



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

“Clonación y expresión del gen codificante para la exo- β -1,3-glucanasa del hongo termófilo *Thielavia terrestris* Co3Bag1 en *Aspergillus niger*. Aplicación de la enzima en la hidrólisis de β -1,3-glucanos”

T E S I S

Que presenta

JOHAN RODRÍGUEZ MENDOZA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de Tesis:

Dra. María Eugenia Hidalgo Lara

*“La vida es un camino a largo plazo, en la que tú
eres maestro y alumno, unas veces te tocará
enseñar y todos los días tendrás que aprender”*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia quienes siempre me han apoyado en la realización de mis metas y la confianza que en mí han depositado, la cual ha sido de importancia en mis actividades.

Especialmente a Cintia por darme ánimo en los momentos difíciles, su amor y apoyo incondicional hacen que la vida sea alegre.

A la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara, por su gran compromiso y paciencia, por estar siempre cuando la necesitaba y hacer de mi trabajo, inspiración para mis objetivos.

Al Laboratorio de Ingeniería de Proteínas (Laboratorio 51), en especial al M. en C. Alejandro Santiago Hernández por toda la ayuda que me brindó en todos estos años, su asesoría me permitió continuar con mi trabajo, sus sugerencias fueron indispensables en muchos puntos importantes, gracias por tu asesoría y amistad. Gracias por hacer grato el ambiente de trabajo.

Al Químico Fernando Maldonado García por su apoyo técnico desde que me encontraba en la Maestría y hasta mi formación en el Doctorado, su asesoría y sugerencias me permitieron realizar parte fundamental de mi trabajo, tu amistad y apoyo fueron fundamentales en mi posgrado.

A mis compañeros y amigos Alex, Maru, Tere, Marina, Azucena, Wilber, Josué, Omar, Anahí, Karina, Sonia y tantos otros, que necesitaría varias páginas para nombrarlos, hicieron que creciera muchísimo como persona, en los lugares donde estaba hicieron que mi estancia fuera agradable, los momentos de reuniones siempre fueron divertidas. Lo que soy se lo debo a muchos de ustedes, amigos, profesores, compañeros y todos aquellos que encontré en mi camino.

A mis asesores, la Dra. María del Carmen Montes Horcasitas, al Dr. Roberto Ruiz Medrano, Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras, Dr. Ismael Bustos Jaimés y al Dr. Guillermo Aguilar Osorio quienes me brindaron su apoyo en la realización de este trabajo con su asesoría académica, comentarios y sugerencias, pues la suma de todo eso me ayudó a mejorar como investigador.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de Doctorado (Beca número: 355064), sin este gran apoyo, el sueño de muchos por adentrarnos al mundo de la ciencia sería complicado.

Al CINVESTAV, por abrirme las puertas desde mi estancia de Licenciatura hasta el Doctorado, me enorgullezco formar parte de este Centro de investigación, espero poner muy en alto todo lo que el CINVESTAV me brindó.

Gracias a todos y a la vida por permitirme tener esta experiencia que es “disfrutar esta vida” ...

DEDICATORIAS

Este gran trabajo resultado de la pasión y dedicación, lo dedico a las personas más importantes de mi vida:

A mi madre y hermano quienes son los pilares de mis objetivos, forman la parte más importante en mi vida. La dedicatoria más importante es para mi madre, pues gracias a su apoyo, amor y consejos hicieron que nunca me rindiera en mis sueños, me dio la fuerza necesaria para cumplir mis metas, la vida y todo lo que soy se lo debo a ella.



ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 β -glucanos.....	2
1.1.1 Características de los β -glucanos.....	2
1.1.2 Química de los β -glucanos.....	3
1.1.3 Fuentes de β -1,3-glucanos en la naturaleza.....	4
1.2 Glicosil hidrolasas (GHs).....	4
1.2.1 Estructura tridimensional de GHs.....	6
1.2.2 Mecanismos de hidrólisis.....	6
1.2.3 Topologías del sitio activo de las GHs.....	8
1.2.3.1 Bolsillo.....	8
1.2.3.2 Fisura o hendidura.....	9
1.2.4 Aplicaciones industriales de las GHs.....	10
1.3 β -1,3-glucanasas.....	10
1.3.1. Familia GH5.....	11
1.3.2 Familia GH55.....	12
1.4 Mecanismo de hidrólisis de las β -1,3-glucanasas.....	13
1.5 Funciones fisiológicas de las β -1,3-glucanasas.....	14
1.6 Aplicaciones biotecnológicas de las β -1,3-glucanasas.....	14
1.6.1 Alimentación animal.....	14
1.6.2 Control biológico.....	15
1.6.3 Investigación.....	15
1.6.4 Industria alimenticia.....	15
1.6.5 Desarrollo.....	16
1.6.6 Medicina.....	16
1.7. Hongos filamentosos y características generales.....	16
1.7.1 Género <i>Thielavia</i>	17
1.8 Sistemas de expresión heterólogo.....	18
1.9 Antecedentes directos.....	19
1.9.1 Aislamiento e identificación taxonómica de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.....	19
1.9.2 Secuencia parcial de una β -1,3-glucanasa de <i>T. terrestris</i>	19
II. JUSTIFICACIÓN.....	21
III. HIPÓTESIS.....	21
IV. OBJETIVO GENERAL.....	21
Objetivos particulares.....	21
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1 Microorganismos.....	23
6.2 Medios de cultivo.....	23
6.3 Cinética de crecimiento y actividad exo- β -1,3-glucanasa.....	24



6.4 Obtención del extracto crudo	24
6.5 Condiciones iniciales del ensayo enzimático de la β -1,3-glucanasa	24
6.6 Determinación de proteína por el Método de Lowry	24
6.7 Purificación de <i>TtBgn31A</i> silvestre de <i>T. terrestris</i>	25
6.7.1 Ultrafiltración del sobrenadante de cultivo	25
6.7.2 Diálisis del sobrenadante de cultivo	25
6.7.3 Cromatografía de intercambio iónico	25
6.7.4 Cromatografía de filtración en gel	26
6.8 Secuenciación parcial de la β -1,3- glucanasa.....	26
6.9 Análisis de la secuencia <i>TtBgn31A</i>	26
6.10 Caracterización bioquímica de <i>TtBgn31A</i> silvestre.....	26
6.10.1 Determinación del pH óptimo.....	26
6.10.2 Determinación de la temperatura óptima	27
6.10.3 Efecto de iones metálicos sobre la actividad β -1,3-glucanasa	27
6.10.4 Estabilidad térmica.....	27
6.10.5 Estabilidad al pH	28
6.10.6 Determinación de parámetros cinéticos	28
6.10.7 Especificidad a sustratos	28
6.10.8 Análisis de los productos de hidrólisis.....	28
6.11 Clonación del gen codificante para la exo- β -1,3-glucanasa del hongo <i>T. terrestris</i>	29
6.11.1 Vectores.....	29
6.11.2 <i>pDrive</i>	29
6.11.3 <i>pAniger</i>	29
6.11.4 Extracción de DNA total	30
6.11.5 Diseño de oligonucleótidos	30
6.11.6 Amplificación del gen <i>ttbgn31a</i>	31
6.11.7 Clonación del gen <i>ttbgn31a</i> en <i>pDrive</i>	32
6.11.8 Transformación de células <i>E. coli</i> DH5 α	32
6.11.9 Extracción de la construcción <i>ttbgn31a/pDrive</i>	32
6.11.10 Subclonación del gen <i>ttbgn31a</i> en el vector de expresión <i>Aniger</i>	32
6.11.11 Transformación de células <i>E. coli</i> DH5 α con la construcción <i>ttbgn31a/Aniger</i>	33
6.11.12 Extracción de la construcción <i>ttbgn31a/Aniger</i>	33
6.12 Análisis de la secuencia <i>TtBgn31A</i>	34
6.13 Expresión de <i>TtBgn31A</i> en <i>A. niger</i> CBS 513.88.....	34
6.13.1 Transformación de <i>A. niger</i>	34
6.13.2 Detección del transgen <i>ttbgn31a</i> en las transformantes de <i>A. niger</i>	34
6.13.3 Detección de la actividad exo- β -1,3-glucanasa y selección de la transformante de <i>A. niger</i>	35
6.13.4 Obtención del sobrenadante de cultivo para la purificación de <i>TtBgn31Ar</i>	35
6.13.5 Condiciones iniciales del ensayo enzimático de <i>TtBgn31Ar</i>	36
6.14 Purificación de <i>TtBgn31Ar</i> expresada en <i>A. niger</i> CBS 513.88	36
6.14.1 Ultrafiltración del sobrenadante de cultivo	36
6.14.2 Diálisis del sobrenadante de cultivo	36
6.14.3 Cromatografía de intercambio iónico	36
6.14.4 Análisis de fracciones por SDS-PAGE.....	37
6.14.5 Zimograma para detectar actividad β -1,3-glucanasa	37
6.14.6 Análisis de glicosilación	38
6.15 Caracterización bioquímica de <i>TtBgn31Ar</i> (recombinante).....	38
6.15.1 Determinación del pH óptimo.....	38



6.15.2 Determinación de la temperatura óptima	39
6.15.3 Efecto de iones metálicos sobre la actividad exo- β -1,3-glucanasa	39
6.15.4 Estabilidad térmica.....	39
6.15.5 Estabilidad al pH	39
6.15.6 Determinación de parámetros cinéticos	40
6.15.7 Especificidad a sustratos	40
6.15.8 Análisis de los productos de hidrólisis.....	40
6.16 Tratamiento de residuos ricos en β -1,3-glucanos	40
6.16.1 Hidrólisis enzimática de salvados	40
6.16.2 Ensayo de confrontación de los hongos	41
VII. RESULTADOS	42
7.1 Cinética de crecimiento y actividad exo- β -1,3-glucanasa	42
7.2 Purificación de la β -1,3-glucanasa silvestre.....	44
7.3 Análisis de pureza y estimación de peso molecular de la enzima silvestre	45
7.4 Análisis de la secuenciación parcial de la exo- β -1,3-glucanasa	47
7.5 Estructura secundaria de <i>TtBgn31A</i>	52
7.6 Estructura terciaria de <i>TtBgn31A</i>	52
7.7 Caracterización bioquímica de la enzima silvestre	54
7.7.1 Determinación del pH óptimo de la enzima silvestre	54
7.7.2 Estabilidad al pH de la β -1,3-glucanasa silvestre.....	54
7.7.3 Determinación de la temperatura óptima enzima silvestre.....	55
7.7.4 Estabilidad térmica de la β -1,3-glucanasa silvestre	56
7.7.5 Efecto de iones metálicos sobre la actividad β -1,3-glucanasa silvestre.....	57
7.7.6 Especificidad a sustratos de la β -1,3-glucanasa silvestre.....	59
7.7.7 Análisis de los productos de hidrólisis de la exo- β -1,3-glucanasa silvestre	60
7.8 Clonación del gen <i>TtBgn31A</i> del hongo <i>T. terrestris</i>	61
7.8.1 Extracción de ADNg de <i>T. terrestris</i>	61
7.8.2 Amplificación del gen <i>TtBgn31A</i> de <i>T. terrestris</i>	62
7.8.3 Clonación del gen <i>TtBgn31A</i> en el vector <i>pDrive</i>	62
7.8.4 Análisis del vector de expresión <i>gfp/Aniger</i>	64
7.8.5 Subclonación del gen <i>TtBgn31A</i> en el vector de expresión para <i>A. niger</i>	65
7.9 Análisis de la secuencia.....	67
7.10 Expresión de <i>TtBgn31A</i> en <i>A. niger</i> CBS 513 88.....	68
7.11 Detección de la actividad β -1,3-glucanasa y selección de las cepas transformantes	69
7.12 Purificación de <i>TtBgn31A</i> recombinante expresada en <i>A. niger</i> CBS 513.88	71
7.13 Análisis de pureza y estimación de peso molecular de <i>TtBgn31A</i> expresada en <i>A. niger</i>	72
7.14 Zimograma para detectar actividad β -1,3-glucanasa	73
7.15 Análisis de glicosilación de las enzimas.....	73
7.16 Caracterización bioquímica de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante.....	74
7.16.1 Determinación del pH óptimo enzima recombinante.....	74
7.16.2 Estabilidad al pH de la β -1,3-glucanasa recombinante	75
7.16.3 Determinación de la temperatura óptima de la enzima recombinante	76
7.16.4 Estabilidad térmica de la β -1,3-glucanasa recombinante.....	76
7.16.5 Efecto de iones metálicos sobre la actividad β -1,3-glucanasa recombinante	77
7.16.6 Determinación de parámetros cinéticos de las exo- β -1,3-glucanasas	78
7.16.7 Especificidad a sustratos de la β -1,3-glucanasa recombinante	79
7.16.8 Análisis de los productos de hidrólisis de la β -1,3-glucanasa recombinante.....	79
7.17 Actividad glucanasa sobre salvados de cereales.....	81



7.18 Ensayo de confrontación de los hogos	83
VIII DISCUSIÓN DE RESULTADOS	86
IX CONCLUSIONES.....	96
X BIBLIOGRAFÍA.....	98
ANEXO A Predicción de la estructura secundaria de <i>TtBgn31A</i>	A
ANEXO B Predicción de la estructura terciaria de <i>TtBgn31A</i>	C



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (β -1,3/ β -1,6)-glucano de naturaleza insoluble.....	2
Figura 2. Molécula de glucosa en la proyección de Haworth.....	3
Figura 3. Mecanismos de acción de GHs.....	7
Figura 4. Formas que adquiere el sitio activo de las GHs.....	8
Figura 5. El mecanismo de procesividad de celobiohidrolasas.....	9
Figura 6. Estrategia experimental.....	22
Figura 7. Vector de clonación, <i>pDrive</i>	29
Figura 8. Vector de expresión <i>pAniger</i> para <i>A. niger</i>	30
Figura 9. Fermentaciones de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1 con diferentes fuentes de carbono.....	43
Figura 10. Perfil de separación de proteínas y actividad β -1,3-glucanasa.....	44
Figura 11. Análisis por SDS-PAGE de la etapa de purificación en un gel de poliacrilamida al 10 %.....	45
Figura 12. Cromatograma utilizando la columna de filtración en gel.....	46
Figura 13. Análisis por SDS-PAGE de fracciones con actividad β -1,3-glucanasa.....	46
Figura 14. Péptidos generados de la secuenciación en LANSE.....	48
Figura 15. Péptidos generados de la secuenciación en INMEGEN.....	49
Figura 16. Secuencia nucleotídica del gen <i>TtBgn31A</i> codificante para la β -1,3-glucanasa.....	50
Figura 17. Análisis informático del gen <i>TtBgn31A</i>	51
Figura 18. Análisis informático de la secuencia aminoacídica de la β -1,3-glucanasa.....	51
Figura 19. Identificación de los dominios de <i>TtBgn31A</i>	52
Figura 20. Estructura 3D de <i>TtBgn31A</i> predicho en el software I-TASSER.....	53
Figura 21. Efecto del pH en la actividad β -1,3-glucanasa silvestre.....	54
Figura 22. Estabilidad al pH de la β -1,3-glucanasa silvestre.....	55
Figura 23. Efecto de la temperatura en la actividad β -1,3-glucanasa silvestre.....	56
Figura 24. Estabilidad térmica de la β -1,3-glucanasa silvestre.....	57
Figura 25. Efecto de los iones metálicos de la β -1,3-glucanasa silvestre.....	58
Figura 26. Productos de hidrólisis generados por la exo- β -1,3-glucanasa silvestre sobre laminarina.....	60
Figura 27. Productos de hidrólisis generados la exo- β -1,3-glucanasa silvestre sobre <i>pNPG</i>	60
Figura 28. Extracción de ADN total de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.....	61
Figura 29. Amplificación del gen (<i>TtBgn31A</i>) codificante de la exo- β -1,3-glucanasa.....	62
Figura 30. Análisis de la construcción <i>TtBgn31A/pDrive</i>	63
Figura 31. Análisis <i>in silico</i> de la construcción <i>TtBgn31A/pDrive</i>	63
Figura 32. Análisis del vector de expresión <i>gfp/Aniger</i>	64
Figura 33. Análisis <i>in silico</i> de la construcción de expresión <i>gfp/Aniger</i>	65
Figura 34. Digestión del producto de PCR del gen <i>TtBgn31A</i> y del vector de expresión <i>gfp/Aniger</i>	65
Figura 35. Digestiones para identificar la construcción <i>TtBgn31A/Aniger</i>	66
Figura 36. Digestiones para corroborar la construcción de expresión <i>TtBgn31A/Aniger</i>	67
Figura 37. Análisis informático del gen <i>TtBgn31A</i>	68
Figura 38. Crecimiento de células de <i>A. niger</i> en placas con higromicina en medio mínimo.....	69
Figura 39. Determinación de la actividad exo- β -1,3-glucanasa de las cepas AN-J.....	69
Figura 40. Determinación de proteína del sobrenadante de cultivo de las transformantes.....	70
Figura 41. Diferencia en el crecimiento de un cultivo de la transformante D y la cepa silvestre.....	70
Figura 42. Comparación de la actividad exo- β -1,3-glucanasa y concentración de proteína.....	71
Figura 43. Análisis por SDS-PAGE al 10 % de la <i>TtBgn31A</i> recombinante.....	72
Figura 44. Zimograma específico para determinar la actividad exo- β -1,3-glucanasa.....	73



Figura 45. Análisis con el reactivo de Schiff.....	74
Figura 46. Efecto del pH en la actividad exo- β -1,3-glucanasa de la enzima recombinante	75
Figura 47. Estabilidad al pH de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante.....	75
Figura 48. Efecto de la temperatura en la actividad exo- β -1,3-glucanasa recombinante.....	76
Figura 49. Estabilidad térmica de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante.....	77
Figura 50. Efecto de los iones metálicos sobre la exo- β -1,3-glucanasa recombinante.....	78
Figura 51. Cinética de actividad de las dos exo- β -1,3-glucanasas	78
Figura 52. Productos de hidrólisis generados por la exo- β -1,3-glucanasa recombinante sobre laminarina.....	80
Figura 53. Productos de hidrólisis generados por la exo- β -1,3-glucanasa recombinante sobre pNPG	80
Figura 54. Micrografías electrónicas de barrido del salvado de avena	82
Figura 55. Micrografías electrónicas de barrido del salvado de trigo	83
Figura 56. Confrontación de <i>A. niger</i> transformante vs. <i>Fusarium</i> sp.....	84
Figura 57. Confrontación de <i>A. niger</i> silvestre vs. <i>Fusarium</i> sp.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio mínimo	34
Tabla 2. Etapas de purificación de la β -1,3-glucanasa de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.....	47
Tabla 3. Modelos utilizados para la elucidación 3D de <i>TtBgn31A</i>	53
Tabla 4. Especificidad a sustratos de la β -1,3-glucanasa silvestre	59
Tabla 5. Etapas de purificación de la enzima recombinante	72
Tabla 6. Parámetros bioquímicos de las exo- β -1,3-glucanasas.....	79
Tabla 7. Especificidad a sustratos de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante.....	79
Tabla 8. Comparación bioquímica de <i>TtBgn31A</i> y <i>TtBgn31Ar</i>	94



RESUMEN

Las β -1,3-glucanasas son enzimas que pertenecen a las familias GH3, GH5, GH17 y GH55 de las glicosil hidrolasas, catalizan la liberación de α -glucosa de β -1,3-glucanos, que normalmente se encuentra en la pared celular de hongos y biomasa vegetal, así como en el salvado de los cereales. Las β -1,3-glucanasas tienen importancia por su aplicación como control biológico contra patógenos de cultivos vegetales, como vehículos de fármacos y para mejorar las propiedades organolépticas de jugos y vinos. En el grupo de trabajo estamos interesados en el estudio de enzimas de importancia industrial. Uno de los modelos de estudio es el hongo termófilo *Thielavia terrestris* Co3Bag1 que fue seleccionado por crecer a 45 °C y presentar actividad lignocelulósica. Hasta la fecha, no se ha reportado la actividad β -1,3-glucanasa del hongo *T. terrestris* y su estudio bioquímico indicaría si la β -1,3-glucanasa presenta propiedades adecuadas para su aplicación biotecnológica.

El objetivo del presente trabajo fue clonar y expresar el gen codificante para la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1 en un sistema heterólogo y evaluar su aplicación en la hidrólisis de materiales ricos en β -1,3-glucanos.

Este trabajo describe la purificación y caracterización de una enzima con actividad hidrolítica exo- β -1,3 llamada *TtBgn31A* de *T. terrestris* Co3Bag1, la primera enzima con actividad hidrolítica exo- β -1,3 perteneciente a la familia GH31. *TtBgn31A* exhibió actividad óptima a 70 °C y pH 6, Esta enzima presenta propiedades hidrolíticas exo- β -1,3 y parámetros cinéticos que superan a varias exo- β -1,3-glucanasas previamente reportadas, por lo cual constituye un candidato para su aplicación biotecnológica. Adicionalmente, la exo- β -1,3-glucanasa fue expresada en *Aspergillus niger*, se purificó y caracterizó para ser comparada con la enzima producida por *T. terrestris* Co3Bag1.

Con la comparación bioquímica de la exo- β -1,3-glucanasa producida por *T. terrestris* Co3Bag1 y la exo- β -1,3-glucanasa recombinante expresada en *A. niger* CBS 513.88, esta última, presenta mejores propiedades bioquímicas como, los valores de vida media en el análisis de la termoestabilidad, incrementar su actividad 3.5 y 1.2 veces más en presencia de Fe^{2+} y Mn^{2+} , respectivamente, comparándola con la silvestre. Sin embargo, la exo- β -1,3-glucanasa secretada por *T. terrestris* tiene la mayor temperatura óptima comparándola con las exo- β -1,3-glucanasas fúngicas reportadas en las bases de datos, con un valor de 70 °C. Ambas enzimas, muestran una marcada preferencia por el sustrato laminarina, como lo indican los resultados de especificidad a sustratos. Además, los ensayos de TLC utilizando laminarina y pNPG, sugieren que las enzimas actúan de manera exo.

Esas características las convierten en candidatas potenciales para su participación en procesos biotecnológicos.



ABSTRACT

β -1,3-glucanases are enzymes that belong to the GH3, GH5, GH17 and GH55 families of glycosyl hydrolases, catalyze the release of α -glucose from β -1,3-glucans, which is normally found in the wall cellular fungi and plant biomass, as well as in the bran of cereals. β -1,3-glucanases are important for their application as biological control against plant pathogens, as vehicles for drugs and for improving the organoleptic properties of juices and wines. In the working group, we are interested in the study of enzymes of industrial importance. One of the study models is the thermophilic fungus *Thielavia terrestris* Co3Bag1 that was selected to grow at 45 °C and to have lignocellulosic activity. To date, the β -1,3-glucanase activity of the fungus *T. terrestris* has not been reported and its biochemical study would indicate whether the β -1,3-glucanase presents adequate properties for its biotechnological application.

The aim of the present work was to clone and express the gene coding for the β -1,3-glucanase of *T. terrestris* Co3Bag1 in a heterologous system and to evaluate its application in the hydrolysis of materials rich in β -1,3-glucans.

This work describes the purification and characterization of an enzyme with exo- β -1,3 hydrolytic activity called *TtBgn31A* of *T. terrestris* Co3Bag1, the first enzyme with exo- β -1,3 hydrolytic activity belonging to the GH31 family. *TtBgn31A* exhibited optimal activity at 70 °C and pH 6, This enzyme has exo- β -1,3 hydrolytic properties and kinetic parameters that exceed several exo- β -1,3-glucanases previously reported, which makes it a candidate for its biotechnological application. Additionally, exo- β -1,3-glucanase was expressed in *Aspergillus niger*, it was purified and characterized to be compared with the enzyme produced by *T. terrestris* Co3Bag1.

With the biochemical comparison of exo- β -1,3-glucanase produced by *T. terrestris* Co3Bag1 and the recombinant exo- β -1,3-glucanase expressed in *A. niger* CBS 513.88, the latter has better biochemical properties such as the values of average life in the analysis of the thermostability, increase its activity 3.5 and 1.2 times more in the presence of Fe^{2+} and Mn^{2+} , respectively. However, the exo- β -1,3-glucanase secreted by *T. terrestris* has the highest optimal temperature, comparing it with the fungal exo- β -1,3-glucanases reported in the databases, with a value of 70 °C.

Both enzymes show a marked preference for the laminarin substrate, as indicated by substrate specificity results. In addition, TLC assays using laminarin and pNPG suggest that the enzymes act exo.

These characteristics make them potential candidates for their participation in biotechnological processes.



I. INTRODUCCIÓN

La gran diversidad en la estereoquímica de los carbohidratos y el gran número de sus posibles combinaciones, están en paralelo con una inmensa variedad de enzimas diseñadas para su hidrólisis selectiva (Davies & Henrissat, 1995). El número de plegamientos de las proteínas ha sido estimado en no más de unos miles. Esto plantea la cuestión del origen de la especificidad de las Glicosil Hidrolasas (GHs) y sugiere que las GHs con diferente especificidad de sustrato podrían tener plegamientos conformaciones similares (Henrissat *et al.*, 1995).

Las funciones biológicas de los oligonucleótidosacáridos y polisacáridos son muy variadas, así como de las GHs, enzimas que participan en varias funciones esenciales de la vida, por ejemplo: la hidrólisis de oligonucleótidosacáridos y polisacáridos como fuente de energía y para el ataque de patógenos como defensa contra microorganismos patógenos, ya que la composición de la pared celular de estos, está compuesta por polisacáridos estructurales como los β -glucanos (Nett *et al.*, 2007).

Las β -1,3-glucanasas son enzimas que pertenecen a las familias GH3, GH5, GH17 y GH55 de las glicosil hidrolasas, catalizan la liberación de α -glucosa de los β -1,3-glucanos, que normalmente se encuentra en la pared celular de hongos y en la biomasa vegetal, así como en el salvado de los cereales. Las β -1,3-glucanasas tienen importancia por su aplicación como control biológico contra patógenos de cultivos vegetales, los productos generados por las β -glucanasas son usados como vehículos de fármacos, también, las β -glucanasas se usan para mejorar las propiedades organolépticas de jugos, cervezas y vinos. En el grupo de trabajo estamos interesados en el estudio de enzimas de importancia industrial. Uno de los modelos de estudio es el hongo termófilo *Thielavia terrestris* Co3Bag1, que fue seleccionado por crecer a 45 °C y presentar actividad lignocelulolítica. En el laboratorio estamos interesados por el estudio de enzimas termoestables, anteriormente, se han purificado y caracterizado enzimas con algunas propiedades interesantes, como las temperaturas óptimas y valores altos en la termoestabilidad, del hongo *T. terrestris* Co3Bag1: lacasa de 97 kDa, xilanasas de 86 kDa, glucosidasa de 77 kDa y lipasa de 24 kDa. Hasta la fecha, no se ha reportado la actividad exo- β -1,3-glucanasa del hongo *T. terrestris* Co3Bag1 por otros autores y su estudio bioquímico indicaría si la enzima podría tener propiedades adecuadas para su aplicación biotecnológica.



1.1 β -glucanos

Los β -glucanos son polisacáridos que están compuestos por monómeros de D-glucosa, ligados con enlaces glucosídicos β . Los β -glucanos son un grupo muy diverso de moléculas que pueden variar en relación a su masa molecular, solubilidad, viscosidad, y configuración tridimensional. Normalmente, los β -glucanos se presentan como celulosa en las plantas, el salvado de los granos de cereales, la pared celular de levaduras, hongos, setas y algunas bacterias. Algunas formas de β -glucanos son útiles en la nutrición humana como agentes de textura y como suplementos de fibra soluble, aunque pueden ser problemáticos en el proceso de elaboración de la cerveza.

Los β -glucanos, normalmente extraídos de levaduras y hongos medicinales, son notables por su capacidad para modular el sistema inmunitario. Investigaciones han demostrado que los β -glucanos insolubles (β -1,3/ β -1,6) (**Figura 1**), tienen mayor actividad biológica que sus homólogos β -glucanos solubles (β -1,3/ β -1,4) (Vannucci *et al.*, 2013). La funcionalidad y la actividad biológica de los β -glucanos dependen de los enlaces que lo conforman, la estructura química y la solubilidad.

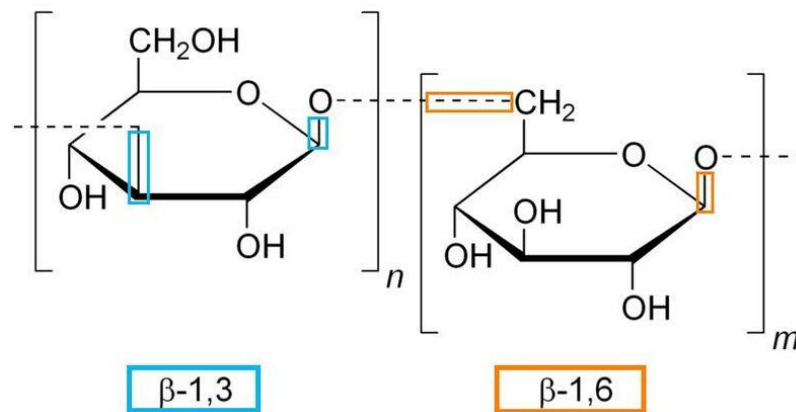


Figura 1. (β -1,3/ β -1,6)-glucano de naturaleza insoluble

Diagrama que muestra el tipo de enlaces de los (β -1,3/ β -1,6)-glucanos. Tomado de (Beta glucano. (n.d.). En Wikipedia. Recuperado el 30 de julio del 2019, de <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:BetaGlucanReference.jpg>)

1.1.1 Características de los β -glucanos

Los β -glucanos son polisacáridos que sólo contienen moléculas de glucosa como componente estructural, unidas con enlaces β -glucosídicos.

En general, se distinguen los enlaces α - y β -glucosídico dependiendo de la orientación del radical hidroxilo que se encuentra enlazado al carbono anomérico. Un enlace α -glucosídico de D-azúcar en la proyección de Haworth deriva de la orientación del radical hidroxilo por debajo de dicho plano, mientras que un enlace β -glucosídico se encuentra por encima de dicho plano (**Figura 2**).

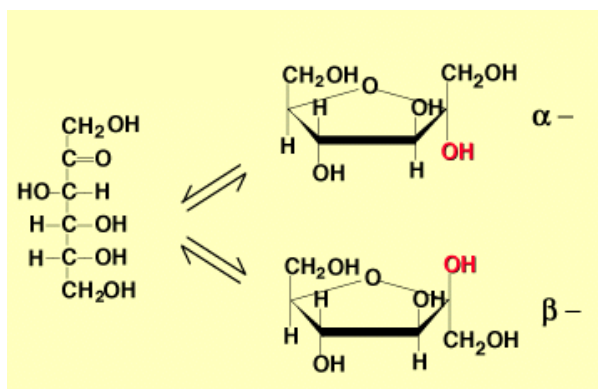


Figura 2. Molécula de glucosa en la proyección de Haworth
Visualización de la orientación de los radicales hidroxilos. Tomado de (Glúcidos. (n.d.). Recuperado el 09 de enero del 2017, de <http://www.ehu.es/biomoleculas/hc/sugar31c.htm>

A continuación, se muestran algunos ejemplos de β -glucanos con sus enlaces característicos:

Nombre	Enlace	Notas
Celulosa	β -1,4	Presente en pared celular de plantas
Curdlan	β -1,3	Aislado de <i>Alcaligenes faecalis</i>
Laminarina	β -1,3 y β -1,6	Aislado de algas
Crisolaminarina	β -1,3	Aislado de algas
Lentinan	β -1,6: β -1,3	Aislado de <i>Lentinula edodes</i>
Liquenina	β -1,3 y β -1,4	Aislado de líquenes
Pleuran	β -1,3 y β -1,6	Aislado de <i>Pleurotus ostreatus</i>
Zimosán	β -1,3	Aislado de levaduras

1.1.2 Química de los β -glucanos

La forma más activa de los β -glucanos son los que integran unidades de D-glucosa unidas unas a otras en la posición (1,3) con cadenas laterales de D-glucosa unidas a la posición (1,6). Éstos son referidos como β -1,3/ β -1,6-glucanos. Algunos investigadores han sugerido que es la frecuencia, la ubicación, y la longitud de la cadena lateral lo que determina su actividad en el sistema inmune, más que el esqueleto principal de los β -glucanos (Vannucci *et al.*, 2013). Otra variable es el hecho de que algunos de estos glucanos contienen una cadena única, mientras que los esqueletos principales de otros β -1,3-glucanos existen en forma de dobles y triples cadenas. En algunos casos, las proteínas enlazadas al esqueleto principal del β -1,3-glucano, también pueden estar involucradas en actividades terapéuticas (Gan *et al.*, 2004). Hasta ahora, existe controversia sobre qué peso molecular, forma, estructura, y fuente de los β -1,3-glucanos proporcionan el mayor beneficio terapéutico (Vannucci *et al.*, 2013).



1.1.3 Fuentes de β -1,3-glucanos en la naturaleza

Una de las fuentes más comunes de los β -glucanos para el uso de suplementos alimenticios, se deriva de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, los β -1,3/ β -1,4 glucanos también son extraídos de los salvados de algunos cereales como la avena, cebada, y en un grado menor del centeno y el trigo. Los β -glucanos forman parte estructural de la pared celular de los hongos y de la fase amorfa de la pared celular vegetal (Vannucci *et al.*, 2013). Los β -1,3-glucanos de las levaduras, a menudo son insolubles; mientras que los que se extraen de los cereales tienden a ser tanto solubles como insolubles.

Otras fuentes de β -glucanos incluyen algunos tipos de algas (Gan *et al.*, 2004) y varias especies de hongos (Castoria *et al.*, 1997), como reishi (*Ganoderma lucidum*), shiitake (*Lentinus edodes*), maitake (*Grifola frondosa*) y enokitake (*Flammonulina velutipes*) (Sanodiyam *et al.*, 2013).

Los β -1,3-glucanos en los hongos, juegan un papel estructural, ya que proporciona rigidez a la célula y la protege de los factores externos. También se ha sugerido que los β -1,3-glucanos son degradados con propósito nutricional, después de que se agota la fuente de carbono (Ishida *et al.*, 2009).

Un β -glucano conocido es la laminarina, que es un polisacárido de almacenamiento que consta de enlaces β -1,3 de monómeros de glucosa en la cadena principal con ramificaciones β -1,6 de glucosa. Este polisacárido se encuentra en varias algas pardas y microalgas. El orden estructural del polisacárido de laminarina varía dependiendo de su origen, por ejemplo, la cadena principal de laminarina en las diatomeas posee pocas ramificaciones β -1,6; mientras que la cadena principal de la laminarina de *Laminaria digitata* posee enlaces β -1,6 con una proporción molar de enlace glucosa β -1,6 a β -1,3 de 1:7. Al polímero de laminarina, en cualquier grado de polimerización, se le atribuyen muchas actividades biológicas beneficiosas (Kumagai & Ojima, 2010; O'Connell *et al.*, 2011).

1.2 Glicosil hidrolasas (GHs)

Las GHs constituyen un amplio y variado grupo de enzimas cuya característica común es la capacidad de hidrolizar el enlace glucosídico, se clasifican siguiendo las recomendaciones originalmente establecidas por el "Nomenclature Committee" (NC) de la "International Union of Biochemistry (IUB)", posteriormente adoptada por otras organizaciones bioquímicas internacionales, como la "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) y la "International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (IUBMB). Esta clasificación establece un Catálogo de Enzimas ("Enzyme Catalog", abreviado EC) que asigna a cada enzima un código numérico basado en el tipo de reacción catalizada y en la especificidad del sustrato. Las GHs son definidas como (3.2.1.X), donde los tres primeros dígitos indican la propiedad de hidrolizar el enlace O-glucosídico, y el cuarto (X) indica el tipo de sustrato en el que actúan y algunas veces refleja el mecanismo



molecular (Henrissat *et al.*, 1995). Esta clasificación es muy útil, especialmente para evitar ambigüedades y la aparición de nombres triviales, proporcionando de este modo una única clasificación. Sin embargo, en el caso de las GHs, tal clasificación no refleja necesariamente las características estructurales de las enzimas. De hecho, una clasificación basada principalmente en el sustrato no puede tener en cuenta los eventos evolutivos, tales como (1) divergencia, la cual puede resultar en la especificidad y a veces el tipo de reacción o (2) la evolución convergente, que puede obligar a enzimas con conformación diferente a catalizar la misma reacción en el mismo sustrato (Henrissat, 1991).

La clasificación EC es muy conveniente, sin embargo, se complementa con una clasificación basada en la similitud de la secuencia, esto significa que las secuencias de GHs pueden alinearse de acuerdo a los dominios, agrupándose en familias. Otro factor influyente es que toma en cuenta la estructura, en el caso de que esté disponible. Hasta la fecha, es posible encontrar agrupadas a 156 familias distribuidas en 18 clanes que se encuentra en la base de datos CAZy (Davies *et al.*, 2005). Agrupando las enzimas de esta manera, se permite la determinación de las características importantes de todos los miembros de una familia basada en la evidencia experimental obtenida.

Por medio de esta clasificación, se ha demostrado que casi todas las GHs tienen los mismos dos residuos aminoacídicos ácidos, los cuales son los encargados en participar en la escisión del enlace glucosídico (Henrissat & Bairoch, 1993; Davies & Henrissat, 1995; Henrissat & Bairoch, 1996; Henrissat & Davies, 2000). Las lisozimas fueron las primeras GHs a las cuales se pudo conocer su estructura tridimensional (3D), a partir de la cual se identificaron los dos aminoácidos catalíticos: ácido aspártico y ácido glutámico. En muchas GHs estudiadas posteriormente, sólo esos dos residuos aminoacídicos se han encontrado como los responsables de llevar a cabo la catálisis. Estudios posteriores demostraron que, en algunas ocasiones, otros residuos están involucrados en la hidrólisis del enlace glucosídico. Algunos ejemplos son la neuraminidasa viral y la sialidasa bacteriana, en donde el estado de transición es estabilizado con la ayuda de una tirosina o algún aminoácido de naturaleza aromática (Davies & Henrissat, 1995).

Con la secuenciación de genomas, el número de GHs ha aumentado considerablemente, revelando que del 1 al 3 % de un genoma codifica para GHs (Davies *et al.*, 2005).

La limitante de clasificar a las GHs en familias, es que una familia puede ser definida, sólo cuando uno de sus miembros se caracteriza bioquímicamente. Por ejemplo, la mayoría de los polisacáridos con enlace β en las plantas, se sintetizan por la familia 2 de las glicosiltransferasas (GT-2), sin embargo, varias secuencias aminoacídicas de hongos y plantas no parecen ser miembros de esta familia; por lo tanto, pudieran potencialmente formar una familia separada de glicosiltransferasas y en las bases de datos están anotadas como potenciales β -1,3 glucano sintasas (Henrissat & Davies, 2000).



1.2.1 Estructura tridimensional de GHs

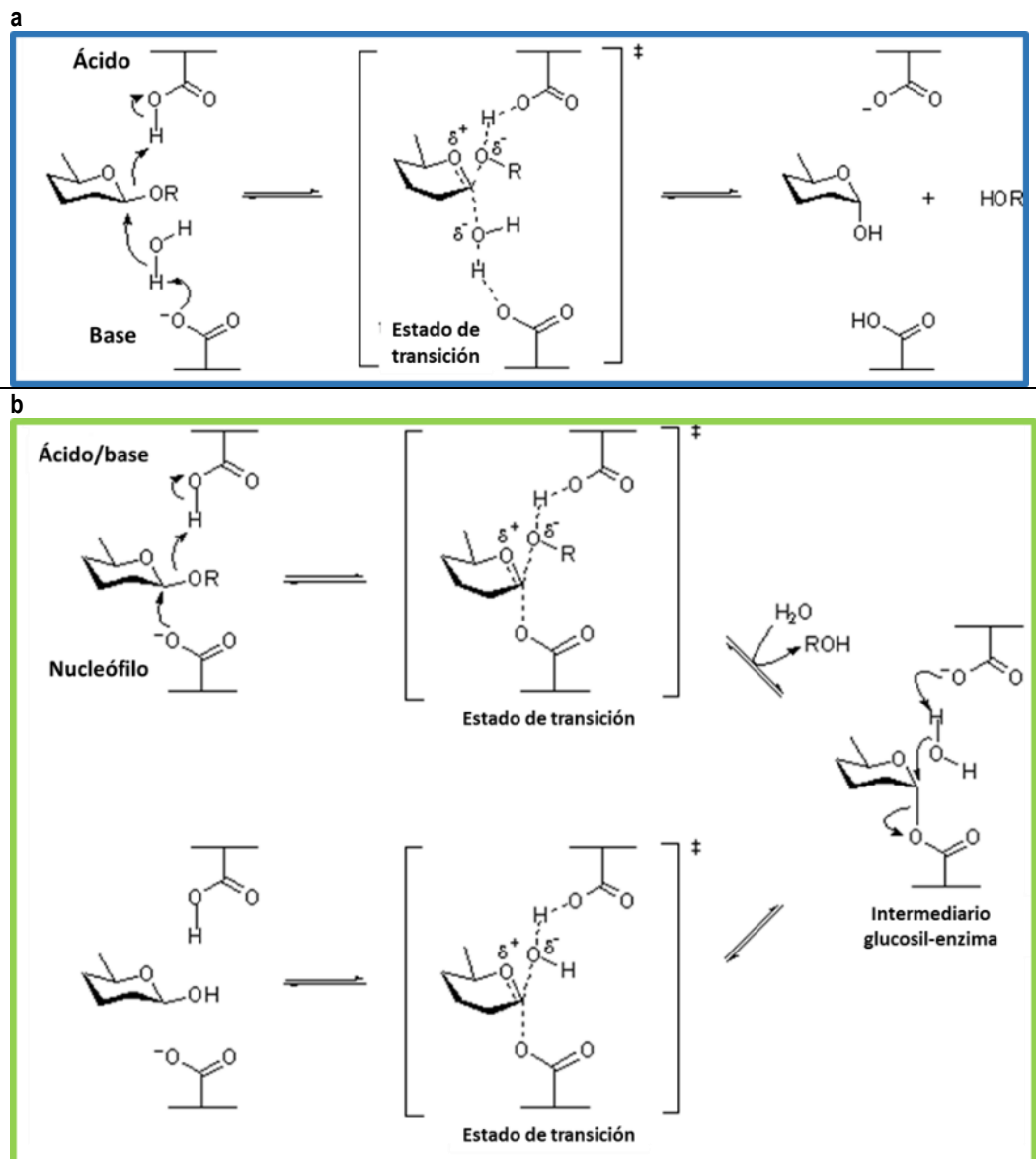
Notablemente, a pesar de que todas las GHs hidrolizan el enlace glucosídico, estas enzimas muestran una extraordinaria diversidad estructural. El análisis comparativo de las estructuras tridimensionales resueltas, ha revelado relaciones entre proteínas de distintas familias que presentan secuencias llamadas módulos de unión a carbohidratos (CBM) (Lynd *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2005). De este análisis surge una clasificación de las familias en “Clanes” denominados también “Superfamilias”. Los clanes agrupan enzimas de distintas familias, entre las cuales no puede establecerse homología discernible de estructura primaria, pero cuyas estructuras tridimensionales presentan elementos comunes que revelan una remota relación filogenética. El clan más numeroso, con diferencia sobre los demás, es el denominado GH-A, caracterizado por una estructura de barril $(\alpha/\beta)_8$ también denominada “TIM-barrel” (por corresponder a la estructura de la enzima “Triose-phosphate isomerase”). Este motivo estructural es además, con gran diferencia, el más frecuente en el conjunto de GHs, ya que está presente en 24 familias con estructuras resueltas. En el clan GH-A se encuentra agrupadas enzimas clasificadas en las familias 1, 2, 5, 10, 17, 26, 30, 35, 39, 42, 50, 51, 53, 59, 72, 79, 86, 113 y 128. Todas ellas tienen en común dos propiedades relevantes: a) Hidrolizar sustratos β -glucosídicos y el operar mediante un mecanismo que retiene la configuración anomérica, y b) Los dos residuos catalíticos de estas enzimas están situados en las cadenas β cuatro y siete, de las ocho que constituyen el barril $(\alpha/\beta)_8$ que caracteriza su estructura. Por este motivo, al clan GH-A también se le denomina clan 4/7 (Cutfield *et al.*, 1999).

