



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXPRESADA EN RESIDUOS AGRÍCOLAS
Y ANÁLISIS *in silico* DE GENES DE β -GLUCOSIDASA DE
Moniliophthora roreri.**

ANDRÉS CONCEPCIÓN BRINDIS.

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2015

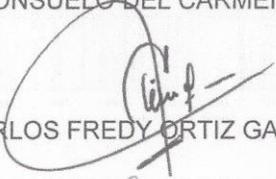
La presente tesis, titulada: **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXPRESADA EN RESIDUOS AGRÍCOLAS Y ANÁLISIS *in silico* DE GENES DE β -GLUCOSIDASA DE *Monilophthora roveri***, realizada por el alumno: Andrés Concepción Brindis, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

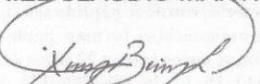
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

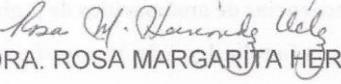
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO  DRA. CONSUELO DEL CARMEN BAUTISTA MUÑOZ

ASESOR  DR. CARLOS FREDY ORTIZ GARCÍA

ASESOR  DR. DANIEL CLAUDIO MARTINEZ CARRERA

ASESOR  DR. XAVIER MIGUEL BOLDO LEÓN

ASESOR  DRA. ROSA MARGARITA HERNÁNDEZ VÉLEZ

H. Cárdenas, Tabasco, 9 de junio de 2015

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXPRESADA EN RESIDUOS AGRÍCOLAS Y ANÁLISIS
in silico DE GENES DE β -GLUCOSIDASA DE *Moniliophthora roreri*.**

Andrés Concepción Brindis, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015.

Se estudió la cinética de producción de enzimas de β -glucosidasa de *Moniliophthora roreri* cultivado en un sistema de fermentación en estado sólido (FES) utilizando bagazo de caña de azúcar (BCA) y cáscara de cacao (CCA) como sustratos inductores. Los tratamientos (T) evaluados fueron: T1, BCA sin inocular; T2, BCA con inóculo de *M. roreri*; T3, CCA sin inocular y T4, CCA con inóculo de *M. roreri*. Se evaluó la actividad enzimática de β -glucosidasa, proteína total, pH y biomasa durante 30 días. Se realizó un análisis *in silico* de la secuencia de seis genes codificantes de enzimas β -glucosidasas predichas, depositadas en el GenBank del NCBI. La actividad enzimática de β -glucosidasa más alta, inducida con BCA y CCA, se encontró el día 18 con 332.69 U mg⁻¹ de proteína total, pH 6.73 del medio de cultivo y el día 27 con 27.6 U mg⁻¹ de proteína total, pH 7.46 respectivamente. Se obtuvo un fragmento de 1737 pb del gen 18S ADNr y se registró en el GenBank (NCBI) con el número de acceso KM998972. La secuencia presento 100% de identidad con respecto a la secuencia AY996745 de *M. roreri*. La cepa fue denominada MROCP. El análisis *in silico* confirmo que las seis proteínas β -glucosidasa predichas contenidas en el genoma de *M. roreri*, pertenecen a las glicosil hidrolasas de la familia 1 y 3: GH1 (ESK96275, ESK95676, ESK92642) y GH3 (ESK95149, ESK88175 y ESK84536), además de predecir sus características fisicoquímicas y bioquímicas. Las β -glucosidasa de la familia GH1 forman tres subgrupos (1a, 1b y 1c), bien definidos de *M. roreri*. Las β -glucosidasa de la familia GH3 forman tres subgrupos (2a, 2b y 2c), bien definidos de *M. roreri*. La proteína GH1 con número de acceso GenBank ESK95676, de localización extracelular, podría ser la responsable de la actividad β -glucosidasa de *M. roreri* MROCP expresada en el sistema FES usando BCA y CCA como sustratos inductores. Los resultados del presente trabajo serán de ayuda en la purificación y caracterización bioquímica de esta familia de enzimas con potenciales aplicaciones biotecnológicos e industriales.

Palabras clave: *Moniliophthora roreri*, *in silico*, β -glucosidasa, glicosil hidrolasas.

**ENZYME ACTIVITY EXPRESSED WITH AGRICULTURAL WASTE AND *in silico*
ANALYSIS OF GENES β -glucosidase of *Moniliophthora roreri*.**

Andrés Concepción Brindis, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015.

The kinetics of production of β -glucosidase enzymes of *Moniliophthora roreri* cultivated in a system of solid state fermentation (SSF) using sugar cane bagasse (SCB) and cocoa husk (CH) as inductor substrates was studied. Treatments (T) were evaluated: T1, SBC without inoculation; T2, SCB inoculum *M. roreri*; T3, CH without inoculation, and T4, CH inoculum of *M. roreri*. The enzymatic activity of β -glucosidase, total biomass pH and protein was evaluated for 30 days. Was performed An *in silico* sequence analysis six genes encoding β -glucosidase enzymes predicted, deposited in the NCBI GenBank. The enzymatic activity of β -glucosidase higher induced with SCB and CH, was found day 18 with 332.69 U mg protein⁻¹ pH 6.73 of culture medium and the day 27 with 27.6 U mg protein⁻¹ and pH 7.46, respectively. A fragment of 1737 bp of the 18S DNAr gene was obtained and recorded in the GenBank (NCBI) with the access number of KM998972. Introduce 100% sequence identity with the sequence AY996745 *M. roreri*. The strain was named MROCP. The analysis *in silico* confirmed that the six proteins predicted β -glucosidase contained in the genome of *M. roreri*, belonging to glycosyl hydrolases family 1 and 3: GH1 (ESK96275, ESK95676, ESK92642) and GH3 (ESK95149, ESK88175 and ESK84536), in addition to predict the physicochemical and biochemical characteristics. The β -glucosidase are the family GH1, *M. roreri* well defined three subgroups (1a, 1b and 1c). The β -glucosidase Family GH3 form three subgroups (2a, 2b and 2c), well defined *M. roreri*. The GH1 protein with GenBank accession number ESK95676, extracellular location, could be responsible for the β -glucosidase activity expressed in *M. roreri* MROCP SSF system using the SCB and CH substrates inducers. The results of this study will assist in purification and biochemical characterization of this family of enzymes with potential biotechnological and industrial applications.

Key Words: *Moniliophthora roreri*, *in silico*, β -glucosidase, glycosyl hydrolases.

DEDICATORIA.

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos además de su infinita bondad y amor.

A mis Padres por haberme apoyado siempre por sus consejos sus valores por la motivación que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por su paciencia y amor.

A mi Hermana por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan por el valor mostrado para salir adelante y por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS.

A mi país, México, el cual por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) me otorgó una beca para realizar los estudios de maestría.

Agradezco al Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, por abrir sus puertas para mi formación profesional.

Agradezco sinceramente a la Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz por todo su esfuerzo, dedicación, tiempo y apoyo brindado para la realización de la presente tesis.

Agradezco a los miembros de mi consejo particular Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, Dr. Carlos Fredy Ortiz García, Dr. Xavier Miguel Boldo León y a la Dra. Rosa Margarita Hernández Vélez, por toda la ayuda para la culminación del presente trabajo.

A mis compañeros y amigos de generación primavera 2013 con los cuales compartimos excelentes momentos.

A todos los que directa e indirectamente contribuyeron en la realización de este trabajo:

Q.F.B. Ricarda Ventura, por su apoyo incondicional en la preparación de medios de cultivo.

Dra. Nora Rosas, por haberme impartido el curso de herramientas bioinformáticas aplicadas al diseño y análisis de ADN recombinante y expresión de proteínas.

Dr. Magdiel Torres, por la donación de la cepa del hongo *Moniliophthora roreri*.

CONTENIDO.

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN.....	1
I.I INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
I.II OBJETIVOS.....	6
I.II.I GENERAL.....	6
I.II.II PARTICULARES.....	6
I.III HIPÓTESIS.....	6
I.IV ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	7
I.V LITERATURA CITADA.....	8
CAPÍTULO II.....	10
REVISIÓN DE LITERATURA.....	10
II.I Generalidades de <i>Moniliophthora roreri</i>	10
II.II Taxonomía de <i>M. roreri</i>	10
II.III Morfología básica de <i>M. roreri</i>	11
II.IV Descripción morfológica del cultivo de <i>M. roreri in vitro</i>	12
II.V Fuente de inóculo.....	13
II.VI Identificación de proteínas secretadas en el genoma y transcriptoma de <i>M. roreri</i>	13
II.VII Importancia y aplicación de las enzimas celulasas.....	15
II.VIII Sistema de Fermentación en Estado Sólido.....	22
II.IX LITERATURA CITADA.....	23
CAPÍTULO III	27
CONFIRMACIÓN MOLECULAR DE <i>Moniliophthora roreri</i> A PARTIR DEL GEN 18S ADNr.....	27
III.I INTRODUCCIÓN.....	27
III.II MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
III.II.I Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i>	28
III.II.II Medio de cultivo.....	29
III.II.III Extracción de ADN cromosómico.....	29
III.II.IV Amplificación del gen 18S ADNr por PCR.....	30
III.II.V Electroforesis del ADN.....	31
III.II.VI Purificación de fragmento de ADN amplificado.....	31
III.II.VII Secuenciación del ADN purificado.....	31
III.II.VIII Alineamiento múltiple de secuencias de genes 18S ADNr descritos en hongos.....	31
III.II.IX Relaciones de similitud entre las secuencias de genes 18S ADNr de la cepa MROCP de <i>M. roreri</i> y otros hongos descritos.....	32
III.III RESULTADOS.....	32
III.III.II Identificación molecular de <i>Moniliophthora roreri</i>	33
III.IV. DISCUSIÓN.....	36
III.V CONCLUSIÓN.....	38
III.VI LITERATURA CITADA.....	39

CAPÍTULO IV	41
CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE β -GLUCOSIDASA DE <i>Moniliophthora roreri</i> EN UN SISTEMA DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.	41
IV.I INTRODUCCIÓN.....	41
IV.II MATERIALES Y MÉTODOS.	43
IV.II.I Medios de cultivo.	43
IV.II.I.I Composición del sistema de fermentación en estado sólido (FES).	43
IV.II.I.II Preparación del pre-inóculo.	43
IV.II.I.III Determinación de la biomasa de <i>M. roreri</i>	43
IV.II.II Determinación pH.	44
IV.II.III Determinación de actividad enzimática.	44
IV.II.IV Determinación de la proteína total.	44
IV.II.V Diseño experimental.....	44
IV.III RESULTADOS.	45
IV.IV DISCUSIÓN.....	48
IV. IV CONCLUSIONES.....	53
IV.V LITERATURA CITADA.	54
CAPÍTULO V	58
ANÁLISIS <i>in silico</i> DE GENES DE β -GLUCOSIDASA DE <i>Moniliophthora roreri</i>	58
V.I INTRODUCCIÓN.....	58
V.II MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
V.II.I Análisis <i>in silico</i> de secuencias β -glucosidasa registradas en el Genbank.	59
V.III RESULTADOS.....	60
V.III.I Análisis <i>in silico</i> de secuencias nucleotídicas de genes β -glucosidasa de <i>Moniliophthora roreri</i>	60
V.III.II. Relaciones filogenéticas entre secuencias de aminoácidos de β -glucosidasa predichas pertenecientes a las glicosil hidrolasas de la familia 1 y 3 de <i>M. roreri</i> y otros hongos.	79
V.IV DISCUSIÓN.	81
V.V CONCLUSIONES.	88
V.VI LITERATURA CITADA.	89
CAPÍTULO VI.....	91
VI.I CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.....	91
VI.I.I CONCLUSIONES.	91
VI.I.II RECOMENDACIONES.....	91
VI.I.III SIGNIFICANCIA E IMPACTO DEL ESTUDIO	92
ANEXOS.	93

LISTA DE CUADROS.

	Pág.
Cuadro 1. Iniciadores empleados en las reacciones de secuenciación del gen 18S ADNr.	31
Cuadro 2. Porcentaje de identidad de la secuencia del gen 18S ADNr (Número de acceso GenBank KM998972) de la cepa MROCP con las secuencias de referencia de los parientes más próximos.	36
Cuadro 3. Cepas de hongos de WRF y BRF potenciales en la producción de celulasas vía FES.	42
Cuadro 4. Efecto de la fermentación del BCA y CCA con y sin inóculo de la cepa MROCP de <i>M. roreri</i> y los días de fermentación en el cambio de pH, actividad enzimática de β -glucosidasa y biomasa.	47
Cuadro 5. Comparación de la producción de β -glucosidasa de diferentes hongos crecidos en materiales lignocelulósicos.	51
Cuadro 6. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos traducido desde el CDS uno correspondiente a la secuencia AWSO01000264 codificante de una β -glucosidasa predicha de <i>M. roreri</i> .	63
Cuadro 7. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos traducido desde el CDS siete correspondiente a la secuencia AWSO01000050 codificante de una β -glucosidasa predicha de <i>M. roreri</i> .	66
Cuadro 8. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos traducido desde el CDS 21 correspondiente a la secuencia AWSO01000068 codificante de una β -glucosidasa predicha de <i>M. roreri</i> .	69
Cuadro 9. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos traducido desde el CDS nueve correspondiente a la secuencia AWSO01001286 codificante de una β -glucosidasa predicha de <i>M. roreri</i> .	72
Cuadro 10. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos traducido desde el CDS 69 correspondiente a la secuencia AWSO01000113 codificante de una β -glucosidasa predicha de <i>M. roreri</i> .	75
Cuadro 11. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos traducido desde el CDS tres correspondiente a la secuencia AWSO01000688 codificante de una β -glucosidasa predicha de <i>M. roreri</i> .	79
Cuadro 12. Secuencias de aminoácidos de β -glucosidasa predichas pertenecientes a las glicosil hidrolasas de la familia 1 y 3 de <i>M. roreri</i> y otros hongos.	81

LISTA DE FIGURAS.

	Pág.
Figura 1. Estructuras morfológicas de <i>Moniliophthora roreri</i> , mostrando: a) micelio septado y b) esporas con pared gruesa (Evans, 1981).	12
Figura 2. Estructura del ADNr nuclear de los organismos eucariontes.	28
Figura 3. Morfología colonial y microscópica de la cepa MROCP de <i>M. roreri</i> aislada a partir de mazorcas infectadas. a) Características de la colonia de <i>M. roreri</i> MROCP cultivada en el medio V8 a 21 días de crecimiento; b) Características de las esporas, de formación basal, hialinas, en su mayoría de forma ovoide o elipsoidal (E) y de tipo globosa (G) de <i>M. roreri</i> MROCP.	33
Figura 4. Fragmento del gen 18S ADNr amplificado por PCR con los oligonucleótidos iniciadores LV1 y LV2 a partir del ADN de la cepa MROCP de <i>M. roreri</i> , aislada a partir de mazorcas infectadas. 1. Marcador de talla molecular de ADN de 1 kb; 2. Fragmento de ADN del gen 18S ADNr de <i>M. roreri</i> amplificado por PCR. El fragmento fue enviado a secuenciar con los oligonucleótidos iniciadores LV1 y LV2, resultando una secuencia de 1737 pb.	34
Figura 5. Secuencia nucleotídica parcial de 1737 pb del gen 18S ADNr de la cepa MROCP de <i>M. roreri</i> (Número de acceso GenBank: KM998972) aislada de mazorcas infectadas. La numeración del lado izquierdo indica el número de bases nucleotídicas.	34
Figura 6. Relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del gen 18S ADNr de la cepa MROCP aislada de frutos de cacao y las secuencias nucleotídicas de los genes 18S ADNr de otros hongos relacionados. La comparación filogenética se basó en el análisis de 1725 posiciones nucleotídicas por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P), el método de agrupamiento fue Neighborn-joining. La significancia de las relaciones se realizó mediante 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje.	36
Figura 7. Comportamiento del pH y la actividad enzimática específica de β -glucosidasa de la cepa MROCP de <i>M. roreri</i> cultivado en FES con el substrato BCA: pH testigo (■) pH problema (▲) actividad enzimática con BCA en U/mg de proteína total (◆).	46
Figura 8. Comportamiento del pH y la actividad enzimática específica de β -glucosidasa de la cepa MROCP de <i>M. roreri</i> cultivado en FES con el substrato CCA: pH testigo (■) pH problema (▲) actividad enzimática con CCA en U/mg de proteína total (◆).	46
Figura 9. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del gen β -glucosidasa registrado en el GenBank con número de acceso AWSO01000264 de <i>M. roreri</i> . La secuencia nucleotídica contiene un gen de 3005 pb que codifica para una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasa familia 1. La región codificante (CDS) consta de 1638 pb traducidas a 545 aminoácidos y codón de terminación (TGA). La secuencia de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos de la región codificante (Número de acceso ESK92642). Los residuos de nucleótidos están numerados en la dirección 5' a 3', con la A del ATG predicho iniciando con metionina dado el número 1. La secuencia de aminoácidos indica 2 secuencias motifs, amino terminal (□), sitio activo (▤) y un nucleófilo (⋯), de las glicosil hidrolasas de la familia 1.	63
Figura 10. Predicción de dominios transmembranales de la β -glucosidasa de <i>M. roreri</i> con número de acceso GenBank ESK92642, derivada del gen uno de la secuencia con número de acceso GenBank AWSO01000264. (a) La proteína predicha pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 1, consta de 545 residuos de aminoácidos y un codón de terminación (TGA) y no presenta hélices integradas a membranas. (b) Predicción de la presencia y localización del sitio de división del péptido señal en la secuencia de aminoácidos, los resultados muestran que la proteína predicha es no secretoria, no contiene péptido señal, ni sitio de división de la peptidasa señal (SPase 1) I, ni sitio de anclaje, y los aminoácidos forman parte de la proteína madura. (c) En la predicción de sitios posibles de fosforilación, se encontraron 17 sitios de fosforilación, correspondientes a 15 residuos de Serina (Ser) (posiciones 36, 60, 78, 82, 84, 86, 192, 193, 213, 306, 361, 461, 474, 492 y 527) y dos residuos de Treonina (Thr) (151 y 388).	64

- Figura 11. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del gen β -glucosidasa número siete, registrado en el GenBank con número de acceso AWSO01000050 de *M. roreri*. La secuencia nucleotídica contiene un gen de 2214 pb que codifica para una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasa de la familia 1. La región codificante (CDS) consta de 1410 pb traducidas a 469 aminoácidos y un codón de terminación (TAA). La secuencia de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos de la región codificante (Número de acceso GenBank ESK96275). Los residuos de nucleótidos están numerados en la dirección 5' a 3', con la A del ATG predicho iniciando con metionina dado el número 1. La secuencia de aminoácidos indica 2 secuencias motifs, amino terminal (□), sitio activo (└─┘) y un nucleófilo (⋮⋮⋮), de las glicosil hidrolasas de la familia 1. 66
- Figura 12. Predicción de dominios transmembranales de la β -glucosidasa de *M. roreri* con número de acceso GenBank ESK96275, derivada del gen siete de la secuencias con número de acceso GenBank AWSO01000050. (a) La proteína predicha pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 1, consta de 469 residuos de aminoácidos y un codón de terminación (TAA) y no presenta hélices integradas a membranas. (b) La predicción fue realizada con los servidores SignalP 3.0 y 4.1. Los resultados muestran que la proteína predicha es no secretoria, no contiene péptido señal, sitio de división de la peptidasa señal (SPase 1) I, ni sitio de anclaje, y todos los aminoácidos forman parte de la proteína madura. (c) En la predicción de sitios posibles de fosforilación, se encontraron 13 sitios de fosforilación, correspondientes a 11 residuos de Serina (Ser) (posiciones 22, 30, 36, 78, 80, 185, 186, 196, 203, 300 y 318) y dos residuos de Treonina (Thr) (posiciones 102 y 441). 67
- Figura 13. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del gen β -glucosidasa albergado en el GenBank con número de acceso AWSO01000068 de *M. roreri*. La secuencia nucleotídica contiene un gen de 2627 pb que codifica para una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasas familia 1. La región codificante (CDS) consta de 1743 pb traducidas a 580 aminoácidos y codón de terminación (TAA). La secuencia de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos de la región codificante. Los residuos de nucleótidos están numerados en la dirección 5' a 3', con la A del ATG predicho iniciando con metionina dado el número 1. La secuencia de aminoácidos indica una secuencia motifs, sitio activo (└─┘) de las glicosil hidrolasas de la familia 1. 69
- Figura 14. Predicción de dominios transmembranales de la β -glucosidasa de *M. roreri* con número de acceso GenBank ESK95676, derivada del gen 21 de la secuencia con número de acceso GenBank AWSO01000068. (a) La proteína predicha pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 1, consta de 580 residuos de aminoácidos y un codón de terminación (TAA) y no presenta hélices integradas a membrana. (b) La predicción fue realizada con los servidores SignalP 3.0 y 4.1. Los resultados muestran que la proteína predicha es secretoria, contiene péptido señal, sitio de división de la peptidasa señal (SPase 1) I, sitio de anclaje, y los aminoácidos forman parte del péptido señal. (c) En la predicción de sitios posibles de fosforilación, se encontraron 14 sitios de fosforilación, correspondientes a 13 residuos de Serina (Ser) (posiciones 34, 79, 173, 175, 275, 354, 390, 398, 434, 442, 443, 543 y 567) y un residuo de Treonina (Thr) (61). 70
- Figura 15. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del gen β -glucosidasa registrado en el GenBank con número de acceso AWSO01001286 de *M. roreri*. La secuencia nucleotídica contiene un gen de 1952 pb que codifica para una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasa familia 3. La región codificante (CDS) consta de 1740 pb traducidas a 579 aminoácidos y codón de terminación (TGA). La secuencia de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos de la región codificante (Número de acceso ESK84536). Los residuos de nucleótidos están numerados en la dirección 5' a 3', con la A del ATG predicho iniciando con metionina dado el número 1. La secuencia de aminoácidos indica una secuencia motifs, sitio activo (└─┘), de las glicosil hidrolasas de la familia 3. 72
- Figura 16. Predicción de dominios transmembranales de la β -glucosidasa de *M. roreri* con número de acceso GenBank ESK84536, derivada del gen nueve de la secuencia con número de acceso GenBank AWSO01001286. (a) La proteína predicha pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 3, consta de 579 residuos de aminoácidos y un codón de terminación (TGA) y no presenta hélices integradas a membrana. (b) La predicción fue realizada con los servidores SignalP 3.0 y 4.1. Los resultados muestran que la proteína predicha es no secretoria, no contiene péptido señal, ni sitio de división de la peptidasa señal (SPase 1) I, ni sitio de anclaje, y los aminoácidos forman parte de la proteína madura. (c) En la predicción de sitios posibles de fosforilación, se encontraron 16 sitios de fosforilación, correspondientes a 15 residuos de Serina (Ser) (posiciones 30, 60, 94, 155, 177, 196, 240, 250, 340, 465, 469, 523, 529, 530 y 531) y un residuo de Treonina (Thr) (192). 73

- Figura 17. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del gen β -glucosidasa registrado en el GenBank con número de acceso AWSO01000113 de *M. roreri*. La secuencia nucleotídica contiene un gen de 3470 pb que codifica para una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasa familia 3. La región codificante (CDS) consta de 2553 pb traducidas a 850 aminoácidos y codón de terminación (TAG). La secuencia de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos de la región codificante (Número de acceso ESK95149). Los residuos de nucleótidos están numerados en la dirección 5' a 3', con la A del ATG predicho iniciando con metionina dado el número 1. La secuencia de aminoácidos indica una secuencia motifs, sitio activo (L⁻), de las glicosil hidrolasas de la familia 3. 75
- Figura 18. Predicción de dominios transmembranales de la β -glucosidasa de *M. roreri* con número de acceso GenBank ESK84536, derivada del gen 69 de la secuencia con número de acceso GenBank AWSO01000113. (a) La proteína predicha pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 3, consta de 850 residuos de aminoácidos y un codón de terminación (TAG) y no presenta hélices integradas a membranas. (b) La predicción fue realizada con los servidores SignalP 3.0 y 4.1. Los resultados muestran que la proteína predicha es no secretoria, no contiene péptido señal, ni sitio de división de la peptidasa señal (SPase 1) I, ni sitio de anclaje, y los aminoácidos forman parte de la proteína madura. (c) En la predicción de sitios posibles de fosforilación, se encontraron 25 sitios de fosforilación, correspondientes a 23 residuos de Serina (Ser) (posiciones 4, 114, 119, 159, 162, 165, 184, 313, 352, 386, 441, 480, 529, 576, 600, 625, 627, 665, 740, 767, 771, 814 y 830) y dos residuos de Treonina (Thr) (605 y 837). 76
- Figura 19. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del gen β -glucosidasa registrado en el GenBank con número de acceso AWSO01000688 de *M. roreri*. La secuencia nucleotídica contiene un gen de 3623 pb que codifica para una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasa familia 3. La región codificante (CDS) consta de 2880 pb traducidas a 959 aminoácidos y codón de terminación (TGA). La secuencia de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos de la región codificante (Número de acceso ESK88175). Los residuos de nucleótidos están numerados en la dirección 5' a 3', con la A del ATG predicho iniciando con metionina dado el número 1. La secuencia de aminoácidos indica una secuencia motifs, sitio activo (L⁻), de las glicosil hidrolasas de la familia 3. 78
- Figura 20. Predicción de dominios transmembranales de la β -glucosidasa de *M. roreri* con número de acceso GenBank ESK88175, derivada del gen tres de la secuencia con número de acceso GenBank AWSO01000688. (a) La proteína predicha pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 3, consta de 959 residuos de aminoácidos y un codón de terminación (TGA) y no presenta hélices integradas a membrana. (b) La predicción fue realizada con los servidores SignalP 3.0 y 4.1. Los resultados muestran que la proteína predicha es secretoria, contiene péptido señal, sitio de división de la peptidasa señal (SPase 1) I, sitio de anclaje, y los aminoácidos forman parte de la péptido señal. (c) En la predicción de sitios posibles de fosforilación, se encontraron 22 sitios de fosforilación, correspondientes a 19 residuos de Serina (Ser) (posiciones 412, 15, 37, 76, 136, 209, 371, 486, 551, 555, 583, 626, 644, 663, 817, 822, 828, 885 y 907) y tres residuos de Treonina (Thr) (10, 589 y 886). 80
- Figura 21. Relaciones filogenéticas entre las secuencias de aminoácidos de proteínas β -glucosidasa predichas de *M. roreri* y de otros hongos. Las secuencias fueron tomadas de la base de datos GenBank del NCBI. La comparación filogenética se basó en el análisis de 684 posiciones aminoacídicas por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P), el método de agrupamiento fue Neighborn-joining. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje. El árbol filogenético muestra dicotomía con dos diferentes grupos de β -glucosidasa inferidos por el método de Neighborn-Joining del software MEGA 6.0. 82

ABREVIATURAS

%: Por ciento.

°C: Grados centígrados.

A: Adenina.

A₂₆₀: Absorbancia 260 nanómetros.

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico.

BCA: Bagazo de caña de azúcar.

BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool”.

BRF: “Brown rot fungi”

C: Citosina.

CAI: “Índice de adaptación de codones”.

CCA. Cáscara de cacao.

CDS: “Secuencia codificante”.

CMC: Carboximetilcelulosa.

Da: Daltoones.

dNTPs: desoxirribonucleotidos trifosfatos.

DPI: “Days post infection”.

FES: Fermentación en estado sólido.

fg: Fentogramos (10^{-15} g).

FPR: “Frosty pod rot”.

g: Gramos.

G: Guanina.

GenBank: “Banco de genes”.

GH: Glicosil hidrolasas.

h: hora (s).

HGT: “Horizontal gene transfer”.

ITS: “Espacio interno transcripto”.

M: Molar.

Mb: Mega bases.

mg: miligramo.

min: minuto (s).

mL: Mililitro.

mM: Milimolar.

NCBI: “Centro nacional para información de biotecnología”.

NJ: Neighborn-Joining.

ORFs: “Marcos de lectura abierta”.

pb: pares de bases.

PCR: “Reacción en cadena de la polimerasa”.

pH: potencial de hidrogeno.

PNPG: ρ -Nitrofenil- β -D-glucopiranosido.

RNAse: Enzima del ácido ribonucleico.

RNA-seq: Secuenciación del ARN.

rpm: Revoluciones por minuto.

s: Segundos.

T: Timina.

T_m: Temperatura media.

μ g: microgramo.

μ L: microlitro.

μ m: micrometro.

U gdm⁻¹: Unidades por miligramo de materia seca.

U mg⁻¹ proteína total: unidades por miligramo de proteína total.

UV: Ultravioleta.

V: Volts.

WRF: “White rot fungus”

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN.

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL.

Las celulasas son enzimas que tienen un papel importante en la hidrólisis de enlaces 1,4- β -glucosídicos, la celulosa es el componente principal de la pared celular vegetal. La celulosa es el principal polisacárido constituyente de la pared celular de plantas, es un polímero lineal con enlaces β -1.4 de 8000 - 12000 unidades de glucosa. Las celulasas contribuyen en gran proporción, en el mercado mundial de enzimas industriales, enzimas importantes. De hecho, la celulasa es la tercera enzima industrial más grande (Singhania *et al.*, 2010) y representa aproximadamente el 20% del total del mercado de enzimas en el mundo (Chandel *et al.*, 2012). La fuerte demanda de celulasas se ha atribuido a las principales aplicaciones en la industria de la pulpa y papel, textil, alimentos, bebidas, detergentes, y en la industria de alimentos balanceados (Singhania *et al.*, 2010; Kirk *et al.*, 2002).

Los productos obtenidos a partir de la hidrólisis sustratos lignocelulósico por celulasas consisten principalmente en glucosa, celobiosa y celooligosacáridos (Singhania *et al.*, 2010). Entre dichos productos, la glucosa es el más deseable porque esta subunidad básica de celulosa puede servir como materia prima valiosa para una gran variedad de productos químicos de especialidad tales como: etanol, ácido orgánico y fuente de proteína unicelular (Wilson, 2009; Howard *et al.*, 2003). Para facilitar una hidrólisis completa de celulosa a glucosa, el sistema celulasa consta de: endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa, estando obligadas a estar presentes en cantidades apreciables (Kumar *et al.*, 2008).

Actualmente, las celulasas pueden ser producidas a través de una ruta biológica por medio de fermentaciones llevadas a cabo por bacterias u hongos. Hay una amplia gama de microorganismos capaces de producir celulasas, tales como bacterias aerobias y anaerobias, hongos anaerobios, hongos de pudrición blanda, hongos de pudrición blanca (WRF) y hongos de podredumbre café (BRF) (Chandel *et al.*, 2012; Lynd *et al.*, 2002; Kuhad *et al.*, 2007). La mayoría de los hongos son capaces de producir un sistema completo de celulasas en comparación con bacterias (Cen y Xia, 1999). La celulasa comercial es comúnmente producida a partir de dos cepas de hongos de pudrición blanda (SRF) llamados *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* (Singhania *et al.*, 2010), a través de una fermentación sumergida (Pandey *et al.*, 2000). Aunque los hongos son capaces de

producir un sistema completo de celulasas, el cultivo de cualquiera de los hongos *T. reesei* y *A. niger*. Por ejemplo, *T. reesei* no es capaz de producir una cantidad sustancial de β -glucosidasa, por otra parte el sistema celulasa de *A. niger* carece de endoglucanasa y exoglucanasa (Chandel *et al.*, 2012; Ahamed *et al.*, 2008).

Varios casos exitosos han sido reportados para la producción de celulasas por *A. niger* y *T. reesei* mediante FES (Chahal 1985; Dos Santos *et al.*, 2013; Singhanian *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Flodman y Nouredini, 2013; Dhillon *et al.*, 2012). Por otra parte, la fermentación sumergida sufre el inconveniente de estar asociada con una baja concentración de productos finales (Rodríguez y Sanromán, 2005), por lo tanto, se requiere una purificación posterior.

Por otra parte, el bagazo de caña de azúcar (BCA) es un subproducto de los ingenios azucareros, el 60%, se utiliza para la alimentación animal, pulpa, fertilizante, dejando el 40% como desechos sólidos en el terreno. El BCA contiene 52.7% de celulosa, el 17,5% de hemicelulosa y el 24.2% de lignina (Samsuri *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2004). Esta biomasa es una fuente potencial de materia prima para la conversión de compuestos a base de azúcar en productos químicos finos y biocombustibles (Binder y Raines, 2009).

La cáscara de cacao, es un residuo agrícola que se acumula en grandes pilas junto con las plantaciones, además se considera un foco de propagación de *Phytophthora* spp y *Moniliophthora roreri*, si se dejan dentro de las plantaciones ya que ambos patógenos provocan pérdidas económicas a la actividad cacaotera (López *et al.*, 1984). Sin embargo, este subproducto se ha propuesto como una fuente de pectinas a nivel comercial, por su relativo bajo costo (Francis y Bell, 1975). El principal uso que se le ha dado a la cáscara de cacao (CCA) es en la fertilización de suelos, esto gracias a su degradación que sirve como mejorador del mismo, no obstante el escepticismo de los agricultores por su aplicación. Por lo que, varios investigadores (Figuiera *et al.*, 1993; Padrón *et al.*, 2013) han revelado que, la cáscara de cacao posee varias cualidades: i) tiene una buena capacidad de absorción y de retención de agua; ii) tiene un alto contenido en grupos OH, provenientes de las ligninas y celulosas, y iii) es altamente biodegradable (Padrón-Gamboa *et al.*, 2004).

El hongo *M. roreri* es el agente causal de enfermedad del cacao (*Theobroma cacao* L.) conocida como la moniliasis del cacao o la pudrición acuosa de la mazorca (Frosty pod rot; FRP). Este hongo es extremadamente dañino para la producción de cacao en los países del noroeste de América del Sur, como Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela, así como en América Central y el

Caribe (Phillips-Mora, 2003). Este hongo infecta solamente a las mazorcas de cacao y tiene una fase biotrófica extendida de hasta 60 días, terminando con la necrosis de la mazorca y la esporulación del hongo, sin llegar a producir un basidiocarpo (Meinhardt *et al.*, 2014).

Recientemente Meinhardt *et al.*, (2014), secuenciaron y ensamblaron 52.3 Mb dentro de 3298 contigs que representan el genoma de *M. royeri*, además se encontraron 17,920 marcos de lectura abiertos (Open Reading Frames; OFRs) predichos, 13760 fueron validados por la técnica RNA-Seq, utilizando los resultados obtenidos de la secuenciación de RNA de mazorcas de cacao a 30 y 60 días después de la infección (DPI), así se estimó la expresión diferencial de genes en las fases biotróficas y necrotróficas en la interacción planta-patógeno. Los datos de la secuenciación fueron usados para desarrollar un genoma basado en el secretoma de las mazorcas infectadas. Se dedujeron 1535 genes que codifican proteínas secretadas putativas, de las cuales 1355 fueron expresadas en las fases biotróficas y necrotróficas. El análisis de los datos reveló la expresión génica del secretoma que se correlacionó con la infección y el crecimiento intercelular en la fase biotrófica y posteriormente con el crecimiento invasivo y la muerte celular de la planta en la fase necrotrófica, lo que determinó y validó el genoma y secretoma de *M. royeri*. La alta identidad de secuencias entre los genes de *M. royeri* y *M. pernicioso* apoya la relación taxonómica con *M. pernicioso* y la relación de este hongo con otros basidiomicetos. El análisis de los datos de RNA-Seq a partir de tejidos de plantas infectadas, reveló la expresión diferencial de genes en las fases biotróficas y necrotróficas. Con base en los datos del transcriptoma, los genes de proteínas secretadas reguladas en la fase necrotrófica son hipotétizadas de estar activas y atacan las paredes celulares y los organelos celulares de las mazorcas dando como resultado la necrosis interna posteriormente expresada como manchas chocolate. Estos genes están siendo usados para desarrollar una nueva comprensión de como es el progreso de la enfermedad e identificar blancos potenciales para reducir el impacto de esta enfermedad devastadora (Meinhardt *et al.*, 2014).

