantejar la hipòtesi de que utilitzar el mateix promotor per a cada unitat transcripcional podria donar lloc a esdeveniments de recombinació, silenciament gènic o competència entre dos promotors pels mateixos factors de transcripció, i que aquests fets podrien explicar la disminució de l'activitat d'E1 en la construcció CEC. Amb l'objectiu de sobrepassar aquest obstacle, també van preparar construccions utilitzant una combinació dels diferents promotors comentats amb anterioritat (Glb2, pr36, pr26, Glb1) i tres còpies de la regió codificant de cada cel·lulasa. Pel que fa a la CBH I, la construcció amb tres promotors diferents va mostrar una activitat enzimàtica molt similar a la construcció amb tres unitats transcripcionals sota el mateix promotor (*Fig. 3; construcció CCG vs. CCF*). Per tant, per aquesta cel·lulasa no es complia l'anterior hipòtesi. En canvi, sí que es complia per a la cel·lulasa E1, ja que la construcció amb tres promotors diferents (CEK) va mostrar una major expressió en comparació amb tota la resta de construccions. Així doncs, el nivell d'activitat enzimàtica relativament baix que van obtenir amb la construcció CEC no es devia a propietats inherents de la proteïna, sinó a alguna de les causes descrites anteriorment, i que es podia solucionar utilitzant una combinació de diferents promotors. En la meua opinió, hagués estat més interessant que la construcció CEK s'hagués dissenyat afegint quatre còpies de l'enzim E1 enlloc de tres, i d'aquesta manera comprovar si una vegada solucionat el problema de la recombinació/silenciament gènic l'activitat enzimàtica augmentaria addicionant una còpia més de l'enzim, o si per contra ja s'havia assolit un límit. Sigui com sigui, és evident que la combinació entre un major nombre de còpies de l'enzim (en el cas de l'E1 sabem que fins a tres) i l'ús de promotors diferents per a cada unitat transcripcional incrementa els nivells d'expressió en les llavors. Com podem comprovar en la gràfica, ambdues construccions amb tres promotors diferents (CEK i CCG) mostraven una mitjana d'acumulació de totes les llavors positives 1.8 vegades més elevada que les seves respectives construccions amb una sola còpia de l'enzim sota el promotor *globulin1* de 3 kb. Pel que fa a la mitjana de les deu llavors amb major expressió, els resultats

eren més exagerats: l'acumulació d'ambdós enzims era tres vegades major en les construccions amb tres promotors diferents que en les que contenien una sola unitat transcripcional (*Fig. 3*; per a E1: CEK vs. CEA, per a CBH I: CCG vs. BCU). Pel que fa a la construcció CEJ preparada per a comprovar si la cel·lulasa E1 s'acumulava en majors quantitats quan era dirigida a la vacuola i també al reticle endoplasmàtic, van trobar que l'expressió era similar a la de la construcció amb dues còpies d'E1 ambdues dirigides a la vacuola (*Fig. 3*; CEB vs. CEJ). Finalment, es va examinar una última construcció amb dues còpies d'E1 sota el control del promotor *pr36* com un altre exemple de transcripció múltiple. Va mostrar una acumulació d'enzim similar a l'assolida amb dues còpies d'E1 sota el promotor *globulin1* de 3 kb (*Fig. 3*; CEB vs. CEL). Per tant, ambdós promotors resultaven igual d'eficients en l'expressió d'aquesta cel·lulasa. Un fet a destacar és que per a cap de les dues cel·lulases podem detectar diferències estadísticament significants entre els nivells d'expressió de totes les llavors positives per a cada construcció (barres negres; *Fig. 3*). No obstant, es dibuixa una tendència clara cap a l'augment de la mitjana d'activitat amb l'addició de múltiples còpies de les unitats de transcripció. Aquest fet s'observa sobretot si comparem els nivells d'acumulació d'E1 entre les diferents construccions per a les deu llavors amb major expressió, on sí que veiem diferències estadísticament significants. En general, l'ús de diverses còpies incrementa l'expressió de 2 a 3 vegades per ambdues cel·lulases, en comparació amb les seves relatives construccions amb una sola còpia sota el control del promotor *globulin1*. Les expectatives són que l'expressió d'aquestes cel·lulases incrementi significativament mitjançant la selecció i el retrocreuament d'aquestes línies transgèniques amb línies endogàmiques d'elit.

L'any 2013, Devaiah i els seus col·laboradors, entre els quals es trobava Hood, van aconseguir per primera vegada en la història l'expressió de l'altra cel·lobiohidrolasa de *Trichoderma reesei* (CBH II) en l'endosperma de les llavors del blat de moro. La finalitat principal d'aquest estudi era produir la cel·lulasa CBH II per combinar-la amb les altres dues que Hood havia aconseguit expressar prèviament a nivells comercials, la CBH I i l'E1, ja que les tres mostren activitat sinèrgica. En aquests casos, l'activitat enzimàtica de la mescla composta per les cel·lulases és significativament major que la suma de les activitats dels enzims per separat. Els codons del gen de la CBH II van ser optimitzats per ser expressats en el blat de

moro, sota el control del promotor específic d'endosperma *rice glutelin* OsGlu. Com que prèviament Hood havia demostrat que la paret cel·lular de l'embrió era una bona localització subcel·lular per a l'acumulació d'elevats nivells de CBH I, els autors d'aquest estudi van decidir fer el mateix per a la CBH II. Una vegada preparada la construcció gènica, es van obtenir dotze esdeveniments transgènics independents (ITEs), cada un amb múltiples plantes clons. Les plantes transgèniques van ser pol·linitzades per plantes endogàmiques d'elit per obtenir així les llavors T1. L'anàlisi de l'activitat enzimàtica en aquestes llavors es va dur a terme exactament igual que en l'experiment de Hood, utilitzant el substrat MUC i un patró purificat de CBH II per a realitzar la corba estàndard. Entre els diferents ITEs, va destacar-ne un en concret per presentar cinc plantes que contenien llavors amb nivells de TSP entre el 22-30%, uns percentatges considerablement més elevats que els obtinguts per a la CBH I i l'E1 en l'experiment de Hood. Els dos següents ITEs amb més acumulació van mostrar percentatges de TSP de fins a un 8%. Amb l'objectiu d'incrementar l'acumulació de CBH II en l'endosperma de les llavors, set dels ITEs que van mostrar els nivells més elevats d'activitat de la cel·lulasa es van retrocreuar de nou amb línies d'elit. Les llavors T2 resultants d'aquest encreuament van ser analitzades. L'ITE que mostrava una major acumulació de CBH II en les llavors T1 seguia sent el de major expressió en la generació T2, amb un percentatge del 34.2% TSP obtingut a partir d'un grup de 50 llavors d'una de les panotxes. Les línies transgèniques dels ITEs restants van mostrar una acumulació de CBH II entre 3 i 22% TSP. Tot i això, aquests sis esdeveniments transgènics havien multiplicat els nivells d'acumulació de la cel·lulasa entre 2.5 i 10 vegades entre les dues generacions de llavors, a diferència de l'ITE amb major expressió, que no havia mostrat cap increment. Aquests increments entre generacions són particularment remarcables quan es té en compte que les llavors T2 són analitzades en grups de 50 (que contenen un rati 1:1 de llavors positives i negatives) i són comparades amb les llavors T1 individuals de major expressió. Mitjançant aquest experiment, els autors van poder comprovar les expectatives de les que parlava Hood en el seu estudi. Era possible incrementar els nivells d'acumulació de les cel·lulases entre generacions mitjançant un retrocreuament amb línies endogàmiques d'elit. La gran pregunta era si aquest increment es mantindria constant a través de les generacions o si a partir d'un cert nombre de retrocreuaments deixaria de tenir efecte. Cal dir que el mecanisme pel qual es produeix aquest augment encara no es coneix, i no sempre es produeix.