1.2.2 Mecanismos de hidrólisis

La hidrólisis del enlace glucosídico, catalizada por las distintas GHs está mediada por la acción de dos residuos catalíticos presentes en el centro activo, uno de los cuales actúa como donador de protones y el otro como nucleófilo o base (White & Roset, 1997), siendo en la mayor parte de los casos dos residuos carboxílicos. El enlace glucosídico puede hidrolizarse de dos formas distintas, dependiendo de la configuración del carbono anomérico resultante de la hidrólisis. A la reacción hidrolítica en donde la configuración anomérica cambia, se le denomina “mecanismo de inversión”, y la distancia de separación de los dos carboxilos catalíticos es de aproximadamente 10 Å. El mecanismo de inversión tiene lugar en una sola etapa, mediante un proceso catalítico ácido-base. Uno de los residuos catalíticos opera como base, facilitando el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico y el otro, como ácido, asistiendo la separación del oxígeno (**Figura 3a**) (McCarter & Withers, 1994). El mecanismo de retención tiene lugar mediante un doble desplazamiento. Como resultado, tiene lugar la formación transitoria de un enlace covalente entre enzima y el glucósido. Este enlace es estable, como para permitir la separación del centro



activo de la parte liberada y su reemplazamiento por una molécula de agua, con ayuda de un segundo residuo catalítico ácido/base, que actúa en la primera etapa como ácido, protonando el oxígeno glucosídico, y como base en la segunda, sustrayendo un protón de una molécula de agua, que deshace el enlace covalente transitorio y regenera a la enzima (**Figura 3b**) (Davies & Henrissat, 1995).





1.2.3 Topologías del sitio activo de las GHs

Aunque existen diferentes pliegues de las GHs representados por al menos una estructura 3D en cada familia, la topología global de los sitios activos cae en sólo tres clases, independientemente del mecanismo de la enzima (inversión o retención). Estas tres topologías (bolsillo, hendidura y túnel) (**Figura 4**), en principio, están constituidos con los mismos residuos catalíticos (Davies & Henrissat, 1995).

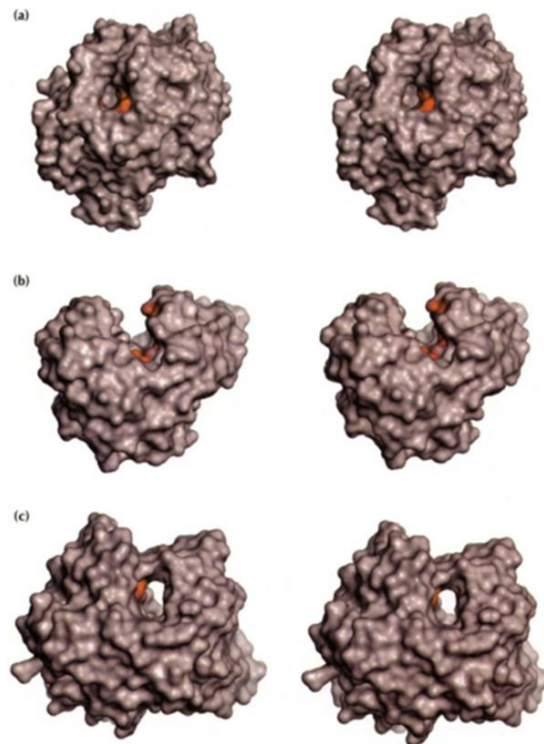


Figura 4. Formas que adquiere el sitio activo de las GHs

(a) Bolsillo (glucoamilasa de *Aspergillus awamori*).

(b) Hendidura (endoglucanasa E2 de *Thermononospora fusca*).

(c) Túnel (celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*).

Los residuos catalíticos se muestran en rojo (Davies & Henrissat, 1995).

1.2.3.1 Bolsillo

La topología de bolsillo (**Figura 4a**) es óptima para el reconocimiento de un extremo no reductor de un sacárido y se encuentra en monosacaridasas como la β -galactosidasa, β -glucosidasa, la sialidasa y la neuraminidasa, también en exopolisacaridasas, tales como glucoamilasa y β -amilasa. Tales exopolisacaridasas se adaptan a los sustratos que tienen un gran número de extremos de cadena disponibles, tales como gránulos de almidón nativo, cuya estructura radial expone todos los extremos de cadena no reducida a la superficie. Por otro lado, estas enzimas no son muy eficientes para sustratos fibrosos, tales como la celulosa nativa, cuya estructura está limitada de cadenas libres en los extremos (Davies & Henrissat, 1995).



1.2.3.2 Fisura o hendidura

La topología de fisura o hendidura es una estructura "abierta" (**Figura 4b**) que permite la unión aleatoria de varias unidades de azúcar en sustratos poliméricos y se encuentra comúnmente en GHs con actividad endoglucanasa, tales como lisozimas, endocelulasas, quitinasas, α -amilasas, xilanasas, β -1,3-1,4-glucanasas y β -1,3-glucanasas (Davies & Henrissat, 1995).

1.2.3.3 Túnel

La topología de túnel (**Figura 4c**) se deriva de la anterior, sin embargo, esta conformación desarrolla bucles largos que cubren parte de la hendidura. Hasta ahora, se ha encontrado sólo en celobiohidrolasas, y el túnel resultante permite que una cadena de polisacárido se enrosque a través de ella. Los bucles que causan los centros catalíticos de celobiohidrolasas se encuentran dentro de túneles cerrados. Esta topología permite a estas enzimas liberar el producto, mientras que la cadena de polisacárido queda firmemente unida, creando así las condiciones para la procesividad (**Figura 5**). No está claro si el sustrato inicialmente penetra en el sitio activo de una manera 'exo' por una de las dos entradas del túnel o si los bucles que cierran el sitio activo pueden "abrir" de vez en cuando para permitir una unión aleatoria seguida de la acción procesiva. En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que, dependiendo del mecanismo (inversión o retención) y la posición exacta del punto de escisión con respecto a los varios subsitios, el movimiento direccional de la enzima a lo largo de la cadena se puede cambiar. Por ejemplo, la celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei* se dirige hacia el extremo reductor de la celulosa, mientras que para la celobiohidrolasa I del mismo organismo es a la inversa. La procesividad es probablemente un factor clave para la eficiencia de degradación enzimática de la celulosa microcristalina insoluble (Davies & Henrissat, 1995).

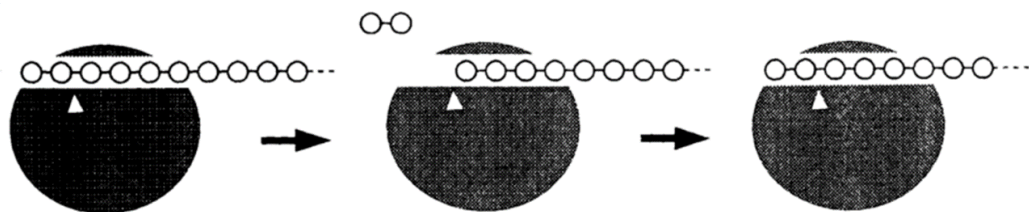


Figura 5. El mecanismo de procesividad de celobiohidrolasas

Una vez que un producto disacárido es liberado (mostrado como dos círculos unidos), la enzima permanece unida a la cadena de polisacárido por varios subsitios. Los dos sitios vacíos producidos por la salida del disacárido, y quizá otros factores tales como los movimientos de bucle, proporcionan la fuerza motriz para el movimiento de la enzima en la cadena (o cadena a lo largo del sitio activo de la enzima). La hidrólisis puede proceder entonces iterativamente hasta que el movimiento de la enzima se detiene por factores estéricos (Davies & Henrissat, 1995)



1.2.4 Aplicaciones industriales de las GHs

Las enzimas se han convertido en herramientas insustituibles para la obtención industrial de productos de índole muy diversa. Actualmente muchas industrias, como la de alimentos, química o farmacéutica, utilizan enzimas de distinta naturaleza y actividad. Entre los principales organismos productores de enzimas industriales se encuentran determinadas especies de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* (Tamano *et al.*, 2007), *Trichoderma* y *Mucor*, (Bourdichon *et al.*, 2012), aunque también se obtienen enzimas a partir de bacterias, plantas y animales.

Los polisacáridos son constituyentes fundamentales de muchos alimentos y su hidrólisis representa una etapa esencial en el proceso productivo de industrias como la panadera, láctea, cervecera, etc., para las cuales el uso de GHs es de gran importancia práctica. Por ejemplo, la fabricación de pan requiere la fermentación de los azúcares presentes en la masa de harina por parte de la levadura. En las industrias cerveceras se usan amilasas y β -glucanasas, entre otras enzimas. El empleo de celulasas es para digerir el material celulósico que acompaña al almidón procedente de la cebada. La presencia de glucano produce una elevada viscosidad del mosto de cerveza, lo que causa problemas para su filtración (Tamano *et al.*, 2007).

Otra aplicación es la obtención de azúcares sencillos, oligo y monosacáridos, empleados para elaborar distintos tipos de alimentos: bebidas, dulces, etc. Por otra parte, los azúcares sencillos se utilizan como materia prima para la obtención de etanol, cuya importancia como combustible líquido, sustituto de la gasolina, crece de forma notable.

1.3 β -1,3-glucanasas

Las β -1,3-glucanasas son GHs que catalizan la ruptura hidrolítica de los enlaces β -1,3 presentes en β -1,3-glucanos. Este biopolímero está formado por monómeros de D-glucosa con enlaces β -1,3 y ramificaciones β -1,6 (Amano *et al.*, 2007; O'Connell *et al.*, 2011). El sustrato de estas enzimas es un componente ampliamente extendido en las plantas. En este sentido, los β -1,3 glucanos y otros polisacáridos relacionados se han encontrado en muchas etapas especializadas del desarrollo de la planta, incluyendo la división celular, la microesporogénesis (Kruse & Cole, 1992), en tubos del polen, en hipocotíleos, durante el desarrollo del endospermo, a lo largo de la germinación de semillas o durante la latencia (Kotake *et al.*, 1997; Hrmova *et al.*, 2001; Hrmova *et al.*, 2005).

Se han descrito β -1,3-glucanasas en bacterias, hongos (Kasahara *et al.*, 1992), actinomicetos, algas (Kumagai & Ojima, 2010), moluscos (Kawai *et al.*, 2006), plantas (Ferrer, 2006; Tamano *et al.*, 2007) y virus (Li *et al.*, 2007). En hongos filamentosos y levaduras son prácticamente ubicuas, siendo esto una



consecuencia probable de la amplia disponibilidad de sustrato existente, especialmente como componente de las paredes celulares, los β -1,3/1,6-glucanos (Bamforth, 1980; Chambers *et al.*, 1993). Se han presentado varias β -1,3-glucanasas, como en *Botryosphaeria rhodina* (Crognale & Bruno, 2007) y diez β -1,3-glucanasas en *Trichoderma harzianum*, que no muestran diferencia genética, pero difieren en las modificaciones postraduccionales, como glicosilación y proteólisis (Martin *et al.*, 2005; O'Connell *et al.*, 2011). Adicionalmente, se ha determinado la concentración de glucosa en el medio de cultivo de hongos para favorecer la producción de β -glucanasas (Medina *et al.*, 2005); así como el efecto de este azúcar en la producción de β -1,3-glucanasa en *S. cerevisiae* (Hien & Fleet, 1983) y en hongos filamentosos, demostrando que al utilizar diferentes fuentes de carbono como almidón, quitina, quitosano, celulosa y la pared celular purificada de algunos hongos como *R. solani*, la actividad y el momento de expresión cambian (Marcello *et al.*, 2010).

De acuerdo al mecanismo de acción de las β -glucanasas, endo u exo, estas enzimas se han identificado y agrupado en diferentes familias de las GHs. Las β -glucanasas con mecanismo de acción exoglucanasa se agrupan en las familias de las GHs: 3, 5, 17 y 55; mientras que aquellas con mecanismo de acción endoglucanasa se agrupan en las familias de las GHs: 16, 17, 64, 72 y 81 (O'Connell *et al.*, 2011). Las β -1,3-glucanasas de naturaleza fúngica se encuentran dentro de las GH5 y GH55, principalmente.

1.3.1. Familia GH5

En años recientes, el aumento de estructuras resueltas de GHs ha mejorado el conocimiento para entender cómo es que las enzimas reconocen y se unen a una gran diversidad de polisacáridos como sustratos. La comparación de las secuencias aminoacídicas permitió la clasificación de las GHs en diferentes familias y, con ayuda de investigaciones de cristalografía, pudieron ser agrupadas dentro de clanes (White & Roset, 1997). El clan GH-A contiene algunas familias y se caracterizan por tener en el sitio catalítico, el donador de protones y el nucleófilo en las cadenas 4 y 7, respectivamente, en el centro de la estructura de barril (β/α)₈ (Cutfield *et al.*, 1999).

La familia 5 pertenece a este clan, además se distingue por tener otros seis residuos conservados que abarcan el sitio activo. Los miembros de esta familia actúan a través de un mecanismo de desplazamiento doble que implica un producto intermedio covalente, con retención neta de la configuración en la posición C1 anomérico del enlace glucosídico. Además, dentro de los miembros de la familia 5 se encuentran celulasas bacterianas (endo- β -1,4-glucanasas) y un grupo de exo- β -1,3-glucanasas fúngicas, como la del patógeno humano *Candida albicans*, y algunas β -mananasas (Cutfield *et al.*, 1999).



Las exo- β -1,3-glucanasas fúngicas pertenecientes a la familia GH5 están asociadas con la esporulación, la termoresistencia de las ascoesporas y la modificación de la pared celular de levaduras y de algunos hongos filamentosos (O'Connell *et al.*, 2011).

Por ejemplo, la exo- β -1,3-glucanasa (Exg) de *C. albicans* es el producto del gen EXG, que codifica una preproenzima de 438 aa. La proteína madura de 400 aa está involucrada en el metabolismo de glucanos presentes en la pared celular, catalizando la hidrólisis de un residuo de glucosa en el extremo no reductor de los glucanos, con enlace β -1,3 y, en un grado menor, los de enlace β -1,6 (Cutfield *et al.*, 1992), que son los constituyentes de la pared celular de los hongos (Chambers *et al.*, 1993; Cutfield *et al.*, 1999; Cutfield *et al.*, 2000). También, se ha observado que esta enzima está involucrada en la morfogénesis y puede ser aislada directamente del medio de cultivo de *C. albicans* (Cutfield *et al.*, 2000).

Se han identificado los residuos catalíticos de la enzima Exg madura, los cuales corresponden a Glu192 (donador y protón) y Glu292 (nucleófilo) (Chambers *et al.*, 1993; Mackenzie *et al.*, 1997). La enzima Exg de *C. albicans* (Cutfield *et al.*, 1992), tiene los mismos residuos aminoácidos catalíticos de la exo- β -1,3-glucanasa de *S. cerevisiae* (Cutfield *et al.*, 1992). Sin embargo, sólo presentan el 58 % de identidad, teniendo homología estructural con celulasas y una forma inusual del sitio activo en forma de túnel lo que es típico para exoglucanasas. Esta estructura, les permite tener actividad de transglicosilación inmediatamente después de la hidrólisis, como ocurre con la Exg de *C. albicans* (Cutfield *et al.*, 1992). La actividad de transglicosilación, utiliza un aceptor que no es agua, el cual puede recuperar el residuo de glucosa del intermediario glicosil-enzima. Se cree que esta actividad puede ser importante para la formación de la pared celular durante la morfogénesis, en la elongación de las hifas, movilización de glucanos para su uso como fuente de energía y en la rotación de la pared celular. Sin embargo, es difícil en la actualidad asignar un papel fisiológico específico para Exg (Henrissat *et al.*, 1989; Cutfield *et al.*, 1999).

1.3.2 Familia GH55

Todas las enzimas caracterizadas bioquímicamente de la familia GH55 muestran actividad exo- o endo- β -1,3-glucanasa, sólo se han identificado en hongos filamentosos y se cree que están asociadas con actividades antifúngicas (O'Connell *et al.*, 2011). Por ejemplo, Lam55A (laminarinasa A) de *Phanerochaete chrysosporium*, no presenta actividad hidrolítica en glucanos con enlaces β -1,6- y β -1,3/1,4, pero muestra una elevada actividad en glucanos con enlaces β -1,3/1,6 presentes en la pared celular de hongos (Ishida *et al.*, 2009).

Algunos microorganismos secretan un complejo de enzimas para la degradación completa de la pared celular, la cual se lleva a cabo, en la mayoría de los casos, por la acción sinérgica de endo- y exo- quitinasas y β -1,3-glucanasas. En trabajos de Rigden *et al.* (2002) se demostró que el dominio catalítico encontrado en



uno de los dominios β simétricos (dominio N- y C-terminal) de las GH55 era parecido al de enzimas pertenecientes a las familias GH28 y GH82, presentando una similitud de aproximadamente 42 % entre el dominio N- y C-terminal (Kawai *et al.*, 2006).

En la familia GH55 se han identificado tres residuos aminoacídicos conservados: Glu633, Glu610 y Asp575. El residuo Glu633 es el aminoácido catalítico, formando directamente el puente de hidrógeno con el O-1 del grupo hidroxilo de la gluconolactona (monosacárido utilizado para el análisis). El residuo Glu610 reconoce el O-2 y O-3 de los grupos hidroxilos y Asp575 reconoce el O-4 del grupo hidroxilo. Los estudios demostraron que el mecanismo de acción de las GH55 es de inversión (Ishida *et al.*, 2009).

Utilizando la estructura primaria de las enzimas y su modelado 3D, se determinó que las GH55 pueden adoptar la conformación de las GH82 (Rigden & Franco, 2002).

Aunque las GH55, contienen dos dominios β -hélice, derivados tal vez de un evento de duplicación genética, que probablemente viene de un origen evolutivo de otras GHs, se ha visto que contiene una tercera clase de sitio activo en forma de β -hélice, este pliegue probablemente es un módulo de unión a carbohidrato (Rigden & Franco, 2002).

1.4 Mecanismo de hidrólisis de las β -1,3-glucanasas

Las β -1,3-glucanasas también pueden clasificarse según el tipo de enlaces sobre el que actúan y por su modo de acción, así existen las exo- β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.58), que hidrolizan los polímeros de β -1,3-glucano desde el extremo no reductor originando monómeros de glucosa, y las endo- β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39), que rompen enlaces internos dando lugar a oligómeros de dos, tres o más unidades (Fontaine *et al.*, 1997).

Algunas levaduras y hongos filamentosos producen exo- β -1,3-glucanasas y endo- β -1,3-glucanasas, las cuales se encuentran en el medio extracelular y también asociadas a la pared celular. Lo que sugiere que estas enzimas son esenciales para el continuo re-arreglo de la pared celular durante todo el crecimiento, por su papel en la esporulación, germinación y crecimiento, ya que están reguladas dependiente del ciclo celular (McLeod *et al.*, 2003). Para los hongos filamentosos como *Coprinus cinereus*, las endo- β -1,3-glucanasas juegan un papel esencial en la elongación de las hifas, mientras que en *S. cerevisiae*, la producción de exo- β -1,3-glucanasas funciona en el ciclo de regulación de la pared celular, reiterando que estas enzimas están implicadas en la morfogénesis (Hien & Fleet, 1983; Muthukumar *et al.*, 1993; Fontaine *et al.*, 1997).

En este sentido, se requiere la actividad conjunta de ambas clases de enzimas, exo- β -1,3-glucanasas y endo- β -1,3-glucanasas, para una degradación completa del sustrato (Tamano *et al.*, 2007).



1.5 Funciones fisiológicas de las β -1,3-glucanasas

Investigaciones hechas en bacterias, hongos y plantas han permitido asignar diversas funciones fisiológicas a las β -1,3-glucanasas. Por ejemplo, en las plantas, estas enzimas se cree que participan en un sistema de defensa contra hongos patógenos. Las β -1,3-glucanasas también están involucradas en la degradación de la fase amorfa de la pared celular de las plantas durante el ataque de patógenos (Kulminskaya *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2013).

En las bacterias se ha observado que las β -1,3-glucanasas están involucradas en la nutrición (Stahmann *et al.*, 1992). En hongos, especialmente, las β -1,3-glucanasas poseen diferentes funciones. En primer lugar, se ha indicado que las β -1,3-glucanasas desempeñan un papel fisiológico, durante el desarrollo de la pared celular y la diferenciación (Stahmann *et al.*, 1992; Amano *et al.*, 2007), así como en la germinación de las esporas de los hongos filamentosos (Lin *et al.*, 2007). En segundo lugar, en condiciones de agotamiento de fuente de carbono, las β -1,3-glucanasas utilizan β -glucanos de la pared celular como fuente de carbono, funcionando como enzimas autolíticas (Bamforth, 1980; Stahmann *et al.*, 1992), lo que sugiere que las β -1,3-glucanasas son constitutivas en los hongos, probablemente debido a que su papel principal es la hidrólisis de la pared celular para su remodelación (Bamforth, 1980).

1.6 Aplicaciones biotecnológicas de las β -1,3-glucanasas

Las β -1,3-glucanasas tienen potencial aplicación en la biotecnología, como en las industrias agrícola, alimenticia (Tamano *et al.*, 2007), control biológico, industria farmacéutica, en la generación de piensos para alimentación animal (Liang *et al.*, 1995), y medicina, entre otras (Li *et al.*, 2007).

1.6.1 Alimentación animal

En el área de alimentación animal se ha reportado que la adición de una cepa de *E. coli* capaz de producir β -glucanasa, mejora el valor nutritivo de cebada y trigo, ya que contienen altas cantidades de carbohidratos anti nutritivos que normalmente perjudican la alimentación de animales de engorda, mediante la alteración de su digestibilidad. Los polisacáridos distintos del almidón (NSP) solubles en agua, presentes en la cebada y el trigo aumentan la viscosidad intestinal impidiendo que las enzimas digestivas interactúen con los sustratos. La adición de enzimas capaces de degradar la cadena principal de estos sustratos ha demostrado mejorar el valor nutritivo de las dietas (Li *et al.*, 2007).



1.6.2 Control biológico

En el control de patógenos, las β -glucanasas de hongos han sido evaluadas como posibles sistemas de control de hongos patógenos en cultivos de plantas, mediante el daño a la pared celular y la consecutiva muerte del hongo. Esta es una tecnología prometedora para la reducción o incluso la sustitución de los fungicidas en el control de patógenos fúngicos (Tamano *et al.*, 2007).

1.6.3 Investigación

Se sabe que las enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis pueden hacer las reacciones inversas. Las β -glucanasas de varios organismos han sido utilizadas *in vitro* para la síntesis de alquil- β -glucósidos, como: 1-octil y 1-heptil- β -glucósido; también, las β -1,3-glucanasas se han utilizado para la solubilización y la reconstrucción de las membranas biológicas, transformación y preparación de protoplastos.

1.6.4 Industria alimenticia

Las β -glucanasas aumentan el nivel de compuestos aromáticos en las bebidas alcohólicas, así como en otros productos de fermentación de material vegetal aumentando así el nivel de glucosa fermentable (Gil *et al.*, 2005).

Las β -glucanasas se utilizan para tratar el vino de uva aumentando el carácter aromático y disminuyendo la amargura de zumos a través de la hidrólisis, también aumentan significativamente el sabor producido por compuestos como el nerol, geraniol, linalol, 2-feniletanol, y bencil alcohol en el vino, α -terpineol, 2-feniletanol, y α -pineno en los jugos de frutas (Tamano *et al.*, 2007). Se ha visto que las β -glucanasas inmovilizadas son muy estables bajo las condiciones de zumo de fruta o vino (Gil *et al.*, 2005).

Las β -glucanasas se utilizan en la producción de aguardiente a partir de los residuos de los racimos de uva prensados "orujo", los cuales contienen azúcares fermentables unidos a monoterpenoles, que son agliconas como linalol, nerol, geraniol, citronelol y α -terpineol. Por lo que se podría potenciar el aroma de estas bebidas hidrolizando estos compuestos para liberar los monoterpenoles, los cuales podrían ser comercializados como saborizantes naturales, así como para obtener más azúcares fermentables.

En las industrias cerveceras se usan amilasas y β -glucanasas, entre otras enzimas. El empleo de β -glucanasas es para degradar la porción de glucanos que se encuentran en la cebada. La presencia de glucano produce una elevada viscosidad del mosto de cerveza, lo que causa problemas para su filtración, con el uso de β -glucanasas se mejora la clarificación. La presencia de β -glucanos en cerveza y vino puede



producir serios problemas durante la producción, incluyendo en la interferencia con la fermentación, clarificación y filtración (Tamano *et al.*, 2007).

1.6.5 Desarrollo

Por otra parte, los azúcares sencillos resultado de la hidrólisis de los β -glucanos se utilizan como materia prima para la obtención de bioetanol, sustitutivo de la gasolina, que crece de forma notable.

1.6.6 Medicina

Los oligómeros producto de la hidrólisis de β -1,3-glucanos han sido probados clínicamente como medicamentos inmunomoduladores contra el cáncer, debido a su alto contenido de enlaces β -1,3, los cuales son solubles en agua (Sanodiyam *et al.*, 2013; Vannucci *et al.*, 2013).

1.7. Hongos filamentosos y características generales

El reino de los hongos se encuentra dividido en los phylum Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y hongos mitosporicos (Arias *et al.*, 2008), en general poseen algunas particularidades en común como: poseer células flageladas, micelio, tienen reproducción sexual o asexual gracias al esporangio, y tienen paredes celulares compuestas principalmente por quitina y glucano.

Los hongos filamentosos son microorganismos eucarióticos, aerobios facultativos que se reproducen sexual o asexualmente, tienen como característica común que se nutren a partir de materia orgánica (Arias *et al.*, 2008), con la ayuda de enzimas que secretan para poder elaborar moléculas más pequeñas.

Fisiológicamente, los hongos filamentosos se adaptan a condiciones más severas que otros microorganismos, su desarrollo en sustratos puede ser con concentraciones de azúcares elevados, hasta el 10 %, debido a que estos microorganismos no son sensibles a la presión osmótica elevada, creciendo muy lentamente de 5 a 7 días, y resistiendo condiciones de acidez relativamente variables (pH entre 2–9) (Arias *et al.*, 2008).

Los hongos filamentosos juegan un importante papel en el medio ambiente, donde su acción de descomposición de la materia orgánica, lleva a la restauración de elementos como el carbono, fósforo, nitrógeno y muchos minerales más. Los hongos filamentosos se utilizan para diferentes fines, por ejemplo en la industria alimentaria, la producción de metabolitos de interés médico y la producción de enzimas que son ocupadas en diversos procesos biotecnológicos (Nevalainen *et al.*, 2005).



Las enzimas provenientes de microorganismos como hongos, tienen muchas características que las hacen ideales como catalizadores en una gran variedad de reacciones. Una de sus ventajas principales es la actividad enzimática que tienen en diversas condiciones como alta temperatura, presión, estabilidad al pH, etc., todas estas características son de suma importancia para muchas de las reacciones químicas ocupadas en la industria. Su capacidad catalítica es sustancial y las cantidades requeridas son muchas veces menores que para la catálisis química. Las enzimas son versátiles y son capaces de realizar una multiplicidad de reacciones. Actualmente, se buscan nuevas actividades que sean compatibles con el desarrollo sostenible. Algunas enzimas producidas por hongos filamentosos más utilizadas son: amilasas, celulasas, β -glucanasas, lacasas, pectinasas y proteasas por hongos del género *Aspergillus* y algunas otras por el género *Penicillium* (Sharma *et al.*, 2009).

Una de las fuentes para obtener enzimas nuevas es en el compostaje, el cual es un proceso biológico donde los microorganismos presentes degradan y transforman la materia orgánica como fruto de su actividad dando finalmente lo que conocemos como compost. Un indicador de esta actividad es la evolución de la temperatura, la cual experimenta un claro comportamiento a lo largo del proceso que es común a todos los compostajes. Así, podemos observar un incremento inicial de la temperatura (fase mesófila), hasta valores altos cercanos a 60 °C (fase termófila) para después descender hasta valores cercanos a los ambientales (fase de enfriamiento o “segunda fase mesófila”), y finalmente hay una etapa de maduración. El tiempo que duran estas fases dependerá de varios factores, entre los que destaca la naturaleza de la materia orgánica y la envergadura de las pilas de compostaje (en pilas más grandes el tiempo de compostaje será mayor y viceversa).

La temperatura a su vez, actúa como un parámetro selectivo de la microbiología del compostaje ya que no todos los microorganismos pueden soportar temperaturas termófilas. Las poblaciones de bacterias y hongos varían con la temperatura a lo largo del proceso de compostaje. Las bacterias y hongos mesófilos (crecen sobre 30 °C) son más importantes en la segunda fase mesófila (que coincide con los 30 días), mientras que las bacterias y hongos termófilos (crecen a 45 °C) son más numerosos a los 14 días, cuando la temperatura de las mezclas de compostaje es mayor (Goyal *et al.*, 2005).

1.7.1 Género *Thielavia*

El género *Thielavia* se ha denominado como teleomorfo de *Myceliophthora*. *Corynascus* fue introducido por primera vez por von Arx (1973), para dar cavidad a dos especies descritas previamente como *T. sepedonium* y *T. novoguineensis* (Lu *et al.*, 2013). Algunas especies del género *Corynascus* identificadas son: *C. heterothallicus*, *C. novoguineensis*, *C. sepedonium*, *C. sexualis*, *C. similis*, *C. thermophilus* y *C. verrucosus* (Stchigel & Sague, 2000; Brink *et al.*, 2011).



Uno de los hongos de importancia de ese grupo es el hongo Ascomiceto termófilo *T. terrestris* el cual es de gran interés ya que descompone la biomasa lignocelulósica y es una fuente de enzimas termostables (Langston *et al.*, 2012). Recientemente se reportó la secuencia del genoma de *T. terrestris* NRRL 8126 comparándose con el de *M. thermophila*. Ambos hongos se cultivaron en salvados de alfalfa, cebada o glucosa como las únicas fuentes de carbono; de esta manera, se logró reportar los niveles de expresión de diversas enzimas como: Glicosil hidrolasas (GHs), polisacárido liasas (PLs), carbohidrato esterasas, glicosil transferasas (GT) y módulos de unión a carbohidratos, en los secretomas fúngicos (Berka *et al.*, 2011).

1.8 Sistemas de expresión heterólogo

Los sistemas de expresión heterólogos se basan en la suposición de que la expresión y función de la proteína podrían ser similares entre un organismo y otro, las secuencias de la mayoría de las proteínas eucariotas están bien conservadas además de que comparten muchos principios de compartimento celular, de transporte intracelular y regulación, así como el tráfico vesicular a lo largo de la vía secretora y la transducción de señales, entre otros. Sin embargo, un organismo puede poseer ventajas sobre otro de su misma especie (Frommer & Ninnemann, 1995).

En general, los sistemas de expresión heterólogos se pueden clasificar en dos tipos: sistemas de expresión procariotas y sistemas de expresión eucariotas. Para la elección del sistema a utilizar se deben considerar factores como: la tasa de crecimiento, tipo de cultivo de células huésped, el nivel de expresión y el procesamiento postraduccional de la proteína sintetizada.

Los hongos son excelentes productores naturales de enzimas extracelulares y, por lo tanto, son candidatos excepcionales para la producción de proteínas recombinantes.

Entre los hongos que se han utilizado para expresar proteínas heterólogas se encuentran *Trichoderma reesei*, *Phytophthora infestans*, *T. atroviride*, *Phanerochaete chrysogenum*, y en especial varias especies del género *Aspergillus* como *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. chrysogenum* y *A. nidulans*, que han sido una fuente para la producción de arabinofuranosidasas, celulasas, galactosidasas, lacasas, lipasas y xilanasas (Sharma *et al.*, 2009); y otras de interés médico como interleucina humana 6, interferón-a 6 y lactoferina (Nevalainen *et al.*, 2005).

Debido a las diferentes características de las paredes celulares entre las levaduras y los hongos filamentosos, se ha visto que el proceso de transformación es fácil en levaduras (Rivera *et al.*, 2014). Recientemente, se ha reportado un nuevo sistema de transformación que solucionaría los problemas generados por la transformación de hongos filamentosos como la electroporación y la biobalística (Rivera *et al.*, 2014) que no generan transformaciones eficientes y reproducibles. Este método se realiza utilizando un generador de ondas de choque piezoeléctrico bajo el agua (Magaña-Ortiz *et al.*, 2013). Las ondas de



choque, son ondas mecánicas que resultan de la liberación repentina de energía en un espacio limitado, el generador de ondas de choque piezoeléctrico, produce ondas de choque bajo el agua, excitando un conjunto de cristales piezoeléctricos montados sobre un soporte de aluminio en forma de tazón semiesférico. Se usa agua como un medio de acoplamiento ya que su impedancia acústica es similar a la suspensión de conidiosporas. Estas ondas de choque causan un aumento transitorio de la permeabilidad de la membrana celular al formarse burbujas las cuales colapsan violentamente en el interior del líquido que rodea a las conidiosporas, el impacto de las microburbujas, producen poros transitorios en las membranas celulares que permiten la captación de macromoléculas contenidas en el líquido que las rodea. La inserción de ADN heterólogo por ondas de choque ha sido probado con éxito en *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *T. reesei*, *Chrysosporium phanerochaete*, *Fusarium oxysporum* y *A. niger* (Magaña-Ortiz *et al.*, 2013).

1.9 Antecedentes directos

1.9.1 Aislamiento e identificación taxonómica de *T. terrestris* Co3Bag1

Cervantes en el 2011, aisló la cepa Co3Bag1 a partir de composta de bagazo de caña. Esta cepa se seleccionó a partir de un conjunto de 29 cepas de hongos termófilos, por su capacidad para producir enzimas con actividad lignocelulolítica, utilizando bagazo de caña como fuente de carbono. Posteriormente, López-Olguín (2011) identificó la cepa Co3Bag1 como *T. terrestris* por análisis taxonómico de rDNA 28S e ITS. Un segundo análisis filogenético (árbol filogenético) hecho por la empresa Charles River Laboratories, Inc., generó resultados que relaciona a la cepa Co3Bag1 con el género *Chaetomium* y *Chaetomidium* de diferentes especies. A partir de estos resultados se puede ubicar a *T. terrestris* género y especie, de la familia *Chaetomimaceae* del orden de Sordoriales (Cereghino *et al.*, 2002). De acuerdo a las características de temperatura en la que fue aislada *T. terrestris* Co3Bag1 se ha denominado como un hongo termófilo capaz de crecer a más de 45 °C.

1.9.2 Secuencia parcial de una β -1,3-glucanasa de *T. terrestris*

En trabajos previos a este proyecto, Cervantes (2011) reportó que *T. terrestris* cepa Co3Bag1 presentó actividad de lacasa utilizando ABTS como sustrato. Posteriormente, en el grupo de trabajo, López (2011) purificó una lacasa de 97 kDa (Lac97) a partir del sobrenadante de cultivo de *T. terrestris* Co3Bag1, por cromatografía de intercambio aniónico. Lac97 presenta un pH y temperatura óptimos de 3.0 y 60 °C, respectivamente.



López en el 2011, secuenció parcialmente una banda de 95 kDa de un gel de poliacrilamida, el resultado fueron tres péptidos, los cuales presentaron alto porcentaje de identidad a nivel aminoacídico con exo- β -1,3-glucanasas fúngicas reportadas en las bases de datos, lo cual indica la presencia de β -glucanasas en *T. terrestris* Co3Bag1.

Actualmente, se tienen otras enzimas termoestables y con otras interesantes propiedades producidas por *T. terrestris* Co3Bag1 como una Xilanasa de 86 kDa, pH óptimo de 5.5 y temperatura óptima de 85 °C (García-Huante, 2012), Glucosidasa de 77 kDa, pH óptimo de 4.5 y temperatura óptima de 75 °C (Soto-Robles, 2014) y Lipasa de 24 kDa, pH óptimo de 6.0 y temperatura óptima de 65 °C (López-Ruiz, 2014). Sin embargo, hasta el momento, no hay reportes sobre la actividad β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1 con propiedades bioquímicas que sean aprovechadas en la industria biotecnológica como la termoestabilidad o el incremento de la actividad en presencia de algunos cofactores.



II. JUSTIFICACIÓN

Los hongos se encuentran entre los principales productores de GHs, de las cuales destacan las β -1,3-glucanasas que han demostrado aplicación en diversas industrias. En años recientes, se ha ido incrementando el interés por enzimas de hongos termófilos, los cuales se espera que produzcan enzimas termofílicas y/o termoestables.

El hongo termófilo *T. terrestris* Co3Bag1 fue seleccionado por su capacidad para crecer a 45 °C y degradar materiales lignocelulósicos. Por lo anterior, resulta interesante el estudio bioquímico y molecular de una β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1, ya que la enzima podría presentar propiedades catalíticas adecuadas para su posterior aplicación en procesos biotecnológicos.

III. HIPÓTESIS

El hongo termófilo *T. terrestris* Co3Bag1, aislado de composta de bagazo de caña, producirá y secretará por lo menos una β -1,3-glucanasa termofílica y termoestable.

La expresión heteróloga del gen codificante para la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1 en *Aspergillus niger* nos permitirá obtener la enzima activa y en cantidad suficiente para estudiar su potencial aplicación biotecnológica.

IV. OBJETIVO GENERAL

Clonar y expresar el gen codificante para la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1 y determinar el papel de la enzima en la hidrólisis de materiales ricos en β -1,3-glucanos.

Objetivos particulares

Para cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Determinar la curva de crecimiento de *T. terrestris* Co3Bag1 y la actividad enzimática de la β -1,3-glucanasa.
- Clonar el gen codificante para la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* y expresar la enzima recombinante en *A. niger* CBS 513.88.
- Purificar y caracterizar bioquímicamente la β -1,3-glucanasa silvestre de *T. terrestris* y la β -1,3-glucanasa recombinante expresada en *A. niger*.
- Determinar el papel de la β -1,3-glucanasa en la hidrólisis de materiales ricos en β -1,3-glucanos.



V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con el proyecto se plantearon las siguientes etapas:

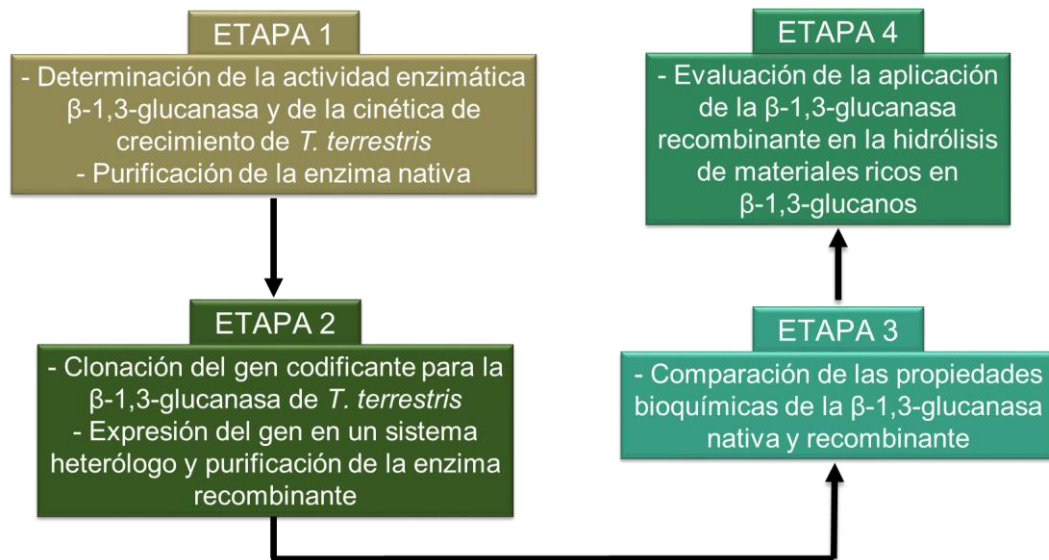


Figura 6. Estrategia experimental



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Microorganismos

Se utilizó la cepa *T. terrestris* Co3Bag1 (número de acceso CDBB-H-1938), que forma parte de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (CINVESTAV-IPN, México). Para la propagación y manipulación del DNA plasmídico se utilizó *Escherichia coli* cepa DH5 α . Para la producción de proteína recombinante se utilizó la cepa *A. niger* CBS 513.88, que fue proporcionada por el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim, CINVESTAV-Irapuato.