El análisis BLAST bidireccional permitió hacer una comparación entre los genomas de cinco basidiomicetos con diferentes adaptaciones ambientales, incluidos *M. royeri* y *M. pernicioso*. El número de genes predictivo particular a un sólo genoma fue de 1133 para A) *M. royeri*, 1202 para *M. pernicioso*. Solamente siete de 1133 genes de *M. royeri* fueron detectados por el análisis RNA-seq y únicamente 16 de los 1133 genes de *M. royeri* tienen funciones putativas. Con base en la anotación, varios de estos genes parecen tener un papel en la integridad y función del genoma (una proteína RNA polimerasa Rpb1 con dominios repetidos C-terminal; una helicasa putativa RecQ;

una proteína P-loop con actividad de nucleósido trifosfato hidrolasa) mientras otro conjunto parece estar ligada a retroelementos (una proteína Gag, una poliproteína Pol del transposon TNT 1-94 y una proteína transcriptasa reversa). Los genes restantes tienen similitud a varias toxinas (El precursor de la Volvatoxina A2, una proteína cristalina tóxica a dípteros); de unión a hemo (una proteína que contiene dominio Hemopexina); de adhesión celular (una proteína tirosina de unión a calcio regulada por fosforilación); de degradación de pectina (un precursor probable de pectina liasa); posibles oxidoreductasas (dos proteínas que contienen dominios de unión a FAD y NAD); una proteína putativa que contiene dominio CNVH y dos proteínas de biosíntesis de los polisacáridos de la cápsula (Meinhardt *et al.*, 2014).

Se encontró que ambas especies del género *Moniliophthora* comparten 1287 genes exclusivos a ambos genomas, permitiendo la identificación de similitudes putativas tales como los genes de patogenicidad, y los genes específicos del género, de los cuales solamente 8 o 106% tienen una función putativa. Ambos genomas contienen cinco monooxigenasas de biosíntesis de antibióticos; cinco feruloil esterasas involucradas en la degradación de hemicelulosa; cuatro proteínas de unión a celulosa; cuatro glicosil hidrolasas que participan en la degradación de los azúcares de la pared celular; cuatro proteínas de unión a quitina; cuatro proteínas de dominio HET asociados con incompatibilidad vegetativa del hongo y la muerte celular del micelio; tres pectato liasas implicadas en la degradación de la pectina; tres carbohidrato esterasa de la familia 12, una familia que incluye pectina acetilesterasas, ramnogalacturonano acetilesterasas y xilano acetilesterasas; tres proteínas secretadas asociadas a la fase biotrófica que actúan como efectoras putativas y dos amidohidrolasas. (Meinhardt *et al.*, 2014).

En la fase necrotrófica, los genes regulados fueron: una monooxigenasa de biosíntesis de antibióticos, dos proteínas secretadas asociadas a la fase biotrófica, una proteína de unión a celulosa, una proteína con dominio de unión a FAD, una proteína integral de membrana, una proteína utilización de lactama, una proteína que contiene el dominio LEA, una proteína taumatina, una proteína de familia transferasa y una proteína cianamida urea hidrolasa. En la fase de biotrófica, se regularon: una glicosil hidrolasa de pared celular, una glucósido hidrolasa de la familia 16 y una proteína semejante a deshidrogenasa fosfogluconato de unión a NAD (Meinhardt *et al.*, 2014).

Sánchez-Sánchez *et al.*, (2011), reportaron la presencia de endo-1,3(4)- β -glucanasas en la cepa MRO1 de *M. royeri* cultivado en FES utilizando bagazo de caña de azúcar (BCA) como sustrato.

La actividad enzimática endo-1,3(4)- β -glucanasas más alta se encontró el día 28 con 258.55 mU mg⁻¹ de proteína total. Además se obtuvo un fragmento de 747 pb del gen *MrGLU1* predicho que codifica una endo-1,3(4)- β -glucanasa y se registró con el número de acceso JN029800 en el GenBank de la NCBI. Dicho fragmento fue traducido a la secuencia de proteína, obteniéndose un fragmento de proteína (mrGLU1) de 249 aminoácidos, que presentó una identidad máxima de 87% con respecto a la secuencia de aminoácidos con número de acceso XP002389355 de endo-1,3(4)- β -glucanasa putativa de *M. pernicioso*, depositada en la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (National Center for Biotechnology Information; NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Datos autorizados por el autor Sánchez-Sánchez *et al.*, 2011).

Por lo anterior y dado que se ha demostrado la presencia de la enzima endo-1,3(4)- β -glucanasa, que forma parte del sistema celulolítico para la conversión de celulosa a glucosa, en este trabajo se propuso determinar la actividad enzimática de β -glucosidasa expresada por el hongo *M. roleri* cuando este último es cultivado en un sistema FES, y realizar un análisis *in silico*, empleando herramientas bioinformáticas, de secuencias de genes codificantes de enzimas β -glucosidasa reportadas en el genoma y secretoma de *M. roleri*.

I.II OBJETIVOS.

I.II.I GENERAL.

Analizar la expresión de genes β -glucosidasa de *Moniliophthora roreri* mediante la determinación de la cinética de actividad enzimática inducida con residuos agrícolas y análisis *in silico*.

I.II.II PARTICULARES.

- ❖ Analizar la cinética de la actividad enzimática de β -glucosidasa de *M. roreri* cultivado en un sistema de fermentación en estado sólido con bagazo de caña de azúcar y cáscara de cacao.
- ❖ Realizar un análisis *in silico* (traducción a proteína, peso molecular, punto isoeléctrico, composición atómica, predicción subcelular, índice de adaptación de codones, predicción transmembrana) de genes β -glucosidasa de *M. roreri*.

I.III HIPÓTESIS.

Moniliophthora roreri es capaz de producir enzimas β -glucosidasas codificadas en su genoma e inducidas en sustratos de residuos agrícolas mediante fermentación en estado sólido.

LIV ESTRUCTURA DE LA TESIS.

El trabajo realizado está formado por seis capítulos, en el CAPITULO I: Se hace una introducción general y se describen los objetivos e hipótesis del trabajo. En el CAPITULO II: Se presenta la revisión de literatura resaltando la importancia de las enzimas celulasas y las características morfológicas de *Moniliophthora roreri*. El CAPÍTULO III: muestra la identificación molecular de *M. roreri*, mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen 18S ADNr y la identificación morfológica y microscópica. En el CAPÍTULO IV: Se analiza la cinética de producción de enzimas β -glucosidasa de *M. roreri* cultivado en un sistema de fermentación en estado sólido usando BCA y CCA como sustratos. En el CAPÍTULO V: Se realiza un análisis *in silico* para obtener las propiedades fisicoquímicas de β -glucosidasa. Por último, en el CAPÍTULO VI se muestran las conclusiones generales y las recomendaciones derivadas de los diferentes ensayos realizados en la presente investigación.

I.V LITERATURA CITADA.

- Ahamed A., Vermette P. 2008. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochem Eng J.* 42 (1): 41-46.
- Aro N., Pakula T., Penttila M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 29 (4): 719-739.
- Binder J., B., Raines R., T. 2009. Simple chemical transformation of lignocellulosic biomass into furans for fuels and chemicals. *J Am Chem Soc.* 131: 1979–1985.
- Cen P., Xia L. 1999. Production of cellulase by solid-state fermentation. In: Tsao GT, editor. *Recent progress in bioconversion of lignocellulosics.* New York: Springer Berlin Heidelberg. 69-92.
- Chahal D., S. 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Appl Environ Microbiol.* 49 (1): 205-210.
- Chandel A., K, Chandrasekhar G., Silva M., B., Da Silva S., S. 2012. The realm of cellulases in biorefinery development. *Crit Rev Biotechnol.* 32 (3): 187-202.
- Dhillon G., S., Kaur S., Brar S., K., Verma M. 2012. Potential of Apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Ind Crop Prod.* 38: 6-13.
- Dias F., M., Vincent F., Pell G., Prates J., A., Centeno M., S., Tailford L., E., Ferreira L., M., Fontes C., M., Davies G., J., Gilbert H., J. 2004. Insights into the molecular determinants of substrate specificity in glycoside hydrolase family 5 revealed by the crystal structure and kinetics of *Cell vibrio mixtus* mannosidase 5A. *J Biol Chem.* 279(24):25517–25526.
- Dos Santos T., C., Abreu F., G., Oliveira A., C, Onorio R., T., J., Pereira M., F., P., Ferreira B., R., C. 2013. Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the Purple Mombin (*Spondias purpurea* L.) residue. *Food Sci Biotechnol.* 22 (1): 1-7.
- Fibriansah G., Masuda S., Koizumi N., Nakamura S., Kumasaka T. 2007. The 1.3 Å crystal structure of a novel endo- β -1, 3-glucanase of glycoside hydrolase family 16 from alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. strain F96. *Proteins.* 69 (3): 683-690.
- Figuiera A., Janick J., BeMiller J., N. 1993. *New products from Theobroma cacao: Seed Pulp and Pod Gum.* New Crops. Wiley, New York. 475-478.
- Flodman H., R., Noureddini H. 2013. Effects of intermittent mechanical mixing on solid-state fermentation of wet corn distillers grain with *Trichoderma reesei*. *Biochem Eng J.* 81: 24-28.
- Francis B., J., Bell J., M., K. 1975. Commercial pectin: a review. *Tropical Sci.* 17 (1): 25-44.
- Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 280 (2): 309-316.
- Howard R., Abotsi E., Rensburg E., J., Howard S. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr J Biotechnol.* 2 (9): 602-619.
- Kirk O., Borchert T., V., Fuglsang C., C. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol.* 13 (4): 345-351.
- Kuhad R., Singh A. 2007. *Lignocellulose biotechnology future prospects.* New Delhi: IK International Publishing House Pvt. Ltd.
- Kumar R., Singh S., Singh O., V. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35 (5): 377-391.
- Kumar S., Sharma H., Sarkar B. 2011. Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). *Food Sci Biotechnol.* 20 (5): 1289-1298.
- Lynd L., R., Weimer P., J., Van Z., W., H., Pretorius I., S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66 (3): 506-517.
- López A., S., Ferreira H., Llamas A., Romeu A. 1984. Present status of cacao by-products utilization in Brazil. *Rev Theobroma.* 14 (4): 271-291.
- Markovic O., Janecek S. 2001. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. *Protein Eng.* 14 (9): 615-631.
- Meinhardt L., W., Lacerda C., G., G., Thomazella P., T., D., Teixeira P., J., Falsarella C., M., Schuster C., S., Carlson J., E., Gultinan M., J., Mieczkowski P., Farmer A., Ramaraj T., Crozier J., Davis R., E., Shao J., Melnick R., L., Pereira G., A., G., Bailey B., A. 2014. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. *BMC Genomics.* 15:164
- Padrón G., Romero G., Benavides A., Ramírez H., Maiti R. 2003. *Crop Research.* 26 (2): 291-302.

- Padrón-Gamboa G., Arias-Marín E., Romero-García J., Benavides-Mendoza A., Zamora-Rodríguez J., y García-Rodríguez S. 2004. Efecto de la cáscara de cacao en la obtención de espumas de poliuretano para uso hortícola. Propiedades físicas y de biodegradabilidad. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 48. 156-164.
- Pandey A., Soccol C., R., Mitchell D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* 35 (10): 1153-1169.
- Phillips-Mora W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao fungus *Moniliophthora roreri* as determined using molecular, phytopathological and morphophysiological evidence, doctoral dissertation. University of Reading, Reading, UK. 349.
- Samsuri M., Gozan M., Mardias R., Baiquni M., Hermansyah H., Wijanarko A. 2007. Utilization of cellulose from sugarcane bagasse to produce ethanol via simultaneous saccharification and fermentation using xylanase (in Bahasa Indonesia). *MakaraTeknologi.* 11: 17-24.
- Sánchez-Sánchez H. 2011. Determinación de la actividad enzimática extracelular de endo-1,3(4)- β -glucanasa y amplificación de genes endo-1,3(4)- β -glucanasa a partir de *moniliophthora roreri*. [Tesis]. Colegio de Postgraduados.
- Singhania R., R., Sukumaran R., K., Pandey A. 2007. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. *Appl Biochem Biotechnol.* 142 (1): 60-70.
- Singhania R., R., Sukumaran R., K., Patel A., K., Larroche C., and Pandey A. 2010 Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzym Microb Tech.* 46 (7): 541-549.
- Sun J., Sun X., Zhao H., Sun R. 2004. Isolation and characterization of cellulose from sugar cane bagasse. *Polym Degrad Stabil.* 84: 331-339.
- Vandermarliere E., Bourgois T., M., Winn M., D., Van Campenhout S., Volckaert G., Delcour J., A., Strelkov S., V., Rabijns A., Courtin C., M. 2009. Structural analysis of a glycoside hydrolase family 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase in complex with xylo-tetraose reveals a different binding mechanism compared with other members of the same family. *Biochem J.* 418 (1): 39-47.
- Wilson D. 2009. Cellulases and biofuels. *Curr Opin Biotechnol.* 20 (3): 295-305.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA.

II.I Generalidades de *Moniliophthora roreri*.

Moniliophthora perniciosa (Stahel), Aime y Phillips-Mora y *Moniliophthora roreri* H. C. Evans, Stalpers, Samson y Benny, son hongos fitopatógenos del orden Agaricales (*Basidiomycetes*) que infectan al fruto del cacao (*Theobroma cacao* L.). Las esporas de *M. roreri* se producen dentro de estructuras semejantes a conidios que cubren los frutos de cacao formando una capa espesa de color blanco. Cuando son liberadas las esporas, se forman nubes densas de esporas blancas que flotan a la deriva con las corrientes de aire. Al parecer, *M. roreri* no forma conexiones de abrazadera y presenta sólo micelios monocarióticos a lo largo de su desarrollo (Griffith *et al.*, 2003).

Análisis filogenéticos realizados mostraron que, a pesar de sus morfologías contrastantes, *M. perniciosa* y *M. roreri* son especies hermanas, sugiriendo que su fitopatogenicidad ha evolucionado sólo una vez, a partir de un ancestro en común (Aime y Phillips-Mora, 2005).

II.II Taxonomía de *M. roreri*.

Actualmente en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov), se encuentra disponible la clasificación taxonómica que se indica a continuación:

Súper reino:	Eukaryota
Reino:	Fungi
Subreino:	Dikarya
Phylum:	Basidiomycota
Clase:	Agaricomycetes
Subclase:	Agaricomycetidae
Orden:	Agaricales
Familia:	Marasmiaceae
Género:	Moniliophthora
Especie:	Moniliophthora roreri

Por otro lado de acuerdo al Index Fungorum (<http://www.speciesfungorum.org/>) *M. roreri* es clasificado de la siguiente forma:

Nombre: *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson y Benny, *Can. J. Bot.* 56(20): 2530 (1978).

Sinónimo:

Monilia roreri Cif. in Ciferri y Parodi, *Phytopath. Z.* 6 (5): 542 (1933).

Crinipellis roreri (Cif.) H.C. Evans, en Evans, Holmes, Phillips y Wilkinson, *Mycologist* 16(4): 151 (2002).

Crinipellis roreri (Cif.) H.C. Evans, en Evans, Holmes, Phillips y Wilkinson, *Mycologist* 16(4): 151 (2002) var. *roreri*.

Crinipellis roreri var. *gileri* H.C. Evans & K.A. Holmes, in Evans, Holmes y Reid, *Pl. Path.* 52(4): 485 (2003).

Posición en clasificación: Marasmiaceae, Agaricales, Agaricomycetidae, Agaricomycetes, Basidiomycota, Fungi.

Sinonimos de contribuidor:

Kew Mycology (2013).

II.III Morfología básica de *M. roreri*.

El estado perfecto (sexual) de *M. roreri* se desconoce, por lo que se cree que su reproducción se realiza sólo asexualmente por conidios. Sin embargo, Thorold (1975), Kranz *et al.* (1978) y Evans *et al.* (1978), describen que el hongo posee hifas hialinas y septadas, las septas sin conexiones de gancho pero con doliporo, de 1.5 a 5 μm de ancho (Fig. 1). Las conidias, se producen en cadenas con maduración basipétala (Evans, 1981) y se desprenden fácilmente del micelio; su pared es gruesa y son amarillo-pálido o café cuando forman masa de esporas, su forma varía de globosa a elipsoidal, se presentan en una proporción aproximada al 60% y 30% y miden de 7 a 10 μm de ancho por 9 a 14 μm de largo. Los conidióforos son más o menos verticales, ligeramente ramificados, ocasionalmente aislados y erectos y forman cadenas de cuatro a diez conidias (Phillips-Mora, 2003).

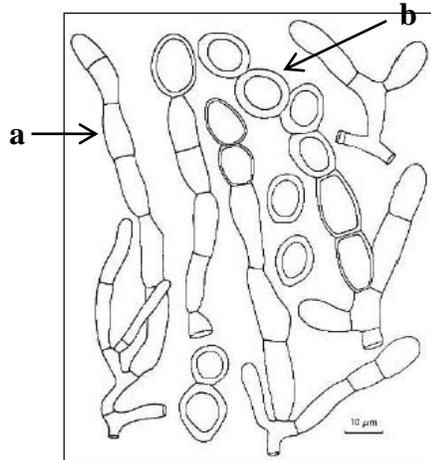


Figura 1. Estructuras morfológicas de *Moniliophthora roreri*, mostrando: a) micelio septado y b) esporas con pared gruesa (Evans, 1981).

II.IV Descripción morfológica del cultivo de *M. roreri* *in vitro*.

Cuando el hongo crece en medio V8 clarificado, las colonias alcanzan un diámetro de 8 a 15 cm después de dos semanas, y muestran un borde levemente levantado. El crecimiento en forma de tapete de aspecto lanoso a fieltro, de color salmón pálido a rosa, finalmente se vuelve de color beige canela a arcilla, o en ocasiones café lanoso a chabacano pálido, esto se debe a la formación de muchas esporas. Ocasionalmente, el tapete es de inicio suave a harinoso, de color blanco a crema o con matices ocráceos. No produce olor. En la zona avanzada, la hifa es hialina, de pared delgada, septada y algunas veces es levemente irregular con hinchamientos de 1.5 a 5 µM de ancho. La hifa aérea es de dos tipos: a) como en la zona avanzada, pero con paredes levemente engrosadas, y b) hialina densa de color parduzco pálido, no septado de 1 a 1.5 µM y 2 a 3 µM de ancho y el esqueleto raramente ramificado (Evans *et al.*, 1978). Los conidióforos ramificados dan lugar a cadenas maduras de conidios, de color amarillo pálido y de color café en masa. Los conidios cilíndricos de paredes delgadas también están presentes y probablemente se derivan a partir de cadenas inmaduras (Evans *et al.*, 1978; Evans, 1981; Phillips-Mora *et al.*, 2006).

Las hifas se sumergen en el medio de cultivo como en la zona avanzada pero con hinchamientos más frecuentes. El hongo también crece y esporula bien, grumos de color crema compactos, de micelio estéril con gotitas de exudado amarillo que se forman frecuentemente y los parches rojo púrpura compuestos de hifas rojas pesadamente incrustadas que están presentes en los cultivos viejos. Las temperaturas de crecimiento óptimas son de 25 a 26 °C y máximo 33 °C (Evans *et al.*, 1978).

II.V Fuente de inóculo.

M. royeri sobrevive en frutos infectados momificados que permanecen en el árbol de cacao después de la cosecha, los que aportan niveles elevados de inóculo durante todo el periodo de fructificación (Evans, 1981; Phillips-Mora, 2003). Las esporas son los únicos propágulos infectivos de *M. royeri*, y son diseminadas principalmente por el viento. Se desprenden una vez que están secas mediante cualquier estímulo físico (como corrientes de aire y vibraciones del árbol durante la cosecha o la poda, etc.) (Evans, 1981), se impactan sobre el dosel de los árboles, tronco, cojinetes florales, y se desplazan por distancias considerables mientras no existan importantes barreras naturales (Phillips-Mora, 2003).

II.VI Identificación de proteínas secretadas en el genoma y transcriptoma de *M. royeri*.

Los genes expresados durante las etapas tempranas de la infección y desarrollo de la enfermedad, reflejan productos de genes que funcionan en la fase biotrófica del desarrollo de la enfermedad, misma que puede ser inicialmente asintomática. La expresión de genes en la etapa tardía produce productos génicos que funcionan en la fase necrotrófica, y que están asociados con la clorosis y necrosis de la mazorca y posiblemente con la esporulación del hongo en el tejido de la mazorca. El análisis de la expresión diferencial de genes codificando proteínas secretadas en mazorcas infectadas, a los 30 y 60 DPI, identificó la expresión de 34 genes codificando proteínas secretadas con funciones predichas, con un único gen siendo expresado en la etapa 30 PDI. A los 60 DPI, se identificó la expresión de 105 genes codificando proteínas secretadas con funciones putativas. 41 de los 105 genes expresados a los 60 DPI fueron detectados únicamente en la fase necrotrófica. Se encontraron varias familias de genes de proteínas secretadas que fueron reguladas en la fase biotrófica. En esta fase, los 34 genes con funciones conocidas fueron asociados principalmente con la adquisición de nutrientes en la planta y modificación de la pared celular de plantas y hongos. El grupo de las glicosil hidrolasas (GH) fue el más numeroso identificado. Once genes GH fueron regulados: dos genes GH de la familia 5; cinco genes GH de la familia 18 y un gen de cada uno de la familia GH 16, 28, 43 y 92 (Meinhardt *et al.*, 2014). Los genes GH de la familia 18 son genes homólogos a genes de quitinasas (EC 3.2.1.14) (Henrissat, 1991) y los genes GH de la familia 5 son endo-enzimas capaces de hidrolizar tanto β -mananos así como β -glucanos (Dias *et al.*, 2004) y son homólogos a la β -1,3-glucanasas, que incluye endoglucanasas, β -mananasas, exo-1,3-glucanasas, endo-1,6-glucanasas, xilanasas, y endoglicoceramididasas. Las GH de la familia 16 son

homólogas a endo- β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39) y xiloglucanos: xiloglucosiltransferasas (EC 2.4.1.207) (Fibriansah *et al.*, 2007), las GH de la familia 28 son homólogas a poligalacturonasas e incluye enzimas degradantes de pectina como la poligalacturonasas (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonasas (EPG; EC 3.2.1.67), exo-poli- α -galacturonosidasas (EC 3.2.1.82) (Markovic y Janecek, 2001), de las GH de la familia 43 son homólogas a β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) (Vandermarliere *et al.*, 2009), mientras que los GH de la familia 92 son α -1,2 manosidasas (Tiels *et al.*, 2012).

Además de la familia GH, otras enzimas fueron identificadas tales como galactosa-1-epimerasa, una anhidrasa carbónica, una carbohidrato esterasa de la familia 8 (pectina metilesterasa) y una triptofan dimetilali transferasa. Las enzimas modificadoras de la pared celular de plantas identificadas en la fase biotrófica incluyeron una endo-poligalacturonasa, una galactano 1,3-beta-galactosidasa y una glicosil hidrolasa de pared celular, una catalasa, una acetilxilano esterasa y una xilanasa A. También tres genes cerato-platanina, dos hidrofobinas, tres proteínas semejantes a PR-1 y una proteína inmunomoduladora, fueron todas inducidas en la fase biotrófica que podrían estar involucradas en la interacción huésped-hongo (Meinhardt *et al.*, 2014).

En la fase necrotrófica, la mayoría de los 105 genes expresados están asociados con el crecimiento fúngico, la patogenicidad y la adquisición de nutrientes. Varias familias de genes fueron identificadas con múltiples genes expresados tales como hidrofobinas (10 genes), proteínas conteniendo dominios de unión a FAD (seis genes), arilalcohol oxidasas (cuatro genes), lacasas (cuatro genes), triacil glicerol lipasas extracelulares (tres genes), cerato-plataninas (tres genes). Varios de los genes antes mencionados, son altamente regulados y están asociados con el rompimiento de la lignina. Las arilalcohol oxidasas (AAOs) son enzimas extracelulares que contienen FAD en la familia glucosa-metanol colina oxidasa (GMC) (Ferreira *et al.*, 2009). Las AAOs están involucradas en la degradación de la lignina, donde la enzima interactúa con p-cumaril alcohol, coniferil de alcohol y polímeros de alcohol sinapílico que componen la lignina, y O₂ produciendo aldehídos aromáticos y peróxido de hidrógeno (Ferreira *et al.*, 2009). Las lacasas son polifenol oxidasas que reducen compuestos fenólico en la lignina (Mayer y Staples, 2002). Las glioxal oxidasas son enzimas extracelulares que forman peróxido de hidrógeno durante la descomposición de la lignina (Kersten, 1990). Ocho familias de genes GH fueron identificados entre los 12 genes de GH (dos genes GH de la familia 35; dos genes GH de la familia 61; dos genes GH de la familia 5 y un gen de cada uno para las familias 3, 9, 10, 16 y 18). Las proteínas GH de

la familia 35 son homólogas a β -galactosidasas y las GH de la familia 61 son proteínas homólogas a endoglucanasas. Las GH3 son proteínas homólogas a β -glucosidasas; las proteínas GH9 son endoglucanasas o celulasas; y las GH10 son proteínas de xilanasas (Henrissat *et al.*, 1995). Otras numerosas enzimas y genes relacionados con la patogenicidad se identificaron como carboxipeptidasas, carbohidrato esterasas, tripeptidil peptidasas, una proteína que induce necrosis, una peroxidasa de hongos, citocromo p450s, y expansinas. Se encontró que las expresiones relativas más altas corresponde a una dioxigenasa, una Fbox y una proteína que contiene repetición FNIP, una quitina sintasa, un antígeno rico en prolina y una de las expansinas (Meinhardt *et al.*, 2014).

II.VII Importancia y aplicación de las enzimas celulasas.

La biomasa lignocelulósica es el material orgánico más abundante en la tierra y podría proporcionar la materia prima adecuada y de bajo costo para la producción de etanol combustible y otros productos químicos en el futuro (Zhao *et al.*, 2009). Estos materiales generalmente contienen hasta 75% de celulosa y hemicelulosa, que son compuestos que no pueden ser fácilmente convertidos en azúcares monoméricos simples debido a su naturaleza recalcitrante (Adsul *et al.*, 2004).

Las enzimas celulolíticas se utilizan en un gran número de procesos que incluyen: la formulación de detergentes (Cavaco-Paulo, 1998), la suplementación de alimentos para el ganado, la extracción de los jugos de frutas y vegetales, manufactura de la pulpa y el papel, procesamiento de almidón, procesamiento de textiles y la producción de etanol (Gusakov *et al.*, 2000; Mandebvu *et al.*, 1999; Rau *et al.*, 2008; Camassola y Dillon, 2007a; Tiwari *et al.*, 2013).

Las β -glucosidasas desempeñan muchas funciones biológicas diferentes e importantes, tales como la degradación de la biomasa celulósica, degradantes glicolípidos en los lisosomas de mamíferos, y escindir flavonoides glucosiladas en las plantas (Dan *et al.*, 2000). Además, estas enzimas se utilizan en la producción de etanol combustible a partir de residuos agrícolas celulósicos y en la síntesis de útiles β -glucósidos. En la industria del sabor, β -glucosidasas son también clave para la liberación enzimática de compuestos aromáticos a partir de los precursores glucosídicos presentes en frutas y productos de fermentación (Pemberton *et al.*, 1980; Bothast y Saha, 1997; Shoseyoc *et al.*, 1990).

Además, la creciente preocupación por las posibles consecuencias de una escasez mundial de combustibles fósiles, la emisión de gases de efecto invernadero, así como la contaminación del aire causada por la combustión incompleta de los combustibles fósiles, se han traducido en un mayor enfoque sobre la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos (Huang *et al.*, 2011; Zaldivar *et al.*, 2001) y el uso de celulasas y hemicelulasas en la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico (Camassola y Dillon, 2009), y especialmente la posibilidad de usar celulasas y hemicelulasas para realizar la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico (Himmel *et al.*, 1999; Sun y Cheng, 2002). Por lo tanto, en el proceso de producción de bioetanol, es necesario reducir los costos de las enzimas usadas para la hidrólisis del material crudo e incrementar la eficiencia para consecuentemente hacer el proceso más económicamente factible (Sheehan y Himmel, 1999). Recientemente, ha surgido un interés general en la obtención de nuevas enzimas con características de mayor estabilidad y especificidad (Jorgensen *et al.*, 2003). Los desafíos son: obtener microorganismos mutantes productores de celulasas (Chand *et al.*, 2005; Dillon *et al.*, 2006), y que los procesos de producción de las celulasas sean económicos en combinación con fuentes baratas de sustratos inductores, junto con el reciclaje parcial o total de las enzimas (Camassola y Dillon, 2014).

La conversión de biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables depende principalmente de la degradación con enzimas celulolíticas producidas por muchos hongos filamentosos, incluyendo *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Acremonium* (Kumar *et al.*, 2008; Kovács *et al.*, 2009).

El sistema celulolítico complejo consta de tres categorías de enzimas básicas: endoglucanasa (endo-1,4- β -D-glucanasa, EG, EC 3.2.1.4), celobiohidrolasa (exo-1,4- β -D-glucanasa, CBH, EC 3.2.1.91) y β -glucosidasa (1,4- β -D-glucosidoglucohidrolasa, BG, EC 3.2.1.21), que actúan sinérgicamente para degradar la celulosa insoluble en glucosa (Sipos *et al.*, 2010).

Las enzimas del sistema celulolítico tienen en común la capacidad de hidrolizar los enlaces 1,4- β -glucosídico entre las moléculas de D-glucosa, pero difieren en su punto de partida y el sustrato a hidrolizar. Las endoglucanasas separan los enlaces internos de la fibra de celulosa para producir celodextrinas; las exoglucanasas actúan en la región externa de la celulosa para producir celobiosa, y finalmente la β -glucosidasa hidroliza celobiosa y oligosacáridos solubles a unidades de glucosa (Lynd *et al.*, 2002), catalizando la hidrólisis de enlaces β -glucosídicos tales como alquil- o aril- β -glucósidos, tales como diglucósidos y oligosacáridos. Es importante mencionar el papel que juega la β -glucosidasa para degradar celobiosa, un potente inhibidor de enzimas celulolíticas,

responsable de la sacarificación completa de la celulosa a glucosa mediante la eliminación de celobiosa que inhibe a la celobiohidrolasa y endoglucanasas (Medve *et al.*, 1997; Singhanía *et al.*, 2013; I-Son *et al.*, 2010).

La β -glucosidasa puede ser obtenida de humanos, insectos, plantas o microorganismos. Las primeras tres fuentes son de poco valor en la elaboración de vinos debido a que son inhibidas por las condiciones del procesamiento (bajo pH, alta concentración de glucosa y etanol); las únicas fuentes viables de estas enzimas, son los microorganismos. En la actualidad, la liberación de aroma es a menudo incrementada con el uso de preparaciones comerciales de enzimas de origen fúngico principalmente *Aspergillus* sp (Villena *et al.*, 2007).

Algunos estudios han demostrado que la hidrólisis de la celulosa es mejor empleando celulasas de *Trichoderma reesei* complementadas con la actividad de β -glucosidasa extra (Tengborg *et al.*, 2001; Tu *et al.*, 2006). Las β -glucosidasas son enzimas ampliamente estudiadas debido a su distribución universal y bien definida naturaleza de sustrato; además de la simplicidad de la prueba de actividad enzimática (Singhanía *et al.*, 2013).

Recientemente, con la mayor disponibilidad de datos de secuencias de genomas de hongos, ha aumentado la evidencia de la existencia de múltiples genes β -glucosidasa en otras especies, entre ellos dos genes β -glucosidasas caracterizadas (BGLI/Cel1A y BGLII/Cel3A) y cinco β -glucosidasas predichas (Cel1B, Cel3B, Cel3C, Cel3D, Cel3E) (Foreman *et al.*, 2003).

El sistema de celulasas de *T. reesei* ha sido el más ampliamente estudiado entre los hongos celulolíticos. La β -glucosidasa divide a la celobiosa en dos monómeros de glucosa, eliminando la inhibición ejercida por la celobiosa sobre ciertas celulasas tales como la CBH1 de *T. reesei* (Gong *et al.*, 1977). Las β -glucosidasas son muy importantes en la regulación de genes de celulasas, son enzimas claves en la síntesis de sofrosa, un inductor eficiente del sistema celulolítico de *T. reesei* (Mandels *et al.*, 1962). Recientemente, la β -glucosidasa se ha convertido en el centro de varios estudios aplicados, debido a que son esenciales no sólo en la degradación de celulosa, sino también en la síntesis de oligómeros y otras moléculas complejas (por ejemplo, alquil-glucósidos) por transglucosilación (Hanssona y Adlercreutz, 2002). La organización estructural de esta enzima está muy diversificada. La β -glucosidasa nativa de *Pyrococcus furiosus* tiene un peso molecular de 230 kDa y se compone de cuatro subunidades, cada una con un peso molecular de 58000Da (Kengen *et al.*, 1993). En contraste, la BG de *Clostridium stercorarium* es un monómero con un peso molecular de 85000Da (Bronnenmeier y Staudenbauer, 1988). Algunos estudios indican que

algunas β -glucosidasa de los hongos de la podredumbre blanca también tienen un peso molecular alto. Por ejemplo, dos β -glucosidasa de *Sporotrichum pulverulentum* tienen pesos moleculares altos de 165000 y 182000Da, respectivamente (Deshpande *et al.*, 1978). Por otra parte, se han purificado algunas β -glucosidasa con pesos moleculares similares: la β -glucosidasa de *Pisolithus tinctorius* de 450000 Da compuesto por tres homosubunidades; y las β -glucosidasa de *Volvariella volvacea* de 158000 y 256000 Da (Cai *et al.*, 1998; Cao y Crawford, 1993). *Stachybotrys microbispora* contiene un sistema de β -glucosidasa enriquecido que consta de más de cuatro enzimas. Dos de ellas fueron purificadas como enzimas diméricas, cada monómero con un peso molecular de 85000 Da (Amouri y Gargouri, 2006). Debido a las múltiples aplicaciones para esta actividad biológica, la preparación de β -glucosidasa con alta pureza ha sido de gran interés para los biólogos. Sin embargo, es muy difícil obtener proteínas activas puras por métodos de separación convencionales, tales como cromatografía en columna, electroforesis de dos dimensiones y la cromatografía en capa fina (TLC). Combinado las técnicas anteriores con la transferencia de membrana blotting y la electroforesis azul nativa (BN-PAGE), se han utilizado con éxito en la separación preparativa de proteínas activas (Offord *et al.*, 1991; Schägger, 1994). Lin *et al.*, (2010), emplearon la electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de dos ciclos en condiciones nativas y electroelución (NGGEE) sin la transferencia a membrana para purificar proteínas enzimáticas de *T. koningii* AS3.2774. Con este método, se purificaron 8 proteínas enzimáticas y se clasificó el sistema de celulasa mediante la comparación de las secreciones de *T. koningii* en un medio inductivo y en un medio represivo. El resultado fue una β -glucosidasa (BG) purificada 24 veces con una tasa de recuperación del 5,5%, y una actividad específica de 994,6 U mg^{-1} proteína total.