L'investigador Benjamin N. Gray i els seus col·laboradors van ser els primers en expressar xilanases GH10 en el blat de moro (*Zea mays*), l'any 2011. En concret, van transformar la planta amb els següents gens: *bsx* de *Bacillus* sp. NG-27 i *xynB* de *Clostridium stercorarium*, codificadors de dues endo-1,4- β -xilanases. Aquests enzims i altres hidrolases glicosídiques (GHs) es poden classificar en famílies en base a la seva seqüència primària d'aminoàcids. Les xilanases presents en aquest estudi formen part de la família 10, i escindeixen l'arabinoxil·là (Fig. 4). Són especialment interessants perquè poden trencar residus adjacents a xiloses ramificades amb arabinosa o àcid glucurònic, substitucions molt freqüents en l'estructura de l'arabinoxil·là de la paret cel·lular del blat de moro. Aquest tipus d'estructura limita molt la despolimerització del xil·là per part de les xilanases del grup GH11, augmentant la recalcitrància de la biomassa d'aquest cultiu. És per això que els autors van trobar

interessant expressar les xilanases GH10, i d'aquesta manera facilitar la degradació de l'hemicel·lulosa. Van expressar ambdues xilanases sota el control de dos promotors diferents per assolir una expressió global (llavors i fulles) i una exclusivament en l'endosperma de les llavors, i així comprovar quina era l'acumulació de proteïna en cada cas. L'expressió global de les xilanases es va aconseguir utilitzant el promotor *rice ubiquitin 3 (rubi3)* i el pèptid senyal BAASS per dirigir els enzims a la paret cel·lular, i va resultar en una acumulació enzimàtica d'aproximadament un 0.1% de TSP i efectes nocius molt severos en el creixement i fenotip de les plantes (atrofiament, llavors estèrils). Podria ser que el *targeting* d'aquests enzims a l'apoplast hagués provocat la hidròlisi de l'esquelet de xil·là durant el creixement de la planta, debilitant la seva estructura i causant així el fenotip mal desenvolupat d'aquestes plantes transgèniques. Degut als resultats que van obtenir,

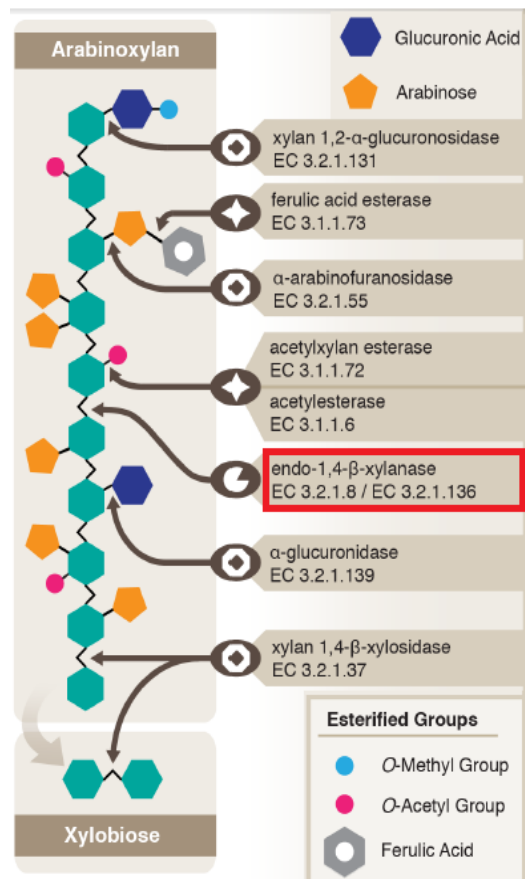


Fig. 4: Estructura de l'arabinoxil·là i les diferents hidrolases glicosídiques que tenen una activitat degradadora sobre aquesta. En el requadre vermell es senyala el tipus de xilanases que es van utilitzar en aquest estudi (BSX i XynB). Imatge extreta de la Figura S2 en la informació complementària de la Review de Park *et al.* (2016).

em dedicaré a relatar exclusivament l'altra meitat de l'estudi en qüestió. Mitjançant el promotor específic de teixit *rice glutelin 4 (GluB-4)*, els autors van aconseguir expressar ambdues xilanases en les llavors del blat de moro i que aquestes s'acumulesin fins a un 4.0% TSP en el cas de la BSX i fins a un 16.4% en el cas de la XynB, el que representa 40 i 160 vegades més, respectivament, que el percentatge assolit utilitzant el promotor *rubi3*. Malgrat els elevats nivells d'acumulació, totes les plantes transgèniques presentaven llavors amb un fenotip arrugat, els embrions estaven severament mal formats i l'endosperma era més petit en comparació al salvatge. No obstant, cal destacar que l'expressió de xilanases en aquestes no va interrompre el desenvolupament normal dels teixits somàtics, a diferència de l'expressió global. Com era d'esperar, en entrecreuar aquestes línies transgèniques amb plantes *wild-type* s'obtenia descendència amb el 50% de les llavors arrugades (*Fig. 5*). El pes sec de les llavors transgèniques representava entre

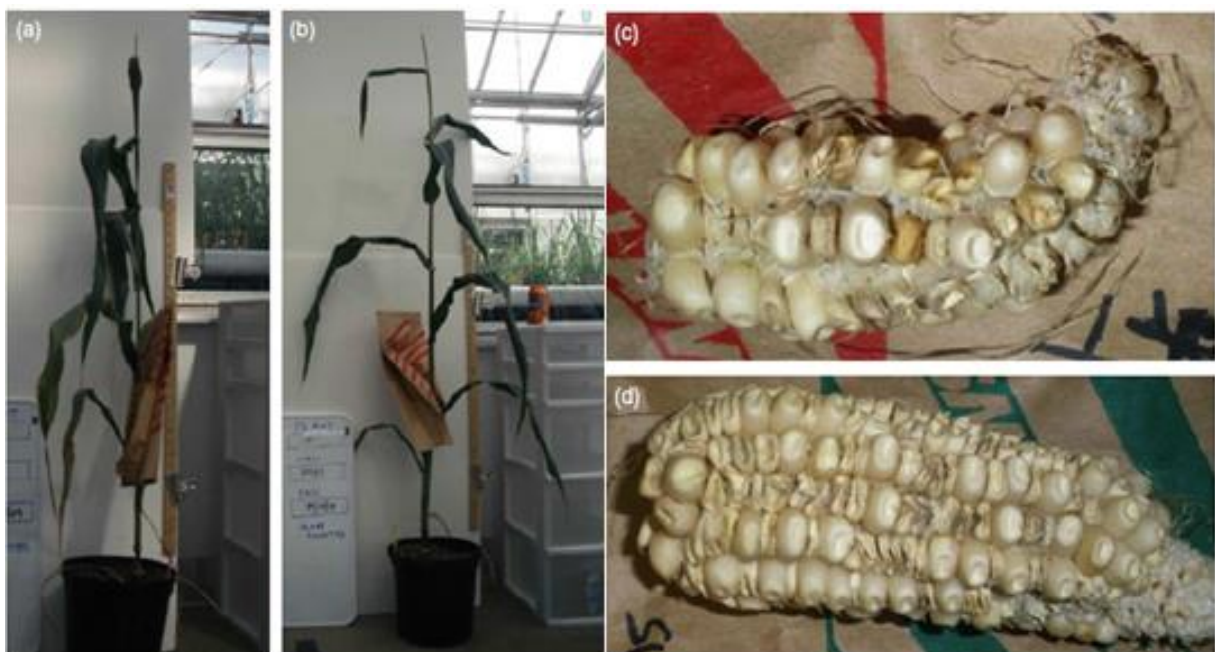


Fig. 5: Desenvolupament normal dels teixits somàtics i fenotip clivellat de les llavors de les panotxes del blat de moro transgènic. (a) teixit somàtic d'una planta transformada amb el gen *bsx*, promotor *Glub-4*. (b) teixit somàtic d'una planta transformada amb el gen *xynB*, promotor *Glub-4*. (c) panotxa resultant de l'encreuament entre la planta en (a) i una WT. (d) panotxa resultant de l'encreuament entre WT i la planta en (b). Imatge extreta de l'article de Gray *et al.* (2011).

un 25-30% del pes de les llavors WT, independentment del promotor utilitzat per a l'expressió del transgen o l'acumulació d'enzim en aquestes. En termes de pes absolut (p.ex. mg midó per llavor), el contingut en midó de les llavors transgèniques era un 70% menor en comparació amb les WT. No obstant, en termes de pes sec (mg midó per g pes sec), els autors van observar que el contingut en midó es

mantenia invariable. L'explicació era que no només havia disminuït el contingut en midó, sinó també els grams en pes sec de la llavor, fent que la proporció es mantingués. En contrast, els principals polisacàrids associats a l'hemicel·lulosa (xilà, arabinà i galactà) es trobaven en major quantitat en les llavors transgèniques que en les salvatges. Per exemple, en termes de pes sec, el contingut en xilà i arabinà es va duplicar en les llavors modificades, mentre que es va quadruplicar pel que fa al galactà. Aquests sacàrids, com ja s'ha dit, poden trobar-se formant part de l'esquelet d'hemicel·lulosa de la paret cel·lular de la llavor o bé poden estar associats a components proteics d'aquesta (p.ex. proteïnes arabinogalactans). Formen part del contingut estructural insoluble de la paret cel·lular que roman després de la sacarificació del midó. L'únic component de la paret cel·lular que va disminuir en les llavors transgèniques va ser el glucà estructural; entre un 92-93% (en termes absoluts) i un 70-75% (en pes sec). Pel que respecta al contingut en sucres solubles, la sacarosa també es va duplicar en les llavors modificades, però només en el cas d'utilitzar el promotor Glub-4. Aquests resultats esdevenen molt prometedors, ja que la principal conclusió que podem treure és que tot i que la llavor transgènica perd molta massa respecte la no modificada, la proporció entre el contingut en sucre (mg) i el pes de la llavor (g pes sec) es manté o bé augmenta en comparació amb les no transgèniques. Aquest fet ens interessa molt perquè, a excepció del cas del glucà, no perdem matèria prima per a la producció del bioetanol. La pèrdua de pes sec en les llavors transgèniques es podria explicar analitzant les variacions de contingut en altres components, com àcids grassos, proteïnes o altres sucres solubles (no analitzats en l'estudi).