6.2 Medios de cultivo

T. terrestris Co3Bag1 se propagó en placas con medio de Tien y Kirk para producción de esporas (Tien y Kirk, 1988), cuya composición en (g/L) es: glucosa 10, extracto de malta 10, peptona 2, extracto de levadura 2, asparagina 1, KH₂PO₄ 2, MgSO₄•7H₂O 1, Tiamina-HCl 1 mg/L, Agar 20, el medio se esterilizó a 121 °C durante 15 min y 15 psi. Las placas se incubaron a 45 °C durante 14 días; posteriormente, se realizó una colecta de esporas y se hizo una suspensión de éstas, la cual se leyó a 650 nm y se ajustó hasta alcanzar una Absorbancia de 0.5, que equivale a 5x10⁶ esporas/mL (Tien y Kirk, 1988), la cual sirvió de inóculo.

Al inicio del proyecto, *T. terrestris* Co3Bag1 fue cultivado en los medios descritos por (Rapp, 1992), conteniendo 3 % (p/v) de glucosa como fuente de carbono, y el medio descrito por Li *et al.* (2007), el cual contenía 4 % (p/v) de salvado de trigo como fuente de carbono, para determinar la actividad β -1,3-glucanasa. Adicionalmente, el medio descrito por (Zouari-Mechichi *et al.*, 2006), también fue utilizado para determinar la actividad β -1,3-glucanasa, la composición de este último medio fue el siguiente:

Componente	(g/L)
Glucosa	10
Peptona	5
Extracto de levadura	1
Tartrato de amonio	2
KH ₂ PO ₄	1
KCl	0.5

Ajustar a pH final de 5.5 con HCl (1 M).



Los medios se esterilizaron a 121 °C durante 15 min y 15 psi. Posteriormente, a matraces de 250 mL que contenían 150 mL del medio de cultivo se les adicionó una suspensión de esporas al 10 % del volumen. Las condiciones de cultivo fueron 45 °C a 120 rpm durante 15 días.

6.3 Cinética de crecimiento y actividad $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanasa}$

Para la determinación de la actividad enzimática del medio de cultivo de *T. terrestris* Co3Bag1, se utilizó un inóculo de 1×10^6 esporas/mL homogenizadas en agua estéril, las cuales fueron obtenidas de cultivos en matraces de medio agar Tien and Kirk (1986). Cada 24 h se tomó muestra para determinar la actividad enzimática, adicionalmente, se sacrificaba un matraz por día para determinar la cinética de crecimiento, con el método de peso en seco que consistió en colocar la suspensión de biomasa en un papel filtro previamente pesado, posteriormente se secó en un horno a 90 °C hasta peso constante. Finalmente se obtuvo la masa haciendo la diferencia de los pesos.

6.4 Obtención del extracto crudo

El contenido de los matraces fue filtrado al vacío con un sistema Millipore utilizando un papel filtro tipo Whatman No. 1, de tal modo que la biomasa quedó retenida en el papel filtro y el filtrado se centrifugó a 4 °C durante 30 min a 8 500 rpm, posteriormente se tomó el sobrenadante para los análisis correspondientes.

6.5 Condiciones iniciales del ensayo enzimático de la $\beta\text{-1,3-glucanasa}$

La mezcla de reacción para 1 mL contenía: 100 μL de laminarina al 2 %, 40 μL del extracto enzimático y 860 μL del amortiguador de citratos (pH 6.0, 50 mM), para tener un volumen final de 1 mL. La mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 5 min. Posteriormente, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 10 min, y se determinó la Absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 540 nm. Una unidad de actividad de $\beta\text{-1,3-glucanasa}$ (U) se definió como la cantidad de azúcar equivalente a 1 μmol de glucosa por minuto bajo las condiciones de reacción. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

6.6 Determinación de proteína por el Método de Lowry

La proteína se determinó con 200 μL de muestra proveniente del sobrenadante de cultivo, a la cual se le adicionaron 2.5 mL de reactivo C (50 mL de **Reactivo B** y 1 mL de **Reactivo A**), se agitó y se esperaron 10



minutos. Posteriormente, se adicionaron 0.25 mL de reactivo D (Reactivo de Folin-Ciocalteu:H₂O 1:1), se agitó vigorosamente para dejar reposar 30 min. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 600 nm para determinar su Absorbancia. Para saber la concentración de proteína en la muestra se construyó una curva estándar con 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 y 2000 µg/mL de albúmina sérica bovina. Las determinaciones de proteína se hicieron por triplicado.

Reactivo A: 0.5 g de Sulfato cúprico, 1 g de Citrato de sodio y 100 mL de agua.

Reactivo B: 20 g de Carbonato de sodio, 4 g de Hidróxido de sodio y 1000 mL de agua.

6.7 Purificación de TfBgn31A silvestre de *T. terrestris*

6.7.1 Ultrafiltración del sobrenadante de cultivo

Para llevar a cabo la purificación de la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1 se partió de 4.5 L de sobrenadante de cultivo del hongo, cultivado con glucosa al 1 %, como fuente de carbono. El sobrenadante de cultivo se ultrafiltró, en lotes de aproximadamente 300 mL, en baño de hielo a 4 °C en el sistema de ultrafiltración Amicon 8400, utilizando una membrana de ultrafiltración MILLIPORE con un límite de exclusión de 10 kDa. Al sobrenadante de cultivo ultrafiltrado, con un volumen final de 30 mL, se le determinó actividad β -1,3-glucanasa y la concentración de proteína.

6.7.2 Diálisis del sobrenadante de cultivo

El sobrenadante de cultivo ultrafiltrado se dializó en 350 mL de amortiguador citratos-fosfatos 50 mM, pH 6.0 en membranas de diálisis (Spectra/Por), con un límite de exclusión de 10 kDa, durante un período de 24 h, haciendo un total de 6 recambios del amortiguador. El proceso de diálisis se llevó a cabo a 4 °C. Al sobrenadante de cultivo dializado se le determinó actividad β -1,3-glucanasa y la concentración de proteína.

6.7.3 Cromatografía de intercambio iónico

El sobrenadante de cultivo dializado se inyectó a través de una columna de intercambio aniónico UNOsphere™ Q, la cual fue equilibrada con 5 volúmenes de columna (VC) de regulador de unión A (Histidina, 50 mM, pH 6.0, KCl 30 mM, glicerol 5 % y PMSF 0.1 M), seguida de 5 VC de regulador de elución B (Histidina, 50 mM, pH 6.0, KCl 1 M, glicerol 5 % y PMSF 0.1 M) y finalmente con 5 VC de regulador de unión A. Las proteínas que se retuvieron en la columna fueron eluidas utilizando un gradiente de KCl (0-1 M) en regulador de unión B. La velocidad de flujo de elución fue de 2 mL/min. Se colectaron 122 fracciones de 1.4 mL.



6.7.4 Cromatografía de filtración en gel

Las fracciones que presentaron actividad β -1,3-glucanasa, se analizaron por SDS-PAGE al 10 %, y aquellas con mayor identidad en el patrón de proteínas se juntaron y se concentraron hasta un volumen final de 2 mL por filtración a través de un centrífugo Microsep™ Advance Centrifugal Device (MWCO 30 K) PALL®. La muestra concentrada fue aplicada a una columna de filtración en gel, que había sido equilibrada con amortiguador de ácido cítrico- Na_2HPO_4 50 mM, pH 6.0, a una velocidad de flujo de 0.05 mL/ min. El volumen de las fracciones fue de 1.1 mL. Las fracciones con actividad β -1,3-glucanasa se analizaron por SDS-PAGE al 10 % y aquellas que mostraron estar puras se juntaron para la caracterización bioquímica.

6.8 Secuenciación parcial de la β -1,3- glucanasa

Para conocer la familia a la que pertenece la proteína purificada, la banda de 129 kDa correspondiente a la β -1,3-glucanasa, se cortó y se envió a secuenciar al Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LANSE) del CINVESTAV y también al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

6.9 Análisis de la secuencia *TtBgn31A*

Después de obtener las secuencias de los péptidos generados de la secuenciación parcial se hizo genética reversa con el programa *Reverse translate* para convertirlos a nucleótidos y localizar la secuencia del gen completa en el preensamble del genoma de *T. terrestris* Co3Bag1. Posteriormente, la secuencia nucleotídica identificada se tradujo a la estructura primaria de la proteína usando el servidor de *ExPasy translate* (<https://web.expasy.org/translate/>). La estructura secundaria se determinó con el servidor de *ESPrnt* v3.0 (<http://esprnt.ibcp.fr/ESPrnt/ESPrnt/>). Finalmente, el modelo de la estructura terciaria de la proteína fue obtenida usando el servidor de *I-TASSER* (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Todos los programas y servidores usados para el análisis, se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones que en cada uno de estos servidores recomiendan para su uso.

6.10 Caracterización bioquímica de *TtBgn31A* silvestre

6.10.1 Determinación del pH óptimo

Para obtener el pH óptimo de la β -1,3-glucanasa silvestre, se utilizó el amortiguador de citrato-fosfatos (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6, 6.5 y 7), citratos (pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5), acetatos (pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0



y 5.5), fosfatos (pH 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0) con la finalidad de abarcar un intervalo amplio de valores de pH. Todos los amortiguadores tenían una concentración de 50 mM en el sistema de reacción.

Las mezclas de reacción contenían: 860 μ L del amortiguador a los valores de pH mencionados anteriormente, con 100 μ L de laminarina al 2 % y 40 μ L de la enzima pura. La mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 5 min. Posteriormente, se determinó la Absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 540 nm. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

6.10.2 Determinación de la temperatura óptima

Para obtener la temperatura óptima de la β -1,3-glucanasa silvestre, las reacciones se incubaron en un intervalo de temperaturas de 20 a 85 °C con incrementos de 5 °C. Las mezclas de reacción contenían: 860 μ L de amortiguador de citratos 50 mM, pH 6.5, con 100 μ L de laminarina al 2 % y 40 μ L de la enzima pura. La mezcla de reacción se incubó a las temperaturas mencionadas anteriormente durante 5 min. Posteriormente, se determinó la Absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 540 nm. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

6.10.3 Efecto de iones metálicos sobre la actividad β -1,3-glucanasa

Se estudió el efecto de diferentes iones metálicos, las sales utilizadas fueron CaCl_2 , CsCl , CuCl_2 , CuSO_4 , FeCl_3 , FeSO_4 , HgCl_2 , KCl , LiCl , MgSO_4 , MnCl_2 , NaCl , NiCl_2 y ZnSO_4 . La enzima purificada fue preincubada durante 5 min en presencia de los iones metálicos mencionados anteriormente a concentraciones de 1 y 5 mM a 25 °C. Posteriormente, se determinó la actividad bajo las condiciones óptimas de pH y temperatura previamente identificadas (pH 6.0 y 70 °C, respectivamente) usando la mezcla de reacción previamente descrita en las condiciones iniciales. Para cada determinación, se corrió un blanco que consistía en el sistema antes mencionado, pero sin la enzima purificada. También se corrió un control el cual no contenía el ión metálico y a este sistema se le consideró como el 100 % de actividad.

6.10.4 Estabilidad térmica

La estabilidad térmica se determinó al determinar la actividad residual de la β -1,3-glucanasa silvestre. La enzima fue expuesta a diferentes temperaturas 50, 60, 65, 70 y 80 °C y en diferentes intervalos de tiempo se tomaron alícuotas para determinar actividad β -1,3-glucanasa residual, utilizando las condiciones óptimas de actividad.



6.10.5 Estabilidad al pH

La estabilidad al pH se determinó a través de su actividad residual. La enzima fue preincubada por 3 h, en amortiguador de citratos-fosfatos en diferentes valores de pH, de 2.5 hasta 7.5; en intervalos de 0.5 unidades, después de este tiempo se tomaron alícuotas para determinar actividad β -1,3-glucanasa, utilizando las condiciones óptimas de actividad.

6.10.6 Determinación de parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos, se usaron las condiciones de ensayo enzimáticas óptimas (pH 6.0 y 70 °C), utilizando diferentes concentraciones finales de sustrato de 0.5 a 12 mg/mL de laminarina, para determinar sus respectivas velocidades de reacción. Los valores finales se usaron para analizarlos por el método de regresión no lineal por mínimos cuadrados, usando el programa OriginLab 9.5.

6.10.7 Especificidad a sustratos

Para analizar la especificidad a sustratos, las reacciones enzimáticas se hicieron en las condiciones óptimas determinadas (pH 6.0 y 70 °C), los sustratos usados fueron laminarina, gentibiosa, curdlan celobiosa, almidón, glucógeno, amilosa, maltosa, sacarosa, metil- α -D-glucopiranosido y metil- α -D-manopiranosido a una concentración final de 2 %. Los ensayos se hicieron por triplicado.

6.10.8 Análisis de los productos de hidrólisis

También se hicieron ensayos de cromatografía en capa fina (TLC), por sus siglas en inglés. La β -1,3-glucanasa silvestre purificada se incubó con 2 % laminarina y 20 mM de *p*-Nitrofenil- β -glucopiranosido (*p*NPG) en de tampón de citratos (50 mM, pH 6.5) a 40 °C. Las muestras se retiraron después de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 h de incubación, la hidrólisis se detuvo calentando las muestras en agua hirviendo durante 3 min.

Posteriormente, las muestras fueron colocadas en placas de sílica gel y fraccionadas en una mezcla de solvente, butanol:etanol:agua (50:30:20), las placas fueron rociadas con H₂SO₄ al 15 % (v/v) y reveladas calentando a 110 °C, hasta que se observaron manchas visibles. Laminarina, gentiobiosa, y glucosa, a una concentración de 0.25 %, se utilizaron como estándares.



6.11 Clonación del gen codificante para la exo- β -1,3-glucanasa del hongo *T. terrestris*

6.11.1 Vectores

Se utilizaron dos vectores: *pDrive* (QIAGEN) y *pAniger* (proporcionado por el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim, CINVESTAV-Irapuato). El vector de clonación *pDrive* se utilizó para clonar el gen codificante para la exo- β -1,3-glucanasa; mientras que el vector de expresión *pAniger* se utilizó para expresar el gen codificante para la exo- β -1,3-glucanasa en el sistema de expresión de *A. niger* CBS 513.88.

6.11.2 *pDrive*

El vector de clonación *pDrive* (Figura 7), se utilizó para la clonación del gen codificante para la exo- β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1. El vector *pDrive* tiene dos genes que proporcionan resistencia a ampicilina y kanamicina. Como resultado, sólo las células con el plásmido recombinante se propagan en el medio de selección. El vector *pDrive* contiene un sitio de clonación múltiple, así como un promotor lacZ.

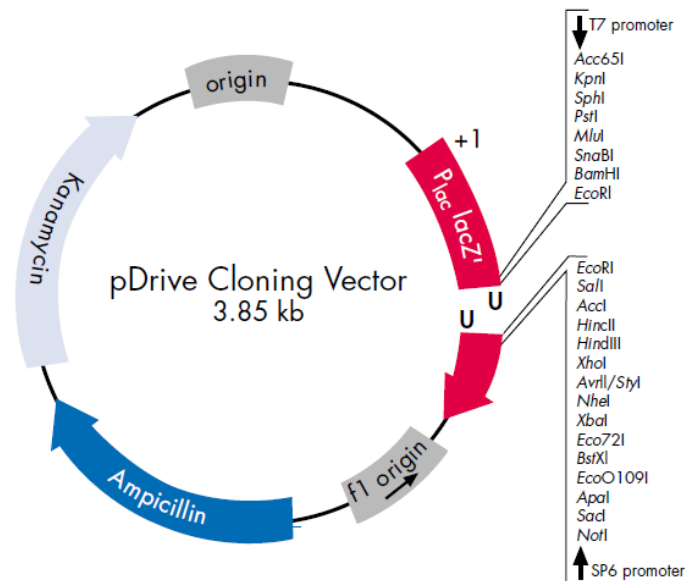


Figura 7. Vector de clonación, *pDrive*

6.11.3 *pAniger*

El vector *pAniger* (Figura 8), se utilizó para la subclonación del gen codificante para la exo- β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1. El vector *pAniger* tiene dos genes que proporcionan resistencia a ampicilina e higromicina. El vector *pAniger* contiene una secuencia de terminación de la transcripción de una amilasa de *A. niger* y una secuencia señal de una glucoamilasa de *Humicola insolens*.

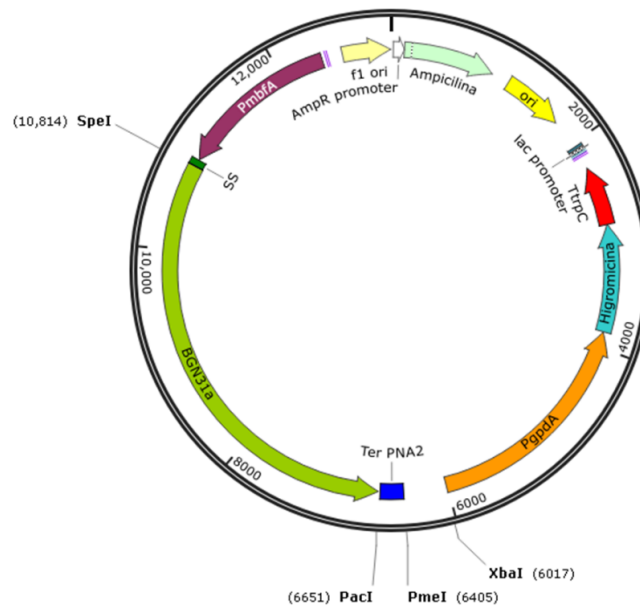


Figura 8. Vector de expresión pAniger para *A. niger*

6.11.4 Extracción de DNA total

A partir de un cultivo líquido de *T. terrestris* Co3Bag1 con las condiciones ya establecidas anteriormente, se obtuvo el micelio por filtración al vacío. Posteriormente, el micelio se trituró en un mortero en condiciones asépticas, utilizando nitrógeno líquido. La extracción del DNA total del hongo se llevó a cabo utilizando el sistema DNeasy plant Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las especificaciones del proveedor. Una vez obtenido el DNA total, se analizó por electroforesis (80 Volts) en un gel de agarosa al 1 %, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) por 5 min, y las bandas se visualizarán bajo luz ultravioleta (UV), utilizando el documentador de imágenes Doc-it LS Image Acquisition Software.

6.11.5 Diseño de oligonucleótidos

Tomando en consideración los péptidos generados de la secuenciación parcial de la banda de 129 kDa, se hizo la búsqueda del gen codificante para la β-1,3-glucanasa (*TtBgn31A*) en el genoma secuenciado y preensamblado de *T. terrestris* Co3Bag1 usando genética reversa con el servidor de *Reverse Translate* (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html). Una vez localizado el gen, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen de 4,157 nt. Para expresar la exo-β-1,3-glucanasa de *T. terrestris* en *A. niger*, se decidió amplificar el gen (4,157 nt), incluyendo los siete intrones, cada uno con una longitud entre 12 a 52 nt (23, 26, 52, 32, 12, 48 y 38 nt), respectivamente, de 5' a 3'.



6.11.6 Amplificación del gen *ttbgn31a*

Los oligonucleótidos se sintetizaron químicamente por la compañía Sigma-Aldrich y para ensayos de PCR, estos se prepararon por hidratación con agua estéril a una concentración de 1 µg/mL.

Para la amplificación del gen codificante para la exo-β-1,3-glucanasa de *T. terrestris*, se utilizaron los siguientes iniciadores diseñados y sintetizados:

FE (5'-GGACTAGTATGGAGCCTTGCAGCATCGCCGAC-3'), y

RE (5'-CCTTAATTAATACTCCCACGTAAGTTCCCACG-3'),

Los oligonucleótidos mencionados anteriormente amplifican la secuencia de 4,157 nt. Por análisis con el programa BLAST se descartó que estos iniciadores hibridaran con otras secuencias nucleotídicas del genoma de *T. terrestris*. Para la amplificación se usó *Premix Ex Taq™* Hot Start Version (Takara), en las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración final	Volumen (µL)
Agua	---	2
<i>Premix</i> (Takara)	10X	10
Sol. Q	5X	4
FE	5 µM	0.9
RE	5 µM	0.9
DNAg	20 ng/µL	2
Volumen final	---	20

El programa utilizado en el termociclador fue:

Paso	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	4 min	1
Desnaturalización	98 °C	20 s	30
Anillaje-Extensión	64-70 °C	4 min 30 s	
Extensión final	72 °C	10 min	1



6.11.7 Clonación del gen *ttbgn31a* en *pDrive*

La ligación de los productos de PCR se llevó a cabo usando el vector de clonación *pDrive* Cloning Vector (Qiagen) en un volumen total de 10 μ L de la mezcla de reacción, los componentes fueron: 1 μ L de *pDrive*, 3 μ L de amplicón, 5 μ L de Ligation Master Mix 2X y 1 μ L de H₂O, manteniendo la mezcla de ligación a 15 °C durante 20 h.

6.11.8 Transformación de células *E. coli* DH5 α

La mezcla de ligación se utilizó para transformar células *E. coli* DH5 α , quimiocompetentes. Para la transformación celular se utilizaron 50 μ L de células competentes los cuales se mezclaron con los 10 μ L de la reacción de ligación. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min, posteriormente se dio un choque térmico a 42 °C durante 2 min, después, el tubo se colocó en hielo durante 2 min. Se adicionó 250 μ L de medio LB y se incubó a 37 °C por 45 min. Finalmente se cultivó en placas con medio LB, 40 μ L de ampicilina, 40 μ L de IPTG y 40 μ L de Xgal (20 mg/mL) a 37 °C durante 16 h.

6.11.9 Extracción de la construcción *ttbgn31a/pDrive*

Se seleccionaron colonias blancas, colocando cada colonia en 3 mL de medio LB y 3 μ L de kanamicina (30 mg/mL). Los tubos se incubaron a 37 °C durante toda la noche a 120 rpm. La extracción de la construcción *TtBgn31A/pDrive*, se hizo por el método de extracción por lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001).

6.11.10 Subclonación del gen *ttbgn31a* en el vector de expresión *Aniger*

Para la subclonación del gen *ttbgn31a* en el vector de expresión para *A. niger* CBS 513.88 (*Aniger*), se extrajo DNA plasmídico a la clona con la construcción (*Aniger/gfp*) proporcionada por el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim del CINVESTAV Unidad Irapuato, con el protocolo de lisis alcalina, posteriormente se digirió con las enzimas *SpeI* (NEB) y *PacI* (Thermo SCIENTIFIC) para liberar dos fragmentos: 8911 nt y 721 nt correspondientes al vector *Aniger* y al gen *gfp* (Green Fluorescent Protein), respectivamente. Debido a que el producto de PCR correspondiente al gen *ttbgn31a* se encontró en una buena concentración y con un alto grado de pureza, de acuerdo a la electroforesis en agarosa, se digirió con las enzimas *SpeI* (NEB) y *PacI* (Thermo SCIENTIFIC). La mezcla de digestión se muestra a continuación.



Componente	Volumen (μL)
H ₂ O	4
Amortiguador Pacl	1
DNA	3
SpeI	1
Pacl	1

Posteriormente, el producto de la digestión de la construcción *Aniger/gfp* y el producto de PCR correspondiente al gen *ttbgn31a*, se colocó a 80 °C durante 20 min para inactivar las enzimas de restricción. Las dos muestras se ligaron a 15 °C durante 20 h. Los componentes fueron:

H ₂ O	Amortiguador	Producto PCR	Vector <i>Aniger/gfp</i>	T4 DNA ligasa (NEB)
0.5 μL	1 μL	6 μL	2 μL	0.5 μL

Adicionalmente, se hizo la clonación y la digestión *in silico* de todas las construcciones mencionadas con el programa SerialCloner 2.5 con la finalidad de verificar el tamaño esperado resultante.

6.11.11 Transformación de células *E. coli* DH5 α con la construcción *ttbgn31a/Aniger*

La mezcla de ligación se utilizó para transformar células *E. coli* DH5 α , quimiocompetentes. 50 μL de células competentes se mezclaron con los 10 μL de la reacción de ligación, se incubaron en hielo durante 30 min, posteriormente se dio un choque térmico a 42 °C durante 2 min, después, el tubo se colocó en hielo durante 2 min. Se adicionaron 250 μL de medio LB y el tubo se incubó a 37 °C por 45 min. Finalmente, se cultivó en placas con medio LB y 40 μL de ampicilina.

6.11.12 Extracción de la construcción *ttbgn31a/Aniger*

Se seleccionaron algunas colonias, colocando cada colonia en 3 mL de medio LB y 3 μL de ampicilina. Los tubos se incubaron a 37 °C durante toda la noche a 120 rpm. La extracción de la construcción *ttbgn31a/Aniger*, se hizo por el método de extracción por lisis alcalina.



6.12 Análisis de la secuencia *TtBgn31A*

La construcción *ttbgn31a/Aniger* se secuenció y analizó, identificando los codones de inicio y terminación de la traducción. En la proteína deducida se identificaron regiones características de la correspondiente Glicosil hidrolasa, como: posibles sitios de glicosilación, aminoácidos catalíticos y dominios de la familia.

6.13 Expresión de *TtBgn31A* en *A. niger* CBS 513.88

6.13.1 Transformación de *A. niger*

Para la transformación de *A. niger* CBS 513.88 se utilizó la metodología descrita por (Magaña-Ortiz *et al.*, 2013), que explica una nueva forma de transformación de hongos filamentosos. Se emplea un generador de ondas de choque piezoeléctrico bajo el agua.

Las conidiesporas de *A. niger* fueron obtenidas de un crecimiento en caja de 7 días; los conidios fueron colectados en medio mínimo líquido para el choque de las ondas. La composición del medio mínimo se muestra en la **Tabla 1**. La suspensión de esporas fue filtrada con una membrana de 0.6 μm .

Se utilizaron bolsas comerciales de polietileno de 1.5 x 1.5 cm con 200 μL de volumen total, el cual contenía 150 μg de la construcción *ttbgn31a/Aniger* y 1×10^5 conidiesporas de *A. niger* CBS 513.88. Las bolsas fueron expuestas a 100 pulsos en el generador de ondas de choque piezoeléctrico.

Después del tratamiento la suspensión de conidiesporas fue inoculada en medio mínimo agar con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina, para seleccionar las colonias transformantes. El cultivo fue incubado a 28 °C durante 5 días.

Tabla 1. Composición del medio mínimo

Componente	Cantidad/100 mL de medio
20X Nitratos	5 mL
Tiamina	100 μL
1000X Trazas	100 μL
Glucosa	1g
Ajustar pH a 6.2	
Agar	1.8 g

6.13.2 Detección del transgen *ttbgn31a* en las transformantes de *A. niger*

Después de seleccionar y crecer las colonias transformantes de *A. niger*, el micelio crecido de las células transformantes, se filtró y se congeló con N_2 líquido para la extracción total de ADN y amplificar el gen



correspondiente a la exo- β -1,3-glucanasa (*ttbgn31a*, 4.1 kb). Para la amplificación se usó *Premix Ex Taq™* Hot Start Version (Takara), en las condiciones siguientes:

Reactivo	Concentración final	Volumen (μ L)
Agua	---	2
<i>Premix</i> (Takara)	10X	10
Solución Q	5 X	4
FE	5 μ M	0.9
RE	5 μ M	0.9
DNAg	20 ng/ μ L	2
Volumen final	---	20

El programa utilizado en el termociclador fue:

Paso	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	4 min	1
Desnaturalización	98 °C	20 s	30
Anillaje-Extensión	64-70 °C	4 min 30 s	
Extensión final	72 °C	10 min	1

6.13.3 Detección de la actividad exo- β -1,3-glucanasa y selección de la transformante de *A. niger*

Para identificar la expresión de la exo- β -1,3-glucanasa funcional, se seleccionaron las células, se propagaron en medio mínimo-agar a 28 °C durante 7 días para la producción de esporas. Las esporas recolectadas se utilizaron a una concentración de 0.5 A, del 10 % del volumen de cultivo, leídas a 650 nm. Una unidad de Absorbancia a 650 nm es equivalente a 5×10^6 esporas/mL. Se utilizaron 150 mL de medio mínimo a 28 °C y 180 rpm, durante 10 días. Durante la cinética, se determinó la actividad exo- β -1,3-glucanasa y la concentración de proteína cada 24 h. De esta manera, se seleccionó la cepa que secretara la mayor concentración de proteína y la que tuviera mayor actividad enzimática.

6.13.4 Obtención del sobrenadante de cultivo para la purificación de *TfBgn31Ar*

Para la purificación de la enzima recombinante (*TfBgn31Ar*), 4.5 L de medio mínimo se inocularon con una suspensión de esporas al 10 % del volumen. Los matraces (30) se incubaron a 28 °C durante cuatro días a



120 rpm. Después de los cuatro días de incubación, el cultivo se centrifugó a 4 °C durante 30 min a 8,000 rpm. El sobrenadante se decantó y se centrifugó nuevamente bajo las condiciones antes mencionadas. Este extracto enzimático se utilizó para la purificación de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante *TtBgn31Ar*.

6.13.5 Condiciones iniciales del ensayo enzimático de *TtBgn31Ar*

La mezcla de reacción para 1 mL contenía: 100 μ L de laminarina al 2 %, 40 μ L del extracto enzimático y 860 μ L del amortiguador de citratos (pH 6.0, 50 mM), para tener un volumen final de 1 mL. La mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 5 min. Posteriormente, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 10 min, y se determinó la Absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 540 nm. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

6.14 Purificación de *TtBgn31Ar* expresada en *A. niger* CBS 513.88

6.14.1 Ultrafiltración del sobrenadante de cultivo

Para llevar a cabo la purificación de *TtBgn31a* expresada en *A. niger* CBS 513.88 se partió de 4.4 L de sobrenadante de cultivo. El sobrenadante de cultivo se ultrafiltró, en lotes de aproximadamente 300 mL a 4 °C en el sistema de ultrafiltración Amicon 8400, utilizando una membrana de ultrafiltración MILLIPORE con un límite de exclusión de 50 kDa. Al sobrenadante de cultivo ultrafiltrado, con un volumen final de 30 mL, se le determinó actividad exo- β -1,3-glucanasa y la concentración de proteína.

6.14.2 Diálisis del sobrenadante de cultivo

El sobrenadante de cultivo ultrafiltrado se dializó en 300 mL de amortiguador citratos 50 mM, pH 6.5 en membranas de diálisis (Spectra/Por), con un límite de exclusión de 10 kDa, durante un período de 24 h, haciendo un total de 6 recambios del amortiguador. El proceso de diálisis se llevó a cabo a 4 °C. Al sobrenadante de cultivo dializado se le determinó actividad exo- β -1,3-glucanasa y la concentración de proteína.

6.14.3 Cromatografía de intercambio iónico

El sobrenadante de cultivo dializado se inyectó a través de una columna de intercambio aniónico UNOsphere™ Q y fue equilibrada con 7 volúmenes de columna (VC) de regulador de unión A (Tris, 50 mM, pH 8.0, KCl 0.1 M, glicerol 5 % y PMSF 0.1 M), seguida de 5 VC de regulador de elución B (Tris, 50 mM, pH



8.0, KCl 0.8 M, glicerol 5 % y PMSF 0.1 M) y finalmente con 5 VC de regulador de unión A. Las proteínas que se retuvieron en la columna fueron eluidas utilizando un gradiente de KCl (0.1-0.8 M) en regulador de unión B. La velocidad de flujo de elución fue de 1 mL/min. Se colectaron 122 fracciones de 1 mL.

Las fracciones que presentaron actividad exo- β -1,3-glucanasa, se analizaron por SDS-PAGE al 10 % y aquellas que mostraron estar puras se juntaron para hacer la caracterización bioquímica.

6.14.4 Análisis de fracciones por SDS-PAGE

Las fracciones colectadas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico al 10 % (10 % SDS-PAGE). Las muestras fueron diluidas con el amortiguador de carga 2x en la relación 1:1, más 2- β -mercaptoetanol al 5 %. Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante 5 min a ebullición, para provocar la desnaturalización completa de las proteínas. Los geles corrieron en cámara electroforética con amortiguador de corrida 1x (Tris-Glicina-SDS), a 80 volts en gel concentrador y a 100 volts en gel separador. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (BioRad) al 0.05 % (p/v) preparado en una solución de metanol, agua y ácido acético (50:40:10) durante 30 min en agitación. Una vez transcurrido el tiempo de tinción, se retiró la solución y se decoloró el gel añadiendo solución de ácido acético al 10 %. Esta solución se reemplazó varias veces hasta la visualización de las bandas de proteína.

6.14.5 Zimograma para detectar actividad β -1,3-glucanasa

La actividad enzimática en gel se llevó a cabo como lo reporta Pan, Ye, & Kuć (1989), con algunas modificaciones. Las muestras de proteína se separaron en gel de poliacrilamida al 10 % copolimerizado con 0.5 % de laminarina, bajo condiciones de semidesnaturalización, las muestras de proteína se resuspendieron en tampón de muestra con SDS y sin 2- β -mercaptoetanol; posteriormente, las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 min. Después de la electroforesis, los geles se lavaron en una mezcla de Tritón X-100 al 1 % e isopropanol al 25 % en tampón de Na_2HPO_4 -ácido cítrico 50 mM (pH 6.0) durante 2 h con agitación suave, esto con el fin de retirar el SDS, los geles se equilibraron con tampón fresco durante 30 min por tres veces. Después, los geles se lavaron con agua destilada, se incubaron con tampón de Na_2HPO_4 -ácido cítrico 50 mM (pH 6.0) durante 60 minutos. Finalmente, los geles se incubaron a 50 °C durante 120 min en tampón de Na_2HPO_4 -ácido cítrico 50 mM, pH 6.0. Las bandas con actividad β -1,3-glucanasa se localizaron después de calentar el gel con una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) a baño María.



6.14.6 Análisis de glicosilación

Para determinar el grado de glicosilación de *TtBgn31A* (silvestre) y de *TtBgn31Ar* (recombinante), las muestras purificadas se desnaturalizaron con SDS al 1 % y 2- β -mercaptoetanol al 2.5 %, esta mezcla se incubó a ebullición durante 5 min. Posteriormente se hizo SDS-PAGE, al finalizar la electroforesis el gel fue sumergido en ácido tricloroacético al 10 % durante 4 h, se continuó con la fijación sumergiéndolo en una solución de isopropanol:ácido acético:agua (25:10:65) durante 12 h. transcurrido este tiempo, se adicionó ácido acético al 7.5 % a 4 °C durante 30 min. Posteriormente, se incubó en ácido peryódico al 0.2 % a 4 °C durante 1 h. Finalmente, se incubó en el reactivo de Schiff (SIGMA) a 4 °C durante 1 h. El gel se coloca en ácido acético al 7.5 % hasta la aparición de las bandas color rosa, indicativo de que la proteína se encuentra glicosilada.

El contenido de carbohidratos de las enzimas se confirmó mediante el ensayo de antrona, de acuerdo con el método descrito por Leyva et al. (2008), empleando manosa como estándar. Brevemente, se mezclaron 0.5 mL de la muestra a analizar con 1 mL de una solución de antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico concentrado. Cabe señalar que la mezcla de estas dos soluciones se llevó a cabo bajo refrigeración y previo enfriamiento de ambas soluciones a 4 °C durante 15 min. La mezcla se llevó a cabo lentamente, agregando la solución de antrona sobre las paredes del tubo y se dejó reposar 5 min en hielo. Posteriormente, se agitó en vórtex para homogenizar la mezcla, la cual adquirió un color amarillo. Inmediatamente después, la mezcla se incubó en un baño en ebullición durante 10 min. Después a este tiempo, los tubos se retiraron del baño de agua y se colocaron rápidamente en hielo. Finalmente, se determinó la Absorbancia a 640 nm de cada muestra y la concentración de carbohidratos se determinó correlacionando los resultados obtenidos con una curva de calibración de 0 a 100 mg de manosa por L.

6.15 Caracterización bioquímica de *TtBgn31Ar* (recombinante)

6.15.1 Determinación del pH óptimo

Para obtener el pH óptimo de *TtBgn31Ar*, se utilizó el amortiguador de citrato-fosfatos (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6, 6.5 y 7), citratos (pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5), acetatos (pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5), fosfatos (pH 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0) con la finalidad de abarcar un intervalo amplio de valores de pH. Todos los amortiguadores tenían una concentración de 50 mM en el sistema de reacción.

La mezcla de reacción contenía: 860 μ L del amortiguador a los valores de pH mencionados anteriormente, con 100 μ L de laminarina al 2 % y 40 μ L de la enzima pura. La mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 5 min. Posteriormente, se determinó la Absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 540 nm. Las determinaciones se hicieron por triplicado.



6.15.2 Determinación de la temperatura óptima

Para obtener la temperatura óptima de *TfBgn31Ar*, las reacciones se incubaron en un intervalo de temperaturas de 20 a 85 °C con incrementos de 5 °C. La mezcla de reacción contenía: 860 µL de amortiguador de citratos 50 mM, pH 6.5, con 100 µL de laminarina al 2 % y 40 µL de la enzima pura. La mezcla de reacción se incubó a las temperaturas mencionadas anteriormente durante 5 min. Posteriormente, se determinó la Absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 540 nm. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

6.15.3 Efecto de iones metálicos sobre la actividad *exo-β-1,3-glucanasa*

Se estudió el efecto de diferentes iones metálicos (Li^+ , Ag^+ , Cs^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+}) a diferentes concentraciones (1 y 5 mM) sobre la *TfBgn31Ar*, bajo las condiciones óptimas (65 °C y pH 6.5, respectivamente).

TfBgn31Ar fue incubada durante 5 min en presencia del ion metálico y el sistema de reacción, para determinar la actividad como se describió anteriormente. Para cada determinación, se corrió un blanco que consistía en el sistema antes mencionado, pero sin la enzima purificada. También se corrió un control el cual no contenía el ion metálico y a este sistema se le consideró como el 100 % de actividad.

6.15.4 Estabilidad térmica

La estabilidad térmica se determinó al medir la actividad residual de *TfBgn31Ar*. La enzima fue expuesta a diferentes temperaturas 50, 60, 65, 70 y 80 °C; en diferentes intervalos de tiempo se tomaron alícuotas para determinar actividad *exo-β-1,3-glucanasa* residual, utilizando las condiciones óptimas de actividad (pH 6.5 y 65 °C).

6.15.5 Estabilidad al pH

La estabilidad al pH se determinó al medir la actividad residual de *TfBgn31Ar*. Las enzimas fueron incubadas por 3 h, en amortiguador de citratos-fosfatos en diferentes valores de pH, de 2.5 hasta 7.5; en intervalos de 0.5 unidades, después de este tiempo se tomaron alícuotas para determinar actividad *exo-β-1,3-glucanasa* residual, utilizando las condiciones óptimas (pH 6.5 y 65 °C).



6.15.6 Determinación de parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos, se usaron las condiciones de ensayo enzimáticas óptimas de *TtBgn31Ar* (pH 6.5 y 65 °C), utilizando diferentes concentraciones finales de sustrato de 0.25 a 20 mg/mL de laminarina, para determinar sus respectivas velocidades de reacción. Los valores finales se usaron para analizarlos por el método de regresión no lineal por mínimos cuadrados, usando el programa OriginLab 9.5.

6.15.7 Especificidad a sustratos

Para analizar la especificidad a sustratos, las reacciones enzimáticas se hicieron en las condiciones óptimas determinadas (pH 6.5 y 65 °C), los sustratos usados fueron laminarina, gentibiosa, curdlan celobiosa, almidón, glucógeno, amilosa, maltosa, sacarosa, metil- α -D-glucopiranosido y metil- α -D-manopiranosido a una concentración final de 2 %. Los ensayos se hicieron por triplicado.

6.15.8 Análisis de los productos de hidrólisis

Se hicieron ensayos de cromatografía en capa fina (TLC), por sus siglas en inglés. La *TtBgn31Ar* purificadas se incubaron con 2 % laminarina y 20 mM de *p*-Nitrofenil- β -glucopiranosido (*p*NPG) en 50 mM de tampón de citratos (pH 6.5, 40 °C). Las muestras se retiraron después de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 h de incubación, la hidrólisis se detuvo calentando las muestras en agua hirviendo durante 3 min.

Las muestras fueron colocadas en placas de sílica gel y fraccionadas en una mezcla de solvente, butanol:etanol:agua (50:30:20), las placas fueron rociadas con H₂SO₄ al 15 % (v/v) y reveladas calentando a 110 °C, hasta que se observaron manchas visibles. Glucosa y *p*NPG, a una concentración de 0.25 %, se utilizaron como estándares.

6.16 Tratamiento de residuos ricos en β -1,3-glucanos

6.16.1 Hidrólisis enzimática de salvados

Los salvados son residuos que se generan después de procesar los granos de los cereales, estos pueden ser aprovechados para su uso como piensos alimenticios. Uno de los componentes principales de los salvados, son los β -glucanos con enlaces β -1,3 y β -1,4. Por esta razón, se tuvo interés por analizar el efecto enzimático sobre estos residuos.

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en alícuotas de 1.5 mL en tubos Eppendorf. La mezcla consistió en 500 μ L de amortiguador de Citratos 50 mM, pH 6.5, 2 mg de salvado de avena o trigo y 10 U de *TtBgn31Ar*.



La mezcla de reacción se incubó a 50 °C y se retiraron después de 24 y 48 h de la incubación, la hidrólisis sobre los salvados se detuvo calentando las muestras en agua hirviendo durante 3 min. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en una estufa de secado a 40 °C durante 24 h.

Finalmente, las muestras fueron sombreadas con oro (~120 nm) y almacenadas en campana de cristal hasta su análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en el equipo JEOL JSM-6510LV en la Unidad de Microscopía Electrónica del CINVESTAV-IPN, siguiendo el protocolo para muestras biológicas utilizadas en la unidad de microscopía.

