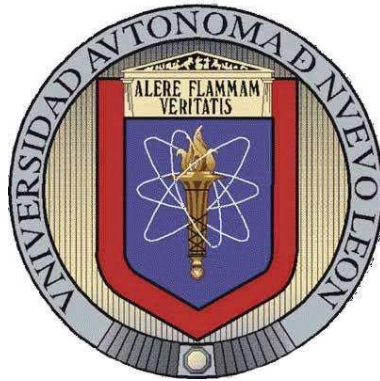


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA  $\beta$ -GLUCOSIDASA  
EN *Pichia pastoris* CON EL POTENCIAL DE APLICARSE  
EN NUTRICIÓN ANIMAL

POR:

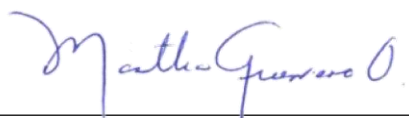
LBG DAVID ALEJANDRO GUTIÉRREZ GUTIÉRREZ

como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
con orientación en Biotecnología

2022

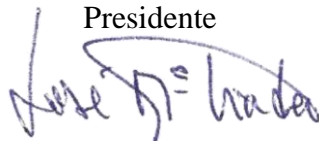
**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA b-GLUCOSIDASA  
EN *Pichia pastoris* CON EL POTENCIAL DE APLICARSE  
EN NUTRICIÓN ANIMAL**

Comité de tesis



DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN

Presidente



DR. JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ

Secretario



DR. JORGE RAMSY KAWAS GARZA

Vocal 1



DRA. MARÍA DE JUSÚS LOERA ARIAS

Vocal 2



DRA: LUCÍA ELIZABETH CRUZ SUÁREZ

Vocal 3



DRA. KATIUSHKA AREVALO NINO

Subdirector de Posgrado



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA  $\beta$ -GLUCOSIDASA EN  
*Pichia pastoris* CON EL POTENCIAL DE APLICARSE  
EN NUTRICIÓN ANIMAL

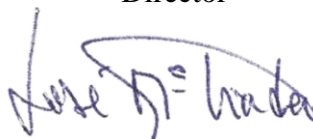
Dirección de tesis



---

DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN

Director



---

DR. JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ

Co-director

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Parte del presente trabajo ha sido presentado en forma de cartel en los siguientes congresos:

Gutierrez-Gutierrez DA, Viader-Salvadó JM, Guerrero-Olazarán M. 2019. Construcción de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras de la  $\beta$ -glucosidasa de la termita *Coptotermes formosanus*. XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. León, Guanajuato, México, 23-28 de junio de 2019.

Gutierrez-Gutierrez DA, Fuentes-Garibay JA, Viader-Salvadó JM, Guerrero-Olazarán M. 2022. Biochemical characterization of the  $\beta$ -glucosidase Glu1B from *Coptotermes formosanus* produced in *Pichia pastoris* and identification of residues responsible for the high specific activity toward cellobiose and resistance to glucose. esib – the European Summit of Industrial Biotechnology. Pichia2022. Graz, Austria, 15-17 de noviembre de 2022.

Además, ha sido publicado en la revista Enzyme and Microbial Technology:

Gutierrez-Gutierrez DA, Fuentes-Garibay JA, Viader-Salvadó JM, Guerrero-Olazarán M. 2022. Biochemical characterization of the  $\beta$ -glucosidase Glu1B from *Coptotermes formosanus* produced in *Pichia pastoris*. Enzyme and Microbial Technology. En impresión. <http://doi.org/10.1016/j.enzimtec.2022.110155>

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Martha Guerrero Olazarán, agradezco primeramente permitirme realizar este trabajo en su laboratorio. Además, agradezco su apoyo en la dirección de este trabajo.

Al Dr. José María Viader, por su asesoría en varias fases del trabajo.

A las Dras. María de Jesús Loera Arias y Lucía Elizabeth Cruz Suárez, por su apoyo como tutoras de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio L5, en especial Alber, Fabián, Mariana y Ana, por hacer de este tiempo una experiencia más agradable. A Mariana, además, por apoyarme en el momento que más lo necesité

A mi familia, por apoyarme estos años.

Y a CONACYT, por la beca otorgada para la realización de este trabajo (CVU 706320).

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. La materia lignocelulósica y su posible aprovechamiento para nutrición animal. .....	3
2.1.1. Composición de la materia lignocelulósica .....	3
2.1.2. Aprovechamiento potencial de la materia lignocelulósica para nutrición animal .....	4
2.2. Las enzimas fibrolíticas.....	6
2.2.1. Las celulasas.....	8
2.3. Las $\beta$ -glucosidasas y su potencial para aplicarse en nutrición animal .....	9
2.3.1. Funciones y clasificación de las $\beta$ -glucosidasas .....	9
2.3.2. Aplicaciones industriales de las $\beta$ -glucosidasas.....	10
2.3.3. Características ideales de $\beta$ -glucosidasas para su aplicación en nutrición animal y otras industrias .....	11
2.3.4. Expresión heteróloga de $\beta$ -glucosidasas .....	12
2.4. <i>Pichia pastoris</i> como hospedero para la producción de proteínas recombinantes .....	13
2.5. Expresión heteróloga de $\beta$ -glucosidasas en <i>P. pastoris</i> .....	15
3. JUSTIFICACIÓN .....	16
4. HIPÓTESIS .....	17
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	18
5.1. Objetivo general .....	18
5.2. Objetivos específicos.....	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
6.1. Lugar de trabajo.....	19
6.2. Material biológico y medios de cultivo .....	19
6.3. Materiales y equipos.....	20
6.4. Estrategia general .....	21
6.5. Selección de una $\beta$ -glucosidasa con propiedades atractivas para su aplicación en nutrición animal.....	22
6.5.1. Proceso de selección de una $\beta$ -glucosidasa con propiedades atractivas para su aplicación en nutrición animal .....	22
6.5.2. Análisis computacional de la $\beta$ -glucosidasa seleccionada.....	25

6.6.	Construcción de cepas de <i>P. pastoris</i> productoras la $\beta$ -glucosidasa Glu1B de <i>Coptotermes formosanus</i> .....	28
6.6.1.	Estrategia general .....	28
6.6.2.	Verificación de codones de la secuencia codificante de Glu1B para su expresión en <i>P. pastoris</i> .....	29
6.6.3.	Aislamiento, caracterización y secuenciación de pUC57-CfBG .....	30
6.6.3.1.	Aislamiento de pUC57-CfBG de <i>E. coli</i> TOP10 y transformación de <i>E. coli</i> JM109 con pUC57-CfBG .....	30
6.6.3.2.	Caracterización y secuenciación de pUC57-CfBG.....	31
6.6.4.	Clonación de la secuencia codificante de Glu1B madura en el vector pGEM-T.....	33
6.6.4.1.	Diseño de oligonucleótidos para la síntesis de la secuencia codificante de Glu1B madura .....	33
6.6.4.2.	Síntesis de la secuencia codificante de Glu1B madura mediante PCR de alta fidelidad.....	34
6.6.4.3.	Clonación del fragmento XBGlUN en pGEM-T .....	36
6.6.4.4.	Identificación de clonas portadoras de pGEMBGlu .....	38
6.6.4.5.	Caracterización y secuenciación de pGEMBGlu.....	39
6.6.5.	Subclonación de la secuencia codificante de Glu1B madura en el vector pPIC9 .....	40
6.6.5.1.	Estrategia de clonación .....	40
6.6.5.2.	Preparación de los plásmidos pGEMBGlu y pPIC9TanM y obtención de los fragmentos pPIC9 y XBGlUN.....	41
6.6.5.3.	Ligación del fragmento XBGlUN con el vector pPIC9 y transformación en <i>E. coli</i> JM109 .....	43
6.6.5.4.	Identificación de clonas de <i>E. coli</i> JM109 portadoras de pPIC9BGlu44 .....	44
6.6.6.	Transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 con pPIC9BGlu.....	45
6.6.6.1.	Preparación y caracterización de pPIC9BGlu .....	45
6.6.6.2.	Linealización de pPIC9BGlu y transformación de células electrocompetentes de <i>P. pastoris</i> KM71 .....	47
6.6.6.3.	Verificación de la integración de pPIC9BGlu en clonas transformantes de <i>P. pastoris</i> KM71 .....	50
6.6.7.	Caracterización fenotípica de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu .....	51
6.6.7.1.	Cultivos en lote de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu en condiciones de inducción del gen heterólogo .....	51
6.6.7.2.	Determinación de proteínas extracelulares totales.....	52



6.6.7.3.	Determinación de la actividad enzimática de $\beta$ -glucosidasa .....	52
6.6.7.4.	Detección de la $\beta$ -glucosidasa recombinante por SDS-PAGE .....	54
6.6.8.	Selección de cepas de <i>P. pastoris</i> sobreproductoras de BGlu .....	56
6.6.8.1.	Estrategia general.....	56
6.6.8.2.	Cultivos en lote de 60 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu en condiciones de inducción del gen heterólogo .....	56
6.6.8.3.	Determinación de proteínas extracelulares totales.....	57
6.6.8.4.	Clasificación de 60 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu .....	57
6.6.8.5.	Determinación de la actividad enzimática de $\beta$ -glucosidasa .....	58
6.6.8.6.	Relación entre producción de proteínas y actividad de $\beta$ -glucosidasa.....	59
6.7.	Caracterización bioquímica de la $\beta$ -glucosidasa de <i>C. formosanus</i> producida en <i>P. pastoris</i> (BGlu) .....	60
6.7.1.	Estrategia general.....	60
6.7.2.	Caracterización parcial de BGlu cruda .....	61
6.7.2.1.	Producción de BGlu.....	61
6.7.2.2.	Relación entre la concentración de BGlu y la actividad enzimática observada .....	62
6.7.2.3.	Efecto del pH y la temperatura en la actividad de BGlu cruda.....	62
6.7.3.	Purificación de BGlu.....	63
6.7.3.1.	Selección del buffer para la purificación de BGlu.....	63
6.7.3.2.	Producción y ultrafiltración de BGlu.....	64
6.7.3.3.	Purificación de BGlu mediante cromatografía de intercambio aniónico .....	65
6.7.4.	Caracterización bioquímica de BGlu purificada.....	66
6.7.4.1.	Evaluación de la masa molecular aparente y N-glicosilación de BGlu.. .....	66
6.7.4.2.	Determinación del tiempo máximo de reacción que permite la medición de la velocidad inicial de reacción de BGlu .....	66
6.7.4.3.	Efecto del pH y la temperatura en la actividad de BGlu y determinación de su actividad específica.....	68
6.7.4.4.	Determinación de las constantes cinéticas de BGlu .....	69
6.7.4.5.	Determinación del efecto inhibitorio de la glucosa sobre la actividad de BGlu y cálculo de la constante de inhibición por glucosa .....	70
6.7.5.	Evaluación del efecto de cationes divalentes en la actividad de BGlu a distintas temperaturas .....	70

6.7.5.1.	Comparación del efecto de la temperatura en la actividad de BGlu cruda, desalada y purificada.....	70
6.7.5.2.	Efecto de cationes divalentes en la actividad de BGlu purificada .....	71
6.7.6.	Evaluación de la termoestabilidad de BGlu .....	71
6.8.	Análisis estadístico .....	72
7.	RESULTADOS .....	73
7.1.	Selección de una $\beta$ -glucosidasa con propiedades atractivas para su aplicación en nutrición animal.....	73
7.1.1.	Proceso de selección de una $\beta$ -glucosidasa con propiedades atractivas para su aplicación en nutrición animal .....	73
7.1.2.	Análisis computacional de la $\beta$ -glucosidasa seleccionada.....	76
7.2.	Construcción de cepas de <i>P. pastoris</i> productoras la $\beta$ -glucosidasa Glu1B de <i>Coptotermes formosanus</i> .....	84
7.2.1.	Verificación de codones de la secuencia codificante de Glu1B para su expresión en <i>P. pastoris</i> .....	84
7.2.2.	Aislamiento, caracterización y secuenciación de pUC57-CfBG .....	85
7.2.3.	Clonación de la secuencia codificante de Glu1B madura en el vector pGEM-T.....	88
7.2.3.1.	Síntesis de la secuencia codificante de Glu1B madura mediante PCR de alta fidelidad.....	88
7.2.3.2.	Clonación del fragmento XBGlun en pGEM-T.....	88
7.2.3.3.	Caracterización y secuenciación de pGEMBGlu.....	89
7.2.4.	Subclonación de la secuencia codificante de Glu1B madura en el vector pPIC9 .....	91
7.2.4.1.	Preparación y ligación de los fragmentos XBGlun y pPIC9 .....	91
7.2.4.2.	Transformación de <i>E. coli</i> JM109 con pPIC9BGlu.....	92
7.2.5.	Transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 con pPIC9BGlu.....	93
7.2.5.1.	Preparación, caracterización y linealización de pPIC9BGlu.....	93
7.2.5.2.	Transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 con pPIC9BGlu y verificación de la integración en las clonas obtenidas .....	94
7.2.6.	Caracterización fenotípica de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu .....	95
7.2.7.	Selección de cepas de <i>P. pastoris</i> KM71 sobreproductoras deBGlu.....	99
7.3.	Caracterización bioquímica de la $\beta$ -glucosidasa de <i>C. formosanus</i> producida en <i>P. pastoris</i> (BGlu) .....	104
7.3.1.	Caracterización parcial de BGlu cruda .....	104

7.3.2.	Purificación de BGlu.....	106
7.3.2.1.	Selección del buffer para la purificación de BGlu.....	106
7.3.2.2.	Producción y purificación de BGlu .....	107
7.3.3.	Caracterización bioquímica de BGlu purificada.....	109
7.3.3.1.	Evaluación de la masa molecular aparente y N-glicosilación de BGlu.. .....	109
7.3.3.2.	Determinación del tiempo máximo de reacción que permite la medición de la velocidad inicial de reacción de BGlu.....	110
7.3.3.3.	Efecto del pH y la temperatura en la actividad de BGlu y determinación de su actividad específica.....	110
7.3.3.4.	Determinación de las constantes cinéticas de BGlu .....	112
7.3.3.5.	Determinación del efecto inhibitorio de la glucosa sobre la actividad de BGlu y cálculo de la constante de inhibición por glucosa .....	114
7.3.4.	Evaluación del efecto de cationes divalentes en la actividad de BGlu a distintas temperaturas .....	115
7.3.5.	Evaluación de la termoestabilidad de BGlu.....	117
8.	DISCUSIÓN .....	119
9.	CONCLUSIONES.....	135
10.	PERSPECTIVAS.....	137
11.	BIBLIOGRAFÍA .....	138
ANEXO 1.....		149
	Mapa del plásmido pUC57-CfBG .....	149
ANEXO 2.....		150
	Secuencias de los oligonucleótidos empleados en este trabajo .....	150
ANEXO 3.....		151
	$\beta$ -glucosidasas analizadas en este trabajo .....	151
ANEXO 4.....		153
	Códigos de acceso de GenBank de las secuencias de 32 $\beta$ -glucosidasas de termitas .....	153

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ejemplos de $\beta$ -glucosidasas expresadas en <i>P. pastoris</i> .....	15
<b>Tabla 2.</b> Mezcla de reacción para la digestión analítica de pUC57-CfBG aislado de <i>E. coli</i> TOP10 con la endonucleasa <i>EcoRI</i> .....	31
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de reacción para las digestiones analíticas de pUC57-CfBG aislado de clonas de <i>E. coli</i> JM109 con la endonucleasa <i>EcoRI</i> .....	32
<b>Tabla 4.</b> Mezcla de reacción para la síntesis de la secuencia codificante de Glu1B madura mediante PCR de alta fidelidad.....	35
<b>Tabla 5.</b> Programa de termociclador para la reacción de síntesis de la secuencia codificante de Glu1B madura por PCR.....	36
<b>Tabla 6.</b> Mezcla de reacción para la adenilación del fragmento XBGlUN sintetizado por PCR de alta fidelidad .....	37
<b>Tabla 7.</b> Mezcla de reacción para la ligación del fragmento XBGlUN adenilado en el vector pGEM-T .....	37
<b>Tabla 8.</b> Mezcla de reacción para la identificación de clonas transformantes de <i>E. coli</i> JM109 portadoras de pGEMBGlu mediante PCR de colonia .....	38
<b>Tabla 9.</b> Programa de termociclador para la identificación de clonas transformantes de <i>E. coli</i> JM109 portadoras de pGEMBGlu mediante PCR de colonia .....	38
<b>Tabla 10.</b> Mezcla de reacción para las digestiones analíticas de pGEMBGlu aislado de clonas de <i>E. coli</i> JM109 con la endonucleasa <i>SalI</i> .....	40
<b>Tabla 11.</b> Mezclas de reacción para las digestiones preparativas de pGEMBGlu y pPIC9TanM con las endonucleasas <i>XhoI</i> y <i>NotI</i> .....	43
<b>Tabla 12.</b> Mezclas de reacción para la ligación del fragmento XBGlUN en el vector pPIC9 .....	44
<b>Tabla 13.</b> Mezcla de reacción para la identificación de clonas transformantes de <i>E. coli</i> JM109 portadoras de pPIC9BGlu mediante PCR de colonia.....	45
<b>Tabla 14.</b> Programa de termociclador para la identificación de clonas transformantes de <i>E. coli</i> JM109 portadoras de pPIC9BGlu mediante PCR de colonia.....	45
<b>Tabla 15.</b> Mezcla de reacción para la caracterización de pPIC9BGlu mediante PCR....	47
<b>Tabla 16.</b> Programa de termociclador para la caracterización de pPIC9BGlu mediante PCR .....	47
<b>Tabla 17.</b> Mezcla de reacción para la linealización de pPIC9BGlu con la endonucleasa <i>SalI</i> .....	48
<b>Tabla 18.</b> Mezcla de reacción para la verificación de la integración de pPIC9BGlu en <i>P. pastoris</i> KM71 mediante PCR de colonia .....	50
<b>Tabla 19.</b> Programa de termociclador para la verificación de la integración de pPIC9BGlu en <i>P. pastoris</i> KM71 mediante PCR de colonia .....	51
<b>Tabla 20.</b> Mezclas para la preparación de los geles separador y concentrador para SDS-PAGE.....	55
<b>Tabla 21.</b> Propiedades de cinco $\beta$ -glucosidasas preseleccionadas con propiedades atractivas para su potencial uso en nutrición animal.....	75
<b>Tabla 22.</b> Evaluación del proceso de purificación de BGlu.....	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquematación de la composición de la materia lignocelulósica en la pared celular vegetal..	3
<b>Figura 2.</b> Representación enzimática de las enzimas involucradas en la degradación de <b>a)</b> celulosa y <b>b)</b> xilano.	7
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la estrategia general para la producción y caracterización en <i>P. pastoris</i> de una $\beta$ -glucosidasa con potencial aplicación en nutrición animal.	21
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la estrategia general para la construcción de cepas de <i>P. pastoris</i> productoras la $\beta$ -glucosidasa Glu1B de <i>C. formosanus</i> .	29
<b>Figura 5.</b> Esquematación de la hibridación de los oligonucleótidos 5BGluX y 3BGluN en el plásmido sintético pUC57-CfBG.	34
<b>Figura 6.</b> Estrategia general para la subclonación de la secuencia codificante de Glu1B en el vector pPIC9 a partir de los plásmidos pGEMBGlu y pPIC9TanM	41
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de la estrategia general para la caracterización bioquímica de la $\beta$ -glucosidasa de <i>C. formosanus</i> producida en <i>P. pastoris</i> (BGlu)	60
<b>Figura 8.</b> Modelo de la estructura tridimensional de la $\beta$ -glucosidasa Glu1B de <i>C. formosanus</i> obtenido por reconocimiento de homología utilizando Phyre <sup>2</sup>	78
<b>Figura 9.</b> Dendrograma Neighbor-Joining de 42 secuencias aminoacídicas de $\beta$ -glucosidasas de las familias GH1 y GH3.	79
<b>Figura 10.</b> Representación superficial de la estructura tridimensional de la $\beta$ -glucosidasa Glu1B de <i>C. formosanus</i> mostrando el túnel de su sitio activo	80
<b>Figura 11.</b> WebLogos del análisis de frecuencia de residuos en los sitios de unión a glicón y aglicón y entre los residuos de enlace de las tres categorías de secuencias de $\beta$ -glucosidasas de acuerdo con su actividad específica sobre celobiosa (AEA: actividad específica alta, AEM: actividad específica media, AEB: actividad específica baja) y del global de las secuencias de $\beta$ -glucosidasas depositadas en la base de datos Glutant $\beta$ base (Mariano et al., 2020). Weblogos del análisis de frecuencia de residuos en los 8 residuos de entrada al túnel del sitio activo de 32 secuencias de $\beta$ -glucosidasas de termitas (TBGlu, Anexo 4) y del global de todas las secuencias de $\beta$ -glucosidasas en la base de datos Glutant $\beta$ base.	83
<b>Figura 12.</b> Dendrograma radial Neighbor-joining del alineamiento de 32 secuencias de $\beta$ -glucosidasas de termitas.	84
<b>Figura 13.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de digestión analítica de pUC57-CfBG aislado a partir de <i>E. coli</i> TOP10 pUC57-CfBG con la endonucleasa <i>EcoRI</i> .	86
<b>Figura 14.</b> Mapa de digestión virtual del plásmido pUC57-CfBG con la endonucleasa <i>EcoRI</i> .	87
<b>Figura 15.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de digestión analítica de pUC57-CfBG aislado a partir de distintas clonas de <b>a)</b> tamaño típico o <b>b)</b> tamaño pequeño de <i>E. coli</i> JM109 pUC57-CfBG con la endonucleasa <i>EcoRI</i> .	87
<b>Figura 16.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de <b>a)</b> síntesis de la secuencia codificante de la $\beta$ -glucosidasa Glu1B de <i>C. formosanus</i> con sitios de restricción <i>XhoI</i> y	

<i>NotI</i> (fragmento XBGlUN) mediante PCR de alta fidelidad y <b>b)</b> purificación de XBGlUN.	88
<b>Figura 17.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de identificación de clonas de <i>E. coli</i> JM109 portadoras de pGEMBGlu mediante PCR de colonia.	89
<b>Figura 18.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de digestión analítica de pGEMBGlu aislado a partir de clonas transformantes de <i>E. coli</i> JM109 con la endonucleasa <i>SalI</i> .	90
<b>Figura 19.</b> Mapa de digestión virtual de los plásmidos <b>a)</b> pGEMBGlu y <b>b)</b> pUC57-CfBG con la endonucleasa <i>SalI</i> .	90
<b>Figura 20.</b> Geles de electroforesis en agarosa al 0.8% que muestran el proceso de preparación y ligación de los fragmentos pPIC9 y XBGlUN.	91
<b>Figura 21.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de identificación de clonas de <i>E. coli</i> JM109 portadoras de pPIC9BGlu mediante PCR de colonia.	92
<b>Figura 22.</b> Representación gráfica del plásmido pPIC9BGlu construido.	93
<b>Figura 23.</b> Geles de electroforesis en agarosa al 0.8% que muestran el proceso de <b>a)</b> preparación, <b>b)</b> caracterización por PCR y <b>c)</b> linealización con <i>SalI</i> de pPIC9BGlu.	94
<b>Figura 24.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la verificación de la integración del plásmido pPIC9BGlu en clonas de <i>P. pastoris</i> KM71 mediante PCR de colonia.	95
<b>Figura 25.</b> Representación gráfica del casete de expresión regulable por metanol para la $\beta$ -glucosidasa Glu1B de <i>C. formosanus</i> integrado en <i>P. pastoris</i> KM71BGlu.	95
<b>Figura 26.</b> Cinéticas de crecimiento en la fase de inducción de 2 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu alimentadas con 0.75% de metanol cada 12 o 24 h.	96
<b>Figura 27. a)</b> Concentración de proteínas totales y <b>b)</b> actividad de $\beta$ -glucosidasa en medios libres de células de cultivos de dos clonas de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu durante la fase de inducción con metanol siguiendo dos estrategias de alimentación.	97
<b>Figura 28.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de un concentrado del medio libre de células de un cultivo de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu (clona 3) tratado con Endo H <sub>f</sub> .	98
<b>Figura 29.</b> Distribución de las DO <sub>600</sub> finales de cultivos de 60 clonas <i>P. pastoris</i> KM71BGlu tras 36 horas de inducción con metanol.	99
<b>Figura 30.</b> Distribución de las concentraciones de proteínas totales en medios libres de células de cultivos de 60 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu tras 36 horas de inducción con metanol.	100
<b>Figura 31.</b> Distribución de los rendimientos producto/biomasa de cultivos de 60 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu tras 36 horas de inducción con metanol.	100
<b>Figura 32.</b> Clasificación de 60 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu en función de su rendimiento producto/biomasa relativo a la clona normalizadora.	101
<b>Figura 33.</b> Actividad volumétrica de $\beta$ -glucosidasa en medios libres de células de cultivos de 9 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu tras 36 h de inducción con metanol.	102
<b>Figura 34.</b> Rendimiento de $\beta$ -glucosidasa extracelular activa por unidad de biomasa en cultivos de 9 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu tras 36 h de inducción con metanol.	102
<b>Figura 35.</b> Análisis de la relación entre la actividad volumétrica de $\beta$ -glucosidasa y la concentración de proteínas extracelulares en los medios libres de células de cultivos de 7	

clonas de <i>P. pastoris</i> KM71BGlu tras 36 h de inducción con metanol utilizando un modelo de regresión lineal. ....	103
<b>Figura 36.</b> Análisis de la relación entre la concentración de BGlu y la actividad volumétrica observada utilizando un modelo de regresión lineal. ....	104
<b>Figura 37.</b> Efecto del pH en la actividad de BGlu cruda a 40°C. ....	105
<b>Figura 38.</b> Efecto de la temperatura en la actividad de BGlu cruda a pH 5.0.....	105
<b>Figura 39.</b> Determinación de la reversibilidad de la inhibición de BGlu con TEA.....	106
<b>Figura 40.</b> Efecto de Tris y TEA en la actividad de BGlu. ....	107
<b>Figura 41.</b> Cromatograma de la purificación de BGlu mediante cromatografía de intercambio aniónico. ....	108
<b>Figura 42.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de muestras de distintas etapas de la purificación de BGlu tratadas con Endo H <sub>f</sub> . ....	110
<b>Figura 43.</b> Análisis de la relación entre el tiempo de reacción del complejo enzima-sustrato y la concentración de glucosa liberada por BGlu utilizando un modelo de regresión lineal. ....	111
<b>Figura 44.</b> Efecto del pH en la actividad a 40°C de dos fracciones de BGlu purificada. ....	111
<b>Figura 45.</b> Efecto de la temperatura en la actividad a pH 5.0 de dos fracciones de BGlu purificada.....	112
<b>Figura 46.</b> Cinética enzimática de la fracción 2 de BGlu ajustada a la ecuación de Michaelis-Menten. ....	113
<b>Figura 47.</b> Cinética enzimática de la fracción 3 de BGlu ajustada a la ecuación de Michaelis-Menten. ....	113
<b>Figura 48.</b> Efecto de la glucosa en la actividad de BGlu utilizando 7.5 (●), 10.0 (▲) y 12.5 (◆) mM de pNPG como sustrato.. ....	114
<b>Figura 49.</b> Gráfica de Dixon que muestra el efecto inhibitorio de la glucosa en la actividad de BGlu. ....	115
<b>Figura 50.</b> Efecto de la temperatura en la actividad a pH 5.0 de muestras de BGlu provenientes de distintas etapas de purificación. ....	116
<b>Figura 51.</b> Efecto de cationes divalentes 1 mM en la actividad a pH 5.0 de la fracción 2 de BGlu a 50°C y 60°C. ....	117
<b>Figura 52.</b> Actividad residual de BGlu (fracción cromatográfica 2) después de la incubación por 30 min a 30-60°C en la ausencia o presencia de MnSO <sub>4</sub> 1 mM o glicerol al 10%.....	118

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
BGlu	$\beta$ -glucosidasa Glu1B de <i>Coptotermes formosanus</i> producida en <i>Pichia pastoris</i>
CDS	Secuencia codificante
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm
DTT	Ditiotreitol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDTA-NaOH	Ácido etilendiaminotetraacético cuyo pH se ha ajustado con NaOH
Glu1B	$\beta$ -glucosidasa Glu1B de <i>Coptotermes formosanus</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico)
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobases
k <sub>cat</sub>	Constante catalítica
kDa	Kilodaltons
K <sub>i</sub>	Constante de inhibición
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
ln	Logaritmo natural
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PIPES	Ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico)
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
TEA	Trietanolamina
TEA-HCl	Trietanolamina cuyo pH ha sido ajustado con HCl
TEMED	Tetrametiletildiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano



Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano cuyo pH ha sido ajustado con HCl
U	Unidad de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
$V_{\max}$	Velocidad de reacción máxima
X	Número de veces la concentración
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
YNB	Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos

## RESUMEN

La celulosa es una materia prima muy abundante en el planeta con el potencial químico de ser utilizada para nutrición animal. Sin embargo, los animales monogástricos de granja no son capaces de utilizar la celulosa como fuente de energía, por lo que deben ser suplementados con enzimas digestivas para ello. Las  $\beta$ -glucosidasas son uno de los tres tipos de enzimas involucradas en la digestión de celulosa. Sin embargo, las  $\beta$ -glucosidasas comerciales actuales no reúnen las propiedades catalíticas necesarias para su uso efectivo en nutrición animal. En este trabajo se seleccionó a partir de reportes en la literatura una  $\beta$ -glucosidasa con propiedades atractivas para su uso en nutrición animal, se produjo en *Pichia pastoris* y la  $\beta$ -glucosidasa recombinante se caracterizó para determinar si conserva estas propiedades al ser producida en *P. pastoris*. La  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *Coptotermes formosanus* fue la enzima seleccionada por su alta actividad específica en condiciones del tracto digestivo animal, resistencia a inhibición por producto, actividad en un amplio rango de pH y termoestabilidad. Esta  $\beta$ -glucosidasa fue producida en *P. pastoris* con niveles de producción de hasta 11.1 mg/L y presentó dos formas principales con masas moleculares de ~56-58 kDa y ~60-62 kDa que difieren en su grado de N-glicosilación. La  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* producida en *P. pastoris* (BGlu) purificada presentó actividad máxima a pH 5.0 y 50°C y las dos formas de ~56-58 kDa y ~60-62 kDa mostraron valores altos de actividad específica y  $K_m$  de 431 y 597  $\text{Umg}^{-1}$  y 6.71 y 11.38 mM, respectivamente. BGlu presentó una resistencia moderada a la inhibición por glucosa con una  $K_i$  de 166 mM. La forma con mayor N-glicosilación de BGlu presentó mayor actividad relativa a pH 4.0 y 6.0 que la forma menos glicosilada. Se observó un efecto dependiente de temperatura de cationes divalentes en la actividad de BGlu, incrementando el manganeso su actividad a 60°C pero no a 50°C. En general, la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* conservó sus propiedades catalíticas más importantes al ser producida en *P. pastoris*, aunque se observaron diferencias entre la enzima no glicosilada previamente reportada y las dos formas con distinto nivel de glicosilación caracterizadas en este trabajo. Además, se identificaron computacionalmente residuos específicos que contribuyen a la alta actividad específica sobre celobiosa de Glu1B y otras  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH1.

## ABSTRACT

Cellulose is an abundant resource on Earth with the potential to be used as animal feed. However, single stomach farm animals are unable to utilize cellulose as an energy source because they lack the necessary digestive enzymes, although they could be provided as supplements.  $\beta$ -glucosidases are one of the three types of enzymes involved in cellulose digestion. However, commercial  $\beta$ -glucosidases currently available do not possess the biochemical properties required to be effective for animal nutrition. In this work, a  $\beta$ -glucosidase with attractive properties for its use in animal nutrition was selected from literature reports, produced in *Pichia pastoris* and characterized to determine whether it retains its properties when produced as a recombinant protein in *P. pastoris*. The  $\beta$ -glucosidase Glu1B from *Coptotermes formosanus* was selected as the best enzyme for animal nutrition due to its high specific activity at conditions of the digestive tract, resistance to product inhibition, activity at a broad pH range and thermostability. This  $\beta$ -glucosidase was produced in *P. pastoris* with production levels up to 11.1 mg/L and presented two main variants with molecular mass of ~56-58 kDa and ~60-62 kDa which differed in their degree of N-glycosylation. Purified  $\beta$ -glucosidase Glu1B from *C. formosanus* produced in *P. pastoris* (BGlu) showed optimum activity at pH 5.0 and 50°C, and the ~56-58 kDa and ~60-62 kDa variants showed high specific activity and  $K_m$  values towards cellobiose of 431 and 597  $\text{Umg}^{-1}$  and 6.71 and 11.38 mM, respectively. BGlu showed moderate resistance to product inhibition by glucose with a  $K_i$  of 166 mM. The most extensively N-glycosylated variant of BGlu presented higher relative activity at pH 4.0 and 6.0 than the less N-glycosylated one. Divalent cations had a temperature-dependent effect on BGlu activity, as manganese enhanced activity of BGlu at 60°C but not at 50°C. In general, the  $\beta$ -glucosidase Glu1B from *C. formosanus* conserved its most important properties when produced in *P. pastoris*, although some differences were observed between the previously reported non-glycosylated enzyme and the two variants with different levels of N-glycosylation here described. Moreover, specific residues that contribute to the high specific activity towards cellobiose of Glu1B and other  $\beta$ -glucosidases of the family GH1 were identified through computer analysis.

# 1. INTRODUCCIÓN

La materia lignocelulósica es el componente orgánico más abundante del planeta, ya que tiene una producción global de cerca de  $180 \times 10^9$  toneladas anuales, de las cuales sólo alrededor del 4% es aprovechado actualmente como alimento y energía. En los últimos años han surgido alternativas para el aprovechamiento de la materia lignocelulósica, como la producción de bioetanol a partir de subproductos agrícolas. Otra alternativa potencial para el aprovechamiento de esta materia es su uso en nutrición de animales monogástricos de granja como el cerdo y el pollo. Tradicionalmente, este tipo de animales siguen dietas basadas en granos ricos de almidón, donde este carbohidrato aporta más del 50% del contenido calórico. Sin embargo, la disponibilidad de los cultivos ricos en almidón en el mundo es limitada, y su producción requiere de uso de tierra de alta calidad, fertilizantes y agua que generan impactos económicos y ambientales. La celulosa es la biomolécula más abundante del planeta y el principal componente de la materia lignocelulósica, es químicamente muy similar al almidón ya que se compone exclusivamente de monómeros de glucosa, y puede ser utilizada como reemplazo del almidón en dietas animales. Además, la producción de materia lignocelulósica con alto contenido de celulosa tiene menos requerimientos de suelo y nutrientes que los cultivos ricos en almidón, e incluso representa un subproducto del cultivo de éstos. Sin embargo, los animales monogástricos no son capaces de utilizar la celulosa como fuente de energía debido a que carecen de las enzimas necesarias para digerirla.

Las celulasas son enzimas que se encargan de la degradación de la celulosa hasta sus monómeros de glucosa y se clasifican en endo- $\beta$ -1.4-glucanasas, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas. Las  $\beta$ -glucosidasas convierten celo-oligómeros generados por las endo- $\beta$ -1.4-glucanasas y celobiohidrolasas en monómeros de glucosa. Estas enzimas se utilizan actualmente para la producción de etanol a partir de lignocelulosa y en la industria de bebidas como potenciadores del sabor y aroma de vinos, jugos y té. Las  $\beta$ -glucosidasas tienen además el potencial de ser utilizadas en nutrición animal, ya que pueden ayudar a mejorar la digestión y aprovechamiento de la celulosa en animales monogástricos si se utilizan en conjunto con otras celulasas.

Para ser útiles en nutrición animal y en otras aplicaciones industriales como la producción de bioetanol, las  $\beta$ -glucosidasas necesitan contar con propiedades como alta actividad específica, resistencia a inhibición por producto, termoestabilidad, entre otras. Sin embargo, las  $\beta$ -glucosidasas actualmente utilizadas comercialmente en la industria no presentan estas características. Por esta razón, en la actualidad se lleva a cabo investigación para encontrar nuevas  $\beta$ -glucosidasas con propiedades atractivas para su aplicación en la industria, ya sea mediante ingeniería de proteínas o mediante la búsqueda de nuevas  $\beta$ -glucosidasas en la naturaleza.

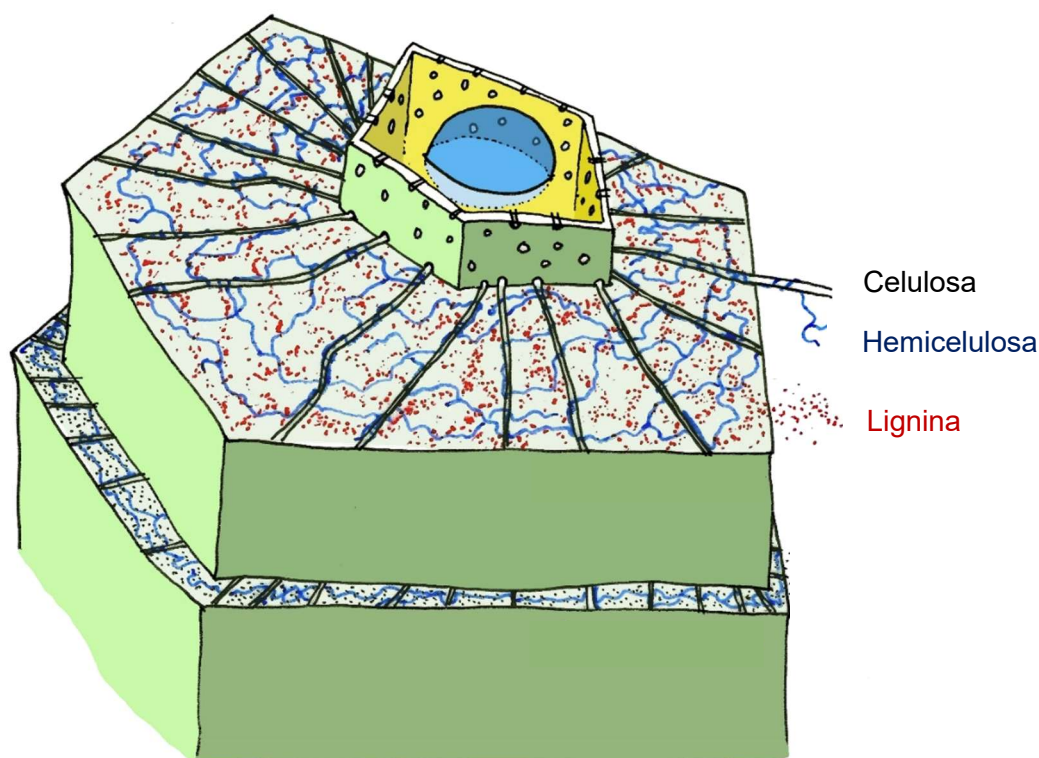
La tecnología de proteínas recombinantes es una estrategia para la producción de enzimas de relevancia industrial que no pueden ser producidas fácilmente en gran escala en los organismos nativos. Actualmente ya se han producido numerosas  $\beta$ -glucosidasas utilizando esta estrategia. *Pichia pastoris* es uno de los organismos más utilizados para la producción de proteínas recombinantes debido a una serie de propiedades que incluyen sus altos niveles de producción, facilidad de manejo y menor costo de producción que los sistemas eucariotas superiores. En este trabajo se seleccionó una  $\beta$ -glucosidasa con propiedades atractivas para su uso en nutrición animal, se produjo en *P. pastoris* y se evaluó si conserva sus propiedades por las que fue seleccionada al producirse de forma recombinante.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. La materia lignocelulósica y su posible aprovechamiento para nutrición animal

#### 2.1.1. Composición de la materia lignocelulósica

La materia lignocelulósica, también llamada lignocelulosa, es el conjunto de componentes poliméricos producidos por las plantas como materia estructural; se localiza principalmente en la pared celular vegetal y está compuesta mayoritariamente por los polímeros celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 1) (Chen 2014).



**Figura 1.** Esquematación de la composición de la materia lignocelulósica en la pared celular vegetal. Adaptado de un trabajo original de Caroline Dahl con licencia CC-BY-SA 3.0.

La lignina es un heteropolímero aromático insoluble complejo, compuesto principalmente por unidades modificadas de polifenilpropano unidas por enlaces éster y carbono-carbono; su composición es muy variable y algunos de sus monómeros más comunes son el alcohol coumeril, alcohol sinapil y alcohol coniferil (Bugg et al. 2011; Chen 2014). La lignina representa entre un 10 y 35% del peso seco de la lignocelulosa, siendo este porcentaje más alto en maderas (Bugg et al. 2011).

La hemicelulosa es un heteropolisacárido corto (menos de 200 monómeros por molécula), parcialmente soluble y altamente ramificado, compuesto por pentosas y hexosas como la xilosa, arabinosa, manosa, galactosa y glucosa (Lee et al. 2007). La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante del planeta y ocupa un 20-40% del peso seco de la lignocelulosa (Liu et al. 2010). La hemicelulosa suele clasificarse en los distintos polisacáridos que la componen, como el xilano, el  $\beta$ -1,3(4)-glucano, los arabinoxilanos, entre otros. El xilano es el principal componente de la hemicelulosa y está presente en la mayoría de las células vegetales, mientras que el  $\beta$ -1,3(4)-glucano es abundante en granos para alimentación animal como la cebada, y los arabinoxilanos son abundantes en cutículas de granos como trigo, maíz y cebada (Liu 2011; Oscarsson et al. 1996).

La celulosa es el principal componente de la lignocelulosa y la biomolécula más abundante del planeta. Es un polímero conformado exclusivamente por monómeros de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos. Cada cadena contiene desde algunos cientos hasta decenas de miles de residuos de glucosa y puede formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares (Chen 2014). La celulosa conforma un 30-55% de la lignocelulosa, aunque puede llegar a ser >90% en algunas especies de plantas (Barbosa et al. 2008; Blasi et al. 2000; Lee et al. 2007).

### **2.1.2. Aprovechamiento potencial de la materia lignocelulósica para nutrición animal**

La materia lignocelulósica es el componente orgánico más abundante del planeta: representa ~50% de la biomasa total mundial (Srivastava et al. 2015) y su producción global es de cerca de  $180 \times 10^9$  toneladas anuales, de las cuales sólo alrededor de  $7 \times 10^9$  son aprovechadas como alimento y energía (Dahmen et al. 2018). Además, se calcula que al año se producen  $4.6 \times 10^9$  toneladas de materia lignocelulósica como subproducto de la agricultura, de los cuales se aprovecha menos del 25% (Dahmen et al. 2018; Kim y Dale, 2004).

Tradicionalmente, la materia lignocelulósica se ha empleado para la generación de calor, como material de construcción y para la fabricación de papel y fibras; sin embargo, desde hace tiempo han surgido alternativas para su aprovechamiento, siendo la producción de etanol a partir de hemicelulosa y celulosa, también llamado bioetanol de segunda

generación, la de mayor importancia (Srivastava et al. 2015). Sin embargo, esta tecnología aún es ineficiente y tiene poca relevancia económica, ya que la producción global de etanol a partir de lignocelulosa fue de sólo 38 millones de litros en el 2018, (Zhang 2019). En contraste, la producción de etanol a partir de cultivos ricos en azúcares y almidón como el maíz o la caña de azúcar, también denominado bioetanol de primera generación, fue de 120,000 millones de litros en el 2017 (OECD/FAO 2018).

Una potencial alternativa a la producción de bioetanol para el aprovechamiento de la materia lignocelulósica es su uso en nutrición de animales monogástricos de granja como el cerdo y el pollo. Tradicionalmente, las dietas para este tipo de animales se componen en un 60-65% de maíz u otros granos ricos en almidón, teniendo este carbohidrato un aporte del 50-60% del contenido calórico de la dieta (Bedford y Partridge 2010). La celulosa es una biomolécula químicamente similar al almidón: ambos son polisacáridos compuestos exclusivamente de glucosa y cuentan con la misma energía química potencial, aunque el almidón presenta otro tipo de enlace y ramificaciones que lo hacen más susceptible a la degradación química y enzimática (Chen 2014; You et al. 2013).

Debido a sus similitudes químicas con el almidón, la celulosa presente en la materia lignocelulósica es una biomolécula viable para reemplazar a este polisacárido en dietas de animales monogástricos. Además, la lignocelulosa tiene una producción anual ~40 veces mayor a la de los cultivos ricos en almidón, así como menores requerimientos de fertilizantes, pesticidas, agua y calidad de suelo para su producción (You et al. 2013). Sin embargo, los polímeros de hemicelulosa y celulosa de la materia lignocelulósica no son digeridos por animales monogástricos de granja, por lo que tienen poco aporte energético y ocasionan problemas en el animal como bloqueo del tráfico intestinal debido a la viscosidad (Bedford y Partridge 2010).

En los últimos años han surgido alternativas para utilizar la materia lignocelulósica como reemplazo de granos ricos en almidón en dietas de animales de granja mediante el uso de enzimas digestivas que permitan el aprovechamiento de la celulosa. Cabe señalar que, si bien la suplementación del alimento con enzimas digestivas es una práctica típica en nutrición animal, ésta se enfoca en mejorar de la digestibilidad de las dietas típicas y no en explorar el uso de materia lignocelulósica como fuente de alimento (Bedford y



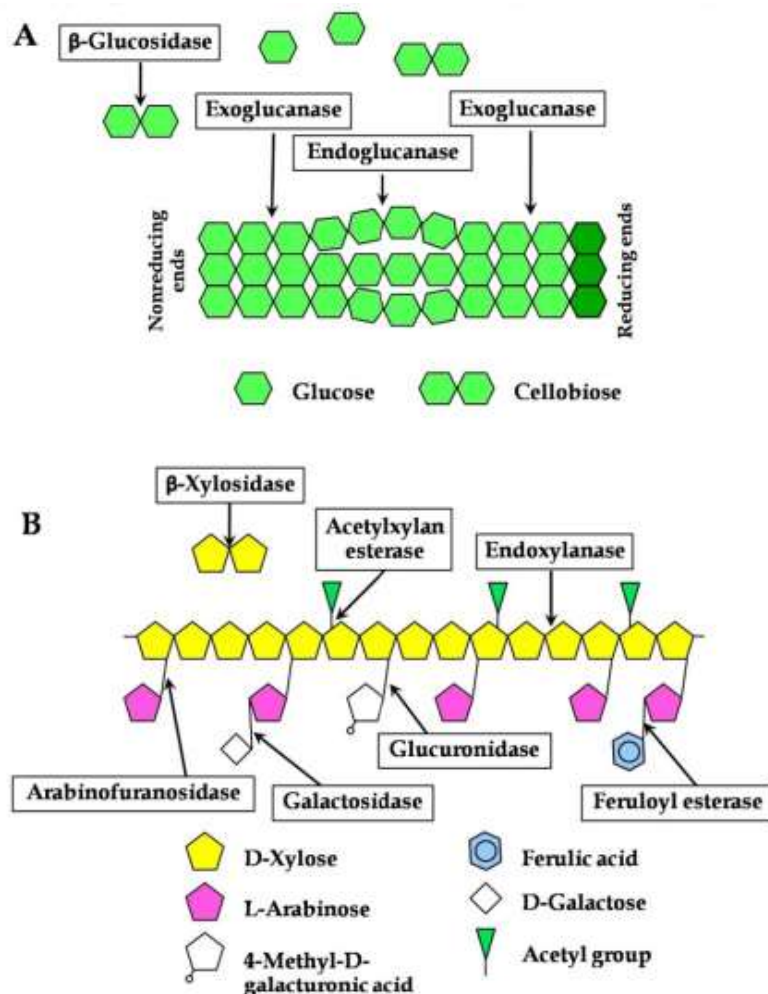
Partridge, 2010). You et al. (2013) crearon un sistema para transformar enzimáticamente la celulosa a almidón asimilable por animales monogástricos, aunque este proceso es caro y requiere largos tiempos de procesamiento. Por su parte, Huang et al. (2013) crearon un ratón transgénico capaz de secretar dos enzimas celulasas en su tracto digestivo, las cuales pueden ayudar a digerir la celulosa y utilizarla como fuente de energía. Además, diversos autores han construido cepas recombinantes de bacterias ácido-lácticas que expresan al menos una celulasa y las han utilizado como probiótico para aves. Zhou et al. (2015) expresaron una celulasa en *Lactococcus lactis* y lograron mejorar la digestión de fibra en gansos alimentados con rastrojo de maíz al suplementar con la cepa productora de celulasa. Por su parte, Li et al. (2012; 2014) construyeron una cepa recombinante de *Lactobacillus reuteri* que co-expresa una hemicelulasa y una celulasa y lograron incrementar el aumento de peso en pollos suplementados con esta cepa siguiendo una dieta a base de cebada y trigo. A pesar de estos avances, el aprovechamiento de la materia lignocelulósica como fuente de alimento en nutrición animal es un campo poco estudiado, por lo que se requiere de nuevas estrategias para aprovechar esta materia prima para esta aplicación.

## **2.2. Las enzimas fibrolíticas**

Las enzimas fibrolíticas son enzimas que degradan los polímeros de la materia lignocelulósica. La mayoría de ellas son glucósido hidrolasas, las cuales catalizan la ruptura de enlaces glucosídicos utilizando una molécula de agua, aunque las enzimas que participan en la degradación de la lignina por lo general son oxidoreductasas (Ni y Tokuda 2013).

Las enzimas fibrolíticas pueden clasificarse por su actividad enzimática o bien en familias. La clasificación por actividad enzimática está dada por el número E.C., el cual indica la reacción química catalizada por la enzima, mientras que la clasificación por familias se basa en similitudes en su secuencia aminoacídica y estructura terciaria. La base de datos de enzimas activas en carbohidratos (CAZy, por sus siglas en inglés: <http://www.cazy.org/>) reporta a la fecha más de 160 familias de este tipo de enzimas (Lombard et al. 2014).

Para la degradación de la materia lignocelulósica se requiere de la participación sinérgica de un conjunto de enzimas fibrolíticas. En el caso de la celulosa, que es el componente mayoritario de la lignocelulosa, tres enzimas llevan a cabo su degradación completa hasta monómeros de glucosa: endo- $\beta$ -1,4-glucanasa (E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolasa (E.C. 3.2.1.91 y E.C. 3.2.1.176) y  $\beta$ -glucosidasa (E.C. 3.2.1.4) (Figura 2a). Por su parte, se requiere de la acción conjunta de al menos siete enzimas distintas para la degradación completa del xilano presente en la hemicelulosa, siendo las principales la endo-1,4-xilanasa (E.C. 3.2.1.8) y la 1-4- $\beta$ -xilosidasa (E.C. 3.2.1.37) (Figura 2b). Además, enzimas adicionales se requieren para la degradación de otros componentes de la materia lignocelulósica, como ligninasas, pectinasas y otros tipos de hemicelulasas (Ni y Tokuda 2013; Ratanakhanokchai et al. 2013).



**Figura 2.** Representación enzimática de las enzimas involucradas en la degradación de **a)** celulosa y **b)** xilano. Tomado de Ratanakhanokchai et al. 2013.

### 2.2.1. Las celulasas

Se conoce como celulasas al conjunto de enzimas fibrolíticas que participan en la degradación de la celulosa. Generalmente se reconoce a tres tipos de enzimas con el término de celulasas: endo- $\beta$ -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolasas (E.C. 3.2.1.91 y E.C. 3.2.1.176) y  $\beta$ -glucosidasas (E.C. 3.2.1.4).

Las endo- $\beta$ -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.4), también llamadas endoglucanasas o endocelulasas, hidrolizan enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos internos de moléculas de celulosa y generan como producto principal celobiosa, aunque también pueden producir glucosa, celotriosa, celotetraosa y otros celo-oligómeros en menor proporción (Tsuji et al. 2012; Ueda et al. 2014) (Figura 2a). Las endo- $\beta$ -1,4-glucanasas suelen ser enzimas monoméricas de menos de 60 kDa, se distribuyen principalmente en las familias GH5, GH9, GH12 y GH45 de la clasificación de CAZy (<http://www.cazy.org/>) y están presentes en diversos organismos como bacterias, hongos, insectos, moluscos, nemátodos y plantas (Lombard et al. 2014).

Las celobiohidrolasas o exocelulasas son enzimas procesivas que liberan residuos de celobiosa a partir del extremo reductor (E.C. 3.2.1.176) o no reductor (E.C. 3.2.1.91) de una molécula de celulosa a través de la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos (Boonvitthya et al. 2013) (Figura 2a). Estas enzimas presentan masas moleculares de 40-70 kDa y cuentan con dominios de unión a carbohidrato que favorecen la unión a la celulosa (Lee et al. 2000). Las celobiohidrolasas se distribuyen principalmente en las familias GH6 y GH7 de la clasificación de CAZy (<http://www.cazy.org/>) y hasta la fecha sólo se han encontrado en bacterias, hongos y protozoarios (Sethi et al. 2013).