Se han realizado investigaciones en diferentes tipos de hongos filamentosos para la producción de β -glucosidasas, por ejemplo, en 2007b, Camassola y Dillon, establecieron el potencial del hongo *Penicillium echinulatum* como productor de enzimas con actividad de papel filtro (FPA), endoglucanasa, β -glucosidasa y xilanasa, cultivado en un Sistema de Fermentación en Estado Sólido (FES), usando un medio de cultivo barato que contiene BCA pretratado y salvado de trigo. Los niveles más altos de actividad enzimática de FPA, fueron medidos sobre mezclas de BCA pretratado y salvado de trigo (32.89 ± 1.90 U gdm^{-1}). La actividad de β -glucosidasa más alta, fue de 58.95 ± 2.58 U gdm^{-1} sobre el cuarto día de cultivo del sistema FES. La actividad de endoglucanasa más alta fue de 282.36 ± 1.23 U gdm^{-1} en el cuarto día, y la actividad de xilanasas

más alta fue aproximadamente de 10 U gdm^{-1} a partir del segundo al cuarto día. Los niveles de las actividades enzimáticas ensayadas, siempre fueron mayoritarios en presencia de cantidades mínimas de BCA pretratado. Finalmente, los autores concluyeron que el salvado de trigo puede ser parcialmente sustituido por BCA pretratado. Este estudio tuvo un impacto considerable debido a que la incorporación de fuentes baratas, tales como el BCA, incluido en el medio para la producción de enzimas lignocelulósicas debe ayudar a disminuir los costos de producción de complejos enzimáticos que pueden hidrolizar residuos lignocelulósicos para la formación de jarabes fermentados, contribuyendo de esta forma a la producción económica de bioetanol (Camassola y Dillon, 2007b).

Una investigación en *A. japonicus* mostró que este hongo fue capaz de producir una β -glucosidasa, cultivado en un sistema de fermentación sumergida, utilizando BCA como fuente de carbono, incubado a 30°C , durante 72 h. La enzima purificada tuvo un peso molecular estimado de 114000 Da. La secuencia de aminoácidos, determinada por espectrometría de masas, demostró una estructura similar a la β -glucosidasa de *A. niger* y *A. kawachii*. La enzima purificada fue inmovilizada por diferentes métodos, sobre distintos soportes, y en todos los casos se observó que la enzima fue rápidamente inmovilizada, presentó una alta actividad residual después de la inmovilización. Este estudio reforzó el uso de los catalizadores inmovilizados en los procesos biotecnológicos (Marcio *et al.*, 2014).

Recientemente, un gen β -glucosidasa (*bgl*) de *Aspergillus oryzae* GIF-10 fue clonado, secuenciado y expresado. La longitud completa de la secuencia de ADN fue de 2903 pb y consta de tres intrones. La longitud completa de la secuencia de ADNc contiene un marco de lectura abierto (ORF) de 2586 nucleótidos, que codifica para 862 aminoácidos con una señal de secreción potencial. El gen *bgl* de *A. oryzae* GIF-10 fue expresado funcionalmente en *Pichia pastoris*. Después de 7 días de inducción, la producción de proteína alcanzó 321 U mg^{-1} proteína total. La actividad específica de la enzima purificada alcanzó 215 U mg^{-1} de proteína total empleando salicina como sustrato. La β -glucosidasa recombinante purificada fue una glicoproteína con un peso molecular de 110000 Da con una actividad catalítica óptima a pH 5.0 y 50°C . La enzima fue estable entre 20 y 60°C , retuvo 65% de actividad después de ser incubada a 60°C durante 30 min, relativamente estable en un intervalo amplio de valores de pH (4.0 a 6.5). La enzima también mostró actividad específica amplia hidrolizando un intervalo de (1-4)- β -diglucósidos y (1-4)- α -

diglucósidos, así mismo, la actividad fue significativamente estimulada por Mn^{+2} (Tang *et al.*, 2014).

Dubrovskaya *et al.* (2012), aislaron una β -D-glucosidasa extracelular a partir del hongo marino *Penicillium canescens*. De acuerdo a electroforesis SDS, el peso molecular de la enzima fue de 64000 Da y la actividad máxima se observó en un pH de 5.2 a 70°C. La β -glucosidasa catalizó la hidrólisis de enlaces β -glucosídicos en glucósidos y en disacáridos de glucosa y presentó actividad de transglicosilación. La enzima se puede utilizar para la desglicosilación de glicósidos naturales y en la síntesis enzimática de nuevos compuestos que contienen de carbohidratos.

Hsin-Liang *et al.* (2012), aislaron un ADNc que codifica para una β -glucosidasa NpaBGS a partir del hongo *Neocallimastix patriciarum* W5 de rumen de búfalo. El ADNc resultó tener una longitud de 2331 pb con un ORF que codifica para una proteína de 776 aminoácidos, correspondiente a un peso molecular teórico de 85100 Da y un punto isoeléctrico de 4.4. El análisis de la secuencia mostró que la proteína NpaBGS contiene dos dominios catalíticos GH3 en los extremos N y C terminal. El ADNc fue expresado en *Pichia pastoris* y después de la purificación de la proteína, la enzima mostró una actividad específica de 34.5 U/mg proteína total contra la celobiosa como sustrato. Los ensayos enzimáticos mostraron que la β -glucosidasa NpaBGS fue activa sobre celooligosacáridos cortos de diferentes sustratos. También se observó actividad mínima sobre carboximetil celulosa (CMC), sugiriendo que la enzima posee ambas actividades de endoglucanasa y β -glucosidasa. La actividad óptima fue detectada a 40°C y pH 5.0~6.0, mostrando que la enzima prefiere condiciones de acidez baja. Sin embargo, la actividad podría ser mejorada a 50 °C con la adición de iones Mg^{+2} o Mn^{+2} . Los experimentos simultáneos de sacarificación y FES usando *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 o *Kluyveromyces marxianus* KY3 de forma similar a la fermentación levaduriforme, la β -glucosidasa NpaBGS mostró ventajas en el crecimiento celular, producción de glucosa y etanol sobre la enzima comercial Novo 188. Sin embargo, los autores demostraron que la cepa KY3 modificada por ingeniería genética con el gen NpaNGS, puede utilizar 2% de pasto seco como única fuente de carbono para producir 3.32 mg/ml de etanol cuando 1.5 L de Celluclast fue agregado al sistema FES. Por lo anterior, se concluyó que la enzima β -glucosidasa NpaBGS se comporta mejor que la Novo 188, bajo las condiciones de vida de la fermentación levaduriforme, por lo que es recomendada como una enzima potencial para sistemas FES de producción.

De Cassia *et al.* (2014), probaron varios residuos agroindustriales (harina de soja y paja de trigo, arroz y cáscaras de maní, mazorca de maíz y el rastrojo de maíz, y bagazo de caña de azúcar) para la producción de β -glucosidasa en el hongo termófilo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 en un cultivo de FES. Entre los sustratos ensayados, los rendimientos mayoritarios se obtuvieron con la harina de soja como sustrato inductor. Este hecho confirma la posibilidad de utilizar este tipo de residuos para reducir el costo de producción de las enzimas microbianas; además, se contribuye a la disminución en la acumulación de estos compuestos en el medio ambiente. La β -glucosidasa producida por el microorganismo *T. indicae-seudaticae* N31 presenta condiciones óptimas para la actividad a pH cercano a la neutralidad y bajo temperaturas elevadas, además de mostrar un amplio espectro de estabilidad al pH y la temperatura. Además, la β -glucosidasa tiene una alta estabilidad frente a concentraciones altas de glucosa y etanol. Tales características son muy deseables en las diversas aplicaciones industriales.

La β -glucosidasa también se ha producido de forma recombinante. Kitagawa *et al.*, (2010), demostraron el valor de la levadura termotolerante *Issatchenkia orientalis* como microorganismo candidato para la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica con el objetivo de bioprocésamiento consolidado. La cepa MF-121 de *I. orientalis* es ácido tolerante, etanol tolerante y termo tolerante, y es por lo tanto, una levadura multiestrés tolerante. Para expresar las proteínas heterólogas en *I. orientalis*, se construyó un sistema de transformación de la cepa MF-121 y luego se aisló los promotores de TDH1 y PGK1, dos genes que han sido encontrado fuertemente expresados durante la fermentación etanólica. Los resultados indicaron que la expresión de la β -glucosidasa de *A. aculeatus* pudo ser lograda con *I. orientalis*, demostrando que la expresión heterólogo se llevó a cabo con éxito en *I. orientalis* por primera vez. La cepa transformada podría convertir celobiosa a etanol, bajo condiciones ácida y temperatura alta. Sacarificación y fermentación (FES) se realizó de manera simultánea con la cepa transformada, que produjo 29 g l⁻¹ de etanol en 72 h a 40 °C, incluso sin adición de β -glucosidasa cuando la FES se llevó a cabo en medio que contenía 100 g l⁻¹ de celulosa microcristalina y una preparación de celulosa comercial. Estos resultados sugieren que el uso de una levadura termotolerante obtenida por ingeniería genética tal como *I. orientalis* en una fermentación FES, podría conducir a la reducción de costos en la sacarificación donde se requieren enzimas.

Existen muchos reportes sobre el estudio de las enzimas β -glucosidasa producidas por hongos (Krogh *et al.*, 2010; Pal *et al.*, 2010; Vetrovsky *et al.*, 2013; Aki *et al.*, 2014; Okeke, 2014), este

trabajo reporta, por vez primera, la producción de β -glucosidasa de *M. roreri* cultivado en un sistema FES usando BCA y CCA como sustratos.

II.VIII Sistema de Fermentación en Estado Sólido.

Una fermentación en estado sólido (FES) se define como cualquier proceso de fermentación que ocurre en la ausencia o casi ausencia de agua libre, mediante el empleo de un sustrato natural como un soporte sólido. Muchos microorganismos son capaces de crecer en sustratos sólidos, hongos filamentosos, en particular, pueden crecer a medida significativa en ausencia de agua libre (Chahal, 1985; Gao *et al.*, 2008; Sonia *et al.*, 2005). La concentración máxima de sustrato que puede ser manejado en la fermentación en estado líquido convencional es sólo un 2-10%. Para aumentar la concentración de sustrato a más de 10%, la FES parece ser la alternativa más atractiva. La FES tiene muchas ventajas sobre la fermentación en estado líquido, incluyendo alta productividad volumétrica, mayor concentración de productos, menor generación de efluentes y baja represión catabólica. La FES también es un método preferible para la producción de enzimas fúngicas debido a que se produce en alta concentración las enzimas y tanto el costo de producción y operación son bajos. Por lo tanto, la FES se está convirtiendo en un método popular para la producción comercial de enzimas (Camassola y Dillon, 2007b; Khan *et al.*, 2007; Nair *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2006). La eficacia de la fermentación de materiales lignocelulósicos presenta dos retos principales. En primer lugar, la estructura cristalina de la celulosa, que es altamente resistente a la hidrólisis y la asociación de lignina-celulosa, que forman una barrera física que impide el acceso enzimático a las fibras de celulosa. Además, la hidrólisis ácida de la celulosa requiere el uso de altas temperaturas y presiones, que conduce a la destrucción de parte de los hidratos de carbono, que se convierten principalmente en compuestos furánicos, y la generación de sustancias tóxicas como consecuencia de la degradación parcial de la lignina (Jacobsen y Wyman, 2000). El uso de residuos agrícolas lignocelulósicos abundantemente disponibles, tales como paja de arroz, salvado de arroz, paja de trigo y bagazo de caña de azúcar, para el cultivo de microorganismos productores de celulasas ofrece un enfoque para alcanzar esta meta (I-Son *et al.*, 2010).

II.IX LITERATURA CITADA.

- Aime M., C., and Phillips-Mora W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao* L.) form a new lineage of *Marasmiaceae*. *Mycologia* 97: 1012-1022.
- Adsul M., G., Ghule J., E., Singh R. 2004. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*. 57 (1): 67-72.
- Aki Y., Hsion-Wen D., K., Mayumi I., Parastoo A., Su-May Y., Tuan-hua D., H. 2014. Glycosylation Variants of a β -Glucosidase Secreted by a Taiwanese Fungus, *Chaetomella raphigera*, Exhibit Variant-Specific Catalytic and Biochemical Properties. *PLoS ONE* 9 (9):106306.
- Amouri B., Gargouri A. 2006. Characterization of a novel β -glucosidase from a *Stachybotrys* strain. *Biochem. Eng. J.* 32: 191-197.
- Aro N., Pakula T., Penttila M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 29 (4): 719-739.
- Bothast R., J., Saha B., C. 1997. Ethanol production from Agricultural biomass substrates. *Adv Appl Microbiol.* 44: 261-286.
- Bronnenmeier K., Staudenbauer W., L., 1988. Purification and properties of an extracellular β -glucosidase from the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 380-386.
- Cai Y., J., Buswell J., A., Chang S., T. 1998. β -Glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 122-129.
- Camassola M., and Dillon A., J., P. 2007a. Effect of methylxanthines on production of cellulases by *Penicillium echinulatum*, *Journal of Applied Microbiology*. 102: 478-485.
- Camassola M., and Dillon A., J., P. 2007b. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 103: 2196-2204.
- Camassola M., and Dillon A., J., P. 2009. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Industrial Crops and Products*. 29: 642-647.
- Cao, W., Crawford D., L. 1993. Purification and some properties of β -glucosidase from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. *Can. J. Microbiol.* 1: 125-129.
- Castro A., M., Carvalho M., L., Leite S., G., F., Pereira J., N. 2010. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37: 151-158.
- Cavaco-Paulo A. 1998. Mechanism of cellulase action in textile processes. *Carbohydr Polym* 37: 273-277.
- Chahal D., S. 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 205-210.
- Chand P., Aruna A., Maqsood A., M, Rao L., V. 2005. Novel mutation method for increased cellulase production. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 318-323.
- Dan S., Marton I., Dekel M., Bravdo B., A., He S., Withers S., G., Shoseyov O. 2000. Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* β -glucosidase. *J Biol Chem.* 275: 4973-4980.
- De Cassia J., P., Ribeiro L., Alves P., Bocchini M., D., Gomes E., Da Silva P. 2014. Production and characterization of β -glucosidase obtained by the solid-state cultivation of the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Appl Biochem Biotechnol.*
- Deshpande V., Eriksson K., E., Pettersson B. 1978. Production, purification and partial characterization of 1,4- β -glucosidase enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* 90: 191-198.
- Dillon A., J., P., Zorgi C., Camassola M., Henriques J., A., P. 2006. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 70: 740-746.
- Dubrovskaya Y., V., Sova V., V., Slinkina N., N., Anastyuk S., D., Pivkin M., V., Zvyagintseva T., N. 2012. Extracellular β -D-glucosidase of the *Penicillium canescens* Marine Fungus. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 48 (4): 401-408.
- Evans H. C., Stalpers J., A., Samson R., A., and Benny., G., L. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Can. J. Bot.* 56: 2528-2532.
- Evans H., C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora roreri* (Monilia) London, UK: Commonwealth Micological Institute. *Phytopathological*. 24: 44.

- Ferreira P., Hernandez-Ortega A., Herguedas B., Martinez A., T., Medina M. 2009. Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: a mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two alcohol substrates. *J Biol Chem.* 284 (37): 24840-24847.
- Figuiera A., Janick J., BeMiller J., N. 1993. New products from *Theobroma cacao*: Seed Pulp and Pod Gum. *New Crops.* Wiley, New York. 475-478.
- Foreman P., K., Brown D., Dankmeyer L., Dean R., Diener S., DunnColeman, N., S., Goedegebuur F., Houfek T., D., England G., J., Kelley A., S., Meerman H., J., Mitchell T., Mitchinson C., Olivares H., A., Teunissen P., J., Yao J., Ward M. 2003. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* 278: 31988-31997.
- Gao J., Weng H., Zhu D., Yuan M., Guan F., Xi Y. 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresour. Technol.* 99: 7623-7629.
- Gong C., S., Ladisch M., R., Tsao G., T. 1977. Cellobiase from *Trichoderma viride*: purification, properties, kinetics, and mechanism. *Biotechnol. Bioeng.* 19: 959-981.
- Griffith G., W., Nicholson J., Nenninger A., Birch R., N., Hedger J., N. 2003. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zeal J Bot.* 41 (3): 423-435.
- Gusakov A., V., Berlin A., G., Popova N., N., Okunev O., N., Sinitsyna O., A., Sinitsyn A., P. 2000. A comparative study of different cellulase preparations in the enzymatic treatment of cotton fabrics. *Applied Biochemistry and Biotechnology A: Enzyme Engineering and Biotechnology.* 88 (3): 119-126.
- Hanssona T., Adlercreutz P. 2002. Enzymatic synthesis of hexyl glycosides from lactose at low water activity and high temperature using hyperthermostable β -glycosidases. *Biocatal. Biotransform.* 20: 167-178.
- Henrissat B., Callebaut I., Fabrega S., Lehn P., Mornon J., P., Davies G. 1995. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92 (15): 7090-7094.
- Himmel M., E., Ruth M., F., Wyman C., E. 1999. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr Opin Biotechnol* 10: 358-364.
- Hsin-Liang C., Yo-Chia C., Mei-Yeh J., L., Jui-Jen C., Hiaow-Ting C., W., Huei-Mien K., Tzi-Yuan W., Sz-Kai R., Tao-Yuan W., Kuo-Yen H., Hsing-Yi C., Wan-Ting L., Ming-Che S., Wen-Hsiung Li. 2012. A highly efficient β -glucosidase from the buffalo rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5. *Biotechnology for Biofuels.* 5: 24.
- Huang R., Su R., Qi W., He Z. 2011. Bioconversion of lignocellulose into bioethanol: process intensification and mechanism research. *BioEnergy Research.* 4 (4): 225-245.
- I-Son N., Chen-Wei L., Shuang-Pi C., Jiun-Ly C., Po-Ting C., Chii-Gong T., Su-May Y., Tuan-Hua D., H. 2010. High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresour. Technol.* 101: 1310-1317.
- Jacobsen S., E., Wyman C., E. 2000. Cellulose and hemicellulose hydrolysis models for application to current and novel pretreatment processes. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 84:86-96.
- Jin-A K., Park J., Y., Kwon H., J., Ryu Y., B., Jeong H., J., Park S., J., Kim C., Y., H.M. Oh H., M., Park C., S., Lim Y., H., Kim D., Rho M., C., Lee W., S., Kim Y., M. 2014. Purification and functional characterization of the first stilbene glucoside-specific β -glucosidase isolated from *Lactobacillus kimchi*. *Enzyme and Microbial Technology.* 67: 59-66.
- Jorgensen H., Eriksson T., Borjesson J., Tjerneld F., Olsson L. 2003. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme Microb Technol* 32: 851-861.
- Kengen S., W., Luesink E., J., Stams A., J., Zehnder A., J. 1993. Purification and characterization of an extremely thermostable β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Eur. J. Biochem.* 213: 305-312.
- Kersten P., J. 1990. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87 (8): 2936-2940.
- Khan M., H., Ali S., Fakhru-Razi A., Alam Z. 2007. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme. *J. Environ. Sci. Health B.* 42: 381-386.
- Kitagawa T., Tokuhiko K., Hidehiko S., Katsuhiko K., Naoto I., Makoto H., Haruo T., Takao I. 2010. Construction of a β -glucosidase expression system using the multistress-tolerant yeast *Issatchenkia orientalis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87: 1841-1853.
- Kovács K., Szakacs G., Zacchi G. 2009. Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. *Bioresour. Technol.* 100: 1350-1357.

- Kranz J., Schmutterer H. and Coch W. 1978. Diseases, pests and weeds in tropical crops. John Wiley and Sons, New York, USA. 219-220.
- Krogh K., B., M., Harris P., V., Olsen C., L., Johansen K., S., Hojer-Pedersen J., Borjesson J., Olsson L. 2010. Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 β -glucosidase from *Penicillium brasilianum*. Appl Microbiol Biotechnol. 86:143-154.
- Kumar R., Singh S., Singh O., V. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. J Ind Microbiol Biotechnol. 35 (5): 377-391.
- Lynd L., R., Wemer P., J., Zyl W., H., V., Pretorius I., S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66: 506-577.
- Maeda R., N., Silva M., M., P., Santa Anna L., M., M., Pereira J., R., N. 2010. Nitrogen source optimization for cellulase production by *Penicillium funiculosum*, using a sequential experimental design methodology and the desirability function. Applied Biochemistry and Biotechnology. 161: 411-422.
- Mandebvu P., West J., W., Froetschel M., A., Hatfield R., D., Gates R., N., Hill G., M. 1999. Effect of enzyme or microbial treatment of bermudagrass forages before ensiling on cell wall composition, end products of silage fermentation and in situ digestion kinetics. *Animal Feed Science and Technology*. 77: 317-329.
- Mandels M., Parrish F., W., Reese E., T. 1962. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma reesei*. J. Bacteriol. 83: 400-408.
- Mayer A., M. and Staples R., C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60 (6): 551-565.
- Medve J., Stahlberg J., Tjerneld F. 1997. Isotherms for adsorption of cellobiohydrolase I and II from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. Appl. Biochem. Biotechnol. 66: 39-56.
- Meinhardt L., W., Lacerda C., G., G., Thomazella P., T., D., Teixeira P., J., Falsarella C., M., Schuster C., S., Carlson J., E., Gultinan M., J., Mieczkowski P., Farmer A., Ramaraj T., Crozier J., Davis R., E., Shao J., Melnick R., L., Pereira G., A., G., Bailey B., A. 2014. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. BMC Genomics. 15:164.
- Nair S., G., Sindhu R., Shashidhar S. 2008. Purification and biochemical characterization of two xylanases from *Aspergillus sydowii* SBS 45. Appl. Biochem. Biotechnol. 149: 229-243.
- Offord D., Lee N., Woodward J. 1991. Preparative purification of *Trichoderma reesei* native and "core" cellobiohydrolase I by electrophoresis and chromatofocusing. Appl. Biochem. Biotechnol. 28 (29): 377-386.
- Okeke B., C. 2014. Cellulolytic and Xylanolytic Potential of High β -Glucosidase-Producing *Trichoderma* from Decaying Biomass. Appl Biochem Biotechnol (10) 1007: 12010.
- Padrón G., Romero G., Benavides A., Ramírez H., Maiti R. 2003. *Crop Research*. 2: 291-302.
- Pal S., Prosad S., B., Ghorai S., Chowdhury S., Khowala S. 2010. Purification and characterization of a thermostable intra-cellular β -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. Bioresource Technology 101: 2412-2420.
- Pemberton M., S., Brown R., D., Emert G., H. 1980. The role of β -glucosidase in the bioconversion of cellulose to ethanol. Can J Chem Eng. 58: 723-729.
- Phillips-Mora W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* As determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Ph.D. Thesis. University of Reading, Reading, UK. 349.
- Phillips-Mora W., Coutiño A., Ortiz C., F., López A., P., Hernández J., Aime M., C. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. Plant Pathology. 55:584.
- Rao M., Gaikwad S., Mishra C., Deshpande V. 1988. Induction and catabolite repression of cellulase in *Penicillium funiculosum*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 19: 129-137.
- Rau M., Heidemann C., Pascoal A., M. 2008. Application of cellulases from *Acrophialophora nainiana* and *Penicillium echinulatum* in textile processing of cellulosic fibres. *Biocatalysis and Biotransformation*. 26: 383-390.
- Schägger H. 1994. Electrophoretic isolation of membrane proteins from acrylamide gels. Appl. Biochem. Biotechnol. 48: 185-203.
- Sheehan J., and Himmel M., E. 1999. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. Department of Energy's Research and Development Activities for ethanol. *Biotechnol Prog*. 15: 817-827.
- Shoseyoc O., Bravdo B., A., Ikan R., Chet I. 1990. Immobilized endo β -glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice. *J Agric Food Chem*. 27: 1973-1976.
- Singhania R., R., Patel A., K., Sukumaran R., K., Larroche C., Pandey A. 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresour. Technol*. 127: 500-507.

- Sipos B., Benko Z., Dienes D., Réczey K., Viikari L., Siika-aho M. 2010. Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on different carbon sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161: 347-364.
- Sonia K., G., Chadha B., S., Saini H., S. 2005. Sorghum straw for xylanase hyperproduction by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 96: 1561-1569.
- Sun Y., Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.* 83: 1-11.
- Tengborg C., Galbe M., Zacchi G. 2001. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam pretreated softwood. *Biotechnol. Prog.* 17: 110-117.
- Thorold C., A. 1975. Disease of cocoa Clarendon Press, Oxford, England. 27-31.
- Tiburcio R., A., Lacerda C., G., G., Carazzolle F., M., Costa M., J., M., Schuster S., C., Carlson J., E., Guiltinan J., M., Bailey A., B., Mieczkowski P., Meinhardt W., L., Guimarañes P., G., C. 2010. Genes Acquired by Horizontal Transfer Are Potentially Involved in the Evolution of Phytopathogenicity in *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri*, two of the Major Pathogens of Cacao. *J Mol Evol.* 70: 85-97
- Tiels P., Baranova E., Piens K., De Visscher C., Pynaert G., Nerinckx W., Stout J., Fudalej F., Hulpiau P., Tannler S., Geysens S., VanHecke A., Valevska A., Vervecken W., Remaut H., Callewaert N. 2012. A bacterial glycosidase enables mannose-6-phosphate modification and improved cellular uptake of yeast-produced recombinant human lysosomal enzymes. *Nat Biotechnol.* 30 (12): 1225-1231.
- Tiwari P., Misra B., N., Sangwan N., S. 2013. β -glucosidases from the fungus *Trichoderma*: an efficient cellulase machinery in biotechnological Applications. *BioMed Research International*.
- Tu M., Zhang X., Kurabi A., Gilkes N., Mabee W., Saddler, J. 2006. Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocelluloses hydrolysis. *Biotechnol. Lett.* 28: 151-156.
- Vetrovsky T., Baldrian Jiri Gabriel J. 2013. Extracellular Enzymes of the White-Rot Fungus *Fomes fomentarius* and Purification of 1,4- β -Glucosidase. *Appl Biochem Biotechnol.* 169:100-109.
- Villena M., A., Iranzo J., F., U., Perez A., I., B. 2007. β -glucosidase activity in wine yeasts: application in enology. *Enzyme Microb Technol.* 40: 420-5.
- Yang S., Q., Yan Q., J., Jiang Z., Q., Li L., T., Tian H., M., Wang Y., Z. 2006. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 97: 1794-1800.
- Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L. 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56: 17-34.
- Zhao H., Jones C., L., Baker G., A., Xia S., Olubajo O., Person V., N. 2009. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis, *Journal of Biotechnology.* 139 (1): 47-54.

CAPÍTULO III

CONFIRMACIÓN MOLECULAR DE *Moniliophthora roreri* A PARTIR DEL GEN 18S ADNr.

III.1 INTRODUCCIÓN.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de la secuenciación rápida y barata de ADN, y la acumulación de una cantidad relativamente grande en un banco de datos de secuencias de ADN ribosomal, han revolucionado tanto los límites mas bajos de detección de patógeno, así como la exactitud y rapidez de su identificación. Estos avances han hecho posible la detección de patógenos dentro de los tejidos vegetales en las primeras etapas de la infección, puesto que la presencia mínima del patógeno y la intervención temprana, pueden prevenir una epidemia. Las técnicas moleculares también han hecho posible una identificación definitiva del patógeno mediante el uso de sondas de ADN de patógenos conocidos, además, han hecho posible la cuantificación del patógeno aislado o en una mezcla con el tejido de la planta, tales como semillas. La mayoría de los oligonucleótidos iniciadores de ADN están diseñados para las secuencias transcritas internas de ADN ribosomal (Agrios, 2005).

En los últimos años, el estudio de subunidades pequeñas de ARN ribosómico ha revolucionado la clasificación de microorganismos, bacterias y hongos. Estas técnicas, basadas en la amplificación por PCR de genes que codifican para ARNr y la comparación de secuencias, ofrecen una nueva herramienta para la identificación y el estudio de los hongos (James *et al.*, 1994). La Identificación rápida de hongos filamentosos se consiguió utilizando dos conjuntos de oligonucleótidos iniciadores para PCR específicos (Bock *et al.*, 1994; Pedersen *et al.*, 1997; Turenne *et al.*, 1999). Los oligonucleótidos iniciadores específicos de hongos para la secuencia conservada de los genes ARNr 18S y 28S común a todos los hongos, han sido usados para detectar hongos patógenos (Anand *et al.*, 2001).

Para superar las dificultades de identificación y clasificación, el gen que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosómico (ADNr 18S o ADNr), ha sido ampliamente utilizado para la caracterización molecular y para el análisis filogenético; la ubicuidad del gen y la tasa evolutiva baja, lo hace particularmente ventajosa a este respecto (Figura 2) (Cavalier-Smith, 1993; Margulis *et al.*, 1996; Van de Peer *et al.*, 2000).

Embong *et al.*, (2008), demostró en un estudio la eficacia del gen 18S ARNr para detectar hongos patógenos en muestras clínicas. Esta prueba basada en PCR es un método rápido, sensible y útil para detectar una etiología fúngica en queratitis microbiana en comparación con las técnicas estándar de laboratorio. Se necesitan más estudios con muestras de mayor tamaño para refinar la técnica, calcular la sensibilidad y especificidad, y para establecer el valor de la técnica en el manejo de pacientes con queratitis microbiana.

Por lo antes mencionado, y con el objetivo de realizar la identificación molecular de la cepa de *Moniliophthora roreri*, aislada de mazorcas de cacao con signos y síntomas de moniliasis, el gen 18S RNAr fue amplificado por PCR, secuenciado y comparado con las secuencias registradas en el GenBank del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

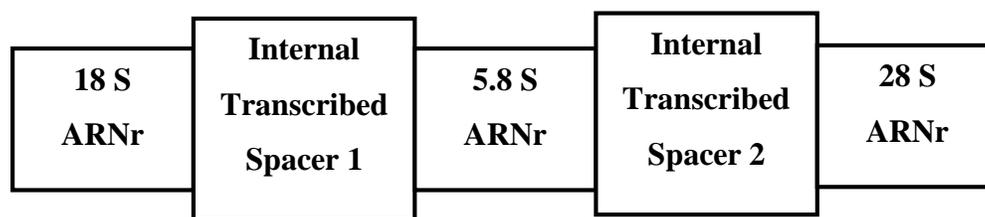


Figura 2. Estructura del ADN nuclear de los organismos eucariontes.

III.II MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente trabajo de investigación fue realizado empleando la cepa MROCP de *M. roreri*, misma que fue aislada a partir de mazorcas infectadas. Previo al trabajo de investigación, la cepa MROCP fue identificada mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen 18S ARNr (Número de acceso GenBank: KM998972). La secuencia fue publicada en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (National Center for Biotechnology Information; NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

III.II.I Aislamiento de *Moniliophthora roreri*.

El presente trabajo se desarrolló con el hongo *M. roreri*, aislado a partir de una mazorca de cacao infectada. La superficie de la mazorca que mostró manchas necróticas, fue desinfectada con etanol y cortadas longitudinalmente cerca de la mancha necrótica. A partir de la parte interna del corte, se extrajeron pequeñas secciones de tejido. Los tejidos fueron sembrados en cajas de petri con medio de cultivo V8 clarificado. Las cajas de petri se colocaron en una incubadora (INCUCCELL MMM Group) durante 15 días a 28°C.

III.II.II Medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado para la conservación y purificación específica de la cepa MROCP de *M. royeri* fue el medio sólido V8 clarificado: Jugo de verduras con antioxidantes naturales y vitaminas A y C 200 mL^{-1} , y CaCO_3 4.5 g L^{-1} .

El medio de cultivo empleado para la extracción del ADN cromosómico de la cepa MROCP de *M. royeri* fue el medio líquido YEPD: Extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y dextrosa al 2%.

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min.

Los medios sólidos fueron preparados agregando 2.0 % de agar bacteriológico.

III.II.III Extracción de ADN cromosómico.

La cepa MROCP de *M. royeri* se cultivó en medio sólido V8 clarificado en cajas de petri, hasta alcanzar 8.5 cm de diámetro (15-21 días). A continuación, se preparó una suspensión de esporas, agregando 5 mL de medio YEPD líquido a cada caja de petri, y removiendo cuidadosamente los conidios con un pincel. La suspensión fue transferida a un matraz de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo líquido YEPD y se incubó a 25°C , en un agitador orbital a 150 rpm durante 48 h (Phillips-Mora, 2003). Las células fueron cosechadas por filtración. La biomasa obtenida fue resuspendida en regulador de acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) 50 mM, pH 5.0 a una concentración de 10 ml g^{-1} de peso seco. La muestra fue sonicada en un baño de hielo empleando un sonicador (Ultrasonic Processor 130 Watt Model) con 20 pulsos de 30 s, cada pulso fue seguido de incubación durante 2 min en baño de hielo (Kurzatkowski *et al.*, 1996).

Posteriormente, la muestra sonicada se distribuyó en microtubos de 1.7 ml, agregando volúmenes de 500 μL de muestra, 200 μL de regulador de lisis y 200 μL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). A continuación, los tubos fueron agitados vigorosamente durante 1 min en un disruptor celular vortex (Disruptor Genie).

Se adicionaron 200 μL de regulador TE (Tris 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM) y se sometió a centrifugación por 5 min a 12, 000 rpm. La fase acuosa se transfirió a otro tubo de 1.7 ml al que se le agregaron 200 μL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), nuevamente se agitó en el disruptor celular vortex durante 1 min y se centrifugó 5 min a 12, 000 rpm. El sobrenadante se recuperó y se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto, enfriado a -20°C . La muestra se incubó a -20°C durante 30 min, se centrifugó por 5 min a 12, 000 rpm y eliminó el etanol residual

por decantación, seguido por evaporación a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en 400 μL de regulador TE y trató con 10 μg de RNAsa A (Gibco BRL), a partir de una solución patrón de 10 mg mL^{-1} en Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5 y NaCl 0.015 M. La mezcla se incubó a 37°C, durante 15 min, posteriormente, el ADN fue precipitado con 10 μL de acetato de amonio 4 M y dos volúmenes de etanol absoluto, enfriado a -20°C, a continuación se mezcló por inversión y se incubó a -20°C durante 30 min, se centrifugó por 10 min a 12, 000 rpm. El sobrenadante fue eliminado por decantación, seguido por evaporación a temperatura ambiente. La pastilla formada de ADN se lavó con 500 μL de etanol al 80%, se agitó suavemente, se centrifugó a 14, 000 por 5 min. Finalmente, el etanol al 80% fue eliminado por decantación y dejó secar a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en 30 μL de agua desionizada estéril, se incubó a 50°C durante 10 min. Para evaluar la calidad, concentración y pureza del ADN, se determinó la absorbancia a 260 nm y considerando que 1U A_{260} equivale a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ADN de doble cadena. La calidad del ADN se determinó por la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} (Sambrook *et al.*, 1989).