6.16.2 Ensayo de confrontación de los hongos

Los ensayos de confrontación de la transformante de *A. niger* productora de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante y del fitopatógeno *Fusarium* sp. donado por el Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, se llevaron a cabo en cajas Petri con medio mínimo, descrito en la sección "Medios de cultivo", el cual contenía 1 % (p/v) de glucosa. Discos de aproximadamente 0.6 cm de los respectivos hongos, fueron cortados de la periferia de un cultivo en placa de cinco días y colocados en lados opuestos de una placa fresca con medio mínimo (a una distancia aproximada de 15 mm del borde). Las placas se incubaron a 28 °C revisando diariamente hasta que se observó interacción entre los hongos. En el tratamiento control se colocó al aislado de *Fusarium* sp. con *A. niger* sin transformar en las mismas condiciones antes mencionadas.



VII. RESULTADOS

7.1 Cinética de crecimiento y actividad β -1,3-glucanasa

Se evaluó la capacidad de *T. terrestris* Co3Bag1 para exhibir actividad β -1,3-glucanasa, mediante el cultivo del hongo en tres diferentes medios, que contenían 1 % de glucosa, 3 % de glucosa o 4 % de salvado de trigo como fuente de carbono, a 45 °C durante 15 días. Se detectó actividad de β -1,3-glucanasa a lo largo de la fermentación. En el cultivo con 1 % de glucosa, se alcanzó la mayor actividad (0.78 U/mL) después de seis días de crecimiento (**Fig. 9a**). En este día comenzó la fase estacionaria de *T. terrestris* Co3Bag1 y la concentración de la fuente de carbono cayó a un nivel bajo (**Fig. 9a**). Por otro lado, las actividades de la β -1,3-glucanasa más altas observadas para los cultivos con 3 % de glucosa y 4 % de salvado de trigo fueron 0.14 y 0.80 U/mL, respectivamente, después de seis días de crecimiento en ambos casos (**Fig. 9b, 9c**).

Debido a que la actividad de β -1,3-glucanasa observada cuando *T. terrestris* Co3Bag1 se cultivó en presencia de 1 % de glucosa o de 4 % de salvado de trigo eran similares, decidimos utilizar un 1 % de glucosa como fuente de carbono para la producción de la enzima en este estudio, ya que un 1 % de glucosa no interferiría con el ensayo de cuantificación de proteínas y con la purificación de la enzima.

Al determinar la actividad β -1,3-glucanasa del cultivo de *T. terrestris* Co3Bag1 con 1 % de glucosa como fuente de carbono, se comenzó a detectar actividad enzimática a partir del día dos. El mayor punto de actividad se registró al sexto día con un valor de 0.78 U/mL, a partir de este día la actividad comenzó a disminuir gradualmente hasta el décimo primer día con un valor de 0.04 U/mL. Además, se identificó un segundo incremento de la actividad al final de la cinética con un valor de 0.16 U/mL **Figura 9a**.

También se graficaron los valores obtenidos de los azúcares reductores. La glucosa del medio de cultivo comenzó con 10 g/L, disminuyendo gradualmente hasta 0.97 g/L al décimo día.

Con respecto a la cinética de crecimiento, se observó la fase exponencial de crecimiento desde el primer hasta el sexto día, observándose que la fase estacionaria comenzó desde ese punto, teniendo una biomasa de 5.01 g/L, esta fase estacionaria se mantiene hasta el décimo primer día.

A partir de los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento de *T. terrestris* Co3Bag1, y de la actividad β -1,3-glucanasa observada durante la misma con glucosa al 1 % como fuente de carbono, se decidió detener los cultivos en el sexto día de la fermentación y utilizar el sobrenadante de cultivo para purificar por lo menos una enzima del hongo *T. terrestris* Co3Bag1 con actividad β -1,3-glucanasa.

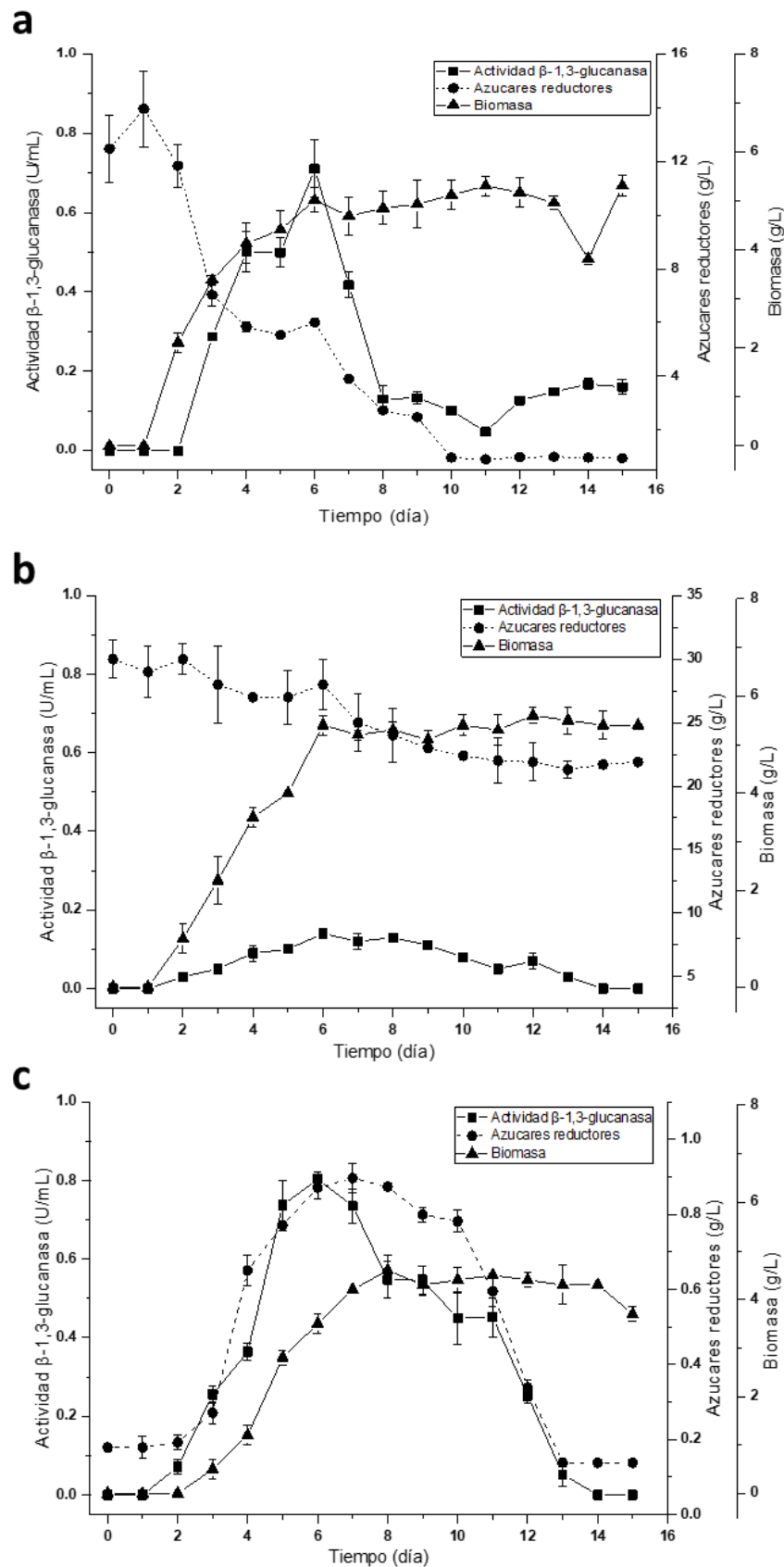


Figura 9. Fermentaciones de *T. terrestris* Co3Bag1 con diferentes fuentes de carbono Crecimiento (▲), actividad β-1,3-glucanasa (■), y azúcares reductores en el medio de cultivo (línea punteada) de *T. terrestris* Co3Bag1. El crecimiento fue monitoreado por peso seco, la actividad β-1,3-glucanasa y azúcares reductores por el método DNS. **a** Fermentación con 1 % (p/v) de glucosa; **b** Fermentación con 3 % (p/v) de glucosa; y **c** Fermentación con 4 % (p/v) de salvado de trigo, como fuentes de carbono



7.2 Purificación de la β -1,3-glucanasa silvestre

La etapa de purificación es muy importante para el estudio de una enzima, ya que de este modo es posible conocer sus propiedades catalíticas, y la cromatografía de intercambio aniónico es una de las herramientas más utilizadas para este propósito. Un punto muy importante para una purificación exitosa es tener suficiente cantidad de proteína, ya que las diferentes etapas de purificación merman el rendimiento. Los resultados de la purificación de la β -1,3-glucanasa se muestran a continuación.

La β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1 se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico, a partir del sobrenadante de cultivo del hongo *T. terrestris* Co3Ba1 cultivado en el medio reportado por Mechichi y colaboradores (2006) a 45 °C con agitación a 120 rpm. Después de 6 días de cultivo, se recuperó el sobrenadante de cultivo; mismo que posteriormente fue concentrado por ultrafiltración y dializado en el regulador a utilizar en la cromatografía de intercambio aniónico. En cada etapa del proceso, se determinó concentración de proteína y la actividad β -1,3-glucanasa. Durante la cromatografía se obtuvieron 122 fracciones de 1.4 mL cada una (**Figura 10**), a las cuales se les determinó cantidad de proteína mediante Absorbancia a 280 nm, y se determinó la actividad β -1,3-glucanasa. Las fracciones con mayor actividad enzimática se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10 %. Aquellas fracciones que presentaron un patrón similar de proteínas se reunieron, y posteriormente se determinó la concentración de proteína y la actividad β -1,3-glucanasa.

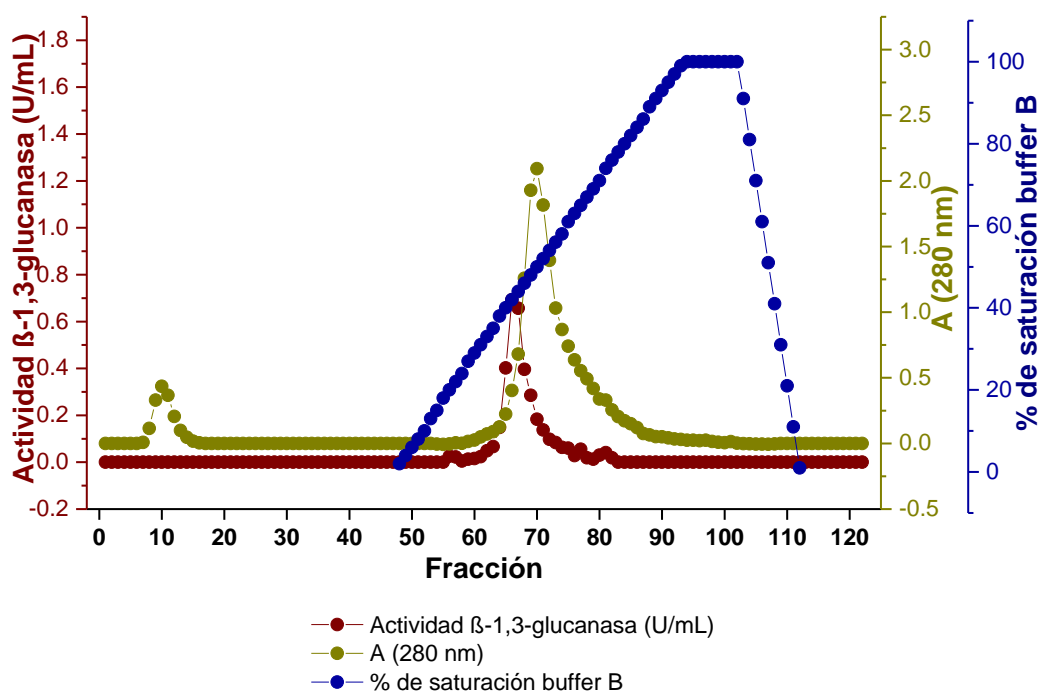


Figura 10. Perfil de separación de proteínas y actividad β -1,3-glucanasa
Se utilizó la columna de intercambio aniónico UNOsphere™ Q.



En el cromatograma de la **Figura 10** se puede apreciar que las fracciones 64 a 71 presentan la máxima actividad β -1,3-glucanasa, obteniéndose un máximo de 0.69 U/mL en la fracción 66.

7.3 Análisis de pureza y estimación de peso molecular de la enzima silvestre

Con la finalidad de estimar el grado de pureza en las fracciones obtenidas durante el paso de purificación utilizando la columna de intercambio aniónico UNOsphere™ Q; así como, el peso molecular de la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1, se procedió a realizar un análisis por SDS-PAGE al 10 %. Los datos obtenidos por el análisis SDS-PAGE (**Figura 11**) mostraron que no se obtuvo la proteína pura, pero sí una banda que sobresalía sobre las demás con una masa teórica calculada de ~129 kDa.

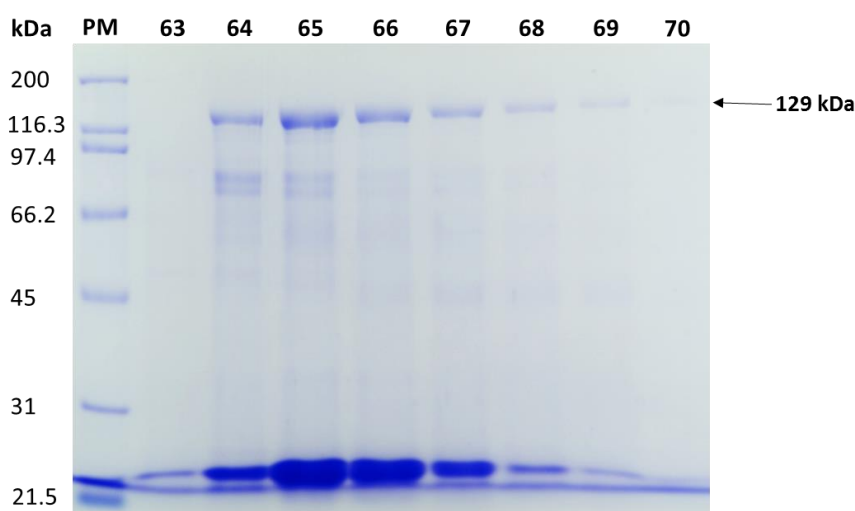


Figura 11. Análisis por SDS-PAGE de la etapa de purificación en un gel de poliacrilamida al 10 %
Se utilizó la columna de intercambio aniónico UNOsphere™ Q. (PM) Marcador de peso molecular. (64-70) Fracciones con actividad β -1,3-glucanasa.

Se juntaron las fracciones que presentaban la mayor actividad y se concentraron hasta un volumen final de 2 mL por filtración a través de un centrífugo Microsep™ Advance Centrifugal Device (MWCO 30 K) PALL®. La muestra concentrada fue aplicada a una columna de filtración en gel, que había sido equilibrada con el amortiguador de ácido cítrico- Na_2HPO_4 , 50 mM pH 6.0, a una velocidad de flujo de 0.05 mL/min. El volumen de las fracciones fue de 1.1 mL. Las fracciones con actividad de β -1,3-glucanasa se analizaron por SDS-PAGE al 10 % y aquellas que mostraron mayor grado de pureza se reunieron para hacer los análisis correspondientes de temperatura y pH óptimo, así como la estabilidad térmica.

Durante la cromatografía se obtuvieron 94 fracciones (**Figura 12**) a las cuales se les determinó proteína mediante Absorbancia a 280 nm y se determinó la actividad β -1,3-glucanasa en los puntos donde se observaba proteína. De acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación de proteína y actividad, se hicieron geles de poliacrilamida, aquellas fracciones que presentaron un patrón similar de bandeo se



juntaron, se determinó la concentración de proteína y la actividad enzimática. Se observó que las fracciones 19 a 32 presentaban actividad β -1,3-glucanasa.

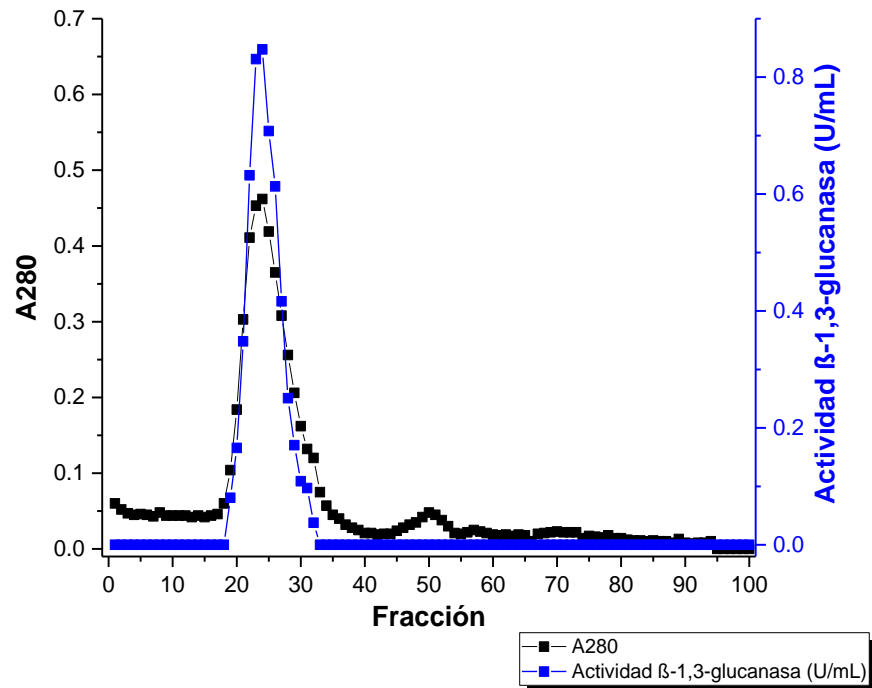


Figura 12. Cromatograma utilizando la columna de filtración en gel

Con la finalidad de estimar el grado de pureza en las fracciones obtenidas durante la purificación; así como, el peso molecular de la glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1, se procedió a realizar un análisis por SDS-PAGE al 10 %. Los datos obtenidos por el análisis SDS-PAGE (Figura 13) mostrando un alto grado de pureza las fracciones 19-26.

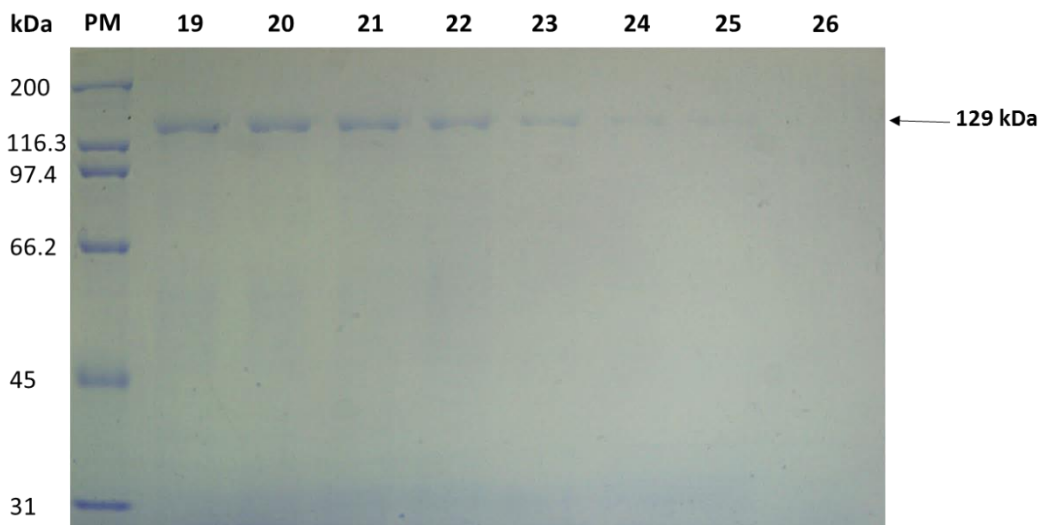


Figura 13. Análisis por SDS-PAGE de fracciones con actividad β -1,3-glucanasa

Se utilizó la columna de filtración en gel. PM) Marcador de peso molecular. 9-26) Fracciones con la β -1,3-glucanasa purificada.



En la **Tabla 2** se muestra un resumen de las etapas de purificación de la β -1,3-glucanasa silvestre, en donde se puede observar que a pesar de las diferentes etapas a las que fue sometida la proteína, ésta se mantuvo catalíticamente activa; además, de acuerdo a lo esperado, se incrementó la actividad específica de la enzima, ya que durante la purificación se van eliminando proteínas que no son de nuestro interés y es por esta razón la actividad específica aumenta; mientras que el rendimiento disminuye debido a las pérdidas de material durante el proceso de purificación.

Tabla 2. Etapas de purificación de la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1

Paso	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	138.02	1641.23	0.08	100.00	1.00
Ultrafiltración (50 kDa)	80.12	120.40	0.67	58.05	8.38
Cromatografía de intercambio aniónico	10.51	10.10	1.04	7.61	13.00
Cromatografía de filtración en gel	0.84	0.14	6.00	0.61	75.00

7.4 Análisis de la secuenciación parcial de la exo- β -1,3-glucanasa

Con la finalidad de identificar la enzima purificada, y de esta forma tratar de establecer a que familia de Glicosil hidrolasas pertenece, nos propusimos determinar la secuencia parcial de aminoácidos por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). La proteína se separó en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % y la banda de 129 kDa se cortó y se envió a secuenciar al Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LANSE) del CINVESTAV y la Unidad de Proteómica del INMEGEN, México, como se indica en la sección de Materiales y métodos. Los resultados de la secuenciación de la banda correspondiente al peso de 129 kDa obtenidos en el LANSE fueron 10 péptidos con 100 % de identidad con respecto a una secuencia aminoacídica anotada en las bases de datos como una secuencia putativa de la familia GH31 de *T. terrestris* NRRL 8126. La secuencia de referencia y los péptidos secuenciados se muestran en la **Figura 14**.



Muestra	Proteína	Accesión	% Cobertura Total	% Cobertura ≥ 50%	% Cobertura ≥ 95%	Unused Score
GLUCANASA	Glycoside hydrolase family 31 protein OS=Thielavia terrestris (strain ATCC 38088 / NRRL 8126) GN=THITE_21220 75 PE=3 SV=1	tr G2RFM7 G2RFM7_THIT E	17.15	9.46	7.53	18.66

Glycoside hydrolase family 31 protein OS=Thielavia terrestris (strain ATCC 38088 / NRRL 8126) GN=THITE_2122075 PE=3 SV=1

MEPAASPTRAARPLAVKHKGRFPGSRPFPSRDNTNTYTSTSSAEITSYPAWPPRRSVVGIRGCTGLVQSAAPKS
KSPPLWRSSSTATLVQSVLILVGGIATAFAEGTGILDVTLDAEEQDVQLQEGPDAIYIETPKLDQVGRAPQH
SGTWILGLGIYIPLGLFLLFLFALTYSFKRRIIPRSKATGSSRFIQSAIAMFSFTLLLWITGFCRAASGD
YDHSAVSRTSWQPNQTVAPAPVFTIPASATLGRNVLPNIIDPEAVDPQTVCPGYKASNIDETEGGFTAELDLA
GPACNVYNDIEHLSLSVDFQADDRVHVDIRPRFISPENESWFLLEPELVPRPPRGARYQQSDSALIVSWSND
PTFSFSVKRRETNDTLFSTEGKVLVYEDQFVEFASALPERY~~YNLYGLGEVIHGFR~~LGDNLTR~~TLFAADVGD~~TID
~~ANLYGSHPIYLD~~TRFYVADDSGELTYVQNTTDDKANKYVSYTHGVFLR~~NAHAQEILLRPSSVTWR~~TLGGSIDLY
FYSGPKAQDVIRAYQQTAVGLPAMQQYWSLGFHQCRWGYKSWAEVEDVDNFARFEIPLIETIWTDDIDYMKQYR
~~DFENDPVR~~FYTEGSKFLAKLHANHQHYVPIIDSAIYAPNPNPDDAYPPYDRGVEAKAFMLNPDGSIYYGAV
WPGYTVFPDVGAVLDGGGAIDWWIDEILRYSKKVAFDGIWIDMSEVSSFCVSGCTGNLTLNPAHPPELPG
EPGNLVLQYPEGFNSTNSSEAMSASSASRQEEAATATTQAPTSTSYRTPPTSGARNVNWPPYVINNSGELA
GHAVSPNATHHGGYLEYDVHNLFGHMLNATYQALLKVHEGK~~RPFIIGR~~STFAGSGKWAGHWGGDNAALWAYM
YFSIPQALSFSIFGIPMFGVDTCCGFAGNTDYELCSR~~WMQLSAFFPFYR~~NHNILGAISQEPYVWSSVAEATKTA
MRIR~~YSLLPYMYTLMAR~~ASLEGSTVMRALAWEPFAEPWLADADRQFMLGSAIMVTPCLEQGASTVGVVFPFVG
DGTVWYDWTLLAAVKGVPEPQNVITIDAPLGHIPLYLRGGNVVPTQEPGMTTTESR~~RNPWGLIVALDR~~DGSAEG
ELYLDDGESLEPDAVTWVHFSATNNSVAARPEGNYVDNRLANVTVLGLPEAPSM~~VWLNGLNLLATS~~SRWSYSAD
SAVLSVQGLHDLSPGAWAAAWELTWE

R. ~~WMQLSAFFPFYR~~. N
R. ~~YSLLPYMYTLMAR~~. A
R. ~~YNLYGLGEVIHGFR~~. L
R. ~~ALAWEPFAEPWLADADR~~. Q
R. ~~NAHAQEILLRPSSVTWR~~. T
K. ~~RPFIIGR~~. S
R. ~~VHVDIRPR~~. F
R. ~~NPWGLIVALDR~~. D
R. ~~RNPWGLIVALDR~~. D
K. ~~QYRDFENDPVR~~. F

Figura 14. Péptidos generados de la secuenciación en LANSE

Los resultados mostraron que los péptidos secuenciados, mostraron tener un alto porcentaje de identidad con una secuencia anotada de la familia GH31 de *T. terrestris* NRRL8126

Por otro lado, los resultados generados por el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) de la secuenciación de la banda de 129 kDa fueron varios péptidos con alto porcentaje de identidad con respecto a una secuencia aminoacídica anotada en las bases de datos como una secuencia putativa de la familia GH31 de *T. terrestris* NRRL8126, y diversas más, con menos porcentaje de identidad con la misma secuencia. La secuencia de referencia y los péptidos secuenciados se muestran en la siguiente imagen Figura 15.



ID Investigador	ID Unidad	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species	Peptidos Mayor a 95
Bgl	MS-2015-005-001	36.83	36.83	44.9	tr G2RFM7 G2RFM7_THITE	Glycoside hydrolase family 31 protein OS=Thielavia terrestris (strain ATCC 38088 / NRRL 8126) GN=THITE_2122075 PE=3 SV=1	THITE	18
		1.39	14.73	38.3	tr G2Q431 G2Q431_THIHA	Glycoside hydrolase family 31 protein OS=Thielavia heterothallica (strain ATCC 42464 / BCRC 31852 / DSM 1799) GN=MY CTH_2087807 PE=3 SV=1	THIHA	7
		0.96	0.96	9.3	tr G2QXM1 G2QXM1_THITE	Glycosyltransferase family 2 protein OS=Thielavia terrestris (strain ATCC 38088 / NRRL 8126) GN=THITE_2106408 PE=4 SV=1	THITE	0

Proteins in Group					Peptides in Group									
N	Unused	Total	Accession #	Name	Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Prec MW	z		
1	36.83	36.83	tr G2RFM7 ...	Glycoside hydr	2.00	99	ALAVEFPAE PVLADADR			-0.0585	1956.8784	1		
2	1.39	14.73	tr G2Q431 ...	Glycoside hydr	2.00	99	FEIPLLETIVTDIDYHK			-0.0867	2012.8938	1		
					2.00	99	GGVVPVTPQEPGMITTESR	Asn->Ser@3		-0.0356	1832.8218	1		
					2.00	99	LHANHQHVPIIDSAIYAPNPEN...	Deamidated(N)@20 Asp->Asn@25		0.0619	3801.8430	1		
					2.00	99	NAHAQEILLRPSVVTWR			-0.0679	1976.9865	1		
					2.00	99	NHNILGAIISQEPYVVSVAEATK			-0.0883	2513.1667	1		
					2.00	99	NFWGLIVALDR			0.0248	1252.7175	1		
					2.00	99	QSDSALIVSWSNDPTFSVVK		cleaved Q...	-0.0863	2314.0254	1		
					2.00	99	RNFWGLIVALDR		missed R-N...	0.0181	1408.8120	1		
					2.00	99	SWAEVEDVDVDFAR	Arg->Lys@14		0.0239	1607.7706	1		
					2.00	99	TLFAADVGTIDANLYGSHPIYL...			0.0496	2837.4368	1		
					2.00	99	VLVYEDQVVEFASALPER	Val->Leu@9		-0.0372	2125.0359	1		
					2.00	99	...	Deamidated(N)@6	cleaved M...	0.0233	4343.7430	1		

Protein Sequence Coverage

```

MEPAASPTRAARPLAVKHKGRFPGSRFPFPRDNTYTSSTSSAEITSYPAWPPRRSVVGIRGCTGLVQSAAPKSKSPPLMRSSTATLVQSVLILVGGIATFAEGTGILDVTLDAEEQDVQLQEGPD
AYIGEPTKLDQVGRAPQHSQGTWILGLGIYIPLGLFLLFLFALTYSFKRRSRIPRSKATGSSRFIQSAIAMPFSFTLLLWITGFCRAASGDYDHSVRSRTSQPNQTVAPVPVFTIPASATLGRMVLDP
NIIDPEAVDPQIVCPGKYKASNIIDETEGGFTAELDLGAPACNVYGNIDIEHLSLVDFQADDVHVVDIRPRISPENESWFLLEVLVPRPRGARYQSDSALIVSWSNDPTFSVVKRRETNDFLST
EGKVLVYEDQVVEFASALPERNYLGLGEVINGFRIGDNLTRTLFAADVGTIDANLYGSHPIYLTRVYFVADDSGELTYVQNTDKANEYVSYTHGVFLRNHAHAQEILLRPSVVTWRILGGSIDLYF
YSGPKAQDVIRAYQQTAVGLPAMQYUSLGFHQCRWGYKSWAEVEDVDVDFARFIEIPLIETIWTIDIDYHKQYRDFENDPVRFGYTEGSKFLAKLHANHQHVPIIDSAIYAPNPENDDAIPPYDRGVE
AKAFMLNPDGSIYGAUVPGYTVFPDHWGAVLDGGGAIIDWIDEILRYSKIVAFDGIWIDNSVSSFCVSGSCGTGNLTLNPAHPFFELPCEPGLNLVQYEPGFNSINSSEAMSSASSRQEAATATT
QAPTSTSYVRRTPPTS GARMNWPPVYVINSMGE LAGHAVSPNATHHGGYLEYDVHNLFGHMLINATYQALLKVHEGKRPFIIGRSTFAGSGRWAGHWGDNALWAMVYVFSIPQALSFSTFGIPHFV
DTCGFAGNTDYLCSHWQLSAFFPFYRNHNLGAIISQEPYVVSVAEATKTAHRIRYSLPLMYTLHARASLEGSTVHRALAWEPFAEPWLAADADRQFHLGSAIHVTPCLEQAGSTVGVVFPVGDG
TVWYDWTTLAAVKGVEPGQVNTIDAPLGHIPLYLFGGVVVPVTPQEPGMITTESRRNPWGLIVALDRDGSAGELELYLDDGSELEPDAVTWVHFSATINNSVAARPEGVTVDTNRLANVTVLGLPEAPSIVHW
LNGNLLATSRNYSYASDAVLSVQGLHDLSPEGAWAAAWELTWE
  
```

Figura 15. Péptidos generados de la secuenciación en INMEGEN

Los resultados mostraron que los péptidos secuenciados tienen un alto porcentaje de identidad con una secuencia anotada de la familia GH31 de *T. terrestris* NRRL 8126.

Debido a la identidad de los péptidos obtenidos en la secuenciación, a la proteína se le llamó *TtBgn31A*. Esos péptidos se analizaron con el programa *Reverse Translate* para convertirlos a nucleótidos y localizar la secuencia del gen completa en el genoma de *T. terrestris* Co3Bag1. La secuencia del gen *TtBgn31A* (4157 pb) de la β-1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1, se muestra en la **Figura 16**.



ATGGAGCCTGCAGCATCGCCGACTCAAGCCTCCCGACCTTTAGCGGTCAAGGATGAGGGC
CGGTTCCCCGGAACGGGACCGTTTCCAGCCGGGACACGAACACAAACAAAGTGAAGC
TCGGCCGAGTTAACTTCATACCCCGCATGGCCACCTCGCCGATCCCGTGTGCGGGATCCCG
GGTTGTACCGGTCTGTAAAGTGGGACAGCTCGGCTCCATAAGGTATGCAGAGGTGCATAT
CTGCGCACGCGACCGTTGAACGGGCCGAATCCCCTCATCTCCTACACCGTGTCTACCCG
CGAGGGGGCTTGCCTGATTGTTCCCGCCTGTGAGATTGATCCACCGTTTCCA
AGTCCAAGTCTCCGCGCCCTTATGGGCTCCTCATCAACGGCCATCCTCGTTCAGTCCG
TGTTGATATTAGTCGGTGGCATCGGCACAGCCTTCGCGGAAGGAACCGGCATTCTTGACG
TCACTTTGGACCGGAGAAACGGGGCGTGCAGTGCAGGAAGGGCCCGACGCATATGTCC
AGGGACCAGCAAAGCTCGGTGAGGTTGGCCAAGCACCGCAGCACTCCGGCCATGGATT
TGGGGCTAGGAGTATATATCCCGCTCGGCCTCTTCTTTTGTGTTCTCTTCGCTCTCA
CATACTCGTTCAAGCGGGTTCAGGAATACCAAGGTCAAAGCTCCGGGATTCTCCAGGT
TCACACAATCTGCCATCGCAATGTTCTCCTTAACGTTGCTATTGTGTTTACTGGGTTCT
GTCTCAGGGCCGTTTCAAGTACTACGATCATTCTGTCTCGCGGACATCGTGGCAGC
AGAATCAGACTGTTGCCCGCCCGCTTACCATTCCAGCTTCTGCCACCTTGGGCG
GGAACTCTTGCACCAATCATCGATCCCAAAGCAGTGCACCCCGAGCTGTGTGCCCGG
GTACAAAGGCTCCAAACATCGACGAGACCGAGGGTGGCTTCAGGGCGGAATGGACCTCG
CTGGACCCCGATGCAACGCTTATGGAAACGACATTGAGCACCTTTCTCTGTCTGTGACT
TCCAGGCCGATGATCGTGTCCATGTGATATCCGGCCCGTTTTCATCAGCCCGGAAAACG
AGAGCTGGTTCCCTCCTCCGGAGGCGCTCGTCCCGCGGCTCCTCGCGGTGATCGGTATC
GGCAATCCGACTCCGCTTGATTGTGCTGCTGGTGAACGACCCCTACCTTCTCCTTCTCCG
TCAAGCGCAGAGACGAATGCACTCTTCTCGACGGAAGGGAAGGTTCTCGTTTATG
AGGACCAATTTATCGAGTTCGCGTCTGCGCTCCCGAGCGCTACAATCTGTACGGCCCTCG
CGGAAGTCAATCCATGGCTTCCGTTTGGCGATACTTGAAGTGTGAGTGTGGTGGTTTTC
CGTTGCCGACCGGCGACGCTCGTGTATAGATCTCAGGAACCTTGTTCGCTGATCGGTATC
GGGACACTATCGACGCAAACTCTACGGCAGCCATCCGATCTATCTTGACACGAGATAT
TTCGTTGCTGGCGACTCGGGTGAAGTACCTATGTCAGAACACGACGGACAAGGCGAAC
AAGTACTGTGCTACACGCATGGCGTGTTCCTCCGGAACGCCATGCGCAGGAGATCCTC
TTGGCACCGTCCAGCGTCAAGTGGAGGACGCTGGGCGGAGCATCGACTTGTACTTCTAC
AGCGGTTCCGAAGGCACAGGACGTCATCCGAGCCTACCAGCAGACCGCAGTGGGATGCCC
GCCATGCAGCAGTACTGGTCCCTTGGCTTCCACCAGTGCCTGGGGATACAAGAGTGG
GCAGAGGTGGAGGACGCTCGTCCGCAATTTCCGCAAGTTCGAGATACCACTGGAGACGATC
TGGAGTGTGCTGACTCTGTTTGAAGAGGAACAGATAGTGGAAATATCGGTAGTGTCTAA
CTTACGGCAGCCGACATCGATTACATGAAGCAGTACCAGATTTTGAAGATGATCCGCTG
CGTTCCGATACTCCGAAGGCTCCAAGTTTCTCGCAAAGCTTATGCCAACCATCGCAT
TACGTTCCGATCATCGACTCCGCCATCTATGCCCCCAACCCTGAGAACCAGGACGATGCC
TACCCCTCCATATGATCGCGGAGTTGAGGCCAAGGCTTTTATGTTGAATCCAGATGGTTC
ATATACTACGGAGCCGTTTGGCTGGCTATACAGGTAGATATTGGTGCATGAGGCTGC
TTGAACTCCGAGCTAACATGCGCAGTATTCGCCGACTGGGTGGGAGCTGTGCTCAATG
CGCGCGGGCGATCGACTGGTGGATTGACGAGATATCGAGGTATTGGAAGATGTGGCTG
TAAGTCAATGTCTCGCCAGCTTGTGTTTGCAGGCTCAGGGGCTCTGCACACAGCTTCT
GGGTCTGAGAAGTTGCGGTTGAGCGTCAAGGGCTGACTTGAACAGTTTACGGGATATGG
ATCGACATGTCGAGGTAAGGACGAGATCTATCCGTTGTCACGATTGATTGTGAGTGT
GACTGGCTCACGTTTCTGCTGTTTTCGCTCGGAAGCTGTGTCACGGGCAACTTGCAGCTGA
ACCCAGCCACCCGCTTTTGGCTACCCGGAGAGCCGGGCAATCTGGTGTGCAATACC
CGGAGGCTTCAACTCTACAAACTCGTCCGAAGCGATGTCGGCCTCGTCTGATCGCGC
AGCAGGAGGCGAGCAGCAACTACGACGGCCCGACCTCGACGCTTATTACCACCA
CGCCAACGTCGGGAGCGAGGAACGTAAGTCCCGCCTTACGTGATTAATACTTCAACG
GCGAGCTGCGAGGGCATGCGGTGAGCCCAATGTACGCACCATGGCGGCTACCTTGAGT
ACGACGTGCACAACCTGTTGCGCCATATGATCTCAACGCCAGTACCAAGCCCTGTGTA
AGGTGCACGAGGGCAAGCGCCCTTTCATCATCGGACGCGACCAATTCCGCGGCTCCGGGA
AATGGGCAGGGCACTGGGGAGGCGACAACGCGCCCTTTGGGCGTACATGTACTTACGCA
TCCCGCAGGCTTGTGTTCTCCATCTTCGGCATCCCATGTTTCGGCGTGCACACCTGCG
GGTTCGCGGCAACACCGACTACGAGCTGTGCTCGCGGTGGATGCAGCTCAGCGCCTTTT
TCCCCTTCTACAGGAATCACAACATCCTCGCGCCATCAGCCAGGAGCCGTATGTGGA
GCAGCGTCCCGAGGCGACAAAGACGGCCATGCGCATTCCGTTACTCGTCTCCCTACA
TGTACACGCTCATGGCGGGGAGTCTGGAGGGCAGCACCGTGTGATGCGGGCATTGGCGT
GGGAGTCCCGCCGAGCCTTGGCTTGCAGATGCGGACCGGCAGTTCATGCTGGGCGAGC
CCCTCATGGTGCAGCCGTGTTGGAGCAGGGCCCTCGACCGTCCGGCGGCGTGTTCCTCG
CGCTCGGCAGCGCACTGTCTGGTACGACTGGTACACCTTGGCGGCGCTCAAGGGTGTG
AGCCGGGCCAGACGTCACAATCGACGCCCCGCTCGGCCACATCCCGCTGTATCTGCGCG
GCGGTAGCGTGGTTCACCCAGGAGCCGGGAATGACCACCAGAAAGCCGAGGAATC
CGTGGGGCTCATTTGTGGCGTGGATAGGACCGCTCGGCCGAGGGAGAGCTTTACCTGG
ACGACGGCGAGAGCTTGAACCCGGACGCTGTACGTTGGGTGCATGTAAGTCCGCTCGCTC
ACTCTCTTCTTCTGCTCGCCGTCGACTGGACGGATGACCCAGGTTGATCAGAAT
GACACGGAAACAGTTCTCCGCCCAATAACTCGGTGTTGCGCGGCGGGAAGGCAACTA
CGTTGACACCAACCGCTCGCAATGCCACGGTCTTGGGGCTTCCCGAGGCTCCCTCGAA
GGTCTGGTTGAATGGTGTCTGCTGCGACCTCGCGCTGGAGTACTCCCGAGATAGGGC
CGTCTGTCGGTGCAGGGGCTGCATGACTTATCCCGCAAGGGGCTGGGGCAGCGCGT
GGAACCTACGTGGGAGTAG

Figura 16. Secuencia nucleotídica del gen *TtBgn31A* codificante para la β -1,3-glucanasa



Se hizo un análisis de identidad haciendo un alineamiento entre el gen *TtBgn31A* de la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1 y del gen reportado en la base de datos de la proteína de *T. terrestris* NRRL8126, observando que tienen 95 % de identidad a nivel de secuencia de nucleótidos (**Figura 17**).

