



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

Estudio de la regulación de la β -glucosidasa de *Clavispora lusitaniae*

TESIS

Que presenta

Erika Alfayuset Ochoa Chacón

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOTECNOLOGÍA

Directora de Tesis

Dra. María Teresa Ponce Noyola

Ciudad de México

Agosto, 2018

COMITÉ TUTORIAL

Directora de Tesis:

Dra. María Teresa Ponce Noyola

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería- CINVESTAV

Asesores:

Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería - CINVESTAV

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Instituto de Biotecnología – UNAM

CRÉDITOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Microbiana y Fermentaciones del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) Unidad Zacatenco.

El desarrollo de esta tesis de Maestría tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca número 456447 y el financiamiento del proyecto CB-14/236895.

AGRADECIMIENTOS

Primero que a todos agradezco a mi mentora:

A la Doctora Teresa Ponce Noyola, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, siempre estaré agradecida por la calidad de la formación científica, académica y personal que recibí siendo su estudiante.

A mis asesores:

La Doctora Ana C. Ramos Valdivia y el Doctor Alfredo Martínez Jiménez por apoyar este proyecto aportando su experiencia y conocimiento para poder concluir exitosamente este trabajo.

Al personal del laboratorio de Genética microbiana:

La M en C Odilia Pérez Avalos, por su apoyo en el diseño y aplicación de metodologías para la purificación de la proteína, su guía fue muy importante para el desarrollo de este proyecto.

A Verónica Soto Bellosa, por su apoyo diario, su trabajo facilita y acelera el quehacer científico del laboratorio 17.

A la Unidad de genómica, proteómica y metabolómica del CINVESTAV, a la Dra. Dulce M^a del Carmen Delgadillo Álvarez por su apoyo en las mediciones de niveles de expresión por qPCR.

A mis amigos y compañeros en el laboratorio:

Luis Castro, Diego García, Jimena Santiago, Fernando Sánchez y Miguel Valladares, por todos los momentos compartidos, su amistad y apoyo me hicieron sentir como en familia, siempre les estaré agradecida.

A mi compañero de camino:

Jonathan Acosta, por la paciencia, por el apoyo, por los momentos buenos y malos, por compartir este y otro logros conmigo, nunca ha sido fácil, pero siempre has estado ahí.

A mi hermano de vida:

Sergio Torres, gracias por día a día prestar el oído y la atención suficiente a todas las quejas, logros y descubrimientos durante este maravilloso proyecto.

A la Coordinación Académica y Jefatura del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, al personal de apoyo del Departamento y al personal de la planta piloto, y a todos los que de una u otra forma hicieron posible la realización de este proyecto.

MUCHAS GRACIAS

DEDICATORIA

A mis padres

Sandra Yanet Chacón Castro

Luis Hernando Ochoa Forero

A mis hermanas

Sandra Michel Ochoa Chacón

Karen Michel Ochoa Chacón

A mi sobrina

Emily Sophía Palacio Ochoa

Sin ustedes este proyecto no hubiera sido posible.

INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Bioetanol	2
1.2. Residuos lignocelulósicos	2
1.3. La celulosa	3
1.4. Degradación enzimática de la celulosa	4
1.5. β -glucosidasa	6
1.6. Clasificación de las β -glucosidasas.....	7
1.7. Regulación de la expresión de las β -glucosidasas.....	8
1.8. Las β -glucosidasas en la producción de etanol.....	9
1.9. <i>Clavispora lusitaniae</i>	12
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	16
4.1. General	16
4.2. Específicos.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1. Microorganismos empleados y condiciones de cultivo.....	17

5.2. Medios de cultivo	17
5.2.1. Medio YPD.....	17
5.2.2. Medio YM.....	17
5.2.3. Medio Breus.....	17
5.3. Preparación del inóculo.....	18
5.4. Curva de crecimiento celular.....	18
5.5. Obtención de extracto crudo libre de células	18
5.6. Determinación de actividad enzimática.....	19
5.7. Determinación de las condiciones del ensayo enzimático	19
5.8. Cuantificación de proteína.....	20
5.9. Cuantificación de azúcares y etanol.....	20
5.10. Extracción de RNA.....	20
5.11. Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos	21
5.12. Síntesis de cDNA	21
5.13. PCR en punto final.....	21
5.14. PCR en tiempo real.....	23
5.15. Electroforesis en gel de poliacrilamida para proteínas.....	24
5.16. Ensayo de actividad en gel	24
5.17. Cromatografía de intercambio aniónico fuerte	24
5.18. Cromatografía de exclusión molecular.....	25
6. RESULTADOS.....	26
6.1. Estandarización de las condiciones del ensayo de actividad de la β -glucosidasa	26
6.1.1. Determinación de las condiciones de temperatura, pH y tiempo de incubación	26
6.2. Comportamiento de la β -glucosidasa en diferentes fuentes de carbono.....	29

6.2.1. Actividad de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> en celobiosa en condiciones aerobias	29
6.2.2. Actividad de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> en celobiosa en condiciones anaerobias	31
6.2.3. Actividad de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> en celobiosa en condiciones aerobias y anaerobias.....	33
6.2.4. Efecto de un pulso de glucosa sobre la actividad de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> creciendo en celobiosa en condiciones anaerobias	35
6.2.5. Efecto de diferentes sustratos sobre la actividad la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i>	37
6.2.6. Efecto de la concentración de celobiosa en la síntesis de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> en aerobiosis.....	38
6.2.7. Medición de la actividad de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> creciendo en la mezcla de celobiosa y glucosa en condiciones aerobias.....	39
6.2.8. Medición de la actividad de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> creciendo en celobiosa, glucosa y xilosa en condiciones aerobias.....	41
6.3. Cuantificación de la expresión de los genes que codifican para la β -glucosidasa en <i>Clavispora lusitaniae</i>	43
6.3.1. Diseño de cebadores.....	43
6.3.2. Extracción de RNA	44
6.3.3. Síntesis de cDNA y PCR en punto final.....	46
6.3.4. Medición de la expresión relativa del gen <i>Bgl 1</i> en diferentes fuentes de carbono en condiciones de aireación	48
6.3.5. Medición de la expresión relativa del gen <i>Bgl 1</i> en celobiosa en condiciones de aieración y anaerobiosis	53
6.4. Purificación y caracterización de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i>	55
6.4.1. Cromatografía de intercambio aniónico fuerte.....	55

6.4.2. Cromatografía de exclusión molecular	57
7. CONCLUSIÓN	61
BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de etanol a nivel mundial en 2016	2
Figura 2. Estructura de la lignocelulosa.....	3
Figura 3. Estructura química de la celulosa.....	4
Figura 4. Mecanismo de degradación de la celulosa.....	6
Figura 5. Ciclaje de la reacción de PCR.....	22
Figura 6. Ciclaje de la reacción de qPCR.....	24
Figura 7. Efecto de la temperatura y del pH en la actividad de la β -glucosidasa de <i>Clavispora lusitaniae</i>	27
Figura 8. Velocidad inicial de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> a 45 °C.	29
Figura 9. Comportamiento de la actividad de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> cultivada en medio Breus suministrado con 1% de celobiosa a 30 °C.....	31
Figura 10. Producción de etanol y actividad específica de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> cultivada en medio Breus con 1% de celobiosa a 30 °C en anaerobiosis	33
Figura 11. Actividad de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> cultivada en medio Breus suministrado con 1.5 % de celobiosa a 30 °C.	35
Figura 12. Efecto de un pulso de glucosa sobre la actividad específica de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> cultivada en medio Breus suministrado con 1% de celobiosa a 30 °C.	36
Figura 13. Efecto de la fuente de carbono sobre la actividad específica de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> en medio Breus a 30 °C.....	38
Figura 14. Actividad de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i> cultivada durante 6 h en medio Breus suplementado con diferentes concentraciones de celobiosa	39
Figura 15. (a) Actividad de la β -glucosidasa y crecimiento y (b) consumo de azúcares y producción de etanol por <i>C. lusitaniae</i> cultivada en medio Breus suministrado con celobiosa y glucosa 0.5 % cada una a 30 °C	41

Figura 16. (a) Actividad de la β -glucosidasa y crecimiento y (b) consumo de azúcares y producción de etanol de <i>C. lusitaniae</i> cultivada en medio Breus suministrado con celobiosa, glucosa y xilosa 0.5 % cada uno.	43
Figura 17. Comparación de la calidad del RNA de células de <i>C. lusitaniae</i> extraído mediante dos métodos diferentes.	45
Figura 18. PCR punto final usando como molde cDNA. (a) cebadores para actina (c3, c4); (b) cebadores para Bgl 1 (c3, c4), Bgl 2 (c5, c6), Bgl 3 (c7, c8) y actina (c9, c10, c11).....	46
Figura 19. Productos de PCR punto final usando como molde cDNA en gradiente de temperaturas para <i>Bgl</i> 1.....	47
Figura 20. Productos de PCR punto final usando como molde cDNA para <i>Bgl</i> 1, <i>Bgl</i> 2 y <i>Bgl</i> 3	48
Figura 21. Extracción de RNA de células de <i>C. lusitaniae</i> cultivada en diferentes fuentes de carbono.....	49
Figura 22. Productos de PCR punto final usando como molde cDNA y el kit KAPA SYBR One-step.....	49
Figura 23. Expresión relativa del gen <i>Bgl</i> 1 respecto al gen de actina en diferentes fuentes de carbono a las 0 y 6 h de cultivo en aerobiosis.	50
Figura 24. Log ₂ de la expresión relativa del gen <i>Bgl</i> 1 respecto al gen de actina en diferentes fuentes de carbono a las 6 h de cultivo en aerobiosis.	51
Figura 25. Productos de qPCR usando el kit KAPA SYBR One-step qPCR kit....	52
Figura 26. Curvas de fusión para secuencias amplificadas por los cebadores para el gen de actina y <i>Bgl</i> 1 del experimento de PCR en tiempo real.....	53
Figura 27. Expresión relativa del gen <i>Bgl</i> 1 respecto al gen de actina en el control con glicerol y celobiosa a las 0 y 6 h de cultivo en anaerobiosis.....	54
Figura 28. Perfil de elución de proteína de un extracto crudo libre de células de <i>C. lusitaniae</i> con gradiente de KCl (0.1 a 1 M).	56
Figura 29. SDS-PAGE 10% de las fracciones con actividad β -glucosidasa eluidas con KCl mediante cromatografía de intercambio aniónico.	56
Figura 30. Perfil de elución de un extracto crudo libre de células de <i>C. lusitaniae</i> mediante exclusión molecular.	57

Figura 31. SDS-PAGE (10%) de las fracciones con actividad β -glucosidasa eluidas a través de una columna de exclusión molecular de Bio-Gel P-60. 58

Figura 32. (A) Gel de actividad con MUG 5 mM; (B) Gel de poliacrilamida en condiciones nativas de la fracción 7 de la elución en columna de exclusión molecular..... 59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de etanol a partir de materiales celulósicos usando β -glucosidasas nativas y recombinantes.....	11
Tabla 2. Secuencias de los cebadores usados en este trabajo.....	22
Tabla 3. Temperatura y pH óptimos de actividad de β -glucosidasas de diferentes microorganismos.....	28
Tabla 4. Número de las secuencias en la base de datos NCBI.....	44
Tabla 5. Concentración de RNA extraído de células de <i>C. lusitaniae</i>	45
Tabla 6. Purificación de la β -glucosidasa de <i>C. lusitaniae</i>	59

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
Abs	Absorbancia
<i>Bgl</i> 1	Gen que codifica para la β -glucosidasa de <i>Clavispora lusitaniae</i>
BGL 1	Cebadores para <i>Bgl</i> 1
BGL 2	Cebadores para <i>Bgl</i> 2
BGL 3	Cebadores para <i>Bgl</i> 3
cDNA	ADN complementario
CMC	Carboximetilcelulosa
MUG	4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido
OD	Densidad óptica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pNPG	p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido
qPCR	PCR en tiempo real, del inglés “quantitative polymerase chain reaction”
SDS	Detergente aniónico, del inglés “Sodium dodecyl sulfate”
SDS-PAGE	Del inglés “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”
YM	Medio de cultivo, del inglés “Yeast Extract-Maltose”
YPC	Medio de cultivo, del inglés “Yeast Extract-Peptone-Cellobiose”
YPD	Medio de cultivo, del inglés “Yeast Extract-Peptone-Dextrose”

RESUMEN

El bioetanol producido a partir de desechos agroindustriales o cultivos no aptos para consumo humano es un biocombustible de 2^a generación.

La celobiosa es un disacárido de glucosa que se acumula durante la sacarificación del material lignocelulósico llegando a ser un cuello de botella durante la producción de bioetanol, debido a que inhibe la actividad de las endo y exoglucanasas. Por esta razón se han buscado microorganismos capaces de asimilar y fermentar la celobiosa a etanol. Los géneros más utilizados para la producción de etanol a partir de celobiosa son *Pichia* y sólo cepas recombinantes de *Saccharomyces*, ya que estas levaduras cuentan con la β -glucosidasa, enzima clave para la asimilación y eventual fermentación de la celobiosa. En este trabajo se seleccionó la levadura ascomiceta *Clavispora lusitaniae* aislada de mostos de mezcal en Oaxaca y con capacidad de asimilar y fermentar la celobiosa. *C. lusitaniae* se cultivó en medio mínimo con celobiosa, glucosa y xilosa en condiciones aerobias y/o anaerobias. Cuando la levadura creció en celobiosa en condiciones aerobias se encontró actividad de la β -glucosidasa ligada al crecimiento, mientras que al crecer en glucosa no se observó un aumento o cambio en la actividad. En condiciones anaerobias se observó consumo de celobiosa y producción de etanol, con la diferencia en que bajo estas condiciones la actividad máxima observada representó el 70 % del medido en condiciones de aireación y el consumo de celobiosa fue mucho más lento. Se midió el nivel de expresión del gen que codifica para una β -glucosidasa y se observó bajo las dos condiciones mencionadas anteriormente un aumento de la expresión del gen *Bgl 1* cuando la levadura creció en celobiosa. Se confirmó que *C. lusitaniae* posee al menos un gen que codifica para β -glucosidasa y dos genes putativos que codifican para proteínas con la misma actividad.

ABSTRACT

Bioethanol of second generation is a fuel produced from lignocellulosic residues or crops that not are apt for human consumption.

The cellobiose is a glucose disaccharide that accumulates during saccharification of lignocellulosic material becoming a bottleneck during the production of bioethanol, because it inhibits the activity of endo and exoglucanases. For this reason, the search of novel microorganisms capable of producing ethanol from cellobiose is necessary. The most used genera to produce ethanol from cellobiose are *Pichia* and recombinants of *Saccharomyces* since these yeasts have β -glucosidase, a key enzyme for the assimilation and eventual fermentation of cellobiose. In this work, the ascomycete yeast *Clavispora lusitaniae* isolated from mezcal musts in Oaxaca was selected due its capacity to assimilate cellobiose. *C. lusitaniae* was cultured in minimal medium with cellobiose, glucose and xylose under aerobic and / or anaerobic conditions. When the yeast was grown in cellobiose under aerobic conditions, enzymatic activity of the growth-linked β -glucosidase was found, whereas when was grown in glucose, no increase or change in activity was observed. Under anaerobic conditions, consumption of cellobiose and ethanol production was observed, with the difference that under these conditions the maximum activity observed represented 70% of the measured under aeration conditions and the consumption of cellobiose was much slower. The level of expression of gene coding for a β -glucosidase was measured and an increase in the expression of the *Bgl* 1 gene was observed under the two conditions mentioned above when the yeast grew in cellobiose. Also, was confirmed that *C. lusitaniae* possesses at least one gene that code for β -glucosidase and two putative genes that code for proteins with the same activity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Bioetanol

Los combustibles fósiles, el petróleo y sus derivados, como fuente de energía no renovable, están llegando a niveles de agotamiento acelerado y se estima que a mediano plazo ya no será posible cubrir la demanda mundial. Esta situación sumada a la contaminación ambiental y al calentamiento global, provocados en gran medida por el uso de este tipo de combustibles, es un reto de enormes proporciones, pero también una oportunidad para la implementación de energías renovables (SAGARPA, 2012). Como alternativa a este problema han surgido los biocombustibles, los cuales han ganado atención no sólo por su potencial para asegurar el suministro de energía, sino también por el hecho de que la carga neta de emisiones de gases de efecto invernadero por éstos es cercana a cero (Farrell *et al.*, 2006).

Actualmente existen diversas materias primas para la producción de etanol, tales como el almidón de maíz y el azúcar de caña (primera generación); cultivos de alta densidad (tercera generación) y fuentes de carbono alternativas como CO₂ usando OGM. El etanol de segunda generación es el producido a partir de biomasa lignocelulósica y es uno de los principales tipos de biocombustibles que está siendo producido comercialmente. En 2016, la producción mundial de bioetanol fue cercana a los 26,583 millones de galones, siendo Estados Unidos y Brasil los principales productores abarcando cerca del 85 % del total de la producción mundial (RFA, 2016) (**Figura 1**). En estos países la producción de bioetanol se lleva a cabo a partir de maíz y azúcar de caña, respectivamente (Mussatto *et al.*, 2010); sin embargo, en países como México, el uso de dichas materias primas compromete la seguridad alimentaria y encarecería los alimentos (Aburto *et al.*, 2008). Una alternativa biotecnológica en la producción de etanol, que permiten superar esos

problemas es la utilización de residuos lignocelulósicos para su producción (Sarkar *et al.*, 2012).

Los biocombustibles de segunda generación, producidos a partir de materia prima de bajo costo tal como cultivos que no son para consumo humano (palma, sorgo dulce), partes no comestibles de los cultivos alimentarios (bagazo, fibra de maíz, torta de semillas) y agrorresiduos (rastrajo de maíz, paja de trigo y cebada), son un buen candidato para suplir las necesidades energéticas actuales y futuras (Saini *et al.*, 2015).

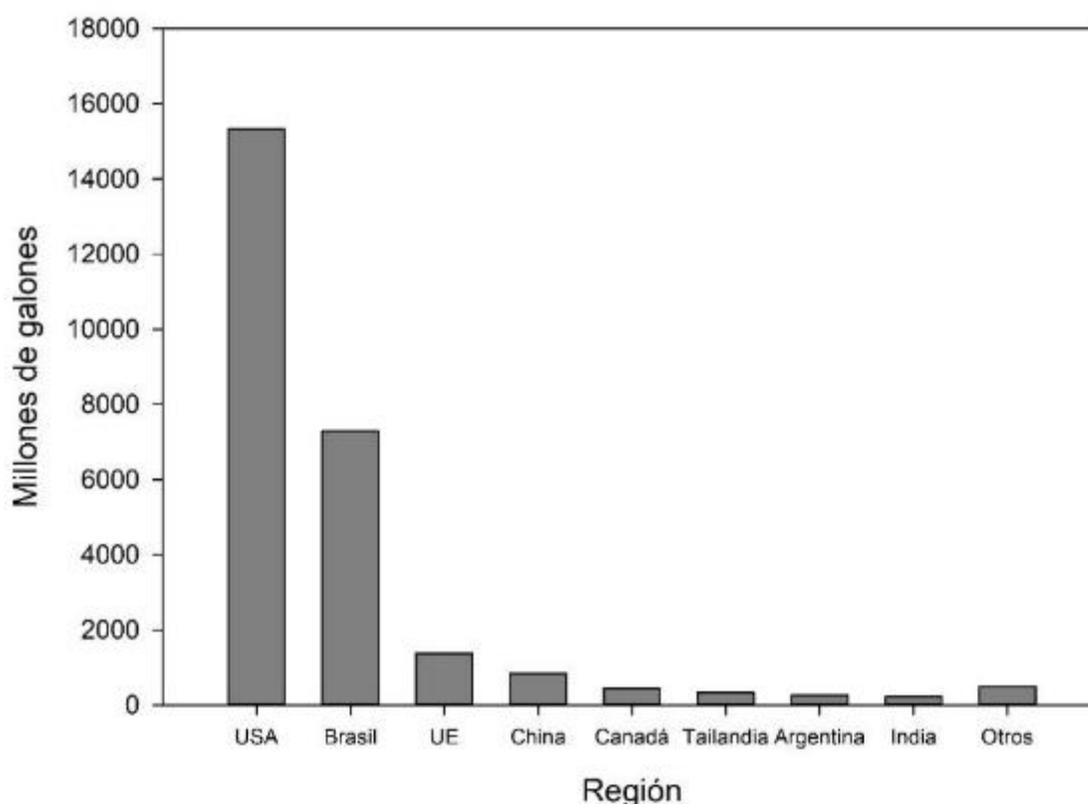


Figura 1. Producción de etanol a nivel mundial en 2016 (RFA, 2016).