III.II.IV Amplificación del gen 18S ADNr por PCR.

La cepa aislada fue identificada mediante la amplificación y secuenciación del gen 18S ADNr. El gen 18S DNAr se amplificó empleando los oligonucleótidos iniciadores universales LV1 (oligo sentido; diseñado a partir de la secuencia de la cadena 5'-3') y LV2 (oligo antisentido; diseñado a partir de la secuencia de la cadena 3'-5') descrito por Bautista-Muñoz *et al.*, (2005):

LV-1: 5' CCT GCC AGT AGT CAT ATG CTT GTC T 3'

LV-2: 5' CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC GAC T 3'

El fragmento amplificado se envió a secuenciar con los oligonucleótidos iniciadores LV1, LV2, así como los oligonucleótidos iniciadores 246 Forward, 354 Forward, 750 Forward, 1160 Forward, 1559 Forward (Cuadro 1) (García *et al.*, 2010), a partir de la secuencia del gen 18S DNAr de *M. roreri* (Número de acceso GenBank: AY916745).

Cuadro 1. Iniciadores empleados en las reacciones de secuenciación del gen 18S ADNr.

Nombre	Rango de secuencia	Posición	5'-Secuencia-3'	Tm (°C)	Longitud (pb)
Primer 246 Forward	201-400	246	TCGAATCGCATGGCCTTGT	65	19
Primer 354 Forward	401-800	354	AGGGTTCGATTCCGGAGAG	61.513	19
Primer 750 Forward	801-1200	750	GTGTTCAAAGCAGGCCTATG	58.379	20
Primer 1160 Forward	1201-1600	1160	CCTGCGGCTTAATTGACTC	59.845	20
Primer 1559 Forward	1601-1779	1559	CGAGGAATACCTAGTAAGCG	54.5	20

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 10 ng del ADN molde, en un volumen final de 25 μL bajo la siguiente formulación: 16.3 μL de agua grado PCR, regulador de reacción 1X, MgCl_2

2mM, dNTPs 200 mM, iniciadores 0.4 mM y 1 U de Taq ADN polimerasa. El ADN se amplificó en un termociclador Techgene ® con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de una desnaturalización a 94°C por 1 min; alineamiento a 67°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 5 min (Bautista-Muñoz *et al.*, 2005).

III.II.V Electroforesis del ADN.

El fragmento de ADN amplificado fue sometido a electroforesis convencional en gel de agarosa, siguiendo el método descrito por Meyers *et al.*, (1976). Se preparó un gel horizontal de agarosa al 1 % en regulador TAE 1X (Tris Base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM). El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 80 V, durante 75 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg mL⁻¹ en regulador TAE 1X, durante 15 min. Finalmente el gel se expuso a luz UV en un transiluminador UV/Vis (MiniBis, Bio Imaging Systems), para visualizar el fragmento de ADN amplificado. El tamaño del fragmento de ADN amplificado se calculó por comparación con un marcador de ADN de 1 kb de talla molecular (Invitrogen) y con la ayuda del software Gel quant Versión 2.7.

III.II.VI Purificación de fragmento de ADN amplificado.

El fragmento de ADN amplificado se purificó empleando el kit QIAquick Gel Extraction de QUIAGEN (QUIAGEN Group, HmbH, Germany), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

III.II.VII Secuenciación del ADN purificado.

El producto de PCR purificado se envió a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. Las secuencias de ADN fueron analizadas con el software BioEdit Sequence Alignment Editor, versión 7.2.5 y alineadas con las secuencias de genes homólogos depositadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov).

III.II.VIII Alineamiento múltiple de secuencias de genes 18S ADNr descritos en hongos.

Las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos iniciadores mencionados en el cuadro 1, fueron editadas y ensambladas con el software BioEdit Sequence Alignment Editor, versión 7.2.5. La

secuencia de ADN parcial obtenida fue comparada mediante la herramienta BLAST las con secuencias nucleotídicas codificante de genes 18S ADNr de hongos descrita y depositada en la base de datos de la NBCI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Posteriormente, todas las secuencias nucleotídicas fueron alineadas empleando el software CLUSTAL X Versión 2.0.11 (Thompson *et al.*, 1997).

III.II.IX Relaciones de similitud entre las secuencias de genes 18S ADNr de la cepa MROCP de *M. roreri* y otros hongos descritos.

Se efectuaron cinco alineamientos múltiples consecutivos y el último alineamiento se uso para establecer un filograma con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) utilizando el método de agrupamiento de Neighbor-joining con el índice Poisson (P). Para valorar estadísticamente la significancia de las relaciones presentadas en el filograma, se realizaron 1000 aleatorizaciones tipo “bootstrap”.

III.III RESULTADOS.

El análisis de la morfología colonial de la cepa MROCP del hongo aislado, y mantenido en el medio V8 clarificado, mostró un crecimiento inicial blanquecino, circular de aspecto lanoso a fieltro, posteriormente se torno color salmón-crema, y finalmente café oscuro debido a la formación masiva de esporas, sin olor (Figura 3a). La morfología microscópica de las esporas, fue observada a partir de una colonia cultivada, en medio de cultivo V8, de 21 días de crecimiento (Figura 3a). Se encontraron esporas de pared gruesa, color amarillo pálido y heteromórficas de formación basal, hialinas, en su mayoría de forma oviode o elipsoidal (E) y de tipo globosa (G) (Figura 3b).

Las características morfológica y microscópica del aislamiento, coincidieron con las reportadas por Phillips-Mora *et al.* (2006), Evans (1981) y Torres-Cruz *et al.*, (2010) para *M. roreri*.

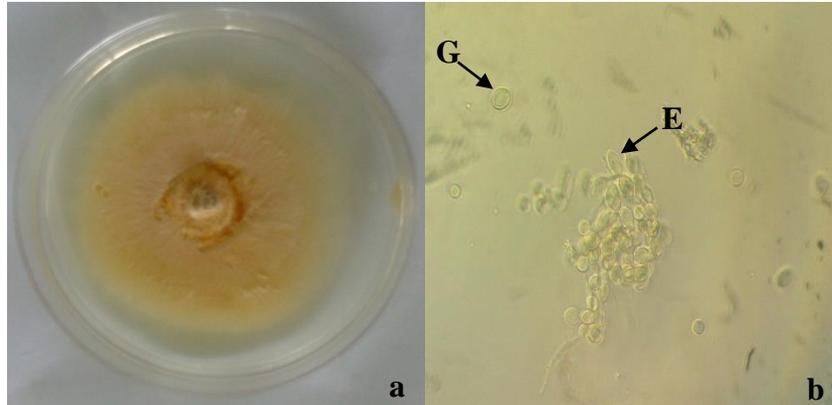


Figura 3. Morfología colonial y microscópica de la cepa MROCP de *M. roreri* aislada a partir de mazorcas infectadas. a) Características de la colonia de *M. roreri* MROCP cultivada en el medio V8 a 21 días de crecimiento; b) Características de las esporas, de formación basal, hialinas, en su mayoría de forma ovoide o elipsoidal (E) y de tipo globosa (G) de *M. roreri* MROCP.

III.III.II Identificación molecular de *Moniliophthora roreri*.

Los iniciadores LV1 y LV2 específicos, se diseñaron para amplificar el gen 18S del ADN_r de hongos (Bautista-Muñoz *et al.*, 2005) con la finalidad de identificar la cepa MROCP a nivel de género y especie, basado sobre el análisis de la secuencia. Dichos iniciadores permitieron la amplificación de un fragmento cuya secuencia contiene 1737 pb (Figura 4) a partir del ADN de la cepa MROCP aislada. La secuencia se registró en la base de datos GenBank y está disponible con el número de acceso KM998972 (Figura 5). El análisis Blast (Basic Local Alignment Search Tool) realizado en el servidor de la NCBI, indicó que la secuencia parcial del gen 18S ADN_r amplificada a partir de ADN de la cepa MROCP corresponde a la del hongo *M. roreri* con el 100% de identidad máxima con respecto a la secuencia AY916745 depositada en la base de datos GenBank de la NCBI.

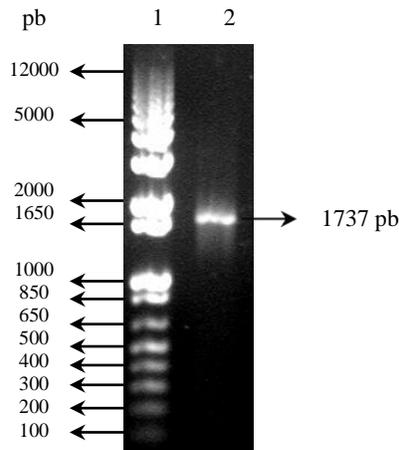


Figura 4. Fragmento del gen 18S ADN_r amplificado por PCR con los oligonucleótidos iniciadores LV1 y LV2 a partir del ADN de la cepa MROCP de *M. royeri*, aislada a partir de mazorcas infectadas. 1. Marcador de talla molecular de ADN de 1 kb; 2. Fragmento de ADN del gen 18S ADN_r de *M. royeri* amplificado por PCR. El fragmento fue enviado a secuenciar con los oligonucleótidos iniciadores LV1 y LV2, resultando una secuencia de 1737 pb.

1	CGTAGTCATA	TGCTTGTCTC	AAAGATTAAG	CCATGCATGT	CTAAGTATAA	ACAAGTTTGT
61	ACTGTGAAAC	TGCGAATGGC	TCATTAAATC	AGTTATAGTT	TATTTGATGA	TACCTTGCTA
121	CATGGATAAC	TGTGGTAATT	CTAGAGCTAA	TACATGCATT	AAAGCCCCGA	CTTCTGGGAG
181	GGGTGTATTT	ATTAGATAAA	AAACCAACGC	GGCTCGCCGC	TCACTTGGTG	ATTCATAATA
241	ACTTCTCGAA	TCGCATGGCC	TTGTGCCGGC	GATGCTTCAT	TCAAAATATCT	GCCCTATCAA
301	CTTTCGATGG	TAGGATAGAG	GCCTACCATG	GTTTCAACGG	GTAACGGGGA	ATAAGGGTTC
361	GATTCCGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAACGGCT	ACCACATCCA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGCA
421	AATTACCCAA	TCCCACACG	GGGAGGTAGT	GACAATAAAT	AACAATATAG	GGCTCTTTTG
481	GGTCTTATAA	TTGGAATGAG	TACAATTTAA	ATCCCTTAAC	GAGGAACAAT	TGGAGGGCAA
541	GTCTGGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATTCCAG	CTCCAATAGC	GTATATTTAA	GTGTGTGCAG
601	TTAAAAAGCT	CGTAGTTGAA	CTCAGGCCT	GGTTGGGCGG	TCCGCTTAAC	GGCGTGTACT
661	GTCTGACTGG	GTCTTACCTC	TTGGTGAGCC	GGCGTGCCCT	TTATTGGTGT	CGCTCGGGGA
721	ACCAGACTT	TTACCTTGAG	AAAATTAGAG	TGTTCAAAGC	AGGCCATATGC	CTGAATACAT
781	TAGCATGGAA	TAATAGAATA	GGACGTGCGG	TTCTATTTTG	TTGGTTTCTA	GAGTCGCCGT
841	AATGATTAAT	AGGGATAGTT	GGGGCATTG	GTATTGAGTC	GCTAGAGGTG	AAATCTTTGG
901	ATTGACTCAA	GACCAACTAC	TGCGAAAGCA	TTTGCCAAGG	ATGTTTTTCAT	TAATCAAGAA
961	CGAAGGTTAG	GGGATCGAAA	ACGATCAGAT	ACCGTTGTAG	TCTTAACAGT	AAACTATGCC
1021	GACTAGGGAT	CGGACGACCT	CAATTTTGAT	GCGTCGTTCG	GCACCTTACG	AGAAATCAAA
1081	GTCTTTGGGT	TCTGGGGGGA	GTATGGTCGC	AAGGCTGAAA	CTTAAAGGAA	TTGACGGAG
1141	GGCACCACCA	GGTGTGGAGC	CTGCGGCTTA	ATTTGACTCA	ACACGGGGAA	ACTCACCAGG
1201	TCCAGACATA	ACTAGGATTG	ACAGATTGAT	AGCTCTTTCA	TGATTTTATG	GGTGGTGGTG
1261	CATGGCCGTT	CTTAGTTGGT	GGAGTGATTT	GTCTGGTTAA	TTCCGATAAC	GAACGAGACC
1321	TTAACCTGCT	AAATAGACAG	GCCGACTTTG	GTTGGCTTCC	GTCTTCTTAG	AGGGACTGTC
1381	AGCGTCTAGC	TGACGGAAGT	TTGAGGCAAT	AACAGGTCTG	TGATGCCCTT	AGATGTTCTG
1441	GGCCGCACGC	GCGCTACACT	GACAGAGCCA	GCGAGTGTC	ACCTTGCCCG	AAAGGTCTGG
1501	GTAATCTTGT	GAAACTCTGT	CGTGCTGGGG	ATAGAGCATT	GCAATTATTG	CTCTCAACG
1561	AGGAATACCT	AGTAAGCGCA	AGTCATCAGC	TTGCGTTGAT	TACGTCCCTG	CCCTTTGTAC
1621	ACACCGCCCG	TCGCTACTAC	CGATTGAATG	GCTTAGTGAG	GTCTCCGGAT	TGGCTTCGGG
1681	GAGCCGGCAA	CGCACCCCTG	TCGCTGAGAA	GTTGATCAAA	CTTGGTCATT	TAGGTGA

Figura 5. Secuencia nucleotídica parcial de 1737 pb del gen 18S ADN_r de la cepa MROCP de *M. royeri* (Número de acceso GenBank: KM998972) aislada de mazorcas infectadas. La numeración del lado izquierdo indica el número de bases nucleotídicas.

III.III.III Relaciones de homología entre secuencias de genes 18S ADNr de la cepa MROCP de *M. roreri* y de otros hongos previamente descritos.

El filograma (Figura 6), muestra las relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del fragmento del gen 18S ADNr amplificado a partir del ADN de la cepa MROCP, aislada de mazorcas de cacao, con las secuencias nucleotídicas de genes 18S ADNr de hongos reportadas en el GenBank de la NCBI y cuyo porcentaje de identidad compartido fluctúa entre el 98 al 100% (Cuadro 2): *Moniliophthora roreri* cepa C21 (Número de acceso AY916745), *Moniliophthora roreri* cepa MRO1 (Número de acceso JF730693), *Moniliophthora* sp. MCA2500 (Número de acceso AY916753), *Moniliophthora perniciosa* cepa DIS71 (Número de acceso AY916739), *Crinipellis zonata* cepa OKM 25450 (Número de acceso AY916691), *Chaetocalathus liliputianus* (Número de acceso AY916681), *Marasmius oreades* aislado AFTOL-ID 1559 (Número de acceso DQ457644), *Marasmius rotula* aislado AFTOL-ID 1505 (Número de acceso DQ113912), *Crinipellis* sp. VPI4021 (Número de acceso AY916697), *Gymnopus contrarius* aislado AFTOL-ID 1758 (Número de acceso DQ440643), *Anthracophyllum archeri voucher* WTU: PBM 2201 (Número de acceso NG013183).

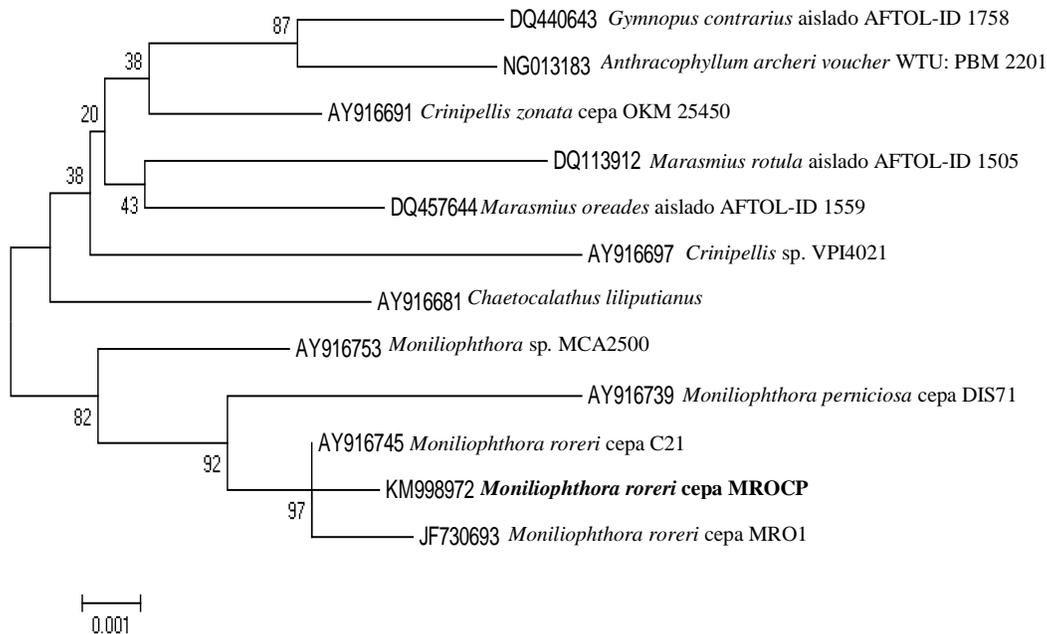


Figura 6. Relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del gen 18S ADNr de la cepa MROCP aislada de frutos de cacao y las secuencias nucleotídicas de los genes 18S ADNr de otros hongos relacionados. La comparación filogenética se basó en el análisis de 1725 posiciones nucleotídicas por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P), el método de agrupamiento fue Neighbour-joining. La significancia de las relaciones se realizó mediante 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje.

Cuadro 2. Porcentaje de identidad de la secuencia del gen 18S ADNr (Número de acceso GenBank KM998972) de la cepa MROCP con las secuencias de referencia de los parientes más próximos.

Secuencia a comparar	Número de acceso GenBank	Bases idénticas/ total de bases comparadas	Porcentaje máximo de Identidad	Parientes más próximos
18S ADNr	AY916745	1732/1732	100	<i>Moniliophthora roreri</i> cepa C21
	JF730693	1729/1732	99	<i>Moniliophthora roreri</i> cepa MRO1
	AY916753	1721/1732	99	<i>Moniliophthora</i> sp. MCA2500
	AY916739	1708/1719	99	<i>Moniliophthora perniciosa</i> cepa DIS71
	AY916691	1715/1732	99	<i>Crimipellis zonata</i> cepa OKM 25450
	AY916681	1713/1732	99	<i>Chaetocalathus liliputianus</i>
	DQ457644	1712/1733	99	<i>Marasmius oreades</i> aislado AFTOL-ID 1559
	DQ113912	1709/1733	99	<i>Marasmius rotula</i> aislado AFTOL-ID 1505
	AY916697	1706/1732	99	<i>Crimipellis</i> sp. VPI4021
	DQ440643	1708/1734	99	<i>Gymnopus contrarius</i> aislado AFTOL-ID 1758
	NG013183	1707/1734	98	<i>Anthracophyllum archeri</i> voucher WTU:PBM 2201

III.IV. DISCUSIÓN.

El fragmento de la secuencia de 1737 pb del gen 18S ADNr, obtenida del hongo aislado a partir de mazorcas de cacao con signos de moniliasis, pertenece al género y especie *Moniliophthora roreri*. Lo anterior, se confirmó por el porcentaje de identidad máxima obtenido mediante el análisis BLAST realizado en la base de datos GenBank de la NCBI, el cual fue del 100% respecto al gen 18S ADNr. De igual forma, el análisis filogenético mostró las relaciones de similitud de las

secuencias nucleotídicas del fragmento del gen 18S ADNr de la cepa MROCP con los parientes más cercanos, indicando que la cepa MROCP se agrupa con las diferentes cepas de *M. roreri*, MRO1 (Número de acceso JF730693) y C21 (Número de acceso AY916745), cuyas secuencias han sido reportadas en la base de datos del GenBank. El 18S ARNr es un gen multicopia que evoluciona lentamente y altamente conservado entre los hongos, característica que lo convierte en un blanco atractivo para la detección de hongos de muestras clínicas (Embong *et al.*, 2008), hongos causantes del deterioro de productos lácteos (Cappa and Cocconcelli, 2001), hongos productores de ligninasas (Ferhan *et al.*, 2013) fitopatógenos como *M. pernicioso* (Mondego *et al.*, 2008), entre otros.

Embong *et al.*, (2008) demostraron que el PCR basado en el 18S ARNr, tiene un alto grado de sensibilidad analítica (100 fg) y especificidad del 100%, para la detección de un amplio intervalo de hongos medicamente significantes. Los oligonucleótidos iniciadores están basados en la región conservada del gen 18S ARNr, los cuales están diseñados para detectar un amplio intervalo de cepas de hongos con productos de PCR de tamaño de 395 ± 6 pb.

Cappa y Cocconcelli (2001) reportaron que la amplificación, secuenciación y análisis de la secuencia del gen 18S RNAr de hongos aislados a partir de yogur y queso empacado, permitió la identificación de la levadura *Zygosaccharomyces microellipsoides* y mohos pertenecientes a *Penicillium chrysogenum* y *Cladosporium cladosporoides*, causantes del deterioro del yogur y queso duro empacado al vacío.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el gen 18S ADNr es un marcador molecular eficiente y eficaz para la identificación molecular de cepas del hongo *M. roreri*.

Las secuencias que codifican el ARN ribosomal (ARNr) se emplean para el estudio de las relaciones filogenéticas y taxonómicas en hongos (Bruns *et al.*, 1991). Los genes ribosomales se localizan en la mitocondria y el núcleo, y contienen numerosas regiones con secuencias conservadas y otras con gran variabilidad (White *et al.*, 1990).

El ADNr nuclear usualmente se encuentra en hongos como elementos de bloques repetidos, cada unidad está formada por un sistema complejo de secuencias que incluye los genes 18S, 28S y 5.8S, y están separados por dos espaciadores internos que se transcriben, llamados ITS1 e ITS2, con longitud de 200 a 400 pb. Además, un espaciador interno que no se transcribe, llamado IGS. Los módulos repetidos del ADNr nuclear se pueden encontrar en uno o varios cromosomas, y varían de acuerdo al genoma. Se pueden encontrar 60 copias en el género *Coprinus* y 200 en el género

Neurospora. En algunos casos, existe la subunidad 5S que puede estar localizada dentro de la unidad ribosomal o en otra región del genoma (Iturralde *et al.*, 2002). White *et al.*, (1990), diseñaron y describieron oligonucleótidos iniciadores específicos para identificar varios segmentos de ADNr mitocondrial y nuclear en hongos, determinando la posibilidad de realizar estudios filogenéticos con el uso de genes 28S, 18S y 5.8S. Muchos de los métodos de identificación de microorganismos fitopatógenos están basados en la región ITS (Martin y Tooley, 2003; Martin *et al.*, 2004; Hayden *et al.*, 2004; Tomlinson *et al.*, 2005). Hong *et al.*, (1999) diseñaron oligonucleótidos iniciadores a partir de la región ITS de los genes ADNr para la detección del complejo *Phytophthora cryptogea-Phytophthora drechsleri* en plantas, empleando una prueba de PCR convencional. Recientemente Gao *et al.*, (2013), aisló una nueva cepa de hongo productora de β -glucosidasa, misma que fue identificada como *Penicillium piceum* PpCel3B con base en la morfología colonial, y genes de ADNr. En resumen, diferentes autores, han descrito que los genes ADNr y las regiones ITS son un blanco molecular atractivo para diseñar oligonucleótidos iniciadores específicos debido a que su alta estabilidad, pueden ser amplificados con oligonucleótidos iniciadores universales y están presentes en múltiples copias y contienen tanto secuencias variables como conservadas (White *et al.*, 1990).

III.V CONCLUSIÓN.

La cepa MROCP aislada de mazorcas de cacao, fue identificada como *Moniliophthora roreri* con base en morfología colonial y microscópica, la secuencia de ADN del gen 18S ADNr con un porcentaje de identidad máxima de 100% respectivamente, con respecto a las cepas *M. roreri* previamente descritas. Este estudio ha demostrado la eficacia del gen 18S ARNr para reconocer el hongo causante de la moniliasis del cacao y ser usado en estudios etiológicos de enfermedades de plantas causadas por hongos.

III.VI LITERATURA CITADA.

- Agrios G., N. 2005. Plant pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. San Diego, California, USA. 948.
- Anand A., Madhavan H., Neelam V., Lily T. 2001. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of fungal endophthalmitis. *Ophthalmology*. 108 (2): 326-330.
- Bautista-Muñoz C., Hernández-Rodríguez C., Villa-Tanaca L. 2005. Analysis and expression of STE13ca gene encoding a putative X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Candida albicans*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 45: 459-469
- Bock M., Maiwald M., Kappe R., Nickel P., Náhher H. 1994. Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus-specific primer system. *Mycoses*. 37. 79-84.
- Bruns T., D., White T., J., Taylor J., W. 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 22: 525-564.
- Cavalier-Smith T., 1993. Kingdom Protozoa and its 18S phyla. *Microbiol Rev*. 57: 953-994.
- Cappa F., Cocconcelli P., S. 2001. Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis. *International Journal of Food Microbiology* 69: 157-160.
- Embong Z., Hazabbah W., H., W., Yean Y., C., Haslindawaty A., R., N., Kamarudin B., Khaironi Z., A., S., Sabariah O., Zainuddin Z., F., Ravichandran M. 2008. Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC Ophthalmology*. 8-7.
- Evans H., C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. *Phytopathological Papers* 24: 1-44.
- Ferhan M., Santos S., N., Melo I., S., Yan N., Sain M. 2013. Identification of a potential fungal species by 18S rDNA for ligninases production. *World J Microbiol Biotechnol*. 29: 2437-2440
- Gao L., Gao F., Zhang D., Zhang C., Wu G., Chen S. 2013. Purification and characterization of a new β -glucosidase from *Penicillium piceum* and its application in enzymatic degradation of delignified corn stover. *Bioresource Technology*. 147: 658-661.
- García A., I., Bautista, M., C., C., Velasco B., A. 2010. Diseños de iniciadores para la amplificación y secuenciación del gen 18S DNAr y la región ITS1-5.8S-ITS2 DNAr de hongos. Diseño de iniciadores para la amplificación y secuenciación del gen 18S DNAr de *Moniliophthora roreri*. 55-62.
- Hayden K., J., Rizzo D., Tse J., Garbelotto M. 2004. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*. 94: 1075-1083.
- Hong S., B., Park I., C., Go S., J., Ryu J., C. 1999. Detection of genus *Phytophthora* and *Phytophthora cryptogea P. drechsleri* complex group using polymerase chain reaction with specific primers. *J. plant pathology*. 15: 287-284.
- Iturralde M., J., Ballesteros S., Ramón F. 2002. Retos en el diagnóstico de las intoxicaciones por setas. Simposio de Toxicología en homenaje a Manuel Repetto, Sesión IV, *Rev. Toxicol*. 19:97-144.
- James S., A., Collins M., D., Roberts I., N. 1994. Genetic interrelationship among species of the genus *Zygosaccharomyces* as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *Yeast*. 10: 871-881.
- Kurzatkowski W., Torronen A., Filipek J., Mach R., L., Herzog P., Sowka S., Kubicek C., P. 1996. Glucose-induced secretion of *Trichoderma reesei* xylanases. *Appl. Environ. Microbiol*. 62 (8): 2859.
- Margulis L., Olendzenski L., Dolan M., MacIntyre F. 1996. Diversity of eukaryotic microorganisms: computer-based resources, the handbook of Protozoa and its glossary. *Microbiol SEM*. 12: 29-42.
- Martin F., N., and Tooley P., W. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia*. 95: 269-284.
- Martin F., N., Tooley P., W., Blomquist C. 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology*. 94: 621-631.
- Meyers J., A., Sanchez D., Elwell L., P., Falkow S. 1976. Simple agarose gelelectroforetic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol*. 127:1529-1537.
- Mondego J., Carazzolle F., M., Costa G., L., G., Formighieri F., E., Parizzi P., L., Rincones J., Cotomacci C., M., Carraro D., Cunha F., A., Carrer H., Vidal O., R., Estrela C., R., García O., Thomazella P., T., D., Oliveira V., B., Pires B., L., A., Rio S., M., C., Araújo R., M., R., Moraes M., H., Castro L., A., Gramacho P., K., Gonçalves S., M., Moura N., J., P., Neto G., A., Barbosa V., L., Guiltinan J., M., Bailey A., B., Meinhardt W., L., Cascardo C., M., J., Pereira A., G., G. 2008. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomic*. 9-548.
- Pedersen L., H., Skouboe P., Boysen M., Soule J., Rossen, L. 1997. Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol*. 35: 169-177.

- Phillips-Mora W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* As determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Ph.D. Thesis. University of Reading, Reading, UK. 349.
- Phillips-Mora W., Coutiño A., Ortiz C., F., López A., P., Hernández J., Aime M., C. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology*. 55:584.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. 2a Edición. New York N. Y.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- Thompson J., D., Gibson T., J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D., G. 1997 The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25:4876-4882.
- Tomlinson J., A., Boonham N., Hughes K., J., D., Griffin R., L., Barker I. 2005. On-site DNA extraction and real time PCR for detection of *Phytophthora ramorum* in the field. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6702-6710.
- Torres-Cruz M. 2010. Progreso temporal y manejo integrado de la moniliasis [*Moniliophthora roreri* (cif y Par.) Evans *et al.*] del cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco, México. [Tesis]. Colegio de Postgraduados.
- Turenne C., Y., Sanche S., E., Hoban D., J., Karlowsky J., A., Kabani A., M. 1999. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1846-1851.
- Van de Peer Y., Rijk P., Wuyts J., Winkelmans J., Wachter R. 2000. The European small subunit ribosomal RNA database. *Nucleic Acid Res.* 28: 175-186
- White T., J., Bruns T., Lee S., Taylor J., W. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, San Diego. Academic Press. 315-322.

CAPÍTULO IV

CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE β -GLUCOSIDASA DE *Moniliophthora roreri* EN UN SISTEMA DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.

IV.I INTRODUCCIÓN.

El bagazo de caña de azúcar (BCA) es un residuo del proceso de extracción del azúcar. Actualmente, el BCA se consume para la producción de energía a través de la cogeneración. El BCA es un material lignocelulósico abundante, de bajo costo, y podría ser una materia prima muy prometedora usada como fuente de carbono en el medio de fermentación para la producción de enzimas celulasas (Camassola y Dillon, 2009).

La cáscara de cacao (CCA) es un residuo que se acumula en grandes pilas junto con la plantación. El principal uso que se le ha dado a este material es el abonamiento de suelos, esto gracias a su degradación que sirve como mejorador del mismo (Figuiera *et al.*, 1993; Padrón *et al.*, 2003). Además, se han desarrollado estudios para utilizarla en la alimentación de porcinos y aves (Oddoye *et al.*, 2010; Olubamiwa *et al.*, 2002), como fuente comercial de pectinas (Barazarte *et al.*, 2008), en la producción de espumas de poliuretano para uso hortícola (Padrón *et al.*, 2004) y algunos hacen referencia a la actividad antibacteriana de extractos de la CCA frente a *Streptococcus mutans* (Osawa *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2003).

A nivel comercial, las celulasas se expresan a través de una fermentación sumergida, sin embargo el costo de producción es alto, y se presentan deficiencias en la producción de algunas de las enzimas del sistema celulasas. Una solución para reducir el costo de producción es la aplicación de la FES como una ruta alternativa para la producción de varias enzimas industriales. Lo anterior, tiene el potencial de ser escalado a volúmenes mayores de producción. El costo de producción de una FES puede reducirse, hasta diez veces más, en comparación a una fermentación sumergida (Tengerdy, 1996) debido al menor consumo de energía (Holker *et al.*, 2004), el empleo de sustratos lignocelulósicos adecuados de bajos costos (Singhania *et al.*, 2010), y la reducción en el costo de la deshidratación durante procesamiento (Tengerdy, 1996).

Los reportes indican que los hongos filamentosos son mejores productores de celulasas cuando son cultivados bajo FES, en comparación a una fermentación sumergida (Shrestha *et al.*, 2010). Además de las ventajas operacionales, la producción de celulasas por hongos de BRF, por ejemplo,

Gloeophyllum trabeum, cultivado bajo FES tuvo mejor rendimiento en términos de la eficiencia de la hidrólisis, lo anterior, comparado con aquellos producidos en cultivos líquidos (Tewalt y Schilling, 2010). El cuadro 3 resume el potencial de las cepas de hongos de WRF y de BRF en la producción de celulasas (Wan *et al.*, 2014).

Cuadro 3. Cepas de hongos de WRF y BRF potenciales en la producción de celulasas vía FES.

Género	Especies	Referencias
WRF		
<i>Phanerochaete</i>	<i>chrysosporium</i>	Shrestha <i>et al.</i> , 2008; Shrestha <i>et al.</i> , 2010; Zeng <i>et al.</i> , 2010; Hong <i>et al.</i> , 2011; Dong <i>et al.</i> , 2013.
<i>Trametes</i>	<i>versicolor</i>	Machuca and Ferraz, 2001; Elisashvili <i>et al.</i> , 2009; Valagkova and Baldrian, 2006.
	<i>trogii</i>	Levin <i>et al.</i> , 2008.
	<i>pubescens</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2008.
	<i>hirsuta</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2009.
	<i>ochracea</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2009.
<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2009; Valagkova and Baldrian, 2006; Velazquez-Cedeno <i>et al.</i> , 2002; Elisashvili <i>et al.</i> , 2008b.
	<i>dryinus</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2008; Kachlishvili <i>et al.</i> , 2005.
	<i>tuberregium</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2008; Kachlishvili <i>et al.</i> , 2005.
	<i>sajor-caju</i>	Kumaran <i>et al.</i> , 1997.
	<i>pulmonarius</i>	Velazquez-Cedeno <i>et al.</i> , 2002.
<i>Lentinus</i>	<i>edodes</i>	Philippoussis <i>et al.</i> , 2011; Dong <i>et al.</i> , 2013; Elisashvili <i>et al.</i> , 2008b; Kachlishvili <i>et al.</i> , 2005; Regina <i>et al.</i> , 2008; Mata and Savoie, 1998.
	<i>tigrinus</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2008; Lechner and Papinutti, 2006.
<i>Cerrena</i>	<i>maxima</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2008.
<i>Funalia</i>	<i>trogii</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2008; Kachlishvili <i>et al.</i> , 2005.
<i>Corioloopsis</i>	<i>polyzona</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2008.
<i>Pycnoporus</i>	<i>coccineus</i>	Machuca and Ferraz, 2001; Elisashvili <i>et al.</i> , 2008.
	<i>sanguineus</i>	Quiroz-Castaneda <i>et al.</i> , 2011.
<i>Bjerkandera</i>	<i>adusta</i>	Quiroz-Castaneda <i>et al.</i> , 2011.
<i>Fomes</i>	<i>fomentarius</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2009.
<i>Pseudotremella</i>	<i>gibbosa</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2009.
<i>Trichaptum</i>	<i>biforme</i>	Elisashvili <i>et al.</i> , 2009.
<i>Irpex</i>	<i>lacteus</i>	Xu <i>et al.</i> , 2009.
<i>Ceriporiopsis</i>	<i>subvermispora</i>	Heidorne <i>et al.</i> , 2006.
BRF		
<i>Laetiporus</i>	<i>sulfurous</i>	Machuca and Ferraz, 2001.
<i>Fomitopsis</i>	-	Deswal <i>et al.</i> , 2011.
<i>Wolfiporia</i>	<i>cocos</i>	Machuca and Ferraz, 2001.
<i>Piptoporus</i>	<i>betulinus</i>	Valagkova and Baldrian, 2006.
<i>Gloeophyllum</i>	<i>trabeum</i>	Rasmussen <i>et al.</i> , 2010; Shrestha <i>et al.</i> , 2010.