Hood *et al.* (2007) suggerien que expressar enzims amb temperatures òptimes molt més elevades que la temperatura de creixement de la planta probablement tindria menys efectes perjudicials per al blat de moro. En aquest estudi es va poder comprovar que, tot i que ambdues BSX i XynB són òptimament actives a elevades temperatures (70°C i 80°C, respectivament), l'acumulació *in planta* d'aquests enzims termofílics pot provocar defectes de creixement o efectes específics en el teixit on s'emmagatzemen, fins i tot quan ho fan en petites quantitats. Això podria ser degut a que aquests enzims mantenen una porció de la seva activitat òptima a temperatures de creixement de la planta (20-30°C). No obstant, existeixen altres factors que poden influir en el desenvolupament de la planta, com la proximitat de l'enzim amb el seu

substrat (es pot controlar mitjançant el *targeting* subcel·lular), els nivells d'acumulació de l'enzim i el temps de residència d'aquest en la planta. La principal conseqüència del fenotip mal format que provoquen aquests factors és l'esterilitat de les llavors, que va impedir la sembra de les plantes transgèniques de la generació T1. Mentre que algunes plantes són capaces de propagar-se vegetativament, el blat de moro requereix de llavors fèrtils per a la seva propagació. Es plantegen diverses alternatives que podrien reduir o donar solució als efectes perjudicials que resulten de l'expressió *in planta* de xilanases o altres enzims degradadors de la paret cel·lular:

- **Promotors específics de teixit.** Com s'ha pogut observar al llarg dels diversos estudis, utilitzar promotors específics de teixit per a l'expressió d'enzims que degraden la paret cel·lular aporta molts més beneficis que utilitzar promotors constitutius. Els promotors específics de llavor resulten particularment efectius i donen lloc als nivells més elevats d'acumulació de proteïna. Un altre avantatge és que els enzims poden ser acumulats en les llavors després de la collita i retenir encara la seva activitat després d'un llarg període d'emmagatzematge a temperatura ambient. L'any 2006, Clough *et al.* ja van descriure que amb l'ús del promotor *globulin1* s'aconseguien incrementar els nivells d'expressió de la manganès peroxidasa (MnP) en les llavors del blat de moro i reduir a la vegada els efectes negatius en la salut de la planta. Un any més tard, Hood *et al.* van realitzar el seu experiment utilitzant un fragment d'1.4 kb del mateix *Glb1*, deixant de banda els promotors constitutius donat els inconvenients que presentaven. Egelkrout *et al.* van decidir millorar l'eficàcia d'aquest promotor utilitzant un fragment més gran (de 3 kb), el qual podia permetre una expressió del gen reporter GUS el doble d'elevada que l'aconseguida amb el promotor *Glb1* d'1.4 kb, segons s'havia descobert prèviament. A més, també van demostrar que utilitzar diferents promotors específics per a conduir cada unitat transcripcional podia incrementar encara més l'expressió de certs enzims (com en el cas de la cel·lulasa E1 d'*A. cellulolyticus*), ja que reduïa les probabilitats de recombinació, alleujava el silenciament gènic, o prevenia la competició entre dos promotors pels mateixos factors de transcripció. Així doncs, utilitzar promotors específics de teixit té dues avantatges principals: millorar els nivells d'expressió dels enzims i evitar els efectes perjudicials que pot tenir expressar-los de forma constitutiva en la

planta. Un altre fet a destacar és que, generalment, un promotor és més efectiu quan s'expressa en la mateixa classe de planta de la qual se'n deriva (sistema homòleg) (Park *et al.*, 2016). Per exemple, els autors Clough, Hood i Egelkroust van utilitzar promotors específics d'endosperma (Glb1 i Glb2) procedents del blat de moro (*Zea mays*) per a conduir l'expressió de gens en la pròpia planta. En canvi, Devaiah i Gray van utilitzar promotors específics (Glub-4 i *rice glutelin*) procedents de l'arròs (*Oryza sativa*) per conduir l'expressió de gens en el blat de moro. No obstant, en la taula sumari de l'*Annex* podem observar que Devaiah va ser el que va obtenir un percentatge més elevat de TSP entre tots els investigadors. Però hem de tenir en compte que a part de l'origen del promotor específic utilitzat, hi ha una gran diversitat de factors que poden influenciar els resultats obtinguts, com la localització del *targeting*, la classe d'enzim que es vol expressar o el *background* genètic de la planta, entre altres.

- **Promotors regulats pel propi desenvolupament de la planta.** Una potencial estratègia podria ser utilitzar un promotor que només fos actiu durant la senescència, com per exemple el promotor *SEE1*. D'aquesta manera, els enzims s'expressarien immediatament abans de la collita, després de la maduració de les parets cel·lulars, de manera que la salut de la planta no es veuria afectada durant el període de creixement. Un estudi ho va demostrar generant plantes d'arròs transgèniques que expressaven el gen *EXG1* sota el control del promotor induïble per senescència *SGR*. Les plantes resultants havien millorat la seva habilitat de sacarificació sense que la seva morfologia o fertilitat es veiessin afectades, sent suficientment eficients per a la producció de bioetanol (Furukawa *et al.*, 2014). Els autors van plantejar que això podia ser degut a que les plantes són sensibles a la integritat de la paret cel·lular durant el seu creixement, però no després d'assolir la maduració, des del punt de vista de la morfogènesi. Alternativament, també podria ser degut a que el període d'expressió (és a dir, la senescència) o el nivell d'expressió del gen *EXG1* sota el promotor *SGR* no fos suficient per afectar la morfologia de les plantes.
- **Promotors induïbles per etanol o temperatura.** També són alternatives interessants ja que permeten iniciar l'expressió dels enzims en el moment que es consideri adequat.
- **Control postraduccional de l'activitat enzimàtica.** Es podria aconseguir amb la disrupció de la seqüència d'aminoàcids de l'enzim utilitzant una inteïna, eliminant

així l'activitat enzimàtica. Les inteïnes són pèptids autoescindibles presents en les proteïnes d'alguns Eucarya, Eubacteria i Archaea simples. Poden interrompre la funcionalitat d'una proteïna hoste fins que són eliminades d'aquesta. Després de l'escissió, la inteïna lliga els polipèptids dels extrems o "exteïnes" amb un enllaç peptídic en una reacció de *splicing*, restaurant així la funció de la proteïna hoste. D'aquesta manera, l'enzim s'acumularia en forma de precursor inactiu durant el creixement de la planta, i després podria ser activat durant el processament de la biomassa induint l'escissió de la inteïna, normalment amb un canvi de temperatura.