Las  $\beta$ -glucosidasas (E.C. 3.2.1.4), también denominadas celobiasas, producen glucosa a través del rompimiento de enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos de moléculas de celobiosa y otros celo-oligómeros generados por las endo- $\beta$ -1,4-glucanasas y celobiohidrolasas (Scharf et al. 2011; Uchiyama et al. 2015) (Figura 2a). Estas enzimas pueden ser monoméricas u homomultiméricas, se clasifican principalmente en las familias GH1 y GH3 y están ampliamente distribuidas en la naturaleza (Lombard et al. 2014).

## 2.3. Las $\beta$ -glucosidasas y su potencial para aplicarse en nutrición animal

### 2.3.1. Funciones y clasificación de las $\beta$ -glucosidasas

Las  $\beta$ -glucosidasas (E.C. 3.2.1.4) son glucósido hidrolasas que se encargan de la hidrólisis de residuos terminales no reductores de  $\beta$ -D-glucosa con la liberación de  $\beta$ -D-glucosa (Jeske et al. 2019). Las  $\beta$ -glucosidasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y su función principal es la de realizar el paso final de la digestión de la celulosa, convirtiendo celobiosa y otros celo-oligómeros generados por las celobiohidrolasas y endo- $\beta$ -1.4-glucanasas en glucosa asimilable para los organismos que se alimentan de celulosa (Singh et al. 2016).

Además de su función en la digestión de celulosa, las  $\beta$ -glucosidasas están involucradas en numerosos procesos. En insectos, las  $\beta$ -glucosidasas contribuyen a la defensa contra patógenos (Scharf et al. 2010) y a la comunicación mediada por feromonas (Zhang et al. 2012b). La  $\beta$ -glucosidasa *Neofem2* de la termita *Cryptotermes secundus* es esencial para el mantenimiento de las reinas y está involucrada en la producción de feromonas que suprimen la reproducción en trabajadores (Korb et al. 2009). Por su parte, la  $\beta$ -glucosidasa *Lma-p72* de la cucaracha *Leucophaea maderae* está involucrada en la producción de feromonas sexuales en machos (Cornette et al. 2003). En plantas, las  $\beta$ -glucosidasas participan en procesos fisiológicos como la lignificación de la pared celular, la degradación del endospermo durante la germinación, la activación de fitohormonas y la activación de compuestos de defensa contra patógenos y depredadores (Morant et al, 2008). En hongos fitopatógenos, las  $\beta$ -glucosidasas contribuyen a la colonización del tejido vegetal mediante la hidrólisis de compuestos de defensa de la planta como las saponinas (Collins et al. 2007). En humanos y otros mamíferos no se conoce con claridad la función de las  $\beta$ -glucosidasas; sin embargo, se cree que la  $\beta$ -glucosidasa citosólica de humano contribuye a la detoxificación de diversos compuestos vegetales como fitoestrógenos, flavonoides, cianógenos y compuestos fenólicos simples (Berrin et al. 2002).

Las  $\beta$ -glucosidasas se clasifican con base en su secuencia aminoacídica y similitud estructural en familias de glucósido hidrolasas. A la fecha, existen propuestas 165 familias de glucósido hidrolasas en la base de datos de enzimas activas en carbohidratos CAZy

(<http://www.cazy.org/>), de las cuales las familias GH1, GH2, GH3, GH5, GH9, GH16, GH30, GH39 y GH116 contienen miembros con actividad de  $\beta$ -glucosidasa. La mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas caracterizadas a la fecha pertenecen a las familias GH1 y GH3. Las  $\beta$ -glucosidasas GH1 se caracterizan por presentar un único dominio con estructura de barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, son monoméricas u homomultiméricas con masa molecular en su forma monomérica de alrededor de 50-60 kDa y están ampliamente distribuidas en la naturaleza (Jeng et al. 2011), mientras que las  $\beta$ -glucosidasas GH3 presentan estructuras variables con uno o dos dominios, masas moleculares alrededor de 70-90 kDa y están principalmente distribuidas en hongos (Sørensen et al. 2013).

### **2.3.2. Aplicaciones industriales de las $\beta$ -glucosidasas**

Las  $\beta$ -glucosidasas tienen distintas aplicaciones industriales. A la fecha, la aplicación con mayor relevancia de estas enzimas es en la sacarificación de la materia lignocelulósica durante la producción de bioetanol. Las  $\beta$ -glucosidasas contribuyen a la sacarificación de la celulosa actuando sobre celobiosa y otros celo-oligosacáridos generados por las celobiohidrolasas y endo- $\beta$ -1.4-glucanasas de dos formas: primero, liberan glucosa fermentable para la siguiente fase del proceso y segundo, ayudan a disminuir el efecto inhibitorio de la celobiosa sobre las celobiohidrolasas y endo- $\beta$ -1.4-glucanasas (Uchiyama et al. 2015). Las  $\beta$ -glucosidasas más empleadas a la fecha para la sacarificación de materia lignocelulósica pertenecen a hongos de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*, siendo la preparación Novozyme 188 de *A. niger* y las preparaciones Celic CTec1, 2 y 3 de *Trichoderma* spp. de las más utilizadas comercialmente (Li et al. 2017; Rosales-Calderon et al. 2014; Zhang 2019).

Las  $\beta$ -glucosidasas también tienen aplicaciones en otras industrias, en especial como potenciadoras del sabor y olor de bebidas. En la fabricación de vino, las  $\beta$ -glucosidasas son utilizadas para liberar monoterpenoles de la uva, los cuales contribuyen al sabor (Riou et al. 1998). Preparaciones comerciales de  $\beta$ -glucosidasas de *A. niger* como Lallzyme Beta y Scottzyme BG son utilizadas comercialmente para la fabricación de vino. En la fabricación de jugos de cítricos, las  $\beta$ -glucosidasas contribuyen en la reducción del sabor amargo mediante la degradación del flavonoide naringina (Riou et al. 1998; Singh et al. 2016). En la fabricación de té, las  $\beta$ -glucosidasas liberan monoterpenos y distintas

agliconas de flavonoides que contribuyen a potenciar el aroma y aumentar el potencial antioxidante de la bebida (Şener 2015; Singh et al. 2016). Además, las  $\beta$ -glucosidasas pueden emplearse para la síntesis enzimática de oligosacáridos con propiedades terapéuticas y de detergentes alquil poliglucósidos (Singh et al. 2016).

Una potencial aplicación industrial más de las  $\beta$ -glucosidasas es en nutrición animal, ya que pueden ayudar a mejorar la digestión y aprovechamiento de celulosa y algunos tipos de hemicelulosa en animales monogástricos cuando se utilizan en conjunto con otras celulasas (Singh et al. 2016). Qian y Sun (2009) estudiaron el efecto de la suplementación de dietas para pollo con  $\beta$ -glucosidasa y encontraron un mayor aumento de peso y mayor tasa de conversión alimenticia en los animales, aunque este estudio se centró en mejorar la biodisponibilidad de isoflavonas de la soya. Otros autores han estudiado el efecto de la suplementación con celulasas en animales monogástricos alimentados con dietas ricas en celulosa, ya sea añadiendo las enzimas directamente al alimento o por medio de probióticos. Zulkarnain et al. (2017) estudiaron el desempeño de pollos alimentados con una dieta rica en residuos agrícolas de palma de sagú suplementados con celulasa. Por su parte, Zhou et al. (2015) incrementaron el aumento de peso en gansos alimentados con una dieta rica en rastrojo de maíz mediante la suplementación con una endo- $\beta$ -1.4-glucanasa entregada por medio de un probiótico recombinante. Sin embargo, estos estudios no consideraron la adición de una  $\beta$ -glucosidasa, la cual tiene el potencial de mejorar el efecto de las endo- $\beta$ -1.4-glucanasas en la digestión de celulosa en animales monogástricos mediante la liberación de glucosa aprovechable por el animal.

### **2.3.3. Características ideales de $\beta$ -glucosidasas para su aplicación en nutrición animal y otras industrias**

Todas las enzimas deben de contar con características que las hagan atractivas para su utilización en aplicaciones industriales. En el caso de las  $\beta$ -glucosidasas, las características más importantes para su aplicación en la producción de etanol lignocelulósico son una alta actividad específica (Zhang et al. 2006; Viikari et al. 2007) y resistencia a inhibición por producto (glucosa) (Uchima et al. 2012; Uchiyama et al. 2015). Sin embargo, la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas conocidas hasta la fecha presentan inhibición por glucosa o bien resistencia a la inhibición por glucosa pero baja actividad

específica, incluyendo las enzimas más prevalentes en la industria, provenientes de hongos del género *Aspergillus* (Li et al. 2017; Uchiyama et al. 2015). Por su parte, las enzimas para nutrición animal deben de presentar una alta actividad específica a las condiciones del tracto digestivo animal, resistencia a inhibición por producto, estabilidad térmica para resistir los procesos de pelletizado del alimento, resistencia a la degradación por proteasas digestivas y estabilidad en el rango de pH de los distintos compartimentos del sistema digestivo de los animales (Amerah et al. 2011; Ravindran 2013). Debido a que la temperatura típica del tracto digestivo de aves y cerdos es cercana a 40°C y el pH en el intestino delgado de estos animales es entre 5.5 y 6.5, una alta actividad específica bajo estas condiciones es importante en enzimas para nutrición animal (Ravindran 2013).

En la actualidad se lleva a cabo investigación para obtener  $\beta$ -glucosidasas con características atractivas para su aplicación en industria. Para ello, se utilizan dos estrategias: mejora de las propiedades de  $\beta$ -glucosidasas ya conocidas mediante ingeniería de proteínas y búsqueda de nuevas  $\beta$ -glucosidasas en la naturaleza. Lee et al. (2012) incrementaron la temperatura de desnaturalización en 7°C y la actividad específica en un factor de 6.9 veces de una  $\beta$ -glucosidasa del hongo *Trichoderma reesei* mediante la modificación de dos aminoácidos. Por su parte, Cao et al. (2015) incrementaron la vida media a 50°C de una  $\beta$ -glucosidasa resistente a glucosa de 1 a 48 h mediante la sustitución de tres aminoácidos. La búsqueda de nuevas enzimas en la naturaleza ha permitido encontrar  $\beta$ -glucosidasas resistentes a inhibición por glucosa con constantes de inhibición ( $K_i$ ) mayores a 1 M (Cao et al. 2015; Riou et al. 1998; Uchiyama et al. 2015), mucho mayores que la  $\beta$ -glucosidasa de *Aspergillus niger* de la preparación comercial Novozyme 188, la cual es fuertemente inhibida por glucosa con una  $K_i$  de 3 mM (Dekker 1986). A su vez, esta búsqueda ha permitido encontrar  $\beta$ -glucosidasas con actividad específica mayor a 1,000 U/mg (Li et al. 2017) o estables a temperaturas de hasta 70°C (Harnpicharnchai et al. 2009; Liu et al. 2012).

#### **2.3.4. Expresión heteróloga de $\beta$ -glucosidasas**

La mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas utilizadas actualmente en la industria son producidas de forma no recombinante en hongos de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus*, como los productos Novozyme 188, Cellic CTec y Celluclast de Novozymes. Sin embargo, las

preparaciones Accellerase 1500 de Genencore son preparadas a partir de una cepa recombinante de *T. reesei* sobreproductora de una  $\beta$ -glucosidasa de otra cepa de la misma especie (Barnett et al. 1991).

La expresión heteróloga de  $\beta$ -glucosidasas con propiedades atractivas para su aplicación industrial provenientes de organismos distintos a *Trichoderma* y *Aspergillus* es una alternativa para obtener  $\beta$ -glucosidasas para la industria. En especial esta estrategia es útil para producir  $\beta$ -glucosidasas con propiedades atractivas de organismos de los cuales no se puede obtener grandes cantidades de enzima de forma nativa (Uchima et al. 2012). Numerosas  $\beta$ -glucosidasas, principalmente de las familias GH1 y GH3, de distintos orígenes como bacterias (Yang et al. 2015), hongos (Harnpicharnchai et al. 2009), insectos (Byeon et al. 2005) y mamíferos (Berrin et al. 2002) han sido producidas de forma recombinante en hospederos como *Escherichia coli* (Jeng et al. 2011), *Pichia pastoris* (Zhao et al. 2013), células de insecto Sp9 (Scharf et al. 2010) y *Aspergillus oryzae* (Uchima et al. 2011) y son factibles de utilizarse industrialmente.

#### **2.4. *Pichia pastoris* como hospedero para la producción de proteínas recombinantes**

*Pichia pastoris* (actualmente reclasificada como *Komagataella phaffii* o *K. pastoris*) es una levadura metilotrófica empleada para la producción de proteínas recombinantes. Su uso se ha extendido en los últimos años debido a que posee características atractivas como 1) facilidad de manipulación genética, 2) capacidad de producir y secretar altos niveles (hasta 20 g/L) de proteínas heterólogas, 3) posibilidad de regulación de la expresión de los genes heterólogos a través de promotores fuertes e inducibles, 4) capacidad de realizar modificaciones postraduccionales, 5) crecimiento aerobio, 6) capacidad de producción en cultivos del alta densidad, 7) disponibilidad comercial del sistema de expresión, 8) menor costo de producción de proteínas heterólogas que en eucariotas superiores y 9) estatus como organismo GRAS (Ahmad et al. 2014; Vogl et al. 2013). Numerosas proteínas se han producido de forma recombinante en *P. pastoris*, entre las cuales destacan ocriplasma, un derivado trunco del microplasminógeno humano, y glargina, un análogo de la insulina humana, las cuales se encuentran aprobadas por la FDA y son comercializadas como agentes terapéuticos (Vogl et al. 2013).



El sistema de expresión de genes heterólogos en *P. pastoris* se basa en vectores y cepas modificadas capaces de integrar los vectores en su genoma de manera sitio-dirigida (Cereghino y Cregg 2000). Los vectores para la expresión de genes heterólogos en *P. pastoris* son plásmidos lanzadera *E. coli-P. pastoris* que se componen de un promotor, una señal de secreción de la proteína, un terminador transcripcional, sitios de clonación, sitios de homología para la integración y un marcador de selección para *P. pastoris*, además de un origen de replicación y un marcador de selección para *E. coli* (Ahmad et al. 2014). La mayoría de estos vectores utilizan el promotor y terminador del gen *AOX1* para permitir la regulación de la expresión del gen heterólogo. El promotor del gen *AOX1* se reprime en la presencia de glucosa o glicerol y se induce fuertemente con la adición de metanol, permitiendo generar biomasa y producir la proteína heteróloga de forma independiente. Otros promotores alternativos, como el del gen *GAP*, permiten la expresión constitutiva del gen heterólogo (Ahmad et al. 2014; Cereghino y Cregg 2000). La mayoría de los vectores contienen además una secuencia que codifica para la secuencia señal del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual favorece la secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo (Sreekrishna 2002).

Las cepas de *P. pastoris* empleadas como hospedero para la producción de proteínas recombinantes derivan de las cepas nativas NRRL Y-11430 (ATCC 76273) y X-33. La mayoría de estas cepas contienen una mutación en el gen *HIS4* que codifica para la histidinol deshidrogenasa, lo cual las hace auxotróficas a histidina y permite la selección por recuperación de la prototrofia (Cereghino y Cregg 2000). Dos de las cepas más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* son GS115 y KM71. La cepa GS115 presenta el fenotipo Mut<sup>+</sup>, el cual indica que es capaz de metabolizar metanol de forma idéntica a la silvestre al tener activos los genes *AOX1* y *AOX2*. La cepa KM71, en cambio, presenta el fenotipo Mus<sup>s</sup>, el cual indica que metaboliza metanol más lento al tener activo sólo el gen *AOX2* pero no *AOX1*. Si bien no hay un consenso sobre cuál de las cepas es mejor para la producción de proteínas heterólogas, se ha demostrado que las cepas Mus<sup>s</sup> pueden producir niveles mayores de proteínas heterólogas que las Mut<sup>+</sup> en algunos casos (Cereghino y Cregg, 2000; Sreekrishna 2002).

## 2.5. Expresión heteróloga de $\beta$ -glucosidasas en *P. pastoris*

Numerosas  $\beta$ -glucosidasas han sido expresadas de forma heteróloga en *P. pastoris*, las cuales comprenden miembros de las familias GH1 (Uchima et al. 2012) y GH3 (Zhao et al. 2013) y son nativas de diversos organismos como hongos (Karnaouri et al. 2013), insectos (Uchima et al. 2011) y mamíferos (Berrin et al. 2002). En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de  $\beta$ -glucosidasas que ya han sido expresadas en *P. pastoris*. Entre estos ejemplos, la  $\beta$ -glucosidasa G1mgNtBG1 de la termita *Nasutitermes takasagoensis* producida en *P. pastoris* presentó estabilidad a 60°C y resistencia a la inhibición por glucosa, pero baja actividad específica (Uchima et al. 2012). Por su parte, la  $\beta$ -glucosidasa MtBgl3a de *Myceliophthora thermophila* producida en *P. pastoris* presentó estabilidad a 60°C y tolerancia al etanol, aunque fue fuertemente inhibida por glucosa (Karnaouri et al. 2013). La  $\beta$ -glucosidasa PaBG1b de la cucaracha *Panesthia angustipennis spadica* producida en *P. pastoris* presentó alta actividad específica y resistencia a inhibición por glucosa, pero propiedades bioquímicas distintas a la enzima nativa y baja estabilidad a temperaturas mayores a 50°C (Li et al. 2017). En cambio, la  $\beta$ -glucosidasa BG13 de *Aspergillus fumigatus* Z5 producida en *P. pastoris* presentó propiedades similares a la enzima nativa, pero mostró baja actividad específica (Liu et al., 2012).

**Tabla 1.** Ejemplos de  $\beta$ -glucosidasas expresadas en *P. pastoris*.

Organismo	Grupo taxonómico	Familia	Referencia
<i>Homo sapiens</i>	Mamífero	GH1	Berrin et al. 2002
<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	Insecto	GH1	Uchima et al. 2012
<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5	Hongo	GH3	Liu et al. 2012
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Hongo	GH3	Karnaouri et al. 2013
<i>Periconia sp.</i>	Hongo	GH3	Harnpicharnchai et al. 2009
<i>Panesthia angustipennis spadica</i>	Insecto	GH1	Li et al. 2017

### 3. JUSTIFICACIÓN

La materia lignocelulósica es una materia prima muy abundante en el planeta y un subproducto de la agricultura. Si bien actualmente se exploran alternativas para su aprovechamiento como la producción de bioetanol, éstas no han sido eficientes hasta ahora. Una alternativa poco explorada hasta la fecha para el aprovechamiento de la materia lignocelulósica es su uso en nutrición de animales monogástricos, y se fundamenta en la similitud química entre la celulosa, que es el componente principal de la materia lignocelulósica, y el almidón, el cual es la principal molécula de aporte energético en dietas actuales de animales monogástricos. Sin embargo, estos animales son incapaces de aprovechar la celulosa como fuente de energía porque carecen de las enzimas necesarias para su digestión.

Las  $\beta$ -glucosidasas son uno de los tres tipos de enzimas necesarias para la degradación de la celulosa y tienen aplicaciones actuales en la producción de bioetanol y en la industria de bebidas, además de su potencial aplicación en nutrición animal. Si bien ya existen preparaciones comerciales de  $\beta$ -glucosidasa, éstas no reúnen las propiedades para poder ser empleadas de forma eficiente en nutrición animal ni en la producción de biocombustibles. En los últimos años se han investigado y reportado nuevas  $\beta$ -glucosidasas, las cuales pueden reunir las propiedades necesarias para su aplicación en nutrición animal, pero es necesario un análisis de éstas para seleccionar las más apropiadas. Además, muchas de estas enzimas no son producidas en grandes cantidades por el organismo nativo, por lo que su producción de forma recombinante utilizando *Pichia pastoris* es una estrategia para obtener grandes cantidades de dichas enzimas.

#### **4. HIPÓTESIS**

Existen  $\beta$ -glucosidasas que presentan propiedades catalíticas atractivas para su aplicación en nutrición animal y, tras su selección, factibles de ser producidas en cepas de *Pichia pastoris* como proteínas heterólogas con las propiedades catalíticas para las que fueron seleccionadas.

## 5. OBJETIVO DEL TRABAJO

### 5.1. Objetivo general

Construir cepas recombinantes de *Pichia pastoris* capaces de producir una  $\beta$ -glucosidasa con el potencial de aplicarse en nutrición animal y caracterizar sus propiedades catalíticas.

### 5.2. Objetivos específicos

1. Seleccionar una enzima  $\beta$ -glucosidasa con propiedades catalíticas atractivas para su potencial uso en nutrición animal.
2. Construir cepas recombinantes de *Pichia pastoris* que expresen una secuencia con actividad  $\beta$ -glucosidasa.
3. Caracterizar bioquímicamente la  $\beta$ -glucosidasa recombinante producida en *Pichia pastoris* y determinar si conserva las propiedades catalíticas necesarias para su aplicación en nutrición animal.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Lugar de trabajo

El trabajo experimental se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) perteneciente al Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

### 6.2. Material biológico y medios de cultivo

*Escherichia coli* JM109 (*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *relA1*, *supE44*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), [F' *traD36*, *proAB*, *laqI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15*]) fue utilizada como hospedero de clonación y subclonación y fue obtenida a partir de conservas del cepario del laboratorio de trabajo. Originalmente esta cepa fue adquirida de Promega (Madison, WI, EUA).

*E. coli* TOP10 pUC57-CfBG fue adquirida de Bio Basic Inc. (Markham, ON, Canadá). Esta cepa contiene el plásmido sintético pUC57-CfBG, el cual consta de una secuencia con codones preferenciales para *Lactobacillus reuteri* que codifica para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *Coptotermes formosanus* (Clave de GenBank: ADB23476) clonada en el vector pUC57 (Anexo 1).

*Pichia pastoris* KM71 (*his4*, *arg4*, *aox1 $\Delta$ ::ARG4*, Mut<sup>S</sup>) fue utilizada como hospedero para la producción de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus*. Esta cepa fue obtenida a partir de conservas del cepario del laboratorio y originalmente adquirida de Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

El plásmido pPIC9TanM fue utilizado para la obtención del vector pPIC9 para la subclonación de la secuencia codificante de Glu1B madura. Este plásmido fue construido previamente en el laboratorio de trabajo y consiste en la secuencia codificante de una tanasa clonada en el vector pPIC9.

Los siguientes medios de cultivo fueron empleados en este trabajo: medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, esterilizado por autoclave), agar LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, agar 10 g/L, esterilizado por autoclave), medio YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 10 g/L, esterilizado por autoclave), agar YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 10 g/L, agar 20 g/L, esterilizado por autoclave), agar RBD (sorbitol 1 M, agar

20 g/L, glucosa 20 g/L, YNB [Sigma] 13.4 g/L, biotina 0.4 mg/L, ácido L-glutámico 50 mg/L, L-metionina 50 mg/L, L-lisina 50 mg/L, L-isoleucina 50 mg/L, componentes esterilizados independientemente por filtración), medio BMG (YNB [Sigma] 13.4 g/L, glicerol 10 g/L y biotina 0.4 mg/L en buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0, componentes esterilizados independientemente por filtración), medio BMM (YNB [Sigma] 13.4 g/L, biotina 0.4 mg/L, metanol 0.75% en buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0, componentes esterilizados independientemente por filtración) y medio SOC (triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, glucosa 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y MgSO<sub>4</sub> 10 mM; glucosa, MgCl<sub>2</sub> y MgSO<sub>4</sub> esterilizados independientemente por filtración y agregados al resto del medio esterilizado por autoclave). Los reactivos para la preparación de estos medios se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), Productos Químicos Monterrey (Monterrey, N.L., México) o Becton Dickinson de México (Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México).

### **6.3. Materiales y equipos**

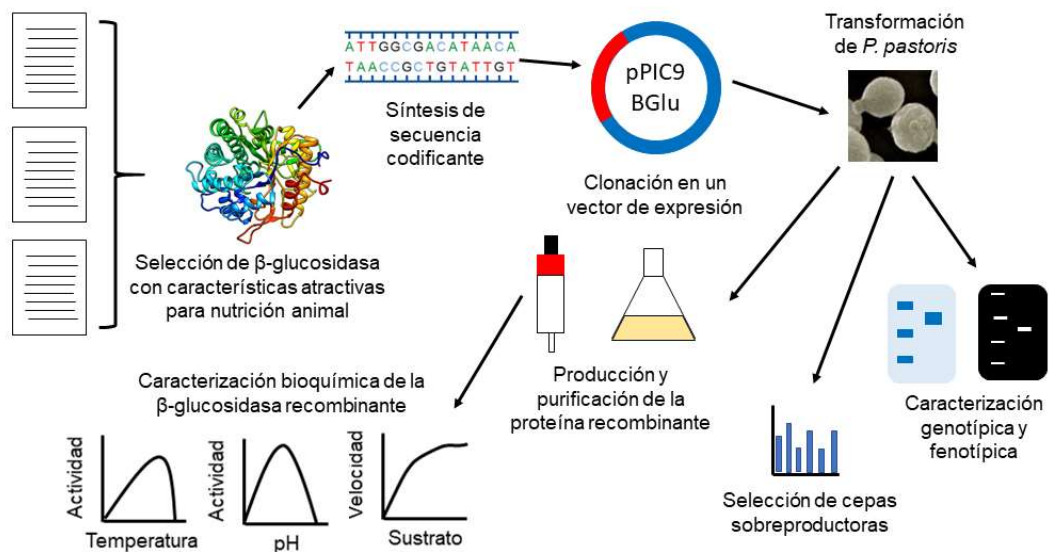
Los oligonucleótidos 5BGluX, 3BGluN, 5CfBG, 3CfBG y 5AOX (Secuencias disponibles en el anexo 2) fueron adquiridos de Integrated DNA Technologies (IDT) (Coralville, IA EUA), eluidos en 1 mL de agua ultrapura estéril y almacenados a -20°C hasta su uso. Se prepararon alícuotas de trabajo a 5 µM para su uso.

Los kits Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, PureYield™ Plasmid Miniprep System y Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, así como los reactivos Green Buffer, Green Buffer Flexi, Colorless Buffer Flexi, GoTaq Green Master Mix, 1 kb DNA Ladder, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, pGEM-T e inserto control, BSA acetilado, agarosa, ligasa T4, buffer de ligación rápida T4, buffer de ligación T4, polimerasa GoTaq Flexi, ribonucleasa RNase ONE, Buffer H y endonucleasa *EcoRI* se adquirieron de Promega (Madison, WI, EUA). Los reactivos Buffer Q5, Buffer G5, Buffer CutSmart, Glycoprotein Denaturing Buffer, la polimerasa Q5, la endoglicosidasa Endo H<sub>f</sub> y las endonucleasas *XhoI* y *NotI* se adquirieron de New England Biolabs (NEB) (Ipswich, MA, EUA). X-Gal, dATP y 1 kb Hypper Ladder fueron obtenidos de Bionline (Boston, MA, EUA). La endonucleasa *SalI* y su Buffer H se adquirieron de TaKaRa (Kusatsu, Shiga, Japón). Las unidades de filtración Amicon Ultra-0.5mL 3K, Amicon Ultra-0.5mL 10K, Amicon Ultra-

4 10K y Microcon-10kDa se adquirieron de Merck Millipore (Burlington, MA, EUA). El reactivo GOPOD forma parte del kit K-GLUC y se obtuvo de Megazyme (Bray, Irlanda). GelRed® Nucleic Acid Gel Stain fue adquirido de Biotium (Fremont, CA, EUA). El fenol saturado se adquirió de Bio Basic Inc. (Markham, ON, Canadá). Las celdas para electroporación y la acrilamida/bisacrilamida fueron obtenidas de Bio-Rad (Hercules, CA, Estados Unidos) y las celdas para espectrofotometría de BRAND GMBH (Wertheim, Alemania).

Los equipos empleados para este trabajo se detallan en el texto.

#### 6.4. Estrategia general



**Figura 3.** Representación esquemática de la estrategia general para la producción y caracterización en *P. pastoris* de una β-glucosidasa con potencial aplicación en nutrición animal.

Se realizó una búsqueda de β-glucosidasas reportadas en la literatura y se eligió una de ellas que presentara propiedades atractivas para su aplicación en nutrición animal, como alta actividad específica a condiciones del tracto digestivo animal y resistencia a inhibición por producto. Posteriormente, una secuencia codificante para la enzima seleccionada se sintetizó y se clonó en un vector de expresión para *P. pastoris* para generar el plásmido pPIC9BGlu. Se transformó *P. pastoris* con este plásmido y las clonas obtenidas se caracterizaron genotípicamente para verificar la presencia del casete de expresión de la secuencia codificante y fenotípicamente para comprobar la producción de



la enzima. Además, se llevó a cabo una selección de clonas de *P. pastoris* sobreproductoras de la enzima recombinante en función de su rendimiento producto/biomasa y de su actividad de  $\beta$ -glucosidasa. La enzima recombinante se purificó y se caracterizó bioquímicamente, para lo cual se midieron propiedades como masa molecular, N-glicosilación, efecto del pH y de la temperatura en la actividad, actividad específica, constantes cinéticas  $K_m$ ,  $k_{cat}$  y  $V_{max}$ , inhibición por glucosa y  $K_i$  y efecto de cationes divalentes en la actividad y en la termoestabilidad (Figura 3).

## **6.5. Selección de una $\beta$ -glucosidasa con propiedades atractivas para su aplicación en nutrición animal**

### **6.5.1. Proceso de selección de una $\beta$ -glucosidasa con propiedades atractivas para su aplicación en nutrición animal**

Se llevó a cabo una búsqueda extensiva en la base de datos de enzimas BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/>) y en literatura científica para encontrar enzimas reportadas con actividad de  $\beta$ -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21). Para las enzimas encontradas a través de la base de datos de BRENDA, se localizó la fuente primaria donde se describen las características de la enzima. Las enzimas encontradas se filtraron, seleccionando aquellas que cumplieran con los siguientes tres criterios: 1) su secuencia aminoacídica completa se ha reportado en al menos una publicación científica y cuenta con una clave de acceso de GenBank, 2) la actividad específica de la enzima purificada se ha determinado en al menos una publicación científica, y 3) la enzima se ha caracterizado bioquímicamente y se cuenta con información sobre su actividad relativa a distintas condiciones de pH y temperatura. Las enzimas que cumplieron con estos criterios se evaluaron con base en los siguientes parámetros:

- 1) Actividad específica. Este valor se obtuvo directamente de las publicaciones originales a partir de la  $V_{max}$  reportada para la enzima purificada en  $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ . En caso de no reportarse  $V_{max}$ , se tomó el valor reportado de actividad específica de la enzima purificada en U/mg. Se consideró mejor a una enzima entre más alta su actividad específica.
- 2) Actividad específica a 40°C y pH 6.0. La actividad específica de cada una de las enzimas se recalculó a las condiciones de 40°C y pH 6.0 para estimar su actividad

en condiciones típicas de temperatura y pH del tracto digestivo de animales monogástricos. Este recálculo se realizó utilizando los datos reportados de actividad relativa a 40°C y pH 6.0 en las publicaciones originales utilizando la siguiente fórmula:  $Act.40^{\circ}CpH6 = Act.Esp. * Act.Rel.40^{\circ}C * Act.Rel.pH6$ , donde  $Act.40^{\circ}CpH6$  representa la actividad específica a 40°C y pH 6.0,  $Act.Esp.$  es la actividad específica de la enzima reportada en las publicaciones originales,  $Act.Rel.40^{\circ}C$  es la actividad relativa de la enzima a 40°C y  $Act.Rel.pH6$  representa la actividad relativa a pH 6.0. Se consideró mejor a una enzima entre más alta su actividad específica a 40°C y pH 6.0.

- 3) Constante de inhibición ( $K_i$ ). por glucosa. Este dato se obtuvo directamente de las publicaciones originales. Se consideró mejor una mayor  $K_i$  por glucosa.
- 4) Rango de pH. Se determinó el rango de pH en el que las enzimas conservan al menos un 30% de su actividad máxima de acuerdo con los datos experimentales reportados en las publicaciones originales. Se consideró mejor una enzima entre más amplio su rango de pH, siempre y cuando abarcara al menos desde 5.0 hasta 7.0, los cuales son comunes en el tracto digestivo de animales.
- 5) Estabilidad térmica. La estabilidad térmica de las enzimas se obtuvo a partir de los datos experimentales de las publicaciones originales. Se investigó la temperatura máxima a la que la enzima puede ser pretratada por 30 min conservando >50% de su actividad.
- 6) Masa molecular. Se determinó la masa molecular teórica y experimental de las enzimas evaluadas. La masa molecular experimental se obtuvo directamente de las publicaciones originales, mientras que la masa molecular teórica se calculó a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína madura. Para ello, primero se determinó la posible presencia de un péptido señal utilizando Signal 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) y este péptido señal se removió de la secuencia para obtener la secuencia aminoacídica de la proteína madura. Esta secuencia se analizó utilizando una herramienta bioinformática en línea ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) para determinar la masa molecular teórica de la enzima. Se consideraron como mejores las enzimas con una masa molecular

teórica <60 kDa y cuya masa molecular experimental en el organismo nativo fuera cercana a la teórica.

- 7) Sitios de N-glicosilación. Se calcularon los sitios potenciales de N-glicosilación en las secuencias aminoacídicas de las enzimas evaluadas utilizando NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Además, se investigó en las publicaciones originales si las enzimas presentan N-glicosilación de acuerdo con los datos experimentales y si estas modificaciones tienen un efecto en la actividad enzimática. Se consideraron como mejores las enzimas con la menor cantidad de sitios potenciales de N-glicosilación y aquellas que no presentan N-glicosilación de acuerdo con datos experimentales. En caso de las enzimas con N-glicosilación comprobada de forma experimental, se consideraron como mejores las enzimas cuya remoción de la glicosilación no tuviera un efecto negativo en la actividad.
- 8) Estructura cuaternaria. Se verificó en las publicaciones originales si se cuenta con información experimental sobre la estructura cuaternaria de las enzimas evaluadas. En caso de conocerse dicha información, se consideraron como mejores las enzimas monoméricas que las poliméricas.
- 9) Expresión heteróloga. Se investigó en literatura científica si las enzimas evaluadas ya han sido producidas de forma heteróloga y si son activas en el hospedero recombinante, en especial aquellas enzimas provenientes de organismos eucariotas. Se consideraron como mejores las enzimas que ya han sido expresadas de forma heteróloga. Dentro de las enzimas provenientes de organismos eucarióticos complejos como animales u hongos filamentosos, se consideraron como mejores aquellas que han sido expresadas y son funcionales en hospederos procariotas o levaduras.

Para realizar la evaluación, primero se ordenaron las enzimas de forma descendente por su actividad específica a 40°C y pH 6.0 y se seleccionaron las cinco con mayor actividad a estas condiciones. Además, las enzimas con mayor actividad específica cuya actividad a 40°C y pH 6.0 no fue posible calcular debido a falta de datos experimentales en las publicaciones originales también fueron consideradas, siempre y cuando la actividad específica hubiera sido medida bajo condiciones cercanas a 40°C y pH 6.0.

Posteriormente, se descartaron las enzimas con una  $K_i$  por glucosa  $<50$  mM. En el caso de las enzimas cuya  $K_i$  por glucosa no se hubiera reportado, se consideraron si presentaban  $>50\%$  de identidad en su secuencia aminoacídica con alguna de las enzimas evaluadas con  $K_i$  por glucosa  $>50$  mM. Después de ello, se descartaron las enzimas poliméricas, aquellas con masa molecular teórica  $>60$  kDa y las que requieren de N-glicosilaciones específicas para el funcionamiento de la proteína de acuerdo con datos experimentales. Las enzimas resultantes se denominaron como preseleccionadas. Posteriormente, las enzimas preseleccionadas se compararon entre sí de acuerdo con los parámetros de evaluación, dando mayor peso a la actividad específica a  $40^\circ\text{C}$  y pH 6.0,  $K_i$  por glucosa, rango de pH, estabilidad térmica y expresión heteróloga en un hospedero procarionta o levadura. Finalmente, se seleccionó la mejor enzima entre las preseleccionadas de acuerdo con los parámetros de evaluación.

### **6.5.2. Análisis computacional de la $\beta$ -glucosidasa seleccionada**

La secuencia aminoacídica de la  $\beta$ -glucosidasa seleccionada (Glu1B de *C. formosanus* (7.1)) fue analizada utilizando herramientas bioinformáticas. Para determinar la secuencia de la proteína madura, la secuencia aminoacídica completa de Glu1B (Clave de GenBank: ADB23476) fue analizada con SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y el péptido señal predicho por este programa fue removido de la secuencia. La estructura tridimensional de Glu1B fue modelada por la técnica de reconocimiento de homología utilizando Phyre<sup>2</sup> (Kelley et al. 2015) a partir de la secuencia de la proteína madura y el modelo producido fue visualizado en el programa USFC Chimera (Pettersen et al. 2004). La estructura tridimensional de Glu1B fue empleada para predecir sus sitios potenciales de N-glicosilación, enlaces disulfuro y punto isoeléctrico como se indica a continuación: Los sitios potenciales de N-glicosilación primeramente se predijeron utilizando NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) y posteriormente se determinó la accesibilidad de estos sitios potenciales de N-glicosilación utilizando el programa bioinformático Swiss-PdbViewer/DeepView 4.1 (Guex y Peitsch 1997). Los enlaces disulfuro se predijeron mediante el cálculo de la distancia entre los átomos de azufre de los residuos de cisteína de Glu1B utilizando USFC Chimera. Una distancia máxima de  $3.0 \text{ \AA}$  fue establecida como umbral para identificar un enlace disulfuro. El punto isoeléctrico de Glu1B madura se calculó con la herramienta H++

(<http://biophysics.cs.vt.edu/uploadpdb.php>) utilizando los parámetros predefinidos a partir de la estructura tridimensional modelada en Phyre<sup>2</sup>.

La secuencia de Glu1B se comparó con las secuencias de todas las  $\beta$ -glucosidasas encontradas en la literatura que cumplieron con los criterios de selección descritos en la sección 6.5.1. Para ello, las secuencias primeramente se clasificaron en las categorías 1)  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH1 provenientes de insecto, 2)  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH1 provenientes de organismos distintos a insectos y 3)  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH3. Las secuencias utilizadas para este análisis se muestran en el anexo 3. Se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas completas utilizando el algoritmo de ClustalW con parámetros predefinidos dentro del programa bioinformático MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>) y se calcularon las distancias y porcentajes de identidad entre ellas. Posteriormente, se construyó un dendrograma sin raíz mediante el método de Neighbor-Joining basado en las distancias entre las secuencias utilizando MEGA X con parámetros predefinidos.

Para el análisis de los aminoácidos funcionales de Glu1B, se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas completas de todas las  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH1 encontradas en la literatura que cumplieron con los criterios de selección descritos en la sección 6.5.1. Estas secuencias se muestran en el anexo 3. El alineamiento se realizó con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y se visualizó en MEGA X. Con base en este alineamiento, se determinaron los aminoácidos catalíticos de Glu1B mediante la identificación de los motivos conservados descritos en la base de datos de enzimas activas en carbohidratos (CAZy) para esta familia de glucósido hidrolasas ([https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_Hydrolase\\_Family\\_1](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_1)). Los aminoácidos del sitio activo de Glu1B se predijeron mediante la comparación de su secuencia con la de una  $\beta$ -glucosidasa GH1 de la termita *Neotermes koshunensis*, la cual ha sido cristalizada en complejo con su sustrato y por ello se conocen los aminoácidos de su sitio activo (Jeng et al. 2011) (Clave de PDB de esta  $\beta$ -glucosidasa unida a celobiosa: 3VIK), y se dividieron en las siguientes categorías: 1) residuos del sitio de unión al glicón (subsito -1), aquellos que se unen la glucosa no reductora de la celobiosa; 2) residuos del sitio de unión al aglicón (subsito +1), aquellos que se unen a la glucosa reductora de la

celobiosa o a la región aglicón de otros sustratos; y 3) residuos de enlace entre residuos de sitios de unión al glicón y/o aglicón. Además, se determinaron los residuos de la entrada del túnel del sitio activo de Glu1B mediante la comparación de su secuencia con la de la  $\beta$ -glucosidasa de *Halothermothrix orenii* (Konar et al. 2019) y se confirmaron con el modelo de la estructura tridimensional de Glu1B. Para la nomenclatura de los aminoácidos funcionales de Glu1B, se consideró la metionina inicial del péptido señal de Glu1B como la posición 1 de la secuencia aminoacídica.

Se realizó un análisis computacional para determinar qué aminoácidos contribuyen a la alta actividad específica sobre celobiosa de Glu1B y de otras  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH1. Para ello, 27 secuencias de  $\beta$ -glucosidasas GH1 encontradas en la literatura que cumplieron con los criterios de selección descritos en la sección 6.5.1 y cuya actividad específica con celobiosa como sustrato a 40°C y pH 6 estaba reportada (o podía ser estimada a partir de datos reportados) se dividieron en tres categorías según el valor de su actividad específica: 1)  $\beta$ -glucosidasas con alta actividad específica sobre celobiosa (>250 U/mg), 2)  $\beta$ -glucosidasas con actividad específica media sobre celobiosa (>10 U/mg <250 U/mg) y 3)  $\beta$ -glucosidasas con baja actividad específica sobre celobiosa (<10 U/mg). La lista de secuencias y su clasificación se muestra en el anexo 3. Se identificaron, mediante correspondencia de residuos con la secuencia de Glu1B en el alineamiento múltiple descrito en el párrafo anterior, los residuos presentes en las posiciones correspondientes a los sitios de unión al glicón, los sitios de unión al aglicón y los residuos de enlace entre residuos de sitios de unión al glicón y/o aglicón en las 27 secuencias anteriores. Posteriormente, se calcularon matrices de frecuencias por posición para cada una de las tres categorías de  $\beta$ -glucosidasas en función de su actividad específica sobre celobiosa (alta, media y baja). Además, se calculó una matriz adicional con la frecuencia de aparición de aminoácidos por posición en todas las 3,842  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH1 depositadas en la base de datos Glutant $\beta$ ase (Mariano et al. 2020). Las matrices de frecuencias obtenidas se visualizaron utilizando WebLogos (Crooks et al. 2004) y la frecuencia de aparición de aminoácidos se comparó por cada posición entre el global de  $\beta$ -glucosidasas GH1 depositadas en Glutant $\beta$ ase y cada categoría de  $\beta$ -glucosidasas en función de su actividad específica sobre celobiosa mediante una prueba de Chi-cuadrada (nivel de significancia de 0.05).

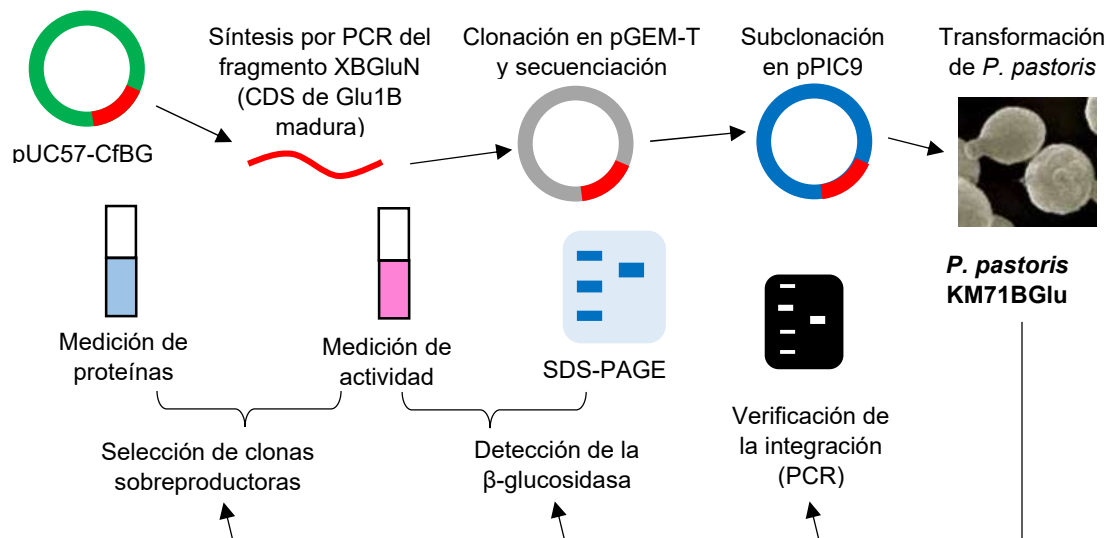
Asimismo, se realizó un análisis computacional para establecer una correlación entre la resistencia a inhibición por glucosa de Glu1B y otras  $\beta$ -glucosidasas de termitas y los aminoácidos presentes en los residuos de la entrada del túnel del sitio activo. Para ello, se calculó una matriz de frecuencia por posición para los residuos de la entrada del túnel del sitio activo con 32 secuencias de  $\beta$ -glucosidasa de termitas reportadas en la base de datos de GenBank (Anexo 4). Los valores de las matrices de frecuencia de 8 posiciones se compararon estadísticamente con la frecuencia de los residuos para cada posición calculada con la información de 3842  $\beta$ -glucosidasas GH1 depositadas en la base de datos Glutansbase (Mariano et al. 2020) usando una prueba de Chi-cuadrada (nivel de significancia de 0.05). También se construyó un dendrograma con las 32 secuencias de  $\beta$ -glucosidasa de termitas usando el programa Clustal Omega con parámetros predeterminados (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) mediante el método neighbor-joining y el dendrograma sin raíz se visualizó con MEGA X (Kumar et al. 2018).

## **6.6. Construcción de cepas de *P. pastoris* productoras la $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *Coptotermes formosanus***

### **6.6.1. Estrategia general**

Para la construcción de cepas de *P. pastoris* productoras de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* se siguió la siguiente estrategia (Figura 4): Primero, el plásmido sintético pUC57-CfBG, el cual contiene una secuencia codificante para Glu1B, se aisló a partir de *E. coli* TOP10 pUC57-CfBG, se propagó en *E. coli* JM109 y se verificó mediante secuenciación. Posteriormente, la secuencia codificante para Glu1B madura se sintetizó mediante PCR de alta fidelidad utilizando el plásmido anterior como molde y se clonó en pGEM-T para verificarse por secuenciación. Posterior a ello, la secuencia codificante para Glu1B madura se subclonó en el vector lanzadera pPIC9 utilizando sitios *XhoI* y *NotI* para generar el plásmido recombinante pIC9BGlu. Este plásmido se empleó para transformar *P. pastoris* KM71, seleccionando por prototrofia a histidina, y se verificó la integración del casete de expresión de Glu1B en clonas transformantes de *P. pastoris* mediante PCR. Las clonas positivas se denominaron *P. pastoris* KM71BGlu. Se realizaron cultivos en lote con metanol como inductor de dos clonas de *P. pastoris* KM71BGlu para comprobar la expresión de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* producida en *P. pastoris* (BGlu) a través de la detección de la actividad enzimática y de la proteína por SDS-PAGE. Por

último, se llevó a cabo una selección de clonas sobreproductoras de BGlu en función al rendimiento producto/biomasa de las proteínas extracelulares totales y a la producción de  $\beta$ -glucosidasa extracelular activa en cultivos en lote con metanol como inductor a partir de 60 clonas.



**Figura 4.** Representación esquemática de la estrategia general para la construcción de cepas de *P. pastoris* productoras la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus*. CDS: secuencia codificante.

### 6.6.2. Verificación de codones de la secuencia codificante de Glu1B para su expresión en *P. pastoris*

Para llevar a cabo la construcción de cepas de *P. pastoris* productoras de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus*, se utilizó como punto de partida la secuencia codificante para Glu1B presente en el plásmido sintético pUC57-CfBG, el cual fue proporcionado por Bio Basic Inc. en la cepa *E. coli* TOP10 pUC57-CfBG. Este plásmido contiene, clonada en el vector pUC57, una secuencia sintética con codones optimizados para *Lactobacillus reuteri* que codifica para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* (Anexo 1). Debido a que el diseño de este gen sintético no consideró la optimización de codones para *P. pastoris* sino para otro organismo, se verificó que los codones fueran apropiados para permitir la expresión de la proteína en *P. pastoris*.



Los codones existentes en la secuencia codificante para Glu1B contenida en el plásmido pUC57-CfBG se compararon con una tabla de frecuencia de uso de codones en *P. pastoris* para genes de alta expresión en condiciones de inducción con metanol (Abad et al. 2010). Se verificó que la mayoría de los codones coincidieran con el codón preferencial de *P. pastoris* para cada aminoácido y que la secuencia no contuviera codones con frecuencia de uso menor a 0.1 en *P. pastoris* en condiciones de inducción con metanol.

### **6.6.3. Aislamiento, caracterización y secuenciación de pUC57-CfBG**

#### **6.6.3.1. Aislamiento de pUC57-CfBG de *E. coli* TOP10 y transformación de *E. coli* JM109 con pUC57-CfBG**

Una conserva de *E. coli* TOP10 pUC57-CfBG fue reactivada en 4 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) a temperatura ambiente con agitación de 250 rpm por ~48 h hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de ~1.0. La temperatura de incubación fue de 27-30°C. Se aisló el plásmido pUC57-CfBG a partir de este cultivo utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando un NanoPhotometer™ Pearl (Implen GmbH) y posteriormente se caracterizó mediante digestión analítica con la endonucleasa *EcoRI* utilizando la reacción descrita en la Tabla 2. La reacción se incubó a 37°C por 2 h y posteriormente se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h 15min), utilizando 2 µL de Green Buffer Flexi 5X (Promega) para el cargado de muestras, 1 µL de 1 kb DNA Ladder (Promega) como marcador de tamaño molecular y 1 µL del plásmido sin digerir como control. El gel se tiñó posteriormente cubriendo con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) 3X en NaCl 100 mM durante 20 min con agitación suave y se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

**Tabla 2.** Mezcla de reacción para la digestión analítica de pUC57-CfBG aislado de *E. coli* TOP10 con la endonucleasa *EcoRI*

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua ultrapura estéril	7.7
Buffer H 10X (Promega)	1.0
BSA acetilada 100X (Promega)	0.1
pUC57-CfBG (95 ng/ $\mu\text{L}$ )	1.0
<i>EcoRI</i> 10 U/ $\mu\text{L}$ (Promega)	0.2
Total	10.0

El plásmido pUC57-CfBG aislado se utilizó para transformar células de *E. coli* JM109 calciocompetentes. Para la preparación de células calciocompetentes, primero se reactivó una conserva de *E. coli* JM109 en 4 mL de medio LB por ~24 h a 37°C y 250 rpm. Después, 50 mL de medio LB se inocularon con 500  $\mu\text{L}$  del cultivo anterior y se incubaron a 37°C y 250 rpm por ~2.5 h hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 0.4-0.5. El cultivo se sumergió en hielo por 10 min y se centrifugó por 5 min a 4,500 rpm a 4°C para obtener el paquete celular. Las células se suspendieron cuidadosamente en 20 mL de  $\text{CaCl}_2$  100 mM frío y se centrifugaron bajo las mismas condiciones. El paquete celular se volvió a suspender en 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  100 mM frío y se mantuvo en hielo por toda la noche a 4°C para después agregar 250  $\mu\text{L}$  de glicerol y dividir en alícuotas de 50  $\mu\text{L}$ . Las células calciocompetentes resultantes se almacenaron a -70°C hasta su uso. Para la transformación, una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de células se mezcló con 200 ng de pUC57-CfBG y la mezcla se incubó 30 min en hielo. Después, la mezcla se sometió a choque térmico a 42°C por 45 s en un baño de agua y se pasó inmediatamente a hielo por 2 min. Se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de medio SOC y la mezcla se incubó por 1.5 h a 24°C a 250 rpm utilizando un ThermoMixer® R (Eppendorf). Posterior a ello, las bacterias se sembraron por extensión en una placa de agar LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y la placa se incubó a temperatura ambiente por ~36 h hasta la aparición de colonias.

#### **6.6.3.2. Caracterización y secuenciación de pUC57-CfBG**

Cuatro colonias seleccionadas al azar y dos de las colonias más pequeñas provenientes de la transformación de *E. coli* JM109 con pUC57-CfBG fueron inoculadas utilizando una puntilla en 4 mL de medio LB e incubadas a temperatura ambiente a 250 rpm por ~12 h.