Tomado de Wan *et al.*, 2014.

Phanerochaete chrysosporium es reportado como uno de los hongos mejores productores de celulasas, entre los hongos de WRF, mas comunes usados en la producción de celulasas (Jha *et al.*, 1995). Lo anterior es debido a que no todos los hongos de WRF y de BRF son productores efectivos de celulasas. Algunos de ellos son mejores productores de otras enzimas hidrolíticas u oxidativas. Por ejemplo, *Lentinula edodes* es un hongo que produce niveles altos de enzimas ligninolíticas, mientras que *Funalia trogii* y *Pleurotus dryinus*, se inclinan a la acumulación de altas cantidades de celulasas bajo FES (Kachlishvili *et al.*, 2005).

IV.II MATERIALES Y MÉTODOS.

IV.II.I Medios de cultivo.

IV.II.I.I Composición del sistema de fermentación en estado sólido (FES).

La producción de enzimas extracelulares β -glucosidasas, biomasa celular y pH, fueron determinados cada 24 h durante todo el proceso de la FES. Cabe mencionar que los ensayos se realizaron por triplicado. La FES se desarrolló en frascos de 100 mL con 25 g de medio de fermentación. El medio de fermentación contenía en gr por 100 gr lo siguiente: urea, 0.3; K_2HPO_4 , 0.65; $(NH_4)_2SO_4$, 1.26; $MgSO_4$, 0.02; $FeSO_4$, 0.029, bagazo de caña de azúcar (BCA) o cascara de cacao (CCA), 24.6 y 70 mL de agua destilada, conteniendo 70% de humedad inicial. El pH se ajustó a 4.5. El BCA y CCA se tamizaron y lavaron con agua caliente para eliminar los azúcares residuales. El medio de cultivo y el substrato inductor (BCA o CCA) se esterilizaron por separado a 120°C durante 15 min. Una vez enfriadas, ambas fracciones se mezclaron (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2011).

IV.II.I.II Preparación del pre-inóculo.

La cepa MROCP de *M. roreri* se cultivaron en cajas Petri, hasta alcanzar 8.5 cm de diámetro (15-21 días). Con la finalidad de favorecer la germinación de las esporas y el crecimiento de micelio del hongo, se prepararon cultivos pre-inoculados a partir de una suspensión de esporas, agregando 5 mL del medio de fermentación a cada caja Petri, y removiendo cuidadosamente los conidios con un pincel. La suspensión de esporas, se transfirió a un matraz de 500 mL con 100 g de medio de cultivo de fermentación y se incubó a 28°C, en un agitador orbital a 150 rpm durante 24 h (Phillips-Mora, 2003). Posteriormente, las esporas germinadas se contaron y los frascos problema se inocularon con una concentración de 1×10^6 esporas germinadas/g de materia seca (Lipa y Slizynki, 1973). Finalmente, todos los frascos problemas y testigos (sin inocular) se incubaron a 28°C sin agitación y bajo condiciones naturales de luz-obscuridad. Posteriormente, las muestras se filtraron cada 24 h durante 30 días. Al líquido filtrado se le determinó pH, proteína total y actividad enzimática extracelular de β -glucosidasa, y el material sólido fue usado en la determinación de la biomasa celular del hongo (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2011).

IV.II.I.III Determinación de la biomasa de *M. roreri*.

La producción de biomasa de *M. roreri*, se determinó en los frascos problemas preparados como se indicó en la sección anterior. A continuación, el micelio se cosecho cada 24 h durante 30 días,

empleando un sistema de filtración al vacío en un sistema Millipore y papel Whatman número 3. El micelio filtrado se secó en un horno Scorpion Cientific a 65°C durante 72 h. Finalmente, las muestras de los frascos problemas y testigos, se pesaron en una balanza analítica Marca AE (Modelo AEP). La biomasa de *M. roreri* calculada en gramos fue el resultado del peso de la biomasa del problema menos el testigo (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2011).

IV.II.II Determinación pH.

Se realizó con un potenciómetro digital marca Conductronic PC 18 (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2011).

IV.II.III Determinación de actividad enzimática.

Las muestras de material fermentado se tomaron cada 24 h durante 30 días. Las muestras fueron filtradas en una unidad de filtración al vacío. El líquido filtrado constituyó el extracto enzimático extracelular para la determinación de la actividad enzimática extracelular de β -glucosidasa, proteína total (Lowry, 1951) y pH. La actividad enzimática extracelular de β -glucosidasa se determinó midiendo la hidrólisis del *p*-nitrofenil- β -D-Glucopiranosido (PNPG) (Sigma). La mezcla de reacción (1 ml) contenía PNPG 5mM preparado en regulador de acetato de sodio 0.1 M (pH 5.0) y una solución de enzima apropiadamente diluida. Después de incubado a 50 °C durante 30 min, la reacción se detuvo agregando 250 μ L de carbonato de sodio 0.25 M, y el color de la mezcla formado se leyó a 410 nm (GENESYS 10uv). Una unidad de actividad enzimática de β -glucosidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol por min bajo las condiciones de ensayo. La actividad específica es definida como el número de unidades por miligramo de proteína total (Karnchanatat *et al.*, 2007).

IV.II.IV Determinación de la proteína total.

La concentración de proteína total se midió siguiendo el método descrito por Lowry *et al.*, (1951), empleando albúmina sérica bovina como patrón.

IV.II.V Diseño experimental.

Se utilizaron cuatro tratamientos (T) con tres repeticiones por tratamiento. En el T1 se estudió la fermentación del BCA sin inóculo (testigo), en el T2 se estudió la fermentación del BCA inoculado con *M. roreri* MROCP, en el T3 se estudió la fermentación de la CCA sin inóculo (testigo), y en

el T4 se estudió la fermentación de la CCA inoculado con *M. roreri* MROCP, durante 30 días para todos los casos. Para conocer la actividad enzimática, se calculó la eficiencia, restando el valor del tratamiento 1 al valor del tratamiento 2, y se restó el tratamiento 3 con el tratamiento 4. El diseño estadístico para actividad enzimática y biomasa fueron completamente aleatorio y se analizaron por medio de análisis de varianza y comparando sus medias entre los días mediante la prueba de Tukey.

Para el pH, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3 por 30. El primer factor estudiado fue la fermentación del BCA con y sin inóculo, el segundo factor estudiado fue la fermentación de la CCA con y sin inóculo y el tercer factor consistió en el tiempo de fermentación de 1 a 30 días. Se realizó un ANOVA para conocer los efectos de interacción del tiempo de incubación y los tratamientos. Se realizó la comparación múltiple de medias por el método de Tukey (1953) con $\alpha=0.05$, mediante PROC GLM del programa estadístico SAS, versión 9.1 (SAS, 2003).

IV.III RESULTADOS.

Los resultados analizados, muestran el comportamiento del valor de pH, biomasa celular y actividad enzimática de β -glucosidasa extracelular de la cepa MROCP de *M. roreri*.

El valor de pH en el tratamiento 2 (BCA inoculado con *M. roreri* MROCP) muestra un valor inicial de 6.52 a las 24 h, se mantiene hasta el día 13 con un valor de 6.80 y posteriormente finaliza con un valor de 7.06 (Figura 7). El valor de pH en el tratamiento 4 (CCA inoculado con *M. roreri*) muestra un valor inicial de 6.48, se mantiene hasta el día 13 con un valor de 6.76 y posteriormente finaliza con un valor de 7.04 (Figura 8).

En la comparación de medias de la prueba de Tukey, por día, se encontró que en el T2 los días 24 y 26 presentaron valores de pH con BCA, y en el T4 los días 26 y 27 presentaron valores de pH con CCA (Cuadro 4).

La determinación de actividad enzimática de β -glucosidasa (Figura 7), muestra que durante los primeros 17 días de fermentación con BCA, hubo poca actividad enzimática, sin embargo, en el día 18, la actividad se incrementó, alcanzando un valor de 332.6 U mg⁻¹ proteína total. En los siguientes días, los días 25 y 30, se alcanzan valores de 180.5 y 279.9 U mg⁻¹ proteína total, respectivamente.

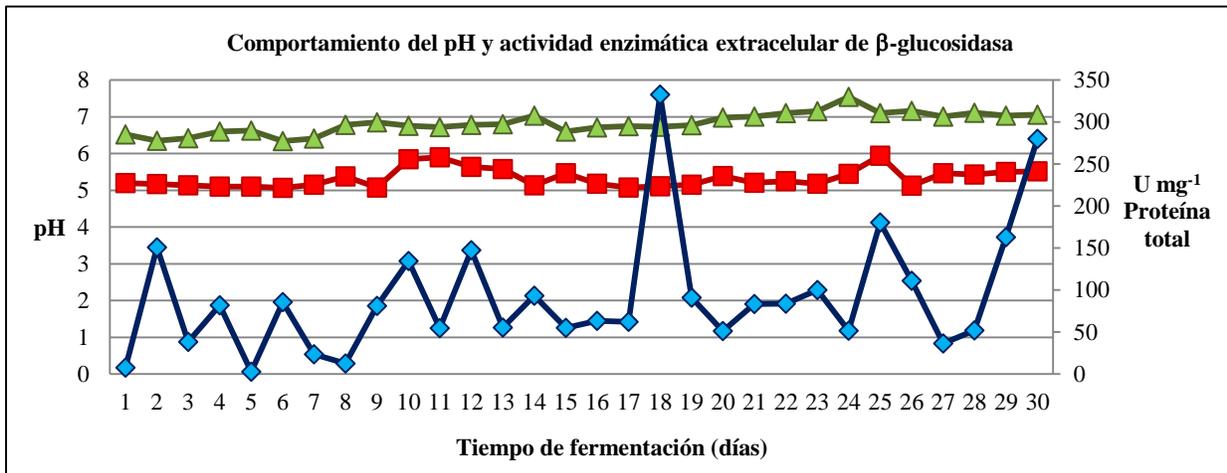


Figura 7. Comportamiento del pH y la actividad enzimática específica de β -glucosidasa de la cepa MROCP de *M. roleri* cultivado en FES con el sustrato BCA: pH testigo (■) pH problema (▲) actividad enzimática con BCA en U/mg de proteína total (◆).

La determinación de la actividad enzimática de β -glucosidasa (Figura 8), muestra que durante los primeros 16 días de fermentación con CCA, hubo poca actividad enzimática, sin embargo, en el día 17, la actividad incrementó, alcanzando un valor de 6.28 U mg⁻¹ proteína total. En los siguientes días, y a partir del día 26 y 27, se alcanzan valores de 25.04 y 27.66 U mg⁻¹ proteína total, respectivamente.

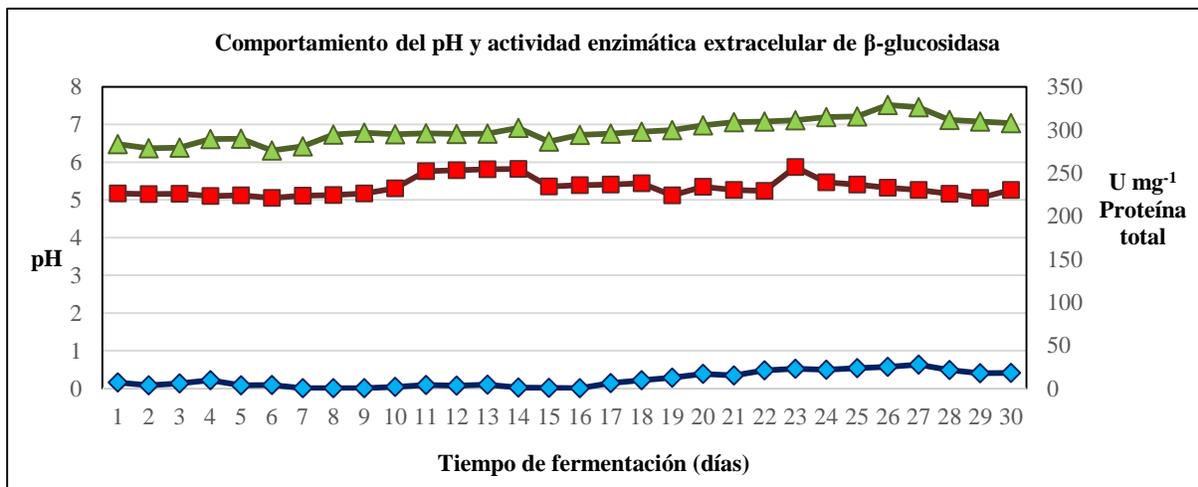


Figura 8. Comportamiento del pH y la actividad enzimática específica de β -glucosidasa de la cepa MROCP de *M. roleri* cultivado en FES con el sustrato CCA: pH testigo (■) pH problema (▲) actividad enzimática con CCA en U/mg de proteína total (◆).

El análisis de varianza muestra una diferencia significativa entre días para ambos tratamientos con los sustratos BCA y CCA inoculados con *M. roleri* MROCP. La comparación de medias de la prueba de Tukey indica que los niveles más altos de actividad enzimática se obtienen en los días

18 y 30 para el T2 (BCA inoculado con *M. roreri* MROCP), y los días 26 y 27 para el T4 (CCA inoculado con *M. roreri* MROCP) (Cuadro 4).

De acuerdo a los resultados obtenidos, en el T2 (BCA inoculado con *M. roreri* MROCP) la biomasa celular inicio con un valor de 21.7 mg (0.2177 g) en el día 1, como se muestra en el Cuadro 4, y tiende a incrementar hasta un valor de 29.07 mg (0.2907 g) en el día 29.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en el T4 (CCA inoculado con *M. roreri* MROCP) la biomasa celular inició con un valor de 24.6 mg (0.2468 g) en el día 1, como se muestra en el Cuadro 4, y se incrementó a un valor de 29.72 mg (0.2972 g) en el día 22. El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre días.

Cuadro 4. Efecto de la fermentación del BCA y CCA con y sin inóculo de la cepa MROCP de *M. roreri* y los días de fermentación en el cambio de pH, actividad enzimática de β -glucosidasa y biomasa.

Factores	pH		Actividad enzimática de β -glucosidasa (U mg ⁻¹ proteína total)		Biomasa (g)	
	BCA	CCA	BCA	CCA	BCA	CCA
Días de fermentación						
1	6.52 ^u	6.48 ^a	7.7 ^e	6.90 ^p	0.2177 ^s	0.2468 ^l
2	6.35 ^x	6.37 ^d	150.9 ^c	3.74 ^u	0.2378 ^l	0.2398 ^m
3	6.42 ^v	6.39 ^c	38.4 ^z	5.88 ^q	0.2049 ^a	0.2317 ^r
4	6.60 ^f	6.61 ^y	82.1 ^o	9.44 ^m	0.2098 ^y	0.2116 ^v
5	6.63 ^s	6.62 ^x	2.6 ^f	3.45 ^v	0.2012 ^d	0.2114 ^z
6	6.34 ^y	6.31 ^e	85.7 ^l	3.91 ^t	0.2137 ^u	0.2318 ^q
7	6.41 ^w	6.42 ^b	23.6 ^c	0.30 ^b	0.2480 ^j	0.2208 ^w
8	6.78 ^l	6.73 ^v	12.6 ^d	0.36 ^a	0.2423 ^k	0.2531 ⁱ
9	6.85 ^j	6.78 ^o	81.4 ^p	0.24 ^d	0.2178 ^r	0.2561 ^h
10	6.76 ⁿ	6.74 ^u	134.7 ^g	1.66 ^x	0.2044 ^c	0.2244 ^t
11	6.72 ^q	6.77 ^p	54.7 ^v	4.06 ^s	0.2153 ^t	0.2372 ^o
12	6.78 ^l	6.75 ^t	147.4 ^f	3.06 ^w	0.2216 ^q	0.2248 ^s
13	6.80 ^k	6.76 ^r	55.4 ^t	4.34 ^r	0.2364 ^m	0.2386 ⁿ
14	7.03 ^g	6.91 ^l	93.3 ^j	0.93 ^y	0.2048 ^b	0.2400 ^j
15	6.60 ^l	6.55 ^z	55.0 ^u	0.66 ^z	0.2105 ^v	0.2572 ^g
16	6.71 ^r	6.72 ^w	63.3 ^r	0.26 ^c	0.2359 ^a	0.2838 ^b
17	6.75 ^o	6.76 ^s	62.4 ^s	6.28 ^p	0.2103 ^x	0.2646 ^e
18	6.73 ^p	6.81 ⁿ	332.7 ^a	9.40 ⁿ	0.2245 ^p	0.2008 ^d
19	6.77 ^m	6.85 ^m	91.2 ^k	12.30 ^l	0.2075 ^z	0.2047 ^c
20	6.98 ⁱ	6.98 ^k	51.4 ^y	16.85 ^j	0.2808 ^c	0.2371 ^p
21	7.01 ^h	7.06 ⁱ	83.5 ⁿ	15.12 ^k	0.2684 ^d	0.2756 ^c
22	7.10 ^e	7.08 ^h	83.9 ^m	20.83 ^g	0.2455 ^j	0.2972 ^a
23	7.15 ^c	7.11 ^f	100.2 ⁱ	22.69 ^d	0.2583 ^f	0.2456 ^k
24	7.54 ^a	7.20 ^d	51.6 ^x	21.76 ^e	0.2566 ^g	0.2195 ^x
25	7.10 ^e	7.21 ^c	180.5 ^c	23.48 ^c	0.2481 ^h	0.2229 ^u
26	7.16 ^b	7.52 ^a	111.3 ^h	25.04 ^b	0.2341 ^o	0.2224 ^v
27	7.01 ^h	7.46 ^b	36.6 ^a	27.66 ^a	0.2104 ^w	0.2052 ^b
28	7.11 ^d	7.12 ^e	52.1 ^w	21.30 ^f	0.2869 ^b	0.2057 ^a
29	7.03 ^g	7.08 ^g	163.1 ^d	17.56 ^j	0.2907 ^a	0.2584 ^f
30	7.06 ^f	7.04 ^j	279.9 ^b	18.15 ^h	0.2629 ^e	0.2666 ^d

^{ab}Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey, 1953). ***P<0.001

IV.IV DISCUSIÓN.

Como se aprecia, a medida que transcurre la fermentación del BCA inoculado, el valor de pH de producción de la enzima se incrementa de un valor inicial de 6.52, a las 24 h, hasta alcanzar un valor de 7.54, en el día 24, y posteriormente desciende. De forma similar, el valor de pH encontrado durante la fermentación del CCA inoculado, inicia con 6.48 y alcanza un valor de 7.52, en el día 26, y posteriormente desciende. Este comportamiento de pH, es similar a lo encontrado por Herrera-Murillo *et al.*, (1988), quienes reportaron que *M. roreri* es capaz de crecer en medios con intervalos de pH de 4.9 a 7.3. Barros (1975), reportó que *M. roreri* es capaz de crecer en medios con intervalos de pH de 3.5 a 8.0, siendo el óptimo de 5.0 a 6.5, pero es capaz de crecer a pH de 7.0.

Respecto a la producción de la enzima β -glucosidasa, en el día 18 de la FES con BCA inoculado con *M. roreri* MROCP, se observa una expresión significativa de la enzima, alcanzando una actividad enzimática específica de 332.6 U mg⁻¹ proteína total, y en el día 27 de la FES con CCA inoculado con *M. roreri* MROCP, se aprecia un incremento de la actividad enzimática específica con un valor de 27.66 U mg⁻¹ proteína total.

Los resultados del presente trabajo tienen un comportamiento similar a los reportes previos. Gurusamy *et al.*, (2012), señalaron que *P. funiculosum* NCL1 produce β -glucosidasa. La optimización del pH inicial, temperatura de incubación y fuente de carbono, pueden resultar en un nivel alto de producción de β -glucosidasa. Lo anterior, obedece a que la producción de la enzima, localización y características, están fuertemente influenciadas por las condiciones antes mencionadas. Dichos autores investigaron el efecto del pH inicial sobre la producción de β -glucosidasa en un intervalo de pH 3.0 a 7.0. Se observó que la producción máxima de β -glucosidasa fue 3.1 U/ml en el medio a pH 5,0 a las 96 h en un medio suplementado con 1% de polvos de celulosa. *P. funiculosum* NCL1 es capaz de producir β -glucosidasa en un intervalo de niveles de pH; sin embargo, el pH 5.0 fue óptimo. La producción de β -glucosidasa fue óptima en el intervalo de pH de 5,0 a 6.5 para *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp (Elyas *et al.*, 2010; Menon *et al.*, 1994; Ng *et al.*, 2010).

En un estudio realizado por Vetrovsky *et al.*, (2013), la enzima purificada mostró un nivel alto de actividad contra PNPG a lo largo de un intervalo de pH relativamente amplio (4.0-6.0) con la actividad más alta detectada entre pH 4.5 y 5.0. De igual forma, el pH óptimo determinado con PNPGAL como sustrato, fue pH 5.0, y el pH óptimo para la enzima empleando pNPX como

sustrato, fue de 6.0. Cuando se utilizaron PNPC y PNPM como sustratos, el pH óptimo fue más ácido (3.5 y 4.0 respectivamente).

De acuerdo a Tiburcio *et al.*, (2010), la mayoría de los estudios realizados en *M. royeri* son descriptivos y carentes de bases bioquímicas necesarias para entender el mecanismo y desarrollo de la necrosis de la mazorca de cacao.

Por lo anterior, Meinhardt *et al.*, (2014) realizó un estudio del genoma de *M. royeri* y un análisis de expresión que proporciona información sobre los mecanismos moleculares de las fases biotrófica y necrotrofica de este importante patógeno hemibiotrófico. Estos resultados apoyan el modelo de la patogénesis existente para la FPR causado por *M. royeri*, mientras que da mayores detalles sobre la identidad de las proteínas putativas secretadas que intervienen en las distintas etapas, y la información sobre el uso diferencial de los miembros únicos de las familias de genes complejos.

La actividad enzimática de la β -glucosidasa determinada en *M. royeri* MROCP, es congruente con lo reportado por Gi-Woong *et al.*, (2013), quienes determinaron en *Penicillium aculeatum* KCTC 6245 el comportamiento del pH sobre la actividad de la enzima β -glucosidasa, identificada como una glicosil hidrolasa de la familia 3. El intervalo de pH ensayado fue de 3 a 6.5, encontrando un pH óptimo de 4.5 para la actividad enzimática de β -glucosidasa. A pH de 3,5 y 6,0, la actividad detectada fue aproximadamente el 50% de la actividad máxima obtenida a pH óptimo. La actividad de β -glucosidasa de la cepa MROCP de *M. royeri* medida en este trabajo fue ensayada a pH 5.0 en un sistema de regulador de acetato de sodio, alcanzando niveles máximos de 332.6 y 27.6 U mg⁻¹ de proteína total con BCA y CCA, respectivamente. Los resultados mencionados anteriormente, son significativos, comparado a los niveles reportados en otros hongos (Cuadro 5).

Por otra parte Karnchanatat *et al.*, (2007), determinaron la influencia del pH sobre la actividad de β -glucanasa a partir de *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.: Fr). Los autores reportaron que el pH óptimo de la actividad de β -glucosidasa fue de 5.0. Este comportamiento es similar a lo reportado para otras β -glucosidasa de otras especies del género *Aspergillus* (Yan y Lin, 1997; Riou *et al.*, 1998). La enzima fue bastante estable en un intervalo de pH 5,0 a 8,0, conservando el 85% de actividad máxima. Sin embargo, la enzima mostró ser sensible a pH menor a 4.0 dado que pierde actividad a pH 3.0. Inversamente, se encontró que es una enzima muy estable a pH alcalino y neutro pudiendo reterner hasta el 75% de la actividad a pH 9.0.

En el 2001, Decker *et al.*, reportaron la purificación de cuatro distintas β -glucosidasa a partir de *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92. Las enzimas purificadas mostraron alta diversidad con respecto al pH, temperatura óptima y estabilidad, así como la especificidad del sustrato y tolerancia a la glucosa. La β -glucosidasa I, dominante, preferentemente hidroliza oligosacáridos. La β -glucosidasa II es estable al ácido y termotolerante, hidroliza aril y terpenil β -D-glucosidos así como 1-O-trans-cinnamoil β -D-glucosidos. En contraste a las β -glucosidasas I y II, las β -glucosidasas III y IV, minoritarias, fueron encontradas ser enzimas tolerantes a la glucosa; con constante de inhibición de 470 y 600 mM, respectivamente. El perfil de pH de las β -glucosidasas III y IV mostró pH óptimo, amplio e idéntico, entre 4 y 6, con máximo a pH 5.0. Más del 80% de la actividad máxima fue mantenida a pH 4.0 y 6.0. La β -glucosidasa I, reveló un pH óptimo definido a 4.6, rápidamente disminuyó al 60% de actividad máxima a pH 4 y 5.5. A pH 7.0 y 3.0 la cantidad de actividad residual fue de 5% y 17%, respectivamente. Su pH óptimo fue idéntico a aquellos determinados para las β -glucosidasa de *A. niger* (Hoh *et al.*, 1992) y *A. ornatu*s (Yeoh *et al.*, 1986). En resumen, muchas β -glucosidasa de hongos estudiadas muestran pH óptimo de actividad en el intervalo de 5.0 a 6.5 (Bhatia *et al.*, 2002). Lo anterior sugiere que al igual que en otros hongos filamentosos, la actividad máxima de β -glucosidasa en *M. roreri* MROCP pudiera encontrarse a pH 5.0 o próximo.

En el análisis de las actividades enzimáticas encontradas en el estudio realizado por Camassola y Dillon (2007), se puede concluir que la producción de la actividad de papel filtro (filter paper activity, FPA), endoglucanasas, β -glucosidasas y xilanasas se ve favorecida en FES con medios formulados utilizando mezclas de BCA pretratado y salvado de trigo. Por lo tanto, estos sustratos son fuentes alternativas viables para la producción de enzimas por cepas del hongo *P. echinulatum*. También se encontró que una enzima dada del complejo de celulosa puede ser inducida, simplemente alternando la proporción de sustratos en el medio de cultivo.

No siempre es posible comparar las β -glucosidasas, endoglucanasas y xilanasas reportados en la literatura, debido a la falta de métodos estándar para determinar la actividad de cada una de estas enzimas (Camassola y Dillon, 2007) y homogeneidad en las unidades de medida empleadas para expresar la actividad enzimática (U gdm⁻¹, Unidades por gramo de medio seco; U mg⁻¹, Unidades por miligramo de proteína total). El cuadro 5 muestra los resultados de algunos estudios realizados con diferentes sustratos inductores para la producción de la enzima β -glucosidasa.

De acuerdo a los resultados presentados en el cuadro 5, las actividades enzimáticas de β -glucosidasa encontradas para *M. roreri* son altas, comparados con muchas investigaciones, siendo el BCA el mejor inductor sobre el CCA.

Cuadro 5. Comparación de la producción de β -glucosidasa de diferentes hongos crecidos en materiales lignocelulósicos.

Hongo	Sustrato	β -glucosidasa (U mg ⁻¹ proteína total)	Referencia
<i>M. roreri</i>	BCA	332.69	Este trabajo
<i>M. roreri</i>	CCA	27.66	Este trabajo
<i>A. japonicus</i>	BCA	4.48	Marcio <i>et al.</i> , 2014
<i>P. piceum</i>	Rastrojo de maíz	9.20	Gao <i>et al.</i> , 2013
<i>L. ramosa</i>	Salvado de trigo	17.26	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>A. niger</i>	Rastrojo de maíz	0.30	Han and Chen, 2008
<i>M. sp</i>	Paja de arroz	2.47	Kaur <i>et al.</i> , 2007
<i>T. citrinoviride</i>	<i>Lantana camara</i>	3.07	Chandra <i>et al.</i> , 2014
<i>P. decumbens</i>	Residuo de mazorca de maíz	0.40	Mei <i>et al.</i> , 2010
<i>P. adiposa</i>	Paja de arroz	16.00	Sujit <i>et al.</i> , 2013
<i>T. indicae-seudaticae</i>	Harina de soya	2.35	De Cassia <i>et al.</i> , 2014
<i>T. indicae-seudaticae</i>	Paja de trigo	1.83	De Cassia <i>et al.</i> , 2014
<i>P. funiculosum</i>	BCA	2.26	Noboyuki <i>et al.</i> , 2013
<i>P. echinulatum</i>	BCA y Salvado de trigo	58.95	Camassola and Dillon, 2007

En el hongo *P. echinulatum*, se encontraron los niveles altos de actividades de endoglucanasa y β -glucosidasa, empleando BCA delignificado, comparado con los niveles reportados para otros hongos. Sin embargo, las actividades de xilanasas obtenidas por este hongo, mostró niveles bajos. Los autores sugieren que el BCA debe ser empleado sin tratamiento previo, es decir, BCA lignificado y de esta forma, evitar la pérdida de la hemicelulosa. Durante el pretratamiento del BCA, posterior a la esterilización, el sustrato fue lavado con hidróxido de sodio para remover la lignina, sin embargo, parte de la hemicelulosa se perdió (Camassola y Dillon, 2007).

Por lo anterior, es posible que en el presente trabajo, las actividades de β -glucosidasas ensayadas con BCA delignificado, hayan sido alteradas, dando lugar a niveles más altos de actividad enzimática y/o expresión temprana de la β -glucosidasa, así como de todas las enzimas que conforman el sistema celulolítico.

De acuerdo a los resultados publicados, el hongo *P. echinulatum* contiene todas las enzimas del complejo de celulosa y también secreta xilanasas, además la enzima β -glucosidasa presentó buena estabilidad térmica a 50°C (Camassola *et al.*, 2004; Camassola y Dillon, 2007).

De forma similar, Sánchez-Sánchez *et al.*, (2011) ha reportado que *M. roreri* produce las enzimas del complejo celulolítico endoglucanasa, exoglucanasa (comunicación personal) y β -glucosidasa, así mismo, el análisis del genoma de este hongo, ha mostrado que contiene genes codificantes de todas las enzimas del sistema celulolítico (endo-1,3(4)- β -glucanasa, exo-1,3- β -glucanasa y β -

glucosidasa), además de genes codificantes de otras enzimas glicósil hidrolasas. Las actividades enzimáticas de endo-1,3(4)- β -glucanasa, exo-1,3- β -glucanasa y β -glucosidasa de *M. roreri*, también presentan buena estabilidad térmica a 50°C, siendo una característica valiosa para su aplicación en procesos tales como la hidrólisis enzimática de la celulosa y lignocelulosa para la producción de jarabe de glucosa, la formulación de detergentes la suplementación de alimentos para el ganado, la extracción de los jugos de frutas y vegetales, manufactura de la pulpa y el papel, procesamiento de almidón, procesamiento de textiles y la producción de etanol.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que la mayor actividad de β -glucosidasa fue detectada en los medios formulados con BCA, además de la composición del BCA, este hecho podría ser favorecido por una mayor aireación de estos cultivos. De manera similar a los resultados observado por Camassola y Dillon (2007), la mayor compactación observada del medio de cultivo formulado con CCA, podría haber dificultado la transferencia de oxígeno y por lo tanto disminuir el desarrollo de la masa fúngica y consecuentemente la actividad enzimática.

Según Poorna y Prema (2007), el tamaño de las partículas de salvado de trigo influye en la producción de enzima y biomasa. Esta influencia se debe a la aglomeración de las partículas que podrían inhibir la transferencia de oxígeno. La adherencia y penetración de microorganismos, así como la acción de las enzimas, dependen de las propiedades físicas del sustrato, tales como su naturaleza amorfa y cristalina, el área de la accesibilidad, la superficie, área, porosidad, tamaño de partícula, etc. (Krishna, 2005). Por otro lado, se considera el contenido de celulosa y hemicelulosa en el sustrato inductor, pueden influir en los niveles de actividad enzimática detectados. Según Binder y Raines, (2009), el contenido de celulosa y hemicelulosa corresponde al 52.7 y 17.5 % para BCA; y de acuerdo a Marina y García (2012), 17.39 y 6.38 % en CCA, respectivamente. Lo anterior, explica el hecho de que la enzima haya sido mejor expresada en medios conteniendo BCA como sustrato inductor que el CCA.

Se ha reportado que la mezcla de sustratos hace más disponible los nutrientes para el desarrollo del micelio y la presencia de sustancias inductoras para la producción de enzima. En *Fomes sclerodermeus*, la mezcla de sustratos (salvado de trigo/soja 1: 1) indujo la producción de niveles más altos de hidrolasas, (Papinutti y Forchiassin, 2007). De igual forma, con *T. reesei*, las actividades enzimáticas fueron generalmente más altas durante el crecimiento del hongo con mezclas de sustratos, comparado a las obtenidas con un solo sustrato (Olsson *et al.*, 2003).

El uso de materiales lignocelulósicos tales como BCA y BCA pretratado, para la producción de enzimas celulasas, da ventajas en comparación con una fermentación sumergida: alta producción de enzimas utilizando un medio de bajo costo (Viniestra-González *et al.*, 2003) y el posible uso de sustratos bioconvertidos por su digestibilidad incrementada (Mukherjee and Nandi 2004).

Con estos resultados, se acepta la hipótesis planteada; *Moniliophthora roreri* es capaz de producir la enzima extracelular β -glucosidasa inducido con bagazo de caña de azúcar (BCA) y cáscara de cacao (CCA) como sustratos mediante una fermentación en estado sólido (FES) es verdadera. Por el momento, no hay reportes de estudios sobre el comportamiento de *M. roreri* cultivado en una FES empleando sustratos inductores de enzimas del complejo celulolítico, por lo que esta investigación constituye el primer reporte de la expresión y presencia de genes codificantes de esta enzima en *M. roreri*.

El presente trabajo prepara el escenario para investigaciones detalladas de esta enzima, como purificación y caracterización bioquímica, cristalografía de rayos X, expresión heteróloga y estudios de ingeniería de proteínas, entre otros.

IV. IV CONCLUSIONES

1.- *Moniliophthora roreri* es capaz de producir la enzima β -glucosidasa inducido con bagazo de caña de azúcar (BCA) y cáscara de cacao (CCA) como sustratos mediante una fermentación en estado sólido (FES).