Això és precisament el que van dur a terme Shen *et al.* l'any 2012. Van modificar una xilanasa termostable de *Dictyoglomus thermophilum* (XynB; EC 3.2.1.8) per a que contingués la inteïna Tth del bacteri termofílic *Thermus thermophilus*, amb l'objectiu de controlar l'activitat catalítica de l'enzim, ara anomenat iXynB. Per a que la inteïna s'escindeixi i s'empalmin les dues extreïnes, es requereix la presència d'una cisteïna (Cys), serina (Ser), o treonina (Thr) en el lloc d'unió entre l'extrem carboxil de la inteïna i l'extrem amino de l'exteïna carboxil (C-exteïna) de la proteïna diana (Fig. 6). Segons això, els autors van inserir la seqüència codificant de la

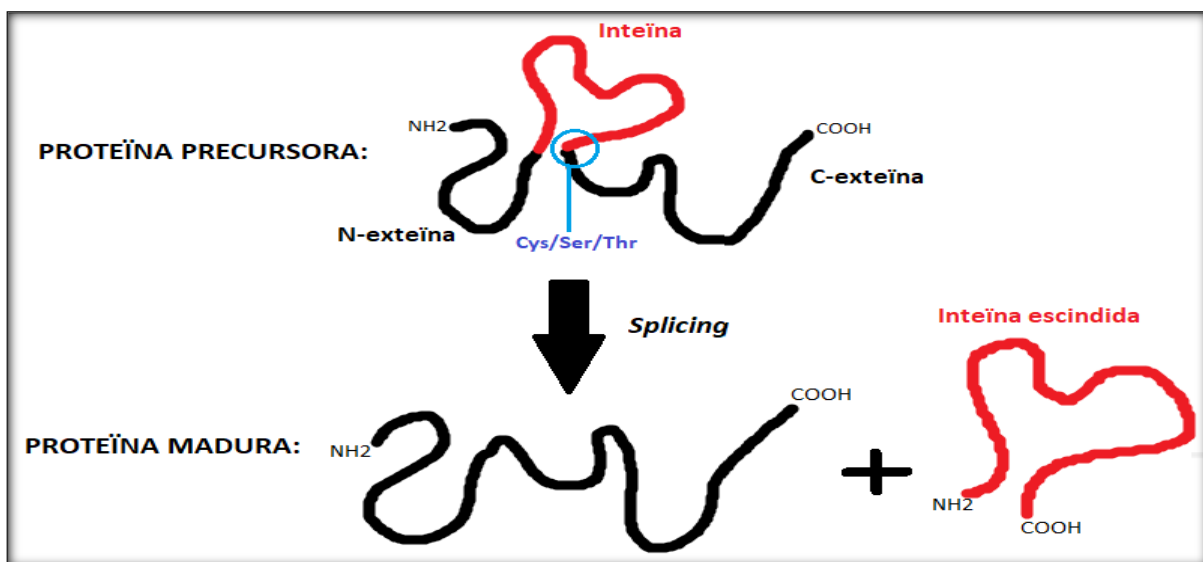


Fig. 6: Reacció de *splicing* d'una inteïna. Es tracta d'un procés autocatalític en el qual la inteïna s'escindeix ella mateixa de la proteïna primària o precursora i llavors catalitza la unió dels dos extrems o extreïnes, donant lloc a dos productes: la proteïna madura per una banda, i la inteïna per una altra.

inteïna Tth en un total de 23 localitzacions individuals, que van ser seleccionats dels 82 possibles llocs Cys, Ser i Thr perquè es trobaven principalment entre els residus catalítics de la seqüència primària de la XynB. La inteïna actua bloquejant l'accés del

substrat al centre catalític de l'enzim. Les construccions obtingudes es van avaluar en plaques d'agar que contenien un substrat amb xilà, que es tornava blau en presència de xilanasa activa. Segons els resultats obtinguts amb aquestes plaques, les iXynB es van classificar en "constitutives" si formaven plaques blaves sense tractament tèrmic (a 37°C o inferior), "termoregulades" si les plaques es tornaven blaves només després d'una incubació a elevades temperatures (60°C-70°C fins a 6 hores), o "nul·les" si les plaques romanien incolores sota totes les condicions. Les xilanasas modificades de major interès eren aquelles que pertanyien al grup de les "termoregulades", ja que la inteïna s'alliberava de l'enzim activant-lo a temperatures molt més elevades que a les que creix normalment una planta. Això significa que la xilanasa romandria inactiva per la presència de la inteïna mentre la biomassa no fos processada i, per tant, els teixits vegetals no es veurien afectats durant el seu desenvolupament. Depèn del lloc on era inserida la inteïna en la XynB, l'activitat d'aquesta variava des de la no escissió fins a un *splicing* casi complet. És per això que van realitzar un *screening* de totes les iXynB termoregulades per escollir les més eficients, basant-se en que l'enzim modificat presentés una molt baixa activitat a 37°C, però recuperés el major percentatge possible d'activitat de la XynB *wild-type* quan era exposada a elevades temperatures. No obstant, totes les iXynB seleccionades van recuperar <5% d'aquesta activitat. Per desenvolupar una variant d'iXynB amb una termoregulació eficient, els autors van mutagenitzar el gen *ixynB* utilitzant la tècnica *error-prone* PCR, que es basa en el fet que la Taq DNA polimerasa no presenta activitat exonucleasa 3' a 5', i això resulta en una taxa d'error d'entre 0.001-0.002% per nucleòtid per replicació. L'activitat xilanasa de les variants iXynB seleccionades va ser analitzada utilitzant un pretractament tèrmic a baixes temperatures (37°C durant 4 h) i a elevades temperatures (59°C durant 4 h). Aquelles que mostraven un increment de l'activitat després del pretractament a elevades temperatures, van ser mutagenitzades de nou per millorar el seu rendiment. Algunes d'aquestes, aconseguien recuperar > 60% de l'activitat enzimàtica de la XynB WT després del pretractament a 59°C durant 4 h, i eren les mateixes que mostraven < 10% d'activitat després del pretractament a 37°C durant 4 h. Això indicava que eren bones candidates, ja que a temperatures de creixement de la planta pràcticament no mostraven activitat enzimàtica (a diferència de la XynB WT que té una activitat constitutiva), però a temperatures elevades de pretractament tèrmic eren activades i mostraven més d'un 60% de l'activitat de l'enzim salvatge. No

obstant, després de pretractaments tèrmics a 59°C durant més de 4 h l'activitat enzimàtica començava a disminuir. Així doncs, amb aquestes variants d'*iXynB* es poden protegir les plantes dels efectes nocius que té l'expressió de la *XynB* WT, i al mateix temps retenen l'activitat enzimàtica beneficiosa després del processament de la biomassa. Per demostrar la utilitat de les variants d'*iXynB* en el blat de moro transgènic, els autors van construir vectors d'expressió utilitzant el promotor constitutiu *rice ubiquitin 3 (rubi3)* per a conduir la transcripció del precursor *iXynB* o bé de l'enzim *XynB* actiu, fusionats amb el pèptid senyal BAASS per a dirigir-los a la paret cel·lular. El blat de moro transgènic *xynB* va desenvolupar llavors amb el ja conegut fenotip clivellat o arrugat, però es va observar un creixement vegetatiu normal. No obstant, el blat de moro transgènic *ixynB* va desenvolupar llavors de forma normal sense mostrar cap diferència amb les plantes control. De fet, les llavors transgèniques *ixynB* van germinar més (91.7%) que les no transgèniques (83.5%). Per tant, les plantes de blat de moro que expressaven aquesta *iXynB* no van desenvolupar infertilitat com descriuen Gray *et al.* (2011) en el seu estudi. El primer que sorprèn d'aquest experiment és que l'autor va decidir utilitzar un promotor constitutiu per a l'expressió de les xilanases, donat que altres investigadors ja havien afirmat en nombroses ocasions que la millor opció era utilitzar un promotor específic de teixit com el *globulin1*. No obstant, en aquest cas veiem que els inconvenients que pot presentar l'expressió global de les xilanases es veuen sobrepassats per l'ús de la inteïna, ja que aquesta permet suspendre l'activitat enzimàtica durant el desenvolupament de la planta. En aquest cas en concret, l'opció d'un promotor constitutiu podria resultar més eficient, ja que la quantitat d'enzim acumulat seria major, i gràcies a la modificació de la inteïna la salut de la planta no es veuria afectada per la presència de la xilanasa. Pel que fa a la hidròlisi de la paret cel·lular, les plantes transgèniques *ixynB* van demostrar un major rendiment. Tant les plantes no transgèniques com les transgèniques *xynB* i *ixynB* van produir la mateixa mitjana de rostoll en pes sec per planta, i el mateix contingut en glucà i xilà; no obstant, van diferir en l'activitat de la xilanasa, sent la més elevada la dels rostolls *ixynB* homogenats. Per últim, els autors van desenvolupar un procés de pretractament de la biomassa transgènica i no transgènica a 55°C, i així comprovar com es comportaven els diferents rostolls. En afegir un còctel enzimàtic sense xilanasa (Ct-Xyl), els rostolls *xynB* i *ixynB* van presentar una producció teòrica de glucosa del 50.9% i del 60.3%, respectivament, mentre que en les plantes WT era d'un 32.6%.