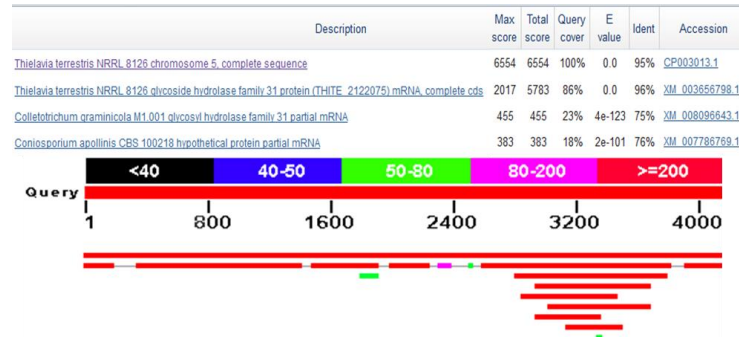


Figura 17. Análisis informático del gen *TtBgn31A*

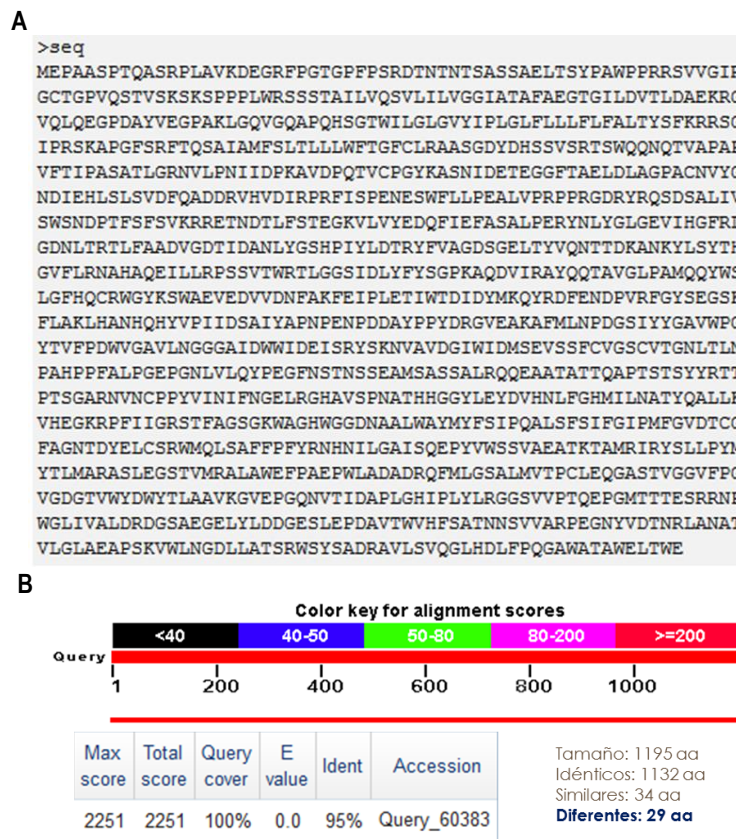


Figura 18. Análisis informático de la secuencia aminoacídica de la β -1,3-glucanasa

A. Secuencia aminoacídica de la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1.

B. Datos del alineamiento de las β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1 y de *T. terrestris* NRRL8126.

Como se observa en la **Figura 18B**, la secuencia aminoacídica de la β -1,3-glucanasa tiene un tamaño de 1195 aminoácidos, calculando una masa molecular teórica de 131 kDa, 1132 aminoácidos son idénticos a la glucanasa de *T. terrestris* NRRL8126 reportada en la base de datos, 34 aa son similares y 29 aa son diferentes. El porcentaje de identidad entre las dos β -1,3-glucanasas es de 95 % a nivel de aminoácidos.



7.5 Estructura secundaria de TtBgn31A

El análisis de similitud de TtBgn31A reveló que es 94.7 % idéntico a la proteína de la familia 31 de las Glicosil hidrolasas (G2RFM7) de *T. terrestris* NRRL 8126, 75.9 % idéntica a la proteína de la familia 31 de las Glicosil hidrolasas (G2Q431) de *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464, 71.9 % idéntica a la α -glucosidasa (A0A175VX48) de *Madurella mycetomatis*, 69.7 % idéntica a la proteína no caracterizada (F8N146) de *Neurospora tetrasperma* FGSC 2508 y 20.1 % idéntica a α -glucosidasa (G0SG42) de *Chaetomium thermophilum* DSM 1495.

El alineamiento de TtBgn31A con las cuatro secuencias que presentaron mayor porcentaje de identidad mediante el análisis BLAST se muestra en el **ANEXO A**. El alineamiento y comparación de TtBgn31A de *T. terrestris* Co3Bag1 con la α -glucosidasa (G0SG42) de la familia GH31 de *C. thermophilum* DSM 1495, ha posibilitado la identificación de 16 hélices α y 53 hebras β , además de los residuos aminoacídicos catalíticos D700 y D868, característicos de la familia GH31, identificados por similitud (**ANEXO A**).

El análisis de la secuencia predicha de aminoácidos de TtBgn31A con el programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) sugiere que la enzima carece de péptido señal. El análisis de los posibles sitios O-glicosilación y N-glicosilación se llevó a cabo con las herramientas del servidor de Expsy, NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) y NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/Services/NetNGlyc/>), respectivamente, encontrándose que la β -1,3-glucanasa TtBgn31A presenta dos sitios potenciales de O-glicosilación y dos sitios potenciales de N-glicosilación. Adicionalmente, el análisis con el servidor InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) mostró que TtBgn31A tiene dominios pertenecientes a la familia 31 de las Glicosil hidrolasas (**Figura 19**).

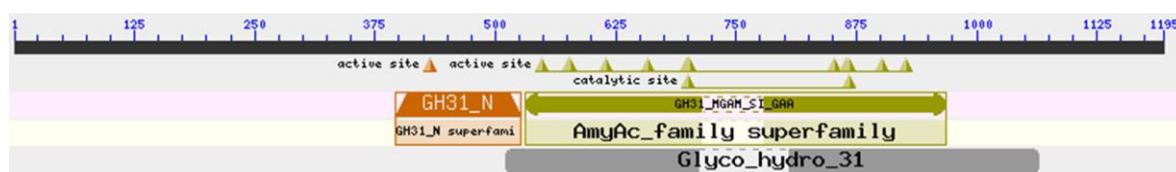


Figura 19. Identificación de los dominios de TtBgn31A

7.6 Estructura terciaria de TtBgn31A

Para generar un modelo de la estructura terciaria de TtBgn31A, la secuencia se analizó con el servidor I-TASSER. Este servidor ha sido calificado como el mejor en su tipo para la elucidación de las estructuras terciarias de proteínas y la predicción de sus funciones biológicas a partir de los aminoácidos que las constituyen.



En la **Tabla 3** se muestra la información de los diez modelos de las enzimas que se utilizaron para la elucidación de la estructura terciaria por I-TASSER.

Tabla 3. Modelos utilizados para la elucidación 3D de *TiBgn31A*

PDB Hit	TM-score	Cobertura	Clasificación
3LPP	0.711	0.714	Isomaltosa
3L4U	0.702	0.708	Glucoamilasa
3TOP	0.687	0.702	Glucoamilasa
3WED	0.653	0.668	α -glucosidasa
2X2H	0.651	0.692	α -1,4-glucan liasa
5DKX	0.647	0.675	α -glucosidasa
5F0E	0.639	0.663	α -glucosidasa
4B9Y	0.589	0.619	α -transglucosidasa
1X51	0.581	0.620	α -glucosidasa
5JOU	0.576	0.615	Hidrolasa

El servidor I-TASSER generó un modelo estructural 3D de *TiBgn31A* con un valor de C-score de -2.41 y valores estimados de TM-score y RMSD de 0.43 ± 0.14 y 15.6 ± 3.3 Å, respectivamente (**Figura 20**). El modelo 3D es estructuralmente más cercano a la sacarosa-isomaltasa (ID PDB: 3LPP) de *Homo sapiens* con una puntuación de modelado de plantilla de 0.711 y una cobertura de alineamiento de 0.714 y a una α -glucosidasa (PDB ID 3WEO) de *Beta vulgaris* con una puntuación de modelo de modelado (TM-score 0.653 y una cobertura en el alineamiento de 0.667).

El significado de cada uno de los parámetros se encuentra en el **ANEXO B**.

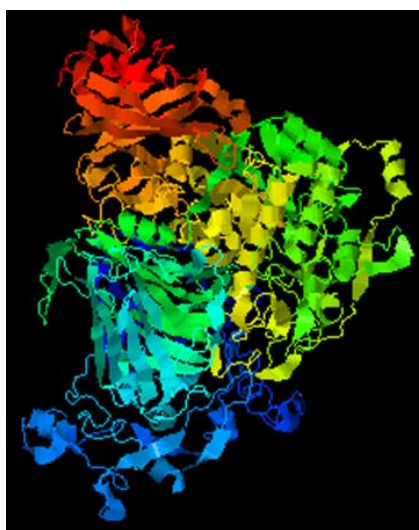


Figura 20. Estructura 3D de *TiBgn31A* predicho en el software I-TASSER



7.7 Caracterización bioquímica de la enzima silvestre

7.7.1 Determinación del pH óptimo de la enzima silvestre

El estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática es una prueba muy importante, ya que para cada enzima en particular existe un pH en el cual la actividad catalítica es más adecuada y valores ya sea por encima o por debajo de este pH óptimo pueden afectar drásticamente la actividad enzimática.

En este trabajo, la actividad óptima de la β -1,3-glucanasa silvestre purificada fue a un pH de 6.0 (4.41 U/mg) (Figura 21) en el amortiguador de citratos-fosfatos 50 mM. Sin embargo, en un intervalo de pH de 4.5 a 7.0 la enzima conserva más del 50 % de actividad.

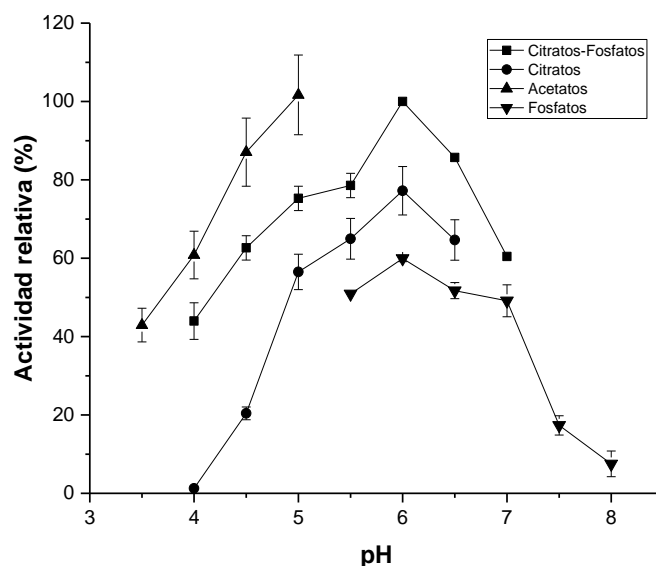


Figura 21. Efecto del pH en la actividad β -1,3-glucanasa silvestre

7.7.2 Estabilidad al pH de la β -1,3-glucanasa silvestre

La evaluación de la estabilidad a pH de las enzimas es muy interesante, ya que nos muestra un panorama del intervalo de pH a la que las enzimas conservan más del 50 % de su actividad catalítica y esta característica es de vital importancia para su posible aplicación en algún proceso biotecnológico.

En la Figura 22 podemos observar que la enzima retiene más del 50 % de su actividad residual en el intervalo de 4.5 a 7.0 en el amortiguador de citratos-fosfatos. La máxima actividad fue definida como el 100 %. La actividad de la enzima al 100 % fue de 4.23 U/mg.

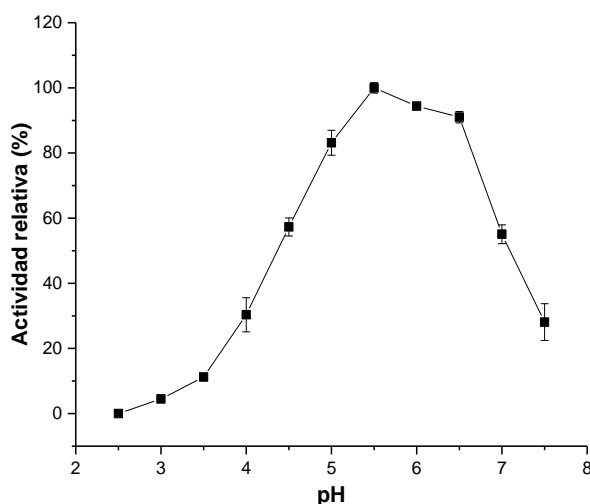


Figura 22. Estabilidad al pH de la β -1,3-glucanasa silvestre
A partir el valor 4.5 y hasta 7.0 de pH en el amortiguador de citratos-fosfatos, la β -1,3-glucanasa presenta más del 50 % de su actividad residual.

7.7.3 Determinación de la temperatura óptima enzima silvestre

El estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática es muy importante; ya que al igual que con el pH, existe una temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima y ésta se llama temperatura óptima.

Para este proyecto, la β -1,3-glucanasa silvestre purificada tuvo una temperatura óptima de 70 °C en amortiguador de citratos-fosfatos 50 mM, pH 6.0 con un valor de 4.29 U/mg. En la **Figura 23** se observa una campana típica y cuya temperatura óptima es de 70 °C, en el intervalo de 55 a 75 °C mantiene más del 50 % de su actividad. Lo anterior nos indica que la enzima mantiene su actividad en un intervalo amplio de temperatura.

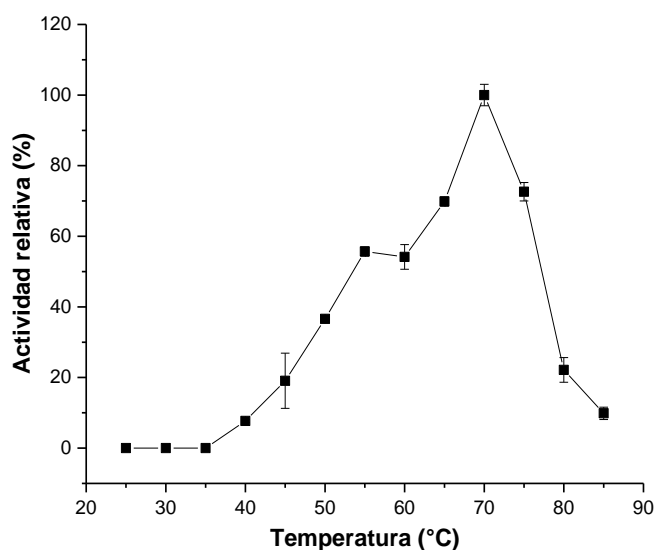


Figura 23. Efecto de la temperatura en la actividad β -1,3-glucanasa silvestre

7.7.4 Estabilidad térmica de la β -1,3-glucanasa silvestre

La evaluación de la estabilidad térmica de las enzimas nos muestra un panorama de las temperaturas y el tiempo que la enzima conserva al menos el 50 % de su actividad catalítica (vida media, $t_{1/2}$) y esta característica es de vital importancia para su posible aplicación en algún proceso biotecnológico.

La termoestabilidad de la β -1,3-glucanasa silvestre fue determinada a diferentes temperaturas 50, 60, 65, 70 y 80 °C en amortiguador de citratos-fosfatos 50 mM, pH 6.0. Las cinéticas fueron de primer orden con un coeficiente de determinación entre 0.9675 y 0.9856. *TtBgn31A* mostró baja estabilidad a 70 °C ($t_{1/2}$ 13 min) con una constante de velocidad de inactivación (k) 0.0521 min^{-1} , y a 80 °C ($t_{1/2}$ 2 min), se observó una k 0.2874 min^{-1} . La enzima fue más estable a 50, 60 y 65 °C con una $t_{1/2}$ de 54, 37 y 18 min, respectivamente (Figura 24). La constante de velocidad de inactivación térmica a 50, 60 y 65 °C fue de 0.0129, 0.0187 y 0.0379 min^{-1} , respectivamente. La máxima actividad fue definida como el 100 %. La actividad de la enzima al 100 % fue de 3.83 U/mg.

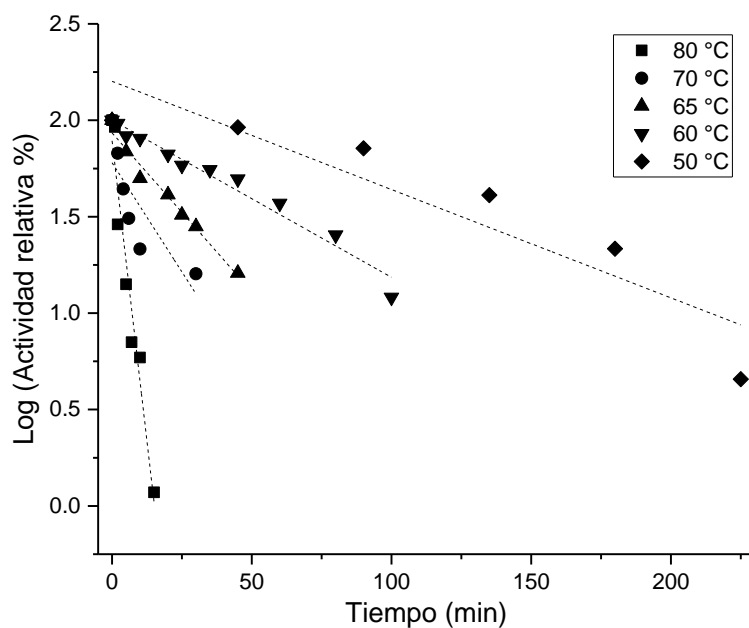


Figura 24. Estabilidad térmica de la β -1,3-glucanasa silvestre

Gráfico semilogarítmico de las actividades residuales (%) de *TtBgn31A* frente al tiempo de calentamiento para la determinación de los valores de constante de velocidad de inactivación (k) a 50, 60, 65, 70 y 80 °C. La actividad se estimó como un porcentaje del máximo. La actividad máxima se definió como 100 %. La actividad de la enzima al 100 % fue 3.83 U/mg

7.7.5 Efecto de iones metálicos sobre la actividad β -1,3-glucanasa silvestre

Las enzimas al estar en contacto con diferentes compuestos pueden ser inhibidas o de lo contrario, incrementar su actividad y por esa razón, se estudió el efecto de algunos metales sobre la β -1,3-glucanasa silvestre.

Los datos obtenidos indicaron que la presencia de los iones (Ni^{2+} , Cs^{1+} , Zn^{2+} , Li^{1+} y Fe^{2+}), a una concentración final de 5 mM, incrementaron la actividad enzimática en el orden que se muestra en la gráfica, mientras que los iones (Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} y Ag^{1+}), a una concentración final de 1 mM, incrementaron la actividad enzimática, como se muestra en la gráfica. En cambio, los iones (Ca^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} y K^{1+}) afectaron negativamente la actividad enzimática. En particular, la presencia de los iones Ca^{2+} y Hg^{2+} abatieron casi en su totalidad la actividad β -1,3-glucanasa, tanto de 1 mM como de 5 mM. Cabe destacar que los iones Ag^{1+} , Cu^{2+} , Li^{1+} y Fe^{2+} incrementaron de manera significativa la actividad β -1,3-glucanasa, 20.5, 5.1, 2 y 2.3 veces, respectivamente con respecto al control (**Figura 25**). La actividad enzimática se expresó como un porcentaje de la actividad observada en ausencia de cualquier ion metálico (control), que se tomó como 100 %. La actividad de la enzima al 100 % fue 4.35 U/mg.

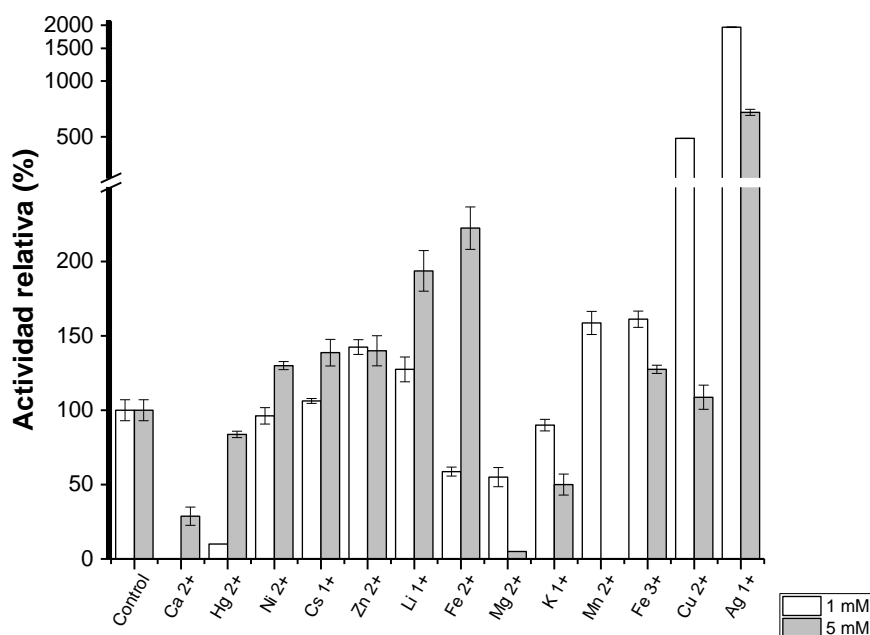


Figura 25. Efecto de los iones metálicos de la β-1,3-glucanasa silvestre

Adicionalmente la actividad enzimática de *TiBgn31A* se determinó en presencia de otras sales que contenían el ion Ag^{+1} , tales como: Ag_2O , AgCl y Ag_2SO_4 . La actividad de la enzima también se determinó en presencia de otros compuestos que contienen el ion nitrato (NO_3^{-1}). Por otro lado, se estudió el efecto que el ion cloruro tenía sobre la actividad enzimática.

Los resultados obtenidos, demostraron claramente que la actividad β-1,3-glucanasa de *TiBgn31A* disminuyó en presencia de Ag^{+1} , mientras que se observó un aumento notable en la actividad enzimática en presencia de NO_3^{-1} . Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Metal ion	*1 Mm	*5 mM
Control	100 ± 8.38	100 ± 6.00
Ag_2O	8.30 ± 0	2.1 ± 0.50
AgCl	0 ± 0	0 ± 0
Ag_2SO_4	0 ± 0	0 ± 0
AgNO_3	1950 ± 7.43	677.50 ± 15.57
NaNO_3	496.12 ± 5.42	477.04 ± 0.91
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	504.98 ± 12.34	549.90 ± 10.76
NH_4NO_3	500.00 ± 5.35	465.71 ± 2.78
CaCl_2	98 ± 0	95 ± 0
CuCl_2	103 ± 0	107 ± 0
MnCl_2	167.10 ± 7.79	0
NaCl	102.31 ± 5.50	91 ± 0



Los datos obtenidos mostraron que la actividad β -1,3-glucanasa de *TtBgn31A* fue inhibida por el ion Ag^{+1} , por lo tanto, NO_3^{-1} podría estar interactuando con el grupo aldehído de la glucosa liberada por la misma laminarina, por la acción de *TtBgn31A*, causando un efecto de fondo. La actividad enzimática se expresó como un porcentaje de la actividad observada en ausencia de cualquier ion metálico (control), que se tomó como 100 %. La actividad de la enzima al 100 % fue de 4.35 U/mg.

7.7.6 Especificidad a sustratos de la β -1,3-glucanasa silvestre

Debido a los resultados de secuenciación, se hizo especificidad a sustratos con algunos con enlaces α y β . A continuación, se muestra en la **Tabla 4** los sustratos utilizados, sus características y la actividad relativa obtenida.

Tabla 4. Especificidad a sustratos de la β -1,3-glucanasa silvestre

Sustrato	Enlace	Actividad relativa (%)
Laminarina	β -1,3/ β -1,6	100
Gentibiosa	β -1,6	4
Curdlan	β -1,3	0
Celobiosa	β -1,4	0
Almidón	α -1,4/ α -1,6	0
Glucógeno	α -1,4/ α -1,6	0
Amilosa	α -1,4	8
Maltosa	α -1,4	0
Sacarosa	α -1,2	7
4-Nitrofenil β -D-glucopiranosido (<i>p</i> NPG)	β -	1511
metil- α -D-glucopiranosido	α -	0
metil- α -D-manopiranosido	α -	4

Los resultados muestran que al utilizar *p*NPG se incrementa la actividad 15 veces con respecto a laminarina. Recordando, *p*NPG es un sustrato sintético, que es utilizado para determinar actividad β -glucanasa a enzimas con actividad hidrolítica β , como en el caso de β -1,3-glucanasas fúngicas previamente reportadas (Cortat *et al.*, 1972, Sanchez *et al.*, 1982, Nebreda *et al.*, 1986, Hrmova *et al.*, 1996, Kruse *et al.*, 1992, Kotake *et al.*, 1997 Xin *et al.*, 1999). La actividad se estimó como un porcentaje de la actividad enzimática obtenida con laminarina como sustrato, que se tomó como 100 %. La actividad de la enzima al 100 % fue de 4.05 U/mg



7.7.7 Análisis de los productos de hidrólisis de la $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanasa}$ silvestre

Al revelar las placas, se observa que la placa en donde se inyectaron las muestras de la incubación de laminarina/ $\beta\text{-1,3-glucanasa}$, el producto mayoritario resultado de la hidrólisis a través del tiempo es glucosa (**Figura 26**).

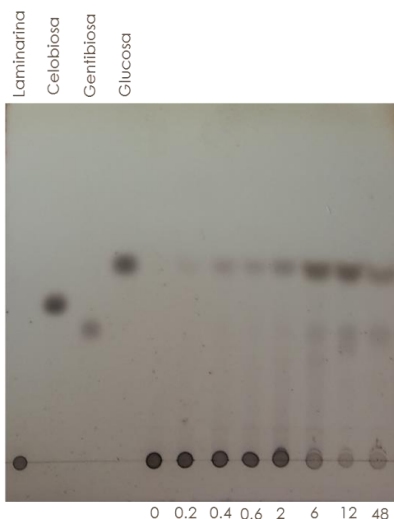


Figura 26. Productos de hidrólisis generados por la $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanasa}$ silvestre sobre laminarina

Para la placa donde se inyectaron las muestras de la incubación de $\text{pNPG}/\beta\text{-1,3-glucanasa}$, el único producto resultado de la hidrólisis a través del tiempo es glucosa (**Figura 27**), este ensayo se hizo debido a que la enzima presentaba actividad considerable (15 veces más que con laminarina) con el sustrato sintético pNPG .

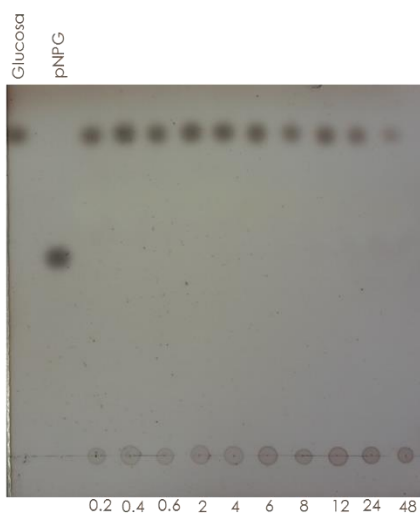


Figura 27. Productos de hidrólisis generados la $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanasa}$ silvestre sobre pNPG



Los resultados muestran que al utilizar *p*NPG, el único producto de hidrólisis resultante es glucosa, indicando que la enzima no presenta actividad de transglicosilación, bajo las condiciones probadas ya que no se forman otros subproductos como dímeros o trímeros de glucosa, también el ensayo muestra que la enzima actúa de manera exo, al ser glucosa el único producto generado (Hrmova et al., 1996, Kruse et al., 1992, Kotake et al., 1997 Xin Du et al., 1999). Tomando en consideración la información antes mencionada, *p*NPG es un sustrato sintético, que es utilizado para determinar actividad exo- β -glucanasa a enzimas con actividad hidrolítica β , como en el caso de exo- β -1,3-glucanasas fúngicas previamente reportadas.

7.8 Clonación del gen *TtBgn31A* del hongo *T. terrestris*

7.8.1 Extracción de ADNg de *T. terrestris*

Debido al interés que se tiene en el grupo de trabajo por contar con enzimas robustas con propiedades relevantes en cuanto a su temperatura óptima y a su termoestabilidad, que puedan ser consideradas como candidatos para implementar un proceso biotecnológico, uno de los objetivos planteados fue la clonación y expresión del gen codificante para una glucanasa termofílica. El primer paso para llevar a cabo la clonación es la extracción de ácidos nucleicos.

Se evaluó la calidad y cantidad del ADN total de *T. terrestris* Co3Bag1, como se indica en la sección de Materiales y métodos. La calidad y cantidad fueron satisfactorias para utilizar como templado para la PCR (Figura 28).

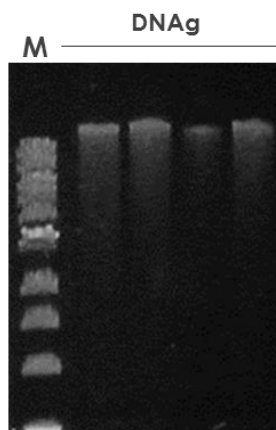


Figura 28. Extracción de ADN total de *T. terrestris* Co3Bag1

M. Marcador de tamaño molecular.
DNAg. DNA genómico de *T. terrestris*.



7.8.2 Amplificación del gen *TtBgn31A* de *T. terrestris*

Para amplificar el gen *TtBgn31A* codificante de la exo- β -1,3-glucanasa, se utilizaron los oligonucleótidos diseñados mencionados en la sección de Materiales y métodos.

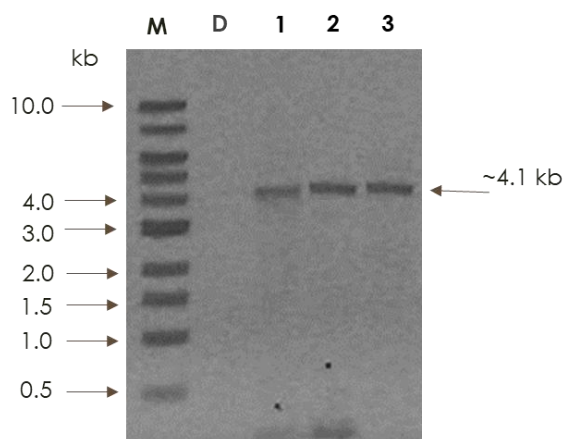


Figura 29. Amplificación del gen (*TtBgn31A*) codificante de la exo- β -1,3-glucanasa.

M. Marcador de tamaño molecular 1kb

D Muestra de DNA genómico de *T. terrestris*

1 Amplicón de **4.1 kb** correspondiente a *bgn31a* a 64 °C

2 Amplicón de **4.1 kb** correspondiente a *bgn31a* a 66 °C

3 Amplicón de **4.1 kb** correspondiente a *bgn31a* a 68 °C

Los productos de PCR se analizaron para verificar los tamaños esperados, haciendo una electroforesis en gel de agarosa al 0.6 % en amortiguador TAE (**Figura 29**). En la figura se muestran los carriles marcados como 1, 2 y 3 correspondientes a las temperaturas de alineamiento de 64, 66 y 68 °C, debido a que se utilizó un protocolo de dos pasos, recomendado para la amplificación de secuencias grandes y oligonucleótidos largos. Este protocolo disminuye la depurinación del ADN y oligonucleótidos, sugerencias indicadas en los protocolos de Qiagen. La temperatura que dio mejores resultados de amplificación específica, de acuerdo a las condiciones indicadas, fue la de 68 °C, donde se obtuvo una banda correspondiente al tamaño esperado de 4.1 kb, con un alto grado de pureza. Esta muestra se utilizó para clonar el gen *TtBgn31A* en los vectores pDrive y pAniger comentados en la sección de Materiales y Métodos.

7.8.3 Clonación del gen *TtBgn31A* en el vector pDrive

El gen *TtBgn31A* se clonó en el vector pDrive. Se obtuvieron varias colonias blancas, las cuales se analizaron por perfil de digestión con enzimas de restricción para confirmar la presencia del inserto de interés (**Figura 30**).

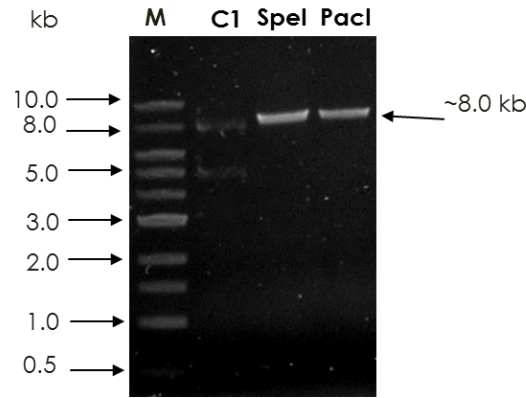


Figura 30. Análisis de la construcción *TtBgn31A/pDrive*.

M. Marcador de tamaño molecular 1kb
C1 DNAp de la colonia transformante 1
SpeI Digestión del DNAp1 con *SpeI*
PaeI Digestión del DNAp1 con *PaeI*

La construcción *TtBgn31A/pDrive* se linealizó de manera independiente con las enzimas de restricción *SpeI* y *PaeI*, y los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa. De acuerdo a lo esperado, en la electroforesis se observó una banda de aproximadamente 8 kb, constituida por el gen *TtBgn31A* de 4.1 kb y el vector de clonación *pDrive* de 3.8 kb (**Figura 30**). Para la linealización de la construcción se eligieron las enzimas de restricción *SpeI* y *PaeI*, debido a que la construcción contiene los sitios de reconocimiento para la digestión con estas enzimas, los cuales fueron introducidos con los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR, y los cuales flanquean el gen *TtBgn31A* dentro de la construcción, como lo muestra el análisis *in silico* de la **Figura 31**, indicando el perfil electroforético que se obtendría con la construcción esperada.

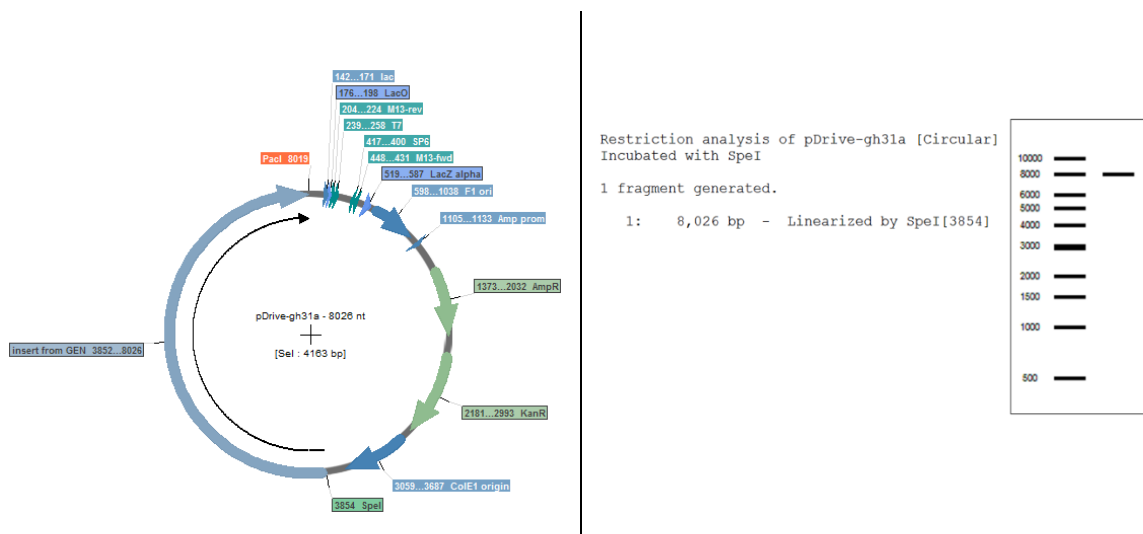


Figura 31. Análisis *in silico* de la construcción *TtBgn31A/pDrive*

- Construcción *in silico* *TtBgn31A/pDrive* indicando los sitios de corte *SpeI* y *PaeI* que flanquean al gen *TtBgn31A* (4163 nt)
- Digestión *in silico* de la construcción *TtBgn31A/pDrive*, con la enzima *SpeI*, observando que se tiene una banda correspondiente a 8 kb



7.8.4 Análisis del vector de expresión *gfp/Aniger*

Se analizó el vector de expresión *gfp/Aniger*, en el cual se clonó el gen *TtBgn31A*. De antemano, se sabía que el vector tenía el gen que codifica a la GFP (Proteína Verde Fluorescente, por sus siglas en inglés de *Green Fluorescent Protein*), flanqueado por los sitios de restricción *SpeI* y *PacI*, por lo que el vector de expresión estaba constituido por 8.9 kb y el gen *gfp* de 0.7 kb. Con esta información se hizo el análisis de restricción como se indica en la sección de “Metodología”. El resultado se muestra en la **Figura 32**.

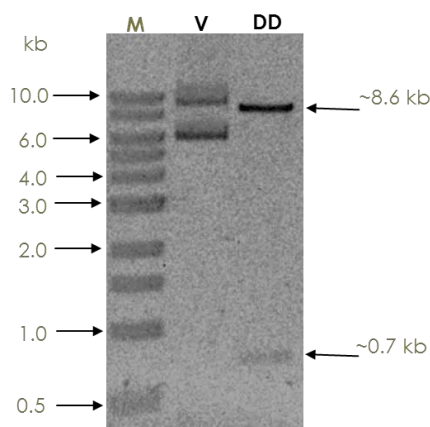


Figura 32. Análisis del vector de expresión *gfp/Aniger*.

M. Marcador de tamaño molecular 1kb

V Construcción de expresión *gfp/Aniger*

DD Doble digestión de la construcción *gfp/Aniger* con las enzimas *SpeI* y *PacI*

Como se observa en la **Figura 32**, la doble digestión de la construcción de expresión *gfp/Aniger* con las enzimas *SpeI* y *PacI*, muestra que se liberan dos fragmentos, uno correspondiente al vector *Aniger* de aproximadamente 8.6 kb y el otro correspondiente al gen *gfp* de 0.7 kb, la doble digestión muestra que la construcción de expresión está correcta debido a que esos sitios de corte flanquean el gen *gfp*, el cual será sustituido por el gen *TtBgn31A*. El análisis *in silico* (**Figura 33**), muestra cómo está constituido el vector de expresión *gfp/Aniger*, así como una digestión *in silico* de la construcción.

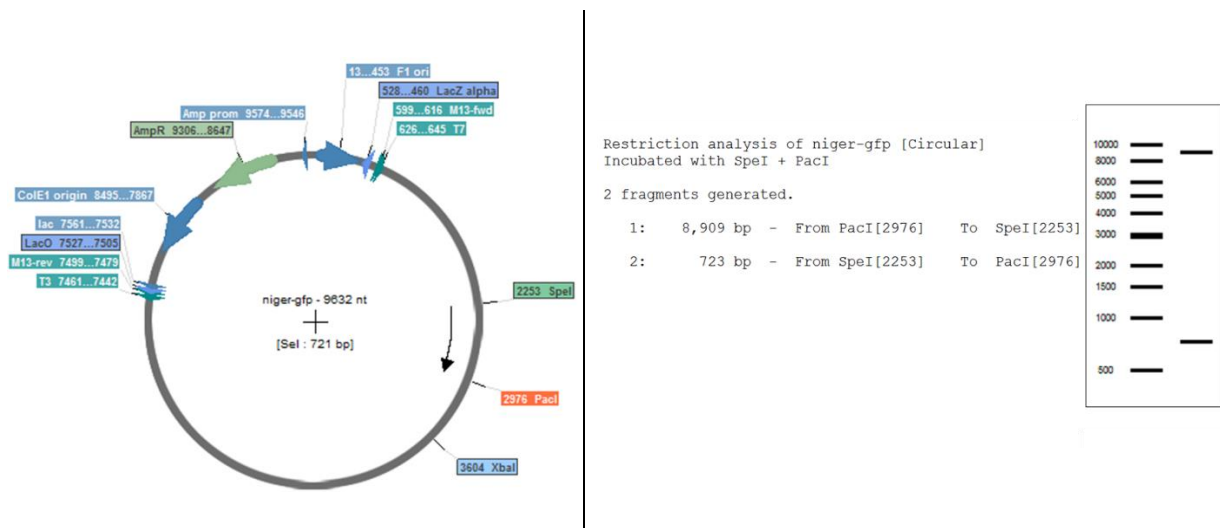


Figura 33. Análisis *in silico* de la construcción de expresión *gfp/Aniger*.

- a. Análisis *in silico* del vector de expresión *gfp/Aniger* indicando los sitios de corte *SpeI* y *PacI* que flanquean al gen *gfp* (721 pb)
- b. Digestión *in silico* de la construcción de expresión *gfp/Aniger*, con la enzima *SpeI* y *PacI*, observando que se tienen dos bandas una de 8.9 kb correspondiente al vector y otra de 0.7 kb correspondiente al gen *gfp*

7.8.5 Subclonación del gen *TtBgn31A* en el vector de expresión para *A. niger*

Para clonar el gen *TtBgn31A* en el vector de expresión para *A. niger*, el producto de PCR *TtBgn31A* y el vector de expresión *gfp/Aniger* se digirieron con las enzimas *SpeI* (NEB) y *PacI* (Thermo Scientific™). (Figura 34).

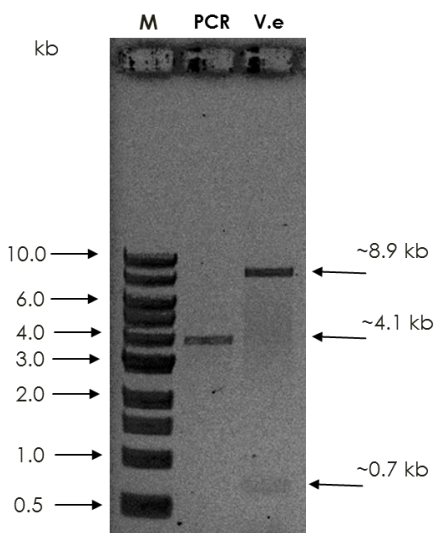


Figura 34. Digestión del producto de PCR del gen *TtBgn31A* y del vector de expresión *gfp/Aniger*.

M. Marcador de tamaño molecular 1kb

PCR Doble digestión del producto de PCR *TtBgn31A* con las enzimas *PacI* y *SpeI*.

V.e Doble digestión del vector de expresión *gfp/Aniger* con las enzimas *PacI* y *SpeI*.