2.- De acuerdo al contenido de celulosa y hemicelulosa, condiciones de aereación del medio de cultivo, el BCA resultó ser el mejor inductor para la producción de β -glucosidasa a partir de *M. roreri* cultivado bajo FES, que en CCA.

3.- La incorporación de fuentes accesibles y de bajo costo, tales como el BCA y CCA, en el medio de cultivo para la producción de enzimas del complejo celulolítico, podría contribuir a una disminución de los costos de producción de complejos enzimáticos con capacidad para hidrolizar residuos lignocelulósicos para la obtención de jarabes fermentados, que podrán ser utilizados en la producción del etanol.

IV.V LITERATURA CITADA.

- Aro N., Saloheimo A., Ilmén M., Penttilä M. 2001. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem*. 276: 24309-24314.
- Barazarte H., Sangronis E., Unai E. 2008. La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. *Arch Latinoam Nutr*. 58: 64-70.
- Barros N., O. 1975. Influencia del pH en el crecimiento del hongo *Monilia roleri* Cif. & Par. *Noticias Fitopatológicas*. 4:78-88.
- Bhatia Y., Mishra S., Bisaria V., S. 2002. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 22: 375-407.
- Binder J., B., Raines R., T. 2009. Simple chemical transformation of lignocellulosic biomass into furans for fuels and chemicals. *J Am Chem Soc*. 131: 1979-85.
- Camassola M., Bittencourt L., R., Shenem N., T., Andreus J., Dillon A., J., P. 2004. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. *Biocatal Biotransformation* 22, 391-396.
- Camassola M., and Dillon A., J., P. 2007. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *J. Appl. Microbiol*. 103: 2196-2204.
- Camassola M., and Dillon A., J., P. 2009. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Industrial Crops and Products*. 29: 642-647.
- Chandel A., K, Chandrasekhar G., Silva M., B., Da Silva S., S. 2012. The realm of cellulases in biorefinery development. *Crit Rev Biotechnol*. 32 (3): 187-202.
- Chandra M., Kalra A., Sangwan N., S., Sangwan R., S. 2013. Biochemical and Proteomic Characterization of a Novel Extracellular β -Glucosidase from *Trichoderma citrinoviride*. *Mol Biotechnol*. 53: 289-299.
- Chauve M., Mathis H., Huc D., Casanave D., Monot F., Ferreira N. 2010. Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases. *Biotechnol. Biofuels* 3: 1-8.
- Chundawat S., Beckham G., Himmel M., Dale B., Prausnitz J. 2011. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng*. 2: 121-145.
- Decker C., H., Visser J., Schreier P. 2001. β -Glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four β -glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol*. 55: 157-163.
- De Cassia J., P., Ribeiro L., Alves P., Bocchini M., D., Gomes E., Da Silva P. 2014. Production and characterization of β -glucosidase obtained by the solid-state cultivation of the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Appl Biochem Biotechnol*.
- Elyas K., K., Mathew A., Sukumaran R., K., Ali P., P., Sapna K., Kumar S., R., Mol K., R. 2010. *New Biotechnology*. 27: 347-351.
- Fengel D., and Wegener G. 1984 *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter De Gruyter.
- Figuiera A., Janick J., BeMiller J., N. 1993. *New products from Theobroma cacao: Seed Pulp and Pod Gum*. New Crops. Wiley, New York. 475-478.
- Gao L., Gao F., Zhang D., Zhang C., Wu G., Chen S. 2013. Purification and characterization of a new β -glucosidase from *Penicillium piceum* and its application in enzymatic degradation of delignified corn stover. *Bioresource Technology*. 147: 658-661.
- Gi-Woong L., Mi-Hyun Y., Kyung-Cheol S., Kyung-Rok K., Yeong-Su K., & Ki-Won L., Deok-Kun O. 2012. β -Glucosidase from *Penicillium aculeatum* hydrolyzes exo-, 3-O-, and 6-O- β -glucosides but not 2-O- β -glucoside and other glycosides of ginsenosides. *Appl Microbiol Biotechnol*. DOI.
- Gonçalves F., A., Ribeiro R., S., Rodrigues A., Sanjinez A., E., J., Fonseca G., G. 2013. Isolation, identification and characterization of a novel high level β -glucosidase producing *Lichtheimi aramosa* strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2:377-384.
- Gurusamy R., Balasubramanian M., Chinnathambi V., Mala R., Paramasamy G. 2012. Production, Purification, and Characterization of a β -Glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. *Appl Biochem Biotechnol*. 167: 959-972.
- Han Y., and Chen H. 2008. Characterization of β -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology* 99: 6081-6087.
- Hendriks A., T., W., M., and Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*. 100 (1): 10-18.

- Herrera-Murillo F., A., Galindo J., J., Ramírez-Martínez C. 1988. Growth and sporulation of *Moniliophthora roreri* under different incubation temperatures, photoperiods and pH of the media. *Phytopathological Society*. 80: 514-590.
- Holker U., Hofer M., Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64 (2):175-86.
- Hoh Y., K., Yeoh H., H., Tan T., K. 1992. Properties of β -glucosidase purified from *Aspergillus niger* mutants USDB 0827 and USDB 0828. *Appl Microbiol Biotechnol*. 37: 590-593.
- Ilmen M., Saloheimo A., Onnela M., L., Penttilä M., E. 1997. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*,” *Applied Environmental and Microbiology*. 63: 1298-1306.
- Ito K., Nakamura Y., Tokunaga T., Iijima D., Fukushima K. 2003. Anti-cariogenic properties of a water-soluble extract from cacao. *Biosci Biotechnol Biochem*. 67: 2567-2573.
- Jha K., Khare S., K., Gandhi A., P. 1995. Solid-state fermentation of soyhull for the production of cellulase. *Bioresour Technol*. 54 (3): 321-2.
- Kachlishvili E., Penninckx M., J., Tsiklauri N., Elisashvili V. 2005. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World J Microbiol Biotechnol*. 22 (4): 391-7.
- Karnchanatit A., Petsom A., Sangvanich P., Piaphukiew J., Whalley A., Colin D., R., Sihanonth P. 2007. Purification and biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrens.:Fr.) Rehm. DOI:10.1111/j.1574-6968.
- Kaur J., Bhupinder S., Chadha B., Kumar A., Kaur G., S., Saini H., S. 2007. Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN. 0717-3458.
- Krishna C. 2005. Solid-state fermentation Systems-an overview. *Crit Rev Biotechnol*. 25: 1-30.
- Lipa J., J., and Slizynsky K. 1973. Wskazówki metodyczne I. Terminologia do wyznaczenia sredniej dawki smiertelnej (LD₅₀) W Patologia Owadów I Tksykologia. *Prace Navkome Instytutu ochrony Roslin* Tom. XV, Seszyti. 59-83.
- Liu Z., L., Weber S., A., Cotta M., A. 2012. Isolation and characterization of a β -glucosidase from a *Clavispora* strain with potential applications in bioethanol production from cellulosic materials. *Bioenergy Res*. 6: 65-74.
- Lowry O., H., Rosebrough N., J., Farr A., L., Randall R., J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193: 265-275.
- Lynd L., Weimer P., Zyl V., W., Pretorius I. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 66: 506-577.
- Marcio T., Costa P., B., Rodrigues J., C., Lima M., S., Jorgea J., A., José Manuel Guisand J., M., Polizeli M. 2014. Immobilization and high stability of an extracellular β -glucosidase from *Aspergillus japonicus* by ionic interactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 104: 95-100.
- Marina L., B., García C., N., A. 2012. Obtención y caracterización de fibra dietaria a partir de cascarilla de las semillas tostadas de *Theobroma cacao* L. de una industria chocolatera colombiana. [Tesis]. Universidad Tecnológica de Pereira Facultad de Tecnologías Escuela de Química Pereira.
- Mei C., Yuqi Q., Ziyong L., Kai L., Fengshan W., Yinbo Q. 2010. Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme and Microbial Technology*. 46: 444-449.
- Meinhardt L., W., Lacerda C., G., Thomazella P., T., D., Teixeira P., J., Falsarella C., M., Schuster C., S., Carlson J., E., Guiltinan M., J., Mieczkowski P., Farmer A., Ramaraj T., Crozier J., Davis R., E., Shao J., Melnick R., L., Pereira G., A., G., Bailey B., A. 2014. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. *BMC Genomics*. 15:164.
- Menon K., Rao K., K., Pushalkar S. 1994. *Indian Journal of Experimental Biology*. 32: 706-709.
- Mukherjee R., Nandi B. 2004. Improvement of in vitro digestibility through biological treatment of water hyacinth biomass by two *Pleurotus* species. *International Biodeter Biodeg*. 53: 7-12.
- Ng I., S., Li C., W., Chan S., P., Chir J., L., Chen P., T., Tong C., G., Yu S., M., Ho T., H., D. 2010. *Bioresour Technol*. 101: 1310-1317.
- Nobuyuki M., R., Araújo B., C., Melo S., L., Pereira N. 2013. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *Journal of Biotechnology* 163: 38-44.
- Oddyoye E., Rhule S., Agente-Badu K., Anchirinah V., Ansah F. 2010. Fresh cocoa pod husk as an ingredient in the diets of growing pigs. *Sci Res Essays*. 5: 1141-1144.

- Olsson L., Christensen T., M., I., E., Hansen K., P., Palmqvist E., A. 2003. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb Technol.* 33: 612-619.
- Olubamiwa O., Otun A., Longe O. 2002. Dietary inclusion rate of cocoa husk for starter cockerels. *Lnt J Poult Sci.* 1: 133-135.
- Osawa K., Miyazaki K., Shimura S., Okuda J., Matsumoto M., Ooshima T. 2001. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. *J Dent Res.* 80: 2000-2004.
- Padrón G., Romero G., Benavides A., Ramírez H., Maiti R. 2003. *Crop Research.* 2: 291-302.
- Padrón G., Arias E., Romero J., Benavides A., Zamora J., García S. 2004. Efecto de la cáscara de cacao en la obtención de espumas de poliuretano para uso hortícola. Propiedades físicas y de biodegradabilidad. *Rev Soc Quím Méx.* 48: 156-164.
- Papinutti V., L., Forchiassin F. 2007. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *J Food Eng.* 81: 54-59.
- Phillips-Mora W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao fungus *Moniliophthora roreri* as determined using molecular, phytopathological and morphophysiological evidence, doctoral dissertation. University of Reading, Reading, UK. 349.
- Poorna C., A., Prema P. 2007. Production of cellulase free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in waste paper recycling. *Bioresour Technol.* 98: 485-490.
- Riou C., Salmon J., M., Vallier I., Z., Gunata Z., Barre P. 1998. Purification, characterization and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64: 3607-3614.
- Samsuri M., Gozan M., Mardias R., Baiquni M., Hermansyah H., Wijanarko A. 2007. Utilization of cellulose from sugarcane bagasse to produce ethanol via simultaneous saccharification and fermentation using xylanase (in Bahasa Indonesia). *MakaraTeknologi.* 11: 17-24.
- Sánchez-Sánchez H. 2011. Determinación de la actividad enzimática extracelular de endo-1,3(4)- β -glucanasa y amplificación de genes endo-1,3(4)- β -glucanasa a partir de *moniliophthora roreri*. [Tesis]. Colegio de Postgraduados.
- Shrestha P., Khanal S., K., Pometto A., L., VanLeeuwen J. 2010. Ethanol production via in situ fungal saccharification and fermentation of mild alkali and steam pretreated corn fiber. *Bioresour Technol.* 101 (22): 8698-705.
- Singhania R., R., Sukumaran R., K., Patel A., K., Larroche C., Pandey A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzym Microb Tech.* 46 (7): 541-9.
- Singhania R., R., Patel A., K., Sukumaran R., K., Larroche C., Pandey A. 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 127: 500-507.
- Sujit S., J., Saurabh S., D., Tae-Su K., Jinglin L., Yun C., K., Jung-Kul L. 2013. Characterization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Pholiota adiposa* and its application to the hydrolysis of biomass. *Biomass and bioenergy.* 54: 181-190.
- Sun J., Sun X., Zhao H., Sun R. 2004. Isolation and characterization of cellulose from sugar cane bagasse. *Polym Degrad Stabil.* 84: 331-339.
- Tengerdy R. 1996. Cellulase production by solid substrate fermentation. *J Sci Ind Res.* 55: 313-316.
- Tewalt J., Schilling J. 2010. Assessment of saccharification efficacy in the cellulase system of the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86 (6): 1785-93.
- Tiburcio R., A., Lacerda C., G., G., Falsarella C., M., Costa M., J., M., Schuster S., C., Carlson J., E., Gultinan M., J., Bailey B., A., Piotr M., P., Lyndel W., Meinhardt L., W., Guimaraes P., G., C. 2009. Genes Acquired by Horizontal Transfer Are Potentially Involved in the Evolution of Phytopathogenicity in *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri*, two of the major pathogens of Cacao. *J. Mol. Evol.* 70: 85-97.
- Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar C., N., Rómero-Gómez S., J., Diaz-Godínez G., Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J.* 13: 157-167.
- Vetrovsky T., Baldrian P., Gabriel J. 2013. Extracellular Enzymes of the White-Rot Fungus *Fomes fomentarius* and Purification of 1, 4- β -glucosidase. *Appl Biochem Biotechnol.* 169: 100-109
- Wan L., Y., Teck N., A., Gek C., N., Adeline S., M., C. 2014. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and bioenergy* 6 7: 319-338.

- Yan T., R., Lin Y., H. 1997. Purification and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. *Biosci Biotechnol Biochem.* 61: 965-970.
- Yeoh H., H., Tan T., K., Koh S., K. 1986. Kinetic properties of β -glucosidase from *Aspergillus ornatus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 25: 25-28.

CAPÍTULO V

ANÁLISIS *in silico* DE GENES DE β -GLUCOSIDASA DE *Moniliophthora roreri*.

V.I INTRODUCCIÓN.

Las β -glucosidasas son conocidas por ser el grupo más grande de enzimas en las familias glicosil hidrolasa (GH) y se enumeran en familias: GH1, GH3, GH5, GH9, GH30, y GH116 (Henrissat, 1991; Opassiri *et al.*, 2007; Cantarel *et al.*, 2009). La familia 3 contiene β -glucosidasas y hexosaminidasas de hongos, bacterias, y de vegetales. Las enzimas de ambas familias hidrolizan celodextrinas y celobiosa a glucosa con la retención neta de la configuración anomérica, a través de dos pasos, que implican un mecanismo de doble desplazamiento de residuos de ácidos carboxílicos claves en el sitio activo: Glu/Asp (Rye and Withers, 2000).

Los genes de enzimas celulolíticas de hongos pueden ser regulados de varias maneras, por ejemplo, expresión constitutiva a un nivel básico, fuerte inducción y represión catabólica. Dado que la celulosa es un sustrato complejo insoluble, los investigadores explican su capacidad para inducir los genes de enzimas celulolíticas por un nivel constitutivo de producción de celulasas, permitiendo la liberación de pequeños oligosacáridos que pueden entrar en las células e inducir la expresión del gen. De este modo, el inductor producido entra en la célula y asegura la transcripción del gen de la celulasa, mediada por una proteína activadora y la activación de elementos tales como el elemento de activación de *cbh2* (CAE) en *Hypocrea jecorina* (anamorfo *T. reesei*) (Saloheimo *et al.*, 2000; Zeilinger *et al.*, 2001).

En la última década, los métodos *in silico* confiables han sido desarrollado y utilizado para identificar regiones codificantes de proteínas (Matsuzaki *et al.*, 2009; Segura *et al.*, 2012; Van Haagen *et al.*, 2011). El creciente número de factores de virulencia y datos de la secuencia del genoma permite la eficiente identificación *in silico* de los genes de virulencia (Chen *et al.*, 2012). El desarrollo reciente de herramientas de comparación *in silico*, servidores web y bases de datos utilizan los datos de secuenciación de alto rendimiento de los genomas para analizar los planos de ADN de especies bacterianas (Chen *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2012; Hemmerich *et al.*, 2010). El análisis comparativo de las secuencias de un genoma para estudiar las características genéticas globales es una tecnología fundamental en la genómica (Khorshidi and Hassani, 2013; Kurokawa *et al.*, 2013; Langille *et al.*, 2008).

El genoma de *M. royeri* ha sido completamente secuenciado y la información genómica está disponible. Las herramientas computacionales proporcionan nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares de las fases biotróficas y necrotroficas de este importante patógeno hemibiotrófico. El análisis RNA-Seq revela la expresión diferencial de genes de la fase biotrófica y necrotrofica de *M. royeri* durante el desarrollo de la FPR del cacao. En este estudio, nosotros identificamos y analizamos la secuencia de ADN de genes codificantes de enzimas β -glucosidasa pertenecientes a la familia 1 y 3 de glicosil hidrolasas identificadas en el genoma de *M. royeri*, usando métodos *in silico* (Meinhardt *et al.*, 2014; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Lo anterior, con la finalidad de correlacionar la actividad enzimática de β -glucosidasa detectada *in vitro* con las características bioquímicas predichas los genes analizados.

V.II MATERIALES Y MÉTODOS.

V.II.I Análisis *in silico* de secuencias β -glucosidasa registradas en el Genbank.

Las secuencias de ADN de genes codificantes de enzimas β -glucosidasas de *M. royeri* fueron obtenidas en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. El análisis *in silico* fue realizado usando varios softwares. La secuencia de nucleótidos fue traducida a la secuencia de aminoácidos utilizando el servidor Translate proporcionado en <http://web.expasy.org/translate/>. La predicción del número total de aminoácidos, composición atómica, peso molecular (PM), punto isoeléctrico (*pI*), coeficiente de extinción, vida media, índice alifático, índice de inestabilidad y el promedio general de hidropaticidad (Grand average of hydropathicity; GRAVY), se determinaron empleando el software ProtParam disponible en el sitio web <http://web.expasy.org/protparam/>. El valor del índice de adaptación de codones (Codon Adaptation Index: CAI), fue calculado introduciendo las secuencias en el servidor EMBOSS.cai situado en el sitio web http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cai?_pref_hide_optional=1. La predicción de las secuencias motifs (secuencias de aminoácidos específicas dentro de una proteína), fue determinada empleando InterProScan 5, disponible en el sitio web <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>. La predicción de la localización subcelular de la proteína predicha codificada, se determinó usando el servidor PSORT II (Prediction of protein sorting signal and localization sites in amino acid sequences) disponible en la dirección electrónica <http://www.genscript.com/psort/psort2.html>. La predicción de sitios de fosforilación fue calculado con NetPhosBac 1.0 server situado en <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosBac-1.0/>. Para la predicción de hélices transmembrana de

la proteína se empleo TMHMM Server v. 2.0 situado en <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>. La predicción de la presencia y localización de sitios de división de péptidos señal se realizo con el servidor SignalP 4.1 disponible <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. Las secuencias de aminoácidos de genes β -glucosidasas descritas en hongos y depositadas en la base de datos de la NBCI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se alinearon con las secuencias de aminoácidos de las proteínas β -glucosidasas predichas de *M. royeri*. La búsqueda de homología fue realizada empleando la herramienta BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) contra la base de datos nr (non-redundant; no redundante) del NCBI. Las secuencias produciendo alineamientos significantes con las β -glucosidasas interrogantes, fueron consideradas para el alineamiento múltiple realizado con el software CLUSTALX Versión 2.0.11 (Thompson *et al.*, 1997). Finalmente se contruyó un árbol de similitud con el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analisis) versión 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) utilizando el método de agrupamiento de Neighbor-joining con el índice Poisson (P). Para valorar estadísticamente la significancia de las relaciones presentadas en el filograma, se realizaron 1000 aleatorizaciones tipo “bootstrap”.

V.III RESULTADOS.

La búsqueda de secuencias de genes codificantes de enzimas β -glucosidasa dio lugar a seis secuencias de ADN codificantes de β -glucosidasas pertenecientes a las enzimas glicosil hidrolasa de las familias 1 y 3. Las secuencias seleccionadas derivan de un proyecto de secuenciación shotgun del genoma completo (Whole Genome Shotgun, WGS) de *M. royeri* depositado en EMBL/GenBank/DDBJ con el número de acceso AWSO00000000.

V.III.I Análisis *in silico* de secuencias nucleotídicas de genes β -glucosidasa de *Moniliophthora royeri*.

Las secuencias nucleotídicas con número de acceso GenBank AWSO01000264, AWSO01000050, AWSO01000068, AWSO01000113, AWSO01000688 y AWSO01001286 fueron analizadas.

La secuencia nucleotídica con número de acceso GenBank AWSO01000264, consta de 10 genes. El gen número uno, en orden ascendente, esta identificado como un gen codificante de una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasas de la familia 1; este gen consta de 3005 pb, un CDS de 1638 pb que se traducen en una proteína predicha de 545 aminoácidos y un codón de

terminación (TGA). La secuencia de aminoácidos esta disponible en la base de datos del GenBank con el número de acceso ESK92642 (Figura 9). La predicción de las secuencias motifs indicó dos secuencias firma y un nucleófilo perteneciente a las glicosil hidrolasas de la familia 1 (Cuadro 6). La predicción de la localización subcelular indica que la proteína se localiza en la mitocondria (Cuadro 6). La predicción de dominios transmembranales indica que la proteína no tiene regiones transmembranas, específicamente, no es una proteína integrada a membrana (Figura 10a). El índice de hidropaticidad (GRAVY) de -0.490 clasifica a la proteína hipotética como una proteína hidrofílica, (Cuadro 6). El índice de inestabilidad nos indica que se trata de una proteína estable (Cuadro 6). La predicción de la presencia y localización de sitios de división de péptidos señal, muestra que la proteína predicha es una proteína no secretoria, no contiene péptido señal, por lo que la secuencia completa forma parte de la proteína madura (Figura 10b). La búsqueda de los posibles sitios de fosforilación indicó la presencia de 17 sitios fosforilados, correspondiente a 15 residuos de Serina (Ser) (posiciones 36, 60, 78, 82, 84, 86, 192, 193, 213, 306, 361, 461, 474, 492 y 527) y dos residuos de Treonina (Thr) (posiciones 151 y 388) (Figura 10c). El índice de adaptación de codones (0.712) nos indica que el gen codificante es de alta expresión (Cuadro 6).

```

1      ATGGCCGCTCCTACTATCAAGAAGTTACCGAAAGACTTTATCTGGGGTTTCGCCACCGCGAGTTTCCAAATCGAA
1      M A A P T I K K L P K D F I W G F A T A S F Q I E
76     GGCTCCA CTGATATCGATGGTCGTGGAAAGTCCATTTGGGATGATTTCTCTCGTATTCCTCCGGGAAGGTTATGGAT
26     G S T D I D G R G K S I W D D F S R I P G K V M D
151    GGGCGAAACGGTGATGTTGCTACCGACTCCTACAGACTCTGGAAGGAAGATGTAGACCTTCTCGTTCAATATGGC
51     G R N G D V A T D S Y R L W K E D V D L L V Q Y G
226    GTCAAGTCTTACCGGTTCTCTATTTCTGTTGCGCAATATCCCCCTCGGAGGTCGGGATGACCCTATCAATCCC
76     V K S Y R F S I S W S R I I P L G G R D D P I N P
301    AAAGGAATGAATTTTACTCCAAGTTGATTGATACATTGCTGGAGAGAGGCATCATGCCATTTGTGACCCCTATAC
101    K G I E F Y S K L I D T L L E R G I M P F V T L Y
376    CATTGGGATCTGCCTCAAGCTCTTACGACCGTTACGGTGGCTGGTTGAACAAGGAGGAAATCGTGAAGGATTAT
126    H W D L P Q A L H D R Y G G W L N K E E I V K D Y
451    ACTCGTTATGCCAGGGTATGTTTCGAGGCCTTCGGTGATCGCGTCAAATATTTGGTTGACAAATGAACCCCTGG
151    T R Y A R V C F E A F G D R V K Y W L T M N E P Y
526    TGTATCTCGATCTTGGGTTACGGACGAGGCGTGTTCGCCCTGGGAGGTCGAAGCGACCGTGAACGATCAGCCGAA
176    C I S I L G Y G R G V F A P G R S S D R E R S A E
601    GGTGATGGATTAAGGGAGCCATGGATTGTTGGCCACAGTGTCTTCTCTCACGCAAGCGCGTGAAGGCTTAC
201    G D G L R E P W I V G H S V L L S H A S A V K A Y
676    CGTGAAGACTTTAAGCCGACTCAAGGCGGCCAAATCGGCATCACCCCAACGGTGACTGGCAAGATGCCATACCG
226    R E D F K P T Q G G Q I G I T L N G D W Q M P Y D
751    GACAGCCAGAAAGCATTGAAGCTGCCAGCATGCTCTTGATGTTGCCATTTGGTTGGTTTGCTGACCCGATTTAC
251    D S P E S I E A A Q H A L D V A I G W F A D P I Y
826    CTTGGCCACTACCCCCCTACATGCGCGAATTCCTTGGGCGATCGTTTCCAGAATTCACGCCAGAGGAGCGTGAG
276    L G H Y P P Y M R E F L G D R F P E F T P E E R E
901    CTTGTCAAAGGATCATCTGATTTCTATGGAATGAATACTTACACCACCAACCTCTGTGCTGCGGGAGGTGACGAT
301    L V K G S S D F Y G M N T Y T T N L C R A G G D D
976    GAGTTCAGGGCAATGTCGATTATACATTACCAGCCAGATGGGACCCAAATGGGCGCAAGCTATTGCGCT
326    E F Q G N V D Y T F T R P D G T Q L G T Q A H C A
1051   TGCTACAGGACTATCCCGAAGGATTCGGTTCTCTTGAACCTACCTTGGAAACGATACAAGATGCTATTTAC
351   W L Q D Y P E G F R S L L N Y L W K R Y K M P I Y
1126   GTGACAGAAAACGGTTTCGCACTCAAAGACGAAGACACCCCTTCCCGCGAGGTAGCTCTCAAAGACCATGACCGC
376   V T L E N G E A V K D E D T L P R E V A L K D H D R
1201   GTTCAATACTTACGGGCACGACCGCTGCCCTTCTTAAACGCGGTAGTTGAAGATGGCGTTCGATGTTAGGGCTTAT
401   V Q Y F R G T T A A L L N A V V E D G V D V R A Y
1276   TTCCCTTGGAGTTTGCTGGATACTTTGAATGGGCGGATGGATACGTGACACGCTTTGGTTTGACATACGTGAC
426   F P W S L L D N F E W A D G Y V T R F G L T Y V D

```

1351 TACGACACGCAGGAACGATACCCGAAGGACAGTGCCAAATTCTGGTCAACTGGTTCAAGGAACATTCTCTGAG
451 Y D T Q E R Y P K D S A K F L V N W F K E H S S E
1426 GAGGACACCAAACCTGTCCACCGAACTCGCGCACCAAGTAAGTCTAGCTCTTTTCGAGAGCCCAAGTCCGACG
476 E D T K L V P P K L A H Q V T S S S F E S P S P T
1501 TCCACCGTCCAGGGCTCAGCTACCAGCGGTCGGAGCCCGGCCTTAAAGCTAAGGCAACCGGGACACCCAAGTCT
501 S T V Q G S A T S A S E P G L K A K A T G T P K S
1576 ACCTCGTTGGTGGGAAAATCAAGGCGTACGTGAAACATTGAAAACAGCGAAAGCATGA
526 T S L V G K I K A Y V V K H L K T A K A *

Figura 9. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del gen β -glucosidasa registrado en el GenBank con número de acceso AWSO01000264 de *M. royeri*. La secuencia nucleotídica contiene un gen de 3005 pb que codifica para una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasa familia 1. La región codificante (CDS) consta de 1638 pb traducidas a 545 aminoácidos y codón de terminación (TGA). La secuencia de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos de la región codificante (Número de acceso ESK92642). Los residuos de nucleótidos están numerados en la dirección 5' a 3', con la A del ATG predicho iniciando con metionina dado el número 1. La secuencia de aminoácidos indica 2 secuencias motifs, amino terminal (□), sitio activo (□) y un nucleófilo (□), de las glicosil hidrolasas de la familia 1.

Cuadro 6. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos traducido desde el CDS uno correspondiente a la secuencia AWSO01000264 codificante de una β -glucosidasa predicha de *M. royeri*.

Secuencia consenso del motifs	Posición	Secuencia del motifs	Descripción del motifs
GLYCOSYL_HYDROL_F1_2	13 - 27	FIWGFATASFQIEGS	N-terminal de las glicosil hidrolasas pertenecientes a la familia 1
F-x-[FYWM]-[GSTA]-x-[GSTA]-x-[GSTA](2)- [FYNH]-[NQ]-x-E-x-[GSTA]			
GLYCOSIL_HYDROL_F1_1	374 – 382	IYVTENGFA	Sitio activo de las glicosil hidrolasas pertenecientes a la familia 1
[LIVMFSTC]-[LIVFYS]-[LIV]-[LIVMST]-E- N-G-[LIVMFAR]-[CSAGN]			
ACT_SITE	378	E	Nucleófilo
Número de aminoácidos: 545			
Peso molecular: 61769.3 Da			
Punto isoeléctrico: 5.45			
Número total de residuos de carga negativa (Asp + Glu): 76			
Número total de residuos de carga positiva (Arg + Lys): 63			
Fórmula de composición atómica: C ₂₇₉₉ H ₄₂₀₈ N ₇₃₆ O ₈₂₆ S ₁₂			
Número total de átomos: 8, 581			
Los coeficientes de extinción son en unidades de M ⁻¹ cm ⁻¹ , a 280 nm medido en el agua.			
Los coeficientes de extinción:	Ext. coeficiente 131460		
	Abs 0,1% (= 1 g/l) 2.128, suponiendo que todos los pares de residuos de Cys forman cisteínas.		
	Ext. coeficiente 131210		
	Abs 0,1% (= 1 g/l) 2.124, suponiendo que todos los residuos de Cys se reducen		
La N-terminal de la secuencia considerada es M (Met).			
Vida media estimada:	La vida media estimada: 30 horas (reticulocitos mamíferos, <i>in vitro</i>). > 20 horas (levaduras, <i>in vivo</i>). > 10 horas (<i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i>).		
Índice de Inestabilidad:	El índice de inestabilidad (II) se calcula para ser 30.07 Este clasifica la proteína como estable.		
Índice alifático: 70.86			
Promedio general de hidropaticidad (GRAVY): -0.490			
Índice de adaptación de codones (CAI): 0.712			
Predicción de localización subcelular:	Mitocondrial: 52.2 % Citoplasmática: 30.4 % Nuclear: 8.7 % Peroxisomal: 4.3 % Vacuolar: 4.3 %		

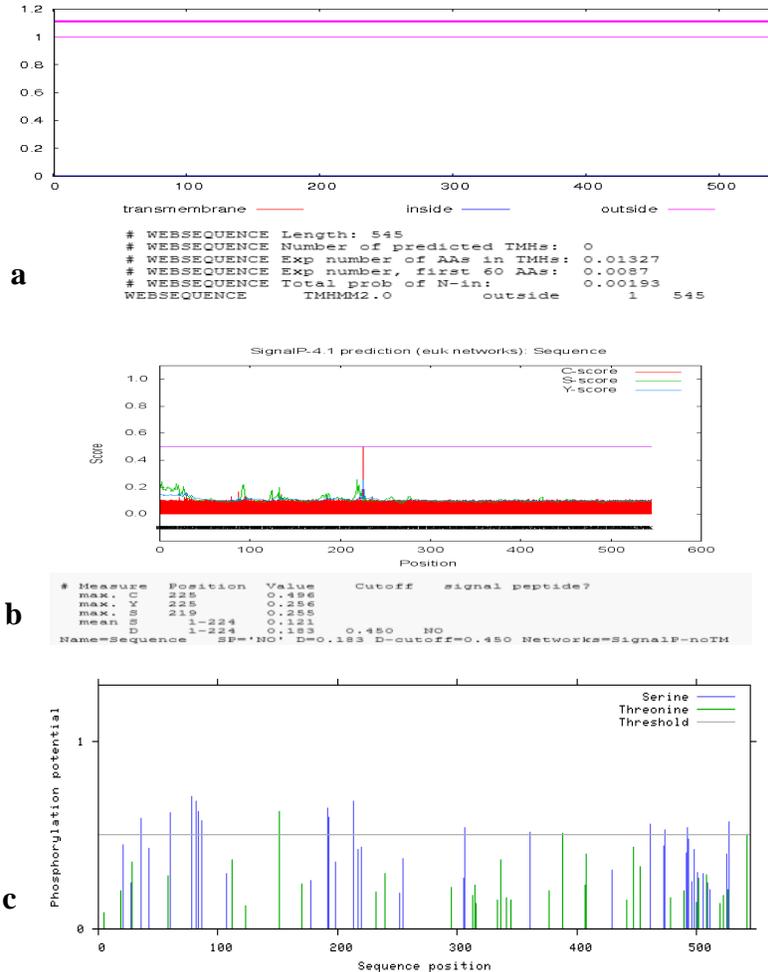


Figura 10. Predicción de dominios transmembranales de la β -glucosidasa de *M. rozeri* con número de acceso GenBank ESK92642, derivada del gen uno de la secuencia con número de acceso GenBank AWSO01000264. (a) La proteína predicha pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 1, consta de 545 residuos de aminoácidos y un codón de terminación (TGA) y no presenta hélices integradas a membranas. (b) Predicción de la presencia y localización del sitio de división del péptido señal en la secuencia de aminoácidos, los resultados muestran que la proteína predicha es no secretoria, no contiene péptido señal, ni sitio de división de la peptidasa señal (SPase 1) I, ni sitio de anclaje, y los aminoácidos forman parte de la proteína madura. (c) En la predicción de sitios posibles de fosforilación, se encontraron 17 sitios de fosforilación, correspondientes a 15 residuos de Serina (Ser) (posiciones 36, 60, 78, 82, 84, 86, 192, 193, 213, 306, 361, 461, 474, 492 y 527) y dos residuos de Treonina (Thr) (151 y 388).