1.2. Residuos lignocelulósicos

La biomasa lignocelulósica está compuesta de celulosa, hemicelulosa, lignina, extraíbles y diferentes materiales inorgánicos (Singla *et al.*, 2012; Saini *et al.*, 2014). La celulosa es un polímero lineal y cristalino compuesto por unidades de β -D-

glucosa, su estructura es rígida y difícil de romper (Chesson & Forsberg, 1988), la degradación de la celulosa genera celooligosacáridos, celodextrinas, celobiosa y en el mejor de los casos glucosa (Yang et al, 2011). La fracción de hemicelulosa está compuesta por heteropolímeros lineales y ramificados de D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-glucosa y D-manosa, su estructura no es cristalina y, por esto es más fácil hidrolizar (Chang & Holtzapfle, 2000).

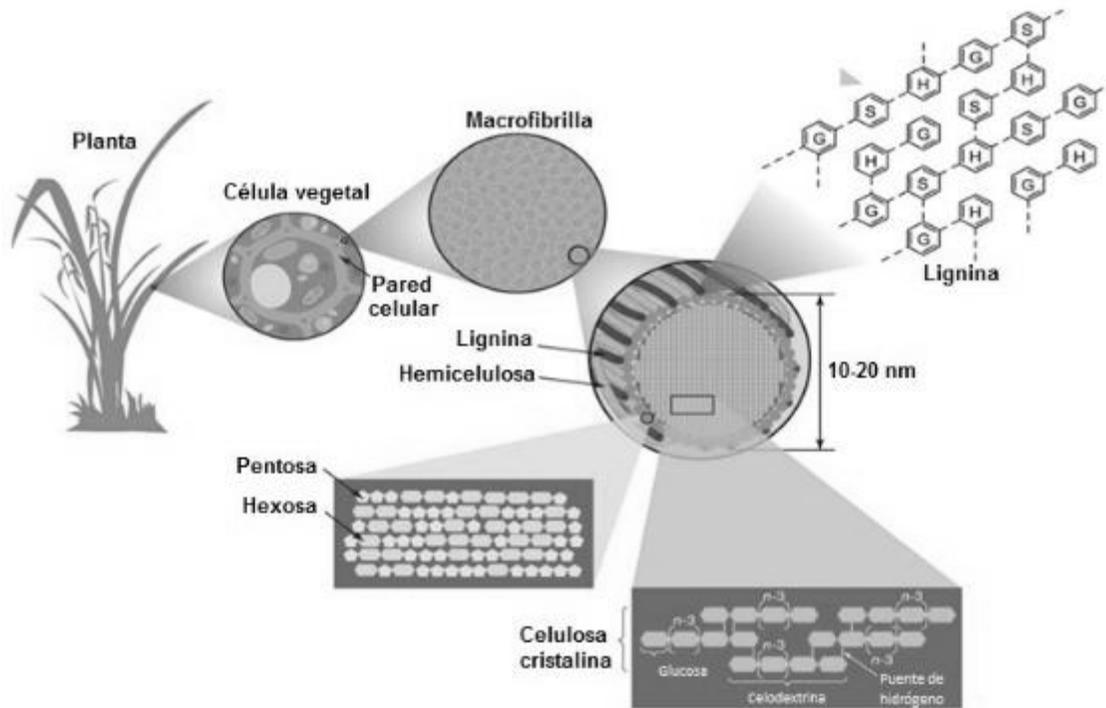


Figura 2. Estructura de la lignocelulosa. Modificado de (Rubin, 2008).

1.3. La celulosa

La celulosa es el biopolímero más abundante y renovable del planeta, se encuentra en la naturaleza casi exclusivamente en la pared celular de las plantas, en un porcentaje que oscila entre el 35 y 50% en peso seco (Peters, 2006). Se estima que alrededor de 180 miles de millones de toneladas de celulosa son producidas por las plantas anualmente, por lo que constituye una de las fuentes de carbono renovables más importantes que hay sobre la Tierra (Kadla & Gilbert, 2000). Este polímero

consiste en cadenas insolubles llamadas microfibrillas que se estructuran de manera lineal unidas intramolecularmente por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Las microfibrillas forman una estructura cristalina resistente a la hidrólisis, además de regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Béguin y Aubert 1994; Ovando-Chacón y Waliszewsk 2005).

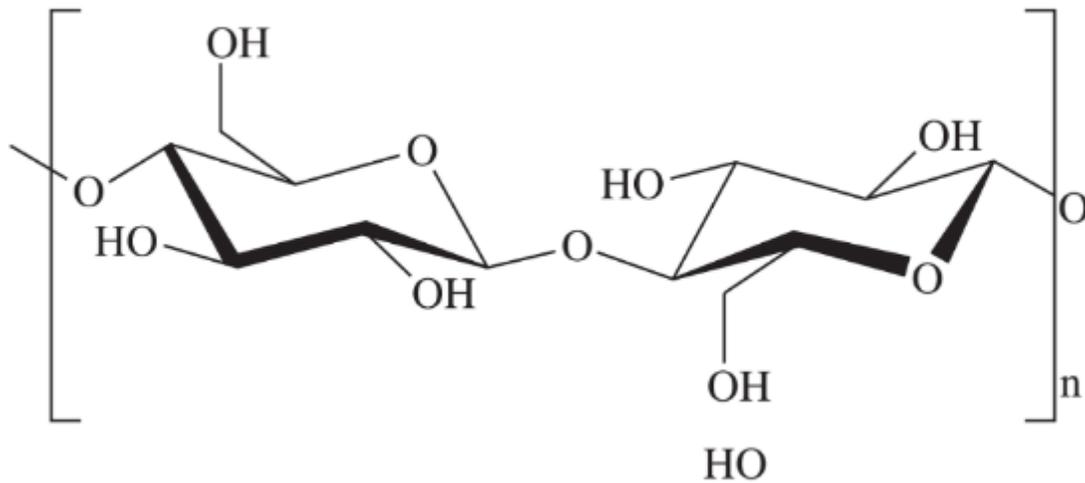


Figura 3. Estructura química de la celulosa.

1.4. Degradación enzimática de la celulosa

Las enzimas implicadas en la degradación de la celulosa a celodextrinas, celobiosa y glucosa, actúan de manera sinérgica y para su estudio han sido clasificadas de acuerdo con su acción catalítica. Sin embargo, en la actualidad también se clasifican tomando en cuenta sus propiedades estructurales (Henrissat *et al*, 1998).

Se han encontrado tres tipos principales de actividades enzimáticas:

- EC 3.2.1.4. Endocelulasas que rompen aleatoriamente enlaces internos en las regiones amorfas de la celulosa.

- EC 3.2.1.91 Exocelulasas o celobiohidrolasas que escinden de dos a cuatro unidades de los extremos de las cadenas expuestas producidas por la endocelulasa, dando como resultado tetrasacáridos o disacáridos, como la celobiosa.
- EC 3.2.1.21 Celobiasas o β -glucosidasas, que hidrolizan el producto de las exocelulasas a monosacáridos.

Las endoglucanasas cortan al azar el enlace $\beta(1\rightarrow4)$ de las regiones internas en sitios amorfos de la cadena de celulosa, generando oligosacáridos de distintas longitudes y a su vez nuevos extremos libres. Las exoglucanasas actúan de forma progresiva en los extremos reductores y no reductores de la celulosa liberando glucosa o celobiosa como productos mayoritarios. La β -glucosidasa hidroliza la celobiosa la cual es un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa unidas por el enlace $\beta(1\rightarrow4)$ (Kumar et al. 2008; Singhania et al. 2013). La hidrólisis total de la celulosa cristalina requiere de la acción de las endoglucanasas, exoglucanasas y β - glucosidasas, sin embargo, a partir de celulosa amorfa sólo se requiere de la acción combinada de la actividad de las endoglucanasas y de la β -glucosidasa, para liberar glucosa y celobiosa principalmente (Zhang & Lynd, 2004).

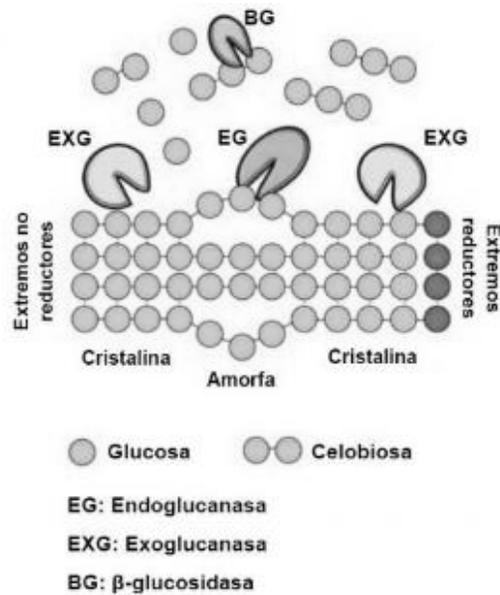


Figura 4. Mecanismo de degradación de la celulosa (Modificado de Lynd et al., 2002).

1.5. β -glucosidasa

Las β -glucosidasas son enzimas miembros del complejo de celulasas que hidroliza los enlaces glicosídicos de glicósidos y oligosacáridos. Estas enzimas rompen los enlaces β 1-4 entre dos moléculas de glucosa o moléculas con un sustituto de glucosa tal como la celobiosa y otros oligosacáridos unidos por enlace β los cuales liberen glucosa (Henrissat, Glycosidase families, 1998). Este grupo de enzimas es encontrado en todos los reinos de organismos, incluyendo bacteria, archaea y eucariotas, jugando papeles importantes tales como la conversión de biomasa en microorganismos, rompimiento de glicolípidos y procesos de lignificación involucrados en la defensa contra plagas, activación de fitohormonas, catabolismo de la pared celular en plantas y, la interacción planta-microorganismo y planta-insecto (Bhatia *et al.*, 2002).

La β -glucosidasa es importante para la hidrólisis final de polímeros complejos y al ser producida por una amplia cantidad de microorganismos, puede ser intracelular, extracelular o estar unida a membrana. Las β -glucosidasas intracelulares son generalmente sintetizadas después de proporcionar una fuente de carbono al medio de cultivo, es decir, son inducibles (Lee *et al.*, 1996); mientras que las β -glucosidasas unidas a membrana son más comunes en levaduras y suele ser constitutivas o inducibles.

1.6. Clasificación de las β -glucosidasas

Las β -glucosidasas se clasifican con base a la especificidad de sustrato y la identidad de su secuencia de aminoácidos.

Basado en la especificidad de sustrato, las β -glucosidasas están agrupadas en 3 clases (Rajan *et al.*, 2004):

1. Aril- β -D-glucosidasas, las cuales tienen una fuerte afinidad por los aril- β -D-glucósidos.
2. Celobiasas, que sólo hidrolizan celobiosa.
3. Glucosidasas de amplia especificidad, que exhiben actividad en muchos tipos de sustratos y son las β -glucosidasas más encontradas comúnmente.

Con base a la homología de secuencias, las β -glucosidasas han sido divididas en dos subfamilias (Cantarel *et al.*, 2009; Krisch *et al.*, 2010):

1. BGA: β -glucosidasas y fosfo- β -glucosidasas de bacterias hasta mamíferos.
2. BGB: β -glucosidasas de levaduras, mohos y bacterias de rumen.

También ha sido desarrollado un sistema de clasificación alternativo para las glicosil hidrolasas basado en la secuencia de aminoácidos y la similitud estructural

(Henrissat & Davies, 1997). En este sistema, aquellas enzimas con una similitud de secuencia de aminoácidos general y motivos de secuencia bien conservados se consideran en una sola familia. Actualmente, 133 familias de glicosil hidrolasas (GH) se encuentran en la base de datos *Carbohydrate Active enZYme* (CAZY) (<http://www.cazy.org>) (Cantarel *et al.*, 2009; Cairns & Esen, 2010).

Estas familias con las estructuras de sus dominios catalíticos similares y aminoácidos catalíticos conservados, sugiriendo un ancestro y mecanismo de catálisis común, son agrupadas en el mismo Clan. El Clan GH-A contiene el mayor número de familias incluyendo las β -glucosidasas de las familias GH1, GH5 y GH30. A la familia GH1 pertenecen el mayor número de β -glucosidasas que han sido caracterizadas. Esta familia incluye β -glucosidasas de arqueobacterias, plantas y mamíferos, y a la familia GH3 pertenecen las β -glucosidasas de algunas bacterias, mohos y levaduras (Cairns & Esen, 2010; Krisch *et al.*, 2010).

1.7. Regulación de la expresión de las β -glucosidasas

En general, las β -glucosidasas son enzimas de actividad inducible. La mayoría de los microorganismos que las poseen y que han sido estudiados producen el nivel más alto de β -glucosidasas cuando crecen en celobiosa, aril-glucósidos o celooligosacáridos y en algunos casos celulosa, tales como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus terreus*, *Axynobacillus* sp. DT3-1, *Clavispora* sp. NRRL Y-50464 (Liu, Weber, & Cotta, 2013; Guo *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2016). También se sabe que algunos microorganismos poseen β -glucosidasas de actividad constitutiva, tales como *Candida wickerharmii* (Freer & Detroy, 1985). Por otro lado, existen microorganismos que poseen más de una β -glucosidasa y unas son enzimas inducibles y las demás de expresión constitutiva (Wang *et al.*, 2016).

El proceso de síntesis de las β -glucosidasas dependerá de su localización en la célula. Cuando estas enzimas están acopladas al exterior de la célula o se liberan extracelularmente, generalmente poseen niveles de expresión basales y al estar en presencia del sustrato se inicia la síntesis de más proteína (inducibles) (Mach *et al.*, 1995). En el caso de los microorganismos que poseen β -glucosidasas intracelulares, es necesario que la celobiosa o las celo-oligosacáridos pasen a través de la membrana al interior celular para desencadenar el proceso de producción de la enzima, para ello son necesarios transportadores de celobiosa o celodextrinas que se encuentren ubicados en la membrana; siendo el último el caso de *Clavispora* sp. NRRL Y-50464 (Liu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016) y, uno de los hongos cuyos transportadores han sido más estudiados, *Neurospora crassa* (Galazka *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2014).

Por otro lado, durante la síntesis de β -glucosidasas la glucosa actúa como principal represor enzimático (Saha & Bothast, 1996; Turan & Zheng, 2005; Lee *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016). Así mismo, la actividad de las β -glucosidasas está sujeta a inhibición por producto final, por lo que la acumulación de glucosa llega a inhibir competitivamente su actividad (Turan & Zheng, 2005; Liu *et al.*, 2013). Este problema se puede superar teniendo cepas con β -glucosidasas tolerantes a altas concentraciones de glucosa o que simplemente no se vean inhibidas por la presencia de este sacárido tales como las β -glucosidasas BGL 2 y 3 de *Clavispora* sp. NRRL Y-50464 (Wang *et al.*, 2016), la β -glucosidasa de *Anoxybacillus* sp. DT3-1 (Chan *et al.*, 2016) y algunas de las β -glucosidasas de *T. reesei* (Guo *et al.*, 2016).

1.8. Las β -glucosidasas en la producción de bioetanol

La utilización exitosa de residuos celulósicos agrícolas y cultivos energéticos para la producción de etanol es uno de los focos de la industria y de la investigación. La mayoría de las investigaciones se han centrado en la bioconversión de polímeros

complejos a azúcares simples y, posteriormente éstos sean convertidos a combustibles a través de la fermentación (Cherubini, 2010).

Las β -glucosidasas como parte del complejo de celulasas, hidroliza la celobiosa y celooligosacáridos cortos para obtener glucosa, que es el azúcar fermentado por las levaduras a etanol. La celulosa es degradada por las endoglucanasas y exoglucanasas, produciendo celobiosa y algunos celooligosacáridos, los cuales pueden ser convertidos a glucosa por acción de la β -glucosidasa. La reacción catalizada por esta enzima es el paso más importante en la degradación de la celulosa porque es el que limita la eficiencia de la hidrólisis y, podría disminuir la inhibición de las exoglucanasas y endoglucanasas por la acumulación celobiosa y celooligosacáridos (Zhenming *et al.*, 2009).

De todas las enzimas que podrían ser usadas para enriquecer los cocteles de celulasas para mejorar la eficiencia de sacarificación, la β -glucosidasa es la más común y ha sido ampliamente estudiada (Kumar & Wyman, 2008; Zimbardi *et al.*, 2013). Además, la búsqueda de nuevos microorganismos y la bioprospección para versiones mejoradas de las enzimas claves y enzimas que actúan sinérgicamente con las celulasas actuales, constituyen un punto importante en la investigación empírica con miras a incrementar la eficiencia de la actividad celulolítica y reducir los costos de la producción de etanol.

Así mismo, para superar las limitaciones que presentan algunas enzimas nativas, la manipulación genética en los genes de las β -glucosidasas ha sido usada para ampliar el espectro de sus sustratos lo cual deja un aumento en el rendimiento de producción de etanol a partir de celobiosa en cepas recombinantes. Algunos de los estudios recientes centrados en el uso de β -glucosidasas microbianas para la producción de biocombustibles a partir de residuos celulósicos son mencionados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Producción de etanol a partir de materiales celulósicos usando β -glucosidasas nativas y recombinantes.

Tipo de microorganismo	Organismo	Etanol	Referencia
Bacteria	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	-	Chen <i>et al.</i> , 2010
	<i>Cellulomonas biazotea</i>	-	Chan <i>et al.</i> , 2011
	<i>Clostridium phytofermentas</i>	25 mM	Tolonen <i>et al.</i> , 2011
	<i>Clostridium thermocellum</i>	1.80 g/L	Kim <i>et al.</i> , 2013
Levaduras	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	9.15 g/L	Jeon <i>et al.</i> , 2009
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	-	Jeon <i>et al.</i> , 2009
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	29 g/L	Kitagawa <i>et al.</i> , 2010
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45 g/L	Ha <i>et al.</i> , 2011
	<i>Clavispora</i> NRRL Y-50464	23 g/L	Liu <i>et al.</i> , 2012
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8.5 g/L	Tang <i>et al.</i> , 2013
Hongos	<i>Aspergillus oryzae</i>	21.6 g/L	Kotaka <i>et al.</i> , 2008
	<i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	-	Chauve <i>et al.</i> , 2010
	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	-	Chen <i>et al.</i> , 2012
	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Neurospora crassa</i>	-	Bauer <i>et al.</i> , 2006

(Adaptado de Singh *et al*, 2016).

1.9. *Clavispora lusitaniae*

Las β -glucosidasas de levaduras nativas pueden ser producidas extra o intracelularmente. En el primer grupo se encuentran levaduras tales como *Candida wickerhamii*, *Debaryomyces pseudopolymorphus* y *Cryptococcus albidus*, que poseen una β -glucosidasa asociada a la célula y una de liberación al medio extracelular, respectivamente (Freer S. , 1993; Rosi *et al*, 1994; Koleva *et al*, 2006). En el segundo grupo se encuentran la mayoría de las levaduras, las cuales poseen β -glucosidasas intracelulares tales como *Clavispora* y *Pichia pastoris* (Liu *et al*, 2013; Turan & Zheng, 2005). Así mismo se ha realizado la manipulación genética de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* que no produce de forma nativa una β -glucosidasa, para obtener cepas recombinantes que sí la produzcan (Ha S.-J *et al*, 2011; Njokweni *et al*, 2012; Trollope *et al*, 2018).

Clavispora lusitaniae es una levadura ascomiceta que ha sido aislada de distintos hábitats como plantas y suelo (Lachance, 1995). Esta levadura forma colonias blancas, circulares y elevadas. Sus células se observan ovaladas y con forma de limón.