Això suggeria que un benefici de les plantes que expressen *ixynB* és fer la cel·lulosa més accessible i digerible sota condicions de processament. Afegir xilanasa en el còctel enzimàtic (FCt), va incrementar els rendiments de glucosa tant dels rostolls transgènics com del *wild-type*. No obstant, el rostoll transgènic *ixynB* produïa més glucosa utilitzant el còctel Ct-Xyl (sense xilanasa) que el rostoll WT tractat amb el còctel FCt (amb xilanasa). Això pot indicar que existeix un avantatge de bioprocessament quan s'utilitzen plantes productores de xilanasa enlloc d'afegir l'enzim de forma externa, possiblement degut a que l'enzim està més pròxim a la paret cel·lular, on ha d'actuar, quan s'expressa *in situ* en la planta que quan s'afegeix de forma exògena. Així doncs, els autors afirmaven que expressar una sola xilanasa podia resultar en un estalvi per al processador major que el valor de les xilanasas afegides de forma exògena.

- **Expressió de l'enzim heteròleg en localitzacions subcel·lulars (*targeting*) on aquest no trobi el seu substrat.** Donat que el substrat de les hidrolases glicosídiques és la cel·lulosa que forma part de la paret cel·lular, no dirigir l'expressió d'aquests enzims a localitzacions com l'apoplast podria ajudar a prevenir la seva degradació abans de temps. No obstant, ja hem pogut veure diverses estratègies com l'addició d'una inteïna o l'ús de promotors induïbles que ens permeten utilitzar l'apoplast com a diana sense perjudicar la salut de la planta. Els orgànuls també poden ser escollits com a diana en base a la compatibilitat que presenten amb les propietats físiques de l'enzim (com per exemple el pH). També poden ser utilitzats per a segrestar els enzims fins que la planta acabi de madurar, i així protegir les parets cel·lulars d'una degradació prematura (Park *et al.*, 2016). Alguns seran més adequats que altres segons l'enzim que es vulgui expressar i l'hoste, però s'han establert alguns avantatges i inconvenients generals per a cada localització subcel·lular (*Taula 3*).

Taula 3: Avantatges i inconvenients que presenten les diferents localitzacions subcel·lulars com a candidates per ser la diana d'expressió d'enzims heteròlegs. Informació extreta de la *Review* de Park *et al.*, (2016).

Localització del targeting	Avantatges	Inconvenients
CITOSOL	<ul style="list-style-type: none"> -Elevats nivells d'acumulació. S'han arribat a reportar valors d'un 50% en TSP, concretament per una 1,4-β-glucosidasa d'<i>Humicola grisea</i>, en les fulles de la planta del tabac. 	<ul style="list-style-type: none"> -S'ha d'eliminar qualsevol pèptid senyal que hi hagi en la construcció gènica. -Presència d'elevats nivells de proteases. -Absència de modificacions co- i postraduccionals.
APOPLAST	<ul style="list-style-type: none"> -Utilitzant el pèptid senyal PR-S/Pr1a/Pr1b, s'han assolit rendiments de producció raonables (1.2-6.1%) sense que la integritat de la paret cel·lular es veiés afectada en les fulles de tabac, blat de moro, arròs i alfals. 	<ul style="list-style-type: none"> -A elevats nivells d'expressió, els enzims CWD poden reduir la recalcitrància de la paret cel·lular, però també poden tenir efectes negatius en el creixement i desenvolupament de la planta.
RETICLE ENDOPLASMÀTIC	<ul style="list-style-type: none"> -Conté una sèrie de xaperones moleculars necessàries durant el plegament i ensamblatge de les proteïnes, que també impedeixen el transport de molècules proteiques immadures. -Es pot aconseguir que l'enzim s'acumuli en altres orgànuls anul·lant la senyal de retenció en el RE. -Elevats nivells d'acumulació de les cel·lulases E1 i CBH I en el blat de moro (Hood <i>et al.</i>, 2007). 	<p>No s'han descrit.</p>

<p>VACUOLA</p>	<p>-Encara que el nombre de vacuoles per cèl·lula vegetal és relativament baix, tenen un gran volum que pot resultar beneficiar per l'acumulació d'enzims.</p> <p>-Utilitzada per emmagatzemar una gran varietat d'enzims CWD (endoglucanases, cel·lobiohidrolases, β-glicosidases i endoxilanasas).</p> <p>-En general, l'acumulació i retenció de l'activitat enzimàtica acostuma a ser elevada en les vacuoles.</p> <p>-En llavors de blat de moro, la vacuola va acumular la major quantitat de cel·lulasa E1 d'entre tots els orgànuls (Hood <i>et al.</i>, 2007).</p>	<p>No s'han descrit.</p>
<p>CLOROPLASTS (via transformació nuclear)</p>	<p>-Particularment idonis perquè es troben en gran nombre en la cèl·lula vegetal i tenen una doble membrana que assegura la contenció dels enzims heteròlegs en l'interior, evitant que aquests interfereixin en el creixement cel·lular o l'activitat metabòlica.</p>	<p>-Només s'han utilitzat com a <i>target</i> per expressar enzims en les fulles del tabac, d'<i>Arabidopsis thaliana</i> i de la canya de sucre. No hi ha casos en el blat de moro.</p>
<p>CLOROPLASTS (via transformació plastidis)</p>	<p>-Les cèl·lules vegetals contenen moltes més còpies del genoma del cloroplast que del nuclear, pel que és possible produir moltes còpies del transgen i així incrementar l'acumulació de proteïna.</p> <p>-Acumulació de la proteïna directament en el cloroplast, sense</p>	<p>-Elevades expressions dels enzims en els cloroplasts ocasionalment poden causar deficiències en els pigments i la fotosíntesi. Tot i així, aquests defectes fenotípics i fisiològics poden ser parcialment superats</p>

	<p>necessitat d'interrompre regions codificants i no codificants essencials.</p> <ul style="list-style-type: none"> -Possibilitat d'expressar múltiples proteïnes a partir d'un mRNA policistrònic a elevats nivells. -Absència de silenciament gènic. -Més seguretat en la contenció del transgen degut a la transferència materna del genoma dels plastidis. -L'acumulació dels enzims resulta ser més elevada en els cloroplasts que en altres orgànuls. 	<p>generant plantes heteroplàsmiques, és a dir, que continguin una barreja de plastidis transgènics i no transgènics.</p> <ul style="list-style-type: none"> -De nou, no s'ha reportat cap cas en el cas del blat de moro.
MITOCONDRIIS	<ul style="list-style-type: none"> -Al igual que els cloroplasts, es troben en gran nombre en la cèl·lula vegetal, presenten una doble membrana i tenen material genètic propi. 	<ul style="list-style-type: none"> -A diferència dels cloroplasts, mai s'ha aconseguit transformar el genoma dels mitocondris de plantes terrestres. -L'acumulació d'enzims com la cel·lulasa E1 en els mitocondris del blat de moro ha resultat ser bastant més baixa que en altres orgànuls. -No es coneix si l'acumulació d'elevades quantitats d'enzims en els mitocondris podria tenir efectes sobre la respiració cel·lular.

Una vegada s'han plantejat diverses solucions per prevenir els efectes negatius resultants de l'acumulació d'enzims CWD *in planta*, el següent objectiu és incrementar l'expressió d'aquests. Existeixen diverses estratègies per dur-ho a terme, algunes de les quals ja hem vist al llarg d'aquest treball:

- **Targeting a múltiples orgànuls.** Es pot aconseguir incorporant un pèptid senyal per un orgànul i una seqüència de terminació en l'extrem C-terminal per un segon orgànul. Utilitzant aquest mètode, alguns autors han demostrat que l'acumulació de xilanasa era significativament major quan es dirigia als cloroplasts i als peroxisomes que quan només era dirigida a un sol orgànul (Park *et al.*, 2016). No obstant, recordem que en l'experiment d'Egelkroust es va preparar una construcció amb dues còpies de la cel·lulasa E1, una dirigida a la vacuola i l'altra al reticle endoplasmàtic, i van determinar que l'expressió d'aquesta era similar a la construcció amb dues còpies d'E1, ambdues dirigides a la vacuola. Així doncs, sembla ser que depèn de les localitzacions del *targeting* i també de l'enzim. Una altra manera d'aconseguir un *targeting* multi-orgànul és aprofitant el procés natural d'*splicing* alternatiu. Si els productes resultants d'aquest mantenen la seqüència de *targeting*, seran dirigits a l'orgànul en específic. Si no, seran dirigits al citosol. Es poden utilitzar diverses etiquetes o *tags* que dirigeixin els enzims a diferents orgànuls. Una altra possibilitat és incrustar la segona seqüència de *targeting* en la primera, el que redueix la possibilitat d'expressió en compartiments no diana (Park *et al.*, 2016).
- **Adjuntar seqüències d'amplificació al promotor i múltiples còpies de les unitats transcripcionals.** En alguns casos, es pot aconseguir augmentar l'expressió dels enzims adjuntant elements reguladors en *cis*, com seqüències d'amplificació en *upstream* del promotor. No obstant, l'èxit d'aquest mètode depèn de la seqüència d'amplificació utilitzada, de l'enzim expressat i de l'orgànul diana. La majoria d'estudis s'han realitzat amb la planta del tabac, i els resultats han estat molt diferents. No hi ha informació pel que fa al blat de moro. Pel que fa a la segona estratègia, com ja va determinar Egelkroust en el seu estudi, incrementar el nombre de les unitats transcripcionals en una construcció gènica pot augmentar l'acumulació d'enzims CWD. No obstant, no sempre es compleix que "a més còpies de l'enzim, major acumulació" per a totes les cel·lulases, ja que l'autor va comprovar que l'activitat enzimàtica d'una construcció amb quatre

còpies de la unitat transcripcional d'E1 (totes sota el control del promotor Glb1) era més baixa que en el cas de la construcció amb dues còpies, probablement per esdeveniments de silenciament gènic o recombinació. En canvi, això no passava per a la cel·lulasa CBH I, ja que la construcció amb tres còpies de la unitat transcripcional va presentar el doble d'activitat enzimàtica que la de dues còpies.