La secuencia nucleotídica con número de acceso GenBank AWSO01000050, consta de 117 genes. El gen número 7, en orden ascendente, está identificado como un gen codificante de una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasas de la familia 1; este gen consta de 2214 pb, una región codificante (CDS) de 1410 pb que se traducen en una proteína predicha de 469 aminoácidos y un codón de terminación (TAA). La secuencia de aminoácidos está disponible en la base de datos

del GenBank con el número de acceso ESK96275 (Figura 11). La predicción de las secuencias motifs indicó dos secuencias firma y un nucleófilo perteneciente a las glicosil hidrolasas de la familia 1 (Cuadro 7). La predicción de la localización subcelular indica que la proteína se localiza en el citoplasma (Cuadro 7). La predicción de dominios transmembranales indica que la proteína no tiene regiones transmembranas, específicamente, no es una proteína integrada a membrana (Figura 12a). El promedio de hidropaticidad (GRAVY) de -0.498 clasifica a la proteína hipotética como una proteína hidrofílica (Cuadro 7). El índice de inestabilidad nos indica que se trata de una proteína estable en la naturaleza (Cuadro 7). La predicción de la presencia y localización de sitios de división de péptidos señal, muestra que la proteína predicha es una proteína no secretoria, no contiene péptido señal, por lo que la secuencia completa forma parte de la proteína madura (Figura 12b). La búsqueda de los posibles sitios de fosforilación indicó la presencia de 13 sitios fosforilados, correspondiente a 11 residuos de Serina (Ser) (posiciones 22, 30, 36, 78, 80, 185, 186, 196, 203, 300 y 318) y dos residuos de Treonina (Thr) (posiciones 102 y 441) (Figura 12c). El índice de adaptación de codones (0.698) nos indica que el gen codificante es de alta expresión (Cuadro 7).

```

1       ATGAAACTGCCCAAAGACTTCCTATTCCGGCTACGCGACTGCGAGTTACCAGATCGAAGGTTCAAGCGACGTCGAT
1       M K L P K D F L F G Y A T A S Y Q I E G S S D V D
76      GGACGAGGGCCATCAATCTGGGACACATTTTCGCATACACCAGGAAAATTTGTTGACGGAACAAACGGCGACGTT
26      G R G P S I W D T F S H T P G K I V D G T N G D V
151     GCGACAGATTCCCTACCAGAGGTGAAAGACGACGTAAGATCGTGAAGGATTACGGCGCAAACGCATATAGGTTTC
51      A T D S Y Q R W K D D V K I V K D Y G A I N A Y R F
226     TCCATCTCGTGGTCTCGAATTATTCCTCTGGGTGGGAAAGACGACCCAGTCAACCCTGAGGGCATAAGATTTTAT
76      S I S W S R I I P L G G K D D P V N P E G I R F Y
301     CGTACGTTGATCGAGGAGCTCTTGAATAATGGCATTACGCCATGCGTGACATTATATCACTGGGACTTACCTCAA
101     R T L I E E L L N N G I T P C V T L Y H W D L P Q
376     GCTCTGCATGACCGATACGGGGCTGGCTTGACAGGCGTGAATCGAGGATTTTGTGCGCTACTGTGAGATCTGT
126     A L H D R Y G G W L D R R V I E D F V R Y C E I C
451     TTTGAGGCATTTGGTAATTCAGTCAAACACTGGATTACCTTTAATGAACCTTGGTGATATATGCCTCGGATAT
151     F E A F G N S V K H W I T F N E P W C I S C L G Y
526     GGATACGGTGTCTTCGCTCCAGGTAGGAGCAGTAATCGCAATCGATCAGAAGCGGGCGATTCTACGCGGGAGCCT
176     G Y G V F A P G R S S N R N R S E A G D S T R E P
601     TGGATAGTGGCACACAACCTTGTGTCTCGCTCATGCCTCGGCCGCTCGCCTCCTACCGACAGAAATTTTGGCCCAGC
201     W I V A H N L L L A H A S A V A S Y R Q K F W P S
676     CAAGCAGGTTCAATTGGAATAACTTTGGACTGTGTTTGGTATATGCCCTACGATGAAAAGTAATGCTGAAGACGTT
226     Q A G S I G I T L D C V W Y M P Y D E S N A E D V
751     GACGCTGCTCAAAGGGCTTTAGATACGCGACTAGGCTGGTTTGCAGACCCGATCTACAAAGGCAATACCCAACT
251     D A A Q R A L D T R L G W F A D P I Y K G H Y P T
826     TCTCTCAAGGCAATGCTCGGAAATCGACTGCCGAGTTCAACACTGAAGAACAAGCCCTTATCAAAGGTTCTGTCG
276     S L K A M L G N R L P E F T T E E Q A L I K G S S
901     GACTTCTTTGGGCTCAACACATACACCAGCAATCTCGTTCAACCCGGAGGCTCGGATGAGTTCAATGGTAAAGTT
301     D F F G L N T Y T S N L V Q P G G S D E F N G K V
976     AAGACTACTCACACTCGAGCTGATGGAAGCTTGGGAAAGCAAGCCCACGTCGCCCTTACAGGCTTACCC
326     K T T H T R A D G S Q L G K Q A H V _ P _ W _ L _ O _ A _ Y _ P _
1051    CCAGGGTTCAGAGCGCTCTTGAATTACTTGTGGAAGACATATGGGAAACCAATCTATGTCCAGGAAATGGCTTT
351     P _ G _ F _ R _ A _ L _ L _ N _ Y _ L _ W _ K _ T _ Y _ G _ K _ P _ I _ Y _ V _ T _ E _ I _ N _ G _ F _
1126    GCTATCAAGGATGAAAACAGACTTCCACCTGAAGACGCGATTACACGACCAAGATCGTGTGATTACTACCGTGGC
376     A _ I _ K _ D _ E _ N _ R _ L _ P _ P _ E _ D _ A _ I _ H _ D _ Q _ D _ R _ V _ D _ Y _ Y _ R _ G _
1201    TACACTAATGCCTTAGCGCACGCTGCCAATGAGGATGGTGTGGACGTCGAAGGCATACTTCGCCTGGAGTCTGCTC
401     Y T N A L A H A A N E D G V D V K A Y F A W S L L

```

1276 GATAACTTTGAATGGGCCGAAGGATATCAAGTTCGATTCGGGGTCACATTTGTTGACTTCGAGACACAGCAACGA
 426 D N F E W A E G Y Q V R F G V T F V D F E T Q Q R
 1351 TATCCTAAGGATTCTTCCAAATTCTTAGCAGAGTGGTACAGGTCGTCGTTGGCGAAGTAA
 451 Y P K D S S K F L A E W Y R S S L A K *

Figura 11. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del gen β -glucosidasa número siete, registrado en el GenBank con número de acceso AWSO01000050 de *M. roleri*. La secuencia nucleotídica contiene un gen de 2214 pb que codifica para una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasa de la familia 1. La región codificante (CDS) consta de 1410 pb traducidas a 469 aminoácidos y un codón de terminación (TAA). La secuencia de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos de la región codificante (Número de acceso GenBank ESK96275). Los residuos de nucleótidos están numerados en la dirección 5' a 3', con la A del ATG predicho iniciando con metionina dado el número 1. La secuencia de aminoácidos indica 2 secuencias motifs, amino terminal (□), sitio activo (┌┐) y un nucleófilo (⋮⋮⋮), de las glicosil hidrolasas de la familia 1.

Cuadro 7. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos traducido desde el CDS siete correspondiente a la secuencia AWSO01000050 codificante de una β -glucosidasa predicha de *M. roleri*.

Secuencia consenso del motifs	Posición	Secuencia del motifs	Descripción del motifs
GLYCOSYL_HYDROL_F1_2	7 - 21	FLFGYATASYQIEGS	N-terminal de las glicosil hidrolasas pertenecientes a la familia 1
F-x-[FYWM]-[GSTA]-x-[GSTA]-x-[GSTA](2)- [FYNH]-[NQ]-x-E-x-[GSTA]			
GLYCOSIL_HYDROL_F1_1	368 - 376	IYVTENGFA	Sitio activo de las glicosil hidrolasas pertenecientes a la familia 1
[LIVMFSTC]-[LIVFYS]-[LIV]-[LIVMST]-E- N-G-[LIVMFAR]-[CSAGN]			
ACT_SITE	372	E	Nucleófilo
Número de aminoácidos: 469			
Peso molecular: 53288.4 Da			
Punto isoeléctrico: 5.45			
Número total de residuos con carga negativa (Asp + Glu): 60			
Número total de residuos con carga positiva (Arg + Lys): 48			
Fórmula de la composición atómica: C ₂₄₁₇ H ₃₅₇₅ N ₆₄₃ O ₇₁₀ S ₉			
Número total de átomos: 7, 354			
Los coeficientes de extinción estan dados en unidades de M ⁻¹ cm ⁻¹ , a 280 nm medido en agua.			
Los coeficientes de extinción:	Ext. Coeficiente = 130095		
	Abs al 0,1% (= 1 g/l) 2.441, asumiendo que todos los pares de residuos de Cys forman cistinas.		
	Ext. Coeficiente = 129720		
	Abs 0,1% (= 1 g/l) 2.434, suponiendo que todos los residuos de Cys estan reducidos		
El extremo N-terminal de la secuencia considerada es M (Met).			
Vida media estimada:	La vida media estimada: 30 horas (reticulocitos mamíferos, <i>in vitro</i>). > 20 horas (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>in vivo</i>). > 10 horas (<i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i>).		
Índice de Inestabilidad:	El índice de inestabilidad (II) calculado es de 28.97 Este clasifica a la proteína como estable.		
Índice alifático: 69.91			
Promedio general de hidropaticidad (GRAVY): -0.498			
Índice de adaptación de codones (CAI): 0.698			
Predicción de la localización subcelular:	Citoplasmática: 34.8 %		
	Nuclear: 30.4 %		
	Mitocondrial: 13.0 %		
	Vacuolar: 13.0 %		
	Extracelular, incluyendo la pared celular: 4.3 %		
Retículo endoplásmico: 4.3 %			

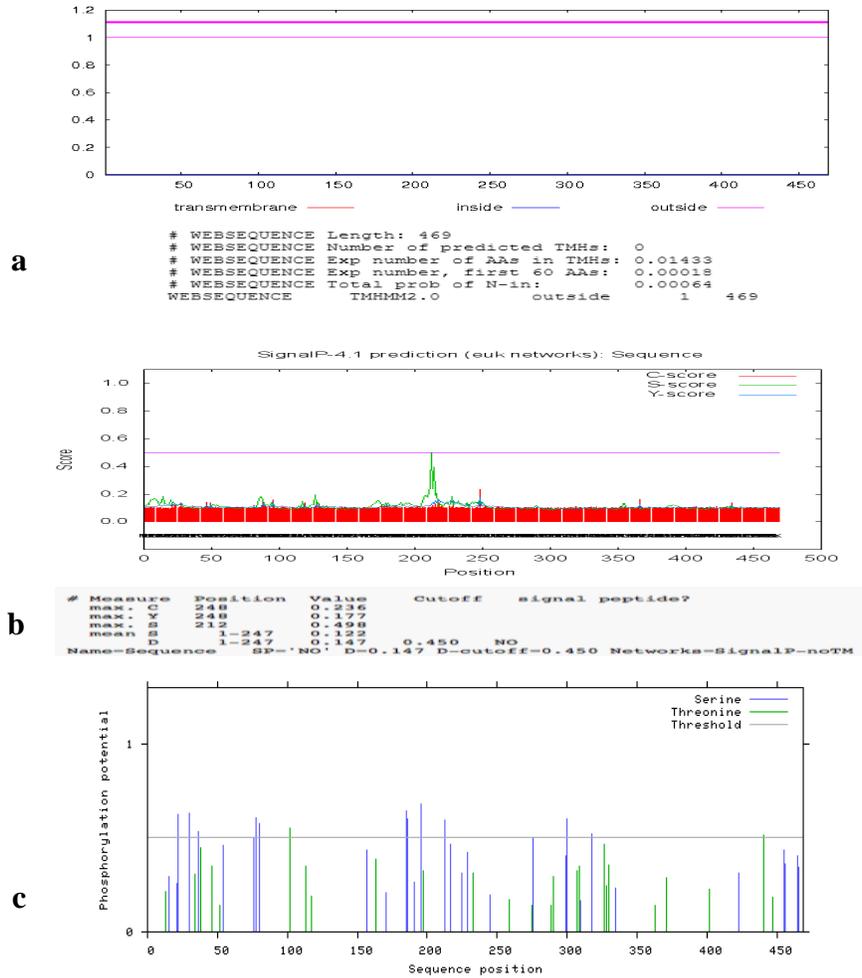


Figura 12. Predicción de dominios transmembranales de la β -glucosidasa de *M. royeri* con número de acceso GenBank ESK96275, derivada del gen siete de la secuencias con número de acceso GenBank AWSO01000050. (a) La proteína predicha pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 1, consta de 469 residuos de aminoácidos y un codón de terminación (TAA) y no presenta hélices integradas a membranas. (b) La predicción fue realizada con los servidores SignalP 3.0 y 4.1. Los resultados muestran que la proteína predicha es no secretoria, no contiene péptido señal, sitio de división de la peptidasa señal (SPase 1) I, ni sitio de anclaje, y todos los aminoácidos forman parte de la proteína madura. (c) En la predicción de sitios posibles de fosforilación, se encontraron 13 sitios de fosforilación, correspondientes a 11 residuos de Serina (Ser) (posiciones 22, 30, 36, 78, 80, 185, 186, 196, 203, 300 y 318) y dos residuos de Treonina (Thr) (posiciones 102 y 441).

La secuencia nucleotídica con número de acceso GenBank AWSO01000068, consta de 41 genes. El gen número 21, en orden ascendente, está identificado como un gen codificante de una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasas de la familia 1; este gen consta de 2627 pb, una región codificante (CDS) de 1743 pb que se traducen en una proteína predicha de 580 aminoácidos y un codón de terminación (TAA). La secuencia de aminoácidos está disponible en la base de datos del GenBank con el número de acceso ESK95676 (Figura 13). La predicción de las secuencias

motif indicó una secuencia firma a las glicosil hidrolasas de la familia 1 (Cuadro 8). La predicción de la localización subcelular indica que la proteína es extracelular. La predicción de dominios transmembranales indica que la proteína tiene una región transmembrana (Figura 14a). El índice de hidropaticidad (GRAVY) de -0.182 clasifica a la proteína hipotética como una proteína hidrofílica, (Cuadro 8). El índice de inestabilidad nos indica que se trata de una proteína inestable en la naturaleza (Cuadro 8). La predicción de la presencia y localización de sitios de división de péptidos señal, muestra que la proteína predicha es una proteína secretoria, contiene un péptido señal de la posición 1-24, un sitio de división de la peptidasa señal I entre la posición 24 y 25: VSS-DS, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 25-469 forman de la proteína madura (Figura 14b). La búsqueda de los posibles sitios de fosforilación indicó la presencia de 14 sitios fosforilados, correspondiente a 13 residuos de Serina (Ser) (posiciones 34, 79, 173, 175, 275, 354, 390, 398, 434, 442, 443, 543 y 567) y un residuo de Treonina (Thr) (posición 61) (Figura 14c). El índice de adaptación de codones (0.681) nos indica que el gen codificante es de alta expresión (Cuadro 8).

```

1      ATGCAGACACAGCTCCCTGGCTTTTCCCGCTTCTCCTATGCCTCTCATGCGCTCTAGCTGGAGTATCCAGTGAC
1      M Q T Q L P G F F P L L L C L S C A L A G V S S D
76     AGCCCGCTGCCGTTACTGGAATTCCTCCCGCCATTGGCACTATCGAGCGAAATATTACC CGGAGAATTG
26     S P L P F T G T S F P A I G T I E R N Y S P E N L
151    GACAAATGTGGGATGTGGTTCGGTACAGTTACAGCACCCCATTCACAACCAGCCTATTCAGAGAAGTACCCGTA
51     D K L W D V V G T V T A P P F T T T P I P E V P V
226    CAACTTCCTTCCACCTCCACCCCTTATCCATCGTGGTTTGCACCCGAACCAAAGGCATCTTACCGGATCTC
76     Q L P S P P P L Y P S W F A P E P K G I L P D L
301    AAGTTTCCCAAGACTTTATCTTTGGAGTTGATACGGTGCCTTTTCAGGTAGAAGGAGCAGTCAAAGATGAAGGG
101    K F P K D F I F G V D T A A F Q V E G A V K D E G
376    AAAGACCGACTATGTGGGATTGGGCTACGCATCAACCAGGTTTCGTTGTGGATAACACAACAGGCGACATTACA
126    K G P T M W D W A T H Q P G F V V D N T T G D I T
451    GACTTGAATACTTCCCTTACAAGAAGATACTGCTAGGGTGCCTGCTCTCGGAGTAAATGCCATTCTTTCTCT
151    D L Q Y F L Y K E D T A R V A A L G V N A H S F S
526    ATTTCTGGGCGAGAATCTTTCCGTTTGGTACGGCCGATTCGCCTGTGAATCAACAAGCTCTCGCCACTACTCT
176    I S W A R I F P F G T A D S P V N Q Q G L A H Y S
601    GATCTGATCGACTACTCTTTGGAATTTGGCGTCGAGCCTGTTGTCACTCTCTTTCACTGGGATATGCCACTCGCA
201    D L I D Y S L E F G V E P V V T L F H W D M P L A
676    TTGCAAGCGTACTACGGCGGGTTCACCTCTGGTTCAATAGTGGCCGATTTTGTGAAGTACGCATAAACAGTATTC
226    L Q A Y Y G G F T S G S I V A D F V N Y A K T V F
751    AGAGCATAACAATGGCAGGGTGAAAACATGGTATACGTTCAACGAACCGCGGTTTTCTGCGGCCAGATTGCATCA
251    R A Y N G R V K T W Y T F N E P R V F C G Q I A S
826    TTTCCATTCAACGTTACGTTCCCTGCTGGCGTGAATAATCAAATGCACCTTATCACTGCTCGTATAACCTACTG
276    F P F N V T F P A G V N N S N A P Y H C S Y N L L
901    AAGGCACATGCTGGTGCAGTCAAAGCGTTCGCGGAAATGAACATCACGGGCGAAATCGCTTTCAAGAACGACGAC
301    K A H A G A V K A F R E M N I T G E I A F K N D D
976    TACGTTGGGACACCTTGGAGAACAATCTACTGAAGACACTGAAGCGGTAGAGAGACATGCTGCCTTCCAAATC
326    Y V G T P W R T N S T E D T E A V E R H Y A K T V F
1051   GGAATTTTCTCAGATCTGTGTATCGCACCGGGGATTTGCCCAAGATTCTGACAGATACCTTGGCCGGAGTCATAT
351    G I F S D P V Y R T G D W P K I L T D T L P E S Y
1126   CTCCCTCGCTTACAGAAGAAGAAAAGCAAGATATTATGTTTCTGCGGACTTCTTTGCCATCGACTTTACC GA
376    L P R F T E E E K Q D I H G S A D F F A I D S Y R
1201   TCCCAACTCATTTGCGGCTCCGGATGAAGGATTGAAGCATGTGTCTCAGATCCAGCGAATCCTTTATGGCCGACA
401    S Q L I A A P D E G I E A C V S D P A N P L W P T
1276   TGCAATGTTGTCAAGGAATTTGACTCTGCTGGTTGGGCAGTGGGGATTTTCGTCGGATCCGAGGACTCCCTGGCTA
426    C N V V K E F D S A G W A V G I S S D P R T P W L

```

```

1351 CAGGCTACACCTAATGCACTACGAGCATACCTCGGGGAACCTCAACGCGGTTGGCCGACCAAGAAGCATGTATGTG;
451 Q A T P N A L R A Y L G E L Q R R W P T K K M Y V I
1426 GCGGAATTTGGGTTCCGCAAGCCATTTGAGGGTATTAGAGAGCCACAGGAGCTGTATCGCGTCACGGAGATGTC
476 L A E F G F A I E P F E G I R E P Q E L Y R V T E D V
1501 GCGAGAATACTATTACATGACGTACCTCGGAGAAATACTACTCGCCATACACGAAGACAAGCTACCTATTGCC
501 A R T N Y Y M T Y L G E I L L A I H E D K L P I A
1576 GGCATATTTGCTTGGGCTATGATCGATAACATGGAATGGTCAAGCGGCGATTTCGTACCGTCCACTTTACGGGTTTC
526 G I F A W A M I D N M E W S S G D S Y R P L Y G F
1651 GGAATACAGTATGTCAACTACACGAGCTTGGAGCGAACCTATAAACGATCTGCTTTTCGATTGGCTGAATTCTTT
551 G I Q Y V N Y T S L E R T Y K R S A F A L A E F F
1726 AGCACCCATTTGCAGTAA
576 S T H L Q *

```

Figura 13. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del gen β -glucosidasa albergado en el GenBank con número de acceso AWSO01000068 de *M. royeri*. La secuencia nucleotídica contiene un gen de 2627 pb que codifica para una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasas familia 1. La región codificante (CDS) consta de 1743 pb traducidas a 580 aminoácidos y codón de terminación (TAA). La secuencia de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos de la región codificante. Los residuos de nucleótidos están numerados en la dirección 5' a 3', con la A del ATG predicho iniciando con metionina dado el número 1. La secuencia de aminoácidos indica una secuencia motifs, sitio activo (L_I) de las glicosil hidrolasas de la familia 1.

Cuadro 8. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos traducido desde el CDS 21 correspondiente a la secuencia AWSO01000068 codificante de una β -glucosidasa predicha de *M. royeri*.

Secuencia consenso del motifs	Posición	Secuencia del motifs	Descripción del motifs
GLYCOSIL_HYDROL_F1_1 [LIVMFSTC]-[LIVFYS]-[LIV]-[LIVMST]-E- N-G-[LIVMFAR]-[CSAGN]	473 – 481	MYVaEfGFA	Sitio activo de las glicosil hidrolasas pertenecientes a la familia 1
Número de aminoácidos: 580			
Peso molecular: 64883.0 Da			
Punto isoeléctrico: 4.73			
Número total de residuos de carga negativa (Asp + Glu): 68			
Número total de residuos de carga positiva (Arg + Lys): 41			
Fórmula de composición atómica: C ₂₉₈₄ H ₄₄₀₂ N ₇₄₀ O ₈₆₂ S ₁₄			
Número total de átomos: 9,002			
Los coeficientes de extinción estan dados en unidades de M ⁻¹ cm ⁻¹ , a 280 nm medido en agua.			
Los coeficientes de extinción:	Ext. coeficiente 124595 Abs 0,1% (= 1 g/l) 1.920, suponiendo que todos los pares de residuos de Cys forman cisteínas. Ext. coeficiente 124220 Abs 0,1% (= 1 g/l) 1.915, suponiendo que todos los residuos de Cys se reducen El extremo N-terminal de la secuencia considerada es M (Met).		
Vida media estimada:	La vida media estimada: 30 horas (reticulocitos mamíferos, <i>in vitro</i>). > 20 horas (levaduras, <i>in vivo</i>). > 10 horas (<i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i>).		
Índice de Inestabilidad:	El índice de inestabilidad (II) se calcula para ser 42.34 Este clasifica la proteína como inestable.		
Índice alifático: 74.21			
Promedio general de hidropaticidad (GRAVY): -0.182			
Índice de adaptación de codones (CAI): 0.681			
Predicción de localización subcelular:	Extracelular, incluyendo la pared celular: 33.3 % Mitocondrial: 22.2 % Retículo endoplásmico: 22.2 % Vacuolar: 22.2 %		

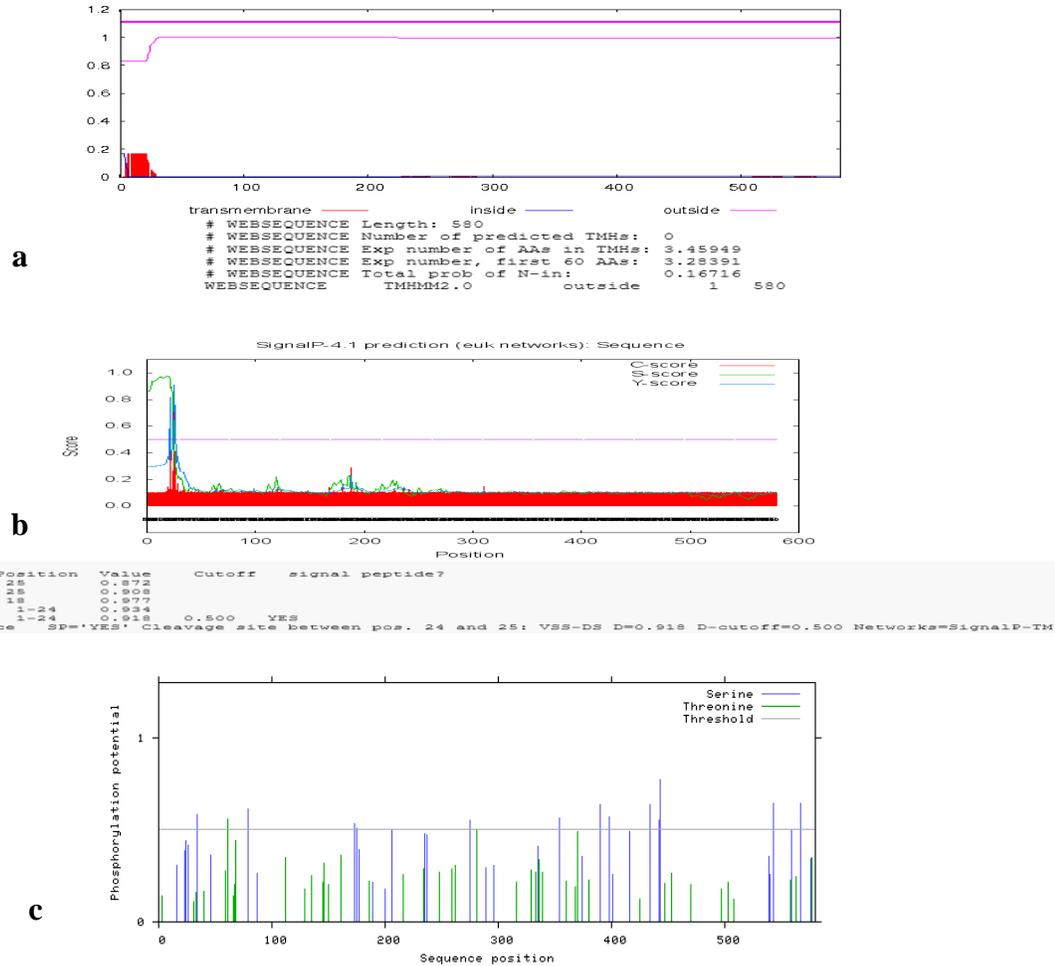


Figura 14. Predicción de dominios transmembranales de la β -glucosidasa de *M. rozeri* con número de acceso GenBank ESK95676, derivada del gen 21 de la secuencia con número de acceso GenBank AWSO01000068. (a) La proteína predicha pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 1, consta de 580 residuos de aminoácidos y un codón de terminación (TAA) y no presenta hélices integradas a membrana. (b) La predicción fue realizada con los servidores SignalP 3.0 y 4.1. Los resultados muestran que la proteína predicha es secretoria, contiene péptido señal, sitio de división de la peptidasa señal (SPase 1) I, sitio de anclaje, y los aminoácidos forman parte del péptido señal. (c) En la predicción de sitios posibles de fosforilación, se encontraron 14 sitios de fosforilación, correspondientes a 13 residuos de Serina (Ser) (posiciones 34, 79, 173, 175, 275, 354, 390, 398, 434, 442, 443, 543 y 567) y un residuo de Treonina (Thr) (61).

La secuencia nucleotídica con número de acceso GenBank AWSO01001286, consta de 11 genes. El gen número nueve, en orden ascendente, está identificado como un gen codificante de una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasas de la familia 3; este gen consta de 1952 pb, una región codificante (CDS) de 1740 pb que se traducen en una proteína predicha de 579 aminoácidos y un codón de terminación (TGA). La secuencia de aminoácidos está disponible en la base de datos del GenBank con el número de acceso ESK84536 (Figura 15). La predicción de las secuencias

motif indicó una secuencia firma de las glicosil hidrolasas de la familia 3 (Cuadro 9). La predicción de la localización subcelular indica que la proteína se localiza en el citoplasma (Cuadro 9). La predicción de dominios transmembranales indica que la proteína no tiene regiones transmembranas, específicamente, no es una proteína integrada a membrana (Figura 16a). El índice de hidropaticidad (GRAVY) de -0.251 clasifica a la proteína hipotética como una proteína hidrofílica, (Cuadro 9). El índice de inestabilidad nos indica que se trata de una proteína estable en la naturaleza (Cuadro 9). La predicción de la presencia y localización de sitios de división de péptidos señal, muestra que la proteína predicha es una proteína no secretoria, no contiene péptido señal, por lo que la secuencia completa forma parte la proteína madura (Figura 16b). La búsqueda de los posibles sitios de fosforilación indicó la presencia de 16 sitios fosforilados, correspondiente a 15 residuos de Serina (Ser) (posiciones 30, 60, 94, 155, 177, 196, 240, 250, 340, 465, 469, 523, 529, 530 y 531) y un residuo de Treonina (Thr) (posición 192) (Figura 16c). El índice de adaptación de codones (0.687) nos indica que el gen codificante es de alta expresión (Cuadro 9).

```

1      ATGCCTTCTACCACGAAATTAACGGACGAAATGAAGAAAGAGATTGGGCAACATTTTGTCTTTGGCTTTCATACC
1      M P S T T K L T D E M K K E I G Q H F V F G F H T
76     CAAGAGCTCGATTCTGATATCAAGACTCTCGTCGGAGCACCCTACTATGTTGGAAATGTCATCTTCATGAAGAGG
76     Q E L D S D I K T L V G A P Y Y V G N V I F M K R
26     AACGTGCGGGATGTTGCACAAGTGAAGAGTATGATCAGAGAGCTGCAGGCGTATGCGAAAGATGCGGGACATGAG
151    N V R D V A Q V K S M I R E L Q A Y A K D A G H E
51     AGGCCACTGTAAATTGGGACTGATCAGGAAATGGTCTGGTTTCAGCTTTCAGCTCAAAGACTGCAGTCACACAA
226    R P L L I G T D Q E N N G L V S A F S S K T A V T Q
76     TTTCCAGGAGCAATGACACTCGCATCCACAGGCTCGGTTTCCCTCACCGAGCAAGTCTACGCGAGCTGCAAAA
301    F P G A M T L A S T G S V S L T E Q V Y A A S A K
101    GAGCTTGACCTCCTTGGTGTAATTTGGGCTTATGCCCCCGTCGCTGACATCAACATTGACAAGCGTAACCCCTGTT
376    E L D L L G V N W A Y A P V A D I N I D K R N P V
126    ATCGGAGTCCGGAGTTTCGGTGATGACCCACACAAGGTAGCCGAATATGTGCTAGCAGCAGCCAAAGGCATGTCC
451    I G V R S F G D D P H K V A E Y V L A A A K G M S
151    AGCTCAGGAGTTGCACCCAACGTCAAACACTTCCCAGGACATGGTGACACACACGTCGATTACATCTTGCACCT
526    S G V A P N V K H F P G H G D T H V D S H L A L
176    CCCAAAATCATGAAAACGAAAGAAGTCATTACCGAAACCGAGCTCGTCCCGTTCAAAGCAGCATTCGACGAAGCA
601    P K I M K T K E V I T E T E L V P F K A A F D E A
201    CAGTCAAATCCGCGCCTTGAAGCCTGCTGACGGTAATGACCAGCCACCATGCTCTCCCGTTGATCACCGGAAGC
676    Q S N P R L G S L L T V M J S H H A L P L J T G S
226    GATGAACCATGCTCATTTGTCAAAGTTGATTACAACCGAGATCCTGAGGAAGGAAATGGGTTTCAAGGGTGTGGTG
751    , D E P C S L S K L I T T E L I L R K E M G E K G V V
251    GTCACTGATTGCCTGGAAATGGATGCGATAGCGGCGACCAAGGATGACGATGGCGTGCAAGGCATGGGCGCGAAC
826    V T D C J E M D A I A A T K D D D G V Q G M G A N
276    GGTGACCGCGAGTCCGGCTGGAACGGTGGATGTGGAGTGGAAAGAGGTGTTGTTTCGTCGCCCTGGAAGCCGGAGCT
901    G D R E S G W N G G C G V E E G V V R A L E A G A
301    GATATTACCATGGTCTGTCATACGATGGCGAGGCACGTTGCTTCTGTCAAACCGCTTTGGGAGGCGGTCGAGAGT
976    D I T M V C H T M A R H V A S V K R V W E A V E S
326    GGGAGGCTCAGCATGGATGATATCAGGAAAGGAGAGAGGATCCGCGCTTGAAGGATGACGATVTCGGTCAA
1051   G R L S M D D I R K G G E R I R R L K D A V F G Q
351    GATGGATGGAGAAAGGTTCTCGAAGATCGTCCGGATTTTCGAGGAGGAATGGAAGAAGGCAAAAGCAGAAAAGCAAG
1126   D G W R K V L E D R P D F E E E W K A K A E S K
376    CAGATTAGTGAAGCTGCCTACGCGAAGACCCGTCCTGCTGAAAGACGACAGCATGCTACCCCTGGGGACCGGC
1201   Q I S E A A Y A K S T V L L K D D S M L P L G T G
401    AAAGTCTACTCTTTACTCCGGAGAACGAAAGCTATAACAAGCAGTCGACGATGCGGAGGGCGTGTGTGAGGACC
1276   K V V L F T P E N E S Y N K A V D D A E G V L R T
426    AAGGGCGGACAAGTCCGGAACACTGCAGGGGATCTTCTATCGTTCCACGCTTCTATCAAGCGCAGGGTTCGAG
1351   K G G Q V R N T A G A Y F L S F H A S I K R R V E
451    GCCTGTGATCACATCGTGATACGAAGGATGGAAGTATTGATGCGGAAGAAGGCACAGAACAAGTCATCTTTGTG
1426

```

```

476      G C D H I V Y T K D G T I D A E E G T E Q V I F V
1501    CTTAGAAACGCGGACCGCAGTACCTGGCAGATTTCCGCTTTGAAGGAGCTCCTTCGTAGGCAACCGTCGAAGGTC
501      L R N A D R S T W Q I S A L K E L L R R Q P S K V
1576    GTCGTGCTATCATCTAGCACACCATACGATTTAGACGGTGTGACCTTGGCTTCTCCATACGCACACTTGGCAAGC
526      V V L S S S T P Y D L D G V T L A S P Y A H L A S
1651    AGCGAATATACAACCGAAGCTTTCGAAGCGCGCGCGCGGTTCATATTCGGAGAACGGAAAGCTGAGGGCAGGTTG
551      S E Y T T E A F E A A A A V I F G E R K A E G R L
1726    GCCGTCAAGCTATGA
576      A V K L *

```

Figura 15. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del gen β -glucosidasa registrado en el GenBank con número de acceso AWSO01001286 de *M. roreri*. La secuencia nucleotídica contiene un gen de 1952 pb que codifica para una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasa familia 3. La región codificante (CDS) consta de 1740 pb traducidas a 579 aminoácidos y codón de terminación (TGA). La secuencia de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos de la región codificante (Número de acceso ESK84536). Los residuos de nucleótidos están numerados en la dirección 5' a 3', con la A del ATG predicho iniciando con metionina dado el número 1. La secuencia de aminoácidos indica una secuencia motifs, sitio activo (L), de las glicosil hidrolasas de la familia 3.

Cuadro 9. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos traducido desde el CDS nueve correspondiente a la secuencia AWSO01001286 codificante de una β -glucosidasa predicha de *M. roreri*.