Las muestras resultado de las digestiones mencionadas anteriormente se utilizaron para ligar y posteriormente transformar células DH5 α con el producto de ligación. Se seleccionaron varias colonias para hacer miniprep y analizarlas por restricción con diversas enzimas y mediante PCR, de esta manera poder corroborar la construcción de expresión *TtBgn31A/Aniger*.

En la **Figura 35** se muestra un análisis de las digestiones con *Bam*HI, observando que la muestra del carril 3 marcado con rojo, muestra un patrón esperado de una banda de ~11.5 kb y ~1.4 kb, indicando que se obtuvo la construcción esperada de ~13 kb.

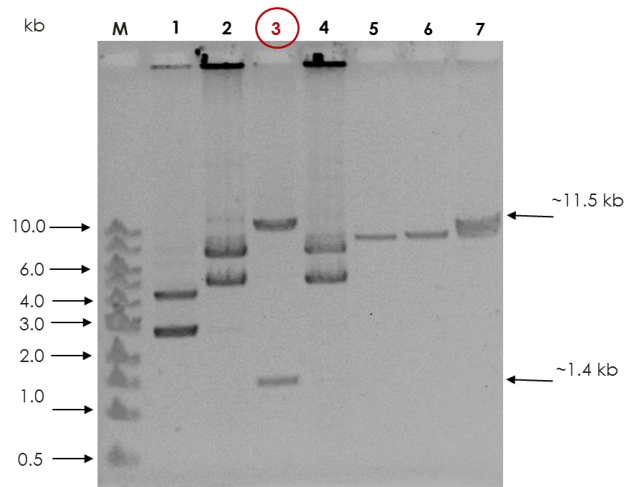


Figura 35. Digestiones para identificar la construcción *TtBgn31A/Aniger*.

M. Marcador de tamaño molecular 1kb

1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 DNAs digerido con *Bam*HI, la muestra del carril 3 muestra un patrón esperado.

Para corroborar completamente la construcción de expresión *TtBgn31A/Aniger*. Se hicieron otras digestiones con enzimas de restricción diferentes, al igual que una PCR para amplificar el gen *TtBgn31A*, tomando como DNA molde, la muestra del carril 3 de la Figura 16. Los resultados se muestran en la **Figura 36**.

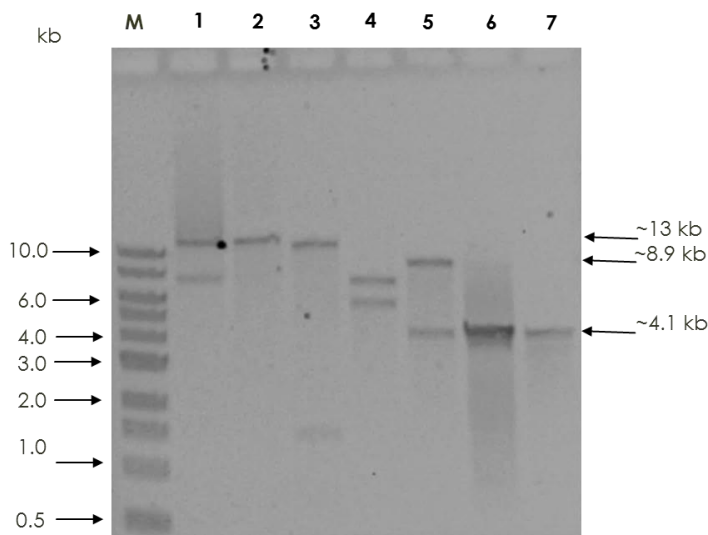


Figura 36. Digestiones para corroborar la construcción de expresión *TtBgn31A/Aniger*.

M. Marcador de tamaño molecular 1kb

1 Clona 3

2 Clona digerida con *XbaI* (13074 pb)

3 Clona digerida con *BamHI* (1457 pb y 11617 pb)

4 Clona digerida con *EcoRI* (7277 pb y 5799 pb)

5 Clona digerida con *Pacl* y *SpeI* (8974 pb y 4100 pb)

6 PCR de la Clona 3 a 68 °C, obteniendo un amplicón de 4100 pb correspondiente al gen *TtBgn31A*

7 PCR de la Clona 3 a 70 °C, obteniendo un amplicón de 4100 pb correspondiente a al gen *TtBgn31A*

Como se muestra en la **Figura 36** (carril 5), el análisis electroforético muestra que se obtuvo la construcción de expresión *TtBgn31A/Aniger*, ya que al hacer la doble digestión con *Pacl* y *SpeI* se obtienen dos fragmentos: uno correspondiente al vector de expresión *Aniger* (8974 pb) y el otro al gen *TtBgn31A* (4100 pb). También se corroboró mediante PCR, utilizando los iniciadores específicos para amplificar el gen *TtBgn31A* (4.1 kb).

7.9 Análisis de la secuencia

Los productos de la secuenciación del gen *TtBgn31A* se analizaron haciendo alineamientos con el gen que se identificó en el genoma de *T. terrestris* Co3Bag1 del laboratorio, adicionalmente se utilizó el gen reportado en la base de datos NCBI de la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* NRRL8126, para hacer alineamientos con las secuencias recibidas de la secuenciación (**Figura 37**).

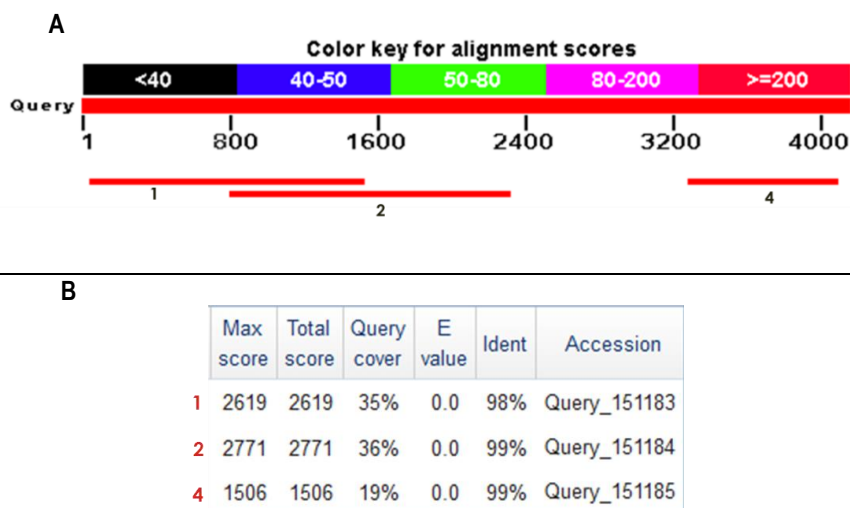


Figura 37. Análisis informático del gen *TtBgn31A*.

a. Diagrama del alineamiento entre el gen *TtBgn31A* de *T. terrestris* Co3Bag1 y los productos de PCR generados de la secuenciación.

b. Datos del alineamiento de los productos de PCR generados de la secuenciación del gen *TtBgn31A* de *T. terrestris* y del gen reportado en la base de datos de la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* NRRL8126.

Los productos de PCR de la **Figura 37** marcados como 1, 2 y 4, mostraron tener una buena calidad de secuenciación, por lo que sólo se trabajaron con esas tres secuencias. Al hacer el alineamiento de las secuencias con el genoma de *T. terrestris* Co3Bag1, se corroboró que había que editar el gen, debido a que el trabajo bioinformático con el genoma, se encuentra a nivel scaffold. Una vez hecho la edición del gen, utilizando los productos de PCR secuenciados, se hizo un alineamiento del gen *TtBgn31A* de *T. terrestris* Co3Bag1 y del gen reportado en la base de datos de la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* NRRL8126, observando que la secuencia 1, 2 y 4 tienen 98, 99 y 99 % de identidad a nivel nucleotídico con la β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* NRRL8126 reportada en la base de datos.

7.10 Expresión de *TtBgn31A* en *A. niger* CBS 513 88

Para obtener la proteína recombinante correspondiente a *TtBgn31A* y su posterior purificación y caracterización, se diseñó la estrategia plasmada en Metodología. Los resultados se muestran a continuación.

Después de la transformación, la suspensión de conidiosporas se vertió en placas de agar con medio mínimo complementado con higromicina y posteriormente se incubaron a 28 °C. Al quinto día de incubación se observó crecimiento de algunas células fúngicas (**Figura 38**), las cuales se seleccionaron para su propagación y análisis.

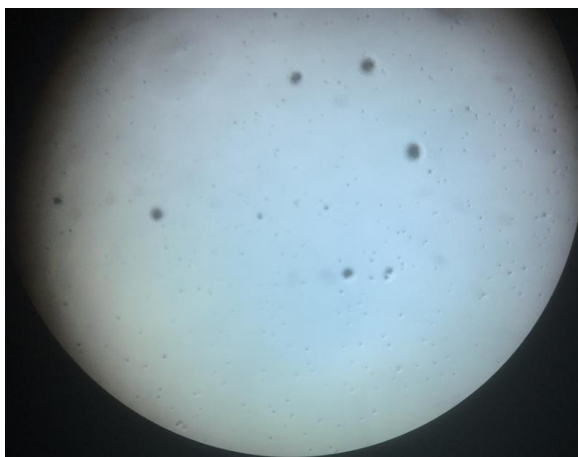


Figura 38. Crecimiento de células de *A. niger* en placas con higromicina en medio mínimo

7.11 Detección de la actividad β -1,3-glucanasa y selección de las cepas transformantes

Durante la cinética, se presentó la mayor actividad β -1,3-glucanasa al cuarto día de cultivo en las cepas C, D, E, F y H, mientras que G y J, lo presentaron al sexto día de la cinética. El control negativo, *A. niger* CBS 513.88, que es la cepa parental, presentó un indicio de actividad β -glucanasa al séptimo día. Esto es probablemente debido a que los hongos producen este tipo de enzimas, posiblemente al presentar una concentración limitada de fuente de carbono, se comenzó a producir alguna enzima con esta actividad para generar fuente de carbono de su pared celular. Cabe hacer notar que no se presenta actividad en los primeros seis días de la fermentación, lo que indica que no produce la enzima *TtBgn31A*. La cepa D, mostró tener mayor actividad sobre las otras cepas con 0.49 U/mL, al cuarto día de crecimiento. (**Figura 39**).

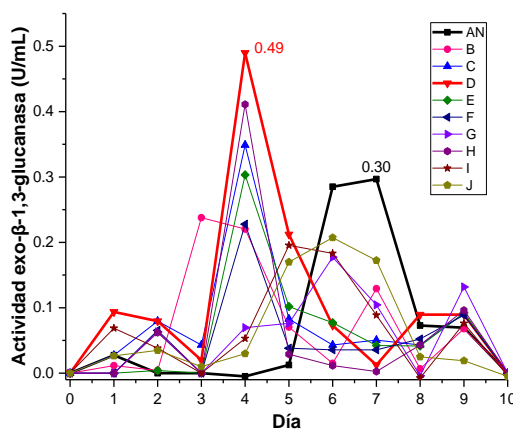


Figura 39. Determinación de la actividad exo- β -1,3-glucanasa de las cepas AN-J
La cepa D, mostró tener mayor actividad sobre las otras cepas con 0.49 U/mL, al cuarto día de crecimiento.



Al determinar la concentración de proteína en el sobrenadante de cultivo de estas clonas, se observa que, en todas las transformantes, comienza un incremento de proteína al tercer día de crecimiento. La transformante **D**, presentó el mayor valor de actividad (0.49 U/mL) y tuvo una concentración de proteína de 0.047 mg/mL (Figura 40).

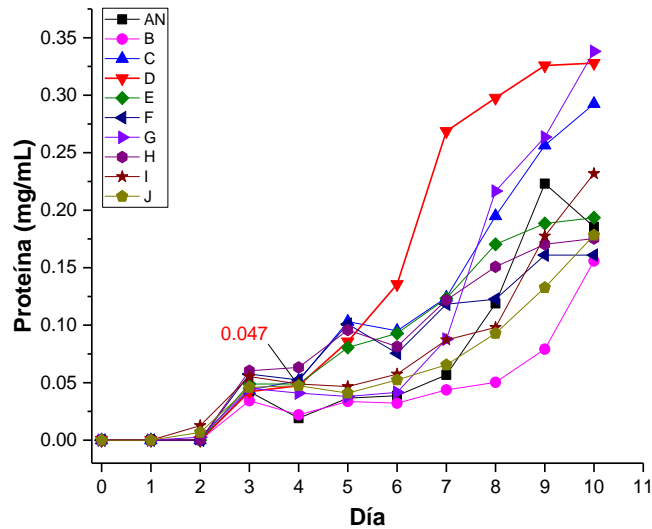
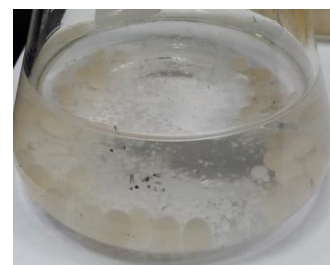


Figura 40. Determinación de proteína del sobrenadante de cultivo de las transformantes
La transformante **D**, tiene una concentración de proteína de 0.047 mg/mL, en el día que muestra tener mayor actividad β -1,3-glucanasa.

Curiosamente, durante la cinética se observó un cambio con la forma de crecimiento de las transformantes, pudiéndose observar una lisis temprana al sexto día (Figura 41), en comparación a la cepa silvestre **AN**, lo que sugiere la producción funcional de la $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanasa recombinante, debido a que este tipo de enzimas están relacionadas con el cambio morfológico de los hongos, en especial cuando se encuentran limitados en fuente de carbono, por lo que comienzan a utilizar su pared celular para obtenerlo. El aumento en la concentración de proteína se puede deber a la liberación de otras proteínas durante la lisis celular.



A



B

Figura 41. Diferencia en el crecimiento de un cultivo de la transformante D y la cepa silvestre.

- Transformante **D**, al sexto día de crecimiento se observa lisis celular, presentando residuos de pared celular en el sobrenadante de cultivo.
- Cultivo de *A. niger* sin transformar, cepa silvestre al sexto día de crecimiento, no presenta lisis celular.



En la **Figura 42**, se muestra una comparación de la actividad β -1,3-glucanasa y concentración de proteína de la recombinante D y AN (cepa silvestre). La recombinante D, muestra la mayor actividad β -1,3-glucanasa (0.49 U/mL) al sexto día, relacionada con el aumento de la concentración de proteína, cuyo valor es de 0.047 mg/mL. Mientras que la cepa silvestre *A. niger* CBS 513.88, durante los primeros cinco días de la cinética, no presenta actividad β -1,3-glucanasa, sus dos valores de actividad glucanasa se presentan al sexto y séptimo día, cuando se encuentra con valores bajos de fuente de carbono, la actividad β -1,3-glucanasa, se puede deber a la secreción de enzimas con dicha actividad, pertenecientes a la cepa silvestre.

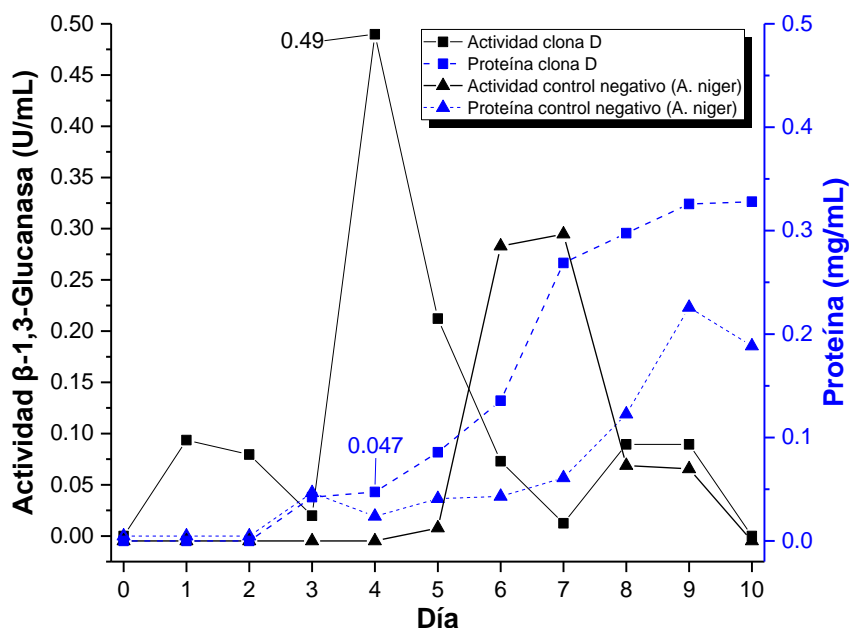


Figura 42. Comparación de la actividad β -1,3-glucanasa y concentración de proteína

7.12 Purificación de *TtBgn31A* recombinante expresada en *A. niger* CBS 513.88

La β -1,3-glucanasa recombinante expresada en *A. niger* se purificó en primera instancia, concentrando el sobrenadante de cultivo por ultrafiltración y finalmente por cromatografía de intercambio aniónico, el hongo creció en medio mínimo, a 28 °C con agitación a 120 rpm. Después de cuatro días de cultivo para la producción de la β -1,3-glucanasa, se recuperó el sobrenadante de cultivo; mismo que posteriormente fue concentrado por ultrafiltración y dializado en el regulador a utilizar en la cromatografía de intercambio aniónico como lo indica la sección de Metodología. En cada etapa se determinó la cantidad de proteína y la actividad β -1,3-glucanasa.



7.13 Análisis de pureza y estimación de peso molecular de *TfBgn31A* expresada en *A. niger*

Con la finalidad de estimar el grado de pureza de la proteína y el peso molecular de la exo- β -1,3-glucanasa expresada en *A. niger*, se hizo un análisis por SDS-PAGE al 10 %. Los datos obtenidos (**Figura 43**) mostraron que se obtuvo la proteína recombinante con un alto grado de pureza y con un peso molecular estimado de aproximadamente 129 kDa.

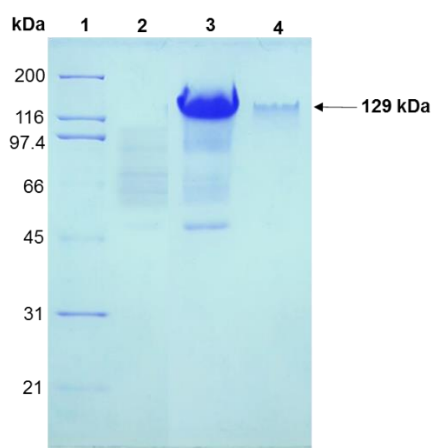


Figura 43. Análisis por SDS-PAGE al 10 % de la *TfBgn31A* recombinante.

1. Marcador de peso molecular
2. Control negativo (sobrenadante de cultivo de *A. niger* CBS 513.88 sin transformar)
3. Sobrenadante de cultivo de *A. niger* transformado con el gen *TfBgn31A*
4. Fracción con la exo- β -1,3-glucanasa purificada

En la **Tabla 5** se muestra un resumen de las etapas de purificación de la enzima recombinante.

Tabla 5. Etapas de purificación de la enzima recombinante

Paso	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
*EC	396.00	2640.00	0.15	100.00	1.00
Ultrafiltración	94.00	120.00	0.78	23.74	5.20
**CIA	5.50	1.15	4.78	1.39	31.87

*EC, Extracto Crudo

**CIA, Cromatografía de Intercambio Aniónico



7.14 Zimograma para detectar actividad β -1,3-glucanasa

Además de la actividad que mostraron las proteínas purificadas usando como sustrato laminarina, el zimograma demuestra la actividad de la exo- β -1,3-glucanasa silvestre y recombinante usando como sustrato laminarina copolimerizado en los geles de poliacrilamida. El resultado de este experimento se observa en la **Figura 44**, indicando que tanto la enzima silvestre como la recombinante presentaron actividad hidrolítica sobre Laminarina.

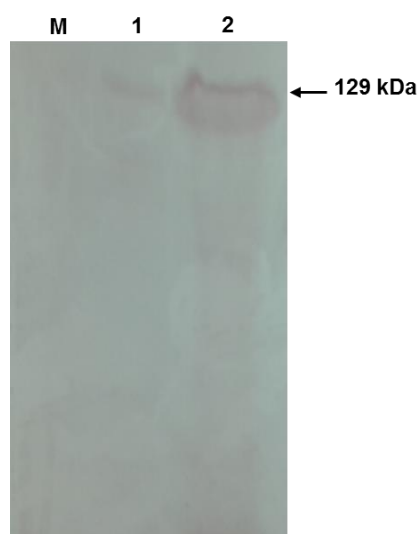


Figura 44. Zimograma específico para determinar la actividad exo- β -1,3-glucanasa.

M. Marcador de peso molecular.

1. exo- β -1,3-glucanasa silvestre purificada de *T. terrestris* Co3Bag1

2. exo- β -1,3-glucanasa recombinante purificada de *A. niger* CBS 513.88

7.15 Análisis de glicosilación de las enzimas

Como lo indica la sección de Metodología se hizo un ensayo para conocer si la enzima silvestre y recombinante se encontraban glicosiladas. Las pruebas de glicosilación fueron positivas, aunque la tinción con el reactivo de Schiff de las exo- β -1,3-glucanasas silvestre y recombinante parece mostrar que tiene una baja cantidad de azúcares, ya que las bandas presentaron un color rosa muy tenue (**Figura 45**).

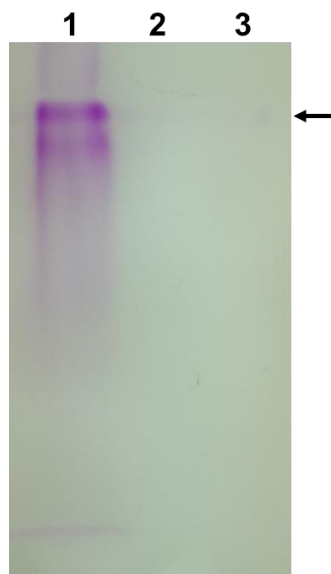


Figura 45. Análisis con el reactivo de Schiff.

1. Control positivo, invertasa de *S. cerevisiae*
2. $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$ -glucanasa purificada de *T. terrestris* Co3Bag1
3. $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$ -glucanasa recombinante purificada de *A. niger* CBS 513.88

Los resultados que se obtuvieron con el método de antrona, confirman los resultados con el reactivo de Schiff, ya que para la enzima silvestre y recombinante se obtuvieron 1.05 % y 1.21 % de glicosilación, respectivamente. Esto sugiere que las dos $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$ -glucanasas se encuentran muy poco glicosiladas.

7.16 Caracterización bioquímica de la $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$ -glucanasa recombinante

La $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$ -glucanasa recombinante *TtBgn31A* se purificó y se caracterizó bioquímicamente de acuerdo a la estrategia descrita en la sección “Materiales y métodos”, con la finalidad de comparar las propiedades bioquímicas de la enzima silvestre con la enzima recombinante. Los resultados se muestran a continuación.

7.16.1 Determinación del pH óptimo enzima recombinante

La actividad óptima de *TtBgn31A* recombinante fue a un pH de 6.5 (4.93 U/mg) (**Figura 46**) en el amortiguador de citratos 50 mM.

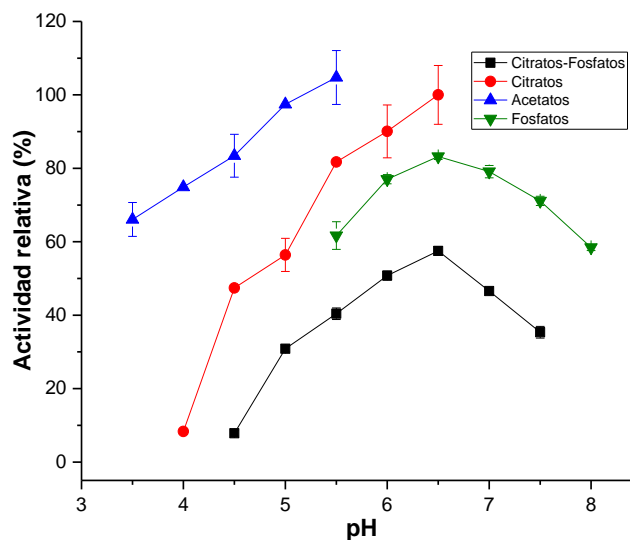


Figura 46. Efecto del pH en la actividad exo- β -1,3-glucanasa de la enzima recombinante

7.16.2 Estabilidad al pH de la β -1,3-glucanasa recombinante

En la **Figura 47** se observa que la enzima recombinante retiene más del 50 % de su actividad residual en el intervalo de 4.5 a 7.5 de pH. La máxima actividad fue definida como el 100 %. La actividad de la enzima al 100 % fue de 2.66 U/mg.

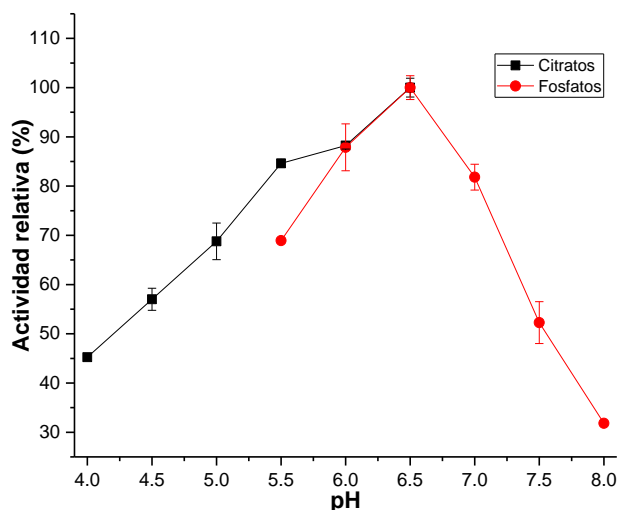


Figura 47. Estabilidad al pH de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante.

A partir del valor 4.5 y hasta 7.5 de pH en los amortiguadores de citratos y fosfatos, la exo- β -1,3-glucanasa presenta más del 50 % de su actividad residual.



7.16.3 Determinación de la temperatura óptima de la enzima recombinante

La enzima recombinante *TtBgn31A* purificada tuvo una temperatura óptima de 60 °C en amortiguador de citratos 50 mM, pH 6.5 con un valor de 4.74 U/mg. En la **Figura 48** se observa que en el intervalo de 20 a 70 °C mantiene más del 50 % de su actividad. Lo anterior nos indica que la enzima mantiene su actividad en un intervalo amplio de temperatura.

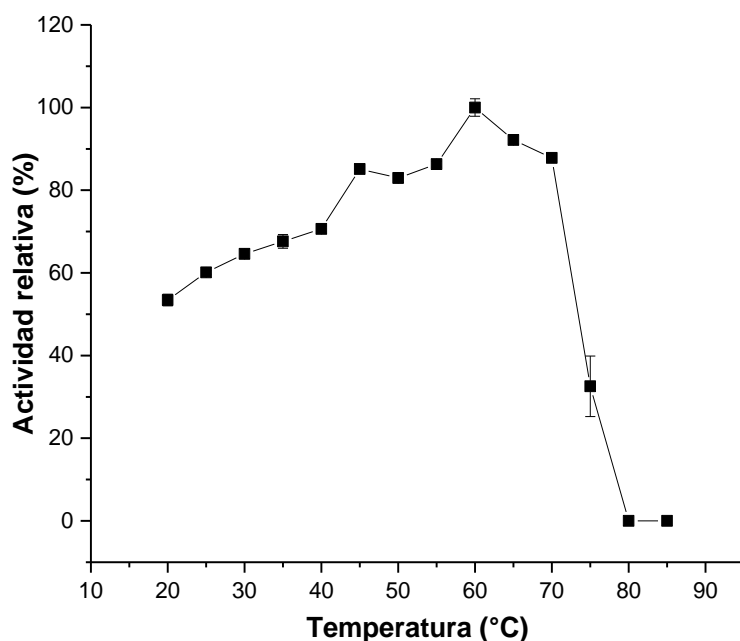


Figura 48. Efecto de la temperatura en la actividad exo- β -1,3-glucanasa recombinante

7.16.4 Estabilidad térmica de la β -1,3-glucanasa recombinante

La termoestabilidad de la β -1,3-glucanasa recombinante fue determinada a 50, 60, 65, 70 y 80 °C en amortiguador de citratos 50 mM, pH 6.5. En la **Figura 49** podemos observar el comportamiento de la actividad a esas temperaturas, *TtBgn31A* mostró buena estabilidad a 70 °C ($t_{1/2}$ 63 min) con una constante de velocidad de inactivación (k) de 0.0110 min⁻¹, y a 80 °C ($t_{1/2}$ 36 min) se observó una k 0.0189 min⁻¹. La enzima fue más estable a 50, 60 y 65 °C con una $t_{1/2}$ de 104, 100 y 94 min, respectivamente (**Figura 49**). La constante de velocidad de inactivación térmica a 50, 60 y 65 °C fue de 6.65 X 10⁻³, 6.74 X 10⁻³ y 7.32 X 10⁻³ min⁻¹, respectivamente. La máxima actividad fue definida como el 100 %. La actividad de la enzima al 100 % fue de 4.73 U/mg.

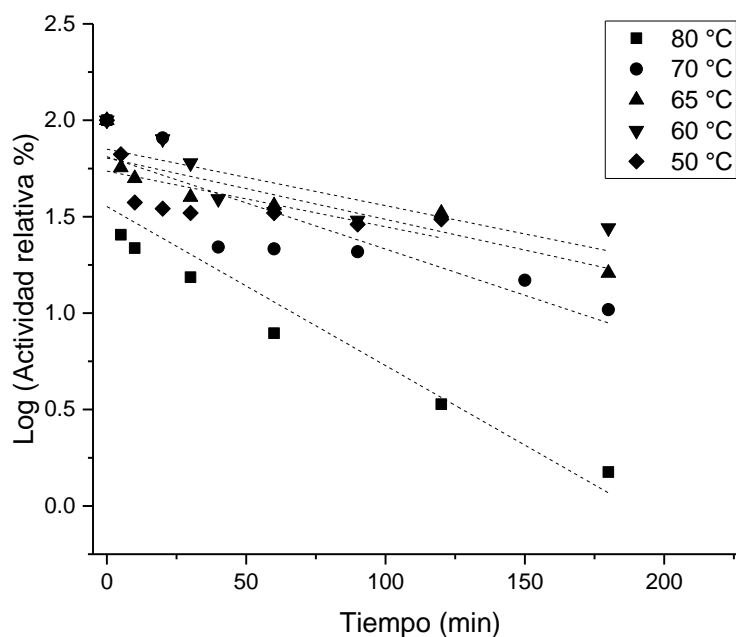


Figura 49. Estabilidad térmica de la exo-β-1,3-glucanasa recombinante

7.16.5 Efecto de iones metálicos sobre la actividad β-1,3-glucanasa recombinante

Los datos obtenidos indicaron que la presencia de los iones Mg^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} en las reacciones enzimáticas, a una concentración final de 5 mM, incrementaron la actividad en el orden que se muestra en la gráfica de la **Figura 46**, mientras que los iones Fe^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} y K^{1+} , a una concentración final de 1 mM, incrementaron la actividad enzimática (**Figura 46**). En cambio, el ion Hg^{2+} afectó negativamente la actividad enzimática, ya que abatió en su totalidad la actividad de β-1,3-glucanasa a 1 mM como a 5 mM. Cabe destacar que los iones Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} incrementaron de manera significativa la actividad β-1,3-glucanasa, 3.2, 4, 8.2 y 3.3 veces más que el control, respectivamente (**Figura 50**). La actividad enzimática se expresó como un porcentaje de la actividad observada en ausencia de cualquier ion metálico (control), que se tomó como 100 %. La actividad de la enzima al 100 % fue 3.06 U/mg.

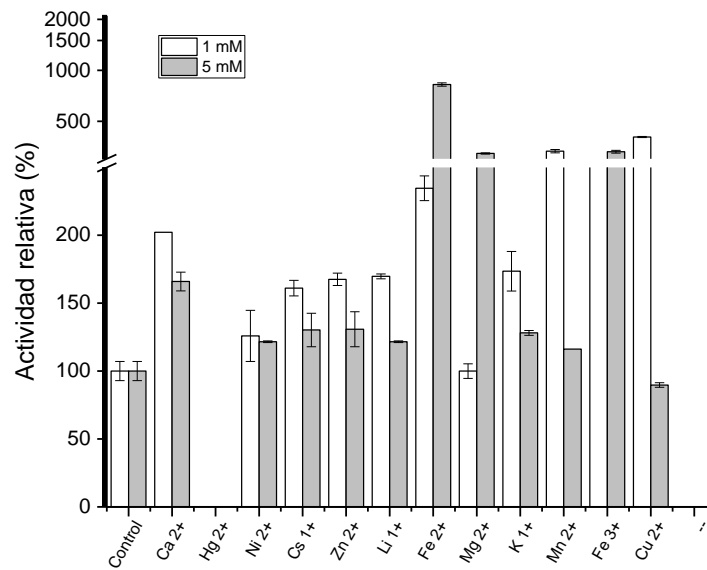


Figura 50. Efecto de los iones metálicos sobre la exo- β -1,3-glucanasa recombinante

7.16.6 Determinación de parámetros cinéticos de las exo- β -1,3-glucanasas

Al determinar los parámetros cinéticos, se usaron las condiciones de ensayo enzimáticas óptimas de cada enzima, utilizando diferentes concentraciones finales de laminarina, 0.25 a 10 mg/mL, para la enzima silvestre y de 0.25 a 20 mg/mL para la recombinante. Los valores finales obtenidos se usaron para analizarlos por el método de regresión no lineal por mínimos cuadrados con el programa OriginLab. Los resultados se muestran en la **Figura 51** y **Tabla 6**.

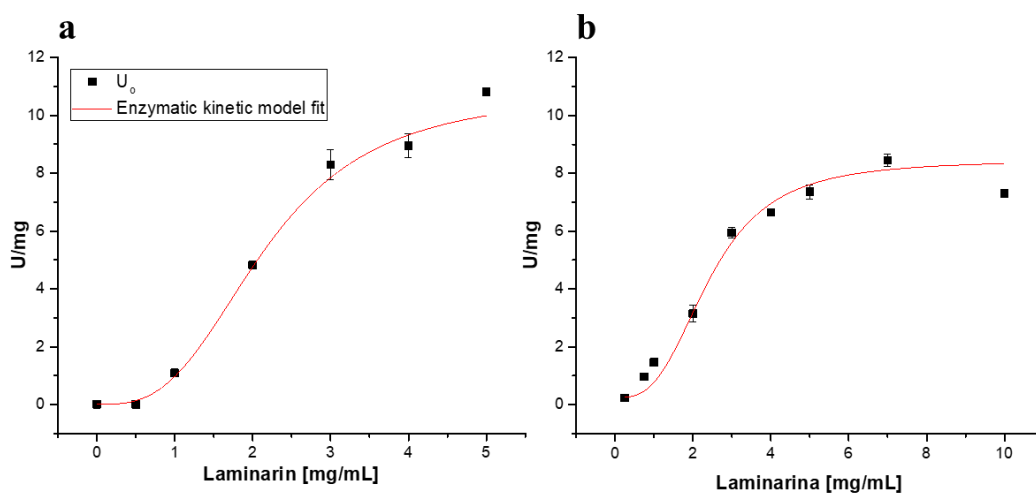


Figura 51. Cinética de actividad de las dos exo- β -1,3-glucanasas

Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad de *TtBgn31A*, laminarina fue usado como sustrato. Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se determinaron en condiciones óptimas de temperatura y pH.

a *TtBgn31A* silvestre de *T. terrestris* Co3Bag1

b *TtBgn31A* recombinante expresada por *A. niger*



Tabla 6. Parámetros bioquímicos de las exo- β -1,3-glucanasas

Parámetro	Silvestre	Recombinante
V_{max}	10.8 ± 0.01 U/mg	8.4 ± 0.02 U/mg
k_M	2.2 ± 0.17 mg/mL	2.4 ± 0.1 mg/mL

7.16.7 Especificidad a sustratos de la β -1,3-glucanasa recombinante

Para determinar la especificidad de las enzimas a varios sustratos, se siguieron las especificaciones mencionadas en Materiales y métodos. A continuación, se muestra la **Tabla 7** con los sustratos utilizados, sus características y la actividad relativa obtenida.

Tabla 7. Especificidad a sustratos de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante

Sustrato	Enlace	Actividad relativa (%)
Laminarina	β -1,3/ β -1,6	100 ± 4.17
Gentibiosa	β -1,6	71 ± 4.80
Curdlan	β -1,3	0
Celobiosa	β -1,4	0
Almidón	α -1,4/ α -1,6	0
Glucógeno	α -1,4/ α -1,6	0
Amilosa	α -1,4	0
Maltosa	α -1,4	0
Sacarosa	α -1,2	0
metil- α -D-glucopiranosido	α	0
metil- α -D-manopiranosido	α	0

Los resultados muestran que es altamente específica a enlaces β principalmente al sustrato laminarina y a gentiobiosa. La actividad se estimó como un porcentaje de la actividad enzimática obtenida con laminarina como sustrato, que se tomó como 100 %. La actividad de la enzima al 100 % fue de 2.80 U/mg.

7.16.8 Análisis de los productos de hidrólisis de la β -1,3-glucanasa recombinante

Al revelar las placas, como se indica en la sección de Materiales y métodos, se observa que la placa en donde se inyectaron las muestras de la incubación de laminarina/exo- β -1,3-glucanasa, el único producto de hidrólisis a través del tiempo fue glucosa (**Figura 52**).

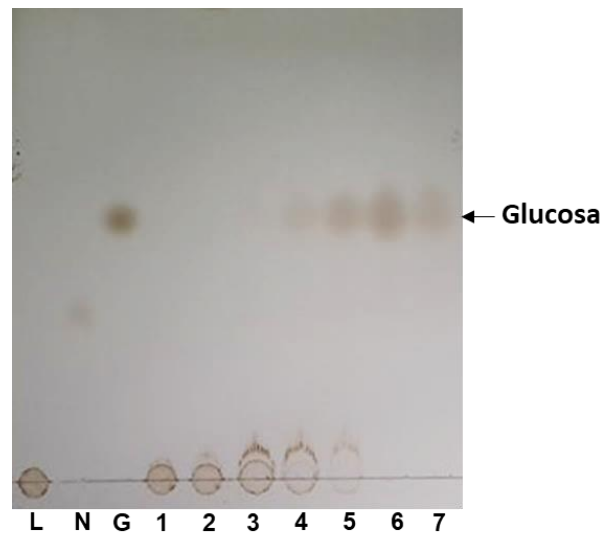


Figura 52. Productos de hidrólisis generados por la *exo*- β -1,3-glucanasa recombinante sobre laminarina.

Estándares: laminarina (L), gentiobiosa (N) y glucosa (G); Carriles (1-7) Diferentes tiempos de reacción para hidrólisis (0, 0.2, 0.4, 0.6, 2, 6, 12 h, respectivamente).

En la placa donde se inyectaron las muestras de la incubación de *p*NPG/*exo*- β -1,3-glucanasa, el único producto de hidrólisis a través del tiempo fue glucosa (**Figura 53**), este ensayo se hizo debido a que la enzima silvestre presentaba actividad sobre *p*NPG.

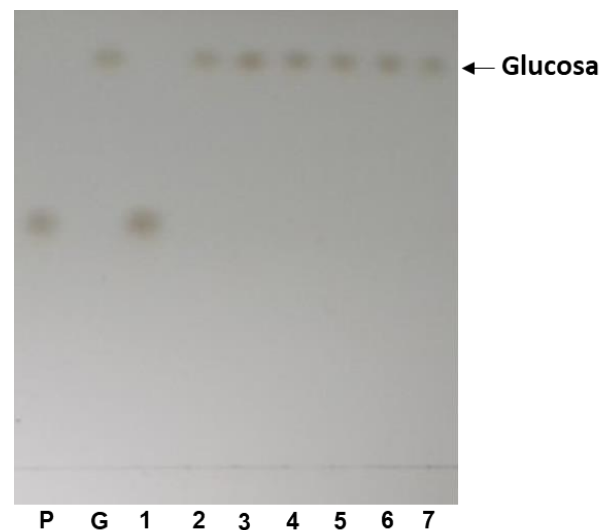


Figura 53. Productos de hidrólisis generados por la *exo*- β -1,3-glucanasa recombinante sobre *p*NPG

Los resultados muestran que al utilizar *p*NPG, el único producto de hidrólisis es glucosa, indicando que la enzima no presenta actividad de transglicosilación, bajo las condiciones probadas ya que no se forman otros subproductos como dímeros o trímeros de glucosa, también el ensayo muestra que la enzima actúa de manera *exo*, al ser glucosa el único producto generado. Recordando, *p*NPG es un sustrato sintético, que es



utilizado para determinar actividad exo- β -glucanasa a enzimas con actividad hidrolítica β , como en el caso de β -1,3-glucanasas fúngicas previamente reportadas

Los resultados obtenidos con el ensayo TLC, confirman la actividad hidrolítica exo- β -1,3, al generar únicamente glucosa como producto de hidrólisis.

7.17 Actividad glucanasa sobre salvados de cereales

Como se mencionó en Materiales y métodos, uno de los componentes principales de los salvados, son los β -glucanos con enlaces β -1,3 y β -1,4. Por esta razón, se tuvo interés por analizar el efecto enzimático sobre este tipo de residuos. En general, la estructura de los salvados de trigo y avena analizados mediante microscopia electrónica de barrido, antes y después del tratamiento enzimático, muestran diferencias tanto en su tamaño como en la forma.

La apariencia del salvado de trigo antes del tratamiento enzimático, muestra partículas redondeadas con un tamaño entre 10 y 50 μm (**Figura 54a**); después de 48 h de tratamiento enzimático con la exo- β -1,3-glucanasa recombinante, las partículas del salvado de avena se observaron irregulares, además de reducir su tamaño en un intervalo de 1 a 5 μm (**Figura 54b**). Claramente, se logra apreciar la separación o desprendimiento de los conglomerados que inicialmente se presentaban en el salvado sin tratamiento enzimático (**Figura 54a**).