- **Ús i manipulació de germoplasma d'alt rendiment.** Utilitzar un *background* genètic adequat per a la transformació de l'espècie és molt important, ja que pot fer variar molt l'acumulació de l'enzim heteròleg. Aquest fet va ser descrit primerament per Clough *et al.* (2006), que va demostrar que la introducció del gen *MnP* en el germoplasma de línies d'alt contingut en triacilglicerols mitjançant encreuaments successius incrementava dràsticament la quantitat d'enzim en les panotxes, arribant a ser el doble que en el cas dels retrocreuaments amb línies endogàmiques d'elit. Per a les cel·lulases E1 i CBH I, es va demostrar que la seva producció es multiplicava per 0.33 i 5 vegades, respectivament, amb tan sols un encreuament amb una línia d'alt contingut en triacilglicerols (Hood *et al.*, 2012). Hibridar plantes transgèniques és una altra manera d'incrementar la producció.

A banda d'incrementar la producció dels enzims, també és important que aquests actuïn sinèrgicament per millorar els rendiments de la hidròlisi enzimàtica. Una estratègia per aconseguir-ho és generar cada enzim individualment en línies transgèniques separades, i després barrejar-los en una mateixa mescla per assolir aquesta sinèrgia. És el que proposaven autors com Hood, Egelkrout i Devaiah amb les cel·lulases E1 d'*Acidothermus cellulolyticus* i CBH I i CBH II de *Trichoderma reesei*. No obstant, podria ser més eficient produir múltiples enzims en una sola planta. La co-expressió de cel·lulases microbianes per a produir etanol cel·lulòsic és un fet que ja s'ha aconseguit almenys en el blat. Un estudi va reportar la co-expressió de construccions gèniques que codificaven pel domini catalític de la endocel·lulasa E1 i de l'exocel·lulasa CBH I en el blat transgènic. Les proteïnes recombinants van ser dirigides a l'apoplast de les cèl·lules vegetals, i es van acumular en les fulles a nivells de fins a un 1% per l'E1 i un 0.5% TSP per la CBH I (Hussain *et al.*, 2015). Existeixen altres estratègies que s'han utilitzat per aconseguir l'expressió de múltiples enzims en una sola planta. Un dels mètodes és dur a terme

transformacions seqüencials en un sol transformant i així incorporar els gens per a diversos enzims en el genoma d'aquest. També es pot recórrer al procés de “*gene stacking*” per incloure més d'un esdeveniment transgènic en una sola planta i així aconseguir l'expressió de múltiples enzims. Una altra estratègia seria unir dos enzims, cada un amb un pèptid senyal diferent, mitjançant l'oligopèptid autoescindible 2A del virus de la febre aftosa del bestiar (“*foot-and-mouth disease virus*”). L'oligopèptid 2A s'autoescindeix *in vivo* i separa els enzims, cada un dels quals es dirigeix al seu compartiment diana segons el pèptid senyal que tingui. Una alternativa al “*gene stacking*” seria expressar enzims multifuncionals. Mentre que molts enzims CWD són actius només per un substrat, els enzims multifuncionals o “quimeres” posseeixen més d'una activitat enzimàtica perquè presenten un centre actiu que és capaç d'acceptar més d'un substrat, o bé tenen múltiples centres actius. Les quimeres existeixen de forma natural o poden produir-se sintèticament. El principal avantatge del seu ús és que es redueix el nombre de gens a expressar i, en conseqüència, la complexitat de la transformació (Park *et al.*, 2016).

Si els enzims heteròlegs han de romandre en la biomassa durant el pretractament d'aquesta, un requisit que han de complir és presentar temperatures òptimes elevades. Això és essencial perquè retinguin l'activitat enzimàtica després dels pretractaments termoquímics necessaris per reduir la recalcitrància de la paret cel·lular, que acostumen a operar per sobre dels 100°C. És per això que s'utilitzen endoglucanases hipertermòfiles com la ja coneguda AcCel5A (E1) d'*A. cellulolyticus*, que presenta una temperatura òptima de 81°C. Altres exemples també presentats en aquest treball són la BSX de *Bacillus* sp. NG-27 i la XynB de *C. stercoarium*, amb temperatures òptimes de 70°C i 80°C, respectivament. En canvi, les dues cel·lobiohidrolases de *T. reesei* presenten temperatures òptimes entre 45-50°C, pel que podria ser interessant modificar-les mitjançant mutagènesi o optimitzant els codons dels gens que les codifiquen per intentar millorar la seva termoestabilitat. No obstant, recordem de l'estudi de Hood *et al.* (2007) que tot i presentar temperatures òptimes prou diferents a la de la cel·lulasa E1, les tres són compatibles i capaces d'actuar de forma sinèrgica, ja que l'E1 segueix sent molt activa a 45-50°C, i les cel·lobiohidrolases encara presenten activitat per sobre dels 50°C. Tot i que l'estabilitat tèrmica dels enzims és un factor molt important a considerar, l'estabilitat del pH també ho és, al igual que la interacció entre aquests dos elements físics. Els

pretractaments de la biomassa que operin a pH molt allunyats dels valors òptims dels enzims faran que es produeixi una pèrdua de l'activitat enzimàtica, fins i tot a temperatures per sota dels 80°C. És per això que es necessiten enzims termostables però també àlcali i àcid tolerants. Per posar alguns exemples, el pretractament AFEX actua a 60°C i un pH > 8, mentre que el pretractament amb àcid diluït actua entre 110-170°C i un pH < 3 (Park *et al.*, 2016). Les cel·lulases E1, CBH I i CBH II presenten pH òptims entre 5-6, pel que escollir un pretractament que no s'ajusti als valors dels enzims pot conduir a una pèrdua total de l'activitat enzimàtica. És per això que alguns autors s'han centrat en la recerca de noves cel·lulases que presentin una elevada termoestabilitat però també valors de pH òptims que s'ajustin als dels pretractaments termoquímics. Un exemple és l'endo- β -1,3-1,4-glucanasa àcida (Bgl7A) de *Bispora* sp. MEY-1, que va ser expressada en les llavors del blat de moro per facilitar l'absorció de nutrients per part dels animals (Zhang *et al.*, 2013). Tot i que el propòsit d'aquesta línia transgènica era l'alimentació animal, l'enzim podria utilitzar-se per a la producció d'etanol cel·lulòsic. Mitjançant l'optimització dels codons del gen *bgl7A*, els autors van aconseguir que la termoestabilitat d'aquesta β -glucanasa (ara Bgl7AM) millorés, presentant una temperatura òptima de 70°C, 10°C més elevada que la forma *wild-type*. La Bgl7AM presentava un pH òptim de 4.0, mentre que la Bgl7A exhibia una gran activitat a pH 1.5, 3.5 i 5.0 (màxim). Ambdós enzims romanien actius en un interval de pH de 1.0-8.0. Així doncs, aquest enzim presenta una excel·lent estabilitat àcida i podria mantenir la seva activitat enzimàtica després d'un pretractament amb àcid diluït, per exemple. Les endo-1,4- β -xilanases XynB i BSX presenten valors de pH òptims bastant alcalins, sent 7.0 i 8.4, respectivament. Poden tolerar valors de fins a 10. Per tant, són enzims que no haurien de presentar pèrdua d'activitat enzimàtica després de pretractaments com l'AFEX. Pel que fa als pretractaments amb líquids iònics, en els que el solvent actua dissolent una porció de la biomassa, l'halotolerància dels enzims també pot ser un assumpte a tenir en compte. Així doncs, enzims hipertermòfils acidòfils, alcalòfils o halòfils que siguin més tolerants a pH extrems o la força iònica, seran més efectius a l'hora de suportar les condicions extremes dels pretractaments necessaris per a la desconstrucció de la paret cel·lular vegetal (Park *et al.*, 2016). L'any 2015 es va publicar un article sobre el descobriment i la caracterització d'una nova xilanasa termofílica àlcali i halotolerant de *Planococcus* sp. SL4, una soca bacteriana aïllada dels sediments d'un llac alcalí ("Soda Lake") de Dabusu (Huang *et al.*, 2015).