Después, el ADN plasmídico de las seis colonias se aisló utilizando ya sea el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) para las colonias seleccionadas al azar o bien el kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) para las colonias pequeñas siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido con el kit Wizard® se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando un NanoPhotometer™ Pearl (Implen GmbH). Cada uno de los plásmidos obtenidos se caracterizó mediante digestión analítica con la endonucleasa *EcoRI* de acuerdo con la reacción descrita en la Tabla 3. Las reacciones se incubaron a 37°C por 2 h y posteriormente se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h 15min), utilizando 2 µL de Green Buffer Flexi 5X (Promega) para el cargado de muestras, 1 µL de 1 kb DNA Ladder (Promega) como marcador de tamaño molecular y 1 µL de cada plásmido sin digerir como control. El gel se tiñó posteriormente cubriendo con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) 3X en NaCl 100 mM durante 20-30 min con agitación suave y se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

**Tabla 3.** Mezcla de reacción para las digestiones analíticas de pUC57-CfBG aislado de clonas de *E. coli* JM109 con la endonucleasa *EcoRI*

Reactivo	Volumen (µL)
Agua ultrapura estéril	7.7
Buffer H 10X (Promega)	1.0
BSA acetilada 100X (Promega)	0.1
pUC57-CfBG (82.5-110 ng/µL)	1.0
<i>EcoRI</i> 10 U/µL (Promega)	0.2
Total	10.0

Una de las clonas positivas de acuerdo con el ensayo anterior se seleccionó para la secuenciación de pUC57-CfBG. La clona se cultivó en 4 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) a temperatura ambiente y 250 rpm por ~24 h y el cultivo se empleó para aislar ADN plasmídico utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando el NanoPhotometer™ Pearl (Implen GmbH) y posteriormente se concentró utilizando un concentrador de vacío CentriVap

(Labconco) a una temperatura de 40°C por ~20 min hasta alcanzar una concentración de 150-200 ng/μL. La muestra de ADN resultante se envió para secuenciación con los oligonucleótidos universales M13F y M13R y los oligonucleótidos específicos 5BgluX (5'-TCA CTC GAG AAA AGA GAC GAC GTT GAC AAC GAC A-3') y 5CfBG (5'-TGG GAC CTT CCA CAA AAG CT-3') al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México siguiendo las especificaciones solicitadas.

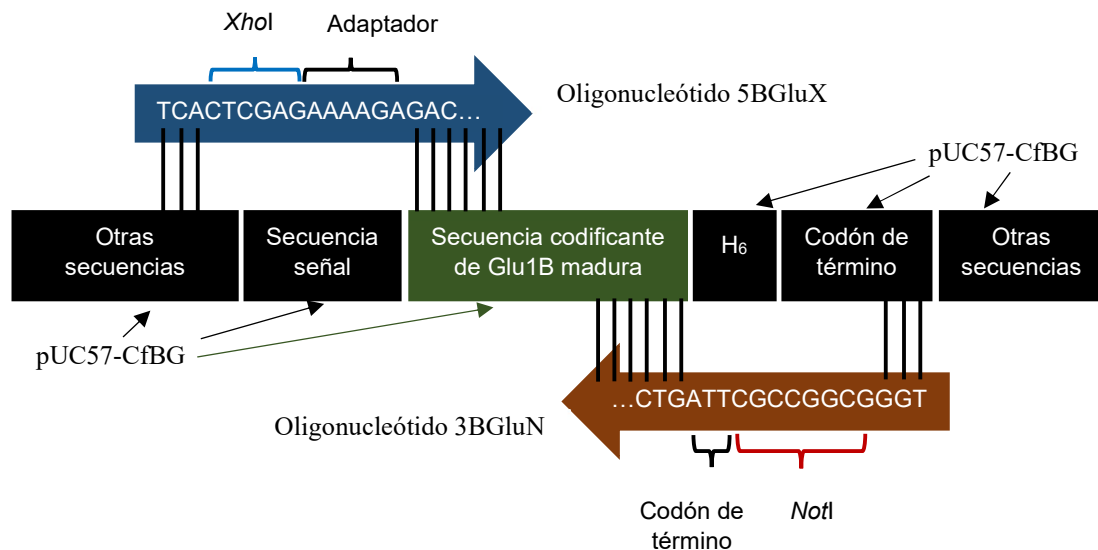
Los archivos de electroferogramas recibidos fueron analizados utilizando los programas bioinformáticos SnapGene Viewer, CAP3 (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>) y Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias se obtuvieron a partir de los electroferogramas utilizando SnapGene Viewer y las regiones terminales con alta densidad de posiciones con niveles de calidad de Phred (Q) menores a 30 se removieron. Las secuencias resultantes se alinearon utilizando el programa CAP3 y el contig resultante se comparó con la secuencia teórica empleando la opción de alineamiento de dos secuencias de Nucleotide Blast con los parámetros predefinidos.

#### **6.6.4. Clonación de la secuencia codificante de Glu1B madura en el vector pGEM-T**

##### **6.6.4.1. Diseño de oligonucleótidos para la síntesis de la secuencia codificante de Glu1B madura**

Para lograr la clonación de la secuencia codificante de la β-glucosidasa Glu1B madura de *C. formosanus* en el vector pGEM-T, primero se diseñaron oligonucleótidos para la síntesis de esta secuencia que permitan su clonación posterior en el vector de expresión para *P. pastoris* pPIC9. Se diseñaron oligonucleótidos utilizando el programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) que flanquearan desde el primer codón codificante para la Glu1B madura sin el péptido señal (oligonucleótido 5') hasta el último codón codificante para la Glu1B madura, sin considerar la secuencia codificante para una cola de histidinas N-terminal presente en pUC57-CfBG ni su adaptador (oligonucleótido 3'). La secuencia de Glu1B madura se determinó previamente mediante la remoción del péptido señal calculado con la herramienta bioinformática SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>). Adicionalmente, al oligonucleótido 5' se le agregó en su extremo 5' una secuencia

(5'-TCA CTC GAG AAA AGA-3') que comprende 1) los nucleótidos TCA para facilitar la hibridación con el ADN blanco, 2) el sitio de restricción CTCGAG para la endonucleasa *XhoI* y 3) la secuencia AAAAGA como adaptador para coincidir con el marco de lectura y con el sitio de corte de Kex2 para la secreción de la proteína en el vector pPIC9. El oligonucleótido finalizado se denominó 5BGluX y su secuencia es 5'-TCA CTC GAG AAA AGA GAC GAC GTT GAC AAC GAC A-3'. Por su parte, al oligonucleótido 3' se le agregó también en su extremo 5' una secuencia (5'-TGG GCG GCC GCT TA-3') que comprende 1) los nucleótidos TGG para facilitar la hibridación con el ADN blanco, 2) el sitio de restricción GCGGCCGC para la endonucleasa *NotI* y 3) el anticodón de término TTA para señalar el fin de la traducción de Glu1B. El oligonucleótido finalizado se denominó 3BGluN y su secuencia es 5'-TGG GCG GCC GCT TAG TCA CGG AAA CGT TCT GG-3'. En la Figura 5 se esquematiza la hibridación de los oligonucleótidos 5BGluX y 3BGluN con la secuencia blanco y las secuencias adicionales que éstos contienen.



**Figura 5.** Esquematización de la hibridación de los oligonucleótidos 5BGluX y 3BGluN en el plásmido sintético pUC57-CfBG. H<sub>6</sub>: secuencia codificante para una cola de histidinas N-terminal.

#### 6.6.4.2. Síntesis de la secuencia codificante de Glu1B madura mediante PCR de alta fidelidad

La secuencia codificante de Glu1B madura fue sintetizada mediante PCR de alta fidelidad empleando los oligonucleótidos 5BGluX (5'-TCA CTC GAG AAA AGA GAC GAC

GTT GAC AAC GAC A-3') y 3BGluN (5'-TGG GCG GCC GCT TAG TCA CGG AAA CGT TCT GG-3') y el plásmido sintético pUC57-CfBG verificado por secuenciación como templado (Sección 6.6.3.2). Esta síntesis se realizó utilizando la polimerasa Q5 Hot Start (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del proveedor. La mezcla de reacción y el programa de termociclador empleados se muestran en la Tabla 4 y Tabla 5. Después de la amplificación, alícuotas de 0.5 y 2  $\mu$ L de la reacción de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h), utilizando 2  $\mu$ L de Green Buffer 5X (Promega) para el cargado de muestras y 1  $\mu$ L de 1 kb DNA Ladder (Promega) como marcador de tamaño molecular. El gel se tiñó posteriormente cubriendo con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) 3X en NaCl 100 mM durante 20 min con agitación suave y se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV. El fragmento de ADN resultante de la reacción de PCR se denominó XBGLuN.

**Tabla 4.** Mezcla de reacción para la síntesis de la secuencia codificante de Glu1B madura mediante PCR de alta fidelidad

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)	Concentración final
Agua ultrapura estéril		-
Buffer Q5 5X (NEB)	5.0	1X
Mezcla de dNTPs 10 mM c/u (Promega)	0.5	0.2 mM
Oligonucleótido 5BGluX (IDT) 5 $\mu$ M	2.5	0.5 $\mu$ M
Oligonucleótido 3BGluN (IDT) 5 $\mu$ M	2.5	0.5 $\mu$ M
Polimerasa Q5 Hot Start 2 U/ $\mu$ L (NEB)	0.25	0.02 U/ $\mu$ L
pUC57-CfBG 1:10,000 en agua (18 pg/ $\mu$ L)	1.0	0.72 pg/ $\mu$ L
Total	25.0	-

**Tabla 5.** Programa de termociclador para la reacción de síntesis de la secuencia codificante de Glu1B madura por PCR

Etapa	Ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	Desnaturalización inicial	98	30 s
		Desnaturalización	98	5 s
2	30	Hibridación	64	20 s
		Extensión	72	45 s
3	1	Extensión final	72	2 min
4	1	Refrigeración	4	Indefinido

El resto del producto de PCR anterior (fragmento XBGlU<sub>N</sub>) se purificó utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN se recuperó finalmente en 50 µL de agua libre de nucleasas. El ADN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando un NanoPhotometer™ Pearl (Implen GmbH) y 1 µL se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h 15min) para confirmar la integridad del producto de PCR, utilizando 2 µL de Green Buffer Flexi 5X (Promega) para el cargado de muestras, 2 µL de GelRed® (Biotium) 100X en NaCl 100 mM para la pre-tinción de las muestras y 1 µL de 1 kb DNA Ladder (Promega) como marcador de tamaño molecular. El gel se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

#### **6.6.4.3. Clonación del fragmento XBGlU<sub>N</sub> en pGEM-T**

El fragmento XBGlU<sub>N</sub> sintetizado y purificado en la Sección 6.6.4.2 fue primeramente adenilado para permitir su clonación en el vector pGEM-T. La mezcla para la reacción de adenilación se detalla en la Tabla 6 y fue incubada por 1 h a 72°C. Posterior a ello, XBGlU<sub>N</sub> adenilado se ligó al vector pGEM-T utilizando una relación inserto:vector de 2.7:1 de acuerdo con la reacción descrita en la Tabla 7 para construir el plásmido pGEMBGlu. La ligación se incubó por ~16 h a 4°C y se utilizó para transformar células calciocompetentes o ultracompetentes de *E. coli* JM109. Las células calciocompetentes se prepararon y transformaron como se indica en la sección 6.6.3.1, utilizando 2 µL de reacción de ligación para transformar. Las células ultracompetentes se prepararon utilizando el método estándar de Inoue et al. 1990 con las siguientes modificaciones: 1)

los volúmenes trabajados fueron la quinta parte de lo recomendado durante todo el proceso de preparación, 2) la sal HEPES fue utilizada en lugar de PIPES para la preparación de la solución TB, y 3) las células preparadas fueron distribuidas en alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  y congeladas utilizando  $\text{CO}_2$  sólido en lugar de  $\text{N}_2$  líquido previo a su almacenamiento a  $-70^\circ\text{C}$ . La transformación de las células ultracompetentes se realizó de la siguiente manera: una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de células se mezcló con 2  $\mu\text{L}$  de reacción de ligación y la mezcla se incubó 30 min en hielo. Después, la mezcla se sometió a choque térmico a  $42^\circ\text{C}$  por 1 min en un baño de agua y se pasó inmediatamente a hielo por 2 min. Se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de medio SOC y la mezcla se incubó por 1.5 h a  $24^\circ\text{C}$  a 250 rpm utilizando un ThermoMixer® R (Eppendorf). Posterior a ello, las bacterias se sembraron por extensión en una placa de agar LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) adicionada con 100  $\mu\text{L}$  de IPTG 10 mM y 40  $\mu\text{L}$  de X-Gal 20 mg/mL y la placa se incubó a temperatura ambiente por ~36 h hasta la aparición de colonias blancas y azules.

**Tabla 6.** Mezcla de reacción para la adenilación del fragmento XBGLuN sintetizado por PCR de alta fidelidad

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final
Producto de PCR del fragmento XBGLuN (36 ng/ $\mu\text{L}$ )	6.2	22.32 ng/ $\mu\text{L}$
Buffer Colorless Flexi 5X (Promega)	2.0	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Promega)	0.6	1.5 mM
dATP 10 mM (Bioline)	0.2	0.2 mM
Polimerasa GoTaq Flexi 5 U/ $\mu\text{L}$ (Promega)	1.0	0.5 U/ $\mu\text{L}$
Total	10.0	-

**Tabla 7.** Mezcla de reacción para la ligación del fragmento XBGLuN adenilado en el vector pGEM-T

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )		
	Control (-)	Control (+)	Ligación muestra
Buffer de ligación rápida T4 2X (Promega)	5.0	5.0	5.0
pGEM-T 50 ng/ $\mu\text{L}$ (Promega)	1.0	1.0	1.0
Ligasa T4 3 U/ $\mu\text{L}$ (Promega)	1.0	1.0	1.0
Inserto control (Promega)	-	2.0	-
Agua ultrapura estéril	3.0	1.0	-
Fragmento XBGLuN adenilado (22.32 ng/ $\mu\text{L}$ )	-	-	3.0
Total	10.0	10.0	10.0



#### 6.6.4.4. Identificación de clonas portadoras de pGEMBGlu

Siete colonias transformantes obtenidas en la sección anterior fueron analizadas mediante PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos 5XBGlu y 3BGluN para identificar las clonas portadoras de pGEMBGlu. Una pequeña porción de cada colonia fue levantada con un palillo en 10  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril y 1  $\mu\text{L}$  de esta suspensión fue utilizada como templado. La mezcla de reacción y el programa de termociclador empleados se muestran en la Tabla 8 y Tabla 9. Después de la amplificación, 5  $\mu\text{L}$  de cada reacción de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h), utilizando 1  $\mu\text{L}$  de 1 kb DNA Ladder (Promega) como marcador de tamaño molecular. El gel se tiñó posteriormente cubriendo con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) 3X en NaCl 100 mM durante 20 min con agitación suave y se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

**Tabla 8.** Mezcla de reacción para la identificación de clonas transformantes de *E. coli* JM109 portadoras de pGEMBGlu mediante PCR de colonia

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final
Agua ultrapura estéril (Promega)	6.5	-
GoTaq Green Master Mix 2X (Promega)	12.5	1X
Oligonucleótido 5BGluX (IDT) 5 $\mu\text{M}$	2.5	0.5 $\mu\text{M}$
Oligonucleótido 3BGluN (IDT) 5 $\mu\text{M}$	2.5	0.5 $\mu\text{M}$
Suspensión de colonia en agua estéril	1.0	-
Total	25.0	-

**Tabla 9.** Programa de termociclador para la identificación de clonas transformantes de *E. coli* JM109 portadoras de pGEMBGlu mediante PCR de colonia

Etapas	Ciclos	Paso	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
1	1	Desnaturalización inicial	95	5 min
		Desnaturalización	92	30 s
2	35	Hibridación	57	30 s
		Extensión	72	90 s
3	1	Extensión final	72	5 min
4	1	Refrigeración	4	Indefinido

#### 6.6.4.5. Caracterización y secuenciación de pGEMBGlu

Las suspensiones de 3 colonias positivas de acuerdo con el método descrito en la sección anterior fueron inoculadas en 4 mL de medio LB e incubadas a temperatura ambiente a 250 rpm por ~16-24 h. Se aisló ADN plasmídico a partir estos cultivos utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos se cuantificaron mediante espectrofotometría utilizando un NanoPhotometer™ Pearl (Implen GmbH) y posteriormente se caracterizaron mediante digestión analítica con la endonucleasa *SaI*I de acuerdo con la reacción descrita en la Tabla 10 para descartar que se trataran de pUC57-CfBG. Las reacciones se incubaron a 37°C por 1 h y posteriormente se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h 15min), utilizando 2 µL de Green Buffer 5X (Promega) para el cargado de muestras, 1 µL de 1 kb DNA Ladder (Promega) como marcador de tamaño molecular y 1 µL de cada plásmido sin digerir como control. El gel se tiñó posteriormente cubriendo con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) 3X en NaCl 100 mM durante 20-30 min con agitación suave y se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

El ADN plasmídico de las clonas positivas de acuerdo con la caracterización con *SaI*I se concentró utilizando un concentrador de vacío CentriVap (Labconco) a una temperatura de 40°C por ~20-30 min hasta alcanzar una concentración de 250-300 ng/µL en un volumen de ~25 µL. Las muestras de ADN se ajustaron a 200 ng/µL con agua ultrapura estéril y dos de ellas se enviaron para secuenciación con los oligonucleótidos universales T7 y SP6 y con el oligonucleótido específico 5CfBG (5'-TGG GAC CTT CCA CAA AAG CT-3') al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México siguiendo las especificaciones solicitadas.

**Tabla 10.** Mezcla de reacción para las digestiones analíticas de pGEMBGlu aislado de clonas de *E. coli* JM109 con la endonucleasa *SaI*I

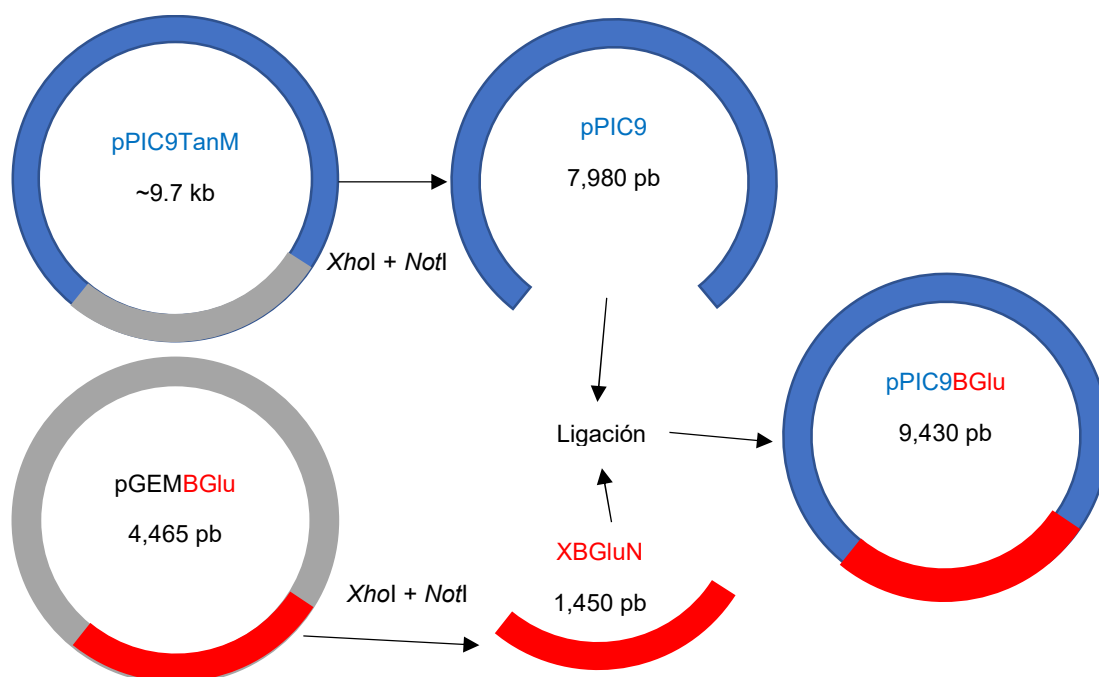
Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)	
	Muestras	Control
Agua ultrapura estéril	7.0	8.75
Buffer H 10X (TaKaRa)	1.0	1.0
pGEMBGlu (61-65 ng/ $\mu$ L)	2.0	-
pUC57-CfBG (500 ng/ $\mu$ L)	-	0.25
<i>SaI</i> I 50 U/ $\mu$ L (TaKaRa)	0.025	0.025
Total	10.025	10.025

Los archivos de electroferogramas recibidos fueron analizados utilizando los programas bioinformáticos SnapGene Viewer, CAP3 (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>) y Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias se obtuvieron a partir de los electroferogramas utilizando SnapGene Viewer y las regiones terminales con alta densidad de posiciones con niveles de calidad de Phred (Q) menores a 30 se removieron. Las secuencias resultantes se alinearon utilizando el programa CAP3 y el contig resultante se comparó con la secuencia teórica empleando la opción de alineamiento de dos secuencias de Nucleotide Blast con los parámetros predefinidos.

### 6.6.5. Subclonación de la secuencia codificante de Glu1B madura en el vector pPIC9

#### 6.6.5.1. Estrategia de clonación

Para la subclonación de la secuencia codificante de Glu1B madura en el vector pPIC9, se emplearon como precursores los plásmidos pGEMBGlu y pPIC9TanM. El plásmido pGEMBGlu se construyó como se describe en la sección 6.6.4, mientras que pPIC9TanM fue previamente construido en el laboratorio de trabajo y consiste en una secuencia codificante para una tanasa clonada en el vector pPIC9 (datos no publicados). El fragmento XBGlun y el vector pPIC9 se liberaron mediante digestión con las endonucleasas *Xho*I y *Not*I a partir de pGEMBGlu y pPIC9TanM, respectivamente, y se ligaron para obtener el plásmido recombinante pPIC9BGlu (Figura 6).



**Figura 6.** Estrategia general para la subclonación de la secuencia codificante de Glu1B en el vector pPIC9 a partir de los plásmidos pGEMBGlu y pPIC9TanM

#### 6.6.5.2. Preparación de los plásmidos pGEMBGlu y pPIC9TanM y obtención de los fragmentos pPIC9 y XBGlun

Las cepas de *E. coli* JM109 portadoras de los plásmidos pGEMBGlu (Sección 7.2.3.3) y pPIC9TanM (datos no publicados) fueron inoculadas en 10 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 30°C y 250 rpm por 20 h. Se aisló ADN plasmídico de ambas cepas a partir de 7 mL de cultivo utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos se cuantificaron mediante espectrofotometría utilizando un NanoPhotometer™ Pearl (Implen GmbH) y una alícuota de 1 µL de cada plásmido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h 15min), utilizando 2 µL de Green Buffer Flexi 5X (Promega) para el cargado de muestras, 2 µL de GelRed® (Biotium) 40X en NaCl 100 mM para la pre-tinción de las muestras y 5 µL de 1 kb HyperLadder (Biolone) como marcador de tamaño molecular. El ADN se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

Los plásmidos pGEMBGlu y pPIC9TanM se digirieron con las endonucleasas *XhoI* y *NotI* por 1 h a 37°C utilizando la mezcla de reacción mostrada en la Tabla 11. Las reacciones de digestión se detuvieron calentando a 65°C por 20 min y los fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis en un gel preparativo de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X nuevo y estéril (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h 25min), utilizando 10 µL de Green Buffer Flexi 5X (Promega) para el cargado de muestras, 2 µL de GelRed® (Biotium) 40X en NaCl 100 mM para la pre-tinción de las muestras y 5 µL de 1 kb HyperLadder (Bioline) como marcador de tamaño molecular. El ADN se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV a longitud de onda de 365 nm y las bandas de ~8.0 y ~1.5 kb correspondientes a los fragmentos pPIC9 y XBGlUN, respectivamente, se cortaron con navajas estériles y se depositaron en tubos para microcentrífuga nuevos y estériles. Los fragmentos se purificaron utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo las instrucciones del fabricante y se recuperaron en 30 µL de agua libre de nucleasas. Por último, se determinó la concentración de los fragmentos obtenidos mediante espectrofotometría utilizando un NanoPhotometer™ Pearl (Implen GmbH) y una alícuota de 1-3 µL de cada fragmento se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h 15min) para comprobar la integridad de los mismos, utilizando 1 µL de Loading Buffer 5X (Bioline) para el cargado de muestras y 5 µL de 1 kb HyperLadder (Bioline) como marcador de tamaño molecular. El gel se tiñó cubriendo con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) 3X en NaCl 100 mM durante 20 min con agitación suave y se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

**Tabla 11.** Mezclas de reacción para las digestiones preparativas de pGEMBGlu y pPIC9TanM con las endonucleasas *XhoI* y *NotI*

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	
	pGEMBGlu	pPIC9TanM
Agua ultrapura estéril	12.3	5.7
Buffer CutSmart 10X (NEB)	4.0	4.0
pGEMBGlu (138 ng/ $\mu\text{L}$ )	21.7	-
pPIC9TanM (106 ng/ $\mu\text{L}$ )	-	28.3
<i>XhoI</i> 20 U/ $\mu\text{L}$ (NEB)	1.0	1.0
<i>NotI</i> 20 U/ $\mu\text{L}$ (NEB)	1.0	1.0
Total	40.0	40.0

#### 6.6.5.3. Ligación del fragmento XBGlun con el vector pPIC9 y transformación en *E. coli* JM109

Los fragmentos XBGlun y pPIC9 con extremos cohesivos *XhoI* y *NotI* obtenidos en la sección anterior se ligaron utilizando una relación molar inserto:vector de 3.2:1 con la ligasa T4 (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las mezclas de reacción de la ligación y de un control negativo se detallan en la Tabla 12. Las reacciones se incubaron por 3 h a temperatura ambiente y 4  $\mu\text{L}$  se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h 15min), utilizando 2  $\mu\text{L}$  de Green Buffer 5X (Promega) para el cargado de muestras, 2  $\mu\text{L}$  de GelRed® (Biotium) 40X en NaCl 100 mM para la pre-tinción de las muestras y 5  $\mu\text{L}$  de 1 kb HyperLadder (Bioline) como marcador de tamaño molecular. Tras la verificación de la ligación, 1 y 2  $\mu\text{L}$  de ligación se emplearon para transformar células ultracompetentes de *E. coli* JM109 como se describe en la sección 6.6.4.3. Las células fueron incubadas a temperatura ambiente o a 37°C hasta la aparición de colonias.

**Tabla 12.** Mezclas de reacción para la ligación del fragmento XBGlUN en el vector pPIC9

Reactivo	Volumen (μL)	
	Ligación	Control (-)
Agua libre de nucleasas (Promega)	2.7	3.0
Vector pPIC9 (27 ng/ μL)	2.0	2.0
Fragmento XBGlUN (8.5 ng/ μL)	4.0	4.0
Buffer de ligación T4 10X (Promega)	1.0	1.0
DNA ligasa T4 3 UμL	0.3	-
Total	10.0	10.0

#### 6.6.5.4. Identificación de clonas de *E. coli* JM109 portadoras de pPIC9BGlu

Siete colonias transformantes obtenidas en la sección anterior fueron analizadas mediante PCR de colonia para identificar las clonas portadoras de pPIC9BGlu. Para este análisis se utilizaron los oligonucleótidos 5AOX (5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3') y 3CfBG (5'-TCC TTT GGA GTA CGT GGA CG-3'), los cuales están dirigidos al promotor del gen *AOXI* del vector pPIC9 y a la secuencia codificante para Glu1B del inserto XBGlUN, respectivamente. Una pequeña porción de cada colonia fue levantada con un palillo en 10 μL de agua destilada estéril y 1 μL de esta suspensión fue utilizada como templado. La mezcla de reacción y el programa de termociclador empleados se muestran en la Tabla 13 y Tabla 14. Después de la amplificación, 5 μL de cada reacción de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h 30 min), utilizando 5 μL de 1 kb HyperLadder (Bioline) como marcador de tamaño molecular. El gel se tiñó posteriormente cubriendo con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) 3X en NaCl 100 mM durante 60 min con agitación suave y se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

**Tabla 13.** Mezcla de reacción para la identificación de clonas transformantes de *E. coli* JM109 portadoras de pPIC9BGlu mediante PCR de colonia

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Agua ultrapura estéril (Promega)	6.5	-
GoTaq Green Master Mix 2X (Promega)	12.5	1X
Oligonucleótido 5AOX (IDT) 5 μM	2.5	0.5 μM
Oligonucleótido 3CfBG (IDT) 5 μM	2.5	0.5 μM
Suspensión de colonia en agua estéril	1.0	-
Total	25.0	-

**Tabla 14.** Programa de termociclador para la identificación de clonas transformantes de *E. coli* JM109 portadoras de pPIC9BGlu mediante PCR de colonia

Etapas	Ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	Desnaturalización inicial	95	5 min
		Desnaturalización	92	30 s
2	35	Hibridación	56	30 s
		Extensión	72	2 min
3	1	Extensión final	72	5 min
4	1	Refrigeración	4	Indefinido

### 6.6.6. Transformación de *P. pastoris* KM71 con pPIC9BGlu

#### 6.6.6.1. Preparación y caracterización de pPIC9BGlu

La suspensión de una colonia portadora de pPIC9BGlu de acuerdo con el análisis descrito en la sección 6.6.5.4 se inoculó en 40 mL de medio LB con ampicilina (100 μg/mL) y se incubó por 17 h a 37°C y 250 rpm. Este cultivo se utilizó para aislar ADN plasmídico de acuerdo con siguiente protocolo: Primero, el cultivo se centrifugó por 25 min a 4,500 rpm a 4°C y el paquete celular se suspendió en 15 mL de solución para resuspensión celular (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM). La suspensión se incubó 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron 15 mL de solución alcalina de lisis recién preparada (NaOH 0.2 M, SDS 1%). La suspensión se mezcló por inversión, se incubó por ~20 min a temperatura ambiente hasta que se tornó clara y viscosa y se colocó en hielo por 5 min. Después, se agregaron 15 mL de solución neutralizante (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> 7.5 M, pH 7.8) y la suspensión se mezcló inmediatamente por inversión, se incubó a 4°C



por 15 min y se centrifugó por 20 min a 4,500 rpm a 4°C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se mezcló por inversión. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 20 min y se centrifugó por 20 min a 4,500 rpm a 4°C. La pastilla de ADN obtenida se disolvió en 2 mL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA-NaOH 1 mM pH 8.0) y posteriormente se agregaron 1 mL de fenol saturado pH 7.9 y 1 mL de SEVAG (cloroformo - alcohol isoamílico 24:1). La mezcla se agitó vigorosamente por 1 min y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm a 4°C. La fase acuosa obtenida se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron 0.5 volúmenes de solución neutralizante y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se mezcló por inversión. La mezcla se incubó por 30 min a -20°C y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm a 4°C para obtener la pastilla de ADN. La pastilla se lavó con 1 mL de etanol 70%, se volvió a recuperar por centrifugación durante 2 min a 14,000 rpm a 4°C y se secó a temperatura ambiente por 15 min. El ADN se disolvió posteriormente en 0.5 mL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA-NaOH 1 mM pH 8.0) y se trató con 1 µL de RNAsa ONE 10 U/µL (Promega) por 3 h a 37°C. A continuación, la preparación de ADN se purificó utilizando una unidad de filtración Amicon® Ultra-0.5 mL 3K (Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron 4 pases del ADN en la unidad de filtración para un factor de dilución de los contaminantes de 1:18 y un volumen final de 50 µL en agua ultrapura estéril. La preparación final de ADN se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando un NanoPhotometer™ Pearl (Implen GmbH) y una alícuota de 0.5 µL se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h), utilizando 2 µL de Green Buffer 5X (Promega) para el cargado de muestras, 2 µL de GelRed® (Biotium) 40X en NaCl 100 mM para la pre-tinción de las muestras y 5 µL de 1 kb HyperLadder (Bioline) como marcador de tamaño molecular. El ADN se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

El plásmido anterior se caracterizó mediante PCR para confirmar que se trata de pPIC9Bglu utilizando los oligonucleótidos 5AOX (5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3') y 3CfBG (5'-TCC TTT GGA GTA CGT GGA CG-3'), los cuales están dirigidos al promotor del gen *AOX1* del vector pPIC9 y a la secuencia codificante para Glu1B del inserto XBgluN, respectivamente. La mezcla de reacción y el programa del termociclador

empleados se muestran en la Tabla 15 y Tabla 16. Después de la amplificación, 5  $\mu$ L de cada reacción de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h 15 min), utilizando 5  $\mu$ L de 1 kb HyperLadder (Bioline) como marcador de tamaño molecular. El gel se tiñó posteriormente cubriendo con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) 3X en NaCl 100 mM durante 15 min con agitación suave y se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

**Tabla 15.** Mezcla de reacción para la caracterización de pPIC9BGlu mediante PCR

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)	Concentración final
Agua ultrapura estéril (Promega)	6.5	-
GoTaq Green Master Mix 2X (Promega)	12.5	1X
Oligonucleótido 5AOX (IDT) 5 $\mu$ M	2.5	0.5 $\mu$ M
Oligonucleótido 3CfBG (IDT) 5 $\mu$ M	2.5	0.5 $\mu$ M
Suspensión de colonia en agua estéril	1.0	-
Total	25.0	-

**Tabla 16.** Programa de termociclador para la caracterización de pPIC9BGlu mediante PCR

Etapas	Ciclos	Paso	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
1	1	Desnaturalización inicial	94	2 min
		Desnaturalización	92	30 s
2	30	Hibridación	56	30 s
		Extensión	72	2 min
3	1	Extensión final	72	5 min
4	1	Refrigeración	4	Indefinido

#### 6.6.6.2. Linealización de pPIC9BGlu y transformación de células electrocompetentes de *P. pastoris* KM71

Para llevar a cabo la transformación de *P. pastoris* KM71 con pPIC9BGlu, el plásmido preparado en la sección 6.6.6.1 fue primero linealizado con la endonucleasa *Sa*I de acuerdo con la mezcla de reacción mostrada en la Tabla 17. La reacción se incubó por 1 h a 37 $^{\circ}$ C y se detuvo mediante calentamiento a 65 $^{\circ}$ C por 15 min. La linealización de

pPIC9BGlu se verificó mediante el análisis de 1  $\mu$ L de reacción por electroforesis en gel de agarosa 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h), utilizando 2  $\mu$ L de Green Buffer 5X (Promega) para el cargado de muestras, 2  $\mu$ L de GelRed® (Biotium) 40X en NaCl 100 mM para la pre-tinción de las muestras y 1  $\mu$ L de 1 kb DNA Ladder (Promega) como marcador de tamaño molecular. El ADN se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV. Posteriormente, el plásmido pPIC9BGlu linealizado se desaló utilizando una unidad de filtración Amicon® Ultra-0.5 mL 3K (Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron 3 pases del ADN en la unidad de filtración para un factor de dilución de los contaminantes de 1:45 y un volumen final de 50  $\mu$ L en agua ultrapura estéril. El ADN desalado se concentró utilizando un concentrador de vacío CentriVap (Labconco) a una temperatura de 40°C hasta alcanzar un volumen de 6.5  $\mu$ L y se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando un NanoPhotometer™ Pearl (Implen GmbH). Una alícuota de la preparación final de ADN se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) (100 V, 84 mA, 1 h 15 min), utilizando 2  $\mu$ L de Green Buffer 5X (Promega) para el cargado de muestras, 2  $\mu$ L de GelRed® (Biotium) 40X en NaCl 100 mM para la pre-tinción de las muestras y 5  $\mu$ L de 1 kb HyperLadder (Bioline) como marcador de tamaño molecular. El ADN se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

**Tabla 17.** Mezcla de reacción para la linealización de pPIC9BGlu con la endonucleasa *SaI*

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
Agua ultrapura estéril	32.0
Buffer H 10X (TaKaRa)	5.0
pPIC9BGlu (535 ng/ $\mu$ L)	10.0
<i>SaI</i> 50 U/ $\mu$ L (TaKaRa)	3.0
Total	50.0

Para permitir su transformación con el plásmido pPIC9BGlu linealizado, se prepararon células electrocompetentes de *P. pastoris* KM71 de la siguiente manera: Una conserva de *P. pastoris* KM71 se reactivó en 10 mL de medio YPD por ~16 h a 30°C y 250 rpm. El cultivo se utilizó para inocular 500 mL de YPD a una DO<sub>600</sub> inicial de 0.1 y se incubó por

4-6 h a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.6-1.0. El paquete celular se obtuvo mediante centrifugación a 4,000 rpm por 5 min a 4°C y se suspendió en 100 mL de YPD suplementado con HEPES 20 mM. A esta suspensión se le agregaron 2.5 mL de DTT 1 M y se incubó 15 min adicionales a 30°C y 250 rpm. Posteriormente, se agregaron 400 mL de agua fría estéril y la mezcla se centrifugó por 10 min a 4,000 rpm a 4°C. El paquete celular resultante se suspendió en 250 mL de agua fría estéril y se volvió a obtener utilizando las mismas condiciones de centrifugación. Las células se suspendieron posteriormente en 20 mL de sorbitol 1 M frío y estéril y se obtuvieron nuevamente por centrifugación de 10 min a 4,000 rpm a 4°C. El paquete celular se suspendió finalmente en 1 mL de sorbitol 1 M frío y estéril y el volumen se dividió en alícuotas de 40 µL que se almacenaron a -70°C hasta su uso.

El plásmido pPIC9BGlu linealizado y purificado se utilizó para transformar células electrocompetentes de *P. pastoris* KM71 de acuerdo con el siguiente procedimiento: Una alícuota de 40 µL de células electrocompetentes fue descongelada en hielo y se le añadieron 5.7 µL (~5.7 µg) de pPIC9BGlu linealizado. La mezcla se colocó en una celda para electroporación de 0.2 cm (BioRad) y se incubó en hielo por 2 min. La celda se colocó posteriormente en el tren de carga de un sistema de electroporación Gene Pulser® II (BioRad) y se le aplicó una descarga eléctrica de 1.5 kV a 400 Ω y 25 µF. Después de la descarga eléctrica, se añadió a la celda 1 mL de sorbitol frío 1 M y se homogenizó por inversión. Una alícuota de 100 µL de esta mezcla se sembró en una placa de agar YPD utilizando el método de extensión en placa como control de electroporación, mientras que alícuotas de 200 y 750 µL se sembraron en placas de agar RBD para la selección de colonias transformantes por prototrofia a histidina. Adicionalmente, 100 µL de una mezcla de células competentes no electroporadas con 1 mL de sorbitol frío 1 M se sembraron en una placa de agar YPD como control de viabilidad y 100 µL se sembraron en una placa de agar RBD como control negativo. Las placas se incubaron a 30°C por 60-120 h hasta observar la aparición de colonias.

### 6.6.6.3. Verificación de la integración de pPIC9BGlu en clonas transformantes de *P. pastoris* KM71

Cuatro colonias transformantes de *P. pastoris* KM71 prototróficas a histidina (Sección 6.6.6.2) fueron analizadas mediante PCR de colonia para verificar la integración de pPIC9BGlu en el genoma. Para este análisis se utilizaron los oligonucleótidos 5AOX (5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3') y 3CfBG (5'-TCC TTT GGA GTA CGT GGA CG-3'), los cuales están dirigidos al promotor del gen *AOX1* y a la secuencia codificante para Glu1B contenidos en pPIC9BGlu, respectivamente. Una pequeña porción de cada colonia fue levantada con un palillo en 10  $\mu$ L de agua destilada estéril, se agregaron 5  $\mu$ L de liticasa 5 U/ $\mu$ L y la mezcla se incubó por 10 min a 30°C para favorecer la lisis celular. Un microlitro de esta suspensión fue utilizado como templado para la PCR. La mezcla de reacción y el programa de termociclador empleados se muestran en la Tabla 18 y Tabla 19. Después de la amplificación, 5  $\mu$ L de cada reacción de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (100 V, 84 mA, 1 h 30 min), utilizando 1  $\mu$ L de 1 kb DNA Ladder (Promega) como marcador de tamaño molecular. El gel se tiñó posteriormente cubriendo con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) 3X en NaCl 100 mM durante 20 min con agitación suave y se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV. Las clonas positivas a este ensayo se denominaron *P. pastoris* KM71BGlu, se inocularon en 10 mL de medio YPD, se incubaron a 30°C y 250 rpm por 16 h y se conservaron a 4°C hasta su uso.

**Tabla 18.** Mezcla de reacción para la verificación de la integración de pPIC9BGlu en *P. pastoris* KM71 mediante PCR de colonia

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)	Concentración final
Agua ultrapura estéril (Promega)	6.5	-
GoTaq Green Master Mix 2X (Promega)	12.5	1X
Oligonucleótido 5AOX (IDT) 5 $\mu$ M	2.5	0.5 $\mu$ M
Oligonucleótido 3CfBG (IDT) 5 $\mu$ M	2.5	0.5 $\mu$ M
Suspensión de colonia en agua estéril	1.0	-
Total	25.0	-

**Tabla 19.** Programa de termociclador para la verificación de la integración de pPIC9BGlu en *P. pastoris* KM71 mediante PCR de colonia

Etapa	Ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	Desnaturalización inicial	95	5 min
		Desnaturalización	92	30 s
2	35	Hibridación	56	30 s
		Extensión	72	2 min
3	1	Extensión final	72	5 min
4	1	Refrigeración	4	Indefinido

### 6.6.7. Caracterización fenotípica de *P. pastoris* KM71BGlu

#### 6.6.7.1. Cultivos en lote de *P. pastoris* KM71BGlu en condiciones de inducción del gen heterólogo

Se realizaron cultivos en lote de dos clones de *P. pastoris* KM71BGlu (clonas 2 y 3), las cuales contienen pPIC9BGlu integrado en su genoma (7.2.5.2), para producir la proteína heteróloga. Los cultivos se desarrollaron en tres fases que se describen a continuación. Las incubaciones se llevaron a cabo en una incubadora MaxQ™ 6000 (Thermo Scientific) y las mediciones de densidad óptica se determinaron utilizando un espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad).

1. Fase de reactivación: Se inocularon 10 mL de medio YPD con 100 µL de conserva de la clona de *P. pastoris* y el cultivo se incubó por 16-24 h a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 6-8.
2. Fase de crecimiento: El cultivo anterior se utilizó para inocular 100 mL de medio BMG, ajustando a una DO<sub>600</sub> inicial de 0.3. Este nuevo cultivo se incubó en un matraz de 1 L a 30°C con agitación a 250 rpm durante 8-10 h hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 4.5-6.
3. Fase de inducción: La biomasa obtenida en el cultivo anterior se recuperó por centrifugación a 4,500 rpm por 10 min y se suspendió en 20 mL de medio BMM. El cultivo se pasó a un matraz de 250 mL y se incubó por 48 h a 30°C y 250 rpm. Se agregó metanol a una concentración final de 0.75% cada a) 12 o b) 24 h para inducir la expresión de la proteína heteróloga. La DO<sub>600</sub> se monitoreó cada 12 h y

se tomó una muestra de 1 mL a las 24 y 48 h. Estas muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min a 4°C y el medio libre de células se almacenó a -20°C hasta su uso. Además, el cultivo final se centrifugó por 10 min a 4,500 rpm a 4°C y el medio libre de células también se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### **6.6.7.2. Determinación de proteínas extracelulares totales**

Se determinó la concentración de proteínas extracelulares totales en los medios libres de células a las 24 y 48 h de inducción de los cultivos realizados en la sección 6.6.7.1 mediante el método de Bradford. Para ello, 200 µL de muestra o de una dilución de ésta se mezclaron con 800 µL de reactivo de Bradford y se midió la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 595 nm utilizando un espectrofotómetro DU® 650 (Beckman Coulter). La concentración de proteínas en las muestras se determinó mediante interpolación en una recta de calibración que fue preparada con concentraciones de 0.0, 5.0, 7.5, 15.0, 22.5, 30.0 y 45.0 µg/mL de albúmina sérica bovina y calculada mediante regresión lineal utilizando una hoja de cálculo en Microsoft Excel. Tanto las muestras como los puntos de la recta de calibración se midieron por triplicado.

#### **6.6.7.3. Determinación de la actividad enzimática de β-glucosidasa**

La actividad enzimática de β-glucosidasa en los medios libres de células a las 24 y 48 h de inducción de los cultivos realizados en la sección 6.6.7.1 se determinó utilizando celobiosa como sustrato mediante un proceso de dos fases como se describe a continuación:

1. Fase de hidrólisis de celobiosa: A un tubo para microcentrífuga se le agregaron 50 µL de celobiosa 2% en buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 y hasta 45 µL de agua destilada estéril. La cantidad de agua estéril se calculó de acuerdo con el factor de dilución deseado para la muestra en una reacción de 100 µL (hasta 1:20). El tubo con la mezcla se precalentó por 10-15 min a 40°C utilizando un ThermoMixer® R (Eppendorf). Después, un volumen de 5-10 µL de muestra se agregó al tubo para un factor de dilución de 10-20. En caso de requerir diluciones mayores a 20, la muestra se pre diluyó en buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 de acuerdo con el factor de dilución deseado y 10 µL de la dilución se agregaron al tubo anterior. La mezcla de celobiosa con muestra se incubó a 40°C

por exactamente 30 min y la reacción se detuvo a 100°C por 10 min utilizando un bloque de calentamiento análogo (VWR). Finalmente, los tubos se dejaron enfriar 5 min a temperatura ambiente. Las reacciones de celobiosa con muestra se realizaron por triplicado. Además, un blanco de sustrato y un blanco de muestra también se procesaron de la misma manera. La reacción del blanco de sustrato consistió en una mezcla de 50 µL de celobiosa 2% en buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 con 50 µL de agua destilada estéril (sin muestra), mientras que la reacción del blanco de muestra consistió en 50 µL de buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 (sin celobiosa) con 50 µL de dilución de la muestra en agua destilada estéril.

2. Fase de detección de glucosa: A 1.5 mL de reactivo GOPOD (kit K-GLUC de Megazyme) se le agregaron 50 µL de las reacciones obtenidas en la fase de hidrólisis de celobiosa. Las mezclas se incubaron por 20 min a 50°C utilizando un ThermoMixer® R (Eppendorf) y posteriormente se midió su absorbancia a una longitud de onda de 510 nm utilizando un espectrofotómetro DU® 650 (Beckman Coulter). A la absorbancia obtenida en las reacciones de celobiosa con muestra se le restó la absorbancia de los blancos y este valor fue utilizado para calcular la concentración de glucosa liberada en la reacción. La concentración de glucosa liberada se calculó mediante interpolación en una recta de calibración que fue preparada con concentraciones de 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 2.0, 3.0 y 4.0 y 6.0 mM de glucosa y calculada mediante regresión lineal utilizando una hoja de cálculo en Microsoft Excel. Todos los puntos de la recta de calibración se midieron por duplicado. Por último, se calculó la actividad de β-glucosidasa en las muestras a partir de la concentración de glucosa liberada utilizando la fórmula  $Actividad (U/mL) = glucosa liberada (mM) / tiempo (min) * factor de dilución$ . Una unidad de actividad de β-glucosidasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de glucosa por minuto a partir de celobiosa en las condiciones del ensayo (40°C, pH 6.0).



#### **6.6.7.4. Detección de la $\beta$ -glucosidasa recombinante por SDS-PAGE**

El medio libre de células al tiempo final del cultivo de la clona 3 realizado en la sección 6.6.7.1 se analizó por SDS-PAGE para detectar la producción de la  $\beta$ -glucosidasa recombinante. El medio libre de células se ultrafiltró y concentró utilizando una unidad de filtración Amicon® Ultra-4 10K (Merck) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En total se realizaron 3 lavados con agua destilada y se pasó de un volumen inicial de 17 mL a un volumen final de 65  $\mu$ L de concentrado proteico. Se determinó la concentración de proteínas totales en el concentrado de acuerdo con el método descrito en la sección 6.6.7.2 y se calculó el porcentaje de recuperación de proteínas.

El concentrado proteico anterior se digirió con la enzima Endo H<sub>f</sub> (NEB) para remover la posible N-glicosilación de las proteínas. Para ello, 12  $\mu$ g de concentrado primero se trataron a 100°C por 10 min en buffer de desnaturalización de glicoproteínas 1X (NEB) en un volumen de 10  $\mu$ L. Después, se agregaron 2  $\mu$ L de buffer G5 10X (NEB), 2  $\mu$ L de Endo H<sub>f</sub> 1  $\mu$ g/ $\mu$ L y 6  $\mu$ L de agua destilada y la reacción se incubó por 1 h a 37°C. Un control de 2  $\mu$ L de Endo H<sub>f</sub> se procesó de la misma manera, excepto que no se agregó concentrado proteico a la reacción.

El concentrado proteico tratado y sin tratamiento con Endo H<sub>f</sub>, así como Endo H<sub>f</sub> sola, se analizaron por SDS-PAGE utilizando poliacrilamida 10% como gel separador y 4.5% como gel concentrador. La preparación de los geles separador y concentrador se realizó con los volúmenes indicados en la Tabla 20. El gel resultante se montó en una cámara de electroforesis vertical y se recubrió con buffer de corrimiento frío (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3). Las reacciones anteriores (concentrado proteico tratado con Endo H<sub>f</sub> y control de Endo H<sub>f</sub>) se mezclaron con 20  $\mu$ L de Sample Buffer Laemmli 2X (Sigma), se calentaron a 100°C por 5 min y 20  $\mu$ L de esta mezcla se aplicaron en el gel de poliacrilamida para un total de 6  $\mu$ g de concentrado proteico tratado y 1  $\mu$ g de Endo H<sub>f</sub> aplicados en el gel. Además, 6  $\mu$ g de concentrado proteico sin tratar se mezclaron con Sample Buffer Laemmli 2X (Sigma) en una relación 1:1, la mezcla se calentó a 100°C por 5 min y se aplicó en el gel. Asimismo, un marcador molecular consistente en 3  $\mu$ g de albúmina sérica bovina (66.0 kDa), 3  $\mu$ g de ovoalbúmina de pollo (45.0 kDa), 3  $\mu$ g de pepsina de mucosa de estómago porcino (34.7 kDa) y 3  $\mu$ g de  $\beta$ -lactoglobulina bovina

(20.1 kDa) se mezcló con Sample Buffer Laemmli 2X (Sigma) en una relación 1:1, se calentó a 100°C por 5 min y se aplicó en el gel. La cámara con el gel montado se transportó a un refrigerador y se le aplicó corriente eléctrica de 25 mA a 4°C por ~1.5 h hasta observar la migración del colorante del buffer Laemmli a la parte baja del gel.

El gel anterior se tiñó de la siguiente manera: El gel primero se desensambló de la cámara y se colocó en un recipiente de plástico. Después, el gel se cubrió con imidazol 0.2 M por 10 min con agitación suave y el imidazol se descartó. Después de esto, se agregaron gotas de ZnCl<sub>2</sub> 0.3 M hasta la aparición de bandas y el gel se lavó con agua destilada. El gel posteriormente se cubrió con solución colorante de Coomassie (azul brillante de Coomassie 0.5%, metanol 50%, ácido acético 10%) por toda la noche con agitación suave, se removió la solución colorante y el gel se cubrió con solución decolorante (metanol 5%, ácido acético 7%) con agitación suave hasta observar bandas de color azul en un fondo claro.

La masa molecular aparente de la(s) proteína(s) de interés fue calculada a partir del gel de SDS-PAGE con base en la distancia de migración de las proteínas del marcador. La masa molecular aparente se calculó a partir del ajuste logarítmico de la relación de la masa molecular de las proteínas del marcador con su distancia de migración en el gel utilizando una hoja de cálculo de Microsoft Excel. La distancia de migración de las proteínas de interés se interpoló en esta ecuación para calcular la masa molecular aparente. La masa molecular teórica de Glu1B madura se calculó a partir de su secuencia aminoacídica con una herramienta bioinformática disponible en línea ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)).

**Tabla 20.** Mezclas para la preparación de los geles separador y concentrador para SDS-PAGE

Reactivo	Volumen (μL)	
	Gel separador	Gel concentrador
Agua destilada	3,650	3,050
Acrilamida/Bisacrilamida 37.5:1 30%	2,650	600
Tris-HCl 2 M pH 8.0	1,500	-
Tris-HCl 2 M pH 6.9	-	250
SDS 10%	80	40
Persulfato de amonio 10%	50	40
TEMED	10	10
Total	7,940	3,990

## **6.6.8. Selección de cepas de *P. pastoris* sobreproductoras de BGlu**

### **6.6.8.1. Estrategia general**

Se realizaron cultivos en condiciones de inducción con metanol de 60 clonas de *P. pastoris* KM71 transformadas con pPIC9BGlu. Se determinó la concentración de proteínas totales en los medios libres de células al final del cultivo y las clonas se clasificaron en función de su rendimiento producto/biomasa (proteínas extracelulares por unidad de biomasa) en tres categorías: clonas de rendimiento bajo, clonas de rendimiento medio y clonas de rendimiento alto. Un total de 5 clonas de rendimiento alto y 3 de rendimiento bajo se preseleccionaron y se determinó su actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa extracelular. Las clonas con la mayor actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa extracelular y mayor actividad de  $\beta$ -glucosidasa por unidad de biomasa fueron seleccionadas como las clonas de *P. pastoris* KM71 sobreproductoras de la  $\beta$ -glucosidasa BGlu de *C. formosanus*. Además, se analizó la relación entre 1) la producción de proteínas extracelulares y la actividad de  $\beta$ -glucosidasa extracelular y 2) el rendimiento producto/biomasa y la actividad de  $\beta$ -glucosidasa extracelular en las clonas analizadas.