Spindler *et al.*, (1988), reportaron que *C. lusitaniae* es una levadura capaz de fermentar celobiosa y sacarificados de celulosa, además mantiene hasta en 70%, su actividad de degradación a los 45 °C, exhibiendo su mayor actividad de bioconversión a los 37 °C. Además, concluyeron que un microorganismo que puede fermentar celobiosa y glucosa rápidamente como *C. lusitaniae*, es altamente valorada. Así mismo, resalta lo importante de utilizar cepas genéticamente modificadas que permitan aumentar el aprovechamiento de la celobiosa, el rendimiento de etanol, y su tolerancia. Por otro lado Freer & Greene, (1989), mencionan que *C. lusitaniae* posee una β -glucosidasa intracelular inducible, y que esta levadura posee la capacidad de transportar celobiosa al interior celular y fermentarla hasta etanol. La enzima y los transportadores de celobiosa

aparentemente son reprimidos por la presencia de glucosa en el medio extracelular y no hay consumo de celobiosa hasta que se ha agotado la mayoría de la glucosa disponible.

Se ha encontrado una cepa de *Clavispora* sp., denominada NRRL Y-50464 que es capaz de utilizar celobiosa como única fuente de carbono y produce suficiente actividad β -glucosidasa para obtener etanol en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas. Además es una levadura tolerante a la mayoría de los inhibidores derivados del pretatamiento de la biomasa lignocelulósica 2-furaldehído (furfural) y 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (HMF) (Liu *et al.*, 2012). En estudios posteriores del mismo grupo de trabajo, se identificaron 3 β -glucosidasas en esta cepa, siendo dos de ellas de síntesis inducible y una constitutiva (Liu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICACIÓN

Dadas las necesidades energéticas de México, es prioritario desarrollar y mejorar los procesos de producción de bioetanol ya existentes. Para ello, se deben concentrar los esfuerzos en la búsqueda de nuevas cepas capaces de fermentar sacarificados de residuos lignocelulósicos. Así como el mejoramiento de éstas para incrementar los rendimientos de los procesos y su rentabilidad.

En este contexto *C. lusitaniae*, levadura aislada de mostos de mezcal provenientes de Oaxaca, tiene la capacidad de asimilar pentosas, hexosas y otros azúcares resultantes de la hidrólisis de la celulosa tales como la celobiosa; a diferencia de levaduras utilizadas comúnmente como *S. cerevisiae*. Esta capacidad es altamente deseada en los procesos de fermentación para obtención de etanol a partir de residuos celulósicos. Por lo anterior se pretende comprender y dilucidar el metabolismo de la celobiosa a través del estudio de la β -glucosidasa, los genes involucrados, así como la regulación de su biosíntesis en la fermentación de la celobiosa por *C. lusitaniae*.

3. HIPÓTESIS

La β -glucosidasa de *Clavispora lusitaniae*, es una enzima regulada y limitante en la producción de etanol a partir de celobiosa.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Identificar los mecanismos que regulan la expresión y actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* como enzima limitante en la producción de etanol.

4.2. Específicos

Determinar las condiciones de proceso (aireación y fuente de carbono) necesarias para la síntesis de la β -glucosidasa en *C. lusitaniae*.

Determinar las condiciones de inhibición de la actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae*.

Cuantificar los transcritos que participan en la codificación para la β -glucosidasa en diferentes fuentes de carbono y aireación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos empleados y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se utilizó la levadura ascomiceta *Clavispora lusitaniae* aislada de mostos de mezcal, Oaxaca, México. Las condiciones de crecimiento fueron 30 °C y 150 rpm en medios diferentes de acuerdo con el objetivo de los ensayos. Las células se reactivan en medio YPD a partir de un cultivo conservado en glicerol al 50% como crioconservante a -70 °C.

5.2. Medios de cultivo

5.2.1. Medio YPD

Composición en g/L: extracto de levadura (10); peptona (20); fuente de carbono (10).

5.2.2. Medio YM

Composición en g/L: bactopectona (5); extracto de levadura (3); extracto de malta (3); glucosa (10).

5.2.3. Medio Breus

Composición en g/L: extracto de levadura (0.5); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05); glucosa (10) (Breus *et al.*, 2012). El medio Breus-C posee la misma composición, a excepción de que la fuente de carbono es celobiosa.

5.3. Preparación del inóculo

Se tomó una colonia de *C. lusitaniae* para inocular un matraz de 250 mL conteniendo 50 mL del medio YPD, se incubó durante 24 h a 30 °C y 150 rpm. Se tomó 10 % (v/v) de este pre-inóculo para inocular un segundo matraz con medio YPD o YPC (según el caso) y se incubó bajo las mismas condiciones durante 12 h. Posteriormente, las células se lavaron por centrifugación (8,000 rpm durante 10 min) tres veces con agua destilada estéril y finalmente fueron resuspendidas en el volumen inicial de medio Breus.

5.4. Curva de crecimiento celular

Para la curva estándar de crecimiento en peso seco se hicieron 5 diluciones de un cultivo de 8 h en medio YPD, se midió DO a 600 nm y posteriormente se llevaron a peso constante una alícuota de cada una de las diluciones en una estufa al vacío a 70°C. La curva de crecimiento, en peso seco (g/L) versus DO 600 nm se hizo por triplicado. La ecuación que representa esta relación se muestra a continuación ($R^2=0.9871$):

$$Biomasa \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{Abs \ 600 \ nm + 0.0031}{2.9558}$$

5.5. Obtención de extracto crudo libre de células

Se centrifugaron 5-10 mL del cultivo a 8,000 rpm por 10 min para recuperar las células, posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Después se resuspendió el botón celular en un tubo Eppendorf con 400 µL de regulador de fosfatos 0.1 M pH 7.2. Se congeló la muestra a -20 °C por 30 min. Tras descongelar se agregaron 0.3 g de arena de vidrio y 150 µL 2-mercaptoetanol 0.1M. Se agitó en

vórtex por 30 min a máxima velocidad. Finalmente, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante en otro tubo.

5.6. Determinación de actividad enzimática

La actividad de la β -glucosidasa fue estimada espectrofotométricamente midiendo la liberación de *p*-nitrofenol (pNP) mediante la hidrólisis de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) (Kim & Pack, 1989).

Se mezclaron 0.1 mL del extracto enzimático con 1 mL de pNPG 1mM en regulador citratos-fosfatos 50 mM pH 5.5. Se incubaron a 45 °C durante 15 min y la reacción se detuvo por la adición de 1 mL de Na₂CO₃ 1 M (modificado de Kim & Pack, 1989). Se leyó la absorbancia a 405 nm y se calculó la concentración de pNP liberado con ayuda de una curva estándar. Una unidad de actividad de β -glucosidasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de pNP por minuto en las condiciones estándar de ensayo.

5.7. Determinación de las condiciones del ensayo enzimático

La temperatura y el pH óptimos del ensayo enzimático se evaluó en los intervalos de 30-55 °C y pH 5.5-7.0 respectivamente. Cuando se evaluó temperatura, el pH se mantuvo en 6.0.

Los efectos del pH sobre la actividad de la β -glucosidasa fueron evaluados usando regulador fosfatos 50 mM (pH 5.7-7.0), citratos 50 mM (pH 5.5-6.5) y citratos-fosfatos 50 mM (pH 5.5-6.5), todos a 45 °C.

5.8. Cuantificación de proteína

Se agregaron 500 μL de NaOH 1 N, 450 μL de agua y 50 μL de muestra en un tubo de ensayo. Se llevó la mezcla a ebullición por 5 min y se enfrió en baño de agua. Se agregó 2.5 mL de reactivo C (50 mL de carbonato de sodio 5%, 1 mL de tartrato de sodio y potasio 2% y 1 ml de sulfato cúprico 1%). Se dejó reposar 10 min y se agregó 500 μL de reactivo de Folin (Sigma) 1 N y se mezcló vigorosamente en vórtex. Se dejó reposar la reacción 30 min y se leyó absorbancia a 750 nm (espectrofotómetro Jenway 6320D). Se calculó la concentración contra una curva patrón de solución de albúmina de suero bovino de 0 a 300 μg (Lowry *et al.*, 1951).

5.9. Cuantificación de azúcares y etanol

La cuantificación e identificación de los azúcares se hizo por HPLC. Se inyectaron 20 μL de muestra previamente diluida con agua (1:5) y filtrada a través de una membrana acrodisco (ϕ 1.3 cm, tamaño de poro 0.45 μm , PALL). Se utilizó una columna Hi-plex H+ (300mm x 7.7mm) (Agilent) a 65 °C. El método empleado fue isocrático con un detector de índice de refracción (IR) a 50 °C y como fase móvil se utilizó una solución de ácido sulfúrico a 5 mM con un flujo de 0.6 mL/min.

5.10. Extracción de RNA

La extracción de RNA total de *Clavispora lusitaniae* se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del manual del Kit YeaStar RNA kit (ZymoResearch). La lisis celular se lleva a cabo con una liticasa. El kit facilita la purificación de 10-25 μg de RNA a partir de 1 – 1.5 mL de cultivo de células.

5.11. Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos

Se armó la cámara de electroforesis (BioRad) y se preparó un gel de agarosa al 1% con TAE y se dejó gelificar. Se cargó en los pozos 8 µl de regulador TAE 1%, 1 µl de muestra y 1 µl de reactivo para teñir (Amber DNA Fluorescent DNA Stain, Gel Company). Se cargó 1 µl del marcador de peso molecular (Plus DNA Ladder 1 kb con una concentración de 1 µg/µl) en vez de muestra. Se conectó la cámara a la fuente de poder y se ajustó la corriente a 80 V, se dejó correr por 30 o 40 min en regulador TAE 1X. El reactivo para teñir tiene 3 colorantes para seguir la migración de los ácidos nucleicos: azul de bromofenol, cianol FF xileno y naranja G; cuando este último llegó al extremo del gel se detuvo la alimentación de corriente. El gel se observó en el fotodocumentador de geles (GelDoc de BioRad) con luz UV.

5.12. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de ADN complementario se usó el kit First Strand ADNc Synthesis Kit (Thermo Scientific) de acuerdo con las indicaciones del manual. Este kit posee una transcriptasa reversa recombinante (M-MuLV RT de Moloney Murine Leukemia Virus). Para la síntesis de cDNA se usaron 900 ng de RNA.

5.13. PCR en punto final

La reacción de PCR punto final se llevó a cabo con los siguientes componentes de acuerdo a las recomendaciones en el kit de cDNA (µL): cDNA (90 ng/µL) (1), 10X PCR regulador (1.25), MgCl₂ 20X (0.63), 10 mM dNTP (0.4); oligonucleótido directo 10 µM (0.4), oligonucleótido reverso 10 µM (0.3), Taq polimerasa 5 U/µL (0.15), agua grado biología molecular 8.37, para un volumen final de 12.5 µL. Todos los componentes hacen parte del kit de PCR punto final de BioTecMol.

Se utilizaron las siguientes condiciones para realizar la reacción: desnaturalización inicial de 3 min a 95°C y 35 ciclos de 20 s de desnaturalización a 98 °C, 30 s de alineamiento a la Tm óptima (55°), 30 s de amplificación a 72 °C y por último una extensión final de 1 min a 72 °C (**Figura 5**). En la **Tabla 2** se muestran los cebadores usados en este proyecto.

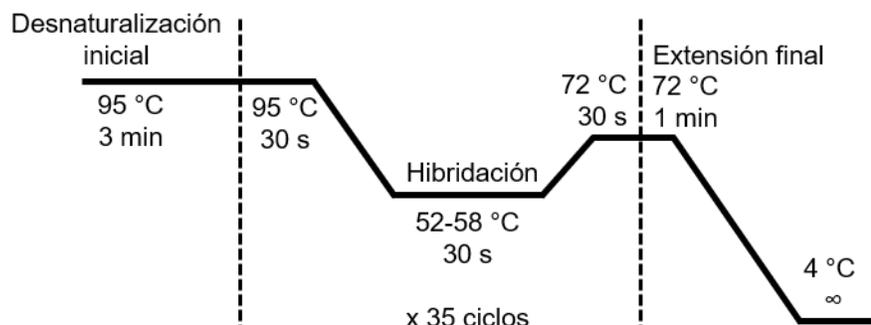


Figura 5. Ciclaje de la reacción de PCR.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores usados en este trabajo.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Referencia
BGL CI 1_F	GGCGCTCAAATCAAAAACACT	Este trabajo
BGL CI 1_R	TAACATCGCTTACCGCTTCA	
BGL CI 2_F	AGTATTCTGCCCCGTTTCTG	
BGL CI 2_R	GCTTCTTCAGGATCACGGTT	
BGL CI 3_F	GCCATTGTGGACGAGTTGTT	
BGL CI 3_R	AGCGTTTGCGAGTTCTTGT	
BGL Clv 2F	GTTTTGCTTCGGGACCTTGT	Wang <i>et al</i> , 2016
BGL Clv 2R	TGAATGTACTACCGGTGGCT	
BGL Clv 3F	CATTGTGGACGAGTTGTTCT	
BGL Clv 2R	CTTGTTGTCGATCACCAACT	
F-actina	TCTACAACGAATTGAGAGTTGC	SIGMA
R-actina	GACAAGATCTTCATCAAGTAGTC	

5.14. PCR en tiempo real

Para realizar la cuantificación relativa se utilizó el método comparativo de Ct, el cual se define como el número de ciclo en el que se detecta fluorescencia significativa por encima del umbral de detección del equipo utilizado para realizar qPCR. β -Actina fue el control endógeno y las variables fueron aerobiosis y anaerobiosis, tiempo de cultivo y diferentes fuentes de carbono. El método comparativo de Ct se calcula con la siguiente ecuación:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{[\langle Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ control} \rangle \text{ condición A}]}{[\langle Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ control} \rangle \text{ condición B}]}$$

Para llevar a cabo las reacciones de PCR en tiempo real, se usó como molde cDNA usando el kit de KAPA SYBR FAST One-step qRT-PCR (KAPA Biosystem), se siguieron las indicaciones del kit para preparar las reacciones (μL): cDNA (90 ng/ μL) (1), KAPA SYBR FAST qPCR Master mix 2X (10), 10 mM dUTP (0.4), oligonucleótido directo 10 μM (0.4), oligonucleótido reverso 10 μM (0.4), 50X ROX Low (0.4), agua grado biología molecular 7.4, para un volumen final de 20 μL .

Se utilizaron las siguientes condiciones para realizar la reacción: transcripción reversa de 5 min a 42 °C; activación de la enzima de 3 min a 95 °C y 40 ciclos de 20 s de desnaturalización a 95 °C; 20 s de alineamiento a la T_m óptima (52°), 30 s de amplificación a 72 °C; en este paso se llevó a cabo la colección de datos. El paso final de la reacción fue la curva de fusión (**Figura 6**).

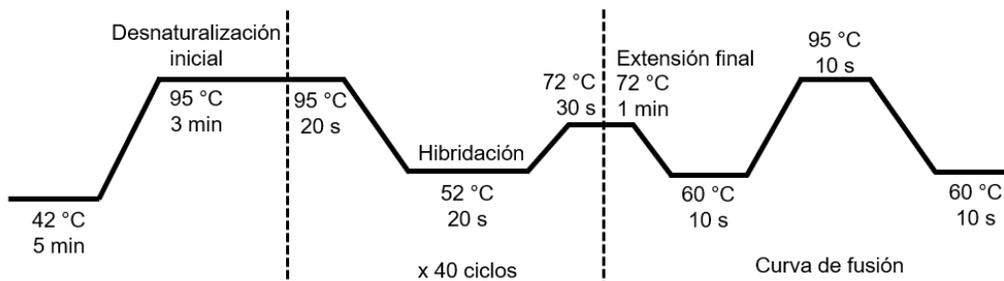


Figura 6. Ciclaje de la reacción de qPCR

5.15. Electroforesis en gel de poliacrilamida para proteínas

Se realizaron geles de poliacrilamida en condiciones nativas y en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 8 y 10 %. Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie Blue R-250 al 0.1 % (Biorad) y observadas bajo luz blanca.

5.16. Ensayo de actividad en gel

Tras haberse completado la electroforesis, el gel fue lavado en regulador citratofosfatos 50 mM pH 5.5 y luego fue sumergido en 50 mL de una solución de Metilumbeliferil- β -D-glucoronido MUG 5 mM en regulador citratofosfatos 50 mM a pH 5.5. El gel fue incubado a 45 °C por 15 min. El gel fue revelado en luz UV 360 nm para observar la liberación de metilumbeliferil.

5.17. Cromatografía de intercambio aniónico fuerte

Un mL de extracto crudo libre de células de *C. lusitaniae* fue sometido a cromatografía de intercambio aniónico empleando una columna de Q Sepharosa Fast Flow (2 x 6 cm) equilibrada previamente con 25 mL de regulador Tris HCl 25

mM pH 7.2. Se eluyó con un gradiente de KCl desde 0.1 a 1 M con un flujo de 0.05 mL/s. Se recolectaron fracciones de 1.7 mL.

5.18. Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó una columna de bio-gel P-60 (Biorad) de 1.5 x 25 cm con rango de fraccionamiento de 3 – 60 kDa, donde se realizó la colección de fracciones de 1 mL por goteo y se siguió la elución de la proteína por espectrofotómetro a 280 nm. Las fracciones con mayor absorbancia fueron evaluadas para actividad de β -glucosidasa.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA β -GLUCOSIDASA

6.1.1. Determinación de las condiciones de temperatura, pH y tiempo de incubación

El extracto crudo libre de células se obtuvo a partir de 1 L de cultivo de *C. lusitaniae*, una vez que se recuperaron las células por centrifugación y fueron lavadas 2 veces con regulador fosfatos 25 mM a pH 7.2. El sobrenadante obtenido después de romper las células contenía 10 mg/mL de proteína y fue usado para determinar las condiciones de pH, tipo de regulador y temperatura óptimos adecuados para la actividad de β -glucosidasa usando pNPG como sustrato. El extracto crudo libre de células que contiene la β -glucosidasa mostró su máxima actividad a 45°C (**Figura 7a**).

En la **Figura 7b** se observa que entre los intervalos de pH 5.0 y 6.5 en regulador citratos fosfatos y citratos, la actividad específica no varía ampliamente. Para elegir la condición óptima para el ensayo se sometieron estos datos a un análisis estadístico de ANOVA de un factor por prueba de Tukey con significancia de 0.95 y el resultado arrojó que los valores de actividad específica en estos intervalos de pH son estadísticamente significativos. Por ende, se eligió el regulador citratos-fosfatos 50 mM pH 5.5 como condición óptima para el ensayo de actividad ya que fue en el que se observó la mayor actividad.

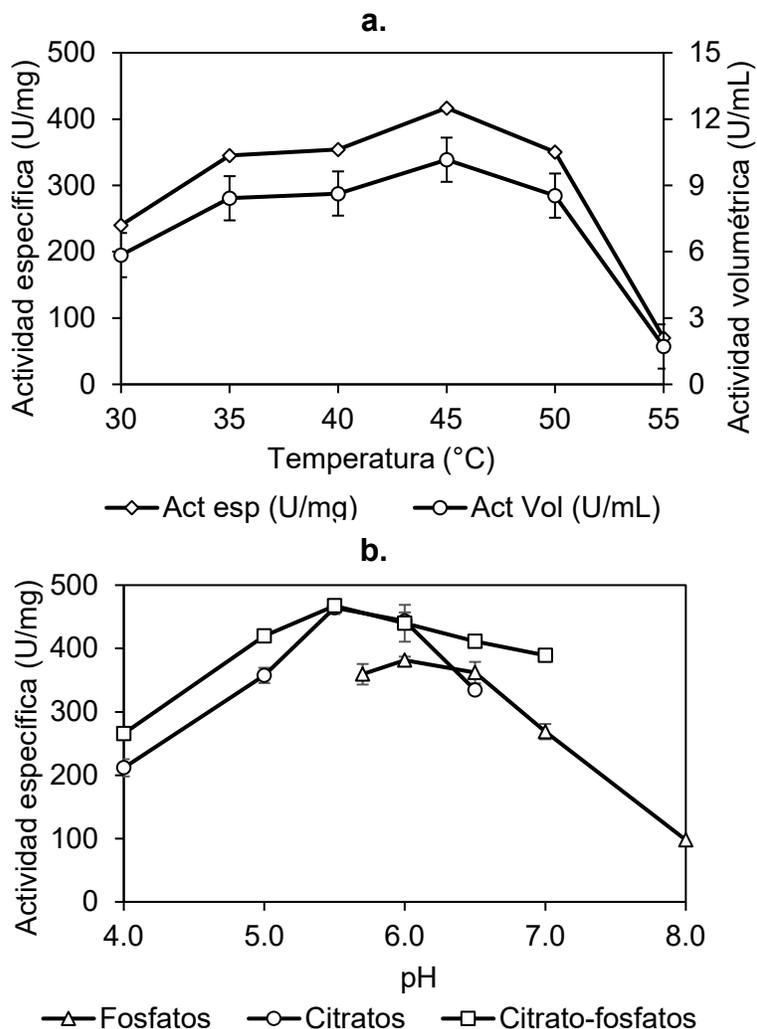


Figura 7. (a) Efecto de la temperatura y (b) pH en la actividad de la β -glucosidasa de *Clavispora lusitaniae*.