Aquesta endo-1,4- β -xilanasa (XynSL4) consisteix en un pèptid senyal de 29 residus i un domini catalític (30-380 residus) i està classificada en la família 10 de les hidrolases glicosídiques, al igual que les xilanases BSX de *Bacillus* sp. NG-27 i XynB de *C. stercorarium*, de l'estudi de Gray *et al.* (2011). De fet, un anàlisi filogenètic va indicar que la XynSL4 es troba estretament relacionada amb les xilanases alcalines de les espècies *Geobacillus* i *Bacillus*. Ambdues XynSL4 i BSX tenen una temperatura òptima de 70°C. Pel que fa al pH, la BSX té el seu òptim en 8.4 i la XynSL4 en 7, però aquesta última segueix sent estable i molt activa en rangs de pH entre 6 i 11, mantenint més d'un 60% de l'activitat a pH 11. A més, és altament halotolerant, retenint més del 55% de l'activitat en concentracions entre 0.25-3.0 M de NaCl i sent encara estable a concentracions superiors a 4 M. En cas d'escollir un pretractament amb líquids iònics, no dubtaria en proposar la xilanasa XynSL4 per ser expressada en les llavors del blat de moro. En la meua opinió, és qüestió de temps que acabem descobrint altres enzims de microorganismes extremòfils que ens puguin ser útils per solucionar els "handicaps" del procés. Juntament amb l'enginyeria genètica, pràcticament és possible fabricar els enzims que necessitem "a mida".

6. Conclusions

Les llavors es consideren la localització més adequada per a l'expressió d'enzims degradadors de la paret cel·lular. En un primer moment es creia que l'ús de promotors específics d'embrió com el *globulin1* garantia elevats nivells d'expressió i l'absència d'efectes perjudicials per la salut de la planta. No és que sigui fals, però no es compleix en tots els casos, com s'ha pogut comprovar en l'estudi de Gray *et al.* (2011). L'addició d'una inteïna a l'enzim pot donar solució a aquest problema, permetent fins i tot l'ús de promotors constitutius com el *rice ubiquitin 3 (rubi3)* sense que el fenotip de la planta es vegi afectat. L'optimització dels codons i la mutagenització dels enzims modificats amb inteïnes poden fer que la seva termoestabilitat millori encara més. Les plantes transgèniques que els expressen demostren una millor habilitat de sacarificació i, per tant, una major producció de glucosa. Gràcies a això, no és necessari afegir elevades concentracions d'enzims suplementaris, el que suposa un estalvi en el procés. No podem oblidar, però, que sempre s'hauran d'afegir enzims de forma exògena donat que per hidrolitzar totalment la biomassa lignocel·lulòsica se'n necessiten una àmplia gamma. En la

meva opinió, l'ús de promotors constitutius si i només si l'enzim es troba modificat amb una inteïna és probablement la millor estratègia. Amb una expressió constitutiva es podrien utilitzar els residus del cultiu (rostoll) per a la producció d'etanol cel·lulòsic enlloc de només les llavors, de manera que es reduiria la competència amb la producció alimentària.

Com bé afirmaven Hood *et al.* (2007) en el seu estudi, el *targeting* subcel·lular és una condició clau per aconseguir grans nivells d'acumulació d'enzims en les llavors del blat de moro transgènic. Les localitzacions diana més populars solen ser la paret cel·lular (o apoplast), el reticle endoplasmàtic i la vacuola. Pel que fa a l'apoplast i a la vacuola, mentre alguns enzims s'han aconseguit secretar de forma completa i en grans quantitats sense afectar la salut de la planta, altres han resultat en % TSP molt baixos, formes truncades, i afectacions en el teixit on s'expressaven. Per contra, el reticle endoplasmàtic sembla ser una molt bona opció, ja que s'aconsegueixen elevats nivells d'acumulació i els enzims són secretats de forma completa i no només truncada. La truncació dels enzims també es pot evitar fusionant els dominis catalítics de les hidrolases glicosídiques amb mòduls d'unió a carbohidrats (CBMs). Sembla ser que els nivells d'acumulació en cada localització subcel·lular depenen del tipus d'enzim que s'expressa, encara que el reticle endoplasmàtic és un *target* comú que acostuma a donar molts bons resultats. Hi ha altres factors que hi poden influir, com el *background* genètic de la planta o les condicions ambientals.

Pel que fa a les estratègies per incrementar la producció d'enzims, la principal conclusió és que no totes són igual d'efectives en tots els casos. Augmentar el nombre de còpies de la mateixa unitat transcripcional generalment es tradueix en un increment de l'expressió de l'enzim, però no funciona per totes les proteïnes, ja que en algunes s'ha observat esdeveniments de silenciament gènic, recombinació o competència entre promotors pels mateixos factors de transcripció. En aquests casos, utilitzar diferents promotors per conduir les múltiples còpies de l'enzim podia solucionar el problema. Pel que fa a les seqüències d'amplificació en *upstream* del promotor, l'èxit depèn de la pròpia seqüència utilitzada, l'enzim expressat i l'òrganul diana. El *targeting* a múltiples òrgànuls també depèn de l'enzim i de les localitzacions subcel·lulars en sí, no sempre condueix a una millora de l'expressió. La selecció de línies transgèniques amb elevats nivells d'expressió o simplement les

autopol·linitzacions per crear plantes homozigòtiques poden incrementar el contingut enzimàtic. De la mateixa manera, els encreuaments successius amb línies d'alt contingut en triacilglicerols són una bona opció per mantenir o incrementar la producció d'enzim al llarg de les generacions, demostrant l'estabilitat del transgen. Pel que fa als retrocreuaments amb línies endogàmiques d'elit, en alguns casos els nivells d'acumulació entre dues generacions de llavors s'han multiplicat entre 2.5 i 10 vegades, però no sempre es produeix. Es desconeix el mecanisme pel qual es dona aquest augment.

En la última dècada s'ha fet un gran progrés pel que fa als dos objectius principals: incrementar la producció d'enzims i evitar els efectes nocius en la salut de la planta. També s'ha treballat amb més varietat d'enzims, no només amb la molt coneguda i estudiada endoglucanasa E1. Crec que les futures línies d'investigació s'haurien de centrar en descobrir altres estratègies que evitin la pèrdua dels CBMs, que són essencials perquè els enzims puguin funcionar correctament, i en la recerca de nous enzims que siguin tolerants a les condicions d'elevades temperatures i pH extrems que es donen normalment en els pretractaments termoquímics. Tot i que la producció d'enzims CWD en cultius bioenergètics està resultant un èxit, encara s'ha de seguir optimitzant el procés per poder establir un sistema de producció a gran escala i sostenible.

7. Bibliografia

Clough, Richard C.; *et al.* "Manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is enzymatically active and accumulates to high levels in transgenic maize seed". *Plant Biotechnology Journal* [en línia], 2006, 4(1), p. 53-62. [Consulta: 17 juliol 2018]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1467-7652.2005.00157.x>

Devaiah, Shivakumar P.; *et al.* "Heterologous expression of cellobiohydrolase II (Cel6A) in maize endosperm". *Transgenic Research* [en línia], 2013, 22(3), p. 477-488. [Consulta: 17 juliol 2018]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11248-012-9659-2>

Egelkrou, Erin; *et al.* "Enhanced Expression Levels of Cellulase Enzymes Using Multiple Transcription Units". *BioEnergy Research* [en línia], 2013, 6(2), p. 699-710.