### **6.6.8.2. Cultivos en lote de 60 clonas de *P. pastoris* KM71BGlu en condiciones de inducción del gen heterólogo**

Un total de 60 colonias prototróficas a histidina de *P. pastoris* KM71 transformadas con pPICBGlu se levantaron en 10 mL de medio YPD, se cultivaron por ~16 h a 30°C a 250 rpm y se conservaron a 4°C hasta su uso. A partir de estas conservar se realizaron cultivos en lote de tres fases a nivel de matraz para producir la proteína heteróloga como se describe a continuación. Los cultivos se llevaron a cabo en una incubadora MaxQ™ 6000 (Thermo Scientific) y las mediciones de densidad óptica se determinaron utilizando un espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad).

1. Fase de reactivación: Se inocularon 10 mL de medio YPD en un tubo para centrífuga de 50 mL con 100  $\mu$ L de conserva de la clona de *P. pastoris* y el cultivo se incubó por 16-24 h a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 6-7.
2. Fase de crecimiento: El cultivo anterior se utilizó para inocular 50 mL de medio BMG en un matraz de 500 mL, ajustando a una DO<sub>600</sub> inicial de 0.3. Este nuevo

cultivo se incubó a 30°C con agitación a 250 rpm durante 8-10 h hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 6.5-7.

3. Fase de inducción: La biomasa obtenida en la fase anterior se recuperó por centrifugación a 4,500 rpm por 10 min a 4°C y se suspendió en 10 mL de medio BMM. Esta suspensión se pasó a un matraz de 125 mL y se incubó por 36 h a 30°C y 250 rpm. Se agregó metanol a una concentración final de 0.75% cada 12 h para inducir la expresión de la proteína heteróloga. La DO<sub>600</sub> se monitoreó cada 12 h. Al finalizar el cultivo, éste se centrifugó por 10 min a 4,500 rpm y 4°C y el medio libre de células se dividió en alícuotas de 1 mL y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Los cultivos descritos se realizaron por lotes de 4-8 clonas por lote. Para reducir la variabilidad entre lotes, cada lote incluyó además una clona (clona 14) como control de normalización.

#### **6.6.8.3. Determinación de proteínas extracelulares totales**

Se determinó la concentración de proteínas totales de los medios libres de células de los cultivos realizados en la sección 6.6.8.2 mediante el método de Bradford como se describe en la sección 6.6.7.2.

#### **6.6.8.4. Clasificación de 60 clonas de *P. pastoris* KM71BGlu**

Las 60 clonas analizadas de *P. pastoris* KM71 transformadas con pPIC9BGlu se clasificaron en las categorías 1) clonas de rendimiento bajo, 2) clonas de rendimiento medio y 3) clonas de rendimiento alto como se indica a continuación: Para cada clona, se calculó el rendimiento producto/biomasa (proteínas extracelulares por unidad de biomasa) utilizando la fórmula  $Rendimiento (mg/g) = Proteínas (mg/L) / (DO_{600} * 0.23 [L/g])$ , donde *Rendimiento* es la cantidad de proteínas producidas por gramo de biomasa seca, *Proteínas* es la concentración de proteínas en el medio libre de células (sección 6.6.7.2), *DO<sub>600</sub>* es la DO<sub>600</sub> del cultivo al tiempo final (6.6.7.1) y 0.23 es un factor de conversión de unidades de absorbancia a gramos de peso seco por volumen. Posteriormente, se dividió el rendimiento producto/biomasa de cada clona entre el rendimiento producto/biomasa de la clona normalizadora (clona 14) en el lote respectivo para obtener el rendimiento relativo a la clona 14. Después, las clonas se clasificaron en

función de su rendimiento relativo. Las clonas con un rendimiento relativo >85% del máximo se catalogaron como clonas de rendimiento alto, mientras que las clonas con un rendimiento relativo <60% del máximo se clasificaron como clonas de rendimiento bajo y aquéllas con un rendimiento relativo entre 60 y 85% del máximo se catalogaron como clonas de rendimiento medio.

#### **6.6.8.5. Determinación de la actividad enzimática de $\beta$ -glucosidasa**

Se determinó la actividad enzimática volumétrica de  $\beta$ -glucosidasa en los medios libres de células del cultivo al tiempo final de 5 clonas de rendimiento alto, 3 clonas de rendimiento bajo y la clona normalizadora (clona 14) de acuerdo con la clasificación detallada en la sección 6.6.8.4. Para ello, se siguió el siguiente proceso de dos fases:

1. Fase de hidrólisis de celobiosa: A un tubo para microcentrífuga se le agregaron 50  $\mu$ L de celobiosa 2% en buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0 y 45  $\mu$ L de agua destilada estéril. El tubo con la mezcla se precalentó por 10-15 min a 50°C utilizando un ThermoMixer® R (Eppendorf). Después, un volumen de 5  $\mu$ L de muestra se agregó al tubo para un factor de dilución de 20. La mezcla de celobiosa con muestra se incubó a 50°C por exactamente 30 min y la reacción se detuvo a 100°C por 10 min utilizando un bloque de calentamiento análogo (VWR). Finalmente, los tubos se dejaron enfriar 5 min a temperatura ambiente. Las mezclas de celobiosa con muestra se realizaron por triplicado. Además, un blanco de sustrato y un blanco de muestra también se procesaron de la misma manera. La reacción del blanco de sustrato consistió en una mezcla de 50  $\mu$ L de celobiosa 2% en buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0 con 50  $\mu$ L de agua destilada estéril (sin muestra), mientras que la reacción del blanco de muestra consistió en 50  $\mu$ L de buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0 (sin celobiosa) con 50  $\mu$ L de dilución de la muestra en agua destilada estéril.
2. Fase de detección de glucosa: A 1.5 mL de reactivo GOPOD (kit K-GLUC de Megazyme) se le agregaron 50  $\mu$ L de las reacciones obtenidas en la fase de hidrólisis de celobiosa. Las mezclas se incubaron por 20 min a 50°C utilizando un ThermoMixer® R (Eppendorf) y posteriormente se midió su absorbancia a una longitud de onda de 510 nm utilizando un espectrofotómetro DU® 650 (Beckman

Coulter). A la absorbancia obtenida en las reacciones de celobiosa con muestra se le restó la absorbancia de los blancos y este valor fue utilizado para calcular la concentración de glucosa liberada en la reacción. La concentración de glucosa liberada se calculó mediante interpolación en una recta de calibración que fue preparada con concentraciones de 0.0, 0.4, 0.8, 1.4, 2.0, 4.0, 5.55, 6.0 y 8.0 mM de glucosa y calculada mediante regresión lineal utilizando una hoja de cálculo en Microsoft Excel. Todos los puntos de la recta de calibración se midieron por duplicado. Por último, se calculó la actividad volumétrica de  $\beta$ -glucosidasa en las muestras a partir de la concentración de glucosa liberada utilizando la fórmula  $Actividad (U/mL) = glucosa liberada (mM) / tiempo (min) * factor de dilución$ . Una unidad de actividad de  $\beta$ -glucosidasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto a partir de celobiosa en las condiciones del ensayo (50°C, pH 5.0).

Se calculó la actividad de  $\beta$ -glucosidasa por unidad de biomasa de las 9 clonas analizadas. Para ello se utilizó la misma fórmula que en la sección 6.6.8.4, excepto que se reemplazó concentración de proteínas por actividad volumétrica de  $\beta$ -glucosidasa. Por último, se seleccionaron las clonas de *P. pastoris* KM71BGlu con la mayor actividad de  $\beta$ -glucosidasa volumétrica y la mayor actividad por unidad de biomasa como las sobreproductoras de BGlu y se calcularon los niveles de producción de la proteína heteróloga utilizando la fórmula  $Niv. Prod. (mg/mL) = Act. Vol. (U/mL) / Act. Esp. P. (U/mg)$ , donde *Niv. Prod.* son los niveles de producción de BGlu, *Act. Vol.* representa la actividad volumétrica de  $\beta$ -glucosidasa en el medio libre de células y *Act. Esp. P.* es la actividad específica promedio de BGlu calculada como se indica en la sección 6.7.4.3.

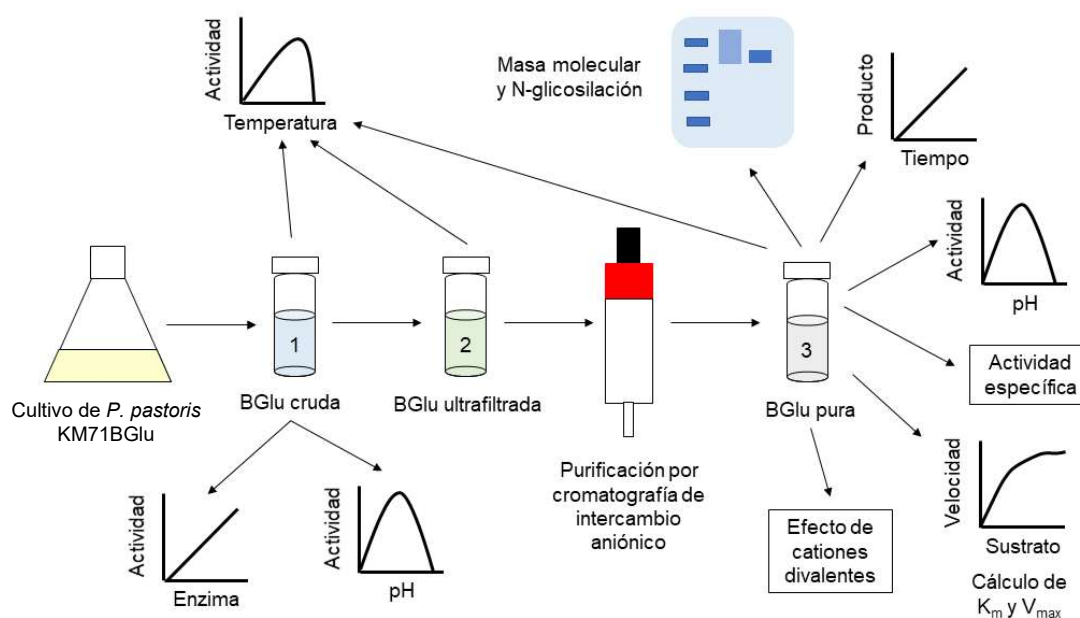
#### **6.6.8.6. Relación entre producción de proteínas y actividad de $\beta$ -glucosidasa**

La actividad volumétrica de  $\beta$ -glucosidasa de las 9 clonas analizadas (6.6.8.5) se correlacionó con la concentración de proteínas extracelulares y con el rendimiento producto/biomasa. Para ello, estos datos se graficaron en una hoja de cálculo de Excel utilizando gráficos de dispersión x/y, donde el eje de las x indica la concentración de proteínas extracelulares o el rendimiento producto/biomasa y el eje de las y corresponde

a la actividad enzimática. Se ajustaron los datos a un modelo de regresión lineal y se calculó el coeficiente de determinación.

## 6.7. Caracterización bioquímica de la $\beta$ -glucosidasa de *C. formosanus* producida en *P. pastoris* (BGlu)

### 6.7.1. Estrategia general



**Figura 7.** Representación esquemática de la estrategia general para la caracterización bioquímica de la  $\beta$ -glucosidasa de *C. formosanus* producida en *P. pastoris* (BGlu)

La  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* fue producida mediante cultivos en condiciones de inducción con metanol utilizando una cepa de *P. pastoris* KM71 productora de esta enzima (clona 3, sección 7.2.6). A la enzima producida en *P. pastoris* se le denominó BGlu. Se realizó una caracterización parcial de BGlu utilizando el medio libre de células, en la cual se determinó 1) la relación entre la concentración de enzima y la actividad observada y 2) el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de BGlu cruda. Posteriormente, BGlu fue purificada mediante cromatografía de intercambio aniónico y se realizó una caracterización bioquímica de la enzima purificada en la que se determinó lo siguiente: 1) masa molecular y N-glicosilación, 2) tiempo máximo de reacción al que se puede medir la velocidad inicial de reacción, 3) efecto del pH y la temperatura sobre la actividad, 4) actividad específica en las condiciones óptimas, 5)

constantes cinéticas  $K_m$ ,  $k_{cat}$  y  $V_{max}$ , 6) inhibición por glucosa y determinación del  $K_i$  por glucosa y 7) termoestabilidad. Por último, se comparó el efecto de la temperatura en BGlu cruda, ultrafiltrada y purificada y se evaluó el efecto de cationes divalentes en la actividad de BGlu purificada a distintas temperaturas y el efecto de un catión divalente y del glicerol en la termoestabilidad de BGlu (Figura 7).

## **6.7.2. Caracterización parcial de BGlu cruda**

### **6.7.2.1. Producción de BGlu**

Se realizó un cultivo en lote de la clona 3 de *P. pastoris* KM71BGlu (7.2.6) para producir BGlu. El cultivo se desarrolló en tres fases que se describen a continuación. Las mediciones de densidad óptica se determinaron utilizando un espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad).

1. Fase de reactivación: Se inocularon 3 tubos para centrifuga de 50 mL conteniendo 10 mL de medio YPD con 100  $\mu$ L de conserva de la clona 3 de *P. pastoris* y se incubaron por 16-24 h a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 6-8.
2. Fase de crecimiento: Los cultivos anteriores se utilizaron para inocular 600 mL de medio BMG, ajustando a una  $DO_{600}$  inicial de 0.3. Este nuevo cultivo se incubó en un matraz de 6 L a 30°C con agitación a 250 rpm en una incubadora Lab-Line 3526 durante ~10 h hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 5-6.
3. Fase de inducción: La biomasa obtenida en el cultivo anterior se recuperó por centrifugación a 4,500 rpm por 10 min y se suspendió en 120 mL de medio BMM. El cultivo se pasó a un matraz de 1 L y se incubó por 36 h a 30°C y 250 rpm utilizando una incubadora MaxQ™ 6000 (Thermo Scientific). Se agregó metanol a una concentración final de 0.75% cada 12 h para inducir la expresión de la proteína heteróloga. La  $DO_{600}$  se monitoreó cada 12 h. Al finalizar el cultivo, éste se centrifugó por 10 min a 4,500 rpm y 4°C y el medio libre de células se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Finalizado el cultivo, se midió la concentración de proteínas extracelulares y la actividad de  $\beta$ -glucosidasa de acuerdo con las metodologías descritas en las secciones 6.6.7.2 y



6.6.7.3, respectivamente, con la siguiente modificación: para la recta de calibración de glucosa se utilizaron concentraciones de 0.0, 0.4, 0.8, 1.4, 2.0, 4.0, 5.55, 6.0 y 8.0 mM.

#### **6.7.2.2. Relación entre la concentración de BGlu y la actividad enzimática observada**

Con el fin de determinar la relación enzima-sustrato adecuada para que en futuros ensayos el sustrato no fuera un factor limitante y la actividad de BGlu observada dependiera únicamente de la concentración de enzima, se estudió la relación entre la concentración de BGlu y la actividad enzimática observada empleando una concentración constante de sustrato. Para ello, se midió la actividad de  $\beta$ -glucosidasa de distintas diluciones del medio libre de células descrito en la sección 6.7.2.1 utilizando la misma metodología que en dicha sección. Las diluciones del medio libre de células empleadas fueron 1:5, 1:6.67, 1:10, 1:20 y 1:50. Se realizó un gráfico de dispersión x/y utilizando una hoja de cálculo de Excel para mostrar la relación entre el inverso de la dilución y la actividad volumétrica observada, y esta relación se analizó utilizando un modelo de regresión lineal. Por último, se definió el rango de concentraciones de BGlu que presentan una relación lineal directa con la actividad observada.

#### **6.7.2.3. Efecto del pH y la temperatura en la actividad de BGlu cruda**

Para evaluar el efecto del pH en la actividad de BGlu cruda, primero se prepararon los siguientes buffers: buffer de acetato de sodio 100 mM pH 4.0, buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0, buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 7.0 y buffer de Tris-HCl pH 8.0. Posteriormente, se midió la actividad de  $\beta$ -glucosidasa en el medio libre de células descrito en la sección 6.7.2.1 al pH de los distintos buffers. Para ello, se utilizó una dilución 1:5 del medio libre de células y se siguió la metodología indicada en la sección 6.7.2.1, excepto que se reemplazó la celobiosa 2% en buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 por celobiosa disuelta en cada uno de los buffers mencionados.

Para evaluar el efecto de la temperatura en la actividad de BGlu cruda, se midió la actividad de  $\beta$ -glucosidasa en el medio libre de células descrito en la sección 6.7.2.1 a 30, 40, 50, 60 y 70°C. Para ello se emplearon diluciones 1:5 y 1:10 del medio libre de células y se utilizó la metodología indicada en la sección 6.7.2.1, excepto que 1) la temperatura

de incubación de la mezcla de celobiosa con muestra fue de 30, 40, 50, 60 y 70°C y 2) la celobiosa 2% en buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 se reemplazó por celobiosa 2% disuelta en el buffer de mayor actividad de BGlu de acuerdo con el experimento anterior.

### **6.7.3. Purificación de BGlu**

#### **6.7.3.1. Selección del buffer para la purificación de BGlu**

Se probaron dos posibles buffers para la purificación de BGlu que cumplieran con los requisitos 1) presentar un pH 2-3 unidades mayor que el punto isoeléctrico de BGlu y 2) ser uno de los buffers recomendados por el proveedor para la purificación de proteínas utilizando una columna de intercambio aniónico HiTrap Q FF (GE Healthcare). Los buffers probados fueron Tris-HCl 200 mM pH 7.0 y TEA-HCl 100 mM pH 7.0, mientras que el buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 7.0 sirvió como control positivo. Primero, se investigó el posible efecto inhibitorio del Tris y de la trietanolamina en la actividad de BGlu. Para ello, se midió la actividad de  $\beta$ -glucosidasa en diluciones apropiadas del medio libre de células descrito en la sección 6.7.2.1 en concentraciones finales de Tris-HCl 100 mM pH 7.0, TEA-HCl 50 mM pH 7.0 y buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0 siguiendo la metodología descrita en la sección 6.7.2.1, excepto que se reemplazó la celobiosa 2% en buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 por celobiosa 2% disuelta en Tris-HCl 200 mM pH 7.0, TEA-HCl 100 mM pH 7.0 o buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 7.0. Segundo, se investigó la reversibilidad del posible efecto inhibitorio de la trietanolamina. Para ello, una alícuota de 75  $\mu$ L del medio libre de células fue diluida en 250  $\mu$ L de TEA-HCl 100 mM pH 7.0 o buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 7.0 y se midió su actividad de  $\beta$ -glucosidasa. Posteriormente, se realizó un cambio de buffer utilizando unidades de filtración Microcon-10kDa (Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante, con un total de 2 lavados con buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 7.0 para una elución final de la muestra en 250  $\mu$ L del mismo buffer. Se midió la actividad de  $\beta$ -glucosidasa de estas muestras y se comparó con la actividad de las muestras originalmente disueltas en TEA-HCl 100 mM pH 7.0 o buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 7.0. Tercero, se investigó el posible efecto inhibitorio de concentraciones bajas de TEA. Para ello, se midió la actividad de  $\beta$ -glucosidasa del medio libre de células descrito en la sección 6.7.3.2 en buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 6.0 y buffer de

fosfato de potasio 50 mM pH 6.0 adicionado con 2 mM de TEA. Las actividades de  $\beta$ -glucosidasa en los distintos buffers se midieron por triplicado y las diferencias entre las medias se analizaron mediante ANOVA de un factor seguido de prueba de Tuckey ([http://astatsa.com/OneWay\\_Anova\\_with\\_TukeyHSD/](http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/)) o prueba de T-student (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>).

### **6.7.3.2. Producción y ultrafiltración de BGlu**

Se realizó un cultivo en lote de la clona 3 de *P. pastoris* KM71BGlu (7.2.6), para producir BGlu. El cultivo se desarrolló en tres fases que se describen a continuación. Las mediciones de densidad óptica se determinaron utilizando un espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad).

1. Fase de reactivación: Se inocularon 3 tubos para centrifuga de 50 mL conteniendo 10 mL de medio YPD con 100  $\mu$ L de conserva de la clona 3 de *P. pastoris* y se incubaron por 16-24 h a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 8-9.
2. Fase de crecimiento: Los cultivos anteriores se utilizaron para inocular 600 mL de medio BMG, ajustando a una DO<sub>600</sub> inicial de 0.3. Este nuevo cultivo se incubó en un matraz de 6 L a 30°C con agitación a 250 rpm en una incubadora Lab-Line 3526 durante ~10 h hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 5. La temperatura medida fue de hasta 31.5°C en algunos momentos de esta fase.
3. Fase de inducción: La biomasa obtenida en el cultivo anterior se recuperó por centrifugación a 4,500 rpm por 10 min y se suspendió en 120 mL de medio BMM. El cultivo se pasó a un matraz de 1 L y se incubó por 84 h a 30°C y 250 rpm utilizando una incubadora MaxQ™ 6000 (Thermo Scientific). Se agregó metanol a una concentración final de 0.75% a las 12, 24, 41 y 74 h para inducir la expresión de la proteína heteróloga. La DO<sub>600</sub> se monitoreó a las 12, 24, 41, 74 y 84 h de inducción. Al finalizar el cultivo, éste se centrifugó por 10 min a 4,500 rpm y 4°C y el medio libre de células se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Se midió la concentración de proteínas extracelulares y la actividad de  $\beta$ -glucosidasa del medio libre de células del cultivo anterior de acuerdo con las metodologías descritas en la

sección 6.7.2.1. Posteriormente, se realizó una ultrafiltración y concentración con cambio de buffer del medio libre de células utilizando una unidad de filtración Amicon® Ultra-4 10K (Merck) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En total se realizaron 3 lavados con buffer TEA-HCl 20 mM pH 7.5 para una elución final de la muestra en este buffer. En este proceso se pasó de un volumen inicial de 110 mL a un volumen final de 2.75 mL. Se determinó la concentración de proteínas totales y la actividad de  $\beta$ -glucosidasa en el concentrado proteico de acuerdo con las metodologías descritas en la sección 6.7.2.1 y se calculó el porcentaje de recuperación de proteínas y actividad. Cuatro alícuotas de 50  $\mu$ L c/u de este concentrado se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso y el resto se utilizó para purificar BGlu como se indica en la sección 6.7.3.3.

### **6.7.3.3. Purificación de BGlu mediante cromatografía de intercambio aniónico**

La enzima BGlu se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico a partir del concentrado proteico descrito en la sección 6.7.3.2 utilizando un sistema de cromatografía BioLogic LP (Bio-Rad). Primeramente, una columna de intercambio aniónico HiTrap Q FF de 1 mL (Ge Healthcare) fue equilibrada con 10 mL de buffer A (TEA-HCl 20 mM, pH 7.5, filtrado por vacío con filtro de 0.45  $\mu$ m y desgasificado) a un flujo de 1 mL/min, seguido de 10 mL de buffer B (TEA-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 7.5, filtrado por vacío con filtro de 0.45  $\mu$ m y desgasificado) y nuevamente 10 mL de buffer A. Posteriormente, el concentrado proteico (sección 6.7.3.2) fue filtrado con un filtro de 0.2  $\mu$ m e inmediatamente aplicado a la columna. Las proteínas fueron eluidas con buffer B utilizando un gradiente escalonado (buffer A 100% por 10 min, buffer B 5% por 10 min, buffer B 35% por 10 min, buffer B 60% por 10 min, buffer B 100% por 10 min, buffer A 100% por 10 min) a un flujo de 1 mL/min. La cromatografía se monitoreó mediante la medición in situ de conductividad y absorbancia a longitud de onda de 260 nm y se colectaron las fracciones de proteínas de acuerdo con la señal de absorbancia. Se midió la concentración de proteínas y actividad de  $\beta$ -glucosidasa en las fracciones recuperadas utilizando las metodologías descritas en la sección 6.7.2.1 y se calculó el porcentaje de recuperación de proteínas y actividad.

## **6.7.4. Caracterización bioquímica de BGlu purificada**

### **6.7.4.1. Evaluación de la masa molecular aparente y N-glicosilación de BGlu**

Las fracciones recuperadas por cromatografía con actividad de  $\beta$ -glucosidasa (sección Purificación de BGlu mediante cromatografía de intercambio aniónico 6.7.3.3) y el concentrado proteico del medio libre de células (sección 6.7.3.2) fueron analizados mediante SDS-PAGE para determinar la masa molecular aparente y la posible N-glicosilación de BGlu. Para ello, volúmenes equivalentes a  $\sim 18 \mu\text{g}$  de proteínas de cada muestra fueron primeramente desalados y concentrados utilizando unidades de filtración Amicon Ultra-0.5 mL 10K (Merck) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En total se realizaron 3 lavados con agua destilada para una elución final de cada muestra en  $50 \mu\text{g}$  agua. Las muestras se concentraron posteriormente utilizando un concentrador de vacío CentriVap (Labconco) a una temperatura de  $40^\circ\text{C}$  hasta alcanzar un volumen de  $9\text{-}10 \mu\text{L}$ .

Un total de  $6 \mu\text{L}$  ( $\sim 12 \mu\text{g}$ ) de cada uno de los concentrados anteriores se digirieron con la enzima Endo H<sub>f</sub> (NEB) para remover la posible N-glicosilación de las proteínas como se indica en la sección 6.6.7.4. Posteriormente, los concentrados proteicos tratados y sin tratamiento con Endo H<sub>f</sub>, así como Endo H<sub>f</sub> sola, se analizaron por SDS-PAGE como se indica en la sección 6.6.7.4. Se aplicaron  $10 \mu\text{L}$  ( $\sim 6 \mu\text{g}$  de proteína) de las reacciones de tratamiento de los concentrados con Endo H<sub>f</sub> y  $3 \mu\text{L}$  ( $\sim 6 \mu\text{g}$  de proteína) de cada uno de los concentrados sin tratar en el gel. El gel fue posteriormente teñido y analizado como se indica en la sección 6.6.7.4.

### **6.7.4.2. Determinación del tiempo máximo de reacción que permite la medición de la velocidad inicial de reacción de BGlu**

Para seleccionar el tiempo de incubación del complejo enzima-sustrato a utilizar en subsecuentes ensayos de actividad, se determinó el tiempo máximo de reacción al que se puede medir la velocidad inicial de reacción de BGlu. Para ello, se analizó la relación entre la glucosa liberada por BGlu y el tiempo de reacción utilizando celobiosa 1% ( $29.2 \text{ mM}$ ) como sustrato como se describe a continuación:

1. Fase de hidrólisis de celobiosa: A un tubo para microcentrífuga se le agregaron  $50 \mu\text{L}$  de celobiosa 2% en buffer de acetato de sodio  $100 \text{ mM}$  pH 5.0 y  $40 \mu\text{L}$  de

agua destilada estéril. El tubo con la mezcla se precalentó por 10-15 min a 50°C utilizando un ThermoMixer® confort (Eppendorf). Después, un volumen de 10 µL de una dilución 1:10 de la fracción 2 de BGlu (sección 7.3.2.2) en buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0 se agregó al tubo anterior para un factor de dilución de la muestra de 100. La mezcla de celobiosa con muestra se incubó a 50°C por exactamente 5, 10, 20, 30 o 45 min y la reacción se detuvo a 100°C por 10 min utilizando un bloque de calentamiento análogo (VWR). Finalmente, los tubos se dejaron enfriar 5 min a temperatura ambiente. Las reacciones de incubación enzima-sustrato se realizaron por triplicado para cada tiempo. Además, un blanco de sustrato y un blanco de muestra para cada tiempo de reacción también se procesaron de la misma manera. La reacción del blanco de sustrato consistió en una mezcla de 50 µL de celobiosa 2% en buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0 con 50 µL de agua destilada estéril (sin muestra), mientras que la reacción del blanco de muestra consistió en 50 µL de buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0 (sin celobiosa) con 50 µL de dilución 1:50 de la muestra en agua destilada estéril.

2. Fase de detección de glucosa: A 1.5 mL de reactivo GOPOD (kit K-GLUC de Megazyme) se le agregaron 50 µL de las reacciones obtenidas en la fase de hidrólisis de celobiosa. Las mezclas se incubaron por 20 min a 50°C utilizando un ThermoMixer® confort (Eppendorf) y posteriormente se midió su absorbancia a una longitud de onda de 510 nm utilizando un espectrofotómetro DU® 650 (Beckman Coulter). A la absorbancia obtenida por las reacciones de celobiosa con muestra se le restó la absorbancia de sus respectivos blancos y este valor fue utilizado para calcular la concentración de glucosa liberada en la reacción. La concentración de glucosa liberada se calculó mediante interpolación en una recta de calibración que fue preparada con concentraciones de 0.0, 0.4, 0.8, 1.4, 2.0, 4.0, 5.55, 6.0 y 8.0 mM de glucosa y calculada mediante regresión lineal utilizando una hoja de cálculo en Microsoft Excel. Todos los puntos en la recta de calibración se midieron por duplicado.

3. Análisis de regresión: Se analizó la relación entre el tiempo de reacción del complejo enzima-sustrato y la concentración de glucosa liberada por BGlu a partir de celobiosa utilizando un modelo de regresión lineal. Se verificó en qué rango de tiempos de reacción existe una relación proporcional directa entre las variables y se decidió en base a ello el tiempo máximo de reacción que permite medir la velocidad inicial de reacción de BGlu.

#### **6.7.4.3. Efecto del pH y la temperatura en la actividad de BGlu y determinación de su actividad específica**

Se evaluó el efecto del pH en la actividad de las fracciones 2 y 3 provenientes de la purificación de BGlu (sección 7.3.2.2). Para ello, primero se prepararon los siguientes buffers: buffer de glicina-HCl 500 mM pH 3.0, buffer de acetato de sodio 100 mM pH 4.0, buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0, buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 7.0 y buffer de TEA-HCl pH 8.0. Posteriormente, se midió la actividad de  $\beta$ -glucosidasa de las fracciones de BGlu en los distintos buffers siguiendo la metodología indicada en la sección 6.7.2.1, excepto que se reemplazó la celobiosa 2% en buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 por celobiosa disuelta en cada uno de los buffers mencionados. Para cada valor de pH se calculó el porcentaje de actividad relativo al máximo y las diferencias entre las dos fracciones para cada valor de pH se analizaron mediante una prueba de T-student (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>).

Para evaluar el efecto de la temperatura en la actividad de las fracciones 2 y 3 de BGlu, se midió la actividad de  $\beta$ -glucosidasa a 30, 40, 50, 60 y 70°C. Para ello se utilizó la metodología indicada en la sección 6.7.2.1, excepto que 1) la temperatura de incubación de la mezcla de celobiosa con muestra fue de 30, 40, 50, 60 y 70°C y 2) la celobiosa 2% en buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 se reemplazó por celobiosa 2% disuelta en el buffer de mayor actividad de BGlu de acuerdo con el experimento anterior. Para cada temperatura se calculó el porcentaje de actividad relativo al máximo y las diferencias entre las dos fracciones en cada temperatura se analizaron mediante prueba de T-student (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>).

Las actividades específicas de las fracciones 2 y 3 de BGlu se calcularon utilizando la ecuación  $Act.Esp.F.(U/mg) = Act.Opt.(U/mL) / Proteínas (mg/mL)$ , donde  $Act.Esp.F.$  representa la actividad específica de la fracción,  $Act.Opt.$  es la actividad volumétrica de la fracción a las condiciones de pH y temperatura donde presenta mayor actividad, y  $Proteínas$  representa la concentración de proteínas totales en la fracción. Por otra parte, la actividad específica promedio de BGlu se calculó mediante la ecuación  $Act.Esp.P. = Act.Esp.F2 \left( \frac{Prot.F2}{Prot.F2+Pr.F3} \right) + Act.Esp.F3 \left( \frac{Prot.F3}{Prot.F2+Pr.F3} \right)$ , donde  $Act.Esp.P.$  representa la actividad específica promedio de BGlu,  $Act.Esp.F2$  y  $Act.Esp.F3$  son las actividades específicas de las fracciones 2 y 3, y  $Prot.F2$  y  $Prot.F3$  representan la cantidad de proteínas recuperadas en las fracciones 2 y 3.

#### **6.7.4.4. Determinación de las constantes cinéticas de BGlu**

Se determinaron las constantes cinéticas de las fracciones 2 y 3 de BGlu mediante ensayos de actividad enzimática a 50°C y pH 5.0 utilizando celobiosa como sustrato. Para ello, primero se prepararon soluciones de celobiosa 58.4, 20.0, 10.0, 8.0, 4.0, 2.0, 1.0 y 0.6 mM en buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0. Los ensayos de actividad se realizaron como se indica en la sección 6.6.8.5 con las siguientes modificaciones: 1) la actividad en la fracción 2 se midió utilizando concentraciones finales de celobiosa de 29.2, 10.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5 y 0.3 mM en las reacciones; 2) la actividad en la fracción 3 se midió utilizando concentraciones finales de celobiosa de 29.2, 10.0, 5.0, 4.0, 2.0 y 1.0 mM; 3) las muestras se diluyeron apropiadamente para la medición de la actividad; 4) la actividad de BGlu a cada concentración de celobiosa se determinó por triplicado; y 5) se preparó un blanco de sustrato y un blanco de muestra para cada concentración de celobiosa.

La relación entre la velocidad de reacción de las fracciones 2 y 3 de BGlu y la concentración de celobiosa se analizó mediante un ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten con un programa escrito en Phyton para determinar la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima de reacción ( $V_m$ ), y a partir de estos datos se estimó también la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) y la actividad específica a condiciones óptimas de cada fracción como se indica en la sección 6.7.4.3.



#### **6.7.4.5. Determinación del efecto inhibitorio de la glucosa sobre la actividad de BGlu y cálculo de la constante de inhibición por glucosa**

El efecto inhibitorio de la glucosa sobre BGlu se evaluó mediante la determinación de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa de la fracción 2 de la cromatografía obtenida en la sección 7.3.2 utilizando p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG) como sustrato. Para ello, se realizaron reacciones de actividad de  $\beta$ -glucosidasa como se indica en la sección 6.6.8.5 con algunas diferencias: 1) las reacciones se incubaron por 10 minutos a 50°C en buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.0; 2) las reacciones se realizaron utilizando 7.5, 10.0 y 12.5 mM de pNPG como sustrato en lugar de celobiosa; 3) las reacciones se realizaron en presencia de 0, 100, 200, y 400 mM de glucosa; y 4) tras la incubación de 10 minutos, las reacciones se detuvieron con la adición de 0.9 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. Tras la reacción enzimática, se cuantificó la liberación de p-nitrofenol mediante espectrofotometría a 405 nm utilizando un coeficiente de extinción molar de 18,300 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (De Ovalle et al. 2021). A partir estos datos, se calculó también la constante de inhibición por glucosa (K<sub>i</sub>) de BGlu. Para ello, se elaboró una gráfica de Dixon (recíproco de la tasa de reacción vs concentración de glucosa) y se calculó el valor negativo del eje x en el cual se intersecaron las líneas de tendencia de los datos de cada concentración de pNPG.

#### **6.7.5. Evaluación del efecto de cationes divalentes en la actividad de BGlu a distintas temperaturas**

##### **6.7.5.1. Comparación del efecto de la temperatura en la actividad de BGlu cruda, desalada y purificada**

Se comparó el efecto de la temperatura en la actividad de 1) las fracciones 2 y 3 de BGlu purificada, 2) dos medios libres de células provenientes de dos cultivos distintos de *P. pastoris* KM71BGlu y 3) un medio libre de células de un cultivo de *P. pastoris* KM71BGlu desalado mediante ultrafiltración. Los datos experimentales del efecto del pH en la actividad de las fracciones de BGlu purificada se tomaron de la sección 7.3.3.3, mientras que los datos experimentales del efecto de la temperatura en la actividad de un medio libre de células de un cultivo de *P. pastoris* KM71BGlu se tomaron de la sección 7.3.1.

Para obtener los demás datos experimentales, primero se realizó un nuevo cultivo de la clona 3 de *P. pastoris* KM71BGlu como se describe en la sección 6.6.8.2, excepto que la fase de crecimiento se llevó hasta una DO<sub>600</sub> de 4.5 y los volúmenes de cultivo en las fases de crecimiento e inducción fueron el doble. Una alícuota del medio libre de células crudo de este cultivo fue utilizado para medir el efecto de la temperatura en la actividad de β-glucosidasa como se indica en la sección 6.7.4.3. El resto del medio libre de células de este cultivo se desaló como se describe en la sección 6.7.4.1 y posteriormente fue utilizado para medir el efecto de la temperatura en la actividad enzimática (sección 6.7.4.3).

Se calculó el porcentaje de actividad relativo al máximo para cada una de las muestras anteriores y las diferencias entre muestras a cada temperatura se analizaron mediante ANOVA de un factor seguido de prueba de Tuckey ([http://astatsa.com/OneWay\\_Anova\\_with\\_TukeyHSD/](http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/)).

#### **6.7.5.2. Efecto de cationes divalentes en la actividad de BGlu purificada**

Se investigó el efecto de Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la actividad de BGlu a 50°C y 60°C mediante ensayos de actividad. Para ello, se midió la actividad de β-glucosidasa en la fracción 2 de BGlu purificada (7.3.2.2) como se indica en la sección 6.6.8.5, excepto que las reacciones se adicionaron con concentraciones finales de 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> o CaCl (o ningún aditivo como control) y se llevaron a cabo tanto a 50°C como a 60°C. Se calculó el porcentaje de actividad relativo al control para cada uno de los cationes y las diferencias entre tratamientos a cada temperatura se analizaron mediante ANOVA de un factor seguido de prueba de Tuckey ([http://astatsa.com/OneWay\\_Anova\\_with\\_TukeyHSD/](http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/)).

#### **6.7.6. Evaluación de la termoestabilidad de BGlu**

La termoestabilidad de BGlu se evaluó utilizando la fracción 2 obtenida por cromatografía en la sección 7.3.2. Para ello, se incubó por triplicado un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml con una alícuota de fracción 2 de β-glucosidasa BGlu diluida en 50 μl de agua estéril. El tubo con la enzima se precalentó por 30 min a 30, 40, 50 y 60°C utilizando un ThermoMixer® R (Eppendorf) y posteriormente se agregó al tubo con celobiosa 2% descrito en la sección 6.6.8.5 para medir la actividad de β-glucosidasa como se describe en dicha sección. Las actividades obtenidas se dividieron entre la actividad de

$\beta$ -glucosidasa control (sin precalentar la enzima BGlu antes de la reacción enzimática) para obtener la actividad residual a 50°C y pH 5.0 de  $\beta$ -glucosidasa BGlu pretratada con calor.

Para evaluar el efecto de aditivos en la termoestabilidad de BGlu, se determinó la termoestabilidad de BGlu conforme se indica en el párrafo anterior con una diferencia: el tubo de mezcla antes de agregar la enzima se compuso de 50  $\mu$ L de celobiosa 2% en buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5.0, 35  $\mu$ L de agua destilada estéril y 10  $\mu$ L de  $MnSO_4$  10 mM o de glicerol para una concentración final en la reacción de  $MnSO_4$  1 mM o glicerol 10 %. Para cada temperatura de precalentamiento de BGlu se calculó el porcentaje de actividad residual relativo al máximo (sin precalentamiento) y las diferencias entre los aditivos en cada temperatura se analizaron mediante ANOVA de un factor seguido de prueba de Tuckey ([http://astatsa.com/OneWay\\_Anova\\_with\\_TukeyHSD/](http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/)).

#### **6.8. Análisis estadístico**

Los datos en este trabajo se analizaron mediante ANOVA de un factor seguido de prueba de Tuckey ([http://astatsa.com/OneWay\\_Anova\\_with\\_TukeyHSD/](http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/)), prueba T-student (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>) o prueba de Chi-cuadrada utilizando herramientas de análisis estadístico en línea. El análisis seguido para cada experimento se detalla en la sección correspondiente.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Selección de una $\beta$ -glucosidasa con propiedades atractivas para su aplicación en nutrición animal

#### 7.1.1. Proceso de selección de una $\beta$ -glucosidasa con propiedades atractivas para su aplicación en nutrición animal

Se encontraron 42 enzimas reportadas en la literatura científica con actividad  $\beta$ -glucosidasa que cumplieron con los criterios de selección. La lista de estas enzimas, sus claves de acceso de GenBank y las referencias a partir de las que se obtuvieron sus propiedades se pueden consultar en el anexo 3. Las enzimas encontradas forman parte de las familias GH1 y GH3 de las glucósido hidrolasas y pertenecen a organismos de distintos grupos taxonómicos como bacterias, hongos, insectos y organismos no cultivados a partir de muestras ambientales. Estas enzimas presentan masas moleculares teóricas entre 49 y 96 kDa en sus formas monoméricas, actividades específicas hasta 130,000 U/mg y constantes de inhibición por glucosa entre 0.28 mM y 3.5 M. La mayoría de las enzimas GH3 encontradas son de origen fúngico y de masa molecular teórica de 76-96 kDa, mientras que las enzimas GH1 encontradas están distribuidas en diversos grupos taxonómicos y presentan masas moleculares teóricas de 49-60 kDa.

La comparación de las actividades específicas de las  $\beta$ -glucosidasas evaluadas tomó en cuenta dos consideraciones:

1. La actividad específica de  $\beta$ -glucosidasa se reporta en la mayoría de las publicaciones consultadas utilizando celobiosa o 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG) como sustrato. Se dio preferencia a las actividades específicas reportadas utilizando celobiosa como sustrato, debido a que éste es el sustrato real de la enzima para su aplicación en nutrición animal y a que las actividades específicas de las  $\beta$ -glucosidasas utilizando estos dos sustratos no están correlacionadas de forma directa (Sørensen et al. 2013).
2. Existen dos definiciones de unidad (U) de  $\beta$ -glucosidasa empleando celobiosa como sustrato en la literatura consultada. Una de estas definiciones indica que una unidad es la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto a partir de celobiosa, mientras que la otra definición indica que una unidad es la cantidad

de enzima que hidroliza 1  $\mu\text{mol}$  de celobiosa por minuto. Para poder comparar los valores de actividad específica de las distintas publicaciones, los valores reportados utilizando la primera definición se dividieron entre 2 para ajustarlos a la segunda definición. Por su parte, los valores de actividad específica tomados de publicaciones en las que no se indica la definición de unidad se marcan con “\*” y pueden ser la mitad del valor reportado.

Las  $\beta$ -glucosidasas evaluadas presentan actividades específicas entre 0 y 1,480 U/mg\* utilizando celobiosa como sustrato, siendo una  $\beta$ -glucosidasa de *Aspergillus niger* NL-1 la de mayor actividad. Sin embargo, la actividad específica de esta enzima a 40°C y pH 6.0 es de sólo 93 U/mg\*. En cambio, las cinco  $\beta$ -glucosidasas encontradas con la mayor actividad específica a 40°C y pH 6.0 utilizando celobiosa como sustrato fueron una  $\beta$ -glucosidasa de la termita *Coptotermes formosanus* (440 U/mg\*), una  $\beta$ -glucosidasa del gusano de seda *Bombyx mori* (317 U/mg), PaBG1b de la cucaracha *Panesthia angustipennis spadica* producida en *P. pastoris* (284 U/mg), BGL1 de un hongo del género *Periconia* (251 U/mg\*) y BGL de la bacteria *Thermoanaerobacterium aotearoense* (222 U/mg). Además, PaBG1b de *P. angustipennis* nativa (1,020 U/mg) y RfBGluc1 de la termita *Reticulitermes flavipes* (638 U/mg\*) presentaron alta actividad específica en condiciones cercanas a 40°C y pH 6.0, pero su actividad a estas condiciones no pudo ser calculada por falta de datos experimentales. En el caso de PaBG1b de *P. angustipennis*, se decidió tomar la información sobre la enzima expresada en *P. pastoris*.

De las enzimas con mayor actividad específica a 40°C y pH 6.0, BGL1 de *Periconia sp.* se descartó por presentar una  $K_i$  por glucosa de 20 mM y masa molecular teórica >90 kDa. En cambio, la  $\beta$ -glucosidasa de *C. formosanus* ( $K_i > 1$  M), PaBG1b de *P. angustipennis* ( $K_i = 0.2$  M) y BGL de *T. aotearoense* ( $K_i = 0.8$  M) poseen constantes de inhibición por glucosa mayores a 100 mM y masa molecular teórica <60 kDa, por lo que fueron preseleccionadas. Además, a pesar de que la  $K_i$  por glucosa no se reporta en las publicaciones originales para la  $\beta$ -glucosidasa de *B. mori* ni para RfBGluc1 de *R. flavipes*, estas enzimas tienen un 50 y 87% de identidad en su secuencia aminoacídica, respectivamente, con la  $\beta$ -glucosidasa de *C. formosanus*, por lo que estas enzimas también

se preseleccionaron. Las cinco  $\beta$ -glucosidasas preseleccionadas con propiedades atractivas para su potencial uso en nutrición animal se muestran en la Tabla 21.

De las enzimas preseleccionadas, la  $\beta$ -glucosidasa de *R. flavipes* se descartó por no ser estable a 40°C, además de que el valor de actividad a 40°C y pH 6.0 no pudo ser calculado (Tabla 21). La  $\beta$ -glucosidasa de *C. formosanus* posee la mayor  $K_i$  por glucosa, el mayor rango de pH y la estabilidad térmica a mayor temperatura de las enzimas preseleccionadas, además que ha sido producida en *E. coli* (Tabla 21). Sin embargo, esta  $\beta$ -glucosidasa puede ser la de mayor (440 U/mg) o menor (220 U/mg) actividad específica a 40°C y pH 6.0 entre las preseleccionadas, dependiendo de la definición de unidad utilizada por los autores para el cálculo de actividad. Considerando que la definición de unidad de  $\beta$ -glucosidasa más utilizada es la de cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto, es más probable que este valor sea de 220 U/mg y, por ende, el más bajo entre las enzimas preseleccionadas (Tabla 21). Por su parte, la  $\beta$ -glucosidasa de *B. mori* presenta la mayor actividad específica a 40°C y pH 6.0, pero no es estable a temperaturas mayores de 50°C y se desconoce su  $K_i$  por glucosa, además que sólo se ha producido en células de insecto (Tabla 21). La  $\beta$ -glucosidasa de *P. angustipennis* presenta la segunda mayor actividad específica a 40°C y pH 6.0 y ha sido producida en *P. pastoris*, pero no es estable a temperaturas mayores de 50°C y presenta una  $K_i$  por glucosa y un rango de pH menores que la  $\beta$ -glucosidasa de *C. formosanus* (Tabla 21). Por su parte, la  $\beta$ -glucosidasa de *T. aotearoense* posee una actividad específica a 40°C y pH 6.0 muy similar a la probable de la enzima de *C. formosanus*, pero es inferior en los demás parámetros (Tabla 21).

**Tabla 21.** Propiedades de cinco  $\beta$ -glucosidasas preseleccionadas con propiedades atractivas para su potencial uso en nutrición animal

Organismo	Clave GenBank	Familia GH	Actividad específica a 40°C y pH 6.0 (U/mg) <sup>1</sup>	$K_i$ glucosa (M)
<i>Coptotermes formosanus</i>	ADB23476	GH1	440 <sup>2</sup>	>1.0
<i>Bombyx mori</i>	AY272037	GH1	317	ND <sup>3</sup>
<i>Panesthia angustipennis spadica</i>	BAU51446	GH1	284	0.2
<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>	AKP45355	GH1	251	0.8
<i>Reticulitermes flavipes</i>	ADK12988	GH1	638 <sup>2,4</sup>	ND

<sup>1</sup>Utilizando celobiosa como sustrato. <sup>2</sup>El valor real puede ser la mitad del mostrado debido a que los autores no reportan la definición de unidad utilizada. <sup>3</sup>No determinado. <sup>4</sup>Actividad específica a temperatura ambiente y pH 6.0, ya que no se cuenta con información sobre la actividad relativa a 40°C.

Finalmente, se seleccionó la  $\beta$ -glucosidasa de la termita *C. formosanus* como la enzima con las propiedades más atractivas para su aplicación en nutrición animal, ya que presenta una de las actividades específicas más altas (220 o 440 U/mg) a las condiciones típicas del tracto digestivo de animales monogástricos (40°C y pH 6.0), es resistente a la inhibición por producto ( $K_i$  por glucosa > 1 M), es estable por 30 min a temperaturas de hasta al menos 60°C y es activa en un amplio rango de pH (Tabla 21). Esta enzima presenta una masa molecular teórica de 55 kDa y ha sido producida en *E. coli* con una masa molecular de 56 kDa (Zhang et al. 2010; 2012a). La enzima seleccionada es una de las tres  $\beta$ -glucosidasas que se han identificado en la termita *C. formosanus* y la única involucrada en la digestión de celulosa, y ha sido nombrada previamente como Glu1B (Zhang et al. 2012b).

**Tabla 21 (continuación).**  $\beta$ -glucosidasas preseleccionadas con propiedades atractivas para su potencial uso en nutrición animal

Organismo	Rango de pH <sup>1</sup>	Estabilidad térmica <sup>2</sup>	Masa molecular (kDa) <sup>3</sup>	Hospedero heterólogo <sup>4</sup>	Referencia
<i>C. formosanus</i>	3.8-8.0	>60°C	55 (56)	<i>E. coli</i>	Zhang et al. 2012a
<i>B. mori</i>	5.0-8.0	50°C	54 (57)	Células Sf9	Byeon et al. 2005
<i>P. angustipennis</i>	4.5-6.5	50°C	56 (61)	<i>P. pastoris</i>	Li et al. 2017
<i>T. aotearoense</i>	5.0-7.5	>55°C	53 (46)	<i>E. coli</i>	Yang et al. 2015
<i>R. flavipes</i>	6.0-7.0	40°C	56 (58)	Células Sf9	Scharf et al. 2010

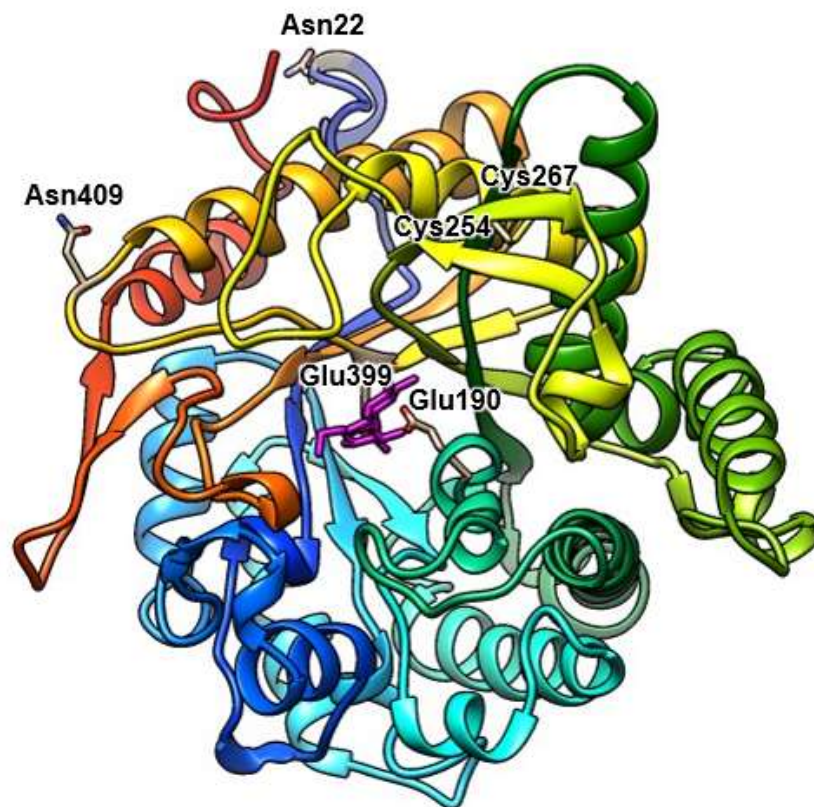
<sup>1</sup>Rango de pH en el cual la enzima conserva al menos un 30% de su actividad máxima. <sup>2</sup>Se define estabilidad térmica en esta tabla como la temperatura máxima a la cual la enzima puede ser pretratada por 30 min conservando al menos un 50% de su actividad. <sup>3</sup>Masa molecular teórica y experimental en el hospedero heterólogo (en paréntesis). <sup>4</sup>Hospedero heterólogo en el que la enzima fue producida para la medición de sus propiedades bioquímicas.