La temperatura óptima de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* es comparable con la de otras β -glucosidasas de diferentes especies de *Clavispora*; *Debaryomyces pseudopolymorphus*, *Trichoderma reesei* y *C. albidus* AL₃, las cuales trabajan en condiciones suaves (45-50 °C) que son convenientes para llevar a cabo el proceso de hidrólisis de la celobiosa (Duff & Murray, 1996). También se puede observar que el pH óptimo para esta enzima está dentro de los intervalos de pH óptimos de otras β -glucosidasas de levaduras (**Tabla 3**).

Tabla 3. Temperatura y pH óptimos de actividad de β -glucosidasas de diferentes microorganismos.

Organismo	T óptima	pH óptimo	Referencia
<i>Clavispora</i> Y-50464 (BGL1)	45 °C	6.0	Lewis <i>et al</i> , 2013
<i>Clavispora</i> NRRL Y-50464 (BGL2)	50 °C	5.0	Wang <i>et al</i> , 2016
<i>Clavispora</i> NRRL Y-50464 (BGL3)	55 °C	5.0	
<i>Debaromyces pseudopolymorphus</i>	40 °C	4.0	Arévalo Villena <i>et al</i> , 2006
<i>Aspergillus terreus</i>	65 °C	5.0	Yan <i>et al</i> , 2016
<i>Trichoderma reesei</i> (Cel3A)	70 °C	4.5	Guo <i>et al</i> , 2016
<i>Trichoderma reesei</i> (Cel1B)	40 °C	5.5	
<i>Trichoderma reesei</i> (Cel3C)	50 °C	6.0	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	50 °C	4.5	González-Pombo <i>et al</i> , 2008
<i>Candida peltata</i>	50 °C	5.0	Saha & Bothast, 1996
<i>Cryptococcus albidus</i> AL ₃	45 °C	5.0	Koleva <i>et al</i> , 2006
<i>Cellulomonas flavigena</i>	37 °C	6.2	Barrera-Islas <i>et al</i> , 2007
<i>Clavispora lusitaniae</i>	45 °C	5.5	Este trabajo

La β -glucosidasa de *C. lusitaniae* presentó una velocidad inicial constante (de formación de pNP) entre 0-30 min de incubación a 45 °C, por lo cual se decidió tomar 15 min como el tiempo de incubación para los siguientes ensayos de actividad (**Figura 8**).

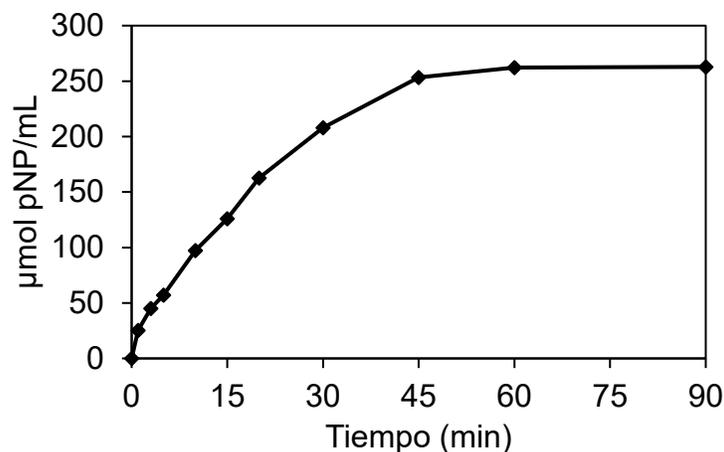


Figura 8. Velocidad inicial de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* a 45 °C.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se decidió llevar a cabo el ensayo de actividad enzimática de la β -glucosidasa en regulador citratos-fosfatos 50 mM pH 5.5 a 45 °C, incubado por 15 min.

6.2. COMPORTAMIENTO DE LA β -GLUCOSIDASA EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

6.2.1. Actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* en celobiosa en condiciones aerobias

La actividad enzimática de la β -glucosidasa se siguió a lo largo de 48 h durante el crecimiento de *C. lusitaniae* en medio Breus suministrado con celobiosa 1%. Se observó un aumento en el nivel de la actividad de la enzima a las 2 h de cultivo a partir de un inóculo crecido en medio YPD, demostrando que durante las primeras horas de cultivo es esencial la síntesis de la enzima para poder asimilar este disacárido (**Figura 9**). Este aumento en la actividad de la enzima concuerda con la paulatina disminución de la celobiosa en el medio de cultivo, la cual al ser agotada

casi en su totalidad lleva a que la actividad de la β -glucosidasa disminuya. En presencia de celobiosa, la actividad de la β -glucosidasa alcanza su máxima actividad al final de la fase exponencial de crecimiento con 800 U/mg y posteriormente, decrece hasta 560 U/mg de proteína. Este comportamiento indicó que la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* es una enzima que se induce por su sustrato, ya que en presencia de este disacárido es que se produce la enzima para su asimilación.

Tras el agotamiento de la mayor parte de la celobiosa, la levadura empieza la fermentación de este disacárido a etanol, produciendo 3.0 g/L a las 48 h con un rendimiento de 0.32 g de etanol/g de celobiosa. Esto puede ser debido a dos situaciones: la primera, que se estén presentando condiciones de microaerofilia y esto promueva la fermentación. En segundo lugar, puede que la β -glucosidasa sea una enzima tan eficiente que, tras la hidrólisis de la celobiosa la levadura tenga alta disponibilidad de glucosa en el interior celular (más del que requiere para su crecimiento) y lo desvíe a otra ruta metabólica como lo es la fermentación a etanol (Verduyn *et al*, 1984; Lübbehüsen *et al*, 2004).

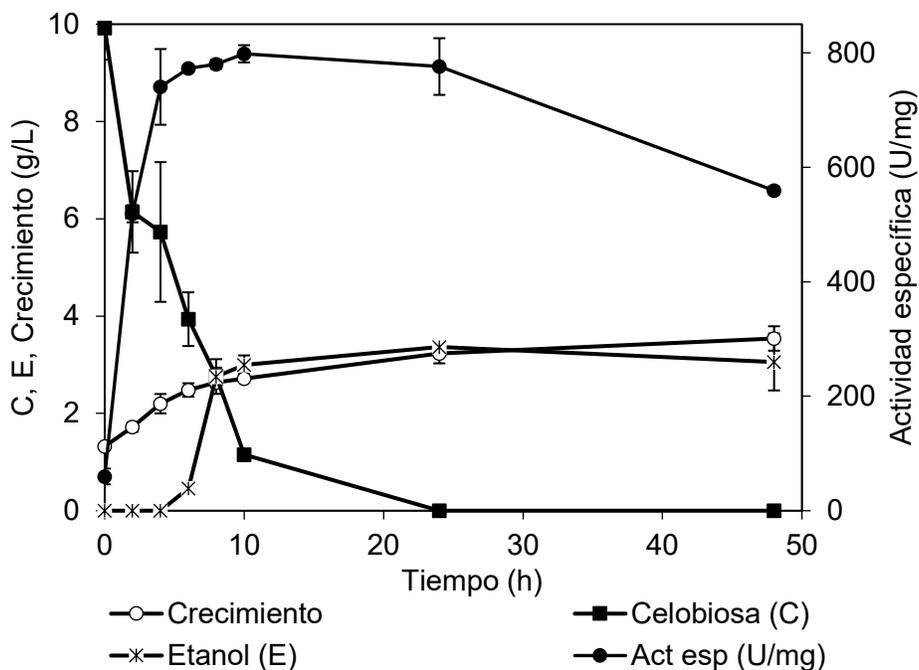


Figura 9. Comportamiento de la actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* cultivada en medio Breus suministrado con 1% de celobiosa a 30 °C en aerobiosis, 450 rpm.

6.2.2. Actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* en celobiosa en condiciones anaerobias

Con el fin de conocer el comportamiento de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* en condiciones de anaerobiosis, la actividad enzimática se siguió a lo largo de 48 h en medio mínimo Breus suministrado con 1% celobiosa. Se observó un aumento en el nivel de la actividad de la β -glucosidasa a las 4 h de cultivo, siendo la mayor actividad a las 12 h (**Figura 10**). En presencia de celobiosa, la actividad de la β -glucosidasa alcanzó su máxima actividad a las 24 h de cultivo (473 U/mg), lo que representa el 60 % de la actividad máxima en condiciones aerobias.

Durante el experimento anterior se observó que la velocidad de la enzima en condiciones de anaerobiosis fue de 0.90 U/mL*h siendo 2.8 veces menor a la observada en condiciones de aerobiosis (2.51 U/mL*h). Esto podría explicar la lenta

producción de la β -glucosidasa en condiciones anaerobias. La baja disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo puede ser la causante de este comportamiento, Freer & Greene (1989) reportaron que *C. lusitaniae* posee dos tipos de transportadores de celobiosa cuya expresión depende de la disponibilidad de oxígeno. Así, a menor concentración de oxígeno en el medio, menor la expresión de los transportadores y, por ende, menor el transporte de celobiosa al interior celular.

En condiciones anaerobias la velocidad específica de crecimiento de *C. lusitaniae* fue de 0.03 h^{-1} , siendo 6.3 veces menor que en condiciones aerobias (0.19 h^{-1}). La baja producción de la β -glucosidasa en un cultivo anaerobio puede ser debido al poco crecimiento de *C. lusitaniae* y debido a que la producción de la enzima está asociada al crecimiento se ve reflejada en su baja velocidad de reacción. Así mismo, la velocidad de consumo de celobiosa en condiciones anaerobias fue de 0.3 h^{-1} , 3.3 veces menor que en condiciones aerobias (0.99 h^{-1}). Lo anterior explica por qué la celobiosa no fue consumida en su totalidad y al final de la fermentación quedaron aproximadamente 1 g/L , indicando que la fermentación requiere de mayor tiempo para lograr el consumo del azúcar o, buscar una alternativa que favorezca el transporte de celobiosa para que sea consumida en menor tiempo.

Respecto a la producción de etanol ésta fue de 3.35 g/L a las 48 h del cultivo con un rendimiento de 0.47 g de etanol/g de celobiosa, mayor en comparación con las condiciones de aerobiosis. Si bien hubo mayor rendimiento en condiciones de anaerobiosis, la producción de etanol fue más lenta respecto a las condiciones de aerobiosis, esto puede deberse a que el oxígeno limita el transporte de celobiosa al interior celular, como ya se ha mencionado previamente. Esto a su vez limita la capacidad de fermentar este disacárido a etanol debido a la baja concentración en el interior celular y a la lenta producción de la β -glucosidasa.

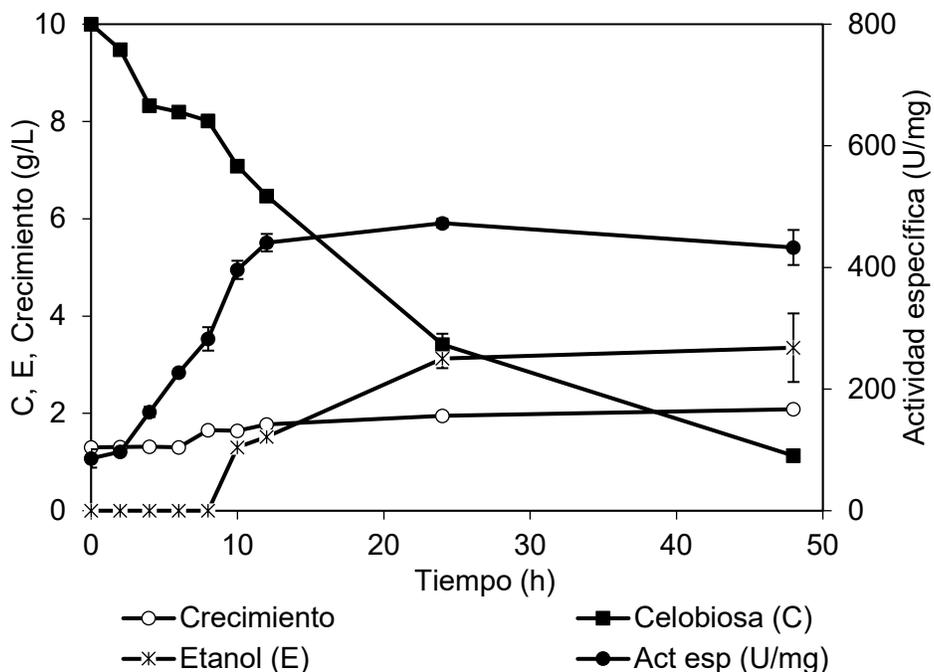


Figura 10. Producción de etanol y actividad específica de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* cultivada en medio Breus con 1% de celobiosa a 30 °C en anaerobiosis, 200 rpm.

6.2.3. Actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* en celobiosa en condiciones aerobias y anaerobias

En los resultados anteriores se mostró que en condiciones anaerobias la síntesis de la β -glucosidasa en *C. lusitaniae* es mucho más lenta comparado con la inducción en condiciones de aireación. Con el objetivo de aumentar los niveles de actividad en condiciones anaerobias, se llevó a cabo un cultivo con aireación durante las 3 primeras horas usando un inóculo crecido en medio YPD. Lo anterior con el fin de promover la síntesis de la enzima y posteriormente cambiar las condiciones a anaerobiosis para promover la producción de etanol. En la **Figura 11** se muestra que efectivamente hubo un aumento de la actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* favorecida por la presencia de aire suministrado durante las 3 primeras horas de cultivo. Al detener el suministro de aire por medio del cierre de la

alimentación de aire, la actividad específica de la enzima disminuyó y tras un tiempo de recuperación llega al mismo nivel de actividad que el máximo observado durante las primeras horas (560 U/mg), que equivale al 70 % del observado en aerobiosis (800 U/mg). Estos resultados señalan que cuando se airea el cultivo durante las primeras horas, se favorece en gran medida la producción de la β -glucosidasa.

Este comportamiento confirma lo observado por Freer & Greene (1989), donde la síntesis de los transportadores de celobiosa se ve reprimida por la falta de oxígeno y sólo tras un tiempo de “aclimatación” la síntesis de los transportadores aumenta y con ello el flujo de celobiosa al interior, lo que lleva a que haya mayor concentración de celobiosa en el interior celular y con ello aumente la síntesis de la β -glucosidasa.

En hongos tales como *Neurospora crassa* se ha observado que los transportadores de celodextrinas y celobiosa tienen función en la regulación de la expresión de los genes para celulasas, en donde es necesario que esté presente el transportador no sólo para transportar la celobiosa al interior celular, sino que también es necesario para desencadenar la señal reguladora positiva de los genes, demostrando así la estrecha y necesaria relación de los transportadores y su efecto sobre el metabolismo de la celobiosa y celo-oligosacáridos (Znameroski *et al*, 2013).

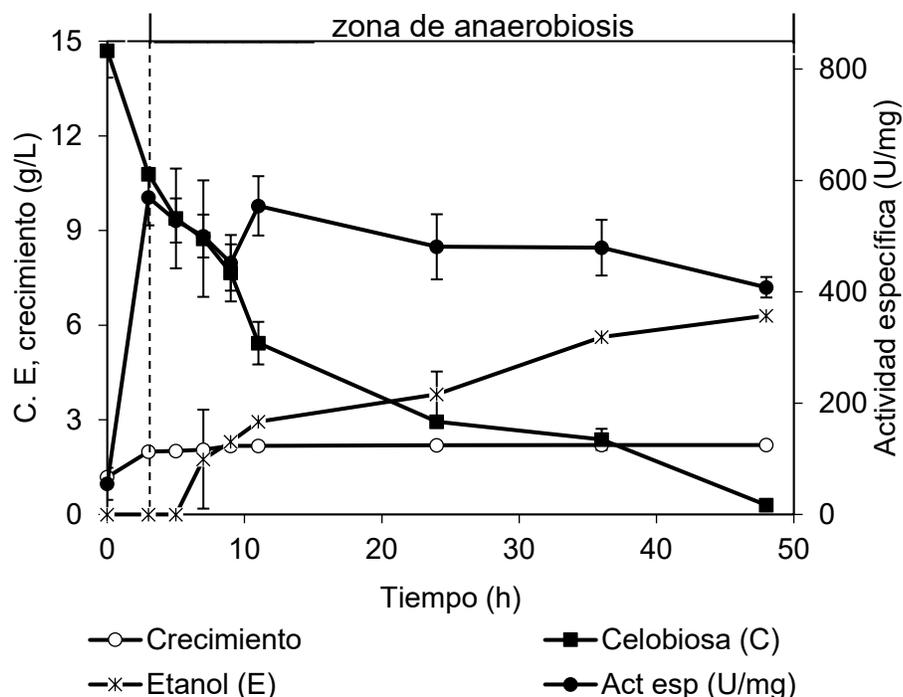


Figura 11. Actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitanae* cultivada en medio Breus suministrado con 1.5 % de celobiosa a 30 °C, 450 rpm.

6.2.4. Efecto de un pulso de glucosa sobre la actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitanae* creciendo en celobiosa en condiciones anaerobias

Con el objetivo de conocer el comportamiento de la β -glucosidasa cuando es sometida a un pulso de 5 mM de glucosa (0.9 g/L), *C. lusitanae* fue cultivada en medio mínimo Breus suministrado con 1 % de celobiosa, llevando a cabo la adición a las 4 h de cultivo. Para este experimento se manejó un inóculo cultivado en medio YPC que permitiera la inducción previa de la enzima y así poder ver la respuesta al pulso claramente. En la **Figura 12**, se observa que tras realizar el pulso de glucosa se detiene el ascenso en la actividad enzimática y causa una leve caída en la misma.

Este comportamiento, en donde no se observa una disminución total de la actividad enzimática, indica que hay una leve represión catabólica de la síntesis de la enzima (Roy *et al*, 1988) o, una interferencia con la inducción del transportador. La glucosa

puede actuar como represor de la síntesis del transportador del disacárido y esto impide que la celobiosa pase al interior celular y pueda inducir la síntesis de más enzima (Freer & Greene, 1990). La glucosa también ha sido reportada como represor catabólico en β -glucosidasas de otras levaduras tales como *Dekkera intermedia*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Clavispora* (Blondin *et al*, 1983; González-Pombo *et al*, 2008; Liu Z. *et al*, 2012).

La represión catabólica de las β -glucosidasas por parte la glucosa también ha sido reportada en hongos hiper productores de estas enzimas, tales como *Neurospora crassa* que posee β -glucosidasas intra y extracelulares, las cuales en presencia de glucosa no son sintetizadas (Znameroski *et al*, 2012). Debido al actual interés que se tiene por este hongo para la producción de celulasas se ha optado por eliminar los genes que codifican para β -glucosidasas y así evitar la represión catabólica de otro tipo de celulasas, logrando así la producción y acumulación de estas en el medio de cultivo (Wu *et al*, 2013).