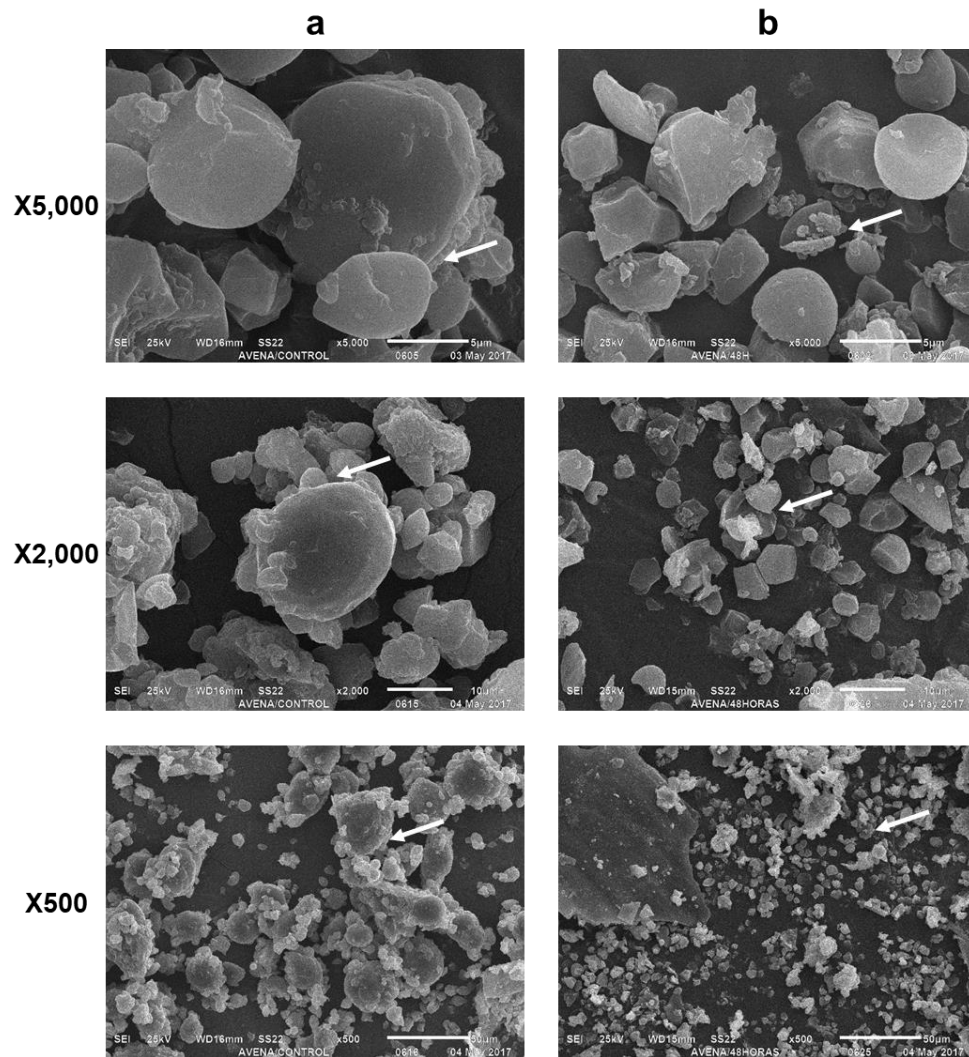


Figura 54. Micrografías electrónicas de barrido del salvado de avena

- a. Micrografías del salvado de avena sin tratamiento enzimático
- b. Micrografías del salvado de avena después de 48 h en presencia de la $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanasa}$ recombinante

En ambas muestras se presentan micrografías tomadas a objetivos de X5,000, X2,000 y X500, para apreciar el cambio de tamaño y forma de las muestras

Por otro lado, el cambio del salvado de trigo fue más evidente como lo muestra la **Figura 55**. El salvado de trigo sin tratamiento enzimático, muestra conglomerados más complejos de un tamaño aproximado de $150\ \mu\text{m}$ (**Figura 55a**), en cuya composición se observa, partículas redondeadas de un tamaño aproximado de 5 a $10\ \mu\text{m}$ unidas por algún tipo de materia (**Figura 55a**). El efecto de hidrólisis sobre el salvado de trigo de la $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanasa}$ recombinante, después de $48\ \text{h}$ de incubación, es más evidente que en el cambio del salvado de avena; se observa una separación total de los conglomerados que inicialmente se presentaban sin tratamiento enzimático, las esferas contenidas en los conglomerados se desprendieron conservando su tamaño, sin embargo la materia que los mantenía unidas fue dañada, apareciendo en pequeñas partículas de aproximadamente de $2\ \mu\text{m}$ (**Figura 55b**).

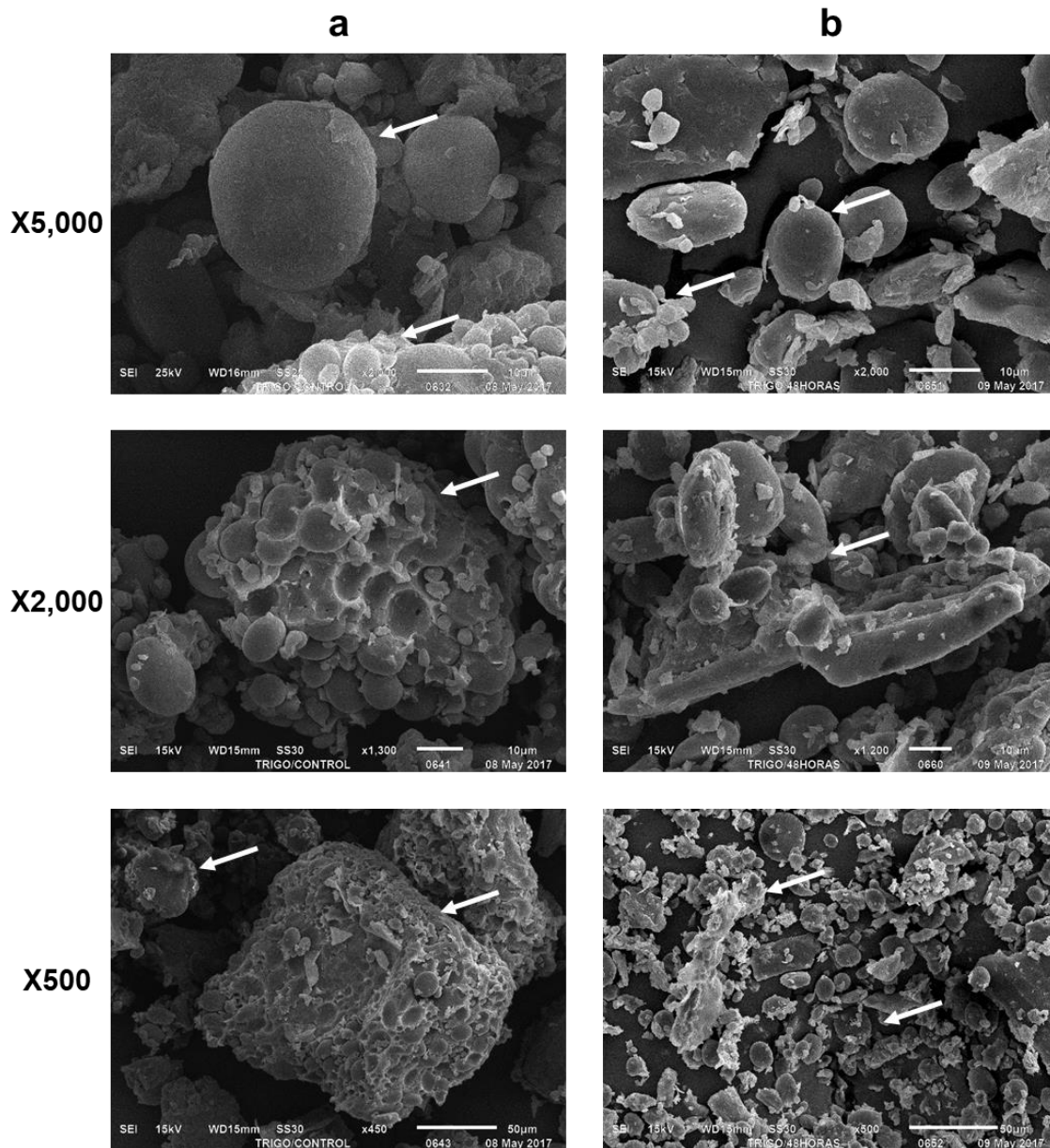


Figura 55. Micrografías electrónicas de barrido del salvado de trigo

a. Micrografías del salvado de trigo sin tratamiento enzimático

b. Micrografías del salvado de trigo después de 48 h en presencia de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante

En ambas muestras se presentan micrografías tomadas a objetivos de X2,000, X1,200 y X500, para apreciar el cambio de tamaño y forma de las muestras

7.18 Ensayo de confrontación de los hongos

El ensayo de confrontación de los hongos tuvo como objetivo verificar que el hongo productor de la enzima recombinante, tuviera un efecto antagonista hacia el hongo fiopatígeno (*Fusarium* sp.), por lo cual se siguió la metodología mencionada en Materiales y métodos. Bajo las condiciones *in vitro* ensayadas, el efecto antagonista de la clona de *A. niger* productora de la β -1,3-glucanasa recombinante contra *Fusarium* sp., muestran que existe un menor crecimiento de *Fusarium*. Este fenómeno se



observó, llevando el experimento durante 22 días, además, se observa que *Fusarium* sp. comienza a crecer a los lados de la placa, para no estar en contacto con el *A. niger* transformante (**Figura 56**). Es muy notable que *Fusarium* sp. comienza a crecer por la periferia de la placa rodeando al *A. niger* productora de la β -1,3-glucanasa.

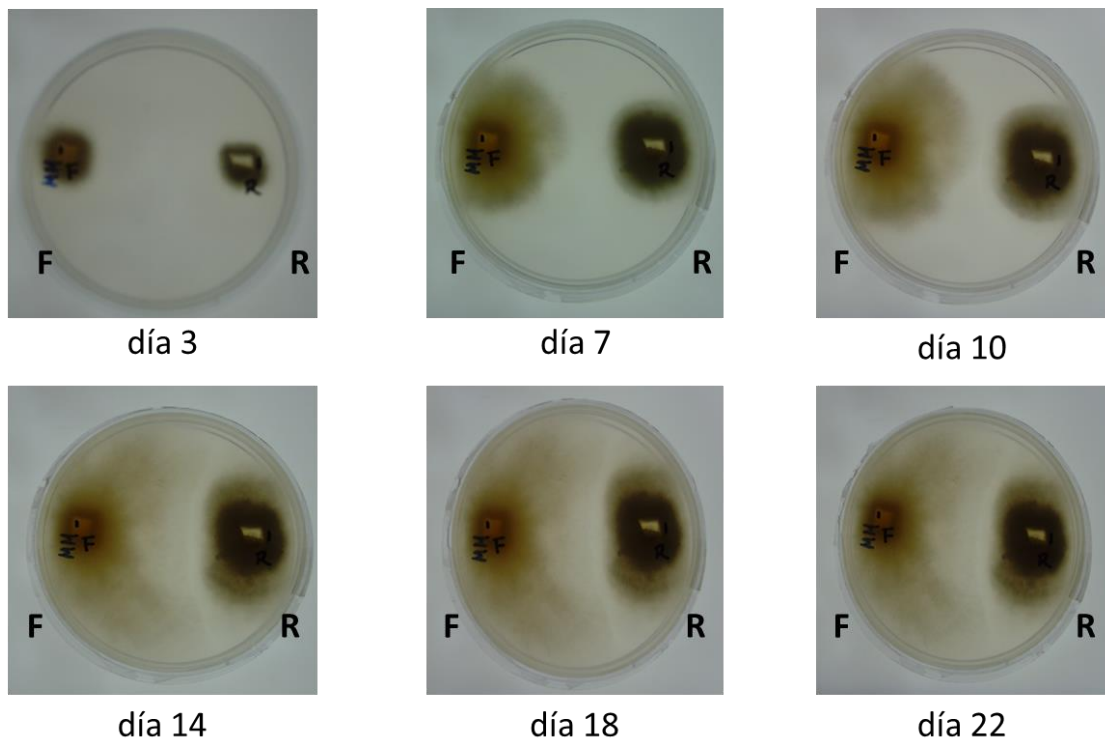


Figura 56. Confrontación de *A. niger* transformante vs. *Fusarium* sp.

Cocultivo de *Fusarium* sp. (F) y *A. niger* productora de *TtBgn31A* (R), se usó el medio mínimo para su crecimiento, el cual está limitado en fuente de carbono. El cultivo duró 22 días, mostrando un lento crecimiento por parte de *Fusarium* sp. desde el séptimo día.

Adicionalmente, se hicieron experimentos en las mismas condiciones colocando en confrontación a *A. niger* sin transformar y *Fusarium* sp., en este caso, el crecimiento de los dos hongos fue muy parejo, extendiéndose cada uno, en un 50 % en la placa (**Figura 57**). Es muy notable que *Fusarium* sp. crece rápidamente además de que se observa un acercamiento entre los hongos, en comparación con el experimento del *A. niger* recombinante.

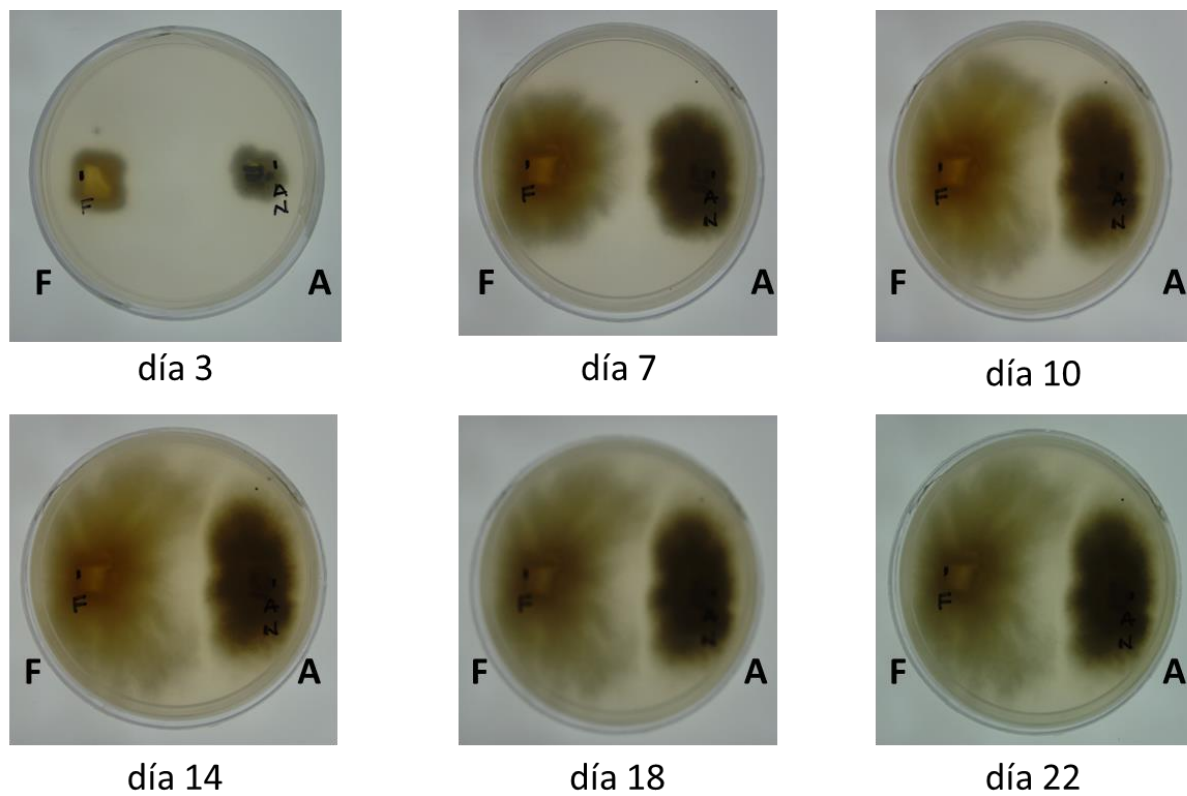


Figura 57. Confrontación de *A. niger* silvestre vs. *Fusarium* sp.

Cocultivo de *Fusarium* sp. (F) y *A. niger* productora silvestre (A), se usó el medio mínimo para su crecimiento, el cual está limitado en fuente de carbono. El cultivo duró 22 días, mostrando un rápido crecimiento por parte de *Fusarium* sp.



VIII DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se identificó la actividad exo- β -1,3-glucanasa relacionada a la cinética de crecimiento de *T. terrestris* Co3Bag1, utilizando como fuente de carbono glucosa al 1 %. Posteriormente, se purificó y caracterizó bioquímicamente la enzima responsable a dicha actividad, nombrada *TtBgn31A*. Adicionalmente, el gen *TtBgn31A* se localizó en el genoma de *T. terrestris* Co3Bag1, la finalidad fue clonar y expresar la enzima en *A. niger* CBS 513.88, ya que se trata de un organismo GRAS, esto permitiría en un futuro utilizar la enzima recombinante en algún proceso biotecnológico, principalmente en industrias como la alimenticia. La enzima recombinante fue purificada y caracterizada, permitiendo la comparación bioquímica de las dos enzimas.

Las β -1,3-glucanasas son enzimas producidas principalmente por organismos del reino de los hongos, y la mayoría de las β -1,3-glucanasas fúngicas descritas son extracelulares, secretadas en el medio tras la síntesis (Pitson *et al.*, 1993). Se ha informado que las β -1,3-glucanasas son de gran importancia por sus diversas actividades como la degradación de la pared celular en hongos fitopatógenos y para la obtención de fuente de carbono (Noronha & Ulhoa, 2000). Además, se ha descrito que el micoparasitismo generalmente se lleva a cabo mediante la producción de haustorios para penetrar las hifas y absorber los nutrientes de otros hongos, por ejemplo *Trichoderma* spp., que puede atacar a varios hongos, incluidas algunas especies relacionadas con *Trichoderma* (Cohen-Kupiec *et al.*, 1999). Se han propuesto algunas hipótesis para explicar cómo el hongo se protege contra sus propias enzimas líticas. Varios autores han propuesto la existencia de componentes específicos de la pared celular, por ejemplo, oligonucleótidosacáridos, capaces de actuar como inductores de ciertas enzimas líticas e incluso la posibilidad de que la presa fúngica se haya debilitado por una variedad de metabolitos secundarios en combinación con enzimas hidrolíticas. Esta mezcla secretada podría dañar las hifas fúngicas, permitiendo la liberación enzimática de oligonucleótidosacáridos, lo que a su vez induciría la expresión de más enzimas hidrolíticas (Gruber & Seidl-Seiboth, 2012). Desafortunadamente, hay poca información sobre la composición detallada de la pared celular de diferentes hongos, lo que podría ayudar a comprender este proceso. Finalmente, también se ha propuesto la idea de proteínas efectoras que están involucradas en la regulación de la degradación y la protección de la propia pared celular fúngica (Gruber & Seidl-Seiboth, 2012). Curiosamente, se ha observado la actividad de la β -1,3-glucanasa durante diferentes etapas de crecimiento y está fuertemente asociada con una baja concentración de fuente de carbono (Noronha & Ulhoa, 2000; Rapp, 1992; Stahmann *et al.*, 1992). Del mismo modo, la actividad de la β -1,3-glucanasa extracelular se relacionó con el crecimiento micelial como lo reportó Adams (2004).

Cabe mencionar que, al inicio de esta investigación, se evaluó la producción de la β -glucanasa por parte de *T. terrestris* Co3Bag1 cultivada en 1 y 3 % glucosa o 4 % salvado de trigo como fuente de carbono. Los



resultados con un 3 % de glucosa como fuente de carbono, sugieren la existencia de la represión catabólica del carbono (RCC) para la producción de la actividad de β -1,3-glucanasa por *T. terrestris* Co3Bag1. La RCC es un mecanismo regulatorio global que se encuentra en los microorganismos, pero no se detalla bioquímicamente sobre este proceso en hongos filamentosos, aunque se han hecho algunos avances en el estudio de los mediadores de la RCC en el hongo *Magnaporthe oryzae* (Fernandez *et al.*, 2012).

La actividad de exo- β -1,3-glucanasa se presentó a lo largo de toda la cinética, observando los valores más altos al cultivar el hongo en glucosa al 1 %. De manera similar, en *C. albicans* se ha demostrado que la actividad extracelular β -1,3-glucanasa se produce en todas las fases de crecimiento celular, además de que se mantiene estable en la fase estacionaria, mostrando la mayor actividad de la enzima al inicio de la fase exponencial (Chambers *et al.*, 1993). Tratando de explicar estos hallazgos, se ha sugerido que la enzima también está involucrada en la salida de hifas de las esporas y otros procesos morfogénicos (Crognale & Bruno, 2007).

Con esos resultados, se estableció el medio de cultivo para la producción de la β -1,3-glucanasa por el hongo *T. terrestris* Co3Bag1, en el cual se utilizó glucosa al 1 % como fuente de carbono. Se hicieron cinéticas utilizando este medio de cultivo, identificándose el mayor punto de actividad en el día seis cuyo valor es de 0.78 U/mL. El mayor valor de actividad concuerda con el inicio de la fase estacionaria de *T. terrestris* Co3Bag1 y con un valor crítico en la concentración de fuente de carbono. Esto es curioso ya que a la enzima se le atribuyen funciones como la remodelación de la pared celular, expansión de las hifas por el crecimiento, y generación de fuente de carbono cuando el microorganismo se encuentra en un estado de limitación de nutrientes. Tomando este último punto, también se puede observar en la gráfica, que la concentración de glucosa utilizada como fuente de carbono está muy bajo al décimo tercer día (0.13 g/L).

Posteriormente, se establecieron los pasos de purificación de la exo- β -1,3-glucanasa del hongo *T. terrestris* Co3Bag1, al hacer los análisis electroforéticos se observó una banda de 129 kDa con un alto grado de pureza. El rendimiento de las dos columnas (AEC y GFC) fue demasiado bajo, probablemente debido a que la enzima perdió su actividad durante la purificación. Además, la cantidad de proteína de la enzima purificada (5.2 μ g) podría parecer muy poco en el análisis SDS-PAGE al 10 %, probablemente debido a las limitaciones intrínsecas descritas previamente para la tinción con azul de Coomassie: i) la reproducibilidad de la tinción es difícil de controlar porque las proteínas pueden desteñirse en diferentes grados junto con la matriz del gel, aunque con una cinética más lenta, y ii) las limitaciones principales con el azul de Coomassie y las tinciones de azul de Coomassie coloidal son su escasa sensibilidad (Zhou & Yu, 2003).

Después de purificar la enzima, la banda se envió a secuenciar y en los resultados de la secuenciación de la banda de 129 kDa, se determinó que la enzima purificada tenía un alto porcentaje de identidad con una secuencia de *T. terrestris* NRRL8126 anotada como una enzima putativa de la familia GH31. Estas enzimas son el segundo grupo de enzimas más numerosas que hay en las glicosil hidrolasas, son ampliamente



distribuidas en arqueas, bacterias, hongos, levaduras, plantas y mamíferos. En hongos presentan actividades principalmente de α -1,4-D-glucosidasa y de α -D-xilosidasa. Se han identificado algunas otras actividades como α -glucosidasa (EC 3.2.1.20), α -1,3-glucosidasa (EC 3.2.1.84), sacarosa-isomaltasa (EC 3.2.1.48 y 3.2.1.10), α -xilosidasa (EC 3.2.1.177), α -glucan liasa (EC 4.2.2.13), isomaltosiltransferasa (EC 2.4.1.X), α -mannosidasa (EC 3.2.1.24) y oligonucleótidosacarido α -1,4-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.161), perteneciendo al clan GH-D debido a la remota homología con las GH27 y GH36. Sugiriendo en ese momento que la enzima purificada era la primera enzima con actividad hidrolítica β -1,3 perteneciente a la familia GH31, por lo que se le denominó *TtBgn31A*.

La *TtBgn31A* purificada exhibió una actividad específica de 6.0 U/mg, que fue notablemente más alta que los valores reportados para otras exo- β -1,3-glucanasas fúngicas. Por ejemplo, la exo- β -1,3-glucanasa de *Rhizoctonia solani* (0.26 U/mg) (Vijayendra & Kashiwagi, 2009) ; y similar a la actividad específica de la exo- β -1,3-glucanasa de *T. asperellum* (7.7 U/mg) (Bara *et al.*, 2003).

Al determinar los valores óptimos de temperatura y pH de la exo- β -1,3-glucanasa, se observa que su pH óptimo es de 6.0 en amortiguador de Citratos-Fosfatos, el cual es similar a las exo- β -1,3-glucanasas de *F. imperfecti* (Nagasaki *et al.*, 1977), *Achlya bisexualis* (Du & Mullins, 1999), *Chaetomium* sp. (Sun *et al.*, 2006), *Pichia pastoris* (Xu *et al.*, 2006), *Periconia byssoides* (Lin *et al.*, 2007) y *C. thermophilum* (Li *et al.*, 2007). Sin embargo, en un intervalo de pH de 4.5 a 7.0 la enzima conserva más del 50 % de actividad después de la preincubación a 25 °C durante 2.5 h; mientras que la estabilidad del pH de las β -1,3-glucanasas fúngicas generalmente se encuentra en el intervalo de 4.0-7.0 durante algunos minutos, por ejemplo, la β -glucanasa de *C. thermophilum* (Li *et al.*, 2007). La pérdida de actividad enzimática a diferentes valores de pH puede deberse al cambio en el estado de ionización de algunos residuos de aminoácidos que podría conducir a cambios conformacionales en la estructura 3D global de la enzima, incluido el sitio activo, afectando así su actividad catalítica (Bisswanger, 2014).

La temperatura óptima de *TtBgn31A* fue de 70 °C, siendo más alta que las reportadas exo- β -1,3-glucanasas de *Acremonium persicinum* (65 °C), *Rasamsonia emersonii* (65 °C), *Aspergillus phoenicis* (50 °C) (Kasahara *et al.*, 1992) y *Chaetomium* sp. (30 °C). La estabilidad térmica de *TtBgn31A* ($t_{1/2}$ fue de 54 y 37 min a 50 y 60 °C, respectivamente) mayor que la reportada previamente para la exo- β -1,3-glucanasa fúngica de *Saccharomyces cerevisiae*, estable a 50 °C durante 30 minutos, pero después de este tiempo cesó la actividad enzimática (Suzuki *et al.*, 2001); mientras que la exo- β -1,3-glucanasa de *T. reesei* perdió toda su actividad incubando a 60 °C durante 15 min (Bamforth, 1980), y la exo- β -1,3-glucanasa de *Chaetomium* sp. se inactivó por encima de 60 °C a los 30 min (Sun *et al.*, 2006). Sin embargo, la estabilidad térmica de *TtBgn31A* a temperaturas más altas fue menor que la reportada para la exo- β -1,3-glucanasa de *C. thermophilum* ($t_{1/2}$ de 55 y 21.5 minutos a 65 y 70 °C, respectivamente) (Li *et al.*, 2007); pero similar a la observada para la exo- β -1,3-glucanasa de *Chaetomium* sp. ($t_{1/2}$ de 5 min a 80 °C) (Sun *et al.*, 2006).



Curiosamente, se observó un aumento de 200, 230 y 510 % en la actividad de *TfBgn31A* en presencia de los iones metálicos Li^+ , Fe^{2+} a 5 mM cada uno y Cu^{2+} al 1 mM, respectivamente. En contraste, se reportó un aumento de 181 % en la actividad de la exo- β -1,3-glucanasa fúngica de *Cyberlindnear saturnus* en presencia de ion Li^+ al 10 mM (Peng *et al.*, 2009); mientras que se registró una disminución del 18 % para la exo- β -1,3-glucanasa fúngica de *T. emersonii* con ion Cu^{2+} al 10 mM (O'Connell *et al.*, 2011). La actividad enzimática de *TfBgn31A* se inhibió por completo en presencia de CaCl_2 al 1 mM, sin embargo, se detectó un 28 % de la actividad original a 5 mM de este ion metálico. De acuerdo con estos hallazgos, se observó una disminución más profunda en la actividad enzimática a baja concentración de CaCl_2 en comparación con la reportada a mayores concentraciones de este ion metálico, por ejemplo, para β -1,3-glucanasas de *C. immitis* (Kruse & Cole, 1992), la enzima de la levadura marina *W. saturnus* WC91-2 (Peng *et al.*, 2009) y de *T. emersonii* (O'Connell *et al.*, 2011). Con el fin de comprender el alto efecto de inhibición de Ca^{2+} a una concentración relativamente baja (1 mM), el ensayo de β -1,3-glucanasa podría estudiarse mediante métodos bioquímicos en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} y agentes quelantes, por ejemplo, EDTA o EGTA, para confirmar el efecto inhibitorio de Ca^{2+} a bajas concentraciones, como se describe para la β -1,3-glucanasa de *Coccidioides immitis* (Kruse & Cole 1992). Además, sería interesante llevar a cabo estudios estructurales mediante cristalografía de rayos X de *TfBgn31A* y su interacción con laminarina en presencia de Ca^{2+} en diferentes concentraciones. Además, el último enfoque puede proporcionar evidencia experimental si alguno de los cambios estructurales de conformación en el complejo enzima-sustrato a una concentración relativamente alta de Ca^{2+} por ejemplo 2.5 a 10 mM, que podría conducir a una mejor accesibilidad del sustrato, y en consecuencia a una mayor actividad de β -1,3-glucanasa. Hasta el momento, no existe un patrón claro para predecir qué ion conducirá a una mejora o reducción dramática en la actividad enzimática (van Wyk *et al.*, 2013).

Tomando en cuenta la información de la secuenciación, se hizo la especificidad a sustratos, ocupando con enlaces β y α . Los resultados demostraron algo muy interesante, pues la mayor actividad se presentó al utilizar laminarina, un glucano con enlace β -1,3 y *p*NPG, utilizando las condiciones óptimas determinadas en los ensayos enzimáticos. La mayor actividad se presentó al utilizar *p*NPG, aumentando 15 veces la actividad en comparación que con laminarina (sustrato que se ha utilizado para toda la caracterización bioquímica de la enzima). Estos hallazgos coinciden con los observados para las β -1,3-glucanasas reportadas previamente, por ejemplo, de *P. chrysosporium* (Kawai *et al.*, 2006), *T. emersonii* (O'Connell *et al.*, 2011), *Penicillium* sp. (Ooi *et al.*, 2009), *A. persicinum* (Pitson *et al.*, 1995), *S. cerevisiae* (Suzuki *et al.*, 2001) y *P. pastoris* (Xu *et al.*, 2006). Por lo tanto, los hallazgos aquí sugieren fuertemente que *TfBgn31A* es una exo- β -1,3-glucanasa. La enzima mostró un bajo nivel de actividad en gentibiosa. Asimismo, se encontró un bajo nivel de actividad para una exo- β -1,3-glucanasa de *P. pastoris* con gentiobiosa como sustrato (Xu *et al.*, 2006). *TfBgn31A* no mostró actividad en curdlan, incluso cuando este sustrato también tiene enlaces



β -1,3. De acuerdo con este hallazgo, se ha reportado que algunas β -1,3-glucanasas tienen una actividad elevada en laminarina, pero poca o ninguna actividad en otros polisacáridos unidos por enlaces β -1,3, por ejemplo para la β -1,3-glucanasas de *A. persicinum* (Pitson *et al.*, 1995), *Ganoderma tsugae* (Liang *et al.*, 1995), *Hordeum vulgare* (Kotake *et al.*, 1997), *A. fumigatus* (Fontaine *et al.*, 1997), *P. chrysosporium* (Kawai *et al.*, 2006), *Acremonium blochii* (Martin *et al.*, 2006), *Penicillium* sp. (Ooi *et al.*, 2009), *Podospora anserina* (Lafond *et al.*, 2012) y *Penicillium rolfsii* (Lee *et al.*, 2014).

Los resultados de este trabajo comprueban que se trata de una exo- β -1,3-glucanasa, debido a que los ensayos de especificidad a sustrato, muestran que la enzima presenta mayor actividad por laminarina y en especial por pNPG, cuya actividad incrementa 15 veces con respecto a laminarina. Hasta el momento no se tiene reportes de una enzima de la familia GH31 con actividad hidrolítica β -1,3.

Los valores aparentes de K_M y V_{max} para *TtBgn31A* se determinaron usando laminarina y pNPG como sustratos. Curiosamente, se observó un comportamiento sigmoideal con laminarina como sustrato; mientras que en el caso de pNPG, se obtuvo una curva hiperbólica típica. De acuerdo con nuestros resultados, también se ha reportado un comportamiento sigmoideal para la determinación de valores aparentes de K_M y V_{max} para β -1,3-glucanasas y otras enzimas, utilizando sustratos complejos, por ejemplo la β -1,3-glucanasa de *Strongylocentrotus purpuratus* (Talbot & Vacquier, 1982), la β -1,3-glucanasa de *Vibrio campbellii* (Wang *et al.*, 2015), la glucomanana de un consorcio microbiano aislado del estómago de un rumiante (Palackal *et al.*, 2007), y una α -L-rhamnosidasa (Ram2) de *Pediococcus acidilactoci* (Michlmayr *et al.*, 2011); sin embargo, cuando se usaron sustratos sintéticos para la determinación de K_M y V_{max} , se obtuvo una curva típica del modelo de Michaelis-Menten para una α -L-rhamnosidasa (Ram2) de *P. acidilactoci* (Michlmayr *et al.*, 2011). El valor de K_M de *TtBgn31A* para laminarina como sustrato fue de 2.2 mg mL⁻¹, similar al valor de K_M reportado para la exo- β -1,3-glucanasa (2.5 mg mL⁻¹) de *A. phoenicis* (Kasahara *et al.*, 1992), y más baja que la reportada de *Schizosaccharomyces japonicus* (6.25 mg mL⁻¹) (Fleet & Phaff, 1975) y *Candida albicans* (3.8 mg mL⁻¹) (Mackenzie *et al.*, 1997). El valor de V_{max} de *TtBgn31A* (10.8 U/mg) fue más alto que el valor reportado para la de *R. solani* (0.27 U/mg) (Vijayendra & Kashiwagi, 2009), y más baja que para la de *P. anomala* (350 U/mg) (Ízgu *et al.*, 2006). El valor de K_M de *TtBgn31A* para pNPG como sustrato fue de 0.035 mM, el cual es 68 veces más baja que para la reportada de *C. albicans* (2.4 mM) (Stubbs *et al.*, 1999).

Con base al análisis de TLC, *TtBgn31A* es una enzima de tipo exo debido a su capacidad para liberar principalmente glucosa y gentibiosa de la laminarina y glucosa de pNPG; sin embargo, se observaron varios compuestos de alto peso molecular en el análisis usando laminarina como sustrato. Se han informado varias exo- β -1,3-glucanasas fúngicas con actividad exo en laminarina y pNPG previamente, por ejemplo, las exo- β -1,3-glucanasas de *T. emersonii*. (O'Connell *et al.*, 2011), *T. asperellum* (Bara *et al.*, 2003) y *C. albicans* (Nakatani *et al.*, 2014). Experimentos han revelado que las exo- β -1,3-glucanasas purificadas pueden hidrolizar tanto la laminarina como el pNPG, pero las endo- β -1,3-glucanasas no hidrolizan el pNPG (Hrmova



et al., 1996). Además de esto, las endo- β -1,3-glucanasas producen laminarioligo sacáridos, por ejemplo, las endo- β -1,3-glucanasas de *A. fumigatus* (Fontaine *et al.*, 1997).

La proteína GH31 de *T. terrestris* NRRL 8126 mostró residuos conservados característicos de la familia GH31 (**Figura S1, ANEXO A**), lo que sugiere que esta enzima puede clasificarse como un miembro de la familia GH31. Esto implica que *TtBgn31A* de *T. terrestris* Co3Bag1 también puede clasificarse en esa familia de glicosil hidrolasas; siendo la primera enzima perteneciente a la familia GH31 que manifiesta actividad hidrolítica β -1,3.

Por otro lado, se logró amplificar y obtener la secuencia correspondiente al gen de la exo- β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1, utilizando el genoma secuenciado del hongo del laboratorio. El análisis del gen, mostró que al igual que el gen reportado en la base de datos de *T. terrestris* NRRL8126, está constituido por 8 exones y 7 intrones. Los ORFs son del mismo tamaño y codifican una enzima de 1195 aminoácidos con una masa molecular teórica calculada de 131 kDa. La exo- β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1 y la enzima de *T. terrestris* NRRL8126 (base de datos) son del mismo tamaño, pero, sólo 1132 aminoácidos son idénticos, 34 aminoácidos son similares y 29 no pertenecen al mismo grupo, teniendo un 95 % de identidad a nivel aminoacídico, esos aminoácidos diferentes podrían dar la característica particular de la exo- β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1, como la temperatura óptima y principalmente, la actividad hidrolítica, exo- β -1,3 perteneciente a la familia GH31, ya que hasta el momento no se tienen reportes en la base de datos de una exo- β -1,3-glucanasa en la familia GH31.

La determinación y análisis de la información de la estructura terciaria de *TtBgn31A* de *T. terrestris* Co3Bag1, indicó que mostró tener homología estructural principalmente con α -glucosidasas de la familia GH31 de organismos como arqueas, bacterias y organismos superiores como humano y plantas, pero no, con enzimas fúngicas, ni con enzimas con actividad β -1,3-glucanasa. Este análisis *in silico* refuerza la información obtenida de los ensayos bioquímicos hechos a la exo- β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* Co3Bag1, que hasta la fecha sería la primera de la familia GH31.

La reciente metodología que se usó para transformar *A. niger* CBS 513.88, mostró ser eficiente debido a que todas las colonias que se obtuvieron mostraron la presencia del transgen *TtBgn31A*, al amplificar dicha secuencia, utilizando como muestra el DNA total extraído de las clonas transformantes de *A. niger*. Por otro lado, la confirmación de la actividad enzimática durante la cinética de las clonas transformantes, reveló que la enzima recombinante, correspondiente a cada clona, se secretaba al medio de cultivo de manera funcional, además de que la mayoría de las clonas producían la mayor actividad exo- β -1,3-glucanasa al cuarto día de cultivo, contrastando con el control negativo, el cual era un cultivo de *A. niger* CBS 513.88 sin transformar, este cultivo no presentó actividad exo- β -1,3-glucanasa en los primeros seis días de cultivo, presentándose solo cuando la fuente de carbono se encuentra limitante. Prueba de lo dicho anteriormente, es que todos los transformantes obtenidos presentaron lisis celular, el sobrenadante de cultivo tenía paredes



celulares degradadas, un día después de la mayor actividad enzimática, posiblemente la lisis celular se presentó al acumularse la exo- β -glucanasa recombinante.

Destacando los resultados de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante expresada en *A. niger* CBS 513.88, la enzima tuvo una actividad específica de 4.78 U/mg y un factor de purificación de 31.87. Al hacer los análisis electroforéticos al final de la purificación, se observó una banda con un alto grado de pureza de 129 kDa, de igual forma que para la enzima silvestre producida por *T. terrestris* Co3Bag1, para corroborar que no existiera alguna enzima con esa masa, se colocó una muestra de cultivo de *A. niger* CBS 512.88 sin transformar, como control negativo.

Al determinar los valores óptimos de temperatura y pH de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante, se observa que su temperatura óptima es de 60 °C, siendo inferior 10 °C que la enzima silvestre. Por otro lado, se identificó que el pH óptimo de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante es de 6.5, 0.5 unidades por arriba de la enzima silvestre (6.0). Otro dato interesante fue la estabilidad a pH, cuyos resultados indican que retiene más del 50 % de actividad residual en un intervalo de pH de 4.5 a 7.0, idéntico que lo que se obtuvo para la enzima silvestre.

Tomando en cuenta los análisis hechos con respecto al efecto de los iones metálicos, hay que destacar que los iones Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} incrementaron de manera significativa la actividad exo- β -1,3-glucanasa, 3.2, 4, 8.2 y 3.3 veces, respectivamente, mientras que con la enzima silvestre, los iones Cu^{2+} , Li^{1+} y Fe^{2+} incrementaron de manera significativa la actividad enzimática con respecto a los testigos que no tenían ningún ion metálico, 5.1, 2 y 2.3 veces, respectivamente.

Cuando se determinó la estabilidad térmica de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante a 50, 60, 65, 70 y 80 °C en amortiguador de citratos 50 mM, pH 6.5; la vida media para 80 °C fue de 36 min, mientras que para la enzima silvestre fue de 1.6 min. A 70 °C la glucanasa recombinante tuvo una vida media de 63 min, mientras que la silvestre tuvo un valor de 3.6 min. A 65 °C tuvo una vida media de 94 min, mientras que la silvestre es de 55 min. A 60 °C la glucanasa recombinante mostró un valor de 102 min, mientras que la silvestre fue de 37.2 min. La enzima recombinante a 50 °C exhibió una vida media de 104 min mientras que la silvestre tuvo un valor de 89.9 min. Los valores de vida media a las temperaturas estudiadas fueron mejores para la enzima recombinante expresada en *A. niger*, esto podría deberse a los aminoácidos diferentes que tienen y produzca un cambio conformacional en las estructuras de las enzimas. En algunos procesos industriales como en la elaboración de jugos, vinos y cervezas, así como en la producción de piensos, se usan β -glucanasas a temperaturas que abarcan desde los 40 hasta los 80 °C, por algunos minutos.

En la obtención de los parámetros cinéticos, se observó un comportamiento sigmoide para la enzima recombinante, fenómeno similar que para la enzima silvestre. Los valores de los parámetros cinéticos para



la enzima recombinante fueron, una K_M de 2.4 mg/mL y una V_{max} de 8.4 U/mg. Mientras que la enzima silvestre tiene unos valores de K_M de 2.2 mg/mL y una V_{max} de 10.8 U/mg.