### 7.1.2. Análisis computacional de la $\beta$ -glucosidasa seleccionada

De acuerdo con el análisis realizado, se encontró que la secuencia aminoacídica de la  $\beta$ -glucosidasa seleccionada (Glu1B de *C. formosanus*) consta de 495 residuos y contiene

un péptido señal de 17 aminoácidos, por lo que la secuencia de la proteína madura se compone de 478 aminoácidos y posee una masa molecular teórica de 54.6 kDa. El servidor Phyre<sup>2</sup> construyó un modelo molecular completo de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B madura de *C. formosanus*, para el cual 472 residuos (99 %) fueron moldeados por homología utilizando la estructura de la  $\beta$ -glucosidasa de *N. koshunensis* (código PDB: 3AI0) como molde (confianza del 100% e identidad de secuencia con Glu1B de 76 %) y 6 residuos (1%) del extremo N-terminal fueron moldeados utilizando técnicas *ab initio*. El modelo de la estructura tridimensional de Glu1B obtenido con Phyre<sup>2</sup> mostró que ésta presenta un único dominio con topología de barril clásico TIM ( $\alpha/\beta$ ) característico de las enzimas glucósido hidrolasas de la familia GH1 ([https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_Hydrolase\\_Family\\_1](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_1)). con 23 hélices alfa y 13 láminas beta que cubren el 43% y 14% de la proteína, respectivamente (Figura 8). El análisis con el servidor NetNGlyc 1.0 mostró que la secuencia madura de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* contiene tres sitios potenciales de N-glicosilación: Asn22, Asn323 y Asn409, de los cuales Asn22 y Asn409 están probablemente N-glicosilados ya que mostraron una accesibilidad mayor al 45%. Asimismo, se encontró que Glu1B contiene dos residuos de cisteína Cys254 y Cys267 cuyos átomos de azufre se encuentran a una distancia de 3.75 Å, por lo que posiblemente formen un enlace disulfuro entre ellos el cual no afectaría a la geometría del sitio activo (Figura 8). Además, el análisis utilizando H<sup>++</sup> determinó que el punto isoeléctrico de Glu1B es de 4.5.



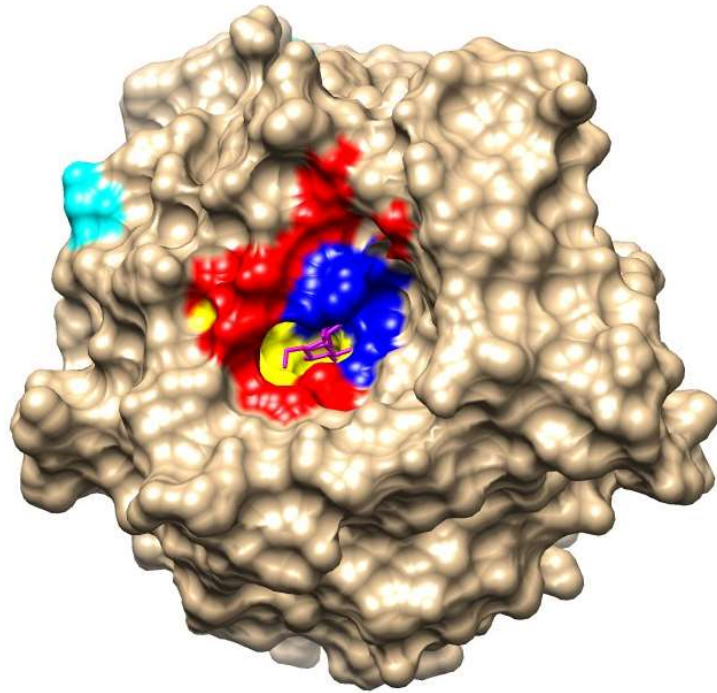


**Figura 8.** Modelo de la estructura tridimensional de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* obtenido por reconocimiento de homología utilizando Phyre<sup>2</sup>. Se sigue un código de color arcoíris del extremo N-terminal (azul) al C-terminal (rojo). Se muestran a detalle los residuos probablemente N-glicosilados (Asn22 y Asn409), los residuos que posiblemente forman un puente disulfuro (Cys254 y Cys267) y los aminoácidos catalíticos (Glu190 y Glu399).

La secuencia aminoacídica de Glu1B presentó 97% de identidad con la secuencia de la  $\beta$ -glucosidasa de la termita *C. gestroi* (Clave de GenBank: AGS32242) y 45-87% de identidad con las otras 8 secuencias de  $\beta$ -glucosidasas GH1 de insecto analizadas. En comparación, la secuencia de Glu1B presentó 24-41% de identidad con las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas GH1 de organismos no insectos y únicamente 6-10% de identidad con las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH3 de acuerdo con la matriz de porcentajes de identidad calculada a partir del alineamiento múltiple. El dendrograma Neighbor-Joining mostró que todas las  $\beta$ -glucosidasas provenientes de insecto son similares entre sí (44-97% de identidad) y forman un grupo independiente, mientras que las  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH3 son muy distintas a las de la familia GH1 (6-13% de identidad entre secuencias de familias distintas) y también conforman un grupo independiente (Figura 9).



los siguientes: 1) Gln42, Hys145, Trp146, Asn189, Asn332, Trp441, Asn446, Glu448, Trp449, Gln455 y Phe457 conforman el sitio de unión al glicón (subsitio -1) (Figura 10); 2) Thr193, Asn250, Hys252, Tyr334, Thr335 y Trp371 conforman el sitio de unión al aglicón (subsitio +1) (Figura 10); y 3) Pro191, Leu192, Ile251, Phe333, Phe447 y Arg456 son residuos de enlace entre residuos del sitio de unión al glicón y/o residuos del sitio de unión al aglicón. Además, de acuerdo con la comparación de la secuencia de Glu1B con la de la  $\beta$ -glucosidasa de *Halothermothrix orenii*, Met204, Thr358, Gln360, Ala368, Ser369, Ser370, Leu450 y Arg451 son los residuos de la entrada al túnel del sitio activo (Figura 10).



**Figura 10.** Representación superficial de la estructura tridimensional de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* mostrando el túnel de su sitio activo. El sitio de unión al glicón se muestra en color amarillo, el sitio de unión al aglicón en color azul, los residuos de la entrada al túnel se resaltan en color rojo, el residuo Asn22 que está potencialmente N-glicosilado se muestra en color cian, y una molécula de celobiosa se representa en color magenta.

El análisis de frecuencia de residuos en los sitios de unión al glicón y al aglicón y de los residuos de enlace de los tres conjuntos de secuencias de  $\beta$ -glucosidasas en función de su actividad específica (alta, media y baja) y del conjunto global de secuencias de  $\beta$ -glucosidasas depositadas en la base de datos de Glutant $\beta$ ase mostró los siguientes

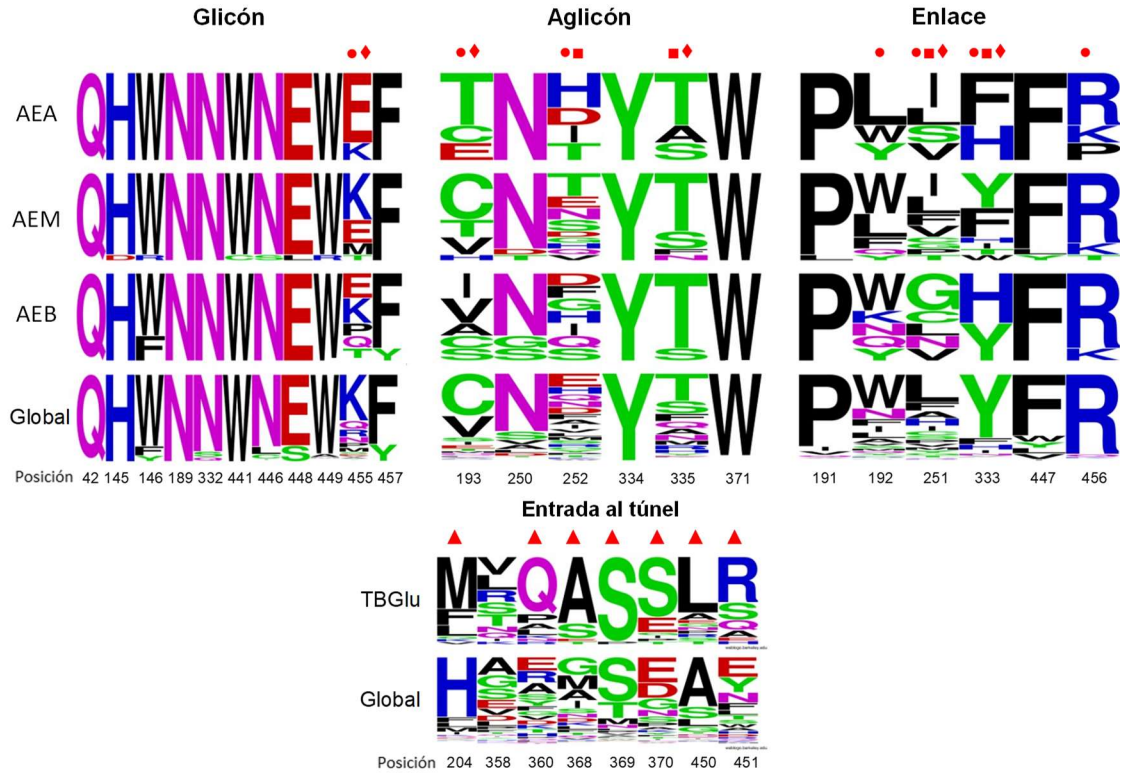
residuos conservados entre los cuatro conjuntos de secuencias: Gln42, Hys145, Thr146, Asn189, Asn332, Trp441, Asn446, Glu448, Trp449 y Phe457 para el sitio de unión al glicón; Asn250, Tyr334, Thr335 y Trp371 para el sitio de unión al aglicón; y Pro191, Phe447 y Arg456 para los residuos de enlace (Figura 11). Sin embargo, este análisis también mostró diferencias significativas en las frecuencias de aparición de residuos en un conjunto específico de secuencias de  $\beta$ -glucosidasas respecto al conjunto global de secuencias para las siguientes posiciones (Figura 11):

- La posición 455 localizada en el sitio de unión al glicón mostró una mayor frecuencia de aparición de Lys en el conjunto global de secuencias (53%). Sin embargo, Glu fue el residuo más frecuente en esta posición para las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas con alta actividad específica sobre celobiosa (80%) y se encontró una variabilidad en esta posición entre las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas con baja actividad específica (ningún aminoácido presentó una frecuencia mayor al 29%).
- La posición 193 localizada en el sitio de unión al aglicón mostró una mayor frecuencia de aparición de Cys (48%) y Val (25%) en el conjunto global de secuencias, mientras que Thr fue el residuo más frecuente entre las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas con alta actividad específica sobre celobiosa (60%) y se encontró una variabilidad en esta posición entre las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas con baja actividad específica (ningún aminoácido presentó una frecuencia mayor al 29%).
- La posición 252 localizada en el sitio de unión al aglicón mostró variabilidad de residuos en el conjunto global de secuencias. Sin embargo, se observó una mayor frecuencia de aparición de Hys únicamente entre las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas con alta actividad específica sobre celobiosa (40%).
- La posición 192 correspondiente a uno de los residuos de enlace mostró una mayor frecuencia de aparición de Trp (29%) en el conjunto global de secuencias, mientras que Leu fue el residuo más frecuente únicamente entre las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas con alta actividad específica sobre celobiosa (60%).
- La posición 251 correspondiente a uno de los residuos de enlace mostró una variabilidad de residuos en el conjunto global de secuencias, con preferencia por

Leu (32%) y otros aminoácidos alifáticos de cadena mediana. Por su parte, en las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas con alta actividad específica sobre celobiosa el aminoácido más común en esta posición fue otro aminoácido alifático de cadena mediana – Ile (40%), mientras que ambos Leu (27%) e Ile (20%) tuvieron una frecuencia de aparición similar entre las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas con actividad específica media sobre celobiosa. Sin embargo, en las secuencias con baja actividad específica sobre celobiosa el residuo más común en esta posición no fue un aminoácido alifático de cadena mediana, sino Gly (43%).

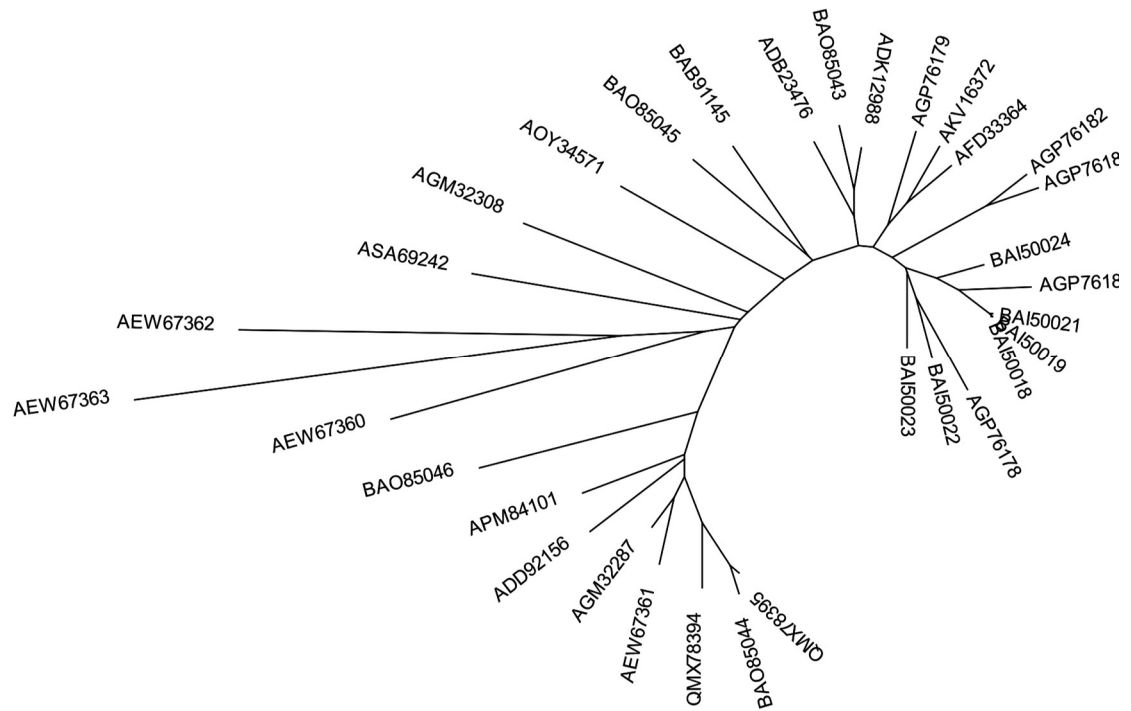
- En la posición 333 correspondiente a uno de los residuos de enlace se observó una mayor frecuencia de aparición de Tyr (73%) en el conjunto global de secuencias, mientras que Phe (60%) e Hys (40%) fueron los más frecuentes para esta posición entre las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas con alta actividad específica sobre celobiosa, Tyr (40%) y Phe (33%) las más frecuentes entre las secuencias con actividad media, y Hys (57%) y Try (43%) entre las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas con baja actividad específica sobre celobiosa.

El análisis de frecuencia de residuos para los residuos de la entrada al túnel del sitio activo de las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas mostró que 7 de las 8 posiciones analizadas presentan residuos conservados entre las secuencias de termitas a pesar de tener variabilidad en el global de las secuencias: Met204, Gln360, Ala368, Ser369, Ser370, Leu450 y Arg451 (Figura 11). Por su parte, el dendrograma mostró que las 32 secuencias de  $\beta$ -glucosidasa de termitas analizadas presentan variabilidad en sus secuencias con una identidad entre pares promedio de 60.1% (Figura 12).



**Figura 11.** WebLogos del análisis de frecuencia de residuos en los sitios de unión a glicón y aglicón y entre los residuos de enlace de las tres categorías de secuencias de  $\beta$ -glucosidasas de acuerdo con su actividad específica sobre celobiosa (AEA: actividad específica alta, AEM: actividad específica media, AEB: actividad específica baja) y del global de las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas depositadas en la base de datos Glutantbase (Mariano et al., 2020). Weblogos del análisis de frecuencia de residuos en los 8 residuos de entrada al túnel del sitio activo de 32 secuencias de  $\beta$ -glucosidasas de termitas (TBGlu, Anexo 4) y del global de todas las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas en la base de datos Glutantbase. Los círculos, cuadrados y diamantes rojos señalan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) por posición entre la frecuencia del residuo más frecuente en el grupo de secuencias de actividad específica alta, media o baja, respectivamente, contra la frecuencia del residuo más frecuente en el global de secuencias en Glutantbase. Los triángulos rojos muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) por posición entre la frecuencia del residuo más frecuente en las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas de termitas contra la frecuencia del residuo más frecuente en el global de secuencias en Glutantbase.





**Figura 12.** Dendrograma radial Neighbor-joining del alineamiento de 32 secuencias de  $\beta$ -glucosidasas de termitas. La descripción de las claves de acceso de GenBank se muestran en el anexo 4.

## 7.2. Construcción de cepas de *P. pastoris* productoras la $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *Coptotermes formosanus*

### 7.2.1. Verificación de codones de la secuencia codificante de Glu1B para su expresión en *P. pastoris*

La secuencia codificante para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* con codones optimizados para *Lactobacillus reuteri* existente en el plásmido sintético pUC57-CfBG (Anexo 1) contiene un total de 24 codones distintos. A excepción de los aminoácidos prolina (P), isoleucina (I) y fenilalanina (F), todos los aminoácidos son codificados por un único codón dentro de esta secuencia. Los codones presentes en la secuencia para los aminoácidos alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), glicina (G), histidina (H), lisina (K), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), treonina (T), valina (V), triptófano (W) y tirosina (Y), así como el codón de término, coincidieron con el codón con mayor frecuencia de uso para cada aminoácido en *P. pastoris* para genes de alta expresión en condiciones de inducción con metanol. Los codones codificantes para fenilalanina (F),

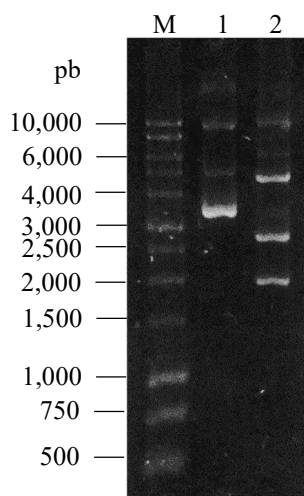
isoleucina (I) y prolina (P) presentes con mayor frecuencia en la secuencia analizada también coincidieron con los codones con mayor frecuencia de uso en *P. pastoris* en las condiciones mencionadas, mientras que los otros codones utilizados en la secuencia para estos aminoácidos presentaron una frecuencia de uso en *P. pastoris* de al menos 0.31 para genes de alta expresión en condiciones de inducción con metanol. En contraste, los codones presentes en la secuencia para los aminoácidos ácido glutámico (E), leucina (L), arginina (R) y serina (S) no coincidieron con el codón preferencial de *P. pastoris* para los genes más expresados en condiciones de inducción con metanol; sin embargo, la frecuencia de uso de estos codones en *P. pastoris* bajo las condiciones mencionadas fue de 0.47, 0.21, 0.20 y 0.11, respectivamente. Ninguno de los codones presentes en la secuencia codificante para Glu1B contenida en pUC57-CfBG presentó una frecuencia de uso menor a 0.1 en *P. pastoris* para genes de alta expresión en condiciones de inducción con metanol, por lo que la secuencia se consideró adecuada para la expresión heteróloga de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* en *P. pastoris*.

### **7.2.2. Aislamiento, caracterización y secuenciación de pUC57-CfBG**

La digestión del plásmido pUC57-CfBG aislado a partir de la cepa *E. coli* TOP10 pUC57-CfBG proporcionada por Bio Basic Inc con la endonucleasa *EcoRI* generó tres fragmentos principales de ~1.9, ~2.7 y ~4.5 kb (Figura 13). Los primeros dos fragmentos coinciden con los esperados de 1,885 y 2,683 pb para la digestión completa de pUC57-CfBG con *EcoRI* (Figura 14), mientras que el fragmento de ~4.5 kb corresponde con el tamaño teórico del plásmido que sólo fue linealizado por *EcoRI* (Figura 14). Sin embargo, en el gel de electroforesis de esta digestión se observan también tres bandas adicionales de ~3.3, ~5.8 y ~10 kb (Figura 13). Mientras que la banda de ~10 kb puede tratarse de plásmido sin digerir, la banda de ~3.3 kb coincide con uno de los fragmentos esperados para pUC57-CfBG cuando éste presenta una inserción de ~1.4 kb que ocurre cuando las células hospederas se cultivan a alta temperatura (datos no publicados), mientras que la banda de ~5.8 kb coincide con el tamaño del plásmido linealizado cuando presenta dicha inserción. Por lo tanto, la preparación de ADN plasmídico a partir de *E. coli* TOP10 pUC57-CfBG consiste en una mezcla de

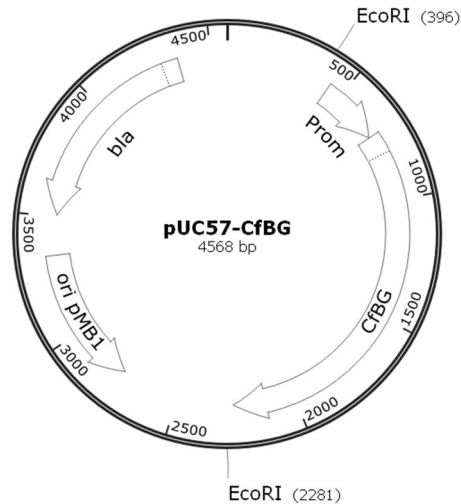


pUC57-CfBG replicado correctamente y una versión de este plásmido con una inserción de ~1.4 kb.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de digestión analítica de pUC57-CfBG aislado a partir de *E. coli* TOP10 pUC57-CfBG con la endonucleasa *EcoRI*. **M:** Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega); **1:** Plásmido pUC57-CfBG de *E. coli* TOP10 pUC57-CfBG sin digerir, 95 ng; **2:** pUC57-CfBG de *E. coli* TOP10 pUC57-CfBG digerido con *EcoRI*, 95 ng. El gel fue teñido con GelRed® (Biotium) después del corrimiento electroforético.

La transformación de *E. coli* JM109 con la preparación de ADN plasmídico de *E. coli* TOP10 pUC57-CfBG resultó en dos tipos de colonias transformantes. Alrededor de 80-90% de las colonias presentaron un tamaño típico >2 mm tras el tiempo de incubación de ~36 h a temperatura ambiente, mientras que ~10-20% de las colonias presentaron un tamaño pequeño <1 mm. La digestión del ADN plasmídico de cuatro colonias de tamaño típico con *EcoRI* generó dos fragmentos de ~2.7 y ~3.3 kb, mientras que la digestión del ADN plasmídico de dos colonias con *EcoRI* generó fragmentos de ~1.9 y ~2.7 kb (Figura 15). El patrón de digestión del ADN plasmídico de las colonias de tamaño pequeño coincide con el patrón esperado para pUC57-CfBG (Figura 14), mientras que el patrón de digestión del ADN plasmídico de las colonias de mayor tamaño coincide con el patrón que presenta pUC57-CfBG con la inserción de ~1.4 kb (datos no publicados). El análisis de secuenciación de la secuencia codificante para Glu1B en el plásmido pUC57-CfBG de una de las colonias pequeñas mostró un 100% de identidad con la secuencia teórica, confirmando que la clona presenta la secuencia correcta.



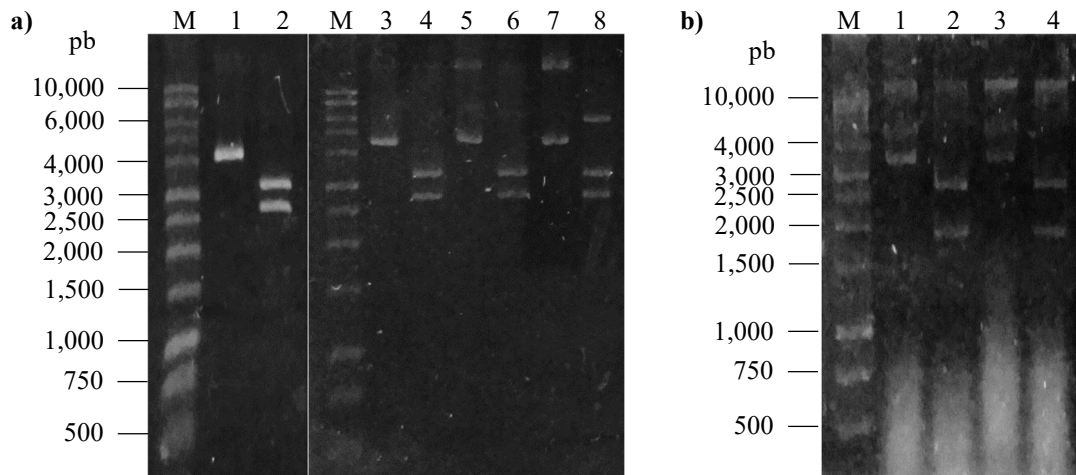
Fragmentos esperados por digestión completa:

- 2,683 pb
- 1,885 pb

Tamaño esperado por linealización:

- 4,568 pb

**Figura 14.** Mapa de digestión virtual del plásmido pUC57-CfBG con la endonucleasa *EcoRI*. CfBG: secuencia codificante para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus*; Prom: promotor; ori pMB1: origen de replicación; bla: marcador de selección (resistencia a ampicilina).

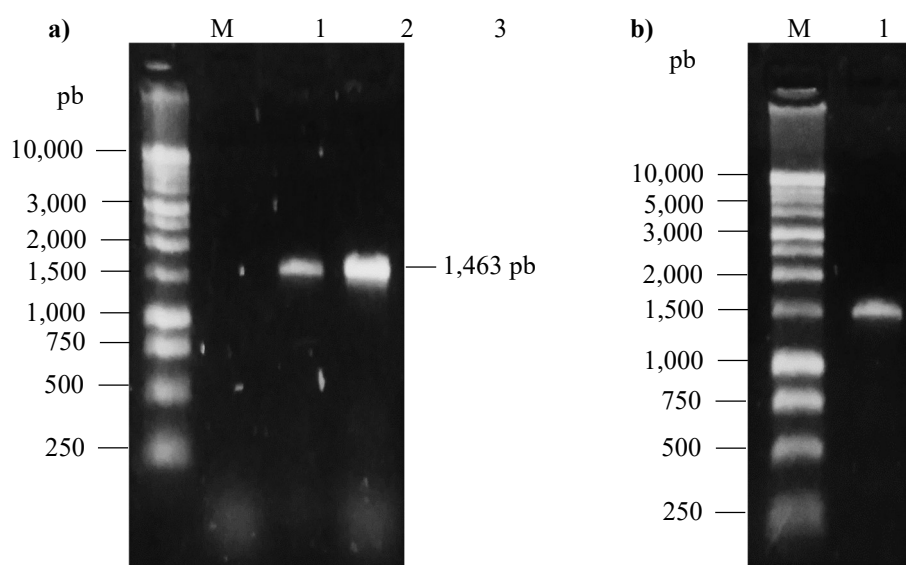


**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de digestión analítica de pUC57-CfBG aislado a partir de distintas clonas de **a)** tamaño típico o **b)** tamaño pequeño de *E. coli* JM109 pUC57-CfBG con la endonucleasa *EcoRI*. **M:** Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega); **1, 3, 5, 7:** Plásmido pUC57-CfBG de clonas de *E. coli* JM109 pUC57-CfBG sin digerir, 82.5-110 ng; **2, 4, 6, 8:** pUC57-CfBG de clonas de *E. coli* JM109 pUC57-CfBG digerido con *EcoRI*, 82.5-110 ng. El gel fue teñido con GelRed® (Biotium) después del corrimiento electroforético.

### 7.2.3. Clonación de la secuencia codificante de Glu1B madura en el vector pGEM-T

#### 7.2.3.1. Síntesis de la secuencia codificante de Glu1B madura mediante PCR de alta fidelidad

La síntesis de la secuencia codificante de Glu1B mediante PCR de alta fidelidad utilizando los oligonucleótidos 5XBGlU y 3BGlUN dio como resultado una banda única de 1,463 pb (Figura 16a) que corresponde al fragmento esperado XBGlUN. El producto de PCR purificado presentó una concentración de 36 ng/ $\mu$ L y no se observó degradación (Figura 16b).

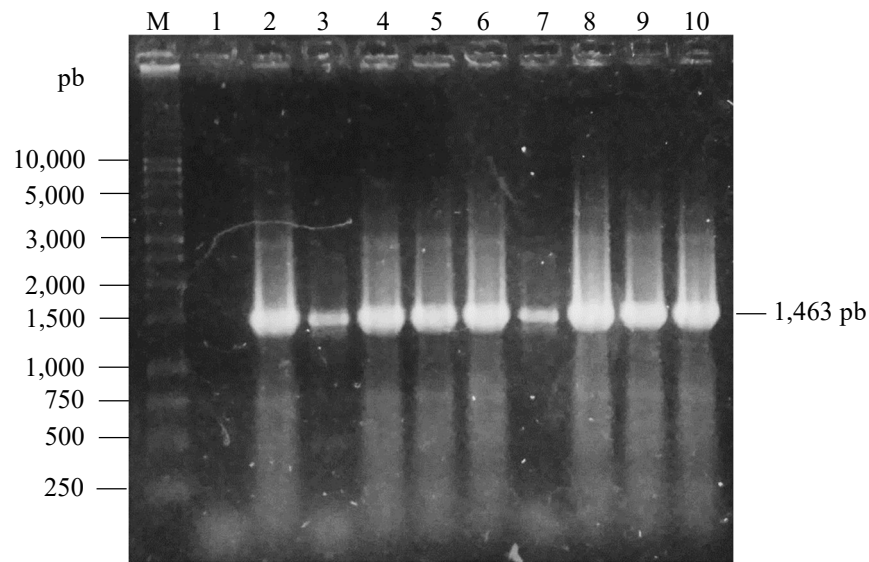


**Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de **a)** síntesis de la secuencia codificante de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* con sitios de restricción *Xho*I y *Not*I (fragmento XBGlUN) mediante PCR de alta fidelidad y **b)** purificación de XBGlUN. **M:** Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega); **a) 1:** Control negativo de la PCR; **2 y 3:** producto de PCR correspondiente a XBGlUN, 0.5 y 2.0  $\mu$ L; **b) 1:** XBGlUN purificado, 1.0.  $\mu$ L. El gel **a)** fue teñido con GelRed® (Biotium) después del corrimiento electroforético. Las muestras del gel **b)** fueron pre-teñidas con GelRed® (Biotium) previo al corrimiento electroforético.

#### 7.2.3.2. Clonación del fragmento XBGlUN en pGEM-T

Se obtuvieron 513 colonias blancas resistentes a ampicilina tras la transformación de *E. coli* JM109 con la ligación de XBGlUN adenilado en el vector pGEM-T utilizando células ultracompetentes y 1 colonia blanca producto de la transformación de *E. coli* JM109 con esta misma ligación empleando células calciocompetentes. De siete de estas clonas analizadas mediante PCR para identificar aquellas portadoras de pGEMBGlu,

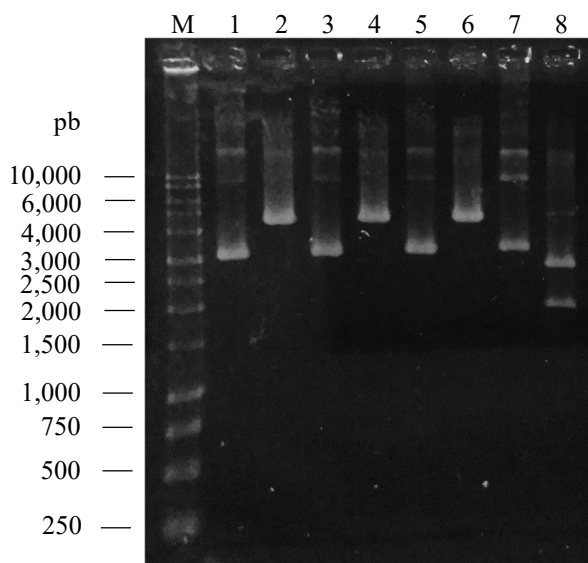
seis resultaron positivas de acuerdo con la amplificación de una banda intensa de 1,463 pb (Figura 17), lo cual indica que son portadoras de pGEMBGlu.



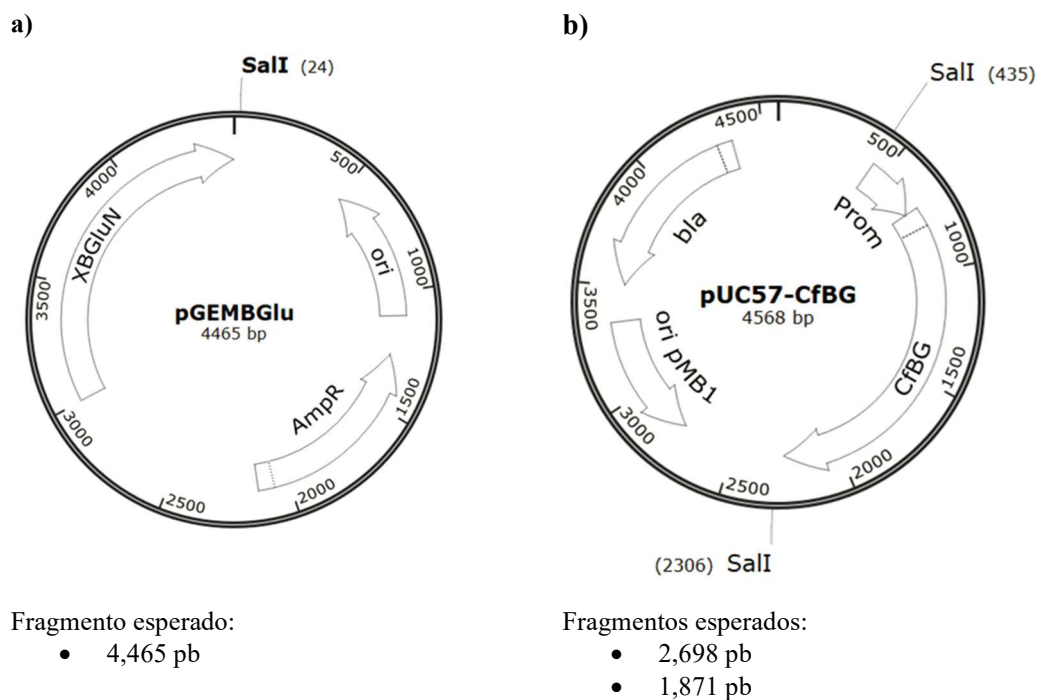
**Figura 17.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de identificación de clonas de *E. coli* JM109 portadoras de pGEMBGlu mediante PCR de colonia. **M:** Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega); **1:** Control negativo de la PCR; **2:** control positivo de la PCR (PCR de pUC57-CfBG); **3:** control de fondo de la placa (PCR de suspensión de agar de la placa de origen de las colonias); **4-10:** PCR a partir de 7 colonias transformantes. El gel fue teñido con GelRed® (Biotium) después del corrimiento electroforético.

### 7.2.3.3. Caracterización y secuenciación de pGEMBGlu

El ADN plasmídico de tres clonas positivas según el ensayo anterior mostró una banda única de 4,432 pb al digerirse con *SalI* (Figura 18), la cual corresponde con el patrón de restricción teórico con *SalI* de pGEMBGlu y no con el de pUC57-CfBG (Figura 19), confirmando que las clonas de *E. coli* JM109 son portadoras de pGEMBGlu. Además, el análisis de secuenciación del inserto XBgluN en pGEMBGlu en una de estas clonas mostró un 100% de identidad con la secuencia teórica, confirmando que presenta la secuencia correcta.



**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de digestión analítica de pGEMBGlu aislado a partir de clonas transformantes de *E. coli* JM109 con la endonucleasa *SalI*. **M:** Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega); **1, 3 y 5:** Plásmido pGEMBGlu sin digerir de tres clonas de *E. coli* JM109, ~120 ng; **2, 4 y 6:** Plásmido pGEMBGlu de tres clonas de *E. coli* JM109 digerido con *SalI*, ~120 ng; **5:** pUC57-CfBG sin digerir, ~120 ng; **6:** pUC57-CfBG digerido con *SalI*, ~120 ng. El gel fue teñido con GelRed® (Biotium) después del corrimiento electroforético.

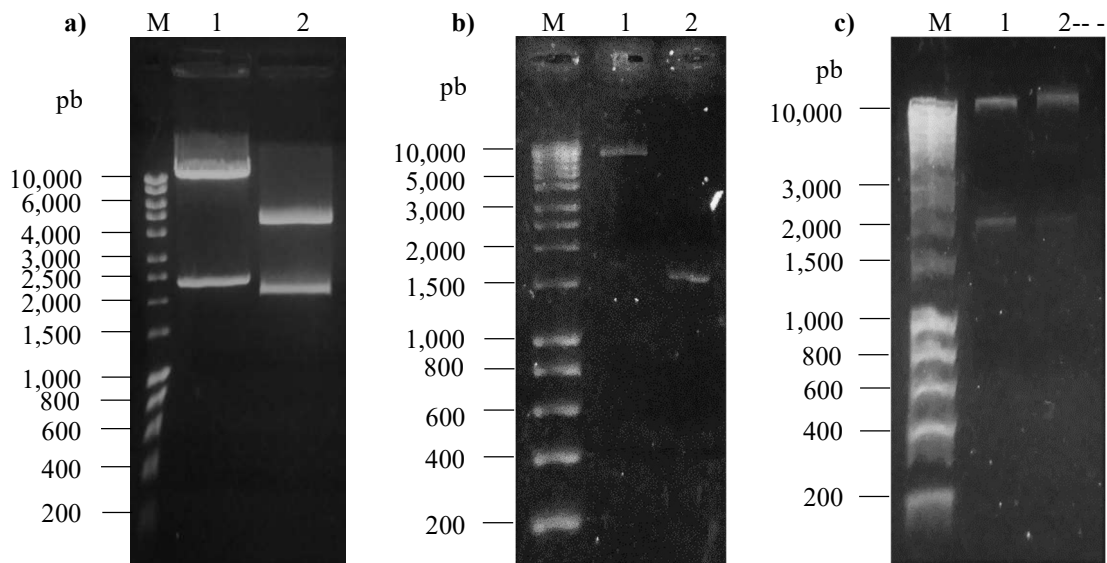


**Figura 19.** Mapa de digestión virtual de los plásmidos **a)** pGEMBGlu y **b)** pUC57-CfBG con la endonucleasa *SalI*. XBGluN: secuencia codificante para Glu1B con sitios *XhoI* y *NotI* sintetizada por PCR; ori y ori pMB1: orígenes de replicación; CfBG: secuencia codificante para Glu1B; Prom: promotor; AmpR y bla: marcadores de selección (resistencia a ampicilina).

## 7.2.4. Subclonación de la secuencia codificante de Glu1B madura en el vector pPIC9

### 7.2.4.1. Preparación y ligación de los fragmentos XBGlU<sub>N</sub> y pPIC9

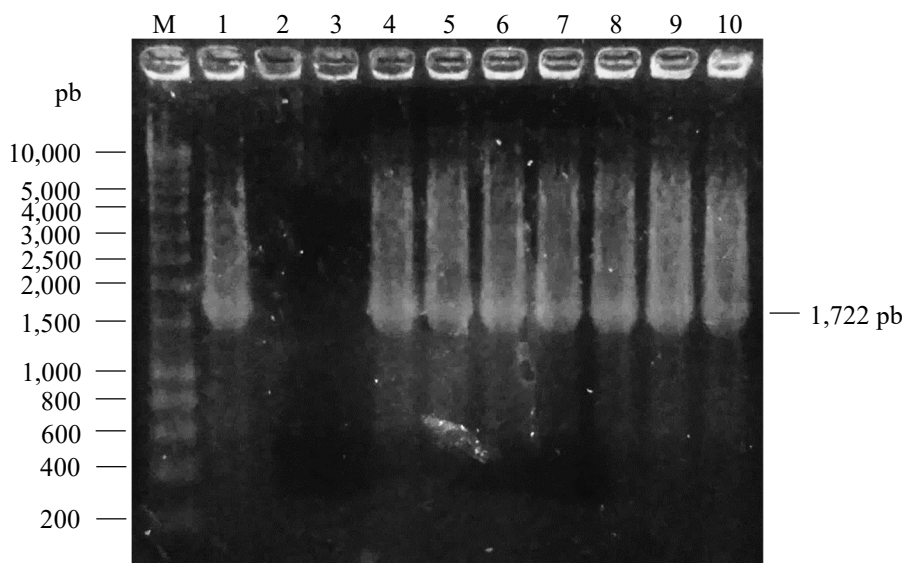
En la Figura 20 se muestran tres geles de agarosa al 0.8% que documentan el proceso de preparación y ligación de los fragmentos pPIC9 y XBGlU<sub>N</sub>. La digestión preparativa de pPIC9TanM con *Xho*I y *Not*I generó dos fragmentos que migraron en ~2.3 y >10 kb, los cuales corresponden al inserto TanM y al vector pPIC9, respectivamente, aunque los tamaños no coinciden con los esperados de 7,950 y 1,450 pb debido al método de tinción (Figura 20a, carril 1). Por su parte, la digestión preparativa de pGEMBGlu con *Xho*I y *Not*I generó dos fragmentos que migraron en ~2.2 y ~5.0 kb, los cuales corresponden al inserto XBGlU<sub>N</sub> y al vector pGEM, respectivamente (Figura 20a, carril 2). Tras la recuperación y purificación de los fragmentos pPIC9 y XBGlU<sub>N</sub> a partir del gel de agarosa, se obtuvieron 810 ng de pPIC9 y 255 ng de XBGlU<sub>N</sub> con extremos cohesivos *Xho*I y *Not*I apropiados para utilizarse para ligación (Figura 20b). La ligación de estos fragmentos se demostró mediante la aparición de nuevas bandas de DNA correspondientes a productos de ligación y la reducción de la intensidad de las bandas correspondiente a los fragmentos pPIC9 y XBGlU<sub>N</sub> (Figura 20c).



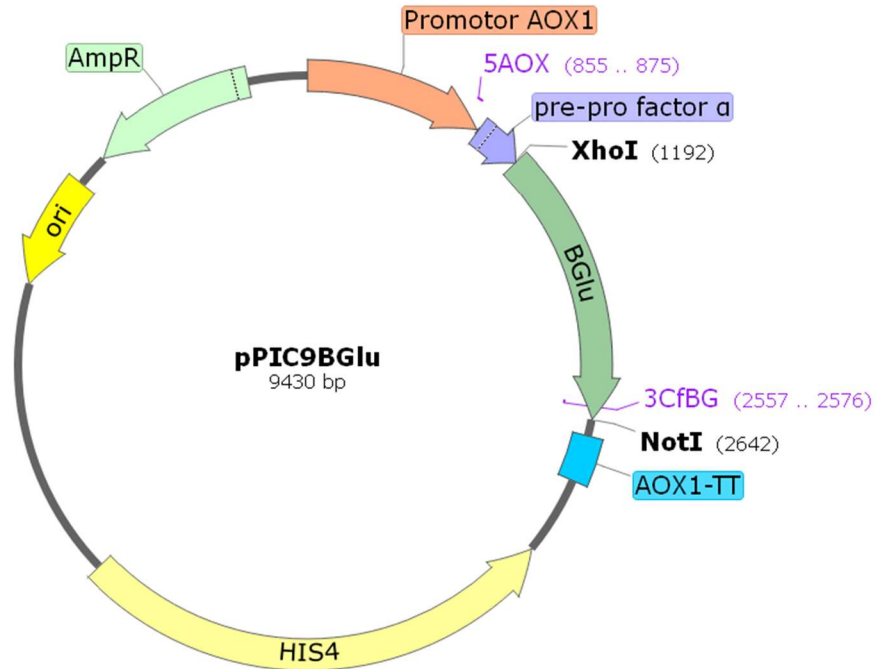
**Figura 20.** Geles de electroforesis en agarosa al 0.8% que muestran el proceso de preparación y ligación de los fragmentos pPIC9 y XBGlU<sub>N</sub>. **a)** Digestiones preparativas de **1)** pPIC9TanM y **2)** pGEMBGlu con *Xho*I y *Not*I. **b)** Purificación de los fragmentos **1)** pPIC9 y **2)** XBGlU<sub>N</sub>. **c)** Ligación de los fragmentos pPIC9 y XBGlU<sub>N</sub>; **1)** fragmentos sin ligar y **2)** ligados. **M:** Marcador de tamaño molecular 1 kb HypperLadder (Bioline); El gel **b)** fue teñido con GelRed® (Biotium) después del corrimiento electroforético. Las muestras en los geles **a)** y **c)** fueron pre-teñidas con GelRed® (Biotium).

#### 7.2.4.2. Transformación de *E. coli* JM109 con pPIC9BGlu

Se obtuvieron >6,000 colonias de *E. coli* resistentes a ampicilina tras la transformación con el producto de ligación del fragmento XBGLuN en el vector pPIC9. De siete de estas clonas analizadas mediante PCR para identificar aquellas portadoras de pPIC9BGlu, todas resultaron positivas de acuerdo con la amplificación de una banda intensa de 1,722 pb (Figura 21). Estos resultados confirmaron la correcta construcción del plásmido pPIC9BGlu. El plásmido construido se esquematiza en la Figura 22 y contiene como sus regiones más importantes lo siguiente: 1) el promotor del gen *AOX1*, el cual permite la expresión de proteínas en *P. pastoris* de forma inducible con metanol; 2) la secuencia pre-pro del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual permite la secreción de proteínas en levaduras; 3) la secuencia codificante para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B madura de *C. formosanus* (*BGlu*); 4) el terminador transcripcional del gen *AOX1* (*AOX1*-TT); 5) el gen de la histidinol deshidrogenasa de *P. pastoris* (*HIS4*), el cual permite la selección de colonias transformantes de *P. pastoris* con este plásmido mediante prototrofia a histidina; 6) un origen de replicación *ori* para *E. coli*; y 7) un marcador de selección para *E. coli* mediante resistencia a ampicilina (*AmpR*).



**Figura 21.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de identificación de clonas de *E. coli* JM109 portadoras de pPIC9BGlu mediante PCR de colonia. **M:** Marcador de tamaño molecular 1 kb HyperLadder (Bioline); **1:** control positivo de la PCR (PCR de la ligación de pPIC9 y XBGLuN); **2:** Control negativo de la PCR; **3:** control de fondo de la placa (PCR de suspensión de agar de la placa de origen de las colonias); **4-10:** PCR a partir de 7 colonias transformantes. El gel fue teñido con GelRed® (Biotium) después del corrimiento electroforético.



**Figura 22.** Representación gráfica del plásmido pPIC9BGlu construido. pre-pro factor  $\alpha$ : secuencia pre-pro del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*; BGlU: secuencia codificante para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B madura de *C. formosanus*; AOX1-TT: terminador transcripcional del gen *AOX1*; HIS4: gen histidinol deshidrogenasa de *P. pastoris*; ori: origen de replicación para *E. coli*; AmpR: marcador de selección para *E. coli* mediante resistencia a ampicilina. Los sitios de restricción *XhoI* y *NotI* empleados para la construcción de pPIC9BGlu y las regiones de hibridación de los oligonucleótidos 5AOX y 3CfBG utilizados para la identificación de clonas de *E. coli* portadoras de este plásmido también se muestran en la figura.

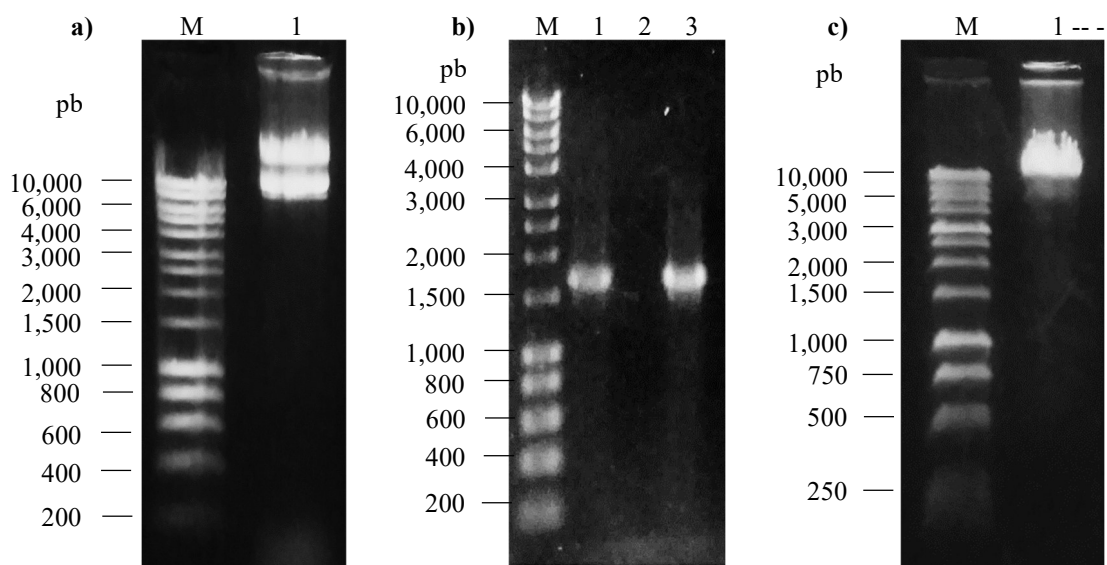
## 7.2.5. Transformación de *P. pastoris* KM71 con pPIC9BGlu

### 7.2.5.1. Preparación, caracterización y linealización de pPIC9BGlu

En la Figura 23 se muestran tres geles de agarosa al 0.8% que documentan el proceso de preparación, caracterización y linealización del plásmido pPIC9BGlu con el que se transformó a *P. pastoris* KM71. El plásmido pPIC9BGlu aislado a partir de *E. coli* JM109 presentó dos conformaciones distintas de acuerdo con el análisis por electroforesis y se obtuvo un rendimiento de 267.5  $\mu$ g totales de este plásmido (Figura 23a). La amplificación de una banda de 1,722 pb con los oligonucleótidos 5AOX y 3XBGlUN confirmó la identidad del plásmido aislado como pPIC9BGlu (Figura 23b). La linealización de este plásmido con *SalI* generó un fragmento único de  $\sim$ 10.0 kb que demostró su digestión completa (Figura 23c). Tras el desalado y concentración del



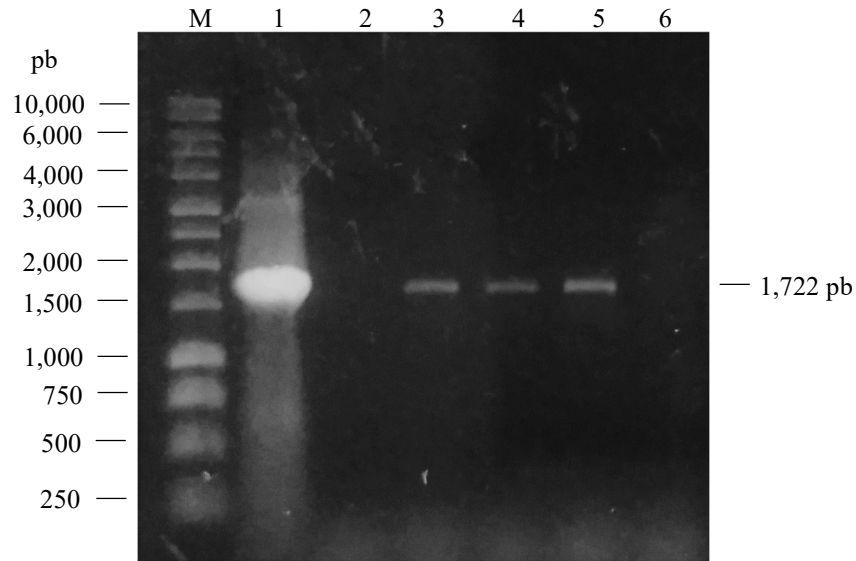
plásmido, se recuperaron finalmente 6.5 µg de pPIC9BGlu linealizado y desalado, listo para emplearse para la transformación de *P. pastoris* KM71.