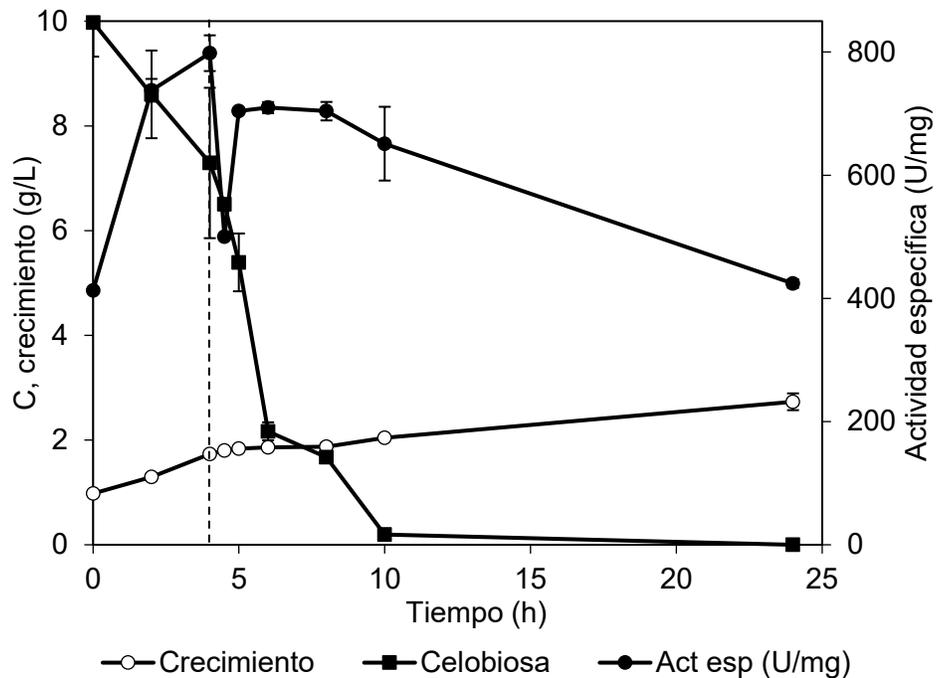


Figura 12. Efecto de un pulso de glucosa (4 h) sobre la actividad específica de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* cultivada en medio Breus suministrado con 1% de celobiosa a 30 °C, 450 rpm (C: celobiosa).

6.2.5. Efecto de diferentes sustratos sobre la actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae*

Con el objetivo de conocer el comportamiento de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* creciendo en diferentes fuentes de carbono, se cultivaron células durante 6 h en medio mínimo Breus suministrado con la fuente de carbono a evaluar (glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, carboximetilcelulosa (CMC), arabinosa y glicerol) al 1%. En la **Figura 13**, se observa que además de la celobiosa, la xilosa también induce la síntesis de la enzima. Este comportamiento puede ser debido a que organismos que han sido aislados de sustratos complejos como la biomasa lignocelulósica, poseen un conjunto de enzimas (celulasas y xilanasas) que están estrechamente relacionadas a nivel genético. Al estar en presencia de un sustrato como la xilosa pueda darse un tipo de inducción cruzada (Bok *et al*, 1998; Faria *et al*, 2008). Lo anterior ha sido observado en organismos celulolíticos como *Cellulomonas flavigena* en donde se reportó la expresión de xilanasas en diferentes sustratos como bagazo de caña y Solka flocc, este último es una celulosa de alto grado de pureza (Pérez-Avalos *et al*, 1996). Así mismo, Sánchez-Herrera *et al*, (2007) reportó que 6 proteínas de este organismo se expresaban en xilano, bagazo de caña, Solka flocc y glucosa.

En la **Figura 13** también se observa que la glucosa, arabinosa, glicerol y CMC no inducen la síntesis de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae*. La primera de estas fuentes de carbono ha sido reportada como represora de la síntesis de la β -glucosidasa debido a que es el producto de la hidrólisis de la celobiosa. La CMC al ser un compuesto derivado de la celulosa presenta una estructura compleja, en la que son necesarias otras enzimas tales como endoglucanasas y exoglucanasas, que liberen celodextrinas y celobiosa para que éstas puedan ser aprovechadas por este tipo de organismos. Con esto se corrobora que *Clavispora lusitaniae* no posee celulasas extracelulares que pudieran degradar la CMC y liberar celobiosa. Por otro lado, el glicerol fue usado como la fuente de carbono control de este experimento debido a que éste compuesto es directamente asimilado a través de la ruta de los ácidos

tricarboxílicos, lo cual hace que se sintetice la maquinaria necesaria para su consumo, además el glicerol no se encuentra presente en los residuos lignocelulósicos, de esta forma se elimina el ruido durante los ensayos de actividad por inducción cruzada o por inhibición, permitiendo conocer los niveles basales de la actividad de la β -glucosidasa en *C. lusitaniae*.

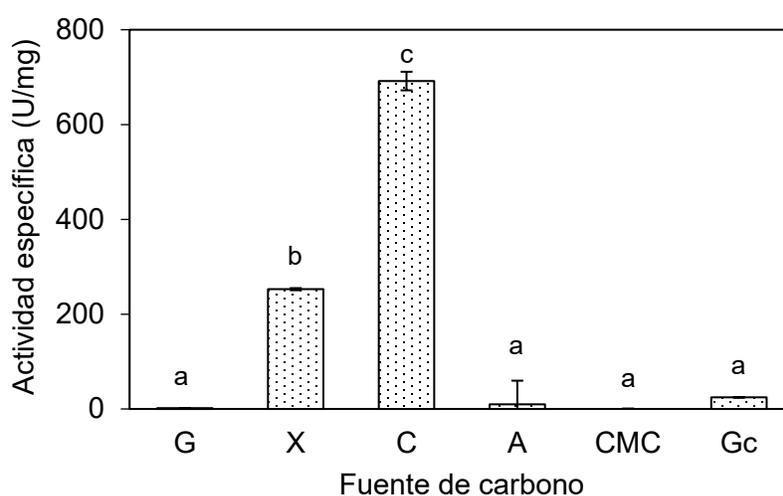


Figura 13. Efecto de la fuente de carbono (G: glucosa, X: xilosa, C: celobiosa, A: arabinosa, CMC: carboximetilcelulosa, Gc: glicerol) sobre la actividad específica de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* en medio Breus a 30 °C, 450 rpm.

6.2.6. Efecto de la concentración de celobiosa en la síntesis de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* en aerobiosis

Para conocer el efecto que tiene la concentración de celobiosa sobre la síntesis de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae*, ésta se hizo crecer durante 6 horas en diferentes concentraciones del disacárido (1, 3, 5 y 7 %). Se observó que la concentración de celobiosa sí tiene un efecto significativo en la actividad de la β -glucosidasa, de acuerdo con la prueba estadística de Scheffe con un nivel de significancia de 0.05. La respuesta a la concentración está agrupada en dos: **a**: 1 y 3 %; **b**: 5 y 7 %, indicando que a mayor concentración de celobiosa empieza a observarse un efecto

inhibitorio, aunque éste no es altamente notorio en la actividad de la enzima (**Figura 14**). Este comportamiento representa una ventaja en los procesos fermentativos donde se pueden alcanzar altas concentraciones de celobiosa y oligosacáridos (30-40 g/L) durante el proceso de sacarificación (Ferreira *et al*, 2010; Gontijo *et al*, 2014). Los resultados sugieren que, *Clavispora lusitaniae* posee una β -glucosidasa y un transporte del disacárido que no se ven afectados por concentraciones de celobiosa hasta 70 g/L.

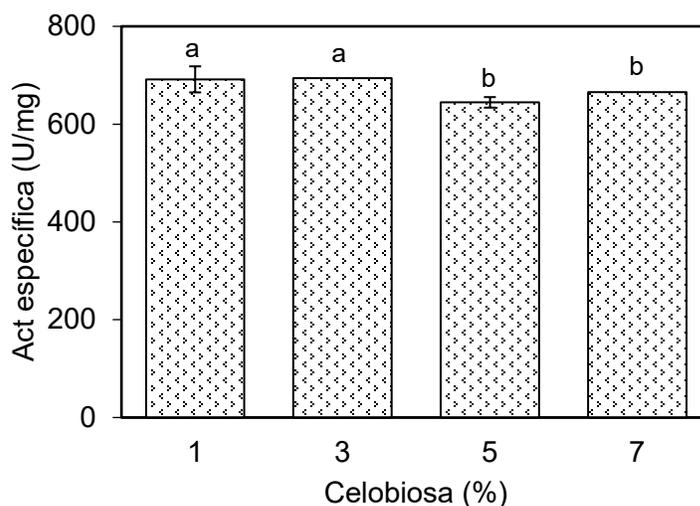


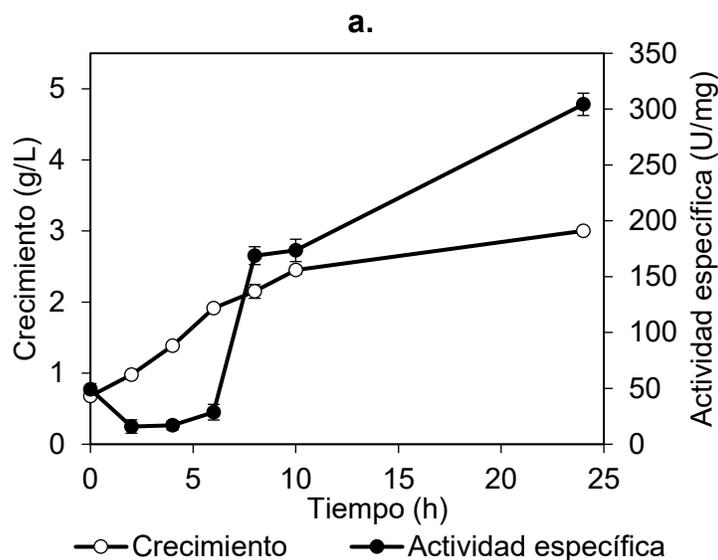
Figura 14. Actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* cultivada durante 6 h en medio Breus suplementado con diferentes concentraciones de celobiosa a 30 °C, 450 rpm. Letras iguales indican un mismo grupo (Scheffe con $\alpha=0.05$).

6.2.7. Medición de la actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* creciendo en la mezcla de celobiosa y glucosa en condiciones aerobias

Con el objetivo de conocer el efecto de la glucosa sobre la síntesis de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae*, la levadura fue crecida en medio mínimo Breus suplementado con 0.5 % de glucosa y 0.5 % de celobiosa. Se observó que, desde el inicio del crecimiento, la glucosa ejerce un efecto represor sobre la síntesis de la β -glucosidasa y es sólo después de que esta fuente de carbono se agota, que la síntesis de la enzima inicia para que la levadura pueda empezar a asimilar la

celobiosa disponible en el medio (**Figura 15b**). Sin embargo se pudo observar que la síntesis de la β -glucosidasa fue más lenta (**Figura 15a**) y por lo tanto también el consumo de celobiosa (**Figura 15b**). El nivel de actividad de la β -glucosidasa observado a las 24 h en estas condiciones representó el 50 % del máximo observado en cinéticas donde el inóculo ya venía preinducido. Estos resultados confirman el efecto de represión de la glucosa sobre la síntesis de las β -glucosidasas (Freer & Detroy, 1982; Blondin *et al*, 1983; Wang *et al*, 2016).

Por otro lado también se observó que tras el rápido consumo de la glucosa, se inició la producción de etanol por parte de *C. lusitaniae* (**Figura 15b**), sugiriendo que la glucosa alcanzó concentraciones intracelulares por encima de las necesarias para el crecimiento y por esto su metabolismo es desviado a la vía fermentativa, fenómeno conocido como efecto Crabtree. Una vez agotada la glucosa, también empieza el consumo de etanol posiblemente a causa del estrés causado por el lento consumo de la celobiosa y al metabolizar el etanol la célula puede obtener poder reductor necesario para sobrevivir (Maleszka & Schneider, 1982).



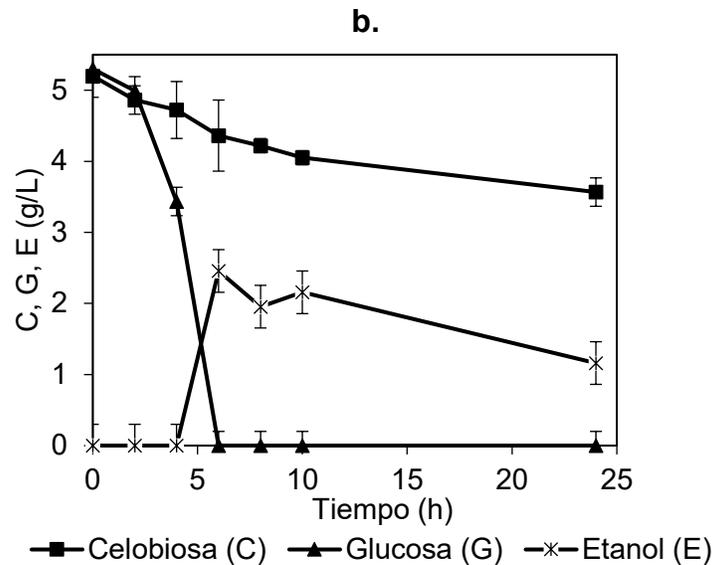


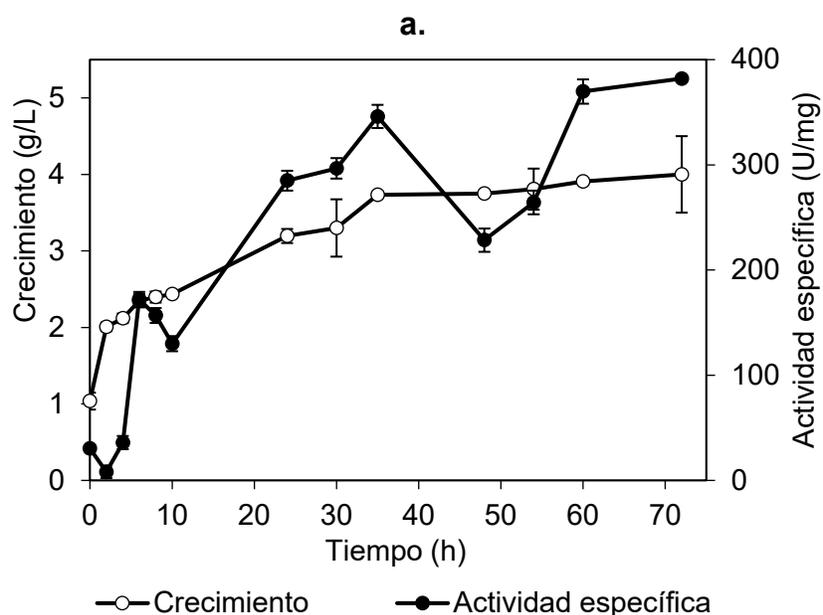
Figura 15. (a) Actividad de la β -glucosidasa y crecimiento y (b) consumo de azúcares y producción de etanol por *C. lusitaniae* cultivada en medio Breus suministrado con celobiosa y glucosa 0.5 % cada una a 30 °C, 450 rpm.

6.2.8. Medición de la actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* creciendo en celobiosa, glucosa y xilosa en condiciones aerobias

En experimentos anteriores se observó que la xilosa ejercía un efecto inductor sobre la síntesis de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae*. Con el objetivo de corroborar este resultado y ver el efecto de 3 fuentes de carbono sobre la enzima, se realizó una cinética en donde se usaron celobiosa, glucosa y xilosa al 0.5 % cada una en medio mínimo Breus. Se siguió el comportamiento de la actividad en estas condiciones de cultivo. Se observó como en experimentos anteriores, que el consumo de glucosa se da en las primeras horas de cultivo, reprimiendo la síntesis de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae*. A lo largo de las 72 h de la cinética, la celobiosa y la xilosa no se agotan totalmente, mostrando así el efecto de represión de la glucosa y de los posibles problemas de duración del proceso. El consumo de xilosa en presencia de glucosa es lento debido a que la glucosa actúa como inhibidor competitivo por el transporte a través de los transportadores de xilosa presentes en levaduras (Hamacher *et al*, 2002). La síntesis de β -glucosidasa es muy lenta debido a la cantidad reducida de celobiosa que entra al interior celular (debido a la preferencia

de consumo de un azúcar fácilmente asimilable). Esta situación pudo ser la causante de que no se alcanzaran los niveles máximos de actividad observados previamente (**Figura 16a**). Lo anterior podría ser una desventaja cuando se desee producir etanol a partir de sacarificados de residuos lignocelulósicos, debido al lento metabolismo de la xilosa en esta cepa y su pobre capacidad de producir etanol a partir de esta pentosa (Santiago, 2017).

El consumo de xilosa por parte de *C. lusitaniae* se ha caracterizado previamente observando que es lento y prolongado (Santiago, 2017). Frente a esta situación inicia el consumo diferencial de celobiosa y el etanol producido (**Figura 16b**). Este comportamiento puede ser a causa del desbalance oxidativo que le genera el consumo de xilosa a *Clavispora lusitaniae* debido a que esta levadura posee una xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa con actividades específicas iguales, es decir que es producida la misma cantidad de cada enzima, lo que genera un desbalance en la retroalimentación de los cofactores NAD⁺ y NADH. Para solventar esta situación, se inicia la oxidación del etanol para obtener NADH y lograr assimilar la xilosa disponible, cuyo consumo se detiene cuando se ha oxidado todo el etanol del medio (Prior *et al*, 1988).



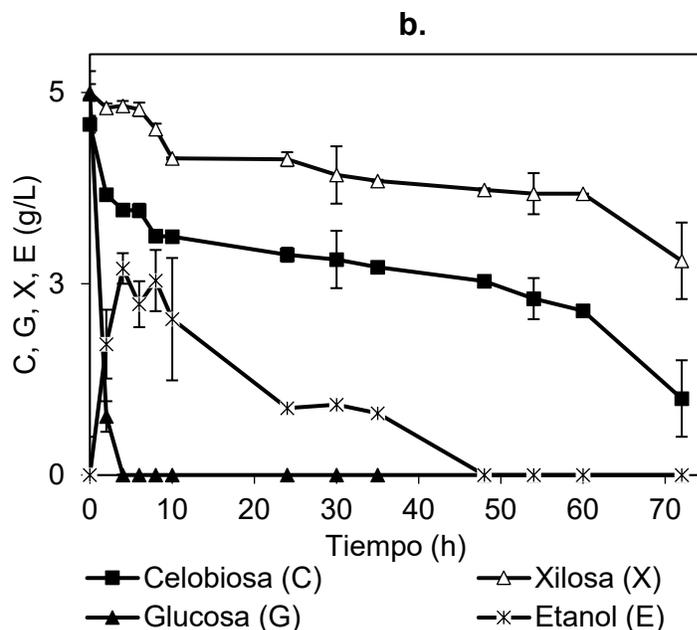


Figura 16. (a) Actividad de la β -glucosidasa y crecimiento y (b) consumo de azúcares y producción de etanol de *C. lusitaniae* cultivada en medio Breus suministrado con celobiosa, glucosa y xilosa 0.5 % cada una a 30 °C y 400 rpm.

6.3. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA β -GLUCOSIDASA EN *Clavispora lusitaniae*

6.3.1. Diseño de cebadores

Con el objetivo de cuantificar la expresión del gen que codifica para la β -glucosidasa de *C. lusitaniae*, se realizó una búsqueda en la base de datos de NCBI para conocer si existe más de un gen que codifique para este tipo de enzimas. Se encontró que existen 7 secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas hipotéticas con actividad β -glucosidasa en *C. lusitaniae*. De estas 7 secuencias fueron elegidas 3: la primera de ellas se eligió por ser el primer gen reportado en las bases de datos como codificante de una β -glucosidasa en esta cepa, las otras dos secuencias han sido investigadas por otros autores en otras cepas de *Clavispora* (Lewis *et al*, 2013;

Wang *et al*, 2016). En la **Tabla 4** se enuncian los números de referencia en el NCBI de los genes elegidos.

Tabla 4. Número de las secuencias en la base de datos NCBI.

Nombre	Número de referencia NCBI
BGL 1	NW_003101578.1
BGL 2	XM_002619563.1
BGL 3	XM_002618615.1

El diseño de cebadores se realizó con las herramientas bioinformáticas Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), así mismo, se corroboraron las características de los cebadores diseñados con OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>). En la **Tabla 2** se muestran las secuencias de los cebadores diseñados.

6.3.2. Extracción de RNA

Los niveles de expresión del gen que codifican para β -glucosidasa fueron determinados mediante el uso de qPCR, en donde se usó como molde cDNA sintetizado a partir de RNA. Con este objetivo se probaron dos métodos para obtener el RNA a partir de células de *C. lusitaniae*. El primero de ellos fue un protocolo de extracción reportado por Collart & Olivero, (2001) y el segundo fue el YeaStar RNA kit de la compañía Zymo Research. Esta primera prueba realizada a partir de células crecidas en medio YPC arrojó las concentraciones de RNA mostradas en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Concentración de RNA extraído de células de *C. lusitaniae*.