Para los ensayos de TLC, en donde se utilizó la misma metodología que en la enzima silvestre, el TLC demuestra que la enzima hidroliza laminarina y genera glucosa como único producto de hidrólisis. Adicionalmente, en la placa del ensayo laminarina/enzima no se observa la liberación de gentiobiosa, como en el ensayo de la enzima silvestre. Este resultado, fortalece lo obtenido en la especificidad a sustratos, ya que la enzima recombinante presenta actividad con gentiobiosa. Este ensayo nos indica que la actividad enzimática es exo- β -1,3-glucanasa, debido a que la cadena principal de laminarina es un polímero de aproximadamente 28 monómeros de glucosa unidas por enlace β -1,3. Además, laminarina tiene aproximadamente en cada 7 glucosas de la cadena principal, una ramificación de dos glucosas unidas por enlace β -1,6, este dímero de glucosa es conocido como gentiobiosa.

Algunas de las principales propiedades bioquímicas de las enzimas muestran que *TtBgn31A* (silvestre) presenta mejores propiedades de termoestabilidad en comparación con *TtBgn31Ar* (recombinante) en las cinco temperaturas estudiadas. Sin embargo, la mayor actividad enzimática de *TtBgn31A* se presenta cuando la enzima se incubó a 70 °C, mientras que *TtBgn31Ar* tienen su mayor actividad a 60 °C. Las dos enzimas tienen el mismo intervalo de estabilidad a pH (4.5-7.0), también, incrementan su actividad en presencia de varios iones metálicos en especial con Fe^{2+} , Mn^{2+} y Cu^{2+} . Los parámetros cinéticos como la K_M y V_{max} no tienen diferencia significativa, considerando la tendencia del estudio de las velocidades iniciales de reacción, sugiriendo que los cambios que pudieron generarse en la conformación estructural de la enzima no afectaron en gran medida estos parámetros. Los productos de hidrólisis sugieren que las dos enzimas tienen actividad exo glucanasa al usar como sustrato laminarina, *TtBgn31A* produce glucosa como producto mayoritario y gentiobiosa como subproductos, esto debido a que laminarina presenta al menos 3 ramificaciones cortas de gentiobiosa, las cuales no pueden ser hidrolizadas por la enzima. Sin embargo, *TtBgn31Ar* genera glucosa como único producto en la actividad, mostrando que la enzima presenta cierta especificidad hacia gentiobiosa; el resultado de la especificidad a sustratos concuerda con el ensayo de TLC (Tabla 8).



Tabla 8. Comparación bioquímica de *TfBgn31A* y *TfBgn31Ar*

Familia		
Masa molecular	129 kDa	
pH óptimo	6.0	6.5
Estabilidad a pH >50 %	4.5–7.0	
Temperatura óptima	70 °C	60 °C
Termoestabilidad ($t_{1/2}$)	80 °C (2 min) 70 °C (13 min) 65 °C (18 min) 60 °C (37 min) 50 °C (90 min)	80 °C (36 min) (↑18) 70 °C (63 min) (↑5) 65 °C (94 min) (↑5) 60 °C (100 min) (↑3) 50 °C (140 min) (↑1.5)
Efecto de iones metálicos	Fe ²⁺ 234 % Mn ²⁺ 167 % Cu ²⁺ 515 % (↑1.3)	Fe ²⁺ 824 % (↑3.5) Mn ²⁺ 332 % (↑1.2) Cu ²⁺ 403 %
Datos cinéticos	$k_M = 2.1$ mg/mL $V_{max} = 10.8$ U/mg	$k_M = 2.4$ mg/mL $V_{max} = 8.4$ U/mg
Productos de hidrólisis (actividad exo)	Glucosa y Gentibiosa	Glucosa

Por otro lado, la placa del ensayo de TLC *p*NPG/enzima, demuestran que la enzima no tiene actividad transglucosilasa, ya que el único producto formado en todos los tiempos es glucosa. Este mismo ensayo refuerza la información en donde se dice que tiene actividad exo, debido a que el *p*NPG es un sustrato sintético utilizado para determinar actividad exo- β -1,3-glucanasa (Hrmova *et al.*, 1996, Kruse *et al.*, 1992, Kotake *et al.*, 1997 Xin Du *et al.*, 1999). Hasta el momento no se tiene reportes de una enzima de la familia GH31 con actividad hidrolítica β -1,3.

Los ensayos preliminares sobre la aplicación de la β -1,3-glucanasa recombinante, demuestran que el salvado de trigo sin tratamiento enzimático, tiene conglomerados más complejos de un tamaño aproximado de 150 μ m, en cuya composición se observa, partículas redondeadas de un tamaño aproximado de 5 a 10 μ m, unidas por algún tipo de materia. El efecto de hidrólisis sobre el salvado de trigo de la exo- β -1,3-glucanasa recombinante, después de 48 h de incubación, es más evidente el cambio que con el salvado de avena. Se observa una separación total de los conglomerados que inicialmente se presentaban sin tratamiento enzimático, las esferas contenidas en los conglomerados se desprendieron. Esos datos indican



que la enzima tiene actividad sobre los salvados, principalmente en el salvado de trigo y pudiera ser utilizada para la fabricación de piensos y solucionar el problema que se presenta al tratar de alimentar al ganado con residuos agroalimenticios de difícil digestión.

Otra de las posibles aplicaciones de la β -1,3-glucanasa es como control biológico contra fitopatógenos. Se sabe que *Trichoderma* es uno de los posibles agentes de control biológico y que su potencial, todavía está siendo investigado. *Trichoderma* es uno de los organismos que crece bien en condiciones de laboratorio y los ensayos de confrontación son fáciles de hacer, suprimiendo el crecimiento de los hongos fitopatógenos a través del crecimiento excesivo (Arunachalam & Sharma, 2012).

En este proyecto se eligió usar al hongo fitopatógeno *Fusarium* sp. para realizar ensayos de control biológico, debido a que es un agente causal de problemas en los cultivos vegetales alrededor del mundo. En los ensayos preliminares de confrontación del hongo recombinante y *Fusarium* sp., no se mostró un comportamiento parasitario debido a que en ningún momento se presentó una interacción entre los hongos, pero si el crecimiento de *Fusarium* sp. se detuvo desde el día siete hasta el día 22 del cocultivo. Sugiriendo que posiblemente exista algún tipo de antagonismo. Es importante comprender el mecanismo de acción de los antagonistas para un mejor uso de los mismos, y para la selección de nuevos antagonistas efectivos. Hasta ahora, los conocimientos sobre los mecanismos de acción involucran: la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio e inducción de resistencia. Cabe destacar que en general más de un mecanismo puede estar implicado en el efecto de biocontrol (Janisiewicz & Korsten, 2002).



IX CONCLUSIONES

Este trabajo describe la purificación y caracterización de una enzima con actividad hidrolítica exo- β -1,3 llamada *TtBgn31A* de *T. terrestris* Co3Bag1, la primera enzima con actividad hidrolítica exo- β -1,3 perteneciente a la familia GH31.

Debido a la naturaleza de las exo- β -1,3-glucanasas, cuyo sustrato natural se encuentra en los salvados de los cereales, podría ser una opción para tratar estos residuos y ser utilizados en la producción de piensos para el alimento de animales de corral. Las propiedades bioquímicas de ambas enzimas estudiadas en este proyecto, como la temperatura óptima, estabilidad a pH y temperatura son idóneas en los procesos para obtener piensos.

TtBgn31A parece ser un excelente candidato para aplicación a procesos industriales debido a sus propiedades tales como temperatura óptima de 70 °C, amplia estabilidad de pH y el incremento de la actividad en presencia de algunos iones metálicos. Estas propiedades bioquímicas, la diferencian de otras exo- β -1,3-glucanasas fúngicas reportadas en las bases de datos. Las β -1,3-glucanasas tienen amplias aplicaciones, debido a que los sustratos naturales donde actúan, se encuentran normalmente en la pared celular de los hongos, en la capa amorfa de la pared celular de la vegetal y en los salvados de los cereales. Estas enzimas tienen potencial aplicación como agente de control biológico, frente a patógenos que afectan a los cultivos y juegan un papel importante en la mejora de la producción de alimentos para animales mejor conocidos como piensos y en los procesos de elaboración del vinos y cervezas. Por lo tanto, *TtBgn31A* podría ser valiosa porque en la mayoría de los procesos industriales requieren enzimas que toleren temperaturas que van desde los 55 a 70 °C y en diferentes valores de pH, según sea el proceso industrial. Con la comparación bioquímica de la exo- β -1,3-glucanasa producida por *T. terrestris* Co3Bag1 y la exo- β -1,3-glucanasa recombinante expresada en *A. niger* CBS 513.88, esta última, presenta mejores propiedades bioquímicas como, los valores de vida media en el análisis de la termoestabilidad, incrementar su actividad 3.5 y 1.2 veces más en presencia de Fe^{2+} y Mn^{2+} , respectivamente, comparándola con la silvestre. Sin embargo, la exo- β -1,3-glucanasa secretada por *T. terrestris* Co3Bag1 tiene la mayor temperatura óptima comparándola con las exo- β -1,3-glucanasas fúngicas reportadas en las bases de datos, con un valor de 70 °C.

Ambas enzimas, muestran una marcada preferencia por el sustrato laminarina, como lo indican los resultados de especificidad a sustratos. Además, los ensayos de TLC utilizando laminarina y pNPG, sugieren que las enzimas actúan de manera exo, al generar únicamente glucosa como producto de hidrólisis, por lo que serían exo- β -1,3-glucanasas. La diferencia de las propiedades bioquímicas entre la enzima silvestre y recombinante, se pueden deber al cambio estructural debido a las posibles diferencias en el plegamiento



entre *T. terrestris* y *A. niger*, dando diferentes fuerzas intramoleculares que tienden a estabilizar la estructura terciaria como son puentes de hidrógeno, interacciones iónicas e interacciones hidrofóbicas.

Los resultados obtenidos de la secuenciación de la banda de 129 kDa, sugieren que la proteína purificada pertenece a las Glicosil Hidrolasas de la familia 31 (GH31), por lo que esta enzima sería la primera proteína con actividad hidrolítica β -1,3 perteneciente a las GH31.

Los resultados preliminares de la hidrólisis de los salvados, sugieren que la enzima tiene actividad hidrolítica frente a estos residuos agroindustriales que no han sido aprovechados, las imágenes obtenidas por Microscopia electrónica muestran una reducción en el tamaño de las partículas y un cambio estructural en las mismas. Como lo han propuesto otros autores, este tipo de enzimas o microorganismos recombinantes de glucanasas pueden ser implementadas en los procesos de pretratamiento del alimento para animales de corral o para los procesos industriales de la producción de piensos.

Por otro lado, la evaluación preliminar del crecimiento del fitopatógeno *Fusarium* sp. frente a *A. niger* recombinante, sugiere que *A. niger* puede controlar el crecimiento del fitopatógeno al ver delimitado su crecimiento, sin embargo, para tener conclusiones sólidas, se sugiere se realicen estudios in vivo a profundidad para complementar los resultados preliminares.

La oportunidad de aprovechar lo que la naturaleza nos ofrece para resolver problemas que nos acompañan en el desarrollo humano, dependerá de la curiosidad que tengamos al realizar nuevas investigaciones, siendo las enzimas una parte fundamental de estos recursos.



X BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology (Reading, England)*, 150(7), 2029–35. <http://doi.org/10.1099/mic.0.26980-0>
- Arias Cifuentes, E. L., & Piñeros Espinosa, P. A. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los paramos de Guasca y Cruz Verde*.
- Arunachalam, M. K., & Sharma, P. (2012). Confrontation assay for *Trichoderma* as a potential biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 18(1), 74–77.
- Bamforth, C. W. (1980). The adaptability, purification and properties of exo- β -1, 3-glucanase from the fungus *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.*, 1, 863–866.
- Bara, M. T. F., Lima, A. L., & Ulhoa, C. J. (2003). Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 81–85. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01191-6](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01191-6)
- Berka, R. M., Grigoriev, I. V., Otiillar, R., Salamov, A., Grimwood, J., Reid, I., ... Tsang, A. (2011). Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nature Biotechnology*, 29(10), 922–7. <http://doi.org/10.1038/nbt.1976>
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1–6), 41–55. <http://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., ... Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87–97. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Brink, J., Samson, R. a., Hagen, F., Boekhout, T., & Vries, R. P. (2011). Phylogeny of the industrial relevant, thermophilic genera *Myceliophthora* and *Corynascus*. *Fungal Diversity*, 52(1), 197–207. <http://doi.org/10.1007/s13225-011-0107-z>
- Castoria, R., Curtis, F. De, Lima, G., & Cicco, V. De. (1997). β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 12(3), 293–300. [http://doi.org/10.1016/S0925-5214\(97\)00061-6](http://doi.org/10.1016/S0925-5214(97)00061-6)
- Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., & Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Technologies and Commercial Enzymes*, 13, 329–332. <http://doi.org/10.1016/S0958166902003300>
- Chambers, R., Broughton, M., Cannon, R., Carne, A., Emerson, G., & Sullivan, P. (1993). An exo- β -(1,3)-glucanase of *Candida albicans*: purification of the enzyme and molecular cloning of the gene. *Journal of General Microbiology*, 139, 325–334. Retrieved from <http://mic.sgmjournals.org/content/139/2/325.short>
- Chambers, R. S., Walden, A. R., Brooke, G. S., Cutfield, J. F., & Sullivan, P. A. (1993). Identification of a putative active site residue in the exo-beta-(1,3)-glucanase of *Candida albicans*. *FEBS Letters*, 327(3), 366–369.
- Cohen-Kupiec, R., Broglie, K. E., Friesem, D., Broglie, R. M., & Chet, I. (1999). Molecular characterization of a novel



- β -1,3-exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Gene*, 226(2), 147–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9931476>
- Crognale, S., & Bruno, M. (2007). Production of β -glucan and related glucan-hydrolases by *Botryosphaeria rhodina*. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 860–871. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03116.x>
- Cutfield, J., Sullivan, P., & Cutfield, S. (2000). Minor structural consequences of alternative CUG codon usage (Ser for Leu) in *Candida albicans* exoglucanase. *Protein Engineering*, 13(10), 735–738. Retrieved from <http://peds.oxfordjournals.org/content/13/10/735.short>
- Cutfield, S. M., Davies, G. J., Murshudov, G., Anderson, B. F., Moody, P. C. E., Sullivan, P. A., & Cutfield, J. F. (1999). The structure of the exo- β -(1,3)-glucanase from *Candida albicans* in native and bound forms: relationship between a pocket and groove in family 5 glycosyl hydrolases. *Journal of Molecular Biology*, 294(3), 771–783. <http://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3287>
- Cutfield, Brooke, G., Sullivan, P., & Cutfield, J. (1992). Crystallization of the exo (1,3)- β -glucanase from *Candida albicans*. *Journal of Molecular Biology*, 225(1), 217–218. [http://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)91037-P](http://doi.org/10.1016/0022-2836(92)91037-P)
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8535779>
- Davies, G. J., Gloster, T. M., & Henrissat, B. (2005). Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(6), 637–45. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.10.008>
- Du, X., & Mullins, J. T. (1999). Glucan 1,3- β -Glucosidase Activities of *Achlya bisexualis*: Synthesis and Properties. *Mycological Society of America*, 91(2), 353–58.
- Fernandez, J., Wright, J. D., Hartline, D., Quispe, C. F., Madayiputhiya, N., & Wilson, R. A. (2012). Principles of Carbon Catabolite repression in the rice blast fungus: Tps1, Nmr1-3, and a MATE-family pump regulate glucose metabolism during infection. *PLoS Genetics*, 8(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002673>
- Ferrer, P. (2006). Revisiting the *Cellulosimicrobium cellulans* yeast-lytic β -1, 3-glucanases toolbox: A review. *Microbial Cell Factories*, 5(10), 1–8. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-5-10>
- Fleet, G. H., & Phaff, H. J. (1975). Glucanases in *Schizosaccharomyces*. Isolation and properties of an exo- β -glucanase from the cell extracts and culture fluid of *Schizosaccharomyces japonicus* var. *Versatilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 401(2), 318–32. [http://doi.org/10.1016/0005-2744\(75\)90234-X](http://doi.org/10.1016/0005-2744(75)90234-X)
- Fontaine, T., Hartland, R. P., Beauvais, A., Diaquin, M., & Latge, J.-P. (1997). Purification and characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *European Journal of Biochemistry*, 243(1–2), 315–21. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.0315a.x>
- Frommer, W. B., & Ninnemann, O. (1995). HETEROLOGOUS EXPRESSION OF GENES IN BACTERIAL , FUNGAL , ANIMAL, AND PLANT CELLS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46, 419–44.
- Gan, L., Hua Zhang, S., Liang Yang, X., & Bi Xu, H. (2004). Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum*. *International Immunopharmacology*, 4(4), 563–9. <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.01.023>
- Gil, J. V., Manzanares, P., Genovés, S., Valles, S., & González-Candelas, L. (2005). Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *International Journal of*



- Food Microbiology*, 103(1), 57–68. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.026>
- Goyal, S., Dhull, S. K., & Kapoor, K. K. (2005). Chemical and biological changes during composting of different organic wastes and assessment of compost maturity. *Bioresource Technology*, 96(14), 1584–1591. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.012>
- Gruber, S. G., & Seidl-Seiboth, V. (2012). Self versus non-self: Fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*, 158(1), 26–34. <http://doi.org/10.1099/mic.0.052613-0>
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid. *Biochem. J.*, 280, 309–316.
- Henrissat, B., & Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical Journal*, 293(3), 781–788. <http://doi.org/066/0>
- Henrissat, B., & Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 316, 695–696. Retrieved from <http://www.biochemj.org/bj/316/bj3160695.htm>
- Henrissat, B., Callebaut, I., Lehn, P., Mornon, J., & Davies, G. (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 7090–7094.
- Henrissat, B., Claeysens, M., Tomme, P., Lemesle, L., & Mornon, J. P. (1989). Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene*, 81(1), 83–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2806912>
- Henrissat, B., & Davies, G. J. (2000). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiology*, 124(4), 1515–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1539306&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hien, N., & Fleet, G. (1983). Variation of (1 leads to 3)-beta-glucanases in *Saccharomyces cerevisiae* during vegetative growth, conjugation, and sporulation. *Journal of Bacteriology*, 156(3), 1214–1220. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/156/3/1214.short>
- Hrmova, M., Harvey, A. J., Wang, J., Shirley, N. J., Jones, G. P., Stone, B. A., ... Fincher, G. B. (1996). Barley β -D-glucan exohydrolases with β -D-glucosidase activity. Purification, characterization, and determination of primary structure from a cDNA clone. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(9), 5277–86. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.9.5277>
- Hrmova, M., Streltsov, V. A., Smith, B. J., Vasella, A., Varghese, J. N., & Fincher, G. B. (2005). Structural Rationale for Low-Nanomolar Binding of Transition State Mimics to a Family GH3 beta-D-Glucan Glucohydrolase from Barley. *Biochemistry*, 44, 16529–16539.
- Hrmova, M., Varghese, J. N., Gori, R. De, Smith, B. J., Driguez, H., & Fincher, G. B. (2001). Catalytic mechanisms and reaction intermediates along the hydrolytic pathway of a plant β -D-glucan glucohydrolase. *Structure*, 9(11), 1005–16. [http://doi.org/doi:10.1016/S0969-2126\(01\)00673-6](http://doi.org/doi:10.1016/S0969-2126(01)00673-6)
- Ishida, T., Fushinobu, S., Kawai, R., Kitaoka, M., Igarashi, K., & Samejima, M. (2009). Crystal structure of glycoside hydrolase family 55 β -1,3-glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(15), 10100–10109. <http://doi.org/10.1074/jbc.M808122200>
- Ízgu, F., Altınbay, D., & Acun, T. (2006). Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo- β -1,3-glucanase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 669–676. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.024>



- Janisiewicz, W. J., & Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 411–441. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158>
- Kasahara, S., Nakajim, T., Miyamoto, C., Wada, K., Furuichi, Y., & Ichishima, E. (1992). Characterization and mode of action of exo-1,3- β -D-glucanase from *Aspergillus saitoi*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(4), 238–40. [http://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90118-E](http://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90118-E)
- Kawai, R., Igarashi, K., & Samejima, M. (2006). Gene cloning and heterologous expression of glycoside hydrolase family 55 beta-1,3-glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Letters*, 28(6), 365–71. <http://doi.org/10.1007/s10529-005-6179-7>
- Kotake, T., Nakagawa, N., Takeda, K., & Sakurai, N. (1997). Purification and characterization of wall-bound exo-1,3- β -D-glucanase from barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Cell Physiol*, 38(2), 194–200. <http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029152>
- Kruse, D., & Cole, G. T. (1992). A seroreactive 120-kilodalton beta-1,3-glucanase of *Coccidioides immitis* which may participate in spherule morphogenesis. *Infection and Immunity*, 60(10), 4350–63. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=257472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kulminskaya, A. a, Thomsen, K. K., Shabalin, K. a, Sidorenko, I. a, Eneyskaya, E. V, Savel'ev, a N., & Neustroev, K. N. (2001). Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3-beta-glucanase from *Trichoderma viride*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268(23), 6123–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11733006>
- Kumagai, Y., & Ojima, T. (2010). Isolation and characterization of two types of beta-1,3-glucanases from the common sea hare *Aplysia kurodai*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 155(2), 138–44. <http://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.10.013>
- Lafond, M., Navarro, D., Haon, M., Couturier, M., & Berrin, J.-G. (2012). Characterization of a broad-specificity β -glucanase acting on β -(1,3)-, β -(1,4)-, and β -(1,6)-glucans that defines a new glycoside hydrolase family. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8540–6. <http://doi.org/10.1128/AEM.02572-12>
- Langston, J. A., Brown, K., Xu, F., Borch, K., Garner, A., & Sweeney, M. D. (2012). Cloning, expression, and characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Thielavia terrestris* induced under cellulose growth conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824(6), 802–812. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.03.009>
- Lee, K. C., Arai, T., Ibrahim, D., Kosugi, A., Prawitwong, P., Lan, D., ... Mori, Y. (2014). Purification and Characterization of a Thermostable Laminarinase from *Penicillium rolfsii* c3-2(1) IBRL, 2(1), 1072–1084.
- Li, H., Chen, J., Li, A., & Li, D.-C. (2007). Purification and partial characterization of β -1,3-glucanase from *Chaetomium thermophilum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(9), 1297–1303. <http://doi.org/10.1007/s11274-007-9366-y>
- Liang, Z., Hseu, R., & Wang, H. (1995). Partial purification and characterization of a 1,3- β -D-glucanase from *Ganoderma tsugae*. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 5–9.
- Lin, C., Yang, J., Sun, H., Huang, X., Wang, R., & Zhang, K.-Q. (2007). Purification and characterization of a β -1,3-glucanase from the novel mycoparasite *Periconia byssoides*. *Biotechnol Lett*, 29(4), 617–22. <http://doi.org/10.1007/s10529-006-9287-0>
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zyl, W. H. Van, Isak, S., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization:



- Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(3), 506–563. <http://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506>
- Mackenzie, L. F., Brooke, G. S., Cutfield, J. F., Sullivan, P. A., & Withers, S. G. (1997). Identification of Glu-330 as the catalytic nucleophile of *Candida albicans* exo- β -(1,3)-glucanase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(6), 3161–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013549>
- Magaña-Ortiz, D., Coconi-Linares, N., Ortiz-Vazquez, E., Fernández, F., Loske, A. M., & Gómez-Lim, M. A. (2013). A novel and highly efficient method for genetic transformation of fungi employing shock waves. *Fungal Genetics and Biology*, 56, 9–16. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.03.008>
- Marcello, C. M., Steindorff, A. S., da Silva, S. P., Silva, R. D. N., Mendes Bataus, L. A., & Ulhoa, C. J. (2010). Expression analysis of the exo-beta-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research*, 165(1), 75–81. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.002>
- Martin, K., McDougall, B., Unkles, S., & Seviour, R. (2006). The three β -1,3-glucanases from *Acremonium blochii* strain C59 appear to be encoded by separate genes. *Mycological Research*, 110(1), 66–74. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.08.004>
- McCarter, J. D., & Withers, S. G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(6), 885–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7712292>
- McLeod, A., Smart, C. D., & Fry, W. E. (2003). Characterization of 1,3- β -glucanase and 1,3;1,4- β -glucanase genes from *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology*, 38(2), 250–263. [http://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00523-6](http://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00523-6)
- Medina, M. L., Haynes, P. a, Breci, L., & Francisco, W. a. (2005). Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteomics*, 5(12), 3153–61. <http://doi.org/10.1002/pmic.200401136>
- Michlmayr, H., Brandes, W., Eder, R., Schümann, C., del Hierro, A. M., & Kulbe, K. D. (2011). Characterization of two distinct glycosyl hydrolase family 78 α -L-rhamnosidases from *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6524–6530. <http://doi.org/10.1128/AEM.05317-11>
- Muthukumar, G., Suhng, S., Magee, P. T., Jewell, R. D., & Primerano, D. A. (1993). The *Saccharomyces cerevisiae* SPRJ Gene Encodes a Contributor to Ascospore Thermoresistance. *Journal of Bacteriology*, 175(2), 386–394.
- Nagasaki, S., Saito, K., & Yamamoto, S. (1977). Purification and characterization of an exo β -1,3-glucanase from a Fungi imperfecti. *Agric. Biol. Chem*, 41(3), 493–502. <http://doi.org/10.1080/00021369.1977.10862525>
- Nakatani, Y., Larsen, D. S., Cutfield, S. M., & Cutfield, J. F. (2014). Major change in regiospecificity for the exo-1,3- β -glucanase from *Candida albicans* following its conversion to a glycosynthase. *Biochemistry*, 53(20), 3318–26. <http://doi.org/10.1021/bi500239m>
- Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K., Holoyda, K., Hoff, B., Vanhandel, M., ... Andes, D. (2007). Putative Role of β -1,3-Glucans in *Candida albicans* Biofilm Resistance. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 51(2), 510–520. <http://doi.org/10.1128/AAC.01056-06>
- Nevalainen, K. M. H., Te'o, V. S. J., & Bergquist, P. L. (2005). Heterologous protein expression in filamentous fungi. *TRENDS in Biotechnology*, 23(9), 468–447. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.06.002>
- Noronha, E. F., & Ulhoa, C. J. (2000). Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 183(1), 119–23. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08944.x>



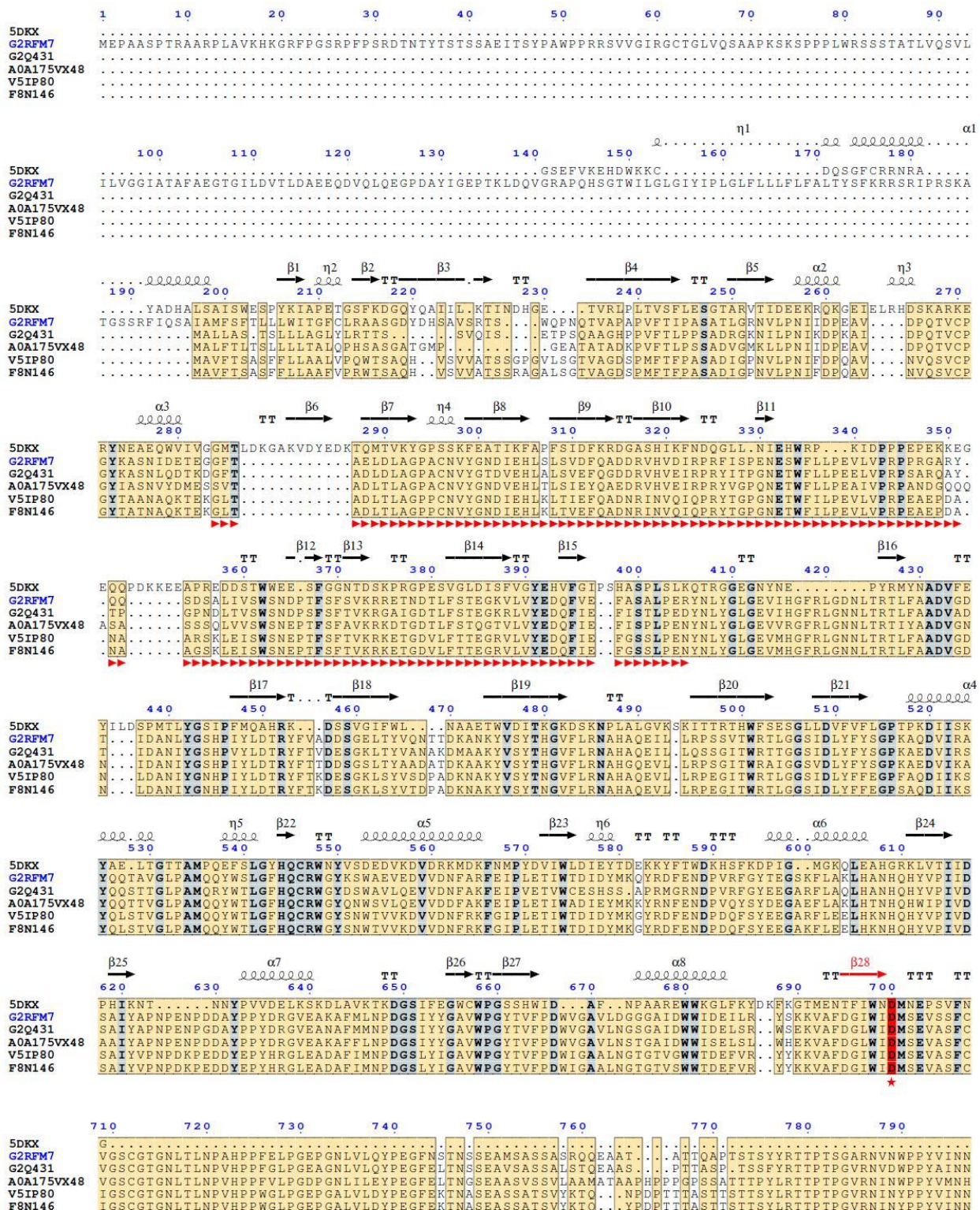
- O'Connell, E., Piggott, C., & Tuohy, M. (2011). Purification of exo-1,3- β -glucanase, a new extracellular glucanolytic enzyme from *Talaromyces emersonii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), 685–96. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-2883-x>
- Ooi, T., Sato, H., Matsumoto, K., & Taguchi, S. (2009). A unique post-translational processing of an exo- β -1,3-glucanase of *Penicillium* sp. KH10 expressed in *Aspergillus oryzae*. *Protein Expression and Purification*, 67(2), 126–31. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2009.05.016>
- Palackal, N., Lyon, C. S., Zaidi, S., Luginbühl, P., Dupree, P., Goubet, F., ... Steer, B. A. (2007). A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 113–124. <http://doi.org/10.1007/s00253-006-0645-6>
- Peng, Y., Chi, Z., Wang, X., & Li, J. (2009). Purification and molecular characterization of exo- β -1,3-glucanases from the marine yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Appl Microbiol Biotechnol* (2009), 85, 85–94. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2061-1>
- Pitson, S. M., Seviour, R. J., & McDougall, B. M. (1993). Noncellulolytic fungal β -glucanases: Their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Technol.*, 15(3), 178–92.
- Pitson, S. M., Seviour, R., McDougall, B., Woodward, J., & Stone, B. (1995). Purification and characterization of three extracellular (1-3)- β -D-glucan glucohydrolases from the filamentous fungus *Acremonium persicinum*. *The Biochemical Journal*, 308(3), 733–41. <http://doi.org/10.1042/bj3080733>
- Rapp, P. (1992). Formation, separation and characterization of three β -1,3-glucanases from *Sclerotium glaucanicum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1117(1), 7–14. [http://doi.org/10.1016/0304-4165\(92\)90155-N](http://doi.org/10.1016/0304-4165(92)90155-N)
- Rigden, D. J., & Franco, O. L. (2002). Beta-helical catalytic domains in glycoside hydrolase families 49, 55 and 87: domain architecture, modelling and assignment of catalytic residues. *FEBS Letters*, 530(1), 225–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12387897>
- Rivera, A. L., Magaña-Ortiz, D., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2014). Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Physics of Life Reviews*, 11(2), 184–203. <http://doi.org/10.1016/j.pprev.2014.01.007>
- Sanodiyam, B. S., Thakurm, G. S., & Graaf, D. (2013). Recent Advance in the Studies of Beta-glucans for Cancer Therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(5), 2012–2013.
- Sharma, R., Katoch, M., Srivastava, P. S., & Qazi, G. N. (2009). Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2083–2094. <http://doi.org/10.1007/s11274-009-0128-x>
- Stahmann, K., Pielken, P., Schimz, K., & Sahm, H. (1992). Degradation of extracellular β -(1,3)(1,6)-D-glucan by *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10), 3347–54.
- Stchigel, A., Sagués, M., Cano, J., & Guarro, J. (2000). Three new thermotolerant species of *Corynascus* from soil, with a key to the known species. *Mycological Research*, 104(7), 879–887. <http://doi.org/10.1017/S0953756299002245>
- Stubbs, H. J., Brasch, D. J., Emerson, G. W., & Sullivan, P. A. (1999). Hydrolase and transferase activities of the β -1,3-exoglucanase of *Candida albicans*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 263(3), 889–895. <http://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00581.x>



- Sun, H., Yang, J., Lin, C., Huang, X., Xing, R., & Zhang, K. (2006). Purification and properties of a β -1,3-glucanase from *Chaetomium* sp. that is involved in mycoparasitism. *Biotechnology Letters*, 28(2), 131–35. <http://doi.org/10.1007/s10529-005-5132-0>
- Suzuki, K., Yabe, T., Maruyama, Y., Abe, K., & Nakajima, T. (2001). Characterization of recombinant yeast exo- β -1,3-glucanase (Exg 1p) expressed in *Escherichia coli* cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(6), 1310–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11471729>
- Takahashi, M., Yoshioka, K., Imai, T., Miyoshi, Y., Nakano, Y., Yoshida, K., ... Takeda, T. (2013). Degradation and synthesis of β -glucans by a *Magnaporthe oryzae* endotransglucosylase, a member of the glycoside hydrolase 7 family. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(19), 13821–30. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.448902>
- Talbot, C. F., & Vacquier, V. D. (1982). The purification and characterization of an exo- β (1,3)-glucanohydrolase from sea urchin eggs. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(2), 742–746.
- Tamano, K., Satoh, Y., Ishii, T., Terabayashi, Y., Ohtaki, S., Sano, M., ... Machida, M. (2007). The β -1,3-exoglucanase gene *exgA* (*exg1*) of *Aspergillus oryzae* is required to catabolize extracellular glucan, and is induced in growth on a solid surface. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(4), 926–934. <http://doi.org/10.1271/bbb.60591>
- van Wyk, N., Trollope, K. M., Steenkamp, E. T., Wingfield, B. D., & Volschenk, H. (2013). Identification of the gene for β -fructofuranosidase from *Ceratocystis moniliformis* CMW 10134 and characterization of the enzyme expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biotechnology*, 13(1), 100–11. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-13-100>
- Vannucci, L., Krizan, J., Sima, P., Stakheev, D., Caja, F., Rajsiglova, L., ... Saieh, M. (2013). Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review). *International Journal of Oncology*, 43(2), 357–64. <http://doi.org/10.3892/ijo.2013.1974>
- Vijayendra, S. V. N., & Kashiwagi, Y. (2009). Characterization of a new acid stable exo- β -1,3-glucanase of *Rhizoctonia solani* and its action on microbial polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(1), 92–7. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.10.008>
- Wang, Z., Robertson, K. L., Liu, C., Liu, J. L., Johnson, B. J., Leary, D. H., ... Vora, G. J. (2015). A novel *Vibrio* beta-glucosidase (LamN) that hydrolyzes the algal storage polysaccharide laminarin. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(8), 1–10. <http://doi.org/10.1093/femsec/fiv087>
- White, A., & Roset, D. R. (1997). Mechanism of catalysis by retaining beta-glycosyl hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 645–651.
- Xu, Z., Shih, M.-C., & Poulton, J. E. (2006). An extracellular exo- β -(1,3)-glucanase from *Pichia pastoris*: Purification, Characterization, molecular cloning, and functional expression. *Protein Expression and Purification*, 47(1), 118–27. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2005.11.025>
- Zhou, M., & Yu, L. (2003). Proteomic Analysis by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In *Elsevier Advances in Protein Chemistry* (Vol. 65, pp. 57–84).
- Zouari-Mechichi, H., Mechichi, T., Dhoub, A., Sayadi, S., Martínez, A. T., & Martínez, J. M. (2006). Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(1), 141–48. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.027>



ANEXO A Predicción de la estructura secundaria de *TtBgn31A*



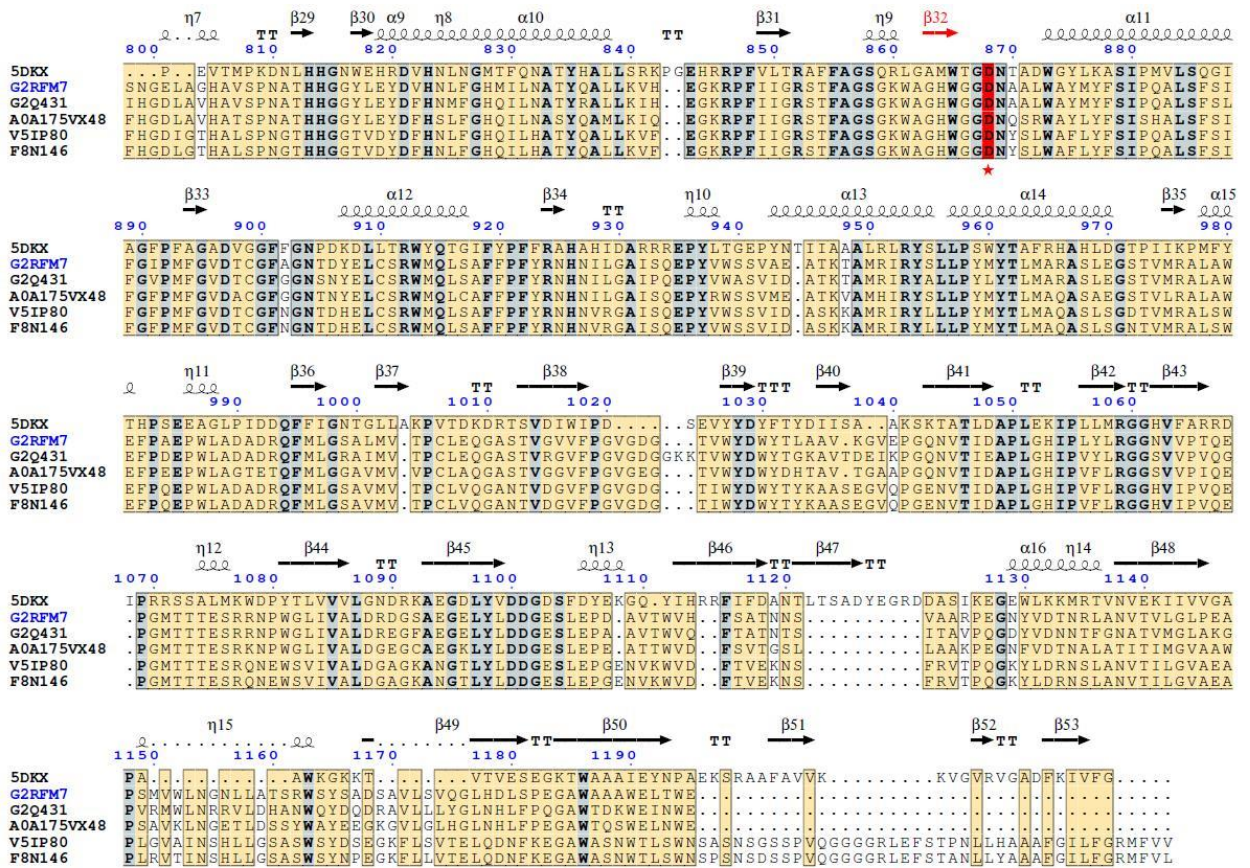


Fig. S1. Alineamiento de secuencia múltiple y asignación de elemento de estructura secundaria.

El alineamiento incluye las proteínas GH31 de *T. terrestris* NRRL8126 (número de acceso UniProtKB G2RFM7), *M. thermophile* ATCC 42464 (G2Q431), *M. mycetomatis* (A0A175VX48), *N. crassa* ATCC 24698 (V5IP80), y *N. tetrasperma* FGSC 2508 (F8N146) y la estructura cristalina 3D de la α -glucosidasa de *C. thermophilum* DSM 1495 (código PDB 5DKX). La estructura de la proteína se realizó en el programa ESPript (Robert y Gouet 2014)



ANEXO B Predicción de la estructura terciaria de TtBgn31A

Ident1: Es el porcentaje de identidad de la secuencia en los plegamientos con la secuencia de consulta.

Ident2: Es el porcentaje de identidad de la secuencia con toda la secuencia de consulta.

Cov: Representa la cobertura del alineamiento en los plegamientos y es igual al número de residuos alineados dividido por la longitud de la proteína de consulta.

Z-score: Es la calificación de los alineamientos en los plegamientos. Los alineamientos con una puntuación $Z > 1$ significa una buena alineamiento y viceversa.

C-score: Es una puntuación de confianza para la estimación de la calidad de los modelos predichos por I-TASSER. Se calcula basándose en los alineamientos de roscado de plantilla y los parámetros de convergencia de las simulaciones del ensamblado de las estructuras. C-score se encuentra dentro del rango $[-5, 2]$, donde un C-score de mayor valor representa un modelo con un alto grado de confianza y vice-versa.

TM-score y RMSD: Son estándares conocidos para medir la similitud estructural entre dos proteínas que se utilizan habitualmente para medir la exactitud de modelado de la estructura cuando la estructura nativa se conozca. En caso de que la estructura nativa no se conoce, estos valores son necesarios para predecir la calidad de la predicción de los modelos, es decir, ¿Cuál es la distancia entre el modelo predicho y las estructuras nativas? Para responder a esta pregunta, se ha intentado predecir la puntuación TM-y RMSD de los modelos previstos de las estructuras nativas basadas en la C-score. Una TM-score > 0.5 indica un modelo de topología correcta y un TM-score < 0.17 significa una similitud al azar. Estos valores no dependen de la longitud de la proteína.

Densidad de clúster: Se define como el número de señuelos en una unidad de espacio. Una densidad más alta significa un modelo de mejor calidad.

IDEN: Es el porcentaje de identidad de la TtBgn31A putativa en la región estructuralmente alineada.