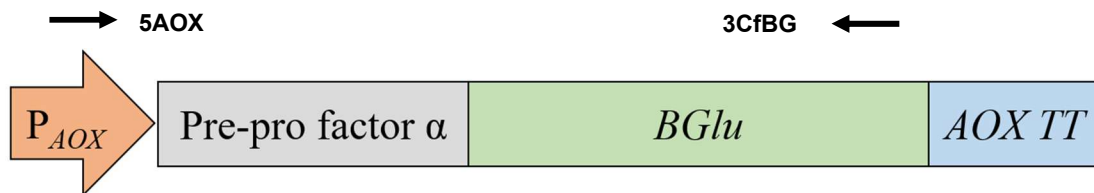
**Figura 23.** Geles de electroforesis en agarosa al 0.8% que muestran el proceso de **a)** preparación, **b)** caracterización por PCR y **c)** linealización con *Sa*I de pPIC9BGlu. **M:** Marcador de tamaño molecular 1 kb HyperLadder (Bioline) (**a** y **b**) o 1 kb DNA Ladder (Promega) (**c**). **a) 1:** pPIC9BGlu aislado a partir de *E. coli* JM109; **b) 1:** control positivo de la PCR (PCR de la ligación de pPIC9 y XBGluN); **2:** Control negativo de la PCR; **3:** PCR de pPIC9BGlu; **c) 1:** pPIC9BGlu linealizado con *Sa*I. El gel **b)** fue teñido con GelRed® (Biotium) después del corrimiento electroforético. Las muestras en los geles **a)** y **c)** fueron pre-teñidas con GelRed® (Biotium).

### 7.2.5.2. Transformación de *P. pastoris* KM71 con pPIC9BGlu y verificación de la integración en las clonas obtenidas

Se obtuvieron >2,000 colonias prototróficas a histidina de *P. pastoris* KM71 tras la transformación con pPIC9BGlu linealizado. De cuatro de estas clonas analizadas mediante PCR para verificar la integración de pPIC9BGlu en su genoma, tres resultaron positivas de acuerdo con la amplificación de una banda de 1,722 pb (Figura 24). Estos resultados confirmaron la integración de las secuencias del plásmido pPIC9BGlu en el genoma de *P. pastoris* KM71. Las clonas positivas se denominaron *P. pastoris* KM71BGlu y cuentan en su genoma con las secuencias necesarias para permitir la expresión de la β-glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* bajo condiciones de inducción con metanol, es decir, el casete de expresión para esta enzima (Figura 25).



**Figura 24.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la verificación de la integración del plásmido pPIC9BGlu en clonas de *P. pastoris* KM71 mediante PCR de colonia. **M:** Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega); **1:** control positivo de la PCR (PCR de pPIC9BGlu de *E. coli*); **2:** Control negativo de la PCR; **3-6:** PCR a partir de 4 colonias de *P. pastoris* KM71 prototróficas a histidina. El gel fue teñido con GelRed® (Biotium) después del corrimiento electroforético.

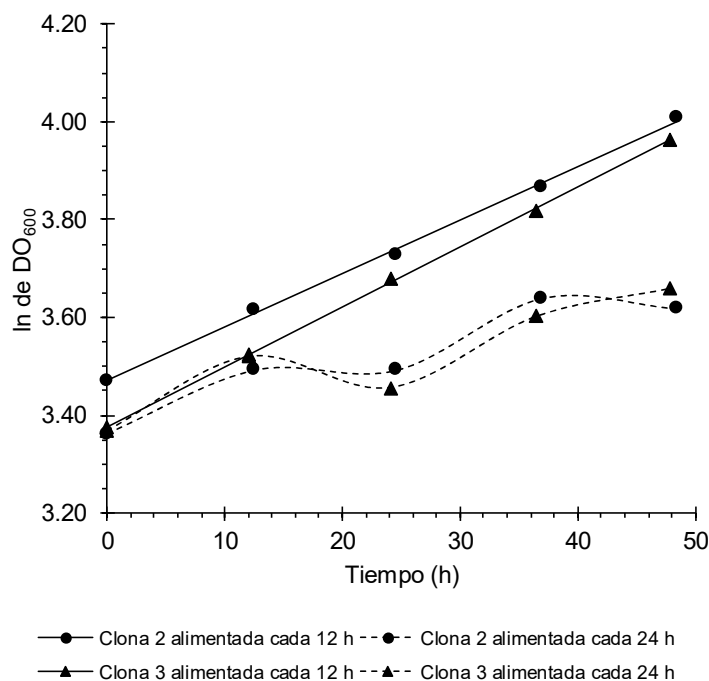


**Figura 25.** Representación gráfica del casete de expresión regulable por metanol para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* integrado en *P. pastoris* KM71BGlu.  $P_{AOX}$ : promotor del gen *AOX1*; pre-pro factor  $\alpha$ : secuencia pre-pro del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*; *BGlu*: secuencia codificante para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B madura de *C. formosanus* *AOX1 TT*: terminador transcripcional del gen *AOX1*. Las regiones de hibridación de los oligonucleótidos 5AOX y 3CfBG utilizados para la verificación de la integración de este casete de expresión en el genoma de clonas de *P. pastoris* también se muestran en la figura.

### 7.2.6. Caracterización fenotípica de *P. pastoris* KM71BGlu

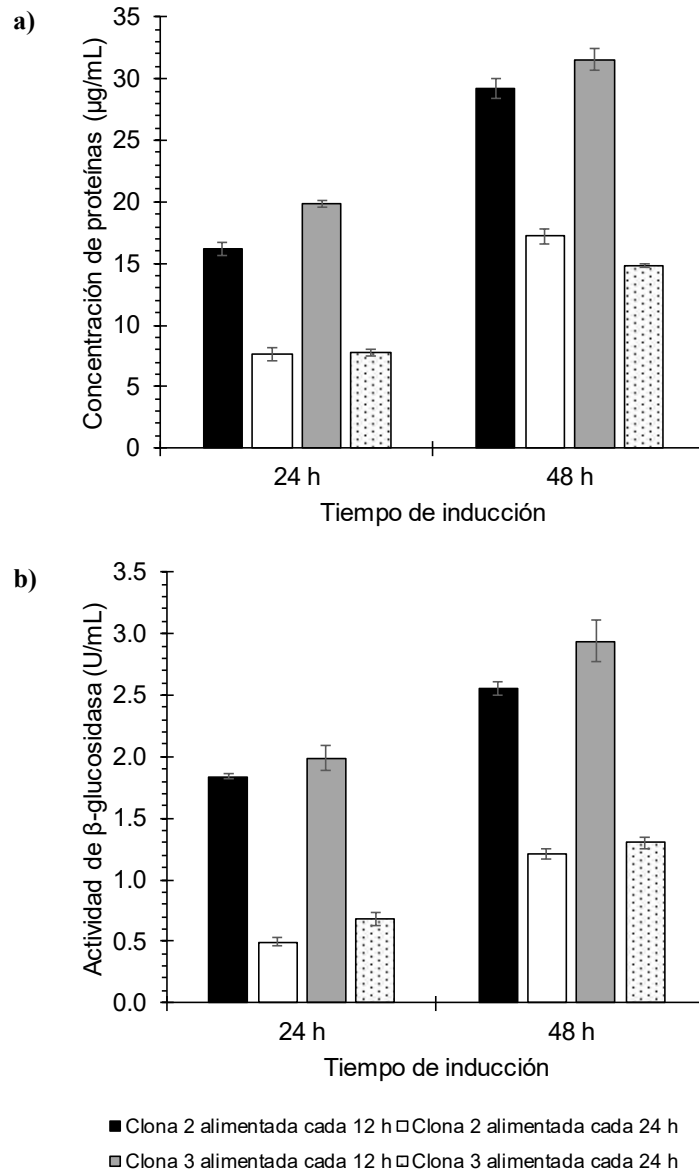
Los cultivos de dos clonas de *P. pastoris* KM71BGlu (clona 2 y clona 3) presentaron una  $DO_{600}$  final en la fase de crecimiento con glicerol de 4.70-5.34. Los cultivos alimentados cada 12 h con metanol durante la fase de inducción presentaron crecimiento exponencial con una  $\mu$  de 0.011-0.012  $h^{-1}$  en esta fase, mientras que los cultivos alimentados cada 24 h presentaron crecimiento exponencial con una  $\mu$  de 0.010-0.013  $h^{-1}$  por 12 h seguido de una fase estacionaria por 12 h (Figura 26). Los valores de  $DO_{600}$  finales alcanzados por

los cultivos alimentados cada 12 h fueron de 52.7 a 55.2, mientras que éstos fueron de 37.3 a 38.9 para los cultivos alimentados cada 24 h (Figura 26).



**Figura 26.** Cinéticas de crecimiento en la fase de inducción de 2 clonas de *P. pastoris* KM71BGlu alimentadas con 0.75% de metanol cada 12 o 24 h. No se realizaron replicados para este experimento.

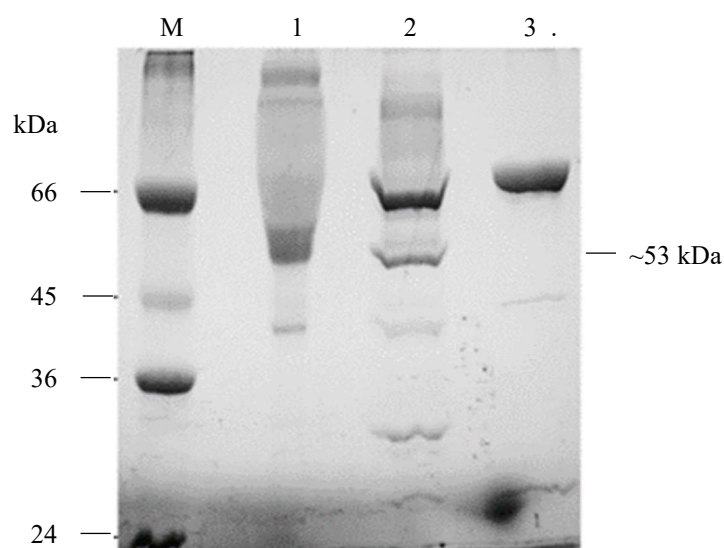
Se detectaron proteínas extracelulares totales y actividad de  $\beta$ -glucosidasa en los medios libres de células de cultivos de las clonas 2 y 3 de *P. pastoris* KM71BGlu a las 24 y 48 h de inducción. Los medios libres de células de los cultivos alimentados con 0.75% de metanol cada 12 h presentaron 16.2-19.9  $\mu\text{g/mL}$  de proteínas totales a las 24 h de inducción y 29.2-31.6  $\mu\text{g/mL}$  a las 48 h, mientras que los medios libres de células de los cultivos alimentados con metanol cada 24 h presentaron valores más bajos de proteínas totales de 7.6-7.8  $\mu\text{g/mL}$  a las 24 h y 14.9-17.2  $\mu\text{g/mL}$  a las 48 h de inducción (Figura 27a). Asimismo, los medios libres de células de los cultivos alimentados con metanol cada 12 h también presentaron mayor actividad de  $\beta$ -glucosidasa volumétrica (1.84-1.99 U/mL a las 24 h y 2.55-2.94 a las 48 h de inducción) que los de los cultivos alimentados cada 24 h (0.50-0.69 U/mL a las 24 h y 1.21-1.30 U/mL a las 48 h de inducción) (Figura 27b). Además, el medio libre de células de la clona 3 presentó mayor concentración de proteínas totales y actividad de  $\beta$ -glucosidasa que el medio de la clona 2 en la mayoría de las condiciones analizadas (Figura 27).



**Figura 27. a)** Concentración de proteínas totales y **b)** actividad de  $\beta$ -glucosidasa en medios libres de células de cultivos de dos clones de *P. pastoris* KM71BGlu durante la fase de inducción con metanol siguiendo dos estrategias de alimentación. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres replicados analíticos.

Se obtuvo un total de 419.6  $\mu\text{g}$  de proteínas totales en el medio libre de células del cultivo de la clona 3 al finalizar la fase de inducción. Tras la ultrafiltración y concentración de esta muestra, se recuperaron 191.6  $\mu\text{g}$  de proteínas en un volumen de 65  $\mu\text{L}$ , con un porcentaje de recuperación del 45.7% y un factor de concentración de 261.5 veces. El análisis por SDS-PAGE de este concentrado proteico reveló la presencia de un barrido de múltiples bandas de masas moleculares  $>53$  kDa, mientras que el análisis del concentrado

proteico tratado con Endo H<sub>f</sub> reveló 1) la presencia de una banda definida con una masa molecular aparente de ~53 kDa y 2) la disminución del barrido, demostrando que el barrido consiste en formas glicosiladas de la proteína de ~53 kDa (Figura 28). La masa molecular aparente de esta proteína coincide con la masa molecular teórica de la β-glucosidasa Glu1B madura de *C. formosanus* calculada a partir de su secuencia aminoacídica, que es de 54.6 kDa. La ecuación de regresión logarítmica que se utilizó para el cálculo de las masas moleculares de las proteínas en este gel se obtuvo a partir de la relación entre la distancia de migración y la masa molecular de las proteínas del marcador y presentó una r<sup>2</sup> de 0.9992.



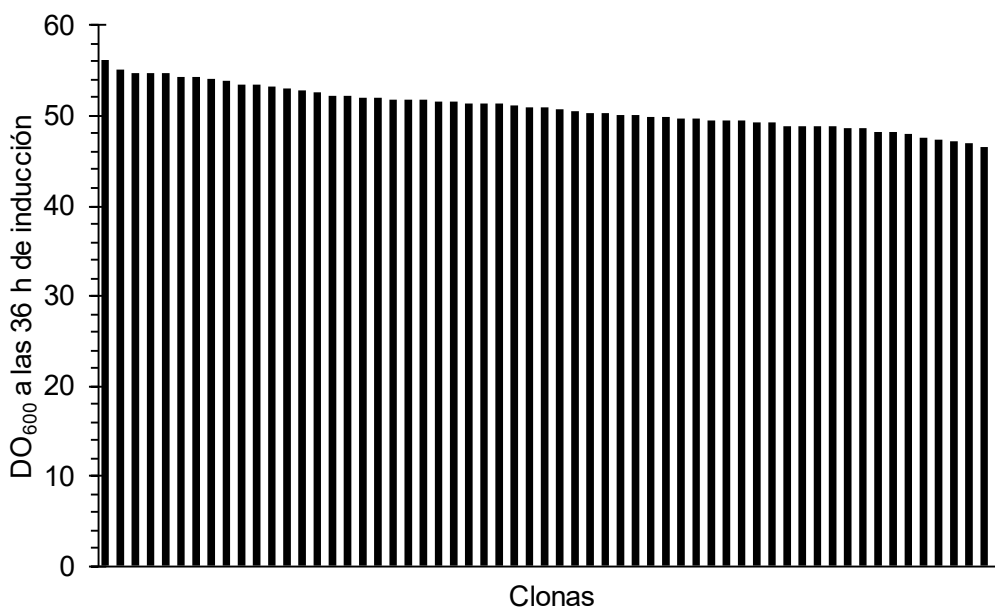
**Figura 28.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de un concentrado del medio libre de células de un cultivo de *P. pastoris* KM71BGlu (clona 3) tratado con Endo H<sub>f</sub>. **M:** marcador de masa molecular (20-66 kDa), 3 µg por proteína; **1:** concentrado del medio libre de células, 6 µg de proteína; **2:** concentrado del medio libre de células tratado con Endo H<sub>f</sub>, 6 µg de proteína + 1 µg de Endo H<sub>f</sub>; **3:** Endo H<sub>f</sub>, 1 µg.

De acuerdo con los resultados de actividad enzimática de β-glucosidasa y el análisis de SDS-PAGE, la clona 3 de *P. pastoris* KM71BGlu produce y secreta al medio de cultivo una proteína con actividad de β-glucosidasa con distintos grados de glicosilación y una masa molecular desglicosilada aparente de ~53 kDa, la cual coincide con la masa molecular teórica de la β-glucosidasa Glu1B madura de *C. formosanus*. Con esto se comprobó que se lograron construir cepas de *P. pastoris* productoras de la β-glucosidasa

Glu1B de *C. formosanus*. A esta proteína producida en *P. pastoris* se le denominó BGlu y será mencionada con este nombre en el resto del trabajo.

### 7.2.7. Selección de cepas de *P. pastoris* KM71 sobreproductoras deBGlu

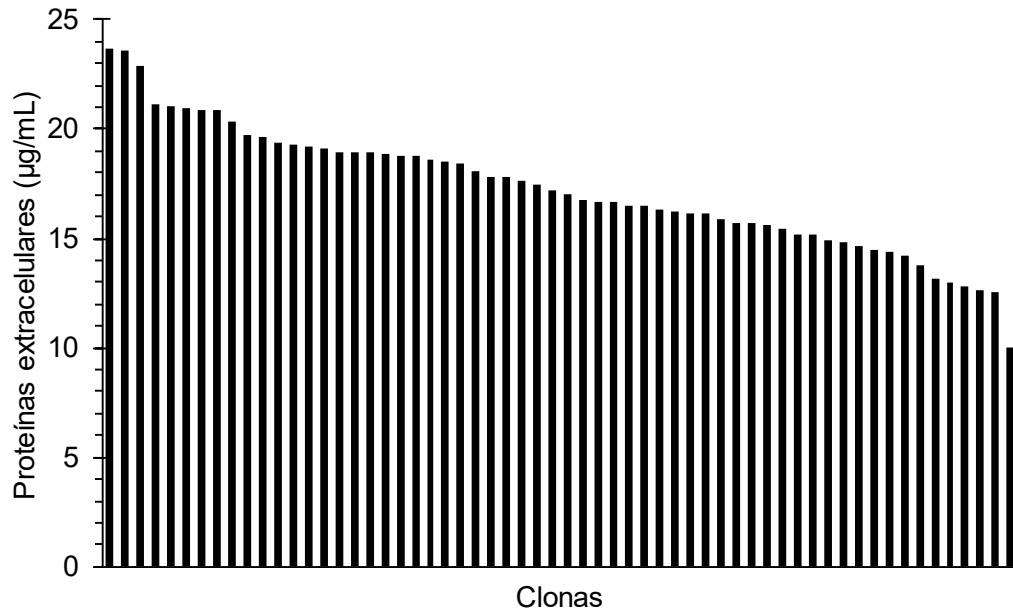
Los cultivos de 60 clonas de *P. pastoris* KM71 transformadas con pPIC9BGlu alcanzaron  $DO_{600}$  entre 45.1 y 56.2 a las 36 h de inducción con metanol (Figura 29). Los medios libres de células de estos cultivos presentaron concentraciones de proteínas extracelulares entre 10.0 y 23.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 30) y rendimientos entre 0.94 y 2.00 mg de proteína por g de biomasa seca (Figura 31). Los cultivos de distintos lotes de la clona normalizadora (clona 14) presentaron concentraciones de proteínas de  $20.0 \pm 3.56 \mu\text{g}/\text{mL}$  y rendimientos de  $1.67 \pm 0.29$  mg de proteína por g de biomasa seca y fueron utilizados para normalizar los resultados de las 60 clonas de acuerdo con su lote correspondiente.



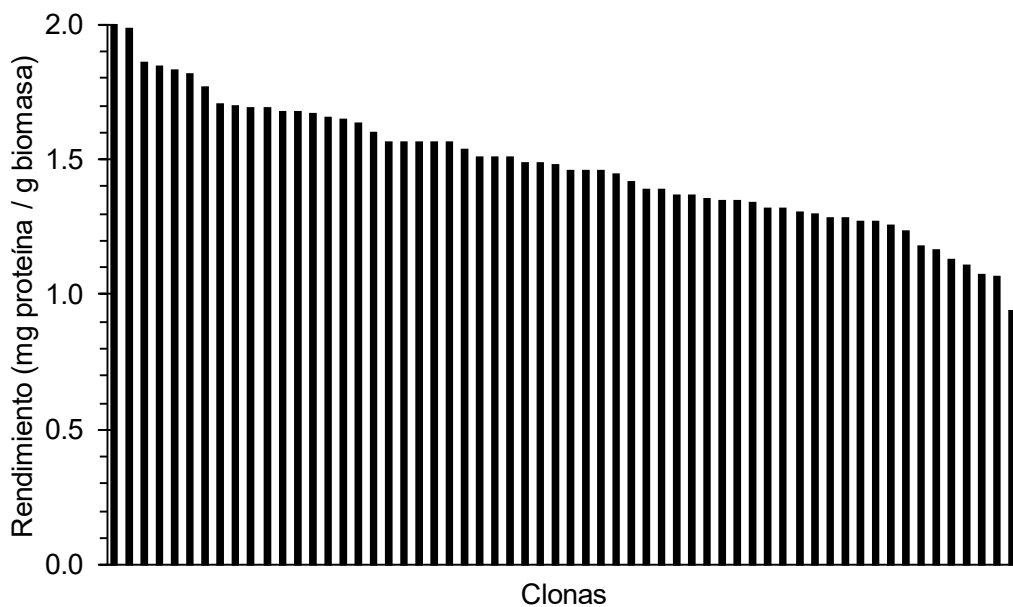
**Figura 29.** Distribución de las  $DO_{600}$  finales de cultivos de 60 clonas *P. pastoris* KM71BGlu tras 36 horas de inducción con metanol.

Los cultivos de 60 clonas de *P. pastoris* KM71 transformadas con pPIC9BGlu presentaron rendimientos producto/biomasa relativos a la clona normalizadora (clona 14) entre 0.58 y 1.20 (Figura 32). El rendimiento relativo de 1.20, perteneciente a la clona 33, fue tomado como el 100% para la clasificación de las clonas. Del total de las clonas, un 15% (9 clonas) fue catalogado como de rendimiento alto, 67% (40 clonas) como de

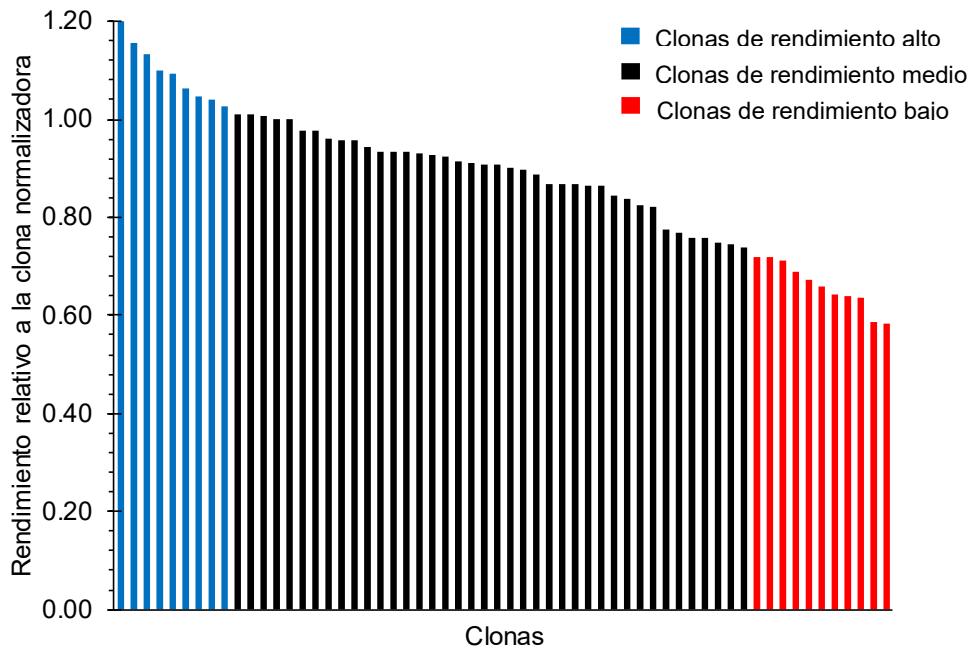
rendimiento medio y 18% (11 clonas) como de rendimiento bajo, al presentar >85% del máximo, entre 60 y 85% del máximo y <60% del máximo rendimiento relativo, respectivamente (Figura 32).



**Figura 30.** Distribución de las concentraciones de proteínas totales en medios libres de células de cultivos de 60 clonas de *P. pastoris* KM71BGlu tras 36 horas de inducción con metanol.



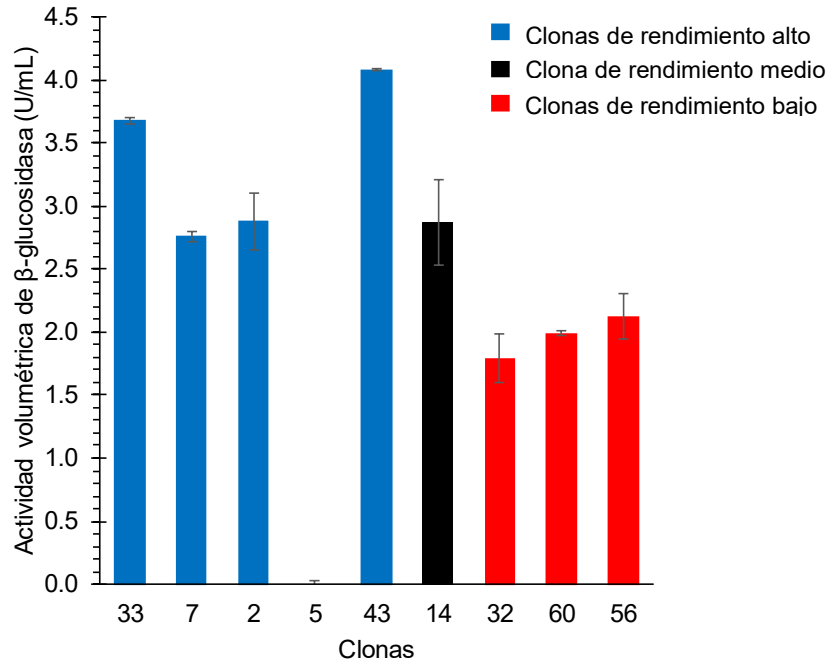
**Figura 31.** Distribución de los rendimientos producto/biomasa de cultivos de 60 clonas de *P. pastoris* KM71BGlu tras 36 horas de inducción con metanol.



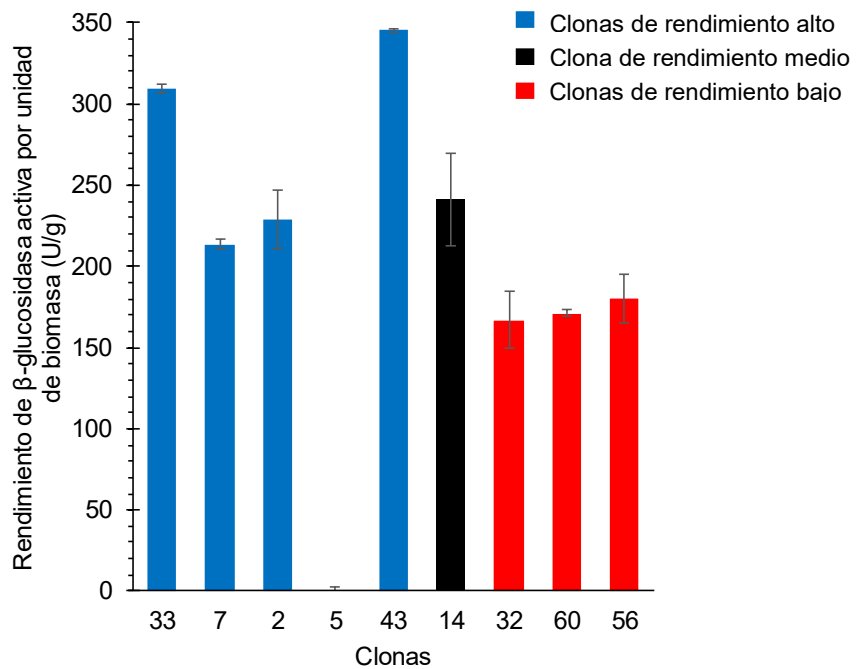
**Figura 32.** Clasificación de 60 clonas de *P. pastoris* KM71BGlu en función de su rendimiento producto/biomasa relativo a la clona normalizadora.

Las clonas de rendimiento alto 33, 7, 2, 5 y 43, las clonas de rendimiento bajo 32, 56 y 60 y la clona normalizadora 14 (de rendimiento medio) fueron seleccionadas para la determinación de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa en los medios libres de células. A excepción de la clona 5, la cual no presentó actividad, los medios libres de células de las clonas de rendimiento alto presentaron actividad entre 2.8 y 4.1 U/mL, mientras que los medios libres de células de las clonas de rendimiento bajo presentaron menor actividad (1.8-2.1 U/mL) y el de la clona 14 de rendimiento medio presentó actividad dentro del rango de las de rendimiento alto. La mayor actividad la presentó el medio libre de células de la clona 43 con 4.1 U/mL (correspondientes a 11.1 mg/L de BGlu), seguido del medio libre de células de la clona 33 con 3.7 U/mL (equivalentes a 10.0 mg/L de BGlu) (Figura 33). De forma similar, la clona 43 presentó el mayor rendimiento de enzima activa/biomasa ( $Y_{p/x}$ ), seguida de la clona 33 (Figura 34). Estas dos clonas fueron finalmente seleccionadas como las cepas de *P. pastoris* KM71 sobreproductoras de BGlu.

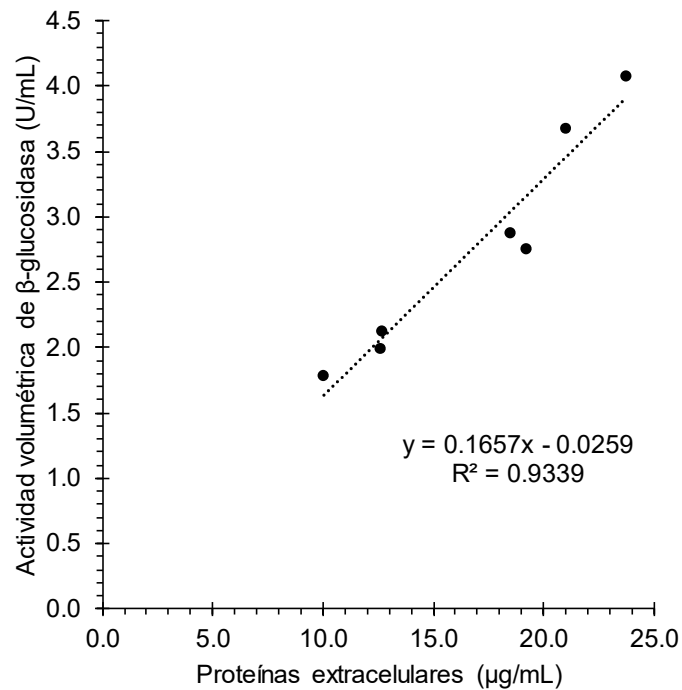




**Figura 33.** Actividad volumétrica de  $\beta$ -glucosidasa en medios libres de células de cultivos de 9 clonas de *P. pastoris* KM71BGlu tras 36 h de inducción con metanol. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres replicados analíticos.



**Figura 34.** Rendimiento de  $\beta$ -glucosidasa extracelular activa por unidad de biomasa en cultivos de 9 clonas de *P. pastoris* KM71BGlu tras 36 h de inducción con metanol. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres replicados analíticos.



**Figura 35.** Análisis de la relación entre la actividad volumétrica de β-glucosidasa y la concentración de proteínas extracelulares en los medios libres de células de cultivos de 7 clonas de *P. pastoris* KM71BGlu tras 36 h de inducción con metanol utilizando un modelo de regresión lineal.

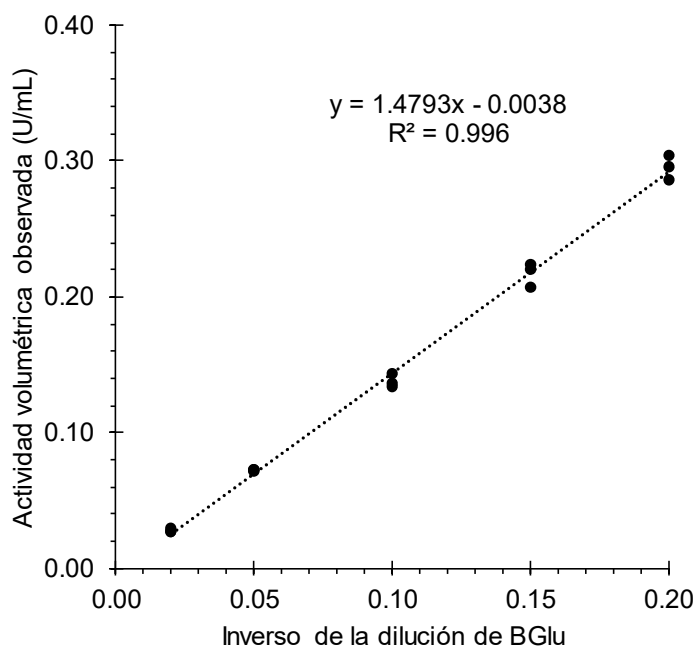
Para el análisis de la relación de la actividad enzimática con la concentración de proteínas extracelulares no se consideró la clona 5 debido a que no presentó actividad. La actividad de β-glucosidasa en los medios libres de células de las clonas analizadas presentó una relación proporcional directa con la concentración de proteínas extracelulares y se ajustó a un modelo de regresión lineal con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.93 (Figura 35).

### 7.3. Caracterización bioquímica de la $\beta$ -glucosidasa de *C. formosanus* producida en *P. pastoris* (BGlu)

#### 7.3.1. Caracterización parcial de BGlu cruda

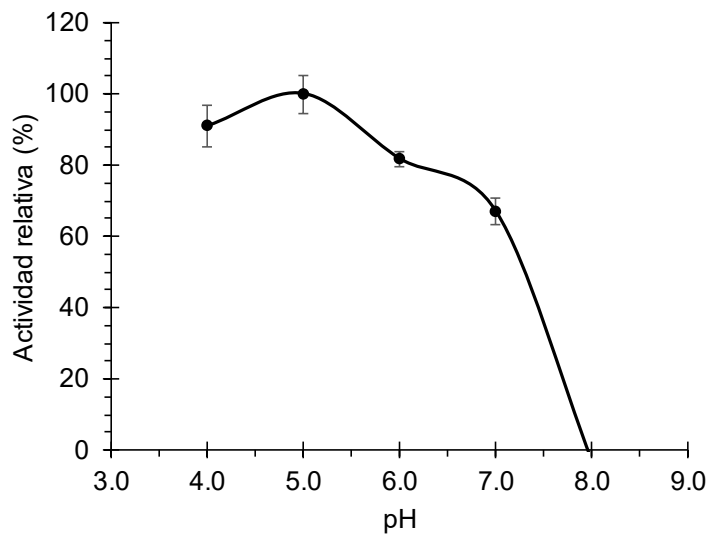
El cultivo de la clona 3 de *P. pastoris* KM71BGlu realizado bajo condiciones de inducción con metanol para la producción de BGlu (sección 6.7.2.1) presentó una  $DO_{600}$  final en la fase de crecimiento con glicerol de 6.05 y una  $\mu$  en la fase de inducción de  $0.009\text{ h}^{-1}$ , alcanzando una  $DO_{600}$  final de 44.1 a las 36 h de inducción. El medio libre de células de este cultivo presentó  $20.1\text{ }\mu\text{g/mL}$  de proteínas totales y  $0.78\text{ U/mL}$  de actividad de  $\beta$ -glucosidasa y fue utilizado para la caracterización parcial de BGlu cruda.

La concentración de BGlu fue directamente proporcional a la actividad volumétrica observada utilizando distintas diluciones de enzima y una concentración constante de  $29.2\text{ mM}$  de celobiosa como sustrato. La relación entre las variables se ajustó a un modelo de regresión lineal con un  $r^2$  de 0.996 y se determinó que es posible medir la actividad de BGlu sin que el sustrato sea un factor limitante en un rango de concentraciones al menos  $0.014$  a  $0.15\text{ U/mL}$  de enzima en el ensayo (Figura 36).

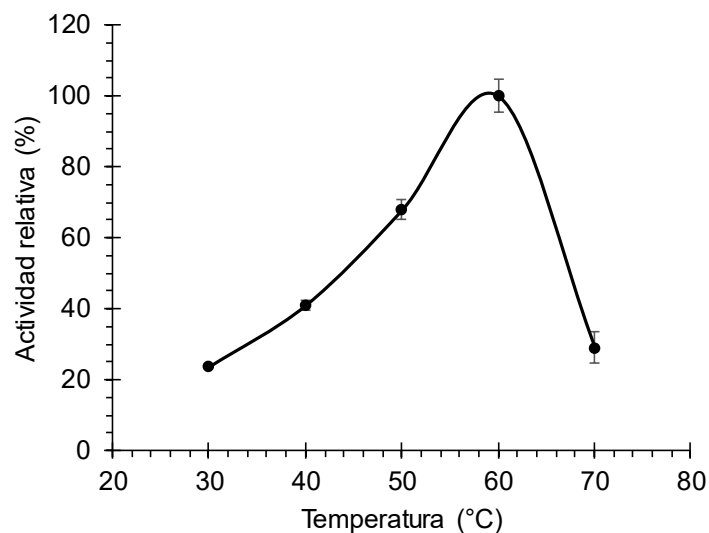


**Figura 36.** Análisis de la relación entre la concentración de BGlu y la actividad volumétrica observada utilizando un modelo de regresión lineal. Los valores de inverso de la dilución de BGlu empleados para la preparación de este análisis fueron de 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 y 0.2, y equivalen a 0.014, 0.036, 0.069, 0.11 y 0.15 U/mL de enzima en la reacción. Los puntos graficados corresponden a tres replicados independientes para cada valor de concentración de BGlu.

BGlu cruda presentó actividad en un rango de pH de 4.0 a 7.0 y actividad máxima a pH 5.0. La enzima conservó más del 60% de su actividad a pH entre 4.0 y 7.0 pero perdió completamente su actividad a pH 8.0 en buffer de Tris-HCl. (Figura 37). Por otra parte, BGlu cruda presentó actividad en todo el rango de temperatura analizado de 30 a 70°C y actividad máxima a 60°C. La actividad de BGlu aumentó gradualmente con respecto a la temperatura hasta los 60°C y disminuyó rápidamente a mayor temperatura (Figura 38).



**Figura 37.** Efecto del pH en la actividad de BGlu cruda a 40°C. Los puntos y las barras de error representan la media y desviación estándar de tres replicados independientes.

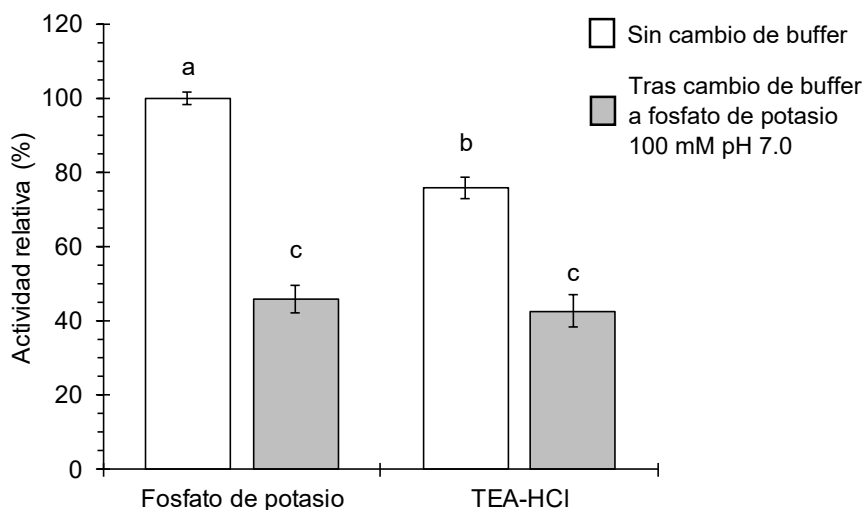


**Figura 38.** Efecto de la temperatura en la actividad de BGlu cruda a pH 5.0. Los puntos y las barras de error representan la media y desviación estándar de tres replicados independientes.

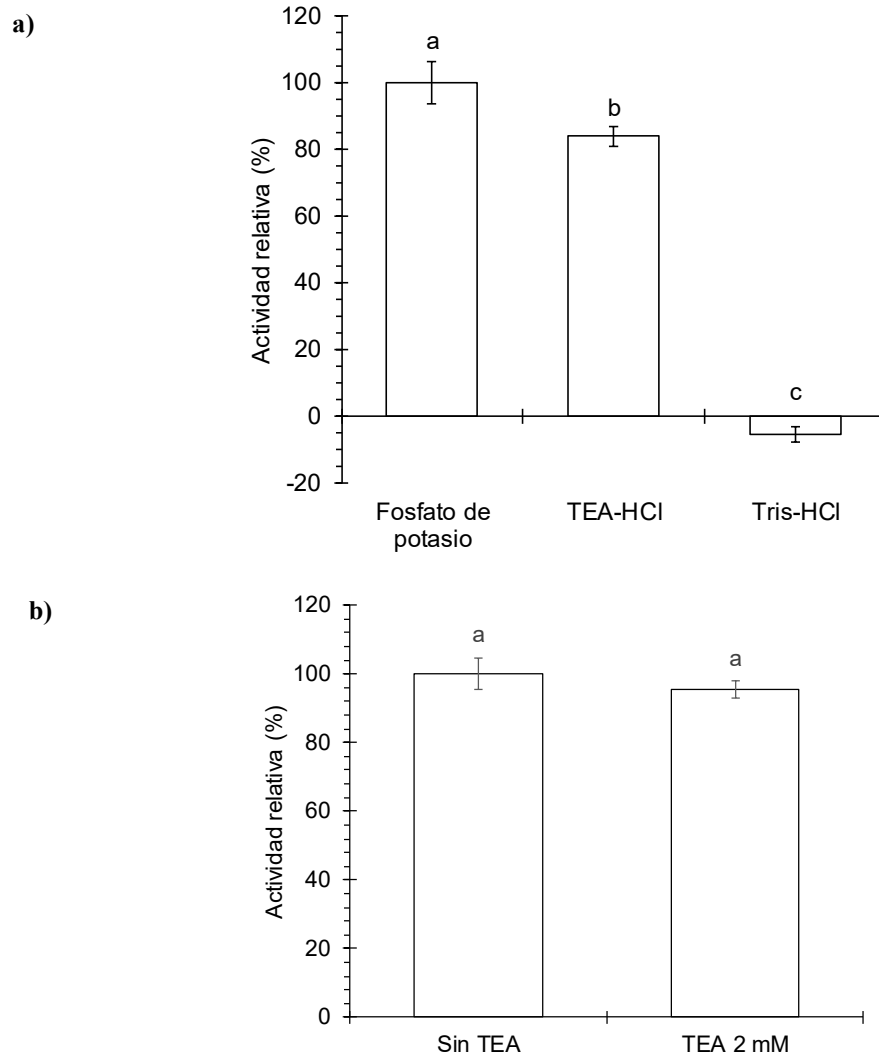
### 7.3.2. Purificación de BGlu

#### 7.3.2.1. Selección del buffer para la purificación de BGlu

Se observó diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) entre la actividad de BGlu medida en buffer de fosfato de potasio 50 mM, Tris-HCl 100 mM y TEA-HCl 50 mM a pH 7.0. BGlu presentó su máxima actividad en buffer de fosfato de potasio, mientras que en TEA-HCl conservó el  $84 \pm 3\%$  de su actividad y en Tris-HCl perdió su actividad por completo (Figura 40a). La actividad de BGlu también fue menor en TEA-HCl 100 mM que en buffer de fosfato de potasio 100 mM a pH 7.0 ( $p < 0.01$ ); sin embargo, no se encontró diferencia significativa en la actividad de BGlu de muestras almacenadas en fosfato de potasio o TEA-HCl después de realizarles un cambio de buffer a fosfato de potasio 100 mM ( $p > 0.05$ ), demostrando que la inhibición de BGlu por TEA observada es reversible (Figura 39). Además, no se observó diferencia significativa entre la actividad de BGlu medida en buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 6.0 con o sin 2 mM de TEA ( $p > 0.05$ ), lo cual sugiere que concentraciones bajas de TEA no inhiben a BGlu (Figura 40b). Con base en estos resultados, se determinó que TEA-HCl es un buffer adecuado para la purificación de BGlu.



**Figura 39.** Determinación de la reversibilidad de la inhibición de BGlu con TEA. **Barras blancas:** Actividad de BGlu en buffer de fosfato de potasio o TEA-HCl 100 mM pH 7.0. **Barras grises:** Actividad de BGlu diluida en buffer de fosfato de potasio o TEA-HCl 100 mM pH 7.0 y posteriormente tratada mediante cambio de buffer a fosfato de potasio 100 mM pH 7.0. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 determinaciones independientes y letras distintas representan medias diferentes según análisis de ANOVA seguido de prueba de Tuckey ( $p < 0.01$ ).



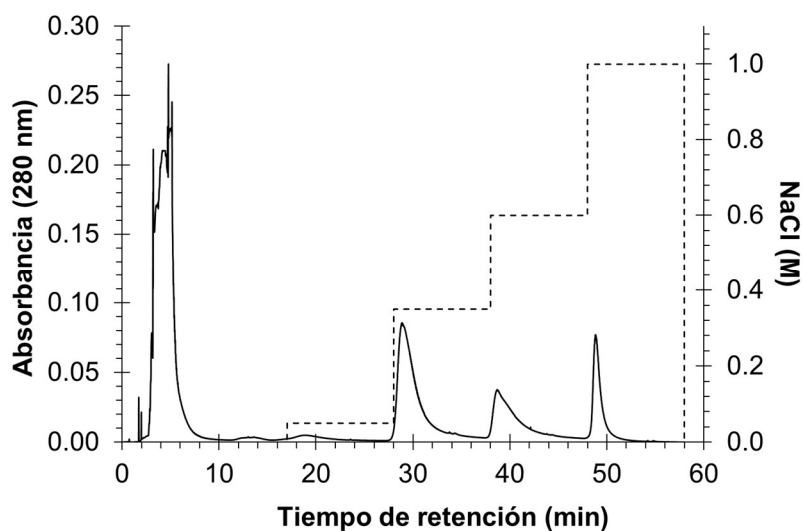
**Figura 40.** Efecto de Tris y TEA en la actividad de BGLu. **a)** Actividad de BGLu en buffer de fosfato de potasio 50 mM, TEA-HCl 50 mM y Tris-HCl 100 mM a pH 7.0. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 determinaciones independientes y letras distintas representan medias diferentes según análisis de ANOVA seguido de prueba de Tuckey ( $p < 0.01$ ). **b)** Actividad de BGLu en buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 6.0 con o sin adición de TEA 2 mM. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 determinaciones independientes. Letras iguales representan medias iguales de acuerdo con análisis de T-student ( $p > 0.05$ ).

### 7.3.2.2. Producción y purificación de BGLu

El cultivo de la clona 3 de *P. pastoris* KM71BGLu realizado bajo condiciones de inducción con metanol para la producción de BGLu (sección 6.7.3.2) presentó una  $\mu$  en la fase de crecimiento de  $0.26 \text{ s}^{-1}$  y un crecimiento irregular con  $\mu$  promedio de  $0.001^{-1}$  en la fase de inducción, alcanzando una  $DO_{600}$  final de 29.8 a las 84 h de inducción. El medio libre de células de este cultivo presentó  $7.95 \text{ }\mu\text{g/mL}$  de proteínas totales y  $0.72 \text{ U/mL}$  de actividad

de  $\beta$ -glucosidasa para una producción total de 874  $\mu\text{g}$  de proteínas y 78.8 U de actividad. Este medio libre de células se utilizó para la purificación de BGlu.

En la Tabla 22 se muestra un resumen del proceso de purificación de BGlu a partir del medio libre de células anterior. Tras el paso de ultrafiltración, se recuperó el 66.2% de las proteínas totales y el 69.4% de la actividad inicial. Durante la cromatografía de intercambio aniónico se recolectaron 4 fracciones con señal de proteínas (Figura 41), de las cuales la fracción 2 (eluida a 0.35 M de NaCl) y la fracción 3 (eluida a 0.6 M de NaCl) presentaron actividad. Considerando la suma de ambas fracciones, se recuperó un 30.1% de las proteínas y un 49.5% de la actividad en la muestra inicial tras el proceso de purificación de BGlu. Por su parte, la actividad específica de  $\beta$ -glucosidasa incrementó durante el proceso de purificación 1.71 veces en la fracción 2 y 1.98 veces en la fracción 3. La actividad específica en la muestra inicial fue de 90.1 U/mg, mientras que las fracciones 2 y 3 presentaron actividad específica de 154.0 y 178.7 U/mg.



**Figura 41.** Cromatograma de la purificación de BGlu mediante cromatografía de intercambio aniónico. La línea continua representa la absorbancia (280 nm) y la línea punteada la concentración de NaCl (M).

**Tabla 22.** Evaluación del proceso de purificación de BGlu

<b>Etapa de purificación</b>	<b>Proteínas totales (µg)</b>	<b>Recuperación de proteínas (%)</b>	<b>Actividad total (U)</b>	<b>Recuperación de la actividad (%)</b>	<b>Actividad específica (U/mg)</b>
Medio libre de células	874.0	100.0	78.8	100.0	90.1
Ultrafiltrado	578.8	66.2	54.7	69.4	94.5
Fracción 1	10.8	1.2	0.0	0.0	0.0
Fracción 2	189.7	21.7	29.2	37.1	154.0
Fracción 3	54.8	6.3	9.8	12.4	178.7
Fracción 4	8.1	0.9	0.0	0.0	2.4
Suma de fracciones	263.4	30.1	39.0	49.5	NA

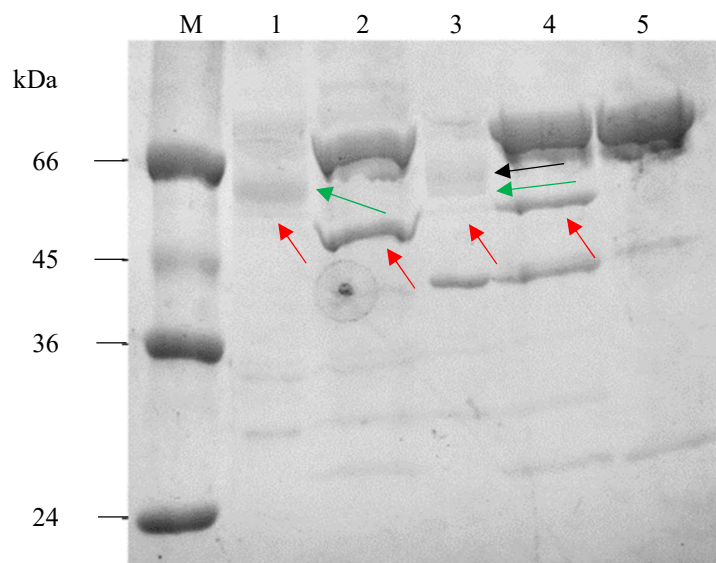
Los porcentajes de recuperación de proteínas y de actividad se calcularon con respecto al total de proteínas y actividad en el medio libre de células.

### 7.3.3. Caracterización bioquímica de BGlu purificada

#### 7.3.3.1. Evaluación de la masa molecular aparente y N-glicosilación de BGlu

El análisis por SDS-PAGE de muestras de distintas etapas de la purificación de BGlu reveló la presencia de una banda de masa molecular aparente de ~53 kDa (Figura 42, flechas rojas) y de un barrido de bandas de masas moleculares de ~56-62 kDa (Figura 42, flechas verdes y negras). Estas muestras tratadas con Endo H<sub>f</sub> presentaron una banda definida de masa molecular aparente de ~53 kDa (Figura 42, flechas rojas) que concuerda con la masa molecular teórica de BGlu de 54.6 kDa pero no el barrido observado en las muestras sin tratar, demostrando que el barrido corresponde a distintas formas glicosiladas de BGlu y que la masa molecular de BGlu desglicosilada es de ~53 kDa. Además, se observó un distinto patrón de glicosilación de BGlu en las fracciones 2 y 3. La fracción 2 presentó mayoritariamente una forma glicosilada de BGlu de ~56-58 kDa (Figura 42, flechas verdes) mientras que la fracción 3 mostró la forma de ~56-58 kDa pero también una forma principal de mayor grado de glicosilación de ~60-62 kDa (Figura 42, flecha negra). BGlu fue purificada con alta pureza en la fracción 2, mientras que en la fracción 3 se observa una banda adicional de ~41 kDa que corresponde a otra proteína (Figura 42, carriles 5 y 6).





**Figura 42.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de muestras de distintas etapas de la purificación de BGLu tratadas con Endo H<sub>f</sub>. **M:** marcador de masa molecular (20-66 kDa), 3 µg por proteína; **1:** fracción 2 de cromatografía, 5 µg de proteína; **2:** fracción 2 de cromatografía tratada con Endo H<sub>f</sub>, 5 µg de proteína + 1 µg de Endo H<sub>f</sub>; **3:** fracción 3 de cromatografía, 6 µg de proteína; **4:** fracción 3 de cromatografía tratada con Endo H<sub>f</sub>, 6 µg de proteína + 1 µg de Endo H<sub>f</sub>; **5:** Endo H<sub>f</sub>, 1 µg. Las flechas rojas señalan la forma desglucosilada de BGLu de ~53 kDa. Las flechas verdes y negra señalan formas glicosiladas de BGLu de ~56-58 kDa y ~60-62 kDa, respectivamente.