Método	RNA (ng/ μ L)	Referencia
Protocolo casero	170.8	Collart & Olivero, 2001
YeaStar RNA kit	1,415.2	ZymoResearch

De acuerdo con los resultados obtenidos, las extracciones de RNA posteriores se realizaron con el kit de extracción de Zymo Research, ya que este fue el método con el cual se obtuvo la mayor concentración de RNA. En la **Figura 17** se muestran los resultados de la extracción de RNA a partir de células de *C. lusitaniae* crecidas en medio mínimo Breus suplementado con 1 % de celobiosa.

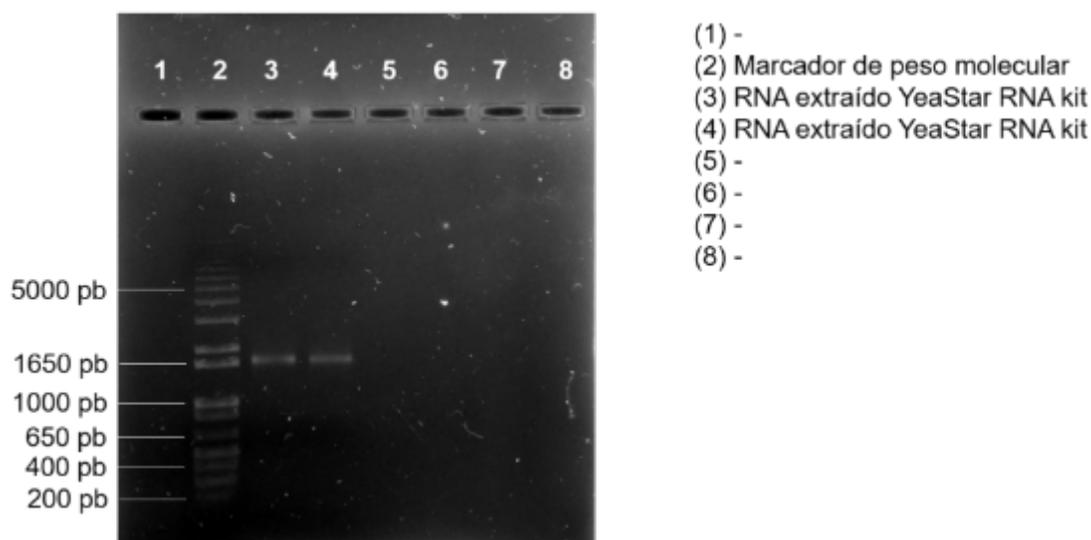


Figura 17. Comparación de la calidad del RNA de células de *C. lusitaniae* extraído mediante dos métodos diferentes, (gel de agarosa 1 %).

6.3.3. Síntesis de cDNA y PCR punto final

Una vez establecidas las condiciones de extracción de RNA, se procedió a llevar la síntesis del cDNA a partir de RNA (150 ng/ μ L) tratado previamente con DNAsa. Con el fin de comprobar que la síntesis de cDNA se llevó a cabo exitosamente, se realizó la reacción de PCR usando como templado el mismo cDNA y los cebadores de actina a una temperatura de hibridación de 58 °C. En la **Figura 18** se aprecia una banda única de ~300 pb, correspondiente al tamaño esperado para el producto de PCR de actina. Con este resultado se demostró que la síntesis de cDNA se dio correctamente, pero no se observaron las bandas esperadas con los pares de cebadores BGL 1, 2 y 3.

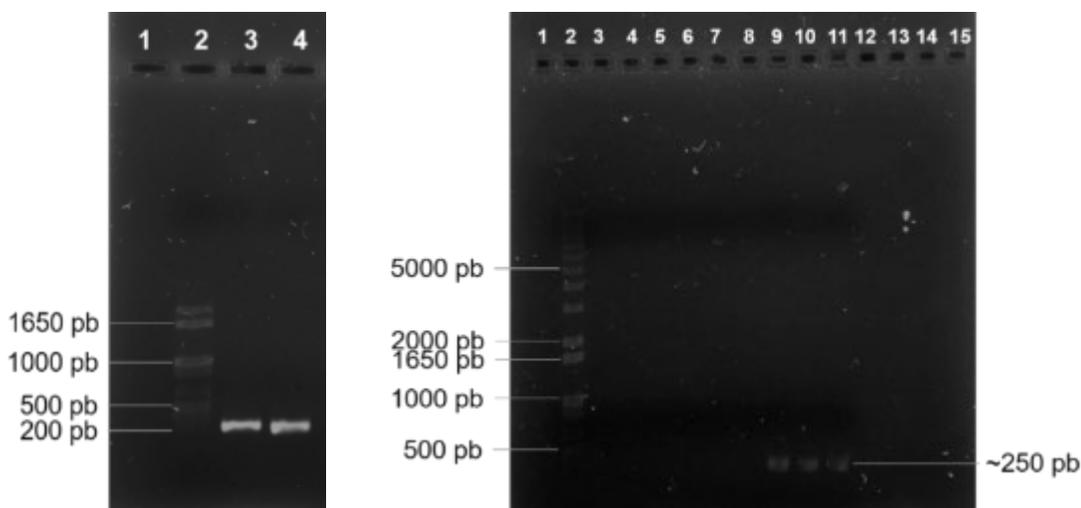


Figura 18. PCR punto final usando como molde cDNA. (a) cebadores para actina (c3, c4); (b) cebadores para *Bgl* 1 (c3, c4), *Bgl* 2 (c5, c6), *Bgl* 3 (c7, c8) y actina (c9, c10, c11).

Tras no obtener productos de PCR a la temperatura recomendada por el proveedor (Sigma, Aldrich) se procedió a realizar un gradiente de temperatura para determinar cuál era la temperatura de hibridación adecuada para cada par de cebadores. El intervalo de temperaturas trabajado fue de 52-58 °C (**Figura 19**), en donde se observó el amplicón esperado entre los 52 a 56°C. En este punto se eligió la

temperatura de 52 °C como temperatura de hibridación para el par de cebadores de *Bgl* 1.

Con el fin de corroborar la presencia de los otros dos genes que codifican para β -glucosidasa se usaron los cebadores de Xang *et al*, 2016 con ciclos de amplificación iguales a los enunciados en el apartado de materiales y métodos, con la única diferencia de que se usó como temperatura de hibridación 54 °C. En la **Figura 20** se presenta el gel de agarosa en dónde se corrieron los productos de PCR, en dónde efectivamente se confirmó que la *C. lusitaniae* usada en este trabajo posee más de un gen que codifica para β -glucosidasa.

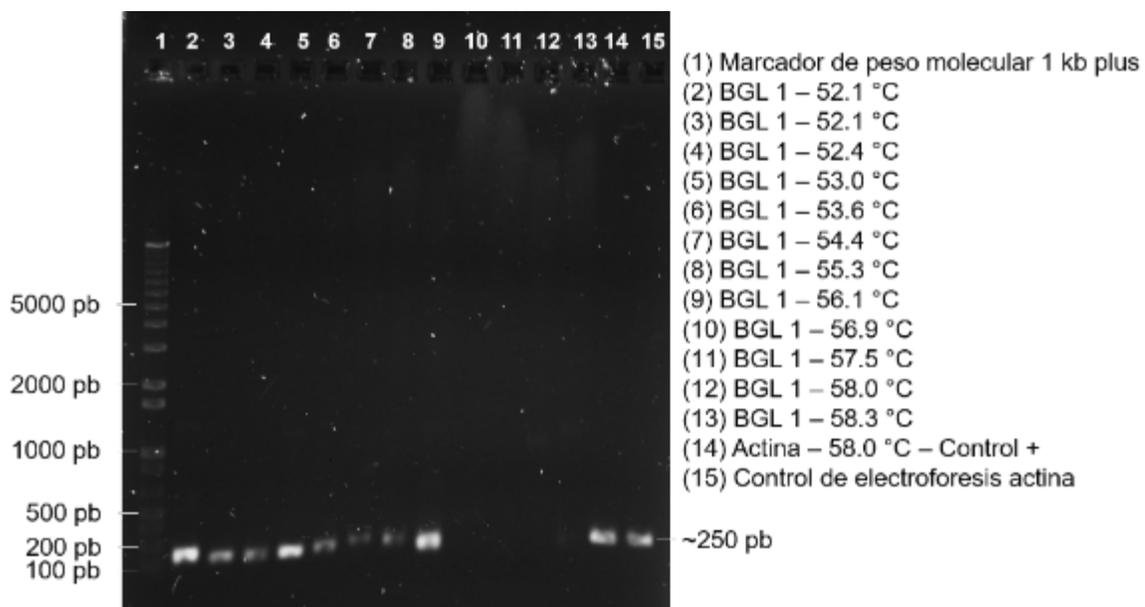


Figura 19. Productos de PCR punto final usando como molde cDNA en gradiente de temperaturas para *Bgl* 1. Gel de agarosa 1 %.

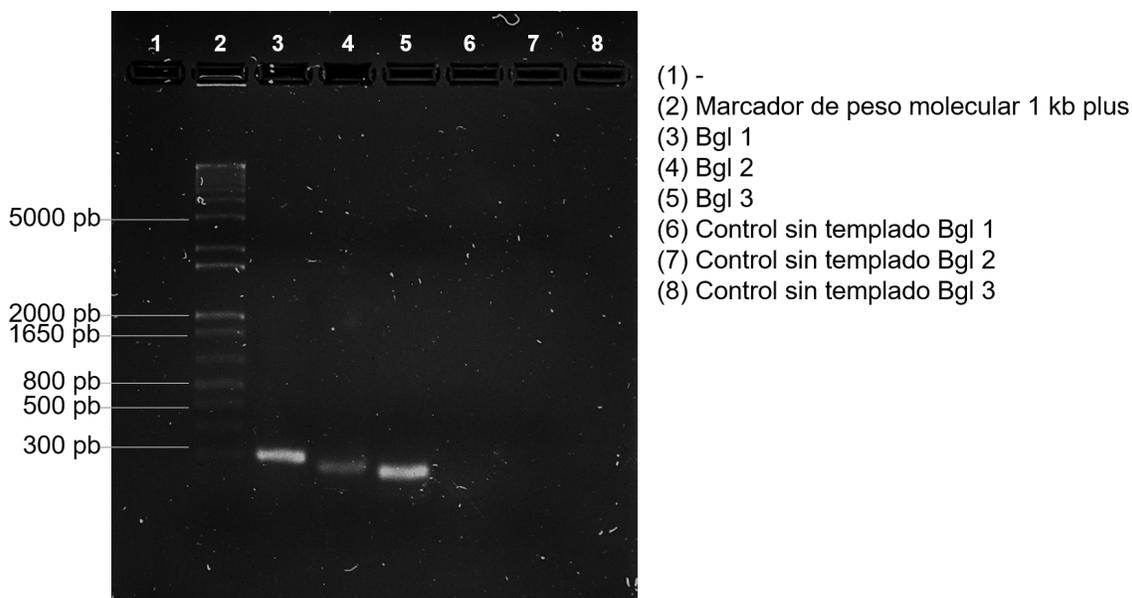


Figura 20. Productos de PCR punto final usando como molde cDNA para *Bgl 1*, *Bgl 2* y *Bgl 3*. Gel de agarosa 1 %.

Una vez estandarizadas las condiciones de extracción de RNA, síntesis de cDNA y los ciclos de PCR, en donde se permitió corroborar la presencia de los genes *Bgl 1*, *Bgl 2* y *Bgl 3* en *C. lusitaniae*, se procedió a realizar los experimentos de cuantificación de niveles de expresión con el gen *Bgl 1*.

6.3.4. Medición de la expresión relativa del gen *Bgl 1* en diferentes fuentes de carbono en condiciones de aireación

Con la finalidad de correlacionar la actividad de la β -glucosidasa con la expresión del gen *Bgl 1* al crecer *C. lusitaniae* en las diferentes fuentes de carbono (apartado 6.2), se extrajo el RNA a las muestras respectivas, que posteriormente se usó para la síntesis de cDN. En la **Figura 21** se observa la calidad del RNA extraído, en donde se observó que es de buena calidad.

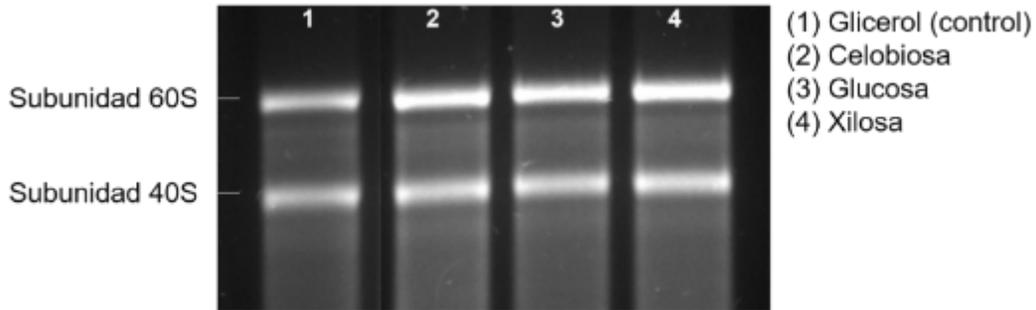


Figura 21. Extracción de RNA de células de *C. lusitaniae* cultivada en diferentes fuentes de carbono. Gel de agarosa 1.2 %.

Tras realizar la extracción de RNA se realizó la síntesis de cDNA y para corroborar la presencia del gen *Bgl 1* se usó el kit de qPCR de KAPA SYBR One-step bajo las condiciones de amplificación para la PCR en tiempo real. En la **Figura 22** se observa el resultado de esta amplificación, en donde para todos los triplicados biológicos el resultado fue positivo con los cebadores BGL 1. Se usó como control positivo de PCR los cebadores de actina.

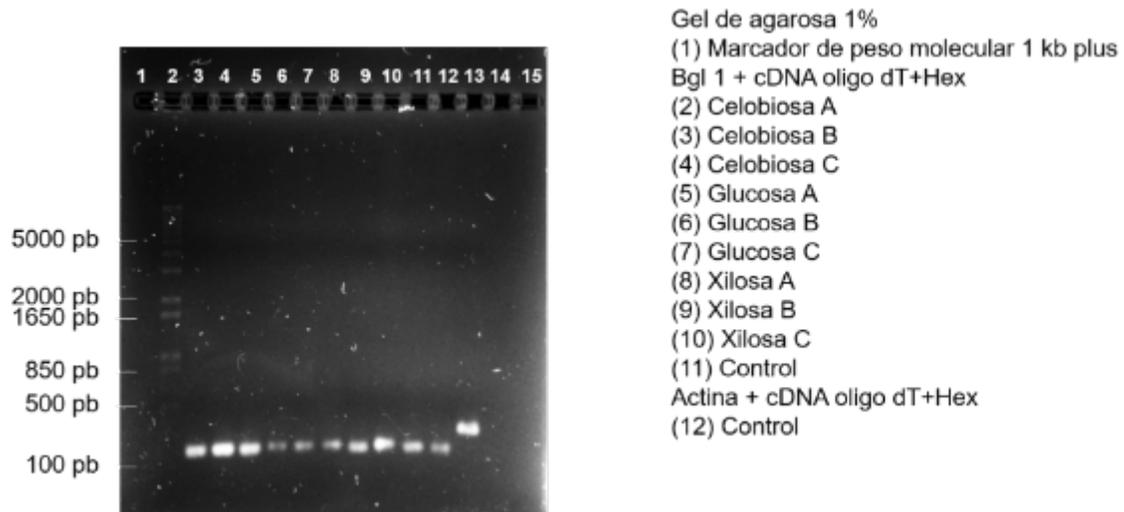


Figura 22. Productos de PCR punto final usando como molde cDNA y el kit KAPA SYBR One-step. Gel de agarosa 1 %.

Una vez corroborada la síntesis de cDNA para cada una de las muestras en donde se indicó que estaba presente el gen de interés en la muestra, se procedió a realizar

el experimento de PCR en tiempo real. Las reacciones fueron llevadas a cabo por duplicado de cada triplicado biológico, se usó actina como control interno y se agregaron dos controles negativos sin templado para cada gen. El cálculo de expresión relativa se llevó a cabo usando el método de comparación de Ct mencionado previamente en materiales y métodos.

En la **Figura 23** se observa que a las 0 h de cultivo en las diferentes fuentes de carbono la expresión del gen *Bgl 1* se mantiene en el mismo nivel. Cuando se evalúa la expresión del gen *Bgl 1* a las 6 h se observa que su expresión es regulada positivamente en presencia de celobiosa, esto quiere decir que la síntesis de la β -glucosidasa codificada por este gen es inducible en presencia de esta fuente carbono. El gen *Bgl 1* se expresa 3.4 veces más respecto al control interno en presencia de celobiosa y aireación a las 6 h del cultivo. Esto quiere decir que hay una expresión 51 veces mayor del gen de interés con respecto al del control interno, corroborando así los resultados obtenidos mediante el método bioquímico previamente mostrados en este trabajo. En presencia de xilosa a las 6 h de cultivo la expresión del gen *Bgl 1* se mantiene en los mismos niveles del tiempo 0 h, indicando así que la xilosa no ejerce efecto regulatorio alguno sobre la expresión de este gen.

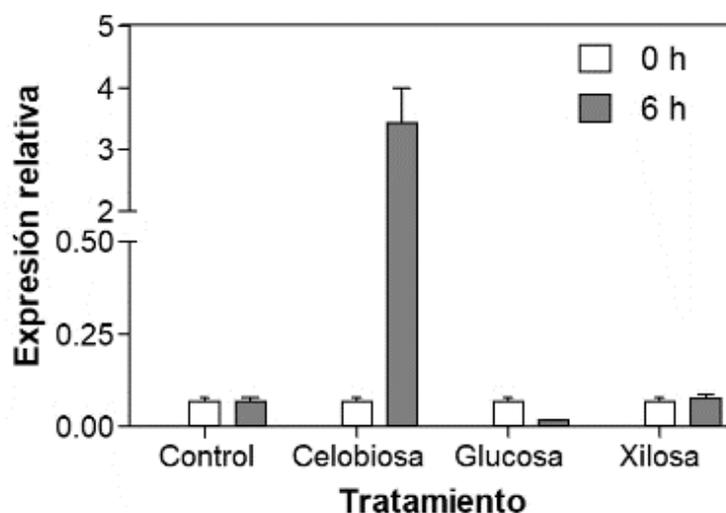


Figura 23. Expresión relativa del gen *Bgl 1* respecto al gen de actina en diferentes fuentes de carbono a las 0 y 6 h de cultivo en aerobiosis.

Por otro lado, los resultados de la qPCR señalan que la glucosa en tiempo de 6 h ejerce una regulación negativa sobre la expresión de *Bgl* 1. Para observar más claramente este efecto se realizó el cálculo del Log₂ de la expresión relativa del gen *Bgl* 1 respecto a actina a las 6 horas de cultivo usando glucosa como fuente de carbono (**Figura 24**). Efectivamente la glucosa ejerce una regulación negativa (represión) de la expresión del gen *Bgl* 1, reduciendo la expresión del gen en 60% respecto al control con glicerol como fuente de carbono a las 6 h de cultivo. Estos resultados corroboran los obtenidos previamente en los cultivos, en donde se observó que en presencia de glucosa no había actividad β-glucosidasa.

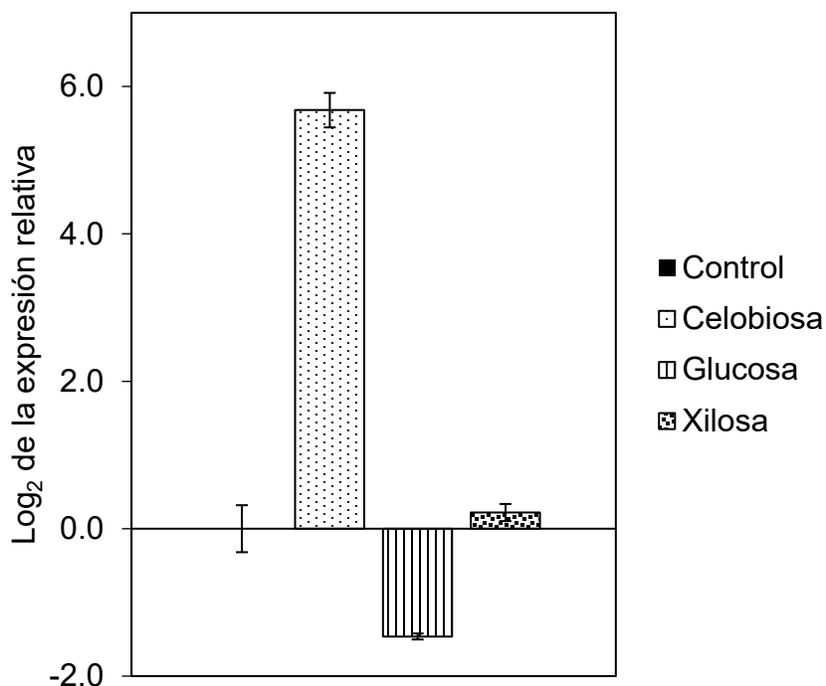


Figura 24. Log₂ de la expresión relativa del gen *Bgl* 1 respecto al gen de actina en diferentes fuentes de carbono a las 6 h de cultivo en aerobiosis.