[Consulta: 17 juliol 2018]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-012-9288-x>

Furukawa, Kayoko; *et al.* "Enhanced production of reducing sugars from transgenic rice expressing exo-glucanase under the control of a senescence-inducible promoter". *Transgenic Research* [en línia], 2014, 23(3), p. 531-537. [Consulta: 16 agost 2018]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11248-014-9786-z>

Gray, Benjamin N.; *et al.* "Global and grain-specific accumulation of glycoside hydrolase family 10 xylanases in transgenic maize (*Zea mays*)". *Plant Biotechnology Journal* [en línia], 2011, 9(9), p. 1100-1108. [Consulta: 17 juliol 2018]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1467-7652.2011.00632.x>

Hood, Elizabeth E.; *et al.* "Subcellular targeting is a key condition for high-level accumulation of cellulose protein in transgenic maize seed". *Plant Biotechnology Journal* [en línia], 2007, 5(6), p. 709-719. [Consulta: 17 juliol 2018]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1467-7652.2007.00275.x>

Hood, Elizabeth E.; *et al.* "Manipulating corn germplasm to increase recombinant protein accumulation". *Plant Biotechnology Journal* [en línia], 2012, 10(1), p. 20-30. [Consulta: 17 juliol 2018]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1467-7652.2011.00627.x>

Huang, Xiaoyun; *et al.* "Molecular Characterization of a Thermophilic and Salt- and Alkaline-Tolerant Xylanase from *Planococcus* sp. SL4, a Strain Isolated from the Sediment of a Soda Lake". *Journal of Microbiology and Biotechnology* [en línia], 2015, 25(5), p. 662-671. [Consulta: 26 agost 2018]. Disponible en: <http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?doi=10.4014/jmb.1408.08062>

Hussain, Hashmath I.; *et al.* "Co-expression of microbial cellulases in transgenic wheat as a potential source for cellulosic ethanol production". *Plant Biotechnology* [en línia], 2015, 32(4), p. 291-297. [Consulta: 26 agost 2018]. Disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/plantbiotechnology/32/4/32_15.1023a/article/-char/en

Klose, Holger; *et al.* "Cell wall modification in tobacco by differential targeting of recombinant endoglucanase from *Trichoderma reesei*". *BMC Plant Biology* [en línia], 2015, 15(54). [Consulta: 16 agost 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4340609/>

Li, Quanzi; *et al.* "Plant biotechnology for lignocellulosic biofuel production". *Plant Biotechnology Journal* [en línia], 2014, 12(9), p. 1174-1192. [Consulta: 10 maig 2018]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pbi.12273>

Park, Sang-Hyuck; Garlock O., Rebecca; Sticklen, Mariam. "Strategies for the production of cell wall-deconstructing enzyme in lignocellulosic biomass and their utilization for biofuel production". *Plant Biotechnology Journal* [en línia], 2016, 14(6), p. 1329-1344. [Consulta: 10 maig 2018]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pbi.12505>

Shen, Binzhang; *et al.* "Engineering a thermoregulated intein-modified xylanase into maize for consolidated lignocellulosic biomass processing". *Nature Biotechnology* [en línia], 2012, 30(11), p. 1131-1136. [Consulta: 17 juliol 2018]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nbt.2402>

Tschofen, Marc; *et al.* "Plant Molecular Farming: Much More than Medicines". *Annual Review of Analytical Chemistry* [en línia], 2016, 9(1), p. 271-294. [Consulta: 10 maig 2018]. Disponible en: https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-anchem-071015-041706?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&

Zhang, Yuhong; *et al.* "Overexpression of an Acidic Endo- β -1,3-1,4-glucanase in Transgenic Maize Seed for Direct Utilization in Animal Feed". *PLOS One* [en línia], 2013, 8(12). [Consulta: 26 agost 2018]. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081993>

8. Autoavaluació

Inicialment ja esperava que les plantes resultessin un sistema de producció de proteïnes heteròlogues amb alguns avantatges enfront als bioreactors de microorganismes, ja que no era la primera recerca que feia sobre el tema de *Plant Molecular Farming*. El desenvolupament de plantes transgèniques amb l'objectiu

d'utilitzar-les com a fàbriques de proteïnes recombinants és una part de la biotecnologia que sempre m'ha cridat molt l'atenció, i per això vaig decidir dedicar el meu treball de final de grau a aquest tema. Crec que se li dóna molta més visibilitat a la producció de proteïnes recombinants farmacèutiques que a les no farmacèutiques, com els enzims. És per això que m'he volgut centrar en aquestes últimes. Tot i això, no tenia masses esperances en aquest cas en concret, ja que suposava que l'expressió d'enzims degradadors de la paret cel·lular en les pròpies plantes comportaria casi segur efectes perjudicials en el seu desenvolupament, sobretot si aquests eren acumulats en localitzacions com l'apoplast, on es troben en contacte directe amb el seu substrat. Era evident que serien necessaris enzims amb temperatures òptimes molt més elevades que a les que creix la planta, però tot i així em va sorprendre que poguessin tenir efectes tan nocius en la seva salut només mantenint una petita porció de l'activitat enzimàtica. El que no m'esperava era trobar solucions tan efectives com l'addició d'una inteïna als enzims, que en la meua opinió ha marcat un abans i un després. Aquesta modificació es tracta d'un procés que no té cap dificultat però ha donat lloc a grans avenços; no només anul·la l'activitat dels enzims durant el desenvolupament de la planta, pel que ja no és necessari haver d'utilitzar exclusivament promotors específics de teixit, sinó que també incrementa els rendiments de glucosa sense necessitat d'afegir de forma exògena grans quantitats d'enzims suplementaris, el que suposa un gran estalvi. Tampoc esperava trobar-me estudis amb resultats tan diferents tenint en compte que en tots s'utilitzava més o menys la mateixa estratègia, el que m'ha obligat a investigar per quin motiu ocorria. Això també m'ha portat a donar-me'n compte que no es poden fer afirmacions generals per a tots els casos i que no podem esperar obtenir sempre els mateixos resultats, ja que aquests dependran de molts factors, moltes vegades externs al propi experiment. A mesura que anava adquirint coneixement sobre el tema, cada vegada em costava menys justificar els resultats obtinguts en els diferents experiments, i plantejar possibles canvis que hagués dut a terme o propostes que haguessin estat interessants d'investigar. Ha estat molt gratificant aprendre nous mètodes per donar solucions als punts crítics del procés i, en general, haver incrementat el coneixement que ja havia adquirit sobre el tema durant el grau.

ANNEX

Taula Annex: Sumari de la producció heteròloga d'enzims degradadors de la paret cel·lular des de l'any 2006 i amb una TSP superior al 4.0% (organitzat per enzims). Adaptació de la taula S2 present en la informació complementària de la *Review* de Park *et al.* (2016).

Organisme font de l'enzim	Nom de l'enzim (Tradicional/ Família)	Localització del <i>targeting</i>	Pèptid senyal/ Seqüència de terminació	Promotor	Espècie vegetal i teixit	% Proteïna Total Soluble (TSP)	Ref.
Endo-1,4-β-glucanasa (3.2.1.4)							
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	E1/AcCel5A	Vacuola	VT	Glb1	Llavors de blat de moro	7.1%	(Egelkrou <i>et al.</i> , 2013)
				Glb2+Glb1 +pr26		18.8%	(Egelkrou <i>et al.</i> , 2013)
				Glb1		16%	(Hood <i>et al.</i> , 2012; Hood <i>et al.</i> , 2007)
		RE	BAASS/KDEL	Glb1		17.9%	(Hood <i>et al.</i> , 2007)
Cel·lulosa 1,4-β-cel·lobiosidasa^R (3.2.1.176)							
<i>Trichoderma reesei</i>	CBHI/TrCel7A	Apoplast	BAASS	Glb1	Llavors de blat de moro	17.8%	(Hood <i>et al.</i> , 2007)
				Glb1+pr36 +Glb2		4.1%	(Egelkrou <i>et al.</i> , 2013)

<i>Trichoderma reesei</i>	CBHI/TrCel7A	RE	BAASS/KDEL	Glb1	Llavors de blat de moro	16.3%	(Hood <i>et al.</i> , 2007)
Cel·lulosa 1,4-β-cel·lobiosidasa^{NR} (3.2.1.91)							
<i>Trichoderma reesei</i>	CBHII/TrCel6A	Apoplast	BAASS	<i>Rice Glutelin</i>	Llavors de blat de moro	30%	(Devaiah <i>et al.</i> , 2013)
Endo-1,4-β-xilanasa (3.2.1.8)							
<i>Bacillus sp.</i> NG-27	BSX/Xyn10	Endosperma	Glub-4	Glub-4	Llavors de blat de moro	4.0%	(Gray <i>et al.</i> , 2011)
<i>Clostridium stercorarium</i>	XynB/CsXyn10B					16.4%	
Manganès Peroxidasa (1.11.1.13)							
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP2	Apoplast	BAASS	Glb1	Llavors de blat de moro	6-14%	(Clough <i>et al.</i> , 2006)

^{NR}Cel·lobiohidrolasa amb acció sobre els extrems no reductors de la cadena de cel·lulosa

^RCel·lobiohidrolasa amb acció sobre els extrems reductors de la cadena de cel·lulosa