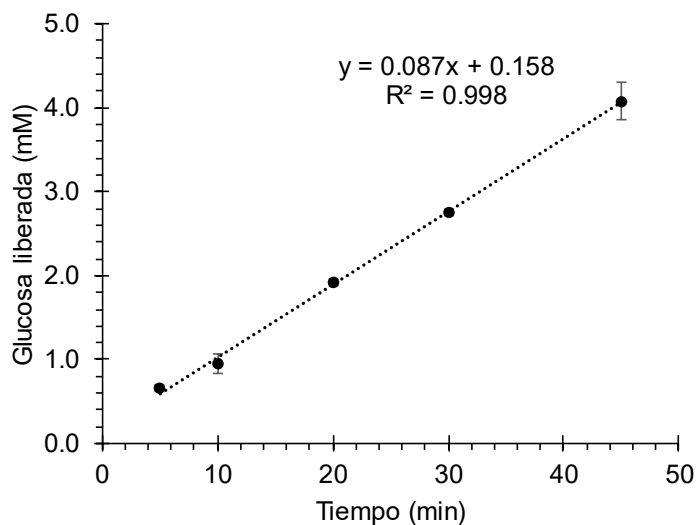
### 7.3.3.2. Determinación del tiempo máximo de reacción que permite la medición de la velocidad inicial de reacción de BGLu

El tiempo de la reacción enzimática fue directamente proporcional a la concentración de glucosa liberada por BGLu utilizando concentraciones constantes de sustrato y enzima. La relación entre las variables se ajustó a un modelo de regresión lineal con un  $r^2$  de 0.999 y se determinó que es posible medir la velocidad inicial de reacción de BGLu en un rango de tiempos de al menos 5 a 45 min de reacción (Figura 43). Se decidió utilizar un tiempo de reacción de 30 min para ensayos posteriores.

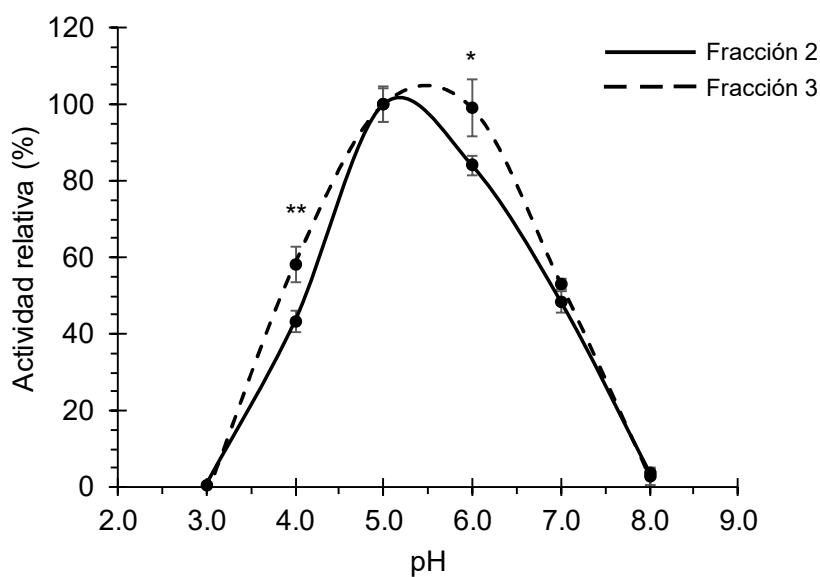
### 7.3.3.3. Efecto del pH y la temperatura en la actividad de BGLu y determinación de su actividad específica

Las fracciones 2 y 3 de BGLu presentaron actividad máxima a pH 5.0. Ambas fracciones conservaron más del 40% de su actividad a pH entre 4.0 y 7.0 pero no fueron activas a pH 3.0 y 8.0. La fracción 3 mostró mayor actividad relativa a pH 4.0 ( $p < 0.01$ ) y a pH 6.0 ( $p < 0.05$ ) que la fracción 2, demostrando ser más tolerante al cambio de pH (Figura 44). Por otra parte, ambas fracciones de BGLu mostraron perfiles idénticos de actividad

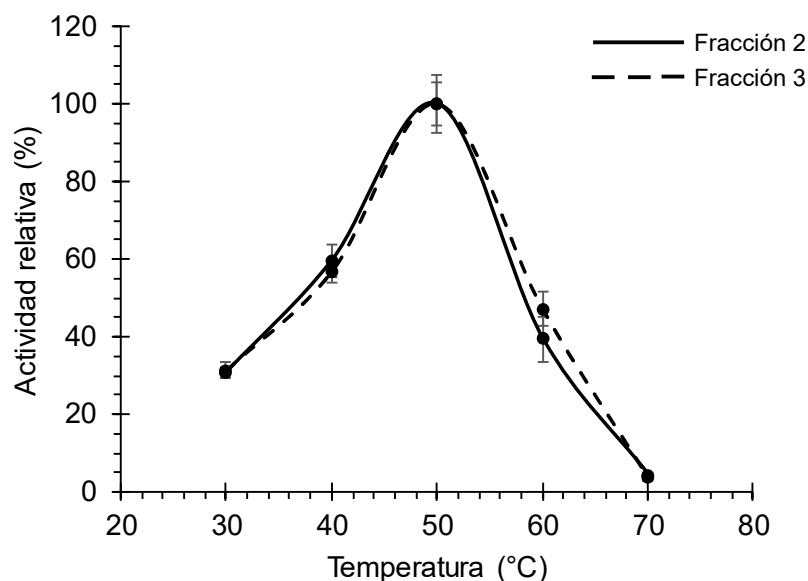
respecto a la temperatura ( $p > 0.05$ ). Las fracciones presentaron actividad en un rango de temperatura de 30 a 60°C y actividad máxima a 50°C. La actividad de BGlu purificada aumentó gradualmente con respecto a la temperatura hasta los 50°C y disminuyó rápidamente a mayor temperatura (Figura 45).



**Figura 43.** Análisis de la relación entre el tiempo de reacción del complejo enzima-sustrato y la concentración de glucosa liberada por BGlu utilizando un modelo de regresión lineal. Los puntos graficados corresponden a la media de tres replicados independientes para cada tiempo. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 replicados independientes.



**Figura 44.** Efecto del pH en la actividad a 40°C de dos fracciones de BGlu purificada. Los puntos y las barras de error representan la media y desviación estándar de tres replicados independientes. \* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). \*\* Diferencia altamente significativa ( $p < 0.01$ ).

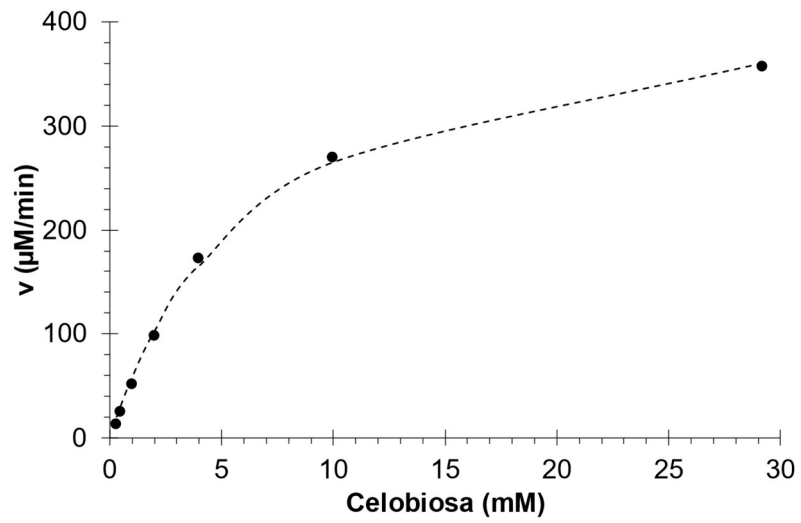


**Figura 45.** Efecto de la temperatura en la actividad a pH 5.0 de dos fracciones de BGLu purificada. Los puntos y las barras de error representan la media y desviación estándar de tres replicados independientes.

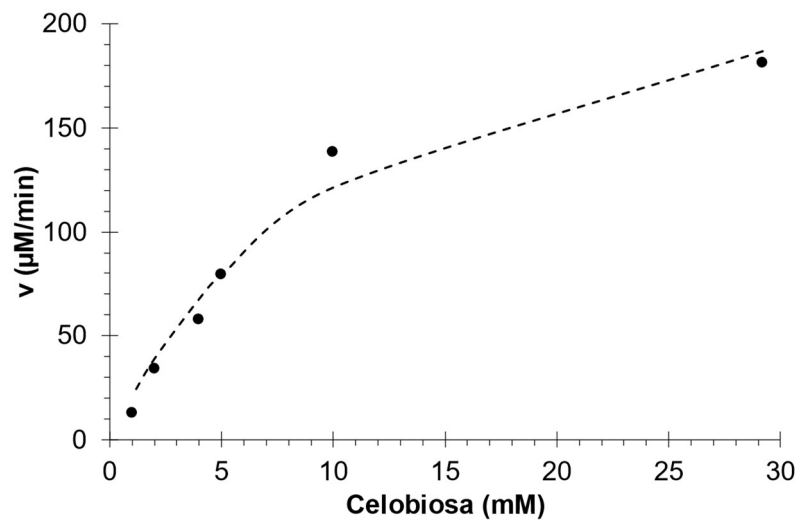
La fracción 2 presentó una actividad específica de  $358 \pm 26$  U/mg a  $50^\circ\text{C}$  y pH 5.0 utilizando celobiosa 29.2 mM como sustrato, mientras que la actividad específica de la fracción 3 a estas condiciones fue de  $400 \pm 22$  U/mg. La actividad específica promedio calculada de BGLu fue de 367 U/mg.

#### 7.3.3.4. Determinación de las constantes cinéticas de BGLu

La fracción 2 de BGLu siguió una cinética típica de Michaelis-Menten con un  $r^2$  de 0.981 (Figura 46). La  $K_m$  y  $V_{max}$  de la fracción 2 fueron estimados en 6.71 mM y  $443 \mu\text{Mmin}^{-1}$ , respectivamente, con una  $k_{cat}$  de  $392 \text{ s}^{-1}$  y una actividad específica máxima de 431 U/mg. La fracción 3 de BGLu siguió una cinética enzimática que se ajustó al modelo de Michaelis-Menten con un  $r^2$  de 0.966 (Figura 47), y sus valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron estimados utilizando este modelo en 11.38 mM y  $259 \mu\text{Mmin}^{-1}$ , respectivamente, con una  $k_{cat}$  de  $543 \text{ s}^{-1}$  y una actividad específica máxima de 597 U/mg. A pesar de que la cinética enzimática de la fracción 3 de BGLu se ajustó mejor a una ecuación sigmoideal, con un  $r^2$  de 0.984 y coeficiente de cooperatividad de Hill (h) de  $1.56 \pm 0.32$ , se utilizó el ajuste al modelo de Michaelis-Menten para estimar las constantes cinéticas ya que la proteína funciona de forma monomérica.



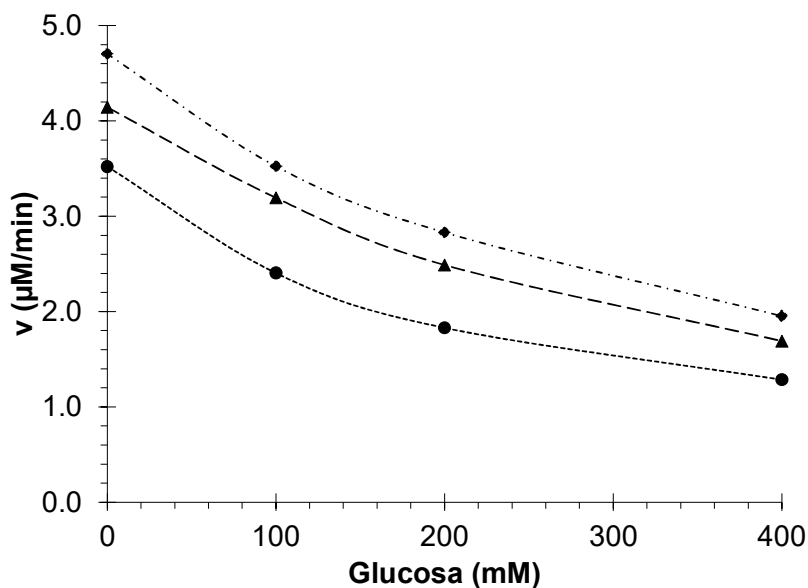
**Figura 46.** Cinética enzimática de la fracción 2 de BGluc ajustada a la ecuación de Michaelis-Menten. Los puntos representan la media de tres replicados independientes.



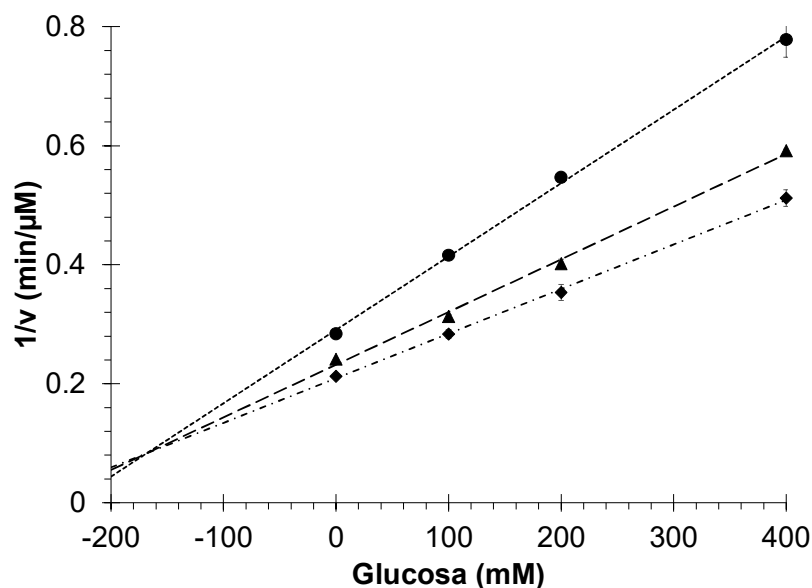
**Figura 47.** Cinética enzimática de la fracción 3 de BGluc ajustada a la ecuación de Michaelis-Menten. Los puntos representan la media de tres replicados independientes.

### 7.3.3.5. Determinación del efecto inhibitorio de la glucosa sobre la actividad de BGlu y cálculo de la constante de inhibición por glucosa

La  $\beta$ -glucosidasa purificada BGlu mostró una disminución en su velocidad de reacción cuando se agregó glucosa a los ensayos de actividad. BGlu mostró una actividad relativa (porcentaje de la velocidad de reacción con glucosa en la reacción respecto a la velocidad de reacción sin glucosa) del 70-80% cuando se agregó 100 mM de glucosa a las reacciones de actividad utilizando cualquiera de las tres concentraciones de pNPG (7.5 mM, 10.0 mM y 12.5 mM) como sustrato. Esta actividad relativa disminuyó hasta un 55-65% con una concentración de glucosa de 200 mM y fue del 40-45% con 400 mM de glucosa (Figura 48). Las formas de las curvas de inhibición de BGlu por glucosa se situaron en un punto intermedio entre las formas de las curvas de  $\beta$ -glucosidasa fuertemente inhibida por bajas concentraciones de glucosa y una  $\beta$ -glucosidasa tolerante a la glucosa de acuerdo con Salgado et al. (2018). La gráfica de Dixon para los datos de inhibición de BGlu por glucosa mostró una relación lineal ( $r^2 > 0.997$ ) entre la concentración de glucosa en la reacción y el recíproco de la velocidad de reacción de BGlu con una constante de inhibición  $K_i$  calculada en 166 mM (Figura 49).



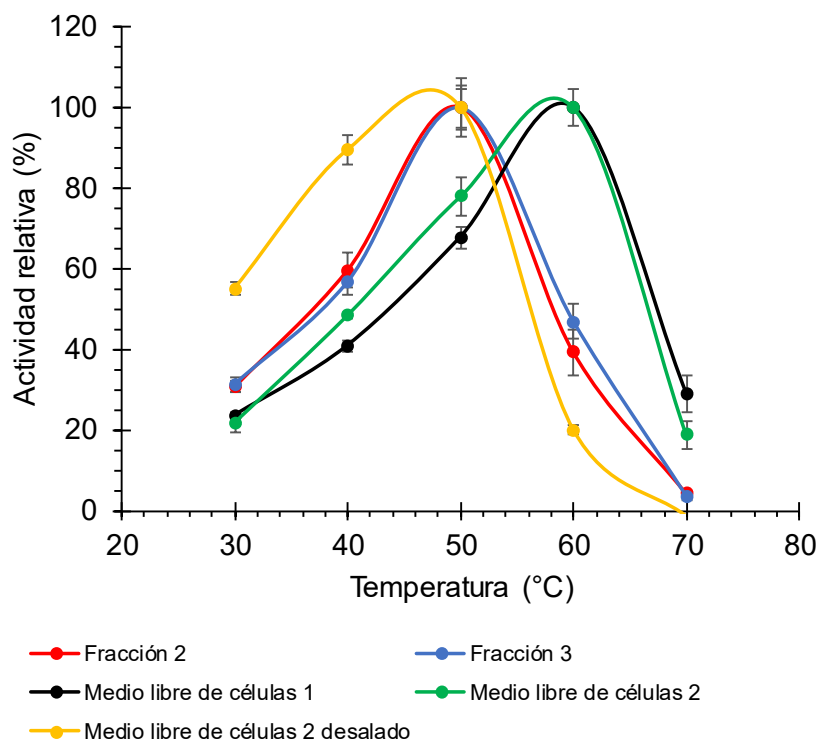
**Figura 48.** Efecto de la glucosa en la actividad de BGlu utilizando 7.5 (●), 10.0 (▲) y 12.5 (◆) mM de pNPG como sustrato. Los puntos muestran la media de tres ensayos enzimáticos independientes. v: velocidad de reacción.



**Figura 49.** Gráfica de Dixon que muestra el efecto inhibitorio de la glucosa en la actividad de BGlu. Los puntos representan la media de tres ensayos enzimáticos independientes. Las líneas punteadas entre los puntos muestran la regresión lineal de los datos. v: velocidad de reacción.

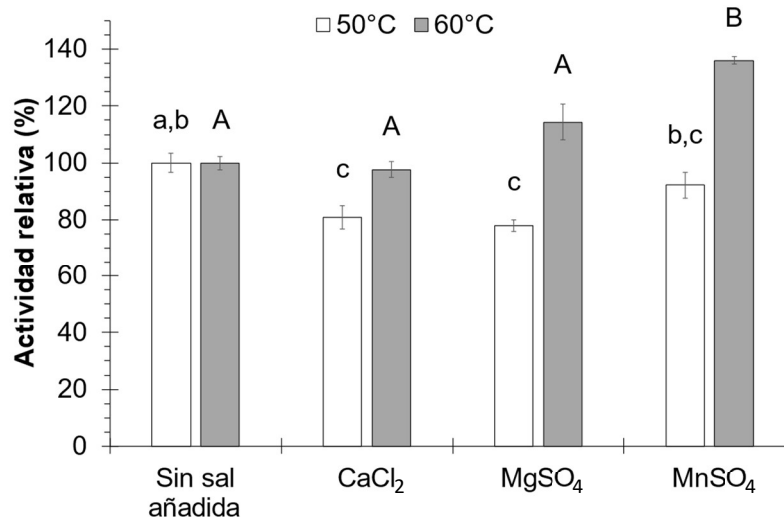
#### 7.3.4. Evaluación del efecto de cationes divalentes en la actividad de BGlu a distintas temperaturas

Las fracciones 2 y 3 de BGlu presentaron actividad máxima a 50°C y pérdida total de la actividad a 70°C (Figura 50, curvas roja y azul). En cambio, los medios libres de células presentaron actividad máxima a 60°C y ~20% de esta actividad a 70°C (Figura 50, curvas verde y negra), lo cual sugiere que un componente del medio de cultivo confiere estabilidad térmica a BGlu. Al desalar el medio libre de células, BGlu volvió a presentar actividad máxima a 50°C, baja actividad a 60°C y pérdida total de la actividad a 70°C (Figura 50, curva amarilla), lo cual demuestra que una molécula de baja masa molecular es la responsable de la estabilidad térmica de BGlu.



**Figura 50.** Efecto de la temperatura en la actividad a pH 5.0 de muestras de BGLu provenientes de distintas etapas de purificación. Los puntos y las barras de error representan la media y desviación estándar de tres replicados independientes.

Se encontró un aumento del  $36.1 \pm 2.3\%$  en la actividad de BGLu debido a la adición de  $Mn^{2+}$  1 mM ( $p < 0.01$ ) a  $60^\circ C$ , pero no se observó diferencia a  $50^\circ C$ . Se encontró asimismo un incremento del  $14 \pm 11\%$  en la actividad de BGLu a  $60^\circ C$  debido a la suplementación con  $Mg^{2+}$  1 mM, aunque esta diferencia no fue significativa ( $p > 0.05$ ). Por otra parte, se observó una disminución del  $19.1 \pm 7.1\%$  y  $22.1 \pm 3.5\%$  en la actividad de BGLu por la adición de 1 mM de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , respectivamente, a  $50^\circ C$  ( $p < 0.05$ ) (Figura 51). Estos resultados sugieren que el  $Mn^{2+}$  funciona como estabilizador de la estructura tridimensional de BGLu, permitiendo que sea activa a  $60^\circ C$  sin llegar a su desnaturalización.

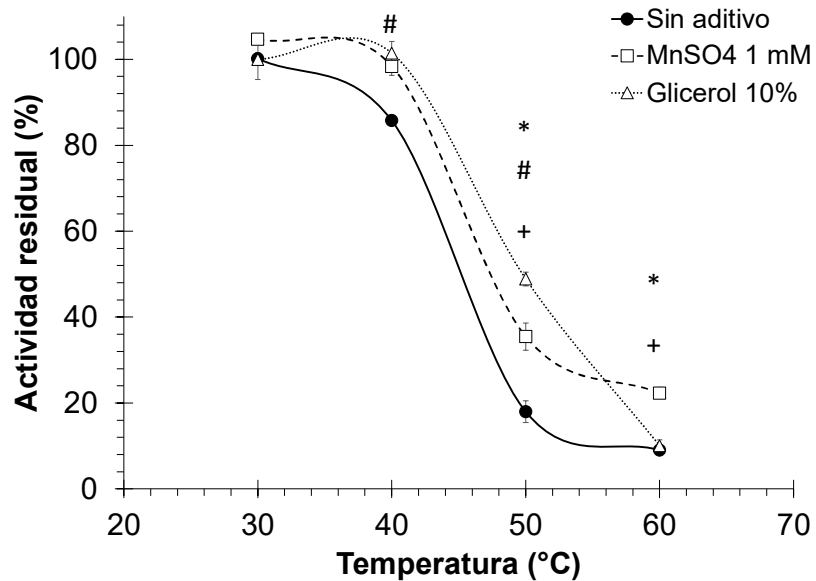


**Figura 51.** Efecto de cationes divalentes 1 mM en la actividad a pH 5.0 de la fracción 2 de BGlu a 50°C y 60°C. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 replicados independientes. Letras distintas representan medias diferentes según análisis de ANOVA seguido de prueba de Tuckey ( $p < 0.05$ ).

### 7.3.5. Evaluación de la termoestabilidad de BGlu

La  $\beta$ -glucosidasa recombinante BGlu (fracción de cromatografía 2) mostró una actividad residual del 88% cuando se preincubó por 30 minutos a 40°C, pero su actividad residual fue de sólo el 20% y <10% cuando se preincubó a 50°C y 60°C, respectivamente (). Sin embargo, BGlu mostró mayor estabilidad térmica cuando los ensayos se realizaron en presencia de MnSO<sub>4</sub> 1 mM o glicerol al 10%. La actividad residual de BGlu preincubada a 40°C fue del 100% cuando el ensayo se realizó en presencia de MnSO<sub>4</sub> 1 mM o glicerol al 10%. En el caso de las reacciones con preincubación de BGlu por 30 minutos a 50°C, las reacciones realizadas en presencia de glicerol al 10% mostraron una actividad residual del 50% y las realizadas en presencia de MnSO<sub>4</sub> 1 mM presentaron actividad residual del 35%, por encima de la actividad residual de BGlu sin aditivos (). De forma similar, la presencia de MnSO<sub>4</sub> 1 mM incrementó la actividad residual de BGlu de <10% a 20% cuando ésta fue preincubada a 60°C, mientras que en el caso del glicerol al 10% no se observó efecto alguno a esta temperatura de preincubación.





**Figura 52.** Actividad residual de BGlu (fracción cromatográfica 2) después de la incubación por 30 min a 30-60°C en la ausencia o presencia de MnSO<sub>4</sub> 1 mM o glicerol al 10%. Los puntos y las barras de error representan la media y error estándar de tres replicados independientes. \* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el ensayo sin aditivo y con MnSO<sub>4</sub> 1 mM. # Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el ensayo sin aditivo y con glicerol al 10%. + Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el ensayo con MnSO<sub>4</sub> 1 mM y con glicerol al 10%.

## 8. DISCUSIÓN

Las  $\beta$ -glucosidasas son enzimas empleadas en la producción de etanol lignocelulósico y en la industria de bebidas (Pei et al. 2012). Además, tienen el potencial de ser utilizadas en conjunto con otras celulasas para el aprovechamiento de la materia lignocelulósica en nutrición animal (Singh et al. 2016). Tradicionalmente, las  $\beta$ -glucosidasas más empleadas en la industria provienen de hongos de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus* (Rosales-Calderon et al. 2014; Uchima et al. 2012). Sin embargo, las preparaciones comerciales de  $\beta$ -glucosidasas actuales no poseen las características más deseables para su aplicación industrial, ya que suelen ser inhibidas por glucosa y presentar baja actividad específica (Li et al. 2017). Por esta razón, en los últimos años se ha intensificado la investigación para encontrar nuevas  $\beta$ -glucosidasas con propiedades atractivas para su aplicación en la industria, tales como alta actividad específica, resistencia a la inhibición por glucosa y estabilidad a altas temperaturas (Pei et al. 2012). En este trabajo se realizó una búsqueda de  $\beta$ -glucosidasas ya reportadas en la literatura y se compararon sus propiedades para seleccionar una  $\beta$ -glucosidasa con características atractivas para su uso en nutrición animal. La enzima seleccionada se produjo en *P. pastoris* y se determinó si sus propiedades de interés se conservan al producirse en este hospedero.

Durante la búsqueda de  $\beta$ -glucosidasas en la literatura se localizaron enzimas con actividad específica de hasta 130,000 U/mg (Akram et al. 2018). Sin embargo, la mayoría de las enzimas con actividad específica  $>1,000$  U/mg fueron caracterizadas utilizando 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG) como sustrato. El pNPG es químicamente distinto de la celobiosa y no es un sustrato real de las  $\beta$ -glucosidasas durante la degradación de lignocelulosa, por lo que la actividad de una enzima medida utilizando pNPG no es un indicador válido de su eficacia en aplicaciones industriales como producción de bioetanol y nutrición animal. Diversas  $\beta$ -glucosidasas pertenecientes a hongos del género *Aspergillus* presentan alta actividad específica sobre pNPG, pero son ineficientes para degradar celobiosa (Zhao et al. 2013). Algunas  $\beta$ -glucosidasas, como la BglA de la bacteria *Thermotoga petrophila* RKU-1, presentan actividad específica casi 20,000 veces mayor sobre pNPG que sobre celobiosa (Haq et al. 2012), mientras que otras, como la HiBgl3C del hongo *Humicola insolens* Y1, presentan actividad específica  $\sim 3$  veces mayor sobre pNPG que sobre celobiosa (Xia et al. 2016a), y otras más, como la

PaBG1b de la cucaracha *Panesthia angustipennis spadica*, presentan actividad específica >10 veces mayor sobre celobiosa que sobre pNPG (Li et al. 2017), lo cual demuestra que no existe una equivalencia entre la actividad específica sobre pNPG y sobre celobiosa. En un estudio por Jeng et al. (2011) se compararon las propiedades de tres  $\beta$ -glucosidasas provenientes de la bacteria *Clostridium cellulovorans* (CcBglA), el hongo *Trichoderma reesei* (TrBgl2) y la termita *Neotermes koshunensis* (NkBgl), y se determinó que CcBglA presenta la mayor actividad sobre pNPG (58.9 U/mg) y NkBgl la menor (1.5 U/mg); sin embargo, la actividad de NkBgl empleando celobiosa como sustrato es de 220 U/mg (Ni et al. 2007), mientras que la de CcBglA es de únicamente 7.1 U/mg (Kosugi et al. 2006). Además, estudios previos han demostrado que los aminoácidos involucrados en la unión de pNPG y de celobiosa al sitio activo de una  $\beta$ -glucosidasa de la bacteria *Thermotoga maritima* son distintos (Rajoka et al. 2015). Por estas razones, las actividades específicas de  $\beta$ -glucosidasa medidas utilizando pNPG como sustrato no se tomaron en cuenta para la selección de la mejor  $\beta$ -glucosidasa.

En la revisión de literatura también se encontraron algunas  $\beta$ -glucosidasas fúngicas de la familia GH3 con actividad específica >1,000 U/mg sobre celobiosa. Sin embargo, la mayoría de estas enzimas son inhibidas por celobiosa y/o glucosa y además son óptimamente activas a condiciones muy distintas a las del tracto digestivo (Cao et al. 2015; Li et al. 2017). Como ejemplo, una  $\beta$ -glucosidasa GH3 de *Aspergillus niger* NL-1 presenta una actividad específica sobre celobiosa de 1,480 U/mg a condiciones óptimas; sin embargo, esta actividad es de sólo ~92 U/mg a condiciones de 40°C y pH 6.0, típicas de tractos digestivos animales, y la enzima es inhibida por glucosa con una  $K_i$  de 48 mM (Zhao et al. 2013).

La mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas encontradas con actividad específica >200 U/mg sobre celobiosa a condiciones típicas de tractos digestivos animales y además resistentes a la inhibición por glucosa se trataron de  $\beta$ -glucosidasas de insectos, pertenecientes a la familia GH1. Las  $\beta$ -glucosidasas de insectos estudiadas hasta la fecha se caracterizan por presentar resistencia a la inhibición por celobiosa y glucosa, y en algunos casos son estimuladas por glucosa (Uchima et al. 2012; Zhang et al. 2012). Además, las  $\beta$ -glucosidasas de insectos suelen ser mesofílicas y activas a pH de 5 a 6, ya que han

evolucionado para funcionar a las condiciones de su tracto digestivo (Arakawa et al. 2016). Las termitas y otros insectos xilófagos son muy eficientes descomponedores de celulosa, capaces de hidrolizar hasta el 99% de la celulosa ingerida (Uchima et al. 2011). Por esta razón, se cree que las enzimas de insectos deben haber evolucionado para poseer propiedades que les permitan una eficiente degradación de la celulosa (Arakawa et al. 2016).

La  $\beta$ -glucosidasa seleccionada para su producción en *Pichia pastoris* fue la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de la termita *Coptotermes formosanus*. La termita de Formosa, *C. formosanus*, es uno de los insectos invasivos más devastadores del planeta, causando daños mayores a 1,000 millones de dólares anuales en EUA producto de la destrucción de propiedades (Zhang et al. 2010; 2012a). Estudios de transcriptoma han revelado que esta termita posee 3  $\beta$ -glucosidasas endógenas llamadas Glu1A, Glu1B y Glu1C; Glu1A está involucrada en el procesamiento de feromonas sexuales, mientras que Glu1B participa en la digestión de madera y el rol de Glu1C aún no se conoce (Zhang et al. 2012b). La secuencia codificante para Glu1B se descifró utilizando bibliotecas de ADNc y la enzima se produjo y se caracterizó de forma intracelular y con la adición de una cola de histidinas en el extremo C-terminal utilizando *Escherichia coli* como hospedero (Zhang et al. 2010; 2012a). Además, esta  $\beta$ -glucosidasa también ha sido producida y caracterizada una cola de histidinas en el extremo N-terminal utilizando *E. coli* como hospedero (Feng et al. 2015)

La  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* presenta características que la hacen atractiva para su potencial uso en nutricional animal y en la producción de bioetanol. Primero, la actividad específica de Glu1B producida en *E. coli* a condiciones típicas de tractos digestivos de animales monogástricos de granja (40°C, pH 6.0) es de 440 U/mg (o 220 U/mg, dependiendo de la definición de unidad seguida por los autores) utilizando celobiosa como sustrato (Zhang et al. 2012a). Este es uno de los valores de actividad específica a estas condiciones más altos reportados a la fecha. En comparación, las dos  $\beta$ -glucosidasas más populares en la industria, BGLI/Cel3A de *Trichoderma reesei* y la  $\beta$ -glucosidasa de *Aspergillus niger* contenida en la preparación comercial Novozyme 188, presentan valores de actividad específica sobre celobiosa a condiciones óptimas de 29-43.5 U/mg (Chen et al. 1992; Chirico y Brown, 1987) y 17.84-33.74 U/mg (Calsavara

et al. 1999; Dekker 1986), respectivamente, y tan bajos como  $\sim 2$  U/mg a  $40^{\circ}\text{C}$  y pH 6.0 en el caso de la  $\beta$ -glucosidasa de *A. niger* (Calsavara et al. 1999). Segundo, Glu1B es resistente a la inhibición por glucosa con una  $K_i > 1$  M (Zhang et al. 2012a). Si bien BGLI/Cel3A de *T. reesei* también es resistente a la inhibición por glucosa con una  $K_i$  de 0.62-0.7 M (Chen et al. 1992; Chirico y Brown, 1987), la  $\beta$ -glucosidasa de *A. niger* en Novozyme 188 es inhibida por glucosa con una  $K_i$  de  $\sim 3$ -10 mM (Calsavara et al. 1999; Dekker 1986). Además, Glu1B producida en *E. coli* mantiene al menos un 30% de su actividad a un rango de pH entre 3.8 y 8.0 y es estable a temperaturas de hasta al menos  $60^{\circ}\text{C}$  (Zhang et al. 2012a). Si bien existen  $\beta$ -glucosidasas reportadas con mayor estabilidad térmica (Uchima et al. 2012; Zhao et al. 2013) o  $K_i$  por glucosa (Cao et al. 2015) que Glu1B, la combinación de todas estas características hace a la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* una enzima idónea para utilizarse en la producción de etanol lignocelulósico o en nutrición animal.

Glu1B presenta los motivos conservados ITENG y T(F/I/L)NEP y una estructura tridimensional compuesta por un único dominio con topología de barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, los cuales son característicos de las glucósido hidrolasas de la familia GH1 (Lombard et al. 2014). Esta familia de glucósido hidrolasas actúa mediante un mecanismo de doble desplazamiento en dos etapas. En el primer paso (glicosilación), el glutamato nucleófilo ataca al carbono anomérico (C1) de la glucosa no reductora apoyado por la formación de un estado de transición de ion oxocarbenio del enlace glucosídico, formando con ello un intermediario con enlace covalente entre el aminoácido nucleófilo y la glucosa no reductora del sustrato. En el segundo paso (desglicosilación), una molécula de agua activada por el glutamato ácido/base libera la glucosa del intermediario a través de un nuevo ataque nucleofílico al carbono anomérico de la glucosa no reductora, también apoyado por la formación de un estado de transición de ion oxocarbenio del enlace glucosídico (Badiéyan et al. 2012; Lombard et al. 2014).

En este trabajo se identificaron los aminoácidos del sitio activo de Glu1B, siendo Glu190 y Glu399 los glutamatos catalíticos. Varios de los aminoácidos identificados coinciden con los aminoácidos del sitio activo de una  $\beta$ -glucosidasa de la familia GH1 de *Oryza sativa* (BGlu1) identificados mediante simulaciones utilizando un modelo híbrido

de mecánica molecular y mecánica cuántica (Badiéyan et al. 2012). Según dicho estudio, Glu176 y Glu386 (Glu190 y Glu399 en Glu1B) son los aminoácidos catalíticos, Tyr315 (Tyr334 en Glu1B) un aminoácido crítico para mantener el nucleófilo y el sustrato en posiciones adecuadas para el ataque nucleofílico, y Asn175 y Glu440 (Asn189 y Glu448 en Glu1B) son importantes para disminuir la energía de activación en la fase de glicosilación (Badiéyan et al. 2012). Además de los dos glutamatos catalíticos, los residuos equivalentes a Asn189, Tyr315 y Glu448 en Glu1B también han sido identificados como parte del sitio activo en estudios de acoplamiento molecular de otras  $\beta$ -glucosidasas con celobiosa o 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (Haq et al. 2012; Franco Cairo et al. 2013; Sun et al. 2018).

En la presente investigación se realizó un análisis computacional para correlacionar la alta actividad específica de algunas  $\beta$ -glucosidasas con la presencia de aminoácidos específicos en algunas posiciones de su sitio activo. La actividad específica de una enzima está dada por la orientación y cercanía a los residuos catalíticos de su sustrato dentro del sitio activo, lo cual está fuertemente correlacionado con la geometría del sitio activo y con los aminoácidos que conforman dicho sitio activo y sus alrededores. En el caso de las  $\beta$ -glucosidasas, el complejo enzima-sustrato está estabilizado por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas que se dan entre el sustrato (celobiosa) y las cadenas laterales de los residuos localizados en el sitio de unión al glicón (subsitio -1) y en el sitio de unión al aglicón (subsitio +1) (Jeng et al. 2011). De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de frecuencia de residuos, Gln455 en el sitio de unión al glicón, Thr193 y Hys252 en el sitio de unión al aglicón, y Leu192, Ile251 y Phe333 como residuos de enlace entre los sitios de unión al glicón y al aglicón, son importantes para proporcionar una actividad específica alta sobre celobiosa en  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH1. El residuo Thr193 de Glu1B forma un puente de hidrógeno con el átomo O2 de la glucosa no reductora de la celobiosa de acuerdo con el análisis en PDBsum de la estructura tridimensional de una  $\beta$ -glucosidasa de la termita *Neotermes koshunensis* (identidad del 76% con Glu1B) en complejo con celobiosa (3VIK) (Jeng et al. 2011). Los aminoácidos treonina y cisteína, los cuales están presentes más frecuentemente en la posición 193 de las secuencias de  $\beta$ -glucosidasas con alta actividad específica de acuerdo con los resultados de este trabajo, son capaces de formar dicho puente de hidrógeno ya que ambos se tratan de aminoácidos

polares, hidrofóbicos y de cadena corta según la clasificación de Taylor (Taylor 1986). En contraste, los aminoácidos no polares, cuya presencia en esta posición está relacionada con una menor actividad específica (Figura 11), no son capaces de formar este puente de hidrógeno con el sustrato. Por lo tanto, la formación de un puente de hidrógeno entre un residuo de treonina o cisteína en la posición Thr193 y el átomo O2 de la glucosa no reductora de la celobiosa parece ser responsable de una hidrólisis más eficiente y, con ello, una mayor actividad específica en las  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH1. Por otra parte, los aminoácidos Asn250 e Hys252 de Glu1B forman dos puentes de hidrógeno con la glucosa reductora de la celobiosa (aglicón o subsitio +1) de acuerdo con el análisis previamente mencionado (3VIK) (Jeng et al. 2011) y ayudan así a otorgar la especificidad sobre la celobiosa como sustrato. En este trabajo se encontró que la presencia de glicina en la posición Ile151 en lugar de aminoácidos alifáticos de cadena mediana como Ile y Leu tiene un impacto negativo en la actividad específica sobre celobiosa. La glicina es conocida por ser un aminoácido único que ocasiona cambios drásticos en la estructura secundaria de las proteínas, como conferir flexibilidad a los residuos contiguos (Imai y Mitaku 2005), lo cual puede derivar en que los puentes de hidrógeno entre los aminoácidos contiguos a ella y la celobiosa no se puedan formar y, por ello, que el reconocimiento de la celobiosa como sustrato sea ineficiente. Si bien se ha sugerido previamente que los aminoácidos de las  $\beta$ -glucosidasas GH1 que interactúan con el extremo reductor del sustrato están involucrados en el reconocimiento del mismo y en la especificidad de la enzima y no participan en la reacción de hidrólisis (Badieyan et al. 2012), no existen hasta la fecha reportes de aminoácidos o motivos relacionados con una mayor actividad sobre sustratos específicos. Por ende, la identificación de este motivo puede ser útil para la mejora de  $\beta$ -glucosidasas existentes mediante ingeniería de proteínas con el fin de incrementar su actividad sobre celobiosa.

La clonación de la secuencia codificante para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* en el vector pGEM-T presentó algunas problemáticas. Primeramente, se intentó realizar la síntesis de esta secuencia a partir de una preparación del plásmido pUC57-CfBG adquirida directamente de una compañía de síntesis de genes. Esta preparación fue recibida de forma liofilizada, disuelta en agua libre de nucleasas, tratada con calor para la desactivación de nucleasas y almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por más de un año. Sin embargo,

repetidos intentos de la síntesis por PCR de alta fidelidad de la secuencia codificante de Glu1B a partir de este ADN molde y su posterior clonación en pGEM-T resultaron en 4-11 mutaciones puntuales en la secuencia objetivo por clona de *E. coli* analizada, independientemente de la cepa utilizada (TOP10 o JM109), las cuales fueron distintas en cada clona y constaron en un 94.3% de sustituciones del tipo G→T/C→A. Las sustituciones del tipo G→T/C→A son características de productos de PCR de ADN depurinado, ya que los nucleótidos G son propensos a depurinación y las polimerasas procariotas tienden a agregar nucleótidos A en la hebra complementaria cuando encuentran bases depurinadas (Ide et al. 1995; Kunkel 1984). La depurinación es un proceso natural de daño químico al ADN que consiste en la remoción de purinas de las bases nitrogenadas, y se ha visto que su velocidad aumenta a mayor temperatura, menor pH y ausencia de sales (An et al. 2014). Debido a que el plásmido pUC57-CfBG originalmente empleado para la síntesis de la secuencia codificante de Glu1B fue disuelto en agua sin sales ni control de pH y además tratado con calor para la desactivación de nucleasas, se propició un ambiente para la depurinación del ADN que fue finalmente responsable de las mutaciones observadas. Este problema se resolvió posteriormente mediante el aislamiento de nuevo plásmido que fue utilizado inmediatamente y que no fue tratado con calor.

El segundo problema afrontado durante la clonación de la secuencia codificante para la β-glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* en el vector pGEM-T fue la modificación del plásmido pUC57-CfBG por células de *E. coli* cultivadas a alta temperatura. Experimentos previos en el laboratorio mostraron que la replicación de pUC57-CfBG en *E. coli* TOP10 y *E. coli* GM2929 a 37°C resulta en una inserción de ~1.4 kb en el plásmido, la cual se puede evitar si las células son cultivadas a 24°C. Para asegurar la ausencia de depurinación en el ADN molde empleado para la síntesis de la secuencia codificante de Glu1B, se aisló pUC57-CfBG a partir de la conserva original de *E. coli* TOP10 adquirida de una compañía de síntesis de genes. Sin embargo, la alta temperatura ambiental durante la reactivación de esta cepa (27-30°C) favoreció la modificación parcial de pUC57-CfBG y la obtención de una mezcla de pUC57-CfBG con y sin la inserción de ~1.4 kb (Figura 13). Este problema se resolvió mediante la transformación de *E. coli* con esta mezcla para separar ambas versiones del plásmido, aunque es interesante notar que las clonas de tamaño



regular en este experimento presentaron la versión con la inserción y únicamente las colonias más pequeñas contuvieron la versión correcta de pUC57-CfBG (Figura 15). La inestabilidad de plásmidos recombinantes ya ha sido reportada previamente para *E. coli* y es una problemática recurrente en la clonación de secuencias que pueden expresar productos tóxicos, secuencias con alto contenido AT, secuencias que forman estructuras secundarias y terciarias, secuencias altamente repetitivas, secuencias que incluyen promotores, entre otro tipo de secuencias (Mostafa et al. 2015). Si bien las cepas de *E. coli* empleadas actualmente en biología molecular contienen mutaciones en el gen *RecA* para disminuir los eventos de recombinación del ADN exógeno con el genoma, se han descrito algunos mecanismos de recombinación independiente de RecA mediante los cuales *E. coli* puede generar deleciones o inserciones en algunos tipos de secuencias introducidas (Bzymek y Lovett, 2001). Dentro de algunos de los métodos existentes para disminuir los eventos de recombinación no deseados en secuencias recombinantes en *E. coli* se encuentra el uso de cepas con distintos tipos de mutaciones en *RecA*, cepas con mutaciones adicionales en genes involucrados con la recombinación y la reducción de la temperatura del cultivo (Mostafa et al. 2015), el último de los cuales coincide con el caso afrontado en este trabajo.

Durante la selección de cepas de *P. pastoris* sobreproductoras de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* (BGlu) se encontraron clonas con distintos rendimientos producto/biomasa (Figura 31) y distintos niveles de actividad enzimática (Figura 33). La alta variación clonal es una propiedad inherente de cepas recombinantes de *P. pastoris* y es producto de una combinación de factores que incluyen la variación en el número de copias del casete de expresión integrados en tándem en el sitio de recombinación homóloga y la posibilidad de ocurrencia de eventos de recombinación no homóloga del casete de expresión cerca de secuencias regulatorias o interrumpiendo genes del hospedero (Schwarzahns et al. 2016). Debido a ello, es necesario un proceso de tamizaje para seleccionar las clonas con las características deseadas (Schwarzahns et al. 2016). En este trabajo se realizó la selección de cepas de *P. pastoris* sobreproductoras de BGlu utilizando el rendimiento de proteínas totales por unidad de biomasa como indicador de la actividad enzimática de BGlu. Un análisis de regresión confirmó que existió una relación lineal directa entre estos dos parámetros (Figura 35), por lo que el rendimiento de

proteínas/biomasa fue un predictor válido de la producción de BGlu en *P. pastoris*, y pudiera ser utilizado para seleccionar cepas sobreproductoras de otras proteínas.

Una de las clonas de *P. pastoris* con rendimiento producto/biomasa alto obtenidas en este trabajo no presentó actividad en el medio libre de células del cultivo (Figura 33). Asimismo, algunos cultivos preliminares realizados presentaron actividad en el medio libre de células a las 36 h de inducción, pero no a las 48 h. Esto pudiera deberse a la degradación de BGlu por proteasas de *P. pastoris* a largos tiempos de cultivo, fenómeno que podría explicar la presencia de una banda adicional de ~41 kDa tras la purificación (Figura 42), la cual pudiera tratarse de BGlu digerida por alguna proteasa. Además, la disminución de la actividad enzimática a altos tiempos de cultivo también pudiera deberse a que BGlu alcanza su punto isoeléctrico a largos tiempos de cultivo. En este trabajo se calculó el punto isoeléctrico de BGlu en 4.5 (sección 7.3.2.1), lo cual significa que esta enzima pierde la solubilidad y es propensa a precipitar a pHs cercanos a 4.5. A pesar de que los cultivos de *P. pastoris* se realizaron a pH 6, es sabido que la actividad metabólica de *P. pastoris* disminuye el pH del medio en cultivos en matraz (Cha et al. 2005). Tomando esto en consideración, es posible que la suficiente prolongación de los cultivos favorezca el descenso del pH hasta alcanzar el punto isoeléctrico de BGlu, al cual la enzima precipita y no es posible detectar su actividad en el medio libre de células. Alternativas como el cultivo en biorreactor bajo condiciones controladas de pH serían entonces ideales para producir BGlu sin riesgo de alcanzar el punto isoeléctrico de la enzima (Looser et al. 2014).

Tras la selección de cepas de *P. pastoris* sobreproductoras de BGlu, se obtuvieron concentraciones de proteínas totales de hasta 23.7 mg/L en el medio libre de células, las cuales equivalen a niveles de producción de hasta 11.1 mg/L de la proteína heteróloga y a una productividad de 0.31 mg/Lh. Esto está dentro del rango de lo reportado para otras  $\beta$ -glucosidasas producidas en *P. pastoris* en cultivos en matraz con metanol como inductor. Harnpicharnchai et al. (2009) produjeron 10.4 mg/L de una  $\beta$ -glucosidasa de un hongo del género *Periconia* tras inducción por 5 días utilizando la cepa Mut<sup>S</sup> KM71 (productividad de 0.09 mg/Lh), mientras que Li et al. (2017) produjeron ~117.8 mg/L de proteínas totales equivalentes a ~35.4 mg/L de una  $\beta$ -glucosidasa de la cucaracha

*Panesthia angustipennis spadica* tras 7 días de inducción utilizando la cepa Mut<sup>S</sup> KM71H (productividad de 0.21 mg/Lh). Por otra parte, Zhao et al. (2013) obtuvieron 275 mg/L de proteínas totales equivalentes a 161.8 mg/L de una  $\beta$ -glucosidasa del hongo *Aspergillus niger* NL-1 tras 120 h de inducción utilizando la cepa Mut<sup>+</sup> GS115 (productividad de 1.35 mg/Lh). Si bien los niveles de producción obtenidos de BGlu en este trabajo están en la parte baja del rango reportado para otras  $\beta$ -glucosidasas en *P. pastoris* en cultivos en matraz, la productividad es mayor que en dos de los tres trabajos antes mencionados, aunque alrededor de cuatro veces menor que en el caso de la  $\beta$ -glucosidasa de *A. niger* NL-1. Una de las posibles razones de que los valores de productividad no sean tan altos como en dicho trabajo es que, si bien la secuencia codificante utilizada presenta codones adecuados para *P. pastoris*, el codón TCA que codifica para serina y que está presente 23 veces en esta secuencia tiene una frecuencia de uso de 0.11 en *P. pastoris* bajo condiciones de inducción en metanol, (Abad et al. 2010), muy cerca del valor de referencia de 0.1 definido como de baja frecuencia, lo cual puede disminuir la velocidad de traducción de la proteína.

En este trabajo se lograron construir cepas de *P. pastoris* capaces de producir la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de la termita *C. formosanus*. Esta es apenas la cuarta  $\beta$ -glucosidasa de termita y la sexta de insecto producida a la fecha en *P. pastoris*, luego de las  $\beta$ -glucosidasas G1mgNtBG1 y G1sgNtBG1 de la termita *Nasutitermes takasagoensis* (Uchima et al. 2013; Uchima et al. 2012), MDBG-II de la mosca *Musca domestica* (Zhang et al. 2017b), PaBG1b de la cucaracha *Panesthia angustipennis spadica* (Li et al. 2017) y MaBG de la termita *Microcerotermes annandalei* (Arthornthurasuk et al. 2018). La  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de la termita *C. formosanus* producida en *P. pastoris* (denominada BGlu) presentó una masa molecular desglicosilada de ~53 kDa (Figura 28), la cual coincide con la masa molecular teórica de acuerdo con su secuencia aminoacídica (54.6 kDa) y es un poco menor a la masa molecular de Glu1B expresada en *E. coli* con una cola de histidinas C-terminal (~56 kDa) (Zhang et al. 2010).

Los resultados de este trabajo indican que el Tris es un fuerte inhibidor de BGlu, ya que inhibe completamente su actividad a 100 mM (Figura 40). Debido a ello, la purificación de BGlu se realizó utilizando TEA-HCl. Se ha reportado que el Tris es un inhibidor de

$\beta$ -glucosidasas GH1 como la *NkBgl* de la termita *Neotermes koshunensis* y la *TrBgl2* de *Trichoderma reesei*, a las cuales inhibe en más de un 50% a 1 mM y completamente a 100 mM debido a que se une al sitio activo (Jeng et al. 2011). A pesar de ello, algunos autores han purificado  $\beta$ -glucosidasas GH1 de insectos por cromatografía utilizando Tris-HCl y un paso de diálisis posterior (Li et al. 2017).