Respecto a la xilosa, ésta no ejerció efecto alguno sobre la regulación del gen *Bgl* 1 a pesar de que en los experimentos previos *in vitro* se observó actividad de β-glucosidasa en presencia de este azúcar. Una explicación podría ser que la xilosa no ejerce efecto sobre este gen, y sí sobre alguno de los otros dos genes, que como

ya se mostró en este trabajo (**Figura 20**), *C. lusitaniae* posee más de un gen que codifican para β -glucosidasa (Wang *et al*, 2016).

Con el fin de corroborar la especificidad de la amplificación durante la PCR en tiempo real por parte de los cebadores diseñados para el gen *Bgl 1*, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 % dónde se corrieron muestras al azar de las reacciones llevadas a cabo, en la **Figura 25** se muestra el resultado obtenido. En los carriles correspondientes al amplicón del gen *Bgl 1* se observa un amplicón del tamaño esperado (~250 pb) y en el caso del control interno (actina), se observan amplicones de aproximadamente 300 pb que corresponde al tamaño esperado.

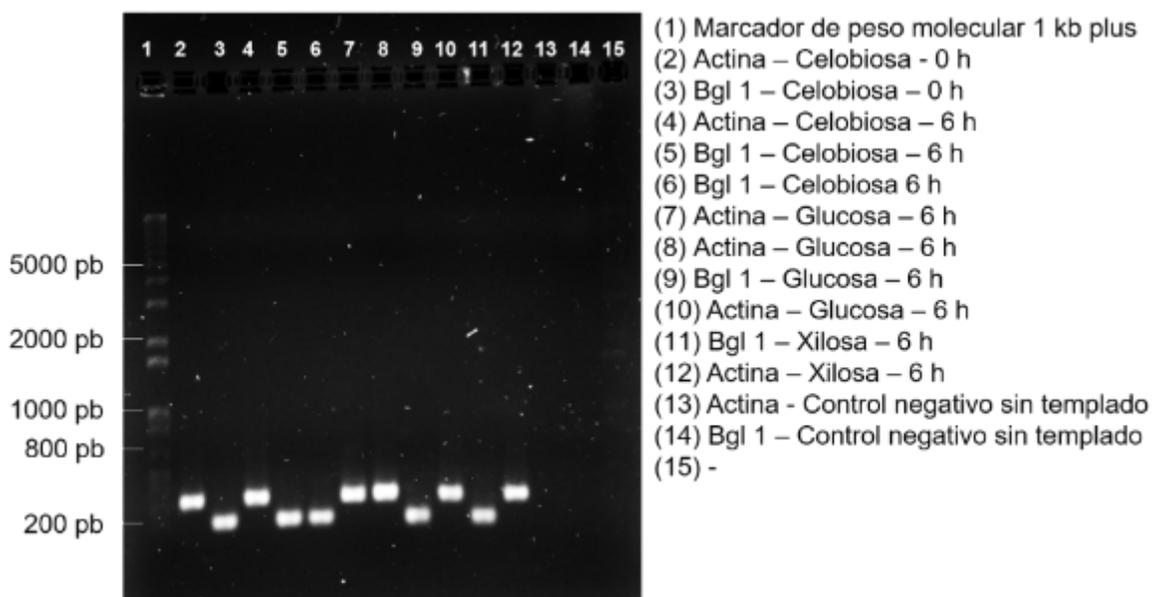


Figura 25. Productos de qPCR usando el kit KAPA SYBR One-step qPCR kit. Gel de agarosa 1 %.

Así mismo se hizo la determinación de la temperatura de fusión de cada uno de los amplicones usando la herramienta bioinformática U-melt (<https://www.dna.utah.edu/umelt/um.php>). Con este programa se obtuvo una temperatura de fusión teórica para el amplicón del gen *Bgl 1* de 89 °C y para el

amplificón del gen de actina de 90 °C. Generalmente la temperatura de fusión varía entre 0.5 – 5 °C por debajo de la temperatura teórica, esto por la concentración de sales y el regulador en que se lleva a cabo la reacción de amplificación (Owczarzy *et al*, 2008). De acuerdo a esto, las temperaturas de fusión durante la reacción de qPCR para los amplicones de *Bgl* 1 y actina fueron de 83 y 84 °C, respectivamente. En la **Figura 26** se muestran las curvas de fusión obtenidas para este experimento.

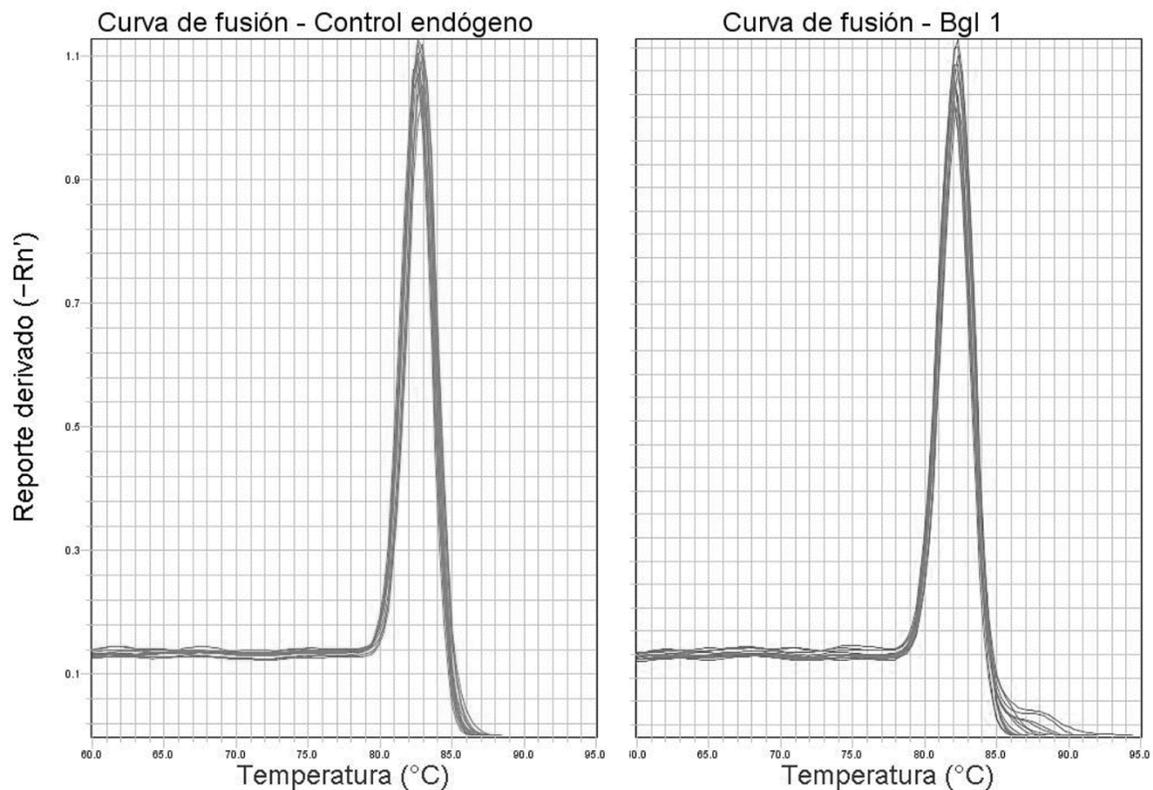


Figura 26. Curvas de fusión para secuencias amplificadas por los cebadores para el gen de actina (izq) y *Bgl* 1 (derecha) generadas por el programa del equipo Applied Biosystems 7500 durante el experimento de PCR en tiempo real.

6.3.5. Medición de la expresión relativa del gen *Bgl* 1 con celobiosa en aerobiosis y anaerobiosis

Con la finalidad de corroborar el efecto de regulación negativa de las condiciones de anaerobiosis sobre la expresión del gen *Bgl* 1 cuando *C. lusitaniae* crece en

celobiosa, se procedió a realizar el experimento de PCR en tiempo real. Las reacciones fueron llevadas a cabo por duplicado de cada triplicado biológico, se usó actina como control interno y se agregaron dos controles negativos sin templado para cada gen. En este caso sólo se usaron dos fuentes de carbono: glicerol como control y celobiosa como tratamiento de estudio.

En la **Figura 27** se observa que al tiempo 0 h en anaerobiosis los niveles de expresión del gen *Bgl* 1 tanto en glicerol como en celobiosa son los mismos. Una vez el cultivo ha sido sometido a anaerobiosis durante 6 h, la expresión del gen *Bgl* 1 respecto al control interno actina es de 2.5 veces, esto indicando que hay una expresión 6.3 veces mayor de *Bgl* 1 respecto a 1 del control interno. Si bien existe una regulación positiva en presencia de celobiosa en condiciones de anaerobiosis, los niveles de expresión respecto a los observados en condiciones de aireación al mismo tiempo son 10 veces menores, corroborando de esta forma lo observado en previamente en cultivo en dónde la actividad β -glucosidasa medida a las 6 h de cultivo en anaerobiosis representó sólo el 30 % de la actividad observada en aerobiosis al mismo tiempo de cultivo (apartado 6.2). Este comportamiento confirma que efectivamente la ausencia de oxígeno en el medio de cultivo es un factor importante en el metabolismo de la celobiosa en esta cepa.

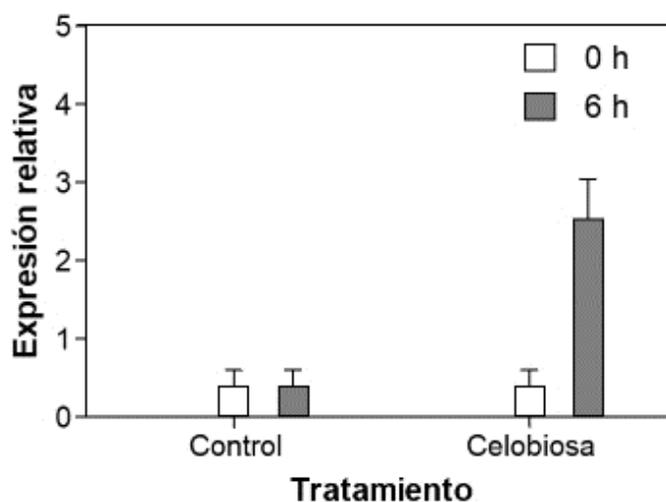


Figura 27. Expresión relativa del gen *Bgl* 1 respecto al gen de actina en el control con glicerol y celobiosa a las 0 y 6 h de cultivo en anaerobiosis.

6.4. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA β -GLUCOSIDASA DE *C. lusitaniae*

6.4.1. Cromatografía de intercambio aniónico fuerte

Con el objetivo de obtener una enzima parcialmente purificada para posteriormente realizar ensayos de inhibición y caracterización bioquímica, se realizó como primer paso, retirar, mediante centrifugación, todos aquellos restos celulares del extracto crudo libre de células tras el rompimiento celular. Posteriormente, se pasó 1 mL del extracto enzimático a través de la columna Q Sepharose Fast Flow y se recolectaron fracciones de 1.7 mL tras aplicar un gradiente de 0.1 a 1 M de KCl.

En la **Figura 28** se muestra el perfil de elución de la proteína y la medición de actividad de la β -glucosidasa con pNPG como sustrato. Desde las fracciones 7 hasta la 15 se observó la mayor absorbancia a 280 nm, lo cual correspondería a mayor cantidad de proteína. A estas 9 fracciones se les midió actividad de β -glucosidasa. Las fracciones 7, 8 y 9 corresponde a la mayor actividad β -glucosidasa. Estas fracciones fueron liofilizadas para posteriormente determinar la pureza de cada una de ellas por medio de SDS-PAGE (**Figura 29**). Se eligió la concentración de KCl 0.37 M para la elución de la muestra debido a que en ésta se encontró la mayor concentración de proteína y la actividad β -glucosidasa más alta.

Dada la alta concentración de sales que presentó esta fracción, tras la elución fue sometida a 2 lavados con agua desionizada estéril en ultrafiltro con volúmenes de 10 mL y el tercer lavado con regulador fosfatos 25 mM pH 7.2. Finalmente, esta elución fue resuspendida en un mL del mismo regulador.

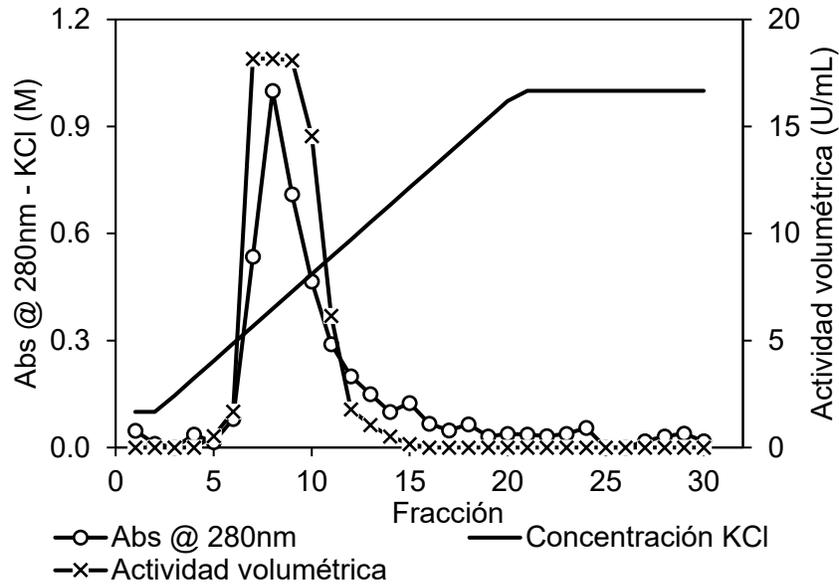


Figura 28. Perfil de elución de proteína de un extracto crudo libre de células de *C. lusitaniae* con gradiente de KCl (0.1 a 1 M) usando como matriz Q Sepharose.

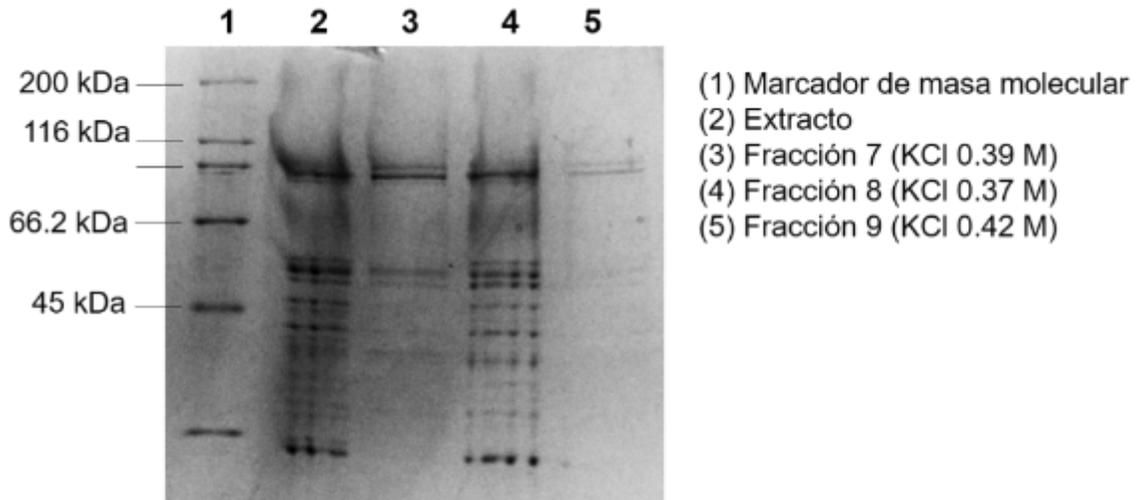


Figura 29. SDS-PAGE 10% de las fracciones con actividad β -glucosidasa eluidas con KCl mediante cromatografía de intercambio aniónico.

Una vez determinada la concentración de KCl para eluir, se pasaron 10 mL de extracto crudo libre de células (8.5 mg de proteína/mL) a través de la columna de intercambio aniónico y se eluyeron con 10 mL de KCl 0.37 M. La muestra fue lavada

y concentrada como se mencionó anteriormente, resultando en una concentración final de proteína de 9.0 mg/mL en un volumen de 1.5 mL.

6.4.2. Cromatografía de exclusión molecular

La fracción previamente recolectada y lavada, fue sometida a cromatografía de exclusión molecular usando un Bio-Gel P-60 (Biorad). La elución de la proteína se realizó con Tris-HCl pH 7.2. En la **Figura 30** se observa el perfil de elución de la proteína y la actividad de β -glucosidasa medida a cada una de las fracciones, y se pudo observar que el pico de proteína correspondió con la mayor actividad de β -glucosidasa.

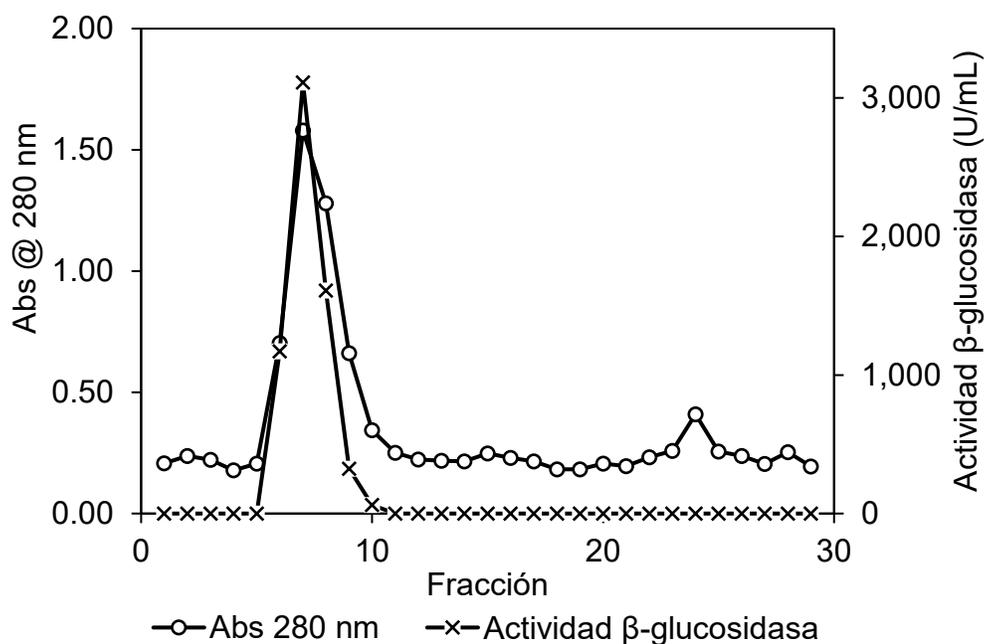


Figura 30. Perfil de elución de un extracto crudo libre de células de *C. lusitaniae* mediante exclusión molecular usando Bio-Gel P-60 (Biorad).

Las fracciones 6, 7, 8 y 9 que son las que se encuentran dentro del pico de mayor elución, fueron sometidas a SDS-PAGE para determinar el patrón de bandas de

proteína y comparar la pureza en cada una de ellas (**Figura 31**). Dado que en la fracción 7 fue en la que se observó la mayor cantidad de proteína (6 mg/mL) y la banda más intensa a la altura esperada ~93 kDa, esta fracción fue corrida en PAGE para llevar a cabo el zimograma respectivo (**Figura 32**), en donde se observó que existe al menos una proteína con actividad β -glucosidasa en los extractos intracelulares de *C. lusitaniae*. Esto debido a que el sustrato usado MUG, posee un enlace β ,1-4 sobre el cual actúan este tipo de enzimas.