Una de las características de *P. pastoris* como hospedero para la producción de proteínas recombinantes es su capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales como N-glicosilación y O-glicosilación (Cereghino y Cregg 2000). Estas modificaciones pueden modificar las propiedades de las proteínas, como su estabilidad, velocidad de reacción o reconocimiento de sustratos (Goettig 2016). En el caso de BGlu, ésta contiene 3 sitios potenciales de N-glicosilación en su secuencia: 22NDTL, 323NGTY y 409NDTN, los cuales todos se encuentran accesibles en la superficie de la proteína. En este trabajo, BGlu fue purificada en dos fracciones con distintos grados de N-glicosilación: la fracción 2, que presenta un incremento en la masa molecular debido a la N-glicosilación de ~3-5 kDa (~7% de glicosilación), y la fracción 3, que presenta un incremento de ~7-9 kDa (~13% de glicosilación) (Figura 42). Otras  $\beta$ -glucosidasas de insectos producidas en *P. pastoris* también presentan N-glicosilación, como PaBG1b de la cucaracha *Panesthia angustipennis spadica* (3.8 kDa de incremento equivalente a 6% de glicosilación) (Li et al. 2017) y G1mgNtBG1 de la termita *Nasutitermes takasagoensis* (6 kDa de incremento equivalente a 10% de glicosilación) (Uchima et al. 2012); sin embargo, se desconoce el efecto de la glicosilación en las propiedades de estas enzimas. Similar a lo que se obtuvo en este trabajo, la  $\beta$ -glucosidasa D2-BGL producida de forma nativa en el hongo *Chaetomella raphigera* fue previamente purificada en dos fracciones con distintos grados de glicosilación (Yoneda et al. 2014), aunque en este caso las diferencias fueron en el grado de O-glicosilación. Los autores encontraron diferencias en las propiedades de las formas con distintos grados de glicosilación de D2-BGL, como mayor termoestabilidad y mayor actividad sobre celobiosa en la forma más glicosilada.

Los resultados de este trabajo demuestran que la temperatura y pH óptimos de BGlu purificada son 50°C a pH 5.0 (Figura 44 y Figura 45), y que la forma más glicosilada de BGlu presenta mayor actividad relativa a pH 4.0 y pH 6.0 (Figura 44). Esta misma enzima

producida de forma desglicosilada en *E. coli* (Glu1B) presenta la misma temperatura óptima que BGlu, pero mayor actividad relativa a menores temperaturas (Zhang et al. 2012a). Por otra parte, el pH óptimo de Glu1B de acuerdo con el trabajo de Zhang et al. (2012a) comprende desde 5.0 hasta 6.2, la enzima presenta mayor actividad relativa a diversos valores de pH que la forma menos glicosilada de BGlu y un perfil de actividad muy similar a la forma más glicosilada de BGlu. Sin embargo, los resultados del efecto del pH en la actividad de Glu1B producida en *E. coli* en dicho trabajo no son del todo confiables debido a que los autores utilizaron buffer de acetato de sodio para todos los valores de pH analizados, incluso fuera de su rango amortiguador (Zhang et al. 2012a). En otro estudio, el pH óptimo de Glu1B producida en *E. coli* fue de 5.0, y la enzima presentó menor actividad relativa a pH 4.0 y pH 6.0 que cualquiera de las formas con distinto grado de N-glicosilación de BGlu (Feng et al. 2015). Las diferencias entre los perfiles de actividad de Glu1B y las formas con menor y mayor glicosilación de BGlu con respecto al pH y a la temperatura indican que la N-glicosilación parece tener un efecto en las propiedades de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *Coptotermes formosanus*: de acuerdo con los resultados de este trabajo y con los de la enzima caracterizada en *E. coli* (Zhang et al. 2012a; Feng et al. 2015): la glicosilación de esta  $\beta$ -glucosidasa incrementa su actividad relativa a valores de pH distintos al óptimo pero disminuye su actividad a baja temperatura. Estudios previos han demostrado diferencias en los perfiles de actividad con respecto al pH o a la temperatura de otras enzimas debido a su glicosilación al producirse de forma recombinante. Por ejemplo, la fitasa C de *Bacillus subtilis* producida de forma glicosilada en *P. pastoris* presenta mayor actividad relativa a distintas temperaturas que la forma nativa no glicosilada (Guerrero-Olazarán et al. 2010), mientras que la  $\beta$ -glucosidasa MaBG de la termita *Microcerotermes annandalei* producida en *P. pastoris* presenta mayor actividad relativa a distintos valores de pH que la nativa (Arthornthurasuk et al. 2018).

La forma de menor N-glicosilación de BGlu siguió una cinética típica de Michaelis-Menten (Figura 46), lo cual coincide con lo mostrado por la enzima producida de forma desglicosilada en *E. coli* (Zhang et al. 2012a) y por otras  $\beta$ -glucosidasas monoméricas de la familia GH1 (Pei et al. 2012; Li et al. 2017). Sin embargo, la forma de mayor N-glicosilación de BGlu siguió una cinética que se ajustó mejor a una ecuación

sigmoidal que a la de Michaelis-Menten (Figura 47), lo cual sugiere cooperatividad entre múltiples sitios activos. Si bien es conocido que las  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH1 únicamente poseen un sitio activo, existen casos de  $\beta$ -glucosidasas GH1 que forman homodímeros (Tokuda et al. 2002; Arthornthurasuk et al. 2018) u homotrímeros (Uchima et al. 2012; Uchima et al. 2013; Uchiyama et al. 2015), lo cual pudiera favorecer dicha cooperatividad. Un análisis por PAGE en condiciones nativas es necesario para determinar si la forma de mayor N-glicosilación de BGlu existe de forma multimérica.

Las actividades específicas a condiciones óptimas de las dos formas de menor y mayor N-glicosilación de BGlu caracterizadas en este trabajo fueron de 431 y 597  $\text{Umg}^{-1}$ , respectivamente, de acuerdo con la definición que fija una unidad de  $\beta$ -glucosidasa como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto a partir de celobiosa. Estos valores son muy similares a la actividad específica a condiciones óptimas de la enzima producida en *E. coli*, que es de 462.6  $\text{Umg}^{-1}$  (Zhang et al. 2012a), lo cual demuestra que la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* conserva su propiedad de alta actividad específica al producirse en *P. pastoris*. Sin embargo, las actividades específicas máximas de las formas de menor y mayor N-glicosilación de BGlu ajustadas a 40°C y pH 6.0 fueron de 216 y 336  $\text{Umg}^{-1}$ , respectivamente, menores que la actividad específica a estas condiciones de la enzima producida en *E. coli* (440  $\text{Umg}^{-1}$ ) (Zhang et al. 2012a). Esto indica que la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* reduce su actividad específica a condiciones similares al tracto digestivo animal al producirse en *P. pastoris*, pero aun así mantiene una actividad específica a estas condiciones mucho mayor que las  $\beta$ -glucosidasas comerciales actuales ( $\sim 2 \text{ U/mg}$  en el caso de la  $\beta$ -glucosidasa de *A. niger* de Novozyme 188 (Calsavara et al. 1999)).

Las formas de menor y mayor N-glicosilación de BGlu caracterizadas en este trabajo presentaron valores de  $K_m$  sobre celobiosa de 6.71 y 11.38 mM, respectivamente (Figura 46 y Figura 47), mientras que el valor de  $K_m$  de la enzima desglicosilada producida en *E. coli* es de 2.2-2.3 mM (Zhang et al. 2012a; Feng et al. 2015). Esto significa que la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* reduce su afinidad a la celobiosa al producirse en *P. pastoris*, posiblemente debido a la glicosilación. Cambios en la afinidad de una enzima a su sustrato debido a la N-glicosilación ya han sido reportados, como en el caso de la

proteasa humana KLK2 (Goettig 2016). Sin embargo, las concentraciones típicas de mono y oligosacáridos en el tracto digestivo animal después de la alimentación suelen estar en el rango de 50-500 mM (Jones et al. 1983; Ferraris et al. 1990), muy por encima del  $K_m$  de BGlu, por lo que la disminución de la afinidad a la celobiosa puede no ser relevante para la aplicación de BGlu en nutrición animal.

La forma glicosilada de BGlu analizada en este trabajo fue inhibida de forma competitiva por glucosa con un coeficiente de inhibición ( $K_i$ ) de 166 mM, lo cual no coincide con los datos previamente obtenidos para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* (Zhang et al. 2012a) pero sí es muy similar al  $K_i$  de 180 mM observado para la  $\beta$ -glucosidasa PaBG1b de la cucaracha *Panesthia angustipennis spadica* producida en *P. pastoris* (Li et al. 2017) y mucho mayor al  $K_i$  de  $\beta$ -glucosidasas populares en la industria como Novozyme 188 de *A. niger* ( $K_i \sim 3-10$  mM) (Calsavara et al. 1999; Dekker 1986).. Este resultado puede considerarse como una resistencia moderada a la inhibición por glucosa, ya que los valores de  $K_i$  debido a glucosa en diversas  $\beta$ -glucosidasas van desde  $<1$  hasta  $>1,000$  mM (Uchima et al. 2012; Teugjas y Våljamäe 2013; Ariaeenejad et al. 2020), si bien la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas más tolerantes a la glucosa ( $K_i >1,000$  mM) hidrolizan preferentemente pNPG como sustrato y no celobiosa (Salgado et al. 2018). El análisis de frecuencia de residuos en la entrada al túnel del sitio activo de  $\beta$ -glucosidasas de termitas mostró que es posible que la presencia de Met204, Gln360, Ala368, Ser369, Ser370, Leu450, and Arg451 influya en la tolerancia moderada a glucosa que deben tener las  $\beta$ -glucosidasas de insectos xilófagos como las termitas.

Los resultados de este trabajo muestran que los cationes divalentes tienen un efecto temperatura-dependiente en la actividad de BGlu: mientras el manganeso y, en menor medida, el magnesio, incrementan su actividad a 60°C, el calcio y el magnesio disminuyen su actividad a 50°C pero no el manganeso (Figura 51). Estudios previos han mostrado que el manganeso potencia fuertemente ( $>50\%$ ) la actividad de  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH1 como CcBglA de la bacteria *Clostridium cellulovorans*, TrBgl2 del hongo *Trichoderma reesei* y NkBlg de la termita *Neotermes koshunensis* a una temperatura no especificada (Jeng et al. 2011) y débilmente ( $<15\%$ ) la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa G1NkBG de la termita *N. koshunensis* a 50°C (Uchima et al. 2011), lo cual concuerda con

los resultados aquí obtenidos. Además, estos mismos estudios también mostraron que el calcio y el magnesio son inhibidores de estas  $\beta$ -glucosidasas a las temperaturas estudiadas, concordando con los resultados de este trabajo (Jeng et al. 2011; Uchima et al. 2011). Sin embargo, hasta la fecha no se había reportado el efecto de cationes divalentes en la actividad de  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH1 de forma dependiente de temperatura, por lo que este es el primer trabajo donde se describe este fenómeno. El incremento de la actividad de BGlu por adición de magnesio a alta temperatura tiene relevancia en industria, ya que es posible utilizar esta enzima con magnesio como aditivo en procesos que requieran temperaturas de 60°C

En este trabajo, BGlu presentó poca estabilidad a temperaturas de 50°C o 60°C (<20% de actividad residual tras incubación por 30 min). Este resultado fue muy distinto a lo previamente reportado para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* no N-glicosilada producida en *E. coli*, la cual presentó actividad residual del 85% tras incubación a 60°C (Zhang et al. 2012a). Por lo general, la N-glicosilación incrementa la termoestabilidad de las enzimas (Guerrero-Olazarán et al. 2010; Zhang et al. 2013; Miyazaki et al. 2015; Guo et al. 2016), en especial si dicha glicosilación se localiza en una región flexible de la proteína (Shental-Bechor y Levy 2009) como en el caso de Glu1B producida en *P. pastoris*. Además, las enzimas digestivas de insectos no están adaptadas para soportar altas temperaturas (Arakawa et al. 2016), por lo que los resultados sobre termoestabilidad previamente reportados para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* producida en *E. coli* deben tomarse con cautela (Zhang et al. 2012a).

En general, la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* es una enzima que posee propiedades atractivas para su aplicación en nutrición animal y en otras aplicaciones industriales, tales como alta actividad específica, resistencia a inhibición por producto, termoestabilidad, alta actividad a las condiciones del tracto digestivo animal y actividad en el rango de pH del tracto digestivo animal. La enzima producida de forma recombinante y N-glicosilada en *P. pastoris* conservó la alta actividad específica y el perfil de actividad a distintos valores de pH respecto a la enzima producida de forma no glicosilada en *E. coli*, pero disminuyó su actividad a las condiciones típicas del tracto digestivo de animales monogástricos, su termoestabilidad y su resistencia a inhibición por glucosa. Aun así, la



actividad específica a las condiciones típicas del tracto digestivo de animales monogástricos y la resistencia a inhibición por glucosa de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* producida de forma recombinante en *P. pastoris* en este trabajo siguen siendo atractivas para su aplicación en nutrición animal al ser mucho mayores que los mismos parámetros en las  $\beta$ -glucosidasas empleadas actualmente en la industria. Además, se encontró que el manganeso es un potenciador de la actividad de BGlu a 60°C, lo cual puede tener relevancia industrial.

## 9. CONCLUSIONES

- Se encontraron  $\beta$ -glucosidasas reportadas en la literatura con propiedades catalíticas atractivas para su aplicación animal, tales como alta actividad específica a las condiciones del tracto digestivo animal y resistencia a inhibición por producto.
- La  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de la termita *Coptotermes formosanus* fue seleccionada por sus propiedades catalíticas para ser producida en *Pichia pastoris*.
- Se identificaron los siguientes residuos específicos relacionados con la alta actividad específica de Glu1B y otras  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH1: Gln455 en el sitio de unión al glicón, Thr193 y Hys252 en el sitio de unión al aglicón, y Leu192, Ile251, y Phe333 como residuos de enlace entre los sitios de unión al glicón o/y aglicón.
- Se lograron construir cepas de *P. pastoris* capaces de producir y secretar la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B activa de *C. formosanus*.
- La  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* producida en *P. pastoris* (BGlu) presentó distintos grados de N-glicosilación y una masa molecular desglucosilada de ~53 kDa.
- La cepa de *P. pastoris* seleccionada como la sobreproductora de BGlu alcanzó niveles de producción de 11.1 mg/L de la proteína heteróloga.
- BGlu fue purificada como dos formas con distintos patrones de glicosilación. Ambas formas presentaron propiedades similares pero la forma más glicosilada mostró mayor actividad relativa a pHs distintos al óptimo que la forma menos glicosilada.
- La  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* conservó su alta actividad específica y su rango de actividad a distintos valores de pH al producirse en *P. pastoris*; sin embargo, la enzima disminuyó su actividad específica a condiciones del tracto digestivo animal.
- BGlu mostró una resistencia moderada a la inhibición competitiva por glucosa, con una  $K_i$  de 166 mM.
- Los cationes divalentes mostraron un efecto temperatura-dependiente en la actividad de BGlu, donde  $Mn^{2+}$  actúa como potenciador de la actividad de BGlu a 60°C.

- BGlu mostró menor termoestabilidad que la enzima previamente producida en *E. coli*, aunque se ésta incrementó en presencia de glicerol o  $Mn^{2+}$ .
- En general, la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* producida en *P. pastoris* (BGlu) conservó las principales características de la enzima caracterizada en *E. coli*, como alta actividad específica y resistencia a inhibición por glucosa, que la hacen atractiva para su uso en nutrición animal.

## 10. PERSPECTIVAS

En este trabajo se seleccionó una  $\beta$ -glucosidasa con características que la hacen atractiva para su aplicación en nutrición animal (la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus*), se produjo en *Pichia pastoris* y se caracterizó bioquímicamente. Sin embargo, aún se deben evaluar características adicionales de esta enzima para determinar su viabilidad para emplearse en nutrición animal, en especial su termoestabilidad y su resistencia a inhibición por producto. Adicional a ello, es conveniente evaluar la eficiencia de esta enzima en procesos industriales ya establecidos como la producción de bioetanol. Asimismo, se requieren de estudios para evaluar la sinergia de la enzima con otras celulasas en la digestión de celulosa tanto en modelos *in vitro* que imiten las condiciones del tracto digestivo animal como *in vivo* en pruebas animales.

En este estudio se encontraron diferencias entre las propiedades de dos formas de la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B de *C. formosanus* con distintos grados de N-glicosilación. Se requieren de estudios posteriores para elucidar qué diferencias existen entre los azúcares unidos a ambas formas de esta enzima producida en *P. pastoris* y cómo impactan en sus propiedades.

Una de las características que presentó la enzima estudiada en este trabajo fue el incremento temperatura-específico de su actividad por cationes divalentes, en especial el manganeso. Se requieren estudios adicionales para entender el mecanismo por el cual sucede este fenómeno y posteriormente encontrar condiciones con aditivos de cationes en las que la enzima funcione mejor en procesos industriales actuales y para nutrición animal.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abad S, Nahalka J, Bergler G, Arnold SA, Speight R, Fotheringham I, Nidetzky B, Glieder A. 2010. Stepwise engineering of a *Pichia pastoris* D-amino acid oxidase whole cell catalyst. *Microbial Cell Factories* 9:24.
- Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98:5301–5317.
- Akram F, Haq I ul, Mukhtar H. 2018. Gene cloning, characterization and thermodynamic analysis of a novel multidomain hyperthermophilic GH family 3  $\beta$ -glucosidase (TnBglB) from *Thermotoga naphthophila* RKU-10T. *Process Biochemistry* 66:70–81.
- Amerah AM, Gilbert C, Simmins PH, Ravindran V. 2011. Influence of feed processing on the efficacy of exogenous enzymes in broiler diets. *World's Poultry Science Journal* 67:29–46.
- An R, Jia Y, Wan B, Zhang Y, Dong P, Li J, Liang X. 2014. Non-enzymatic depurination of nucleic acids: Factors and mechanisms. *PLoS ONE* 9:0–10.
- Arakawa G, Kamino K, Tokuda G, Watanabe H. 2016. Purification, Characterization, and cDNA Cloning of a Prominent  $\beta$ -Glucosidase from the Gut of the Xylophagous Cockroach *Panesthia angustipennis spadica*. *Journal of Applied Glycoscience* 63:51–59.
- Ariaeenejad S, Nooshi-Nedamani S, Rahban M, Kavousi K, Pirbalooti AG, Mirghaderi SS, Mohammadi M, Mirzaei M, Salekdeh GH. 2020. A novel high glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase: Targeted computational approach for metagenomic screening. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:1–14.
- Arthornthurasuk S, Jenkhetkan W, Suwan E, Chokchaichamnankit D, Srisomsap C, Wattana-Amorn P, Svasti J, Kongsaree PT. 2018. Molecular Characterization and Potential Synthetic Applications of GH1  $\beta$ -Glucosidase from Higher Termite *Microcerotermes annandalei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 186:877–894.
- Badieyan S, Bevan DR, Zhang C. 2012. Probing the Active Site Chemistry of  $\beta$ -Glucosidases along the Hydrolysis Reaction Pathway. *Biochemistry* 51:8907–8918.
- Barbosa FF, Tokach MD, DeRouchey JM, Goodband RD, Nelssen JL, Dritz SS. 2008. Variation in chemical composition of soybean hulls. *Swine Day 2008*:158–165.
- Barnett CC, Berka RM, Fowler T. 1991. Cloning and Amplification of the Gene Encoding an Extracellular  $\beta$ -Glucosidase from *Trichoderma reesei*: Evidence for Improved Rates of Saccharification of Cellulosic Substrates. *Nature Biotechnology* 9:562–567.
- Bedford MR, Partridge GG. 2010. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, 2nd Edition, 2nd ed. CABI, Oxfordshire.

- Berrin J-G, McLauchlan WR, Needs P, Williamson G, Puigserver A, Kroon PA, Juge N. 2002. Functional expression of human liver cytosolic  $\beta$ -glucosidase in *Pichia pastoris*. *European Journal of Biochemistry* 269:249–258.
- Blasi DA, Drouillard J, Titgemeyer EC, Paisley SI, Brouk MJ. 2000. Soybean Hulls. Composition and Feeding Value for Beef and Dairy Cattle.
- Boonvitthya N, Bozonnet S, Burapatana V, O'Donohue MJ, Chulalaksananukul W. 2013. Comparison of the Heterologous Expression of *Trichoderma reesei* Endoglucanase II and Cellobiohydrolase II in the Yeasts *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. *Molecular Biotechnology* 54:158–169.
- Bugg TD, Ahmad M, Hardiman EM, Singh R. 2011. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Current Opinion in Biotechnology* 22:394–400.
- Byeon GM, Lee KS, Gui ZZ, Kim I, Kang PD, Lee SM, Sohn HD, Jin BR. 2005. A digestive  $\beta$ -glucosidase from the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA cloning, expression and enzymatic characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 141:418–427.
- Bzymek M, Lovett ST. 2001. Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:8319–8325.
- Calsavara LP V., De Moraes FF, Zanin GM. 1999. Modeling Cellobiose Hydrolysis with Integrated Kinetic Models. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 79:789–806.
- Cao L, Wang Z, Ren G, Kong W, Li L, Xie W, Liu Y. 2015. Engineering a novel glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration. *Biotechnology for Biofuels* 8:202.
- Cereghino J, Cregg J. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24:45–66.
- Cha HJ, Dalal NN, Bentley WE. 2005. Secretion of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in recombinant *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 126:1–11.
- Chan CS, Sin LL, Chan K-G, Shamsir MS, Manan FA, Sani RK, Goh KM. 2016. Characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Anoxybacillus* sp. DT3-1. *Biotechnology for Biofuels* 9:174.
- Chen H. 2014. *Biotechnology of Lignocellulose*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Chen H, Hayn M, Esterbauer H. 1992. Purification and characterization of two extracellular  $\beta$ -glucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1121:54–60.

- Chen M, Qin Y, Liu Z, Liu K, Wang F, Qu Y. 2010. Isolation and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme and Microbial Technology* 46:444–449.
- Chirico WJ, Brown RD. 1987. Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry* 165:333–341.
- Collins CM, Murray PG, Denman S, Morrissey JP, Byrnes L, Teeri TT, Tuohy MG. 2007. Molecular cloning and expression analysis of two distinct  $\beta$ -glucosidase genes, *bg1* and *aven1*, with very different biological roles from the thermophilic, saprophytic fungus *Talaromyces emersonii*. *Mycological Research* 111:840–849.
- Cornette R, Farine J-P, Abed-Viellard D, Quenedey B, Brossut R. 2003. Molecular characterization of a male-specific glycosyl hydrolase, Lma-p72, secreted on to the abdominal surface of the Madeira cockroach *Leucophaea maderae* (Blaberidae, Oxyhaloinae). *Biochemical Journal* 372:535–541.
- Crooks G, Hon G, Chandonia J, Brenner S. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*. 14:1188–1190.
- Dahmen N, Lewandowski I, Zibek S, Weidtmann A. 2018. Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives. *GCB Bioenergy* 11:gcb.12586.
- De Ovalle S, Brena B, González-Pombo P. 2021. Influence of beta glucosidases from native yeast on the aroma of Muscat and Tannat wines. *Food Chemistry* 346:128899.
- Dekker RFH. 1986. Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial  $\beta$ -D-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 28:1438–1442.
- Fang Z, Fang W, Liu J, Hong Y, Peng H, Zhang X, Sun B, Xiao Y. 2010. Cloning and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from marine microbial metagenome with excellent glucose tolerance. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20:1351–1358.
- Feng T, Liu H, Xu Q, Sun J, Shi H. 2015. Identification and Characterization of Two Endogenous  $\beta$ -Glucosidases from the Termite *Coptotermes formosanus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176:2039–2052.
- Ferraris RP, Yasharpour S, Lloyd KCK, Mirzayan R, Diamond JM. 1990. Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 259:G822–G837.
- Franco Cairo JPL, Oliveira LC, Uchima CA, Alvarez TM, Citadini AP da S, Cota J et al. 2013. Deciphering the synergism of endogenous glycoside hydrolase families 1 and 9 from *Coptotermes gestroi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43:970–981.

- Fusco FA, Fiorentino G, Pedone E, Contursi P, Bartolucci S, Limauro D. 2018. Biochemical characterization of a novel thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Dictyoglomus turgidum*. *International Journal of Biological Macromolecules* 113:783–791.
- Goettig P. 2016. Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases. *International Journal of Molecular Sciences* 17:1969.
- Guerrero-Olazarán M, Rodríguez-Blanco L, Carreón-Treviño JG, Gallegos-López JA, Viader-Salvado JM. 2010. Expression of a Bacillus Phytase C Gene in *Pichia pastoris* and Properties of the Recombinant Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology* 76:5601–5608.
- Guex N, Peitsch MC. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714–2723.
- Guo C, Liu Y, Yu H, Du K, Gan Y, Huang H. 2016. A novel strategy for thermostability improvement of trypsin based on N-glycosylation within the  $\Omega$ -loop region. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:1163–1172.
- Guo Y, Yan Q, Yang Y, Yang S, Liu Y, Jiang Z. 2015. Expression and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase, with transglycosylation and exo- $\beta$ -1,3-glucanase activities, from *Rhizomucor miehei*. *Food Chemistry* 175:431–438.
- Haq IU, Khan MA, Muneer B, Hussain Z, Afzal S, Majeed S, Rashid N, Javed MM, Ahmad I. 2012. Cloning, characterization and molecular docking of a highly thermostable  $\beta$ -1,4-glucosidase from *Thermotoga petrophila*. *Biotechnology Letters* 34:1703–1709.
- Harnpicharnchai P, Champreda V, Sornlake W, Eurwilaichitr L. 2009. A thermotolerant  $\beta$ -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. *Protein Expression and Purification* 67:61–69.
- Huang M, Li Z, Huang X, Gao W, Zhu C, Xu H et al. 2013. Co-expression of two fibrolytic enzyme genes in CHO cells and transgenic mice. *Transgenic Research* 22:779–790.
- Ide H, Murayama H, Sakamoto S, Makino K, Honda K, Nakamuta H, Sasaki M, Sugimoto N. 1995. On the mechanism of preferential incorporation of dAMP at abasic sites in translesional DNA synthesis. Role of proof reading activity of DNA polymerase and thermodynamic characterization of model template-primers containing an abasic site. *Nucleic Acids Research* 23:123–129.
- Imai K, Mitaku S. 2005. Mechanisms of secondary structure breakers in soluble proteins. *Biophysics* 1:55–65.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23–28.
- Jeng W-Y, Wang N-C, Lin M-H, Lin C-T, Liaw Y-C, Chang W-J, Liu C-I, Liang P-H, Wang AHJ. 2011. Structural and functional analysis of three  $\beta$ -glucosidases from



bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of Structural Biology* 173:46–56.

Jeske L, Placzek S, Schomburg I, Chang A, Schomburg D. 2019. BRENDA in 2019: A European ELIXIR core data resource. *Nucleic Acids Research* 47:D542–D549.

Jeya M, Joo A-R, Lee K-M, Sim W-I, Oh D-K, Kim Y-S, Kim I-W, Lee J-K. 2010. Characterization of endo- $\beta$ -1,4-glucoamylase from a novel strain of *Penicillium pinophilum* KMJ601. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:1005–1014.

Jones BJM, Brown BE, Loran JS, Edgerton D, Kennedy JF, Stead JA, Silk DB. 1983. Glucose absorption from starch hydrolysates in the human jejunum. *Gut* 24:1152–1160.

Karnaouri A, Topakas E, Paschos T, Taouki I, Christakopoulos P. 2013. Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3  $\beta$ -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. *PeerJ* 1:e46.

Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. 2015. The Phyre<sup>2</sup> web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10:845–858.

Kim S, Dale BE. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26:361–375.

Konar S, Sinha SK, Datta S, Ghorai PK. 2019. Probing the effect of glucose on the activity and stability of  $\beta$ -glucosidase: An all-atom molecular dynamics simulation investigation, *ACS Omega*. 4:11189–11196.

Korb J, Weil T, Hoffmann K, Foster KR, Rehli M. 2009. A Gene Necessary for Reproductive Suppression in Termites. *Science* 324:758–758.

Kosugi A, Arai T, Doi RH. 2006. Degradation of cellulosome-produced cello-oligosaccharides by an extracellular non-cellulosomal  $\beta$ -glucan glucohydrolase, BglA, from *Clostridium cellulovorans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349:20–23.

Krogh KBRM, Harris P V., Olsen CL, Johansen KS, Hojer-Pedersen J, Borjesson J, Olsson L. 2010. Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium brasilianum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86:143–154.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549.

Kunkel TA. 1984. Mutational specificity of depurination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:1494–1498.

- Lee H-L, Chang C-K, Jeng W-Y, Wang AHJ, Liang P-H. 2012. Mutations in the substrate entrance region of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* improve enzyme activity and thermostability. *Protein Engineering Design and Selection* 25:733–740.
- Lee I, Evans BR, Woodward J. 2000. The mechanism of cellulase action on cotton fibers: evidence from atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 82:213–221.
- Lee D, Owens VN, Boe A, Jeranyama P. 2007. Composition of herbaceous biomass feedstocks. *Brookings*.
- Li Y, Arakawa G, Tokuda G, Watanabe H, Arioka M. 2017. Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from the xylophagous cockroach *Panesthia angustipennis spadica* displaying high specific activity for cellobiose. *Enzyme and Microbial Technology* 97:104–113.
- Li W, Li Y-X, Ding K, Wu X-H. 2014. Cellulase gene recombinant *Lactobacillus* colonization of chicken gut and its effect on chicken growth performance. *Journal of Applied Animal Research* 42:492–496.
- Li W, Yang M-M, Zhang G-Q, He W-L, Li Y-X, Chen Y. 2012. Electrotransformation and Expression of Cellulase Genes in Wild-Type *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 22:228–234.
- Li X, Zhao J, Shi P, Yang P, Wang Y, Luo H, Yao B. 2013. Molecular Cloning and Expression of a Novel  $\beta$ -Glucosidase Gene from *Phialophora* sp. G5. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169:941–949.
- Liu K. 2011. Chemical Composition of Distillers Grains, a Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:1508–1526.
- Liu Y, Li R, Wang J, Zhang X, Jia R, Gao Y, Peng H. 2017. Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by a novel glucose- and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13T. *BMC Biochemistry* 18:4.
- Liu W, Shi P, Chen Q, Yang P, Wang G, Wang Y, Luo H, Yao B. 2010. Gene Cloning, Overexpression, and Characterization of a Xylanase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162:1–12.
- Liu D, Zhang R, Yang X, Zhang Z, Song S, Miao Y, Shen Q. 2012. Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial Cell Factories* 11:25.
- Lombard V, Ramulu HG, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research* 42:490–495.
- Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, Stenger C, Costa M, Camattari A, Fotiadis D, Kovar K. 2014. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances* 33:1177–1193.

- Mariano D, Pantuza N, Santos LH, Rocha REO, de Lima LHF, Bleicher L, de Melo-Minardi RC. 2020. Glutantbase: a database for improving the rational design of glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidases. *BMC Molecular and Cell Biology* 21:1–15.
- Mekoo JLD, Yang Y, Li T, Cao R, Liu J. 2010. Molecular cloning and expression of a synthetic gene encoding a  $\beta$ -glucosidase of *Aspergillus niger* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *International Journal of Biology* 2.
- Miyazaki T, Yashiro H, Nishikawa A, Tonozuka T. 2015. The side chain of a glycosylated asparagine residue is important for the stability of isopullulanase. *The Journal of Biochemistry* 157:225–234.
- Morant AV, Jørgensen K, Jørgensen C, Paquette SM, Sánchez-Pérez R, Møller BL, Bak S. 2008.  $\beta$ -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* 69:1795–1813.
- Mostafa A, Kanrai P, Petersen H, Ibrahim S, Rautenschlein S, Pleschka S. 2015. Efficient Generation of Recombinant Influenza A Viruses Employing a New Approach to Overcome the Genetic Instability of HA Segments(F Krammer, Ed). *PLOS ONE* 10:e0116917.
- Ni J, Tokuda G. 2013. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotechnology Advances* 31:838–850.
- Ni J, Tokuda G, Takehara M, Watanabe H. 2007. Heterologous expression and enzymatic characterization of  $\beta$ -glucosidase from the drywood-eating termite, *Neotermes koshunensis*. *Applied Entomology and Zoology* 42:457–463.
- OECD/FAO. 2018. OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027. OECD.
- Oscarsson M, Andersson R, Salomonsson A-C, Åman P. 1996. Chemical Composition of Barley Samples Focusing on Dietary Fibre Components. *Journal of Cereal Science* 24:161–170.
- Pei J, Pang Q, Zhao L, Fan S, Shi H. 2012. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*  $\beta$ -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. *Biotechnology for Biofuels* 5:31.
- Pei X, Zhao J, Cai P, Sun W, Ren J, Wu Q, Zhang S, Tian C. 2016. Heterologous expression of a GH3  $\beta$ -glucosidase from *Neurospora crassa* in *Pichia pastoris* with high purity and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. *Protein Expression and Purification* 119:75–84.
- Percival Zhang Y-H, Himmel ME, Mielenz JR. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24:452–481.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2014. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25:1605–1612.

- Qian LC, Sun JY. 2009. Effect of  $\beta$ -Glucosidase as a Feed Supplementary on the Growth Performance, Digestive Enzymes and Physiology of Broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 22:260–266.
- Rajoka MI, Idrees S, Ashfaq UA, Ehsan B, Haq A. 2015. Determination of Substrate Specificities Against  $\beta$ -Glucosidase A (BglA) from *Thermotoga maritima*: A Molecular Docking Approach. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25:44–49.
- Ramachandran P, Tiwari MK, Singh RK, Haw J-R, Jeya M, Lee J-K. 2012. Cloning and characterization of a putative  $\beta$ -glucosidase (NfBGL595) from *Neosartorya fischeri*. *Process Biochemistry* 47:99–105.
- Ratanakhanokchai K, Waeonukul R, Pason P, Tachaapaikoon C, Lay K, Sakka K, Kosugi A, Mori Y. 2013. *Paenibacillus curdolanolyticus* Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization. In: Matovic MD (ed) *Biomass Now - Cultivation and Utilization*, 460. InTech.
- Ravindran V. 2013. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. *The Journal of Applied Poultry Research* 22:628–636.
- Riou C, Salmon J-M, Vallier M-J, Günata Z, Barre P. 1998. Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3607–3614.
- Rosales-Calderon O, Trajano HL, Duff SJB. 2014. Stability of commercial glucanase and  $\beta$ -glucosidase preparations under hydrolysis conditions. *PeerJ* 2:e402.
- Salgado JCS, Meleiro LP, Carli S, Ward RJ. 2018. Glucose tolerant and glucose stimulated  $\beta$ -glucosidases – A review. *Bioresource Technology* 267:704–713.
- Scharf ME, Karl ZJ, Sethi A, Boucias DG. 2011. Multiple Levels of Synergistic Collaboration in Termite Lignocellulose Digestion (PL Oliveira, Ed). *PLoS ONE* 6:e21709.
- Scharf ME, Kovaleva ES, Jadhao S, Campbell JH, Buchman GW, Boucias DG. 2010. Functional and translational analyses of a beta-glucosidase gene (glycosyl hydrolase family 1) isolated from the gut of the lower termite *Reticulitermes flavipes*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40:611–620.
- Schwarzahns J-P, Wibberg D, Winkler A, Luttermann T, Kalinowski J, Friehs K. 2016. Non-canonical integration events in *Pichia pastoris* encountered during standard transformation analysed with genome sequencing. *Scientific Reports* 6:38952.
- Şener A. 2015. Extraction, partial purification and determination of some biochemical properties of  $\beta$ -glucosidase from Tea Leaves (*Camellia sinensis* L.). *Journal of Food Science and Technology* 52:8322–8328.
- Sethi A, Kovaleva ES, Slack JM, Brown S, Buchman GW, Scharf ME. 2013. A GHF7 cellulase from the protist symbiont community of *Reticulitermes flavipes* enables more

efficient lignocellulose processing by host enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 84:175–193.

Shental-Bechor D, Levy Y. 2009. Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. *Current Opinion in Structural Biology* 19:524–533.

Singh G, Verma AK, Kumar V. 2016. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of  $\beta$ -glucosidases. *3 Biotech* 6:3.

Sørensen A, Lübeck M, Lübeck P, Ahring B. 2013. Fungal Beta-Glucosidases: A Bottleneck in Industrial Use of Lignocellulosic Materials. *Biomolecules* 3:612–631.

Sreekrishna K. 2002. *Pichia*, Optimization of Protein Expression. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Srivastava N, Rawat R, Singh Oberoi H, Ramteke PW. 2015. A Review on Fuel Ethanol Production From Lignocellulosic Biomass. *International Journal of Green Energy* 12:949–960.

Sun J, Wang W, Yao C, Dai F, Zhu X, Liu J, Hao J. 2018. Overexpression and characterization of a novel cold-adapted and salt-tolerant GH1  $\beta$ -glucosidase from the marine bacterium *Alteromonas* sp. L82. *Journal of Microbiology* 56:656–664.

Taylor WR. 1986. The classification of amino acid conservation. *Journal of Theoretical Biology* 119:205–218.

Teugjas H, Väljamäe P. 2013. Product inhibition of cellulases studied with <sup>14</sup>C-labeled cellulose substrates, *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 6:1–14.

Tokuda G, Saito H, Watanabe H. 2002. A digestive  $\beta$ -glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki): distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5'- and 3'-RACE amplifications with degenerate primers. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32:1681–1689.

Tsuji A, Sato S, Kondo A, Tominaga K, Yuasa K. 2012. Purification and characterization of cellulase from North Pacific krill (*Euphausia pacifica*). Analysis of cleavage specificity of the enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 163:324–333.

Uchima CA, Tokuda G, Watanabe H, Kitamoto K, Arioka M. 2011. Heterologous expression and characterization of a glucose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the termite *Neotermes koshunensis* in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89:1761–1771.

Uchima CA, Tokuda G, Watanabe H, Kitamoto K, Arioka M. 2012. Heterologous Expression in *Pichia pastoris* and Characterization of an Endogenous Thermostable and High-Glucose-Tolerant  $\beta$ -Glucosidase from the Termite *Nasutitermes takasagoensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 78:4288–4293.

- Uchima CA, Tokuda G, Watanabe H, Kitamoto K, Arioka M. 2013. A novel glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from the salivary gland of the termite *Nasutitermes takasagoensis*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 59:141–145.
- Uchiyama T, Yaoi K, Miyazaki K. 2015. Glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase retrieved from a Kusaya gravy metagenome. *Frontiers in Microbiology* 6:1–9.
- Ueda M, Ito A, Nakazawa M, Miyatake K, Sakaguchi M, Inouye K. 2014. Cloning and expression of the cold-adapted endo-1,4- $\beta$ -glucanase gene from *Eisenia fetida*. *Carbohydrate Polymers* 101:511–516.
- Viikari L, Alapuranen M, Puranen T, Vehmaanperä J, Siika-aho M. 2007. Thermostable Enzymes in Lignocellulose Hydrolysis. In: Olsson L (ed) *Biofuels, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 121–145. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Vogl T, Hartner FS, Glieder A. 2013. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology* 24:1094–1101.
- Wang Q, Qian C, Zhang X-Z, Liu N, Yan X, Zhou Z. 2012. Characterization of a novel thermostable  $\beta$ -glucosidase from a metagenomic library of termite gut. *Enzyme and Microbial Technology* 51:319–324.
- Wu Y, Chi S, Yun C, Shen Y, Tokuda G, Ni J. 2012. Molecular cloning and characterization of an endogenous digestive  $\beta$ -glucosidase from the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes barneyi*. *Insect Molecular Biology* 21:604–614.
- Xia W, Bai Y, Cui Y, Xu X, Qian L, Shi P et al. 2016a. Functional diversity of family 3  $\beta$ -glucosidases from thermophilic cellulolytic fungus *Humicola insolens* Y1. *Scientific Reports* 6:27062.
- Xia W, Xu X, Qian L, Shi P, Bai Y, Luo H, Ma R, Yao B. 2016b. Engineering a highly active thermophilic  $\beta$ -glucosidase to enhance its pH stability and saccharification performance. *Biotechnology for Biofuels* 9:147.
- Xu H, Xiong A-S, Zhao W, Tian Y-S, Peng R-H, Chen J-M, Yao Q-H. 2011. Characterization of a Glucose-, Xylose-, Sucrose-, and D-Galactose-Stimulated  $\beta$ -Glucosidase from the Alkalophilic Bacterium *Bacillus halodurans* C-125. *Current Microbiology* 62:833–839.
- Yang F, Yang X, Li Z, Du C, Wang J, Li S. 2015. Overexpression and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *T. aotearoense* with high specific activity for cellobiose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:8903–8915.
- Yoneda A, Kuo H-WD, Ishihara M, Azadi P, Yu S-M, Ho TD. 2014. Glycosylation Variants of a  $\beta$ -Glucosidase Secreted by a Taiwanese Fungus, *Chaetomella raphigera*,

Exhibit Variant-Specific Catalytic and Biochemical Properties(EA Permyakov, Ed). PLoS ONE 9:e106306.

You C, Chen H, Myung S, Sathitsuksanoh N, Ma H, Zhang X-Z, Li J, Zhang Y-HP. 2013. Enzymatic transformation of nonfood biomass to starch. Proceedings of the National Academy of Sciences 110:7182–7187.

Zhang C. 2019. Lignocellulosic Ethanol: Technology and Economics. Alcohol Fuels - Current Technologies and Future Prospect [Working Title], 13. IntechOpen.

Zhang D, Allen AB, Lax AR. 2012a. Functional analyses of the digestive  $\beta$ -glucosidase of Formosan subterranean termites (*Coptotermes formosanus*). Journal of Insect Physiology 58:205–210.

Zhang L, Fu Q, Li W, Wang B, Yin X, Liu S, Xu Z, Niu Q. 2017a. Identification and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase via metagenomic analysis of *Bursaphelenchus xylophilus* and its microbial flora. Scientific Reports 7:14850.

Zhang S, Huang J, Hu R, Guo G, Shang X, Wu J. 2017b. Characterization of a new multifunctional beta-glucosidase from *Musca domestica*. Biotechnology Letters 39:1219–1227.

Zhang D, Lax AR, Bland JM, Yu J, Fedorova N, Nierman WC. 2010. Hydrolysis of filter-paper cellulose to glucose by two recombinant endogenous glycosyl hydrolases of *Coptotermes formosanus*. Insect Science 17:245–252.

Zhang D, Lax AR, Henrissat B, Coutinho P, Katiya N, Nierman WC, Fedorova N. 2012b. Carbohydrate-active enzymes revealed in *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) transcriptome. Insect Molecular Biology 21:235–245.

Zhang C, Yao J, Zhou C, Mao L, Zhang G, Ma Y. 2013. The alkaline pectate lyase PEL168 of *Bacillus subtilis* heterologously expressed in *Pichia pastoris* is more stable and efficient for degumming ramie fiber. BMC Biotechnology. 13:1.

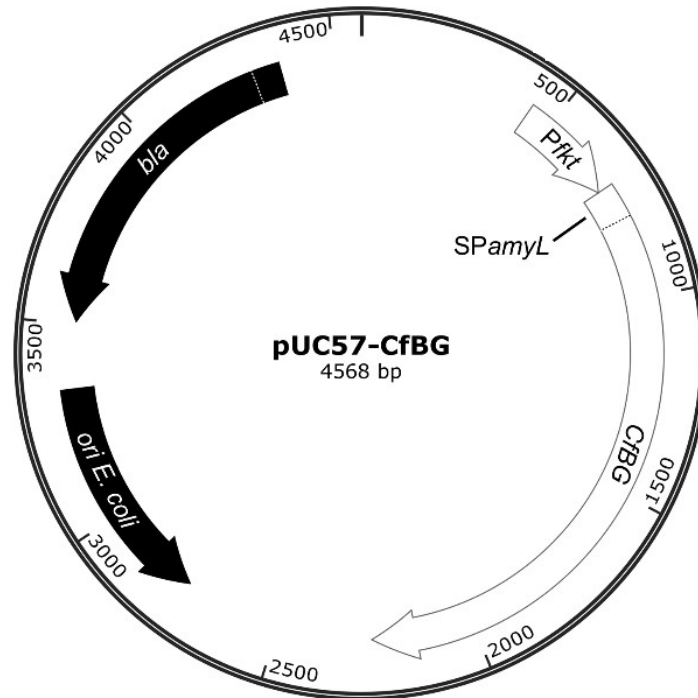
Zhao L, Zhou T, Li X, Fan S, You L. 2013. Expression and characterization of GH3  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus niger* NL-1 with high specific activity, glucose inhibition and solvent tolerance. Microbiology 82:356–363.

Zhou H, Gao Y, Gao G, Lou Y. 2015. Oral Administration of Recombinant *Lactococcus lactis* Expressing the Cellulase Gene Increases Digestibility of Fiber in Geese. Current Microbiology 71:693–698.

Zulkarnain D, Zuprizal, Wihandoyo, Supadmo. 2017. Utilization of Sago Waste with Cellulase Enzyme Fermentation as a Local Feed for Broilers in Southeast Sulawesi. International Journal of Poultry Science 16:266–273.

## ANEXO 1

### Mapa del plásmido pUC57-CfBG



Mapa del plásmido sintético pUC57-CfBG. *Pftk* = promotor del gen de la fosfoctolasa *ftk* de *Lactobacillus reuteri*, *SPamyL*: secuencia señal de un gen de  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus liqueniformis*, *CfBG*: secuencia codificante para la  $\beta$ -glucosidasa Glu1B madura de *Coptotermes formosanus* con codones optimizados para *L. reuteri*, *ori E. coli*: origen de replicación para *E. coli*, *bla*: marcador de selección (gen de resistencia a ampicilina).



## ANEXO 2

### Secuencias de los oligonucleótidos empleados en este trabajo

5BGluX      5'-TCA CTC GAG AAA AGA GAC GAC GTT GAC AAC GAC A-3'

3BGluN      5'-TGG GCG GCC GCT TAG TCA CGG AAA CGT TCT GG-3'

5CfBG      5'-TGG GAC CTT CCA CAA AAG CT-3'

3CfBG      5'-TCC TTT GGA GTA CGT GGA CG-3'

5AOX      5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3'

## ANEXO 3

### $\beta$ -glucosidasas analizadas en este trabajo

Nombre de la proteína	Organismo	Clave de acceso GenBank	Referencia
<b><math>\beta</math>-glucosidasas GH1 con alta actividad específica sobre celobiosa (&gt;250 U/mg)*</b>			
Sin nombre	<i>Bombyx mori</i>	AAP13852	Byeon et al. 2005
Glu1B	<i>Coptotermes formosanus</i>	ADB23476	Zhang et al. 2012a
PaBG1b	<i>Panesthia angustipennis spadica</i>	BAU51446	Arakawa et al. 2016; Li et al. 2017
RfBGlu1	<i>Reticulitermes flavipes</i>	ADK12988	Scharf et al. 2010; 2011
Bgl	<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i> P8G3#4	AKP45355	Yang et al. 2015
<b><math>\beta</math>-glucosidasas GH1 con actividad específica media sobre celobiosa (entre 10 y 250 U/mg)*</b>			
Bgl	<i>Ateromonas sp.</i> L82	AXR85509	Sun et al. 2018
BglP	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> subsp. <i>yunnanensis</i> E13	AGS46809	Liu et al. 2017
DT-Bgl	<i>Anoxybacillus sp.</i> DT3-1	M5QUM2 (UniProt)	Chan et al. 2016
Bhbg1	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	WP_010898083	Xu et al. 2011
CgBG1	<i>Coptotermes gestroi</i>	AGS32242	Franco Cairo et al. 2013
MbmgBG1	<i>Macrotermes barneyi</i>	AFD33364	Wu et al. 2012
Cen502	Metagenoma de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	ARM37687	Zhang et al. 2017a
Ks5A7	Metagenoma de gravy de pescado	HV348683 (ADN)	Uchiyama et al. 2015
Bgl-gs1	Metagenoma de tracto digestivo de <i>Globitermes sulphureus</i>	AGS52251	Wang et al. 2012
Bgl6 y mutantes	Muestra ambiental	AKH41028	Cao et al. 2015
Bgl1A	Muestra ambiental marina	ADD96762	Fang et al. 2010
MDBG-II	<i>Musca domestica</i>	AFS49707	Zhang et al. 2017b
NkBG	<i>Neotermes koshunensis</i>	BAB91145	Tokuda et al. 2002; Ni et al. 2007; Jeng et al. 2011; Uchima et al. 2011
Bgl	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> DSM 571	WP_013298275	Pei et al. 2012
TrBgl2	<i>Trichoderma reesei</i>	BAA74959	Jeng et al. 2011
<b><math>\beta</math>-glucosidasas GH1 con baja actividad específica sobre celobiosa (&lt;10 U/mg)*</b>			
BglA	<i>Clostridium cellulovorans</i>	AAQ00997	Kosugi et al. 2006; Jeng et al. 2011
Glu1C	<i>Coptotermes formosanus</i>	AEW67361	Feng et al. 2015
DturBGlu	<i>Dictyoglomus turgidum</i> DSM 6724	YP_002352376	Fusco et al. 2018
MaBG	<i>Microcerotermes annandalei</i>	APM84101	Arthornthurasuk et al. 2018
NfBGL595	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL181	XP_001258596	Ramachandran et al. 2012
Bgl1G5	<i>Phialophora sp.</i> G5	AGC30579	Li et al. 2013
BglA	<i>Thermotoga petrophila</i>	ABQ46970	Haq et al. 2012
<b><math>\beta</math>-glucosidasas GH3 con alta actividad específica sobre celobiosa (&gt;250 U/mg)*</b>			
Bgl1	<i>Aspergillus niger</i> NL-1	ABH01182	Zhao et al. 2013
Bgl3	<i>Penicillium purpurogenum</i> KJS506	ACV87737	Jeya et al. 2010
BGLI	<i>Periconia sp.</i> BCC2871	ABX84365	Harnpicharnchai et al. 2009
Bgl3A	<i>Talaromyces leycettanus</i> JCM12802	AMR94085	Xia et al. 2016b
<b><math>\beta</math>-glucosidasas GH3 con actividad específica media o baja sobre celobiosa &lt;250 U/mg*</b>			
Bgl3	<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5	ADX78143	Liu et al. 2012
$\beta$ -Gl2	<i>Aspergillus niger</i>	ABW87793	Mekoo et al. 2010
HiBgl3A	<i>Humicola insolens</i> Y1	AMQ75895	Xia et al. 2016a
HiBgl3B	<i>Humicola insolens</i> Y1	AMQ75896	Xia et al. 2016a
HiBgl3C	<i>Humicola insolens</i> Y1	AMQ75897	Xia et al. 2016a
Bgl3	<i>Myceliophthora thermophila</i>	XP_003663588	Karnaouri et al. 2013

Bgl2	<i>Neurospora crassa</i> OR74A	XP_959400	Pei et al. 2016
BGL	<i>Penicillium brasilianum</i>	ABP88968	Krogh et al. 2010
BGL1	<i>Penicillium decumbens</i>	ACD86466	Chen et al. 2010
RmBglu3B	<i>Rhizomucor miehei</i> CAU432	AIY32164	Guo et al. 2015
TnBglB	<i>Thermotoga naphthophila</i> RKU-10	ADA66752	Akram et al. 2018

---

\*La actividad específica utilizando celobiosa como sustrato se tomó de las publicaciones originales y se ajustó a la definición que fija una unidad de  $\beta$ -glucosidasa como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu\text{mol}$  de celobiosa por minuto. Se tomó el valor de  $V_{\text{max}}$  en el caso de las publicaciones que lo especificaran.

## ANEXO 4

### Códigos de acceso de GenBank de las secuencias de 32 $\beta$ -glucosidasas de termitas

Código de acceso de GenBank	Organismo
AGP76178	<i>Anoplotermes schwarzi</i>
ADB23476	<i>Coptotermes formosanus</i>
AEW67363	<i>Coptotermes formosanus</i>
AEW67362	<i>Coptotermes formosanus</i>
AEW67361	<i>Coptotermes formosanus</i>
AEW67360	<i>Coptotermes formosanus</i>
AGM32308	<i>Coptotermes formosanus</i>
AGM32287	<i>Coptotermes formosanus</i>
AOY34571	<i>Coptotermes formosanus</i>
ASA69242	<i>Coptotermes formosanus</i>
AFD33364	<i>Macrotermes barneyi</i>
AGP76179	<i>Macrotermes carbonarius</i>
APM84101	<i>Microcerotermes annandalei</i>
AKV16372	<i>Microtermes sp. KAY-2015</i>
BAI50024	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>
BAI50023	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>
BAI50022	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>
BAI50021	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>
BAI50019	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>
BAI50018	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>
BAB91145	<i>Neotermes koshunensis</i>
ADD92156	<i>Odontotermes formosanus</i>
ADK12988	<i>Reticulitermes flavipes</i>
QMX78395	<i>Reticulitermes perilucifugus</i>
QMX78394	<i>Reticulitermes perilucifugus</i>
BAO85044	<i>Reticulitermes speratus</i>
BAO85043	<i>Reticulitermes speratus</i>
AGP76180	<i>Rhynchotermes bulbinasus</i>

AGP76182	<i>Sphaeroterme sphaerotherax</i>
AGP76181	<i>Sphaeroterme sphaerotherax</i>
BAO85046	<i>Zoothermopsis nevadensis</i>
BAO85045	<i>Zoothermopsis nevadensis</i>

---