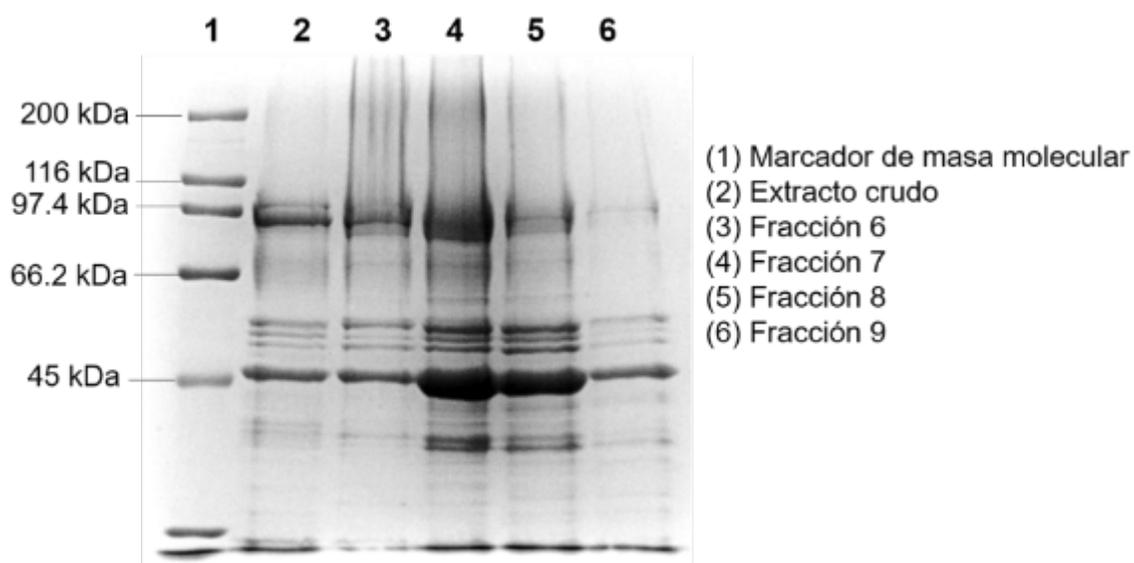


Figura 31. SDS-PAGE (10%) de las fracciones con actividad β -glucosidasa eluidas a través de una columna de exclusión molecular de Bio-Gel P-60.

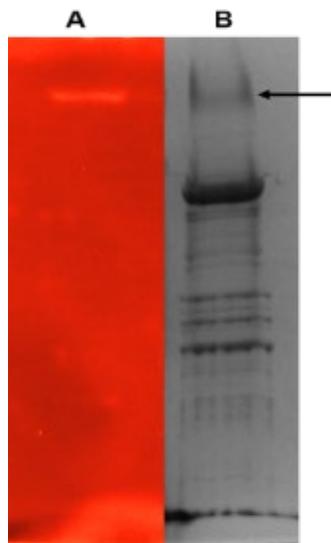


Figura 32. (A) Gel de actividad con MUG 5 mM; (B) Gel de poliacrilamida en condiciones nativas de la fracción 7 de la elución en columna de exclusión molecular.

Con los diferentes pasos de purificación, se logró aumentar la actividad específica de la β -glucosidasa hasta en 4 veces aproximadamente, esto indica que se logró enriquecer cada elución con la enzima de interés (**Tabla 6**).

Tabla 6. Purificación de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* inducida por celobiosa.

Paso de purificación	Unidades (U)	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Veces purificada
Extracto crudo	40631	85.0	478.0	1
Cromatografía intercambio aniónico	10374	13.8	751.7	1.6
Exclusión molecular P-60	6215	3.27	1900.6	4.0

A través de estos pasos de purificación se ha confirmado la presencia de por lo menos una proteína con actividad β -glucosidasa en los extractos intracelulares de

Clavispora lusitaniae creciendo en celobiosa como sustrato. Al final de la purificación aún se observan varias bandas de diferentes masas moleculares que indican la presencia de otras proteínas. Esto puede deberse a que se parte de un extracto intracelular en los que suelen estar presentes diversas proteínas que pueden rondar por los mismos intervalos de masas moleculares de la proteína de interés. Así mismo, es posible que se requieran más pasos de purificación o repetir alguno de ellos para eliminar la presencia de proteínas que no son de interés en este trabajo.

Como seguimiento a este trabajo se espera obtener con mayor grado de purificación la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* para realizar la caracterización cinética de la enzima parcialmente purificada, esto con la finalidad de dilucidar el comportamiento de esta proteína en presencia de inhibidores como la glucosa y cofactores que puedan afectar su actividad.

7. CONCLUSIÓN

Clavispora lusitaniae metaboliza la celobiosa como única fuente de carbono bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, indicando que posee al menos una β -glucosidasa.

La actividad de la β -glucosidasa de *C. lusitaniae* es inducible por celobiosa en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

La expresión del gen *Bgl 1* es regulada positivamente en presencia de celobiosa a las 6 h en condiciones de aerobiosis, alcanzando 3.4 veces de expresión relativa respecto al control interno (actina). En anaerobiosis, la expresión es 10 veces menor respecto a las condiciones aerobias, alcanzando una expresión relativa de 2.5 en presencia de celobiosa respecto al control de actina bajo las mismas condiciones a las 6 h de cultivo.

La glucosa actúa como represor de la expresión de *Bgl 1*, disminuyendo la expresión del gen en 60% respecto al control con glicerol como fuente de carbono a las 6 h de cultivo en condiciones aerobias.

C. lusitaniae es capaz de expresar el gen *Bgl 1* tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

C. lusitaniae posee al menos 3 genes que codifican para proteínas con actividad β -glucosidasa.

BIBLIOGRAFÍA

- Aburto, A., Martínez, T., & Murrieta, F. (2008). Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. *Tecnol Ciencia Ed IMIQ*, 23, 23-30.
- Bauer, S., Vasu, P., Persson, S., Mort, A., & Somerville, C. (2006). Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proc Natl Acad Sci*, 103, 11417-11422.
- Bhatia, Y., Mishra, S., & Bisaria, V. (2002). Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 22(4), 375-407.
- Blondin, B., Ratomahenina, R., Arnaud, A., & Galzy, P. (1983). Purification and properties of the β -glucosidase of a yeast capable of fermenting cellobiose to ethanol: *Dekkera intermedia* van der walt. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17, 1-6.
- Breus, N., Ryazonova, L., Dmitriev, V., Kulakovskaya, T., & Kulaev, I. (2012). Accumulation of phosphate and polyphosphate by *Cryptococcus humicola* and *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of nitrogen. *FEMS Yeast Res*, 12, 617-624.
- Cairns, J., & Esen, A. (2010). β -glucosidase. *Cell Mol Life Sci*, 67, 3389-3405.
- Cantarel, B., Coutinho, P., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 37, 233-238.
- Chan, A., Wang, Y., Ng, K., Fu, Z., & Wong, W. (2011). Cloning and characterization of a novel cellobiase gene, *cba3*, encoding the first known β -glucosidase of glycoside hydrolase family 1 of *Cellulomonas bizotaea*. *Gene*, 493, 52-61.
- Chan, C., Sin, L., Chan, K.-G., Shamsir, M., Manan, F., Sani, R., & Goh, K. (2016). Characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Anoxybacillus sp.* DT3-1. *Biotechnol Biofuels*, 9(174), 1-11.
- Chang, V., & Holtzapple, M. (2000). Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol*, 84, 5-37.
- Chen, H., Chen, Y., Lu, M., Chang, J., & Wang, H. (2012). A highly efficient β -glucosidase from a buffalo rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5. *Biotechnol Biofuels*, 5(24), 1-10.

- Chen, M., Qin, Y., Liu, Z., Liu, K., Wang, F., & Qu, Y. (2010). Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme Microbial Technol*, *46*, 444-449.
- Chen, S., Hong, Y., Shao, Z., & Liu, Z. (2010). A cold-active β -glucosidase (Bgl1C) from a sea bacteria *Exiguobacterium oxidotolerans* A011. *World J Microbiol Biotechnol*, *26*, 1427-1435.
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers Manag*, *51*, 1412-1421.
- Chesson, A., & Forsberg, C. (1988). Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: Hobson (ed) *THE RUMEN MICROBIAL ECOSYSTEM*, pp 251-884.
- Duff, S., & Murray, W. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour Technol*, *55*, 1-33.
- Farrell, A., Plevin, R., Turner, B., Jones, A., O'Hare, M., & Kammen, D. (2006). Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science*, *311*(5760), 506-508.
- Ferreira, V., Oliveira Faber, M., Silva Mesquita, S., & Pereira Jr, N. (2010). Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the β -glucosidase gene. *Electronic Journal of Biotechnology*, *13*(2), 1-7.
- Freer, S. (1993). Kinetic characterization of a β -glucosidase from a yeast, *Candida wickerhamii*. *J Biol Chem*, *268*(13), 9337-9342.
- Freer, S. N., & Greene, R. V. (1989). Transport of glucose and cellobiose by *Candida wickerhamii* and *Clavispora lusitanae*. *J Biol Chem*, *265*(22), 12864-12868.
- Freer, S., & Detroy, R. (1985). Regulation of β -1,4-glucosidase expression by *Candida wickerhamii*. *Appl Environ Microbiol*, *50*(1), 152-159.
- Galazka, J., Tian, C., Beeson, W., Martinez, B., Glass, N., & Cate JHD. (2010). Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science*, *330*, 84-86.
- Gontijo Borges, D., Baraldo Junior, A., Sanchez Farinas, C., Camargo Giordano, R., & Waldir Tardioli, P. (2014). Enhanced saccharification of sugarcane bagasse using soluble cellulase supplemented with immobilized β -glucosidase. *Bioresour Technol*, *167*, 206-213.
- González-Pombo, P., Pérez, G., Carrau, F., Guisán, J. M., Batista-Viera, F., & Brena, B. M. (2008). One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnol Lett*, *30*, 1469-1475.
- Guo, B., Sato, N., Biely, P., Amano, Y., & Nozaki, K. (2016). Comparison of catalytic properties of multiple β -glucosidases of *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, *100*, 4959-4968.

- Ha, S., Galazka, J., Kim, S., Choi, J., Yang, X., Seo, J., . . . Jin, Y. (2011). Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Proc Natl Acad Sci*, *108*(2), 2504-2509.
- Ha, S.-J., Galazka, J., Kim, S., Choi, J.-H., Yang, X., Seo, J.-H., . . . Jin, Y.-S. (2011). Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *PNAS*, *108*(2), 504-509.
- Hamacher, T., Becker, J., Gárdonyi, M., Hahn-Hägerdal, B., & Boles, E. (2002). Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology*, *148*, 2783-2788.
- Henrissat, B. (1998). Glycosidase families. *Biochem Soc Trans*, *26*(2), 153-156.
- Henrissat, B., & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol*, *7*, 637-644.
- Jeon, E., Hyeon, J., Eun, L., Park, B., Kim, S., Lee, J., & Han, S. (2009). Cellulosic alcoholic fermentation using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of *Clostridium cellulovorans* endoglucanase and *Saccharomycopsis fibuligera* β -glucosidase. *FEMS Microbiol Lett*, *301*, 130-136.
- Jeon, E., Hyeon, J., Suh, D., Suh, Y., Kim, S., Song, K., & Han, S. (2009). Production of cellulosic ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* heterologous expressing *Clostridium thermocellum* endoglucanase and *Saccharomycopsis fibuligera* β -glucosidase genes. *Mol Cells*, *28*, 369-373.
- Kim, H., & Pack, M. (1989). Cloning and expression of *Cellulomonas fimi* β -glucosidase genes in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol*, *11*(5), 313-316.
- Kim, H., Lee, W.-H., Galazka, J., Cate, J., & Jin, Y.-S. (2014). Analysis of cellodextrin transporters from *Neurospora crassa* in *Saccharomyces cerevisiae* for cellobiose fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, *98*, 1087-1094.
- Kim, S., Baek, S., Lee, K., & Hahn, J. (2013). Cellulosic ethanol production using a yeast consortium displaying a minicellulosome and β -glucosidase. *Microb Cell Fact*, *12*(14), 1-7.
- Kitagawa, T., Tokuhiko, K., Sugiyama, H., Kohda, K., Isono, N., Hisamatsu, M., . . . Imaeda, T. (2010). Construction of a β -glucosidase expression system using the multistress-tolerant yeast *Issatchenkia orientalis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, *87*, 1841-1853.
- Koleva, L., Pishtiyski, I., & Pavlova, K. (2006). Purification and properties of extracellular β -glucosidase from the antarctic yeast strain *Cryptococcus albidus* AL 3. *Bulg J Agric Sci*, *12*, 713-720.

- Kotaka, A., Bando, H., Kaya, M., Kato-Murai, M., Kuroda, K., Sahara, H., . . . Ueda, M. (2010). Direct ethanol production from barley β -glucan by sake yeast *Aspergillus oryzae* β -glucosidase and endoglucanase. *J Biosci Bioeng*, *105*(6), 891-896.
- Krisch, J., Tako, M., Papp, T., & Vagvolgyi, C. (2010). Characteristics and potential use of β -glucosidases from Zygomycetes. In: A. Méndez-Vilas (ed) *Technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, pp 891-896.
- Kumar, R., & Wyman, C. (2008). Effect of enzyme supplementation at moderate enzyme loading on initial glucose and xylose release from corn stover solids pre treated by leading technologies. *Biotechnol Bioeng*, *102*, 457-467.
- Lachance, M.-A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, *68*, 151-160.
- Lee, J., Kwon, K., & Hah, Y. (1996). Regulation of β -glucosidase biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett*, *135*, 79-84.
- Lee, K., Han, N., & Kim, J. (2012). Purification and characterization of β -glucosidase from *Weissella cibaria* 37. *J Microbiol Biotechnol*, *22*(12), 1705-1713.
- Liu, Z., Weber, S., & Cotta, M. (2013). Isolation and characterization of a β -glucosidase from a *Clavispora* strain with potential applications in bioethanol production from cellulosic materials. *Bioenerg Res*, *6*, 65-74.
- Liu, Z., Weber, S., Cotta, M., & Li, S.-Z. (2012). A new β -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol. *Bioresour Technol*, *104*, 410-416.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, *193*(1), 265-275.
- Lübbehüsen, T. L., Nielsen, J., & McIntyre, M. (2004). Aerobic and anaerobic ethanol production by *Mucor circinelloides* during submerged growth. *Appl Microbiol Biotechnol*, *63*, 543-548.
- Lynd, L., Weimer, P., van Zyl, W., & Pretorius, I. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, *2002*, *66*(3), 506-577.
- Mach, R., Seiboth, B., Myasnikov, A., Gonzalez, R., Strauss, J., Harkki, A., & Kubicek, C. (1995). The *bg1* gene of *Trichoderma reesei* QM 9414 encodes an extracellular, cellulose-inducible β -glucosidase involved in cellulase induction by sophorose. *Mol. Microbiol*, *16*(4), 687-697.
- Maleszka, R., & Schneider, H. (1982). Concurrent production and consumption of ethanol by cultures of *Pachysolen tannophilus* growing on D-xylose. *Appl Environ Microbiol*, *44*(4), 909-912.

- Mussatto, S., Dragone, G., Guimaraes, P., Silva, J., Carneiro, L., Roberto, I., . . . Teixeira, J. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol Adv*, 28, 817-830.
- Njokweni, A., Rose, S., & van Zyl, W. (2012). Fungal β -glucosidase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39(10), 1445-1452.
- Owczarzy, R., Moreira, B., You, Y., Behlke, M., & Walder, J. (2008). Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. *Biochemistry*, 47(19), 5336-5353.
- Pérez-Avalos, O., Ponce-Noyola, T., Magafia-Plaza, I., & De La Torre, M. (1996). Induction of xylanase and β -xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46, 405-409.
- Prior, B., Alexander, M., Yang, V., & Jeffries, T. (1988). The role of alcohol dehydrogenase in the fermentation of D-xylose by *Candida shehatae* ATCC 22984. *Biotechnol Lett*, 10, 37-42.
- Rajan, S., Yang, X., Collart, F., Yip, V., Withers, S., Varrot, A., . . . Anderson, W. (2004). Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD⁺/Mn²⁺-dependent phospho- α -glucosidase from *Bacillus subtilis*. *Structure*, 12(9), 1619-1629.
- RFA, R. F. (2016). *World Fuel Ethanol Production*. Washington, DC: RFA.
- Rosi, I., Vinella, M., & Domizio, P. (1994). Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J Appl Bacteriol*, 77(5), 519-527.
- SAGARPA. (2012). Bases técnicas para el fomento de la producción de biocombustibles en el país a partir de caña de azúcar. Ciudad de México: SAGARPA.
- Saha, B. C., & Bothast, R. J. (1996). Production, purification and characterization of a highly glucose-tolerant novel β -glucosidase from *Candida peltata*. *J Appl Environ Microbiol*, 62(9), 3165-3170.
- Saini, A., Aggarwal, N., Sharma, A., & Yadav, A. (2015). Prospects for irradiation in cellulosic ethanol production. *Biotechnol Res Int*, 1-13.
- Santiago, A. (2017). Estudio de la regulación de la xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa en *Cryptococcus humicola* OJ-31. Tesis de grado de Maestría, pp 53-55.
- Sarkar, N., Kumar Ghosh, S., Bannerjee, S., & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew Energ*, 37, 19-27.
- Singh, G., Verma, A., & Kumar, V. (2016). Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech*, 6(3).

- Spindler, D. D., Wyman, C. E., Mohagheghi, A., & Grohmann, K. (1988). Thermotolerant yeast for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol*, *17*, 279-293.
- Tang, H., Hou, J., Shen, Y., Xu, L., Yang, H., Fang, X., & Bao, X. (2013). High β -glucosidase secretion in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of cellulase hydrolysis and ethanol production in simultaneous saccharification and fermentation. *J Microbiol Biotechnol*, *23*(11), 1577-1585.
- Tolonen, A., Haas, W., Chilaka, A., Aach, J., Gygi, S., & Church, G. (2011). Proteome-wide systems analysis of a cellulosic biofuel producing microbe. *Mol Syst Biol*, *7*(461), 1-12.
- Trollope, K., Nel, D., & Volschenk, H. (2018). The heterologous expression potential of an acid-tolerant *Talaromyces pinophilus* β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol*, 1-10. doi:<https://doi.org/10.1007/s12223-018-0613-4>
- Turan, Y., & Zheng, M. (2005). Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*, *70*(12), 1656-1663.
- Verduyn, C., Zomerdijk, T. P., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1984). Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Appl Microbiol Biotechnol*, *19*, 181-185.
- Wang, X., Lewis Liu, Z., Weber, S. A., & Zhang, X. (2016). Two new native β -glucosidases from *Clavispora* NRRL Y-50464 confer its dual function as cellobiose fermenting ethanologenic yeast. *PLoS ONE*, *11*(3).
- Wu, W., Hildebrand, A., Kasuga, T., Xiong, X., & Fan, Z. (2013). Direct cellobiose production from cellulose using sextuple β -glucosidase gene deletion *Neurospora crassa* mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, *52*(3), 184-189.
- Yan, F.-y., Xia, W., Zhang, X.-x., Chen, S., Nie, X.-z., & Qian, L.-c. (2016). Characterization of β -glucosidase from *Aspergillus terreus* and its application in the hydrolysis of soybean isoflavones. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, *17*(6), 455-464.
- Zhenming, C., Zhe, C., Guanglei, L., Fang, W., Liang, J., & Tong, Z. (2009). *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv*, *27*, 423-431.
- Zimbardi, A., Sehn, C., Meleiro, L., Souza, F., & Madui, D. (2013). Optimization of β -glucosidase, β -xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. *Int J Mol Sci*, *14*, 2875-2902.

Znameroski, E. A., Coradetti, S. T., Roche, C. M., Tsai, J. C., Lavarone, A. T., Cate, J. H., & Glass, N. L. (2012). Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. PNAS, *109*(16), 6012-6017.

Znameroski, E. A., Li, X., Tsai, J., Galazka, J. M., Glass, N. L., & Cate, J. H. (2013). Evidence for transceptor function of cellodextrin transporters in *Neurospora crassa*. J Biol Chem. doi:10.1074/jbc.M113.533273