Secuencia consenso del motifs	Posición	Secuencia del motifs	Descripción del motifs
GLYCOSIL_HYDROL_F3 [LIVM](2)-[KR]-x-[EQKRD]-x(4)-G- [LIVMFTC]-[LIVT]-[LIVMF]-[ST]-D- x(2)-[SGADNIT]	264 - 282	ILRKEMGFKGVVTDCLe	Sitio activo de las glicosil hidrolasas pertenecientes a la familia 3
Número de aminoácidos: 579			
Peso molecular: 62998.4 Da			
Punto isoeléctrico: 5.76			
Número total de residuos de carga negativa (Asp + Glu): 81			
Número total de residuos de carga positiva (Arg + Lys): 69			
Fórmula de composición atómica: C ₂₇₇₃ H ₄₄₂₅ N ₇₇₁ O ₈₆₂ S ₂₀			
Número total de átomos: 8, 851			
Los coeficientes de extinción son en unidades de M ⁻¹ cm ⁻¹ , a 280 nm medido en el agua.			
Los coeficientes de extinción:	Ext. coeficiente 52620		
	Abs 0,1% (= 1 g/l) 0.835, suponiendo que todos los pares de residuos de Cys forman cisteínas.		
	Ext. coeficiente 52370		
	Abs 0,1% (= 1 g/l) 0.831, suponiendo que todos los residuos de Cys se reducen		
La N-terminal de la secuencia considerada es M (Met).			
La vida media estimada: 30 horas (reticulocitos mamíferos, <i>in vitro</i>).			
Vida media estimada:			
> 20 horas (levaduras, <i>in vivo</i>).			
> 10 horas (<i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i>).			
Índice de Inestabilidad:	El índice de inestabilidad	(II)	se calcula para ser 36.86
Este clasifica la proteína como estable.			
Índice alifático: 83.89			
Promedio general de hidropaticidad (GRAVY): -0.251			
Índice de adaptación de codones (CAI): 0.687			
Predicción de localización subcelular:	Citoplasmática: 73.9 %		
	Nuclear: 8.7 %		
	Membrana plasmática: 4.3 %		
	Mitocondrial: 4.3 %		
	Peroxisomal: 4.3 %		
Vacuolar: 4.3 %			

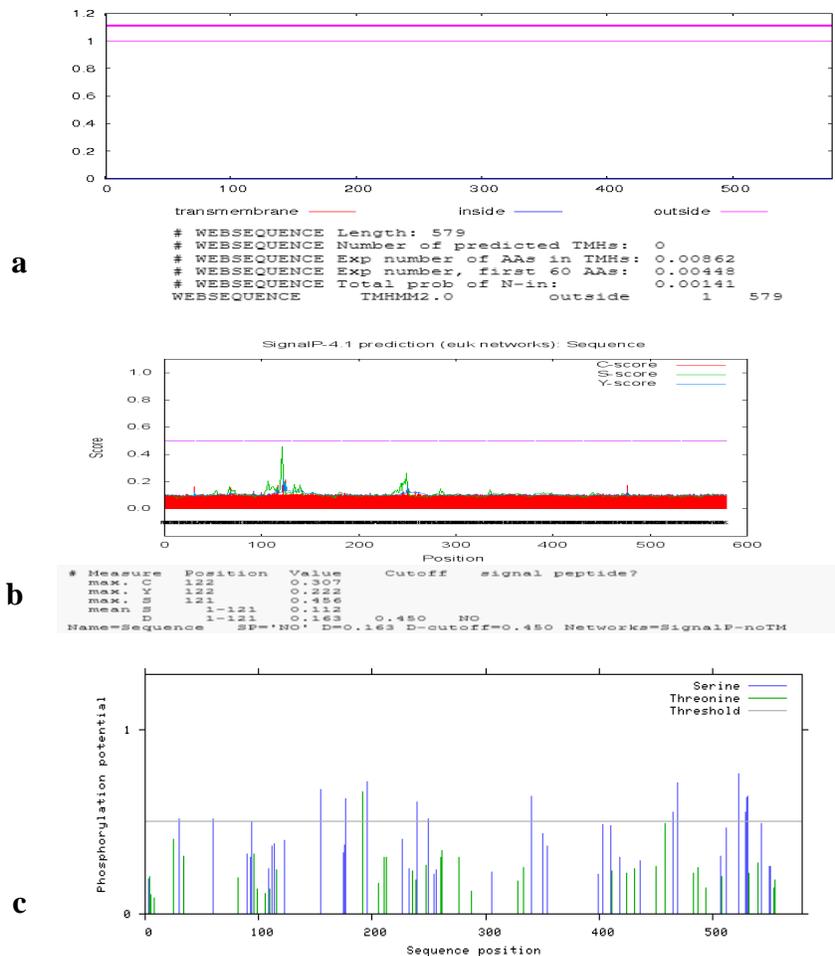


Figura 16. Predicción de dominios transmembranales de la β -glucosidasa de *M. rozeri* con número de acceso GenBank ESK84536, derivada del gen nueve de la secuencia con número de acceso GenBank AWSO01001286. (a) La proteína predicha pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 3, consta de 579 residuos de aminoácidos y un codón de terminación (TGA) y no presenta hélices integradas a membrana. (b) La predicción fue realizada con los servidores SignalP 3.0 y 4.1. Los resultados muestran que la proteína predicha es no secretoria, no contiene péptido señal, ni sitio de división de la peptidasa señal (SPase 1) I, ni sitio de anclaje, y los aminoácidos forman parte de la proteína madura. (c) En la predicción de sitios posibles de fosforilación, se encontraron 16 sitios de fosforilación, correspondientes a 15 residuos de Serina (Ser) (posiciones 30, 60, 94, 155, 177, 196, 240, 250, 340, 465, 469, 523, 529, 530 y 531) y un residuo de Treonina (Thr) (192).

La secuencia nucleotídica con número de acceso GenBank AWSO01000113, consta de 85 genes. El gen número 69, en orden ascendente, está identificado como un gen codificante de una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasas de la familia 3; este gen consta de 3470 pb, un CDS de 2553 pb que se traducen en una proteína predicha de 850 aminoácidos y un codón de terminación (TAG). La secuencia de aminoácidos está disponible en la base de datos del GenBank con el número de acceso ESK95149 (Figura 17). La predicción de las secuencias motifs indicó una secuencia firma a las glicosil hidrolasas de la familia 3 (Cuadro 10). La predicción de la

localización subcelular indica que la proteína se localiza en el citoplasma (Cuadro 10). La predicción de dominios transmembranales indica que la proteína no tiene regiones transmembranas, específicamente, no es una proteína integrada a membrana (Figura 18a). El índice de hidropaticidad (GRAVY) de -0.189 clasifica a la proteína hipotética como una proteína hidrofílica (Cuadro 10). El índice de inestabilidad nos indica que se trata de una proteína estable en la naturaleza (Cuadro 10). La predicción de la presencia y localización de sitios de división de péptidos señal, muestra que la proteína predicha es una proteína no secretoria, no contiene péptido señal, por lo que la secuencia completa forma parte de la proteína madura (Figura 18b). La búsqueda de los posibles sitios de fosforilación indicó la presencia de 25 sitios fosforilados, correspondiente a 23 residuos de Serina (Ser) (posiciones 4, 114, 119, 159, 162, 165, 184, 313, 352, 386, 441, 480, 529, 576, 600, 625, 627, 665, 740, 767, 771, 814 y 830) y dos residuos de Treonina (Thr) (posiciones 605 y 837) (Figura 18c). El índice de adaptación de codones (0.679) nos indica que el gen codificante es de alta expresión (Cuadro 10).

```

1       ATGACCAAGTCAAACGTCGATGAGACCCATCCAAACTGACCATGCCCGATAAGATCAGGCTTCTGTGTGGGCTG
1       M T K S N V D E T L S K L T M P D K I R L L C G L
76      GGATGGTGGCATAACAGCCTGTACCGTCACTTGGTATACCCCTCTATGCGAATGAGCGATGGTCCGAATGGTGT
26      G W W H T E P V P S L G I P S M R M S D G P N G V
151     CGAGGAACTCAATTCTTTAACGGGGTACCATCAAGCTGTTTCCCGTCTCCACCGGCTGGGTTCAACATTCGAC
51      R G T Q F F N G V P S S C F P S S T G L G S T F D
226     ATAGACCTCGCTCGTCAAGTTGGCGAGGCTGCAGATGAATGTGCGGCCAAAGGCTGCCACATCCTTTGGGT
76      I D L A R Q V G E A L A D E C R A K G C H L L G
301     CCTACTACAAATACTCAACGATCTCCACTTGGTGGTGCATCTTTTCAATCATTCTCCGAGGATCCGGTATTGAAT
101     P T T N T Q R S P L G G R S F E S F S E D P V L N
376     GGATCAATCGCCCGCGGTACATCAACGGTTTACAGTCCAAAGGCGTGCCTGCTACCCCTCAAGCACTACGTCGCC
126     G S I A A A Y I N G L Q S K G V A A T L K H Y V A
451     AATGATCAGGAATTTGAGAGGTTTCCGTGAGCAGCGAAGTCAGCGAGCGCGCACTCAGGGAAATCTACCTCAAG
151     N D Q E F E R F S V S E V S E R A L R E I Y L K
526     CCCTTCCAAATGCCATTCGCGAATCAAATCCATGGGCTTAAATGTCTTCATCAATCGTGTCAACGGTCTTCAC
176     P F Q I A I R E S N , P - W - A - L - M - S - S - Y - N - R - V - N - G - L - H -
601     GTTTCGGAGAATAAATGGTTATTGGATGATATTCTGAGAAAGGAATGGGGATACAAAGGAATGATCATGAGTGAC
201     , V - S - E , N K W L L D D ! L - L - B - K - E - W - G - Y - K - G - M - J - M - S - D ,
676     TGGATTGGTCTTTATAGTACAGCCGAGAGTATAAGAGCTGGACTTGATCTGGAGATGCCAGGTCACCGTAATG
226     L W - L - G - V Y S T A E S I R A G L D L E M P G P T V M
751     CGTGGAATGCGGTTCATGAGGGCTCTCGCCGCCAAAAGCTCTTCCGAGTGATATTGATGACCGTGTGCCAAAG
251     R G N A V M R A L A A Q K L F P S D I D D R V R K
826     ATTCTCGAACTTCTCGAGAAAGCATTTCGCATCCGGCATCCCTTTTGGAGCACCCGAAAAACCCGTTGACACACCC
276     I L E L L E K A F A S G I P F G A P E K P V D T P
901     GAGCTTCGCCAATGCTCCGCACCACCGCTGCCGATCCCGTCTGTTTACTCAAGAATACCAAGAACTTACTACCA
301     E L R Q L L R T T A A D S V V L L K N T K N L L P
976     CTTACATCCTCCTCGAACATAAAAAAGATTGCTGTCATAGGCCCAACGCTAAAATGCATTCACCTCCGGAGGT
326     L T S S S N I K K I A V I G P N A K T A F T S G G
1051    GGTTCCGGCTAGACTGCTTGAATCATGGAAAGTTACACTTTTGCAGGGTATCACTGCTGCCCGAAGAGATTGAT
351    G S A R L L E S W K V T L L Q G I T A A A K E I D
1126    GCAGACGTGCAGTACACTATTGGAGCTACGTCGCATAAGATGCTGCCCTTGGCGGAGGACTACGTTTCCAGCAC
376    A D V Q Y T I G A T T S H K M L P L A E D Y V F Q H
1201    GGTTGGTACGCCCGCGCGTCTTGGAGTTTGGACGAGAAACCCCTCCGAAGACTTCTTGGACGACGAGGCTGAT
401    G G Q P G G V L E F W N E K P S E D F L S T K A D
1276    ATCGGGAATCTGAATGAGGAGTAGTATGGAGTACAACGACCAAAATCTACGAACTGCATATTACTTGTATGGAGTT
426    I G N L N E G V V W S T T T K S T N C I L D G V
1351    AATGCAACAAAGTCGATTACAACCTGCTATTTTCAGTACACAACCAAGTTCATACCAGCAATCTGGAGACTGG
451    N A N K V D Y N C Y F R Y T T T F I P D E S G D W
1426    ATATTTGGCGTCTCCGTGTCAGGTCTCGAAACGTTTTTCATCGACGGAAGCTAGCAATTGACTTATCCAACGAC

```

476 I F G V S V S G L G N V F I D G K L A I D L S N D
1501 CCTCCAAAGGGCAACCATCTCATTTGGTGTGGGTACGGCAGAATTTATGTGGTATCGTCAAGGATATGCGAAGGGC
501 P P K G N H L I G V G T A E L C G I V K D M Q K G
1576 CAGAAGTATAGCTTGGAGATTCGTATCAGCAATCTCGAGTTTCATGGCTCAGATTCCTATCATTCTCGCATGGGGT
526 Q K Y S L E I R I S N L E F M A Q I P I I P A W G
1651 GGTTTCAGGCTCGGTGCAATGAAGTTTATGGAGCCTGAGCAAGCCATCAAGGATGCAGTGAAGCTCGCAAAAGAG
551 G F R L G A M K V M E P E Q A I K D A V K L A K E
1726 TCAGATGTCGCAATCTTGGTTGTCGGTTTGAATCATGAATGGGAAAGTGA AAACTACGACCGGGAAGATCTTTCA
576 S D V A I L V V G L N H E W E S E N Y D R E D L S
1801 CTACCTGGTCTCACCAACCGTCTCGTAACCGAAGTACTCGCAGCCAATCTCAGACAGTCTGGTCAACCGAGTCTG
601 L P G L T N R L V T E V L A A N P Q T V V V N Q S
1876 GGCTCTGCCGTAGAATTGCCCTTGGGCAGATGAAGCAAGCACGGTATTACAGGCGTTCTTTGGCGGCAACGAGTA
626 G S A V E L P W A D E A S T V L Q A F F G G N E L
1951 GGAAATGGTGTAGCTGACGTGTGTTTGGAAAAGTGAACCCCTCTGCGAAGCTGTCAATGACGTTTCCCAAGCGA
651 G N G V A D V L F G K V N P S A K L S L T F P K R
2026 CTGGGCGATTGCCCGCATATCCGTCGTGTAAGAAAACACAAGCCATGGCAAACTTATATACGAGGRC
676 L A D C P A Y P S Y G N K T Q D H G K V L Y N E G
2101 GTTTTCGTCGGCTACCGAGGTTATCAAAATTAATCCATAGCTCCTGCCTTCCCTTTGGCTTGGCTTGTCTAC
701 V F V G Y R G Y Q I K S I A P A F P F G F G L S Y
2176 ACGCAATTTGAGTACTCTGACCTGCAGAGCACACCCATCTCCTCTGATGGCAGTTTTCTGTGACGCTCAAGTT
726 T Q F E Y S D L Q S T P I S S D G S F T V T L K V
2251 AAGAATGTTGGGCAGATTAACCGTCCGGAAGTTGTTCAAATTTACATCTCTGATCCCGAGTCGTCATTAGCACGT
751 K N V G Q I N G R E V V Q I Y I S D P E S S L A R
2326 GCAAAAGCAAGAGCTGAGAGGCTTAAAAAGGTCCTTTGAAAAGCTGGAGAGACGAAAAGTGAAGGTGGAATTA
776 A K Q E L R G F K K V S L K A G E T K E V K V E L
2401 GACAGAGATGCCCTTGGATTTTATGATGAGAGAAGGGGATCATGGGTGGCAGAACGAGGCAAGTTTGGTGTGTG
801 D R D A L G F Y D E R R G S W V A E R G K F G V L
2476 GCAGGCGCATCTTCAGAAGATATCAGACTAGAACAGAGGTTGAACTGAAGGATACGTTAACTTGGACGGGCTC
826 A G A S S E D I R L R T E V E L K D T L T W T G L
2551 TAG
851 *

Figura 17. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del gen β -glucosidasa registrado en el GenBank con número de acceso AWSO01000113 de *M. roreri*. La secuencia nucleotídica contiene un gen de 3470 pb que codifica para una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasa familia 3. La región codificante (CDS) consta de 2553 pb traducidas a 850 aminoácidos y codón de terminación (TAG). La secuencia de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos de la región codificante (Número de acceso ESK95149). Los residuos de nucleótidos están numerados en la dirección 5' a 3', con la A del ATG predicho iniciando con metionina dado el número 1. La secuencia de aminoácidos indica una secuencia motifs, sitio activo (L⁻), de las glicosil hidrolasas de la familia 3.

Cuadro 10. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos traducido desde el CDS 69 correspondiente a la secuencia AWSO01000113 codificante de una β -glucosidasa predicha de *M. roreri*.

Secuencia consenso del motifs	Posición	Secuencia del motifs	Descripción del motifs
GLYCOSIL_HYDROL_F3 [LIVM](2)-[KR]-x-[EQKRD]-x(4)-G-[LIVMFTC]- [LIVT]-[LIVMF]-[ST]-D-x(2)-[SGADNIT]	211- 228	ILRKEWGYKGMIM SDWIG	Sitio activo de las glicosil hidrolasas pertenecientes a la familia 3
Número de aminoácidos: 850			
Peso molecular: 92745.4 Da			
Punto isoeléctrico: 5.49			
Número total de residuos de carga negativa (Asp + Glu): 101			
Número total de residuos de carga positiva (Arg + Lys): 88			
Fórmula de composición atómica: C ₄₁₄₃ H ₆₅₂₀ N ₁₁₁₀ O ₁₂₅₈ S ₂₃			
Número total de átomos: 13, 054			
Los coeficientes de extinción son en unidades de M ⁻¹ cm ⁻¹ , a 280 nm medido en el agua.			
Los coeficientes de extinción:	Ext. coeficiente 115780 Abs 0,1% (= 1 g/l) 1.248, suponiendo que todos los pares de residuos de Cys forman cisteínas. Ext. coeficiente 115280 Abs 0,1% (= 1 g/l) 1.243, suponiendo que todos los residuos de Cys se reducen La N-terminal de la secuencia considerada es M (Met).		
Vida media estimada:	La vida media estimada: 30 horas (reticulocitos mamíferos, <i>in vitro</i>). > 20 horas (levaduras, <i>in vivo</i>). > 10 horas (<i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i>).		
Índice de Inestabilidad:	El índice de inestabilidad (II) se calcula para ser 31.04 Este clasifica la proteína como estable.		

Índice alifático: 87.87
Promedio general de hidropaticidad (GRAVY): -0.189
Índice de adaptación de codones (CAI): 0.679
Predicción de localización subcelular: Citoplasmática: 65.2 %
 Mitochondrial: 8.7 %
 Nuclear: 26.1 %

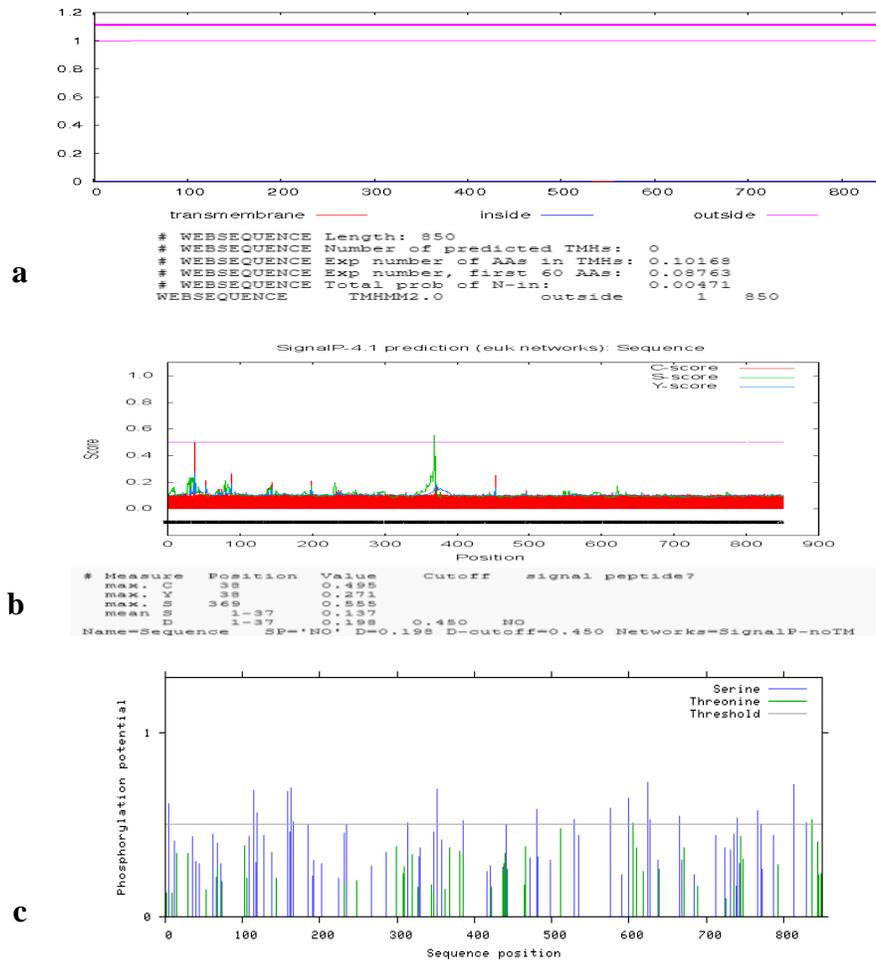


Figura 18. Predicción de dominios transmembranales de la β -glucosidasa de *M. royeri* con número de acceso GenBank ESK84536, derivada del gen 69 de la secuencia con número de acceso GenBank AWSO01000113. (a) La proteína predicha pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 3, consta de 850 residuos de aminoácidos y un codón de terminación (TAG) y no presenta hélices integradas a membranas. (b) La predicción fue realizada con los servidores SignalP 3.0 y 4.1. Los resultados muestran que la proteína predicha es no secretoria, no contiene péptido señal, ni sitio de división de la peptidasa señal (SPase 1) I, ni sitio de anclaje, y los aminoácidos forman parte de la proteína madura. (c) En la predicción de sitios posibles de fosforilación, se encontraron 25 sitios de fosforilación, correspondientes a 23 residuos de Serina (Ser) (posiciones 4, 114, 119, 159, 162, 165, 184, 313, 352, 386, 441, 480, 529, 576, 600, 625, 627, 665, 740, 767, 771, 814 y 830) y dos residuos de Treonina (Thr) (605 y 837).

La secuencia nucleotídica con número de acceso GenBank AWSO01000688, consta de ocho genes. El gen número tres, en orden ascendente, está identificado como un gen codificante de una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasas de la familia 3; este gen consta de 3623 pb, un

CDS de 2880 pb que se traducen en una proteína predicha de 959 aminoácidos y un codón de terminación (TGA). La secuencia de aminoácidos está disponible en la base de datos del GenBank con el número de acceso ESK88175 (Figura 19). La predicción de las secuencias motifs indicó una secuencia firma de las glicosil hidrolasas de la familia 3 (Cuadro 11). La predicción de la localización subcelular indica que la proteína se localiza en el retículo endoplásmico (Cuadro 11). La predicción de dominios transmembranales indica que la proteína tiene regiones transmembranas, es una proteína integrada a membrana del retículo endoplásmico (Figura 20a). El índice de hidropaticidad (GRAVY) de -0.044 clasifica a la proteína hipotética como una proteína hidrofílica, (Cuadro 11). El índice de inestabilidad nos indica que se trata de una proteína estable en la naturaleza (Cuadro 11). La predicción de la presencia y localización de sitios de división de péptidos señal, muestra que la proteína predicha es una proteína secretoria, contiene péptido señal, sitio de anclaje, por lo que la secuencia completa forma parte del péptido señal (Figura 20b). La búsqueda de los posibles sitios de fosforilación indicó la presencia de 22 sitios fosforilados, correspondiente a 19 residuos de Serina (Ser) (posiciones 12, 15, 37, 76, 136, 209, 371, 486, 551, 555, 583, 626, 644, 663, 817, 822, 828, 885 y 907) y tres residuos de Treonina (Thr) (posiciones 10, 589 y 886) (Figura 20c). El índice de adaptación de codones (0.665) nos indica que el gen codificante es de alta expresión (Cuadro 11).

```

1       ATGCTGCTCGTCGTAGTAGTCATTCTCACCTTTTCTACTACCTTCTCTTGCCTGGCGTCAGTTATGGCCAGAGAGC
1       M L L V V V V I L T F S L P S F A W R Q L W P E S
76      TATAGTTTCTCTGCAGGCTTACAATTTGGGAATTCGAAGAGAGCAGGGAAAGAGGCCTTTGTGAACGACTTGGTG
26      Y S F S A G L Q F G N S K R A G K E A F V N D L V
151     GAAAGGATGTCCGTTGAGGAGCTTGTATGCAGCTTTCATCTGATGTTTCGCTGACAACGTGGTCCGCCCGAAGTCC
51      E R M S V E E L V M Q L H L M F A D N V V G P K S
226     TCAAACGAGCTGTATGATTTTGTCTTTCGGCCCCGCCGCCGCTCGACTGGCTTAGGCGTTCATGCATGACTGGTAC
76      S N E L Y D F A L R P A P P S T G L G V M H D W Y
301     CCAACCTCGGCTGACTACTACAATACGCTCCAGCAACTCAACCTCAACAAGTCTCGCTACAAACGCCATTTCATG
101     P T S A D Y Y N T L Q Q L N L N K S R L Q T P F M
376     CTACTCGAAGAATGTGTACATGGCGTCCGGTTCATTCAAACAATCCATGTTTCCGCATGCTATTGCTCTTGCGGGC
126     L L E E C V H G V G S F K Q S M F P H A I A L A A
451     AGCTGGGACGAAGATTTGGTCTGGCGTGTGGGAAGAGCTATCGGTACGGAAGCCAGAGCAATCGGCATACACGGA
151     S W D E D L V W R V G R A I G T E A R A I G I H G
526     TGCTTTGCGCCAGTGTAGATCTGGGGAAGGATGTAAGGTGGGGTTCGAGTTCAAGAGGCCCTGGGGAGAGGATTAC
176     C F A P V L D L G K D V R W G R V Q E A W G E D Y
601     GTGTTTACATCGCACATGGGTGTGCTTTTGTCTCCGATTATCGAAGAACGGATCATGGGCTGATCCCGACGCT
201     V F T S H M G V A F A S G L S K N G S W A D P D A
676     GTAGTTCCAGTAATGAAGCATTTTGGCGCTCATGGCTCACCTCGAGGAGGTATCAACGCTGCGCTTTCATGGGT
226     V V P V M K H F A A H G S P R G G I N A A P F M G
751     CGGGGTACCCGGCAGGTCATGATGGAGATGCTCATTCCCTTCCGAGACGCTGTCCAAAAAGGTTTCGTGAAGGGC
251     R G H R Q V M M E M L I P F R D A V Q K _ G _ F _ V _ K _ G _
826     GTCATGATGGCATAACCATGAGTACGATGAGATACCTGCGCACGTCAACCCCGTTTTTATGACGCTTTGGAAGAT
276     _ V _ M _ M _ A _ Y _ H _ E _ Y _ D _ E _ I _ P _ A _ H _ V _ N _ P _ V _ F _ Y _ D _ A _ L _ E _ D _
901     TGGGGTGTGATGGCTTTGTCATTGCAGATGATACAGGAATGCGGATGCTCCACGTTGGGCACAAGGTATCGAAC
301     _ L _ W _ G _ E _ D _ G _ F _ V _ I _ A _ D _ D _ T _ G _ M _ R _ M _ L _ H _ V _ G _ H _ K _ V _ S _ N
976     TCGGACGCAGACACCATCGCTCAGTGGTTCATGCTGGTGGAAATGTTACAGTTCTACGATTACAGCTACGAGACC
326     S D A D T I A Q W F N A G G M L Q F Y D S Y E T
1051    TACCTCAACGTAACGAAAGCTCTTATTGCCAACTCAACAATTTCTCTCAACGATTACAGTCTCACGCCGCTAGG
351     Y L N V T K A L I A N S T I S L S T I Q S H A A R

```

```

1126   ATCTCTCGCCGTGAAACATGATCTTGGTCTCTTCGATAACCCGTATGTACCCACGAGGTGGATTACCAGGCCATT
376     I L A V K H D L G L F D N P Y V P H E V D Y Q A I
1201   ACCGACAACACGTTCCATTAACCCTCGAAGCTGCACAGAAGGCTATTGTTCTCCTGGAGAACAAGAACAGATG
401     T Q Q H V P L T L E A A Q K A I V L L E N K N Q M
1276   CTCCCCTCCAGCCTAATGAGCAGGGTATTAACCAACATCGCATTGATTGGTCCATTTGGGGACCAACTCAACTAT
426     L P L Q P N E Q G I K T I A L I G P F G D Q L N Y
1351   GGTGACTACTCAGGCCCTTGGGGCAGTACCCCTGTAACAATCCAACACGATACGAGAAGCTATGTTGGGATAT
451     G D Y S G P W G S T P V N N S N T I R E A M L G Y
1426   CTTGCAGCCGAGAATGTCGAACCTCTGACCAGTACTGGTGCCAACACCTTCTATACAATGCTCCATATCCCATT
476     L A A E N V E L L T S T G A N T F L Y N A P Y P I
1501   CCGATAACCTTCTATCGCCACCGTCTCGGAAGTCAACAGGTGGCCATAAGGCAACCTATTTCCGCTGACACCAAC
501     P T Y L L S P P S S E V T G G L K A T Y F S D T N
1576   TTCTCCGAACCCGTTTTTACCACCGTTGAGGCTCCGAACCGAGACTGGGGCTTTATCCACCTCTTGGGCTTCTCT
526     F S E P V F T T V E A P N R D W G L Y P P L G L P
1651   TCGAACAAATTTAGCGTGATATGGGAAGGCGAGGTGACGTTACCGTTCTCCGACACCTCGGATATCGAACAAAGAC
551     S N F S V I W E S G M L S S L N A Q V Q L W N D Y
1726   ATCCACGGCTTTATCGGTATATCAGTCTCTCCAACACTACCCTCGTCTCTATATCGATTCTCAGTTAGTCGCT
576     I H G F I G I S V S P N T T A R L Y I D S Q L V A
1801   GAATCACCGTTCTCTTCTTCCGGTACGATATGGGAACATTTATGCCTCTGGCGTACAGTCTCGTCAATGCGACG
601     E S P F S S S G T I M G N I M P L A Y S L V N D Y
1876   AGCACACCGTTGGGGCGCTCACCATTTGTTTTGAGAAGGCAAGGAAGAAGTTGAGTGTAGAGTGGAGTTTCAG
626     S T P L G G S P F V F E K A R K K L S V R V E F Q
1951   ACGTGGAATCTCTACCAGAAGATTGAGAATCTCAGTTCTTTGAATGCTCAGTTACGTTTGGTGGAATTTAGTT
651     T W N L Y Q K I E N L S S L N A Q V Q L W N D Y
2026   GATCAGAGGCCGGGTGAGGCGGTTAGACAGGCTGTTGCAGTAGCCGAAGCCGGGATATTGTTGTTCTTGCTGTT
676     D Q R P G E A V R Q A V A V A E A A D I V V L A V
2101   GGTGCAAACCTGGAATAGTGATGGTGAAGTGGTGATCGTGCTACGCTGGGTTACCTGCGAATCAAACCTGCTTG
701     G A N W N S D G E S G M L S S L N A Q V Q L W N D Y
2176   GCCGACGAATATTTGCGCTTGGGAAGCCAGTGGTGTAGTTCTCGAAGCCGGTAGGCCTTTTGTCTATACCGGAG
726     A D A I F A L G K P V V L V L E G G R P F A I P E
2251   TTTTATCAAAGTGTGCTGCTGTGTGAACGCCCTTTCCCTGGGCAACAGGGTGGTCAAGCCATTGCAGATGTT
751     F Y S K C A A A V N A L F P G Q Q G G Q A I A D V
2326   CTATTTGGCAAAGTGAACCCAGGGGGCAGAATACCTCTTAGCGTGCCATATGGTGAAGGAACACTGCCTTCGTAT
776     L F G K V N P G G R I P L S V P Y G E G T L P S Y
2401   TACAACCTACCACCTACGGCTCAGCTGGGAACCTACATAGATGTGCATTTCATCCCCACATATTCGTTCCGGCTAT
801     Y N Y H P T A H A G N Y I D V H S F P T Y S F G Y
2476   GGCCTCTCATATAGCCGTTCTCAACGTCGACTTCAATGCGGCTCTTCAGGCAGCCCTGGTGGACTCTCTCAG
826     G L S Y S A F S T S D F N A A S S G S P G G L S Q
2551   ACCTTCGACAGTGGAGAAACGATTCACCTCCATGTCAAAGTCAACGACGAAAGGTCCTATGGCTGGGAGCTACGTT
851     T F A A G E T I H F H V K V T N K G P M A G S Y V
2626   GCGCAGATCTATCTGCTGCAACGTGTATCTACCATAGTCCGTGCTGAACGTCAACTCGTTCGCTTTCAAGCGTGTA
876     A Q I Y L L Q R V S T I V R A E R Q L V A F K R V
2701   TACTTGGATGTTGGCGAGTCCGAGGAAGTGAAGCTTGATCTGGAAGTTGATCGATTCTTACCAATTGTGAATCGT
901     Y L D V G E S E E V K L D L E V D R F L P I V N R
2776   CGGTACCAATGGGAATTGGAGAAGGGGAACATAACCTCGCTTTGTTGGATCACGGCGGCTCTGAGGCTAATCCA
926     R Y Q W E L E K G N Y T F A L L D H G G P E A N P
2851   AGTGTAATGTCAACCTGAACTGTATTTGA
951     S V N V T L N C I *

```

Figura 19. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del gen β -glucosidasa registrado en el GenBank con número de acceso AWSO01000688 de *M. royeri*. La secuencia nucleotídica contiene un gen de 3623 pb que codifica para una β -glucosidasa perteneciente a las glicosil hidrolasa familia 3. La región codificante (CDS) consta de 2880 pb traducidas a 959 aminoácidos y codón de terminación (TGA). La secuencia de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos de la región codificante (Número de acceso ESK88175). Los residuos de nucleótidos están numerados en la dirección 5' a 3', con la A del ATG predicho iniciando con metionina dado el número 1. La secuencia de aminoácidos indica una secuencia motifs, sitio activo ([-]), de las glicosil hidrolasas de la familia 3.

Cuadro 11. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos traducido desde el CDS tres correspondiente a la secuencia AWSO01000688 codificante de una β -glucosidasa predicha de *M. roreri*.

Secuencia consenso del motifs	Posición	Secuencia del motifs	Descripción del motifs
GLYCOSIL_HYDROL_F3 [LIVM](2)-[KR]-x-[EQKRD]-x(4)-G- [LIVMFTC]-[LIVT]-[LIVMF]-[ST]-D- x(2)-[SGADNIT]	296 - 314	dalEDWGFDFGVlaDDTG	Sitio activo de las glicosil hidrolasas pertenecientes a la familia 3
Número de aminoácidos: 959			
Peso molecular: 105049.9 Da			
Punto isoeléctrico: 5.16			
Número total de residuos de carga negativa (Asp + Glu): 94			
Número total de residuos de carga positiva (Arg + Lys): 62			
Fórmula de composición atómica: C ₄₇₆₃ H ₇₂₃₃ N ₁₂₄₁ O ₁₃₉₄ S ₂₇			
Número total de átomos: 14, 658			
Los coeficientes de extinción son en unidades de M ⁻¹ cm ⁻¹ , a 280 nm medido en el agua.			
Los coeficientes de extinción:	Ext. coeficiente	158850	
	Abs 0,1% (= 1 g/l)	1.512, suponiendo que todos los pares de residuos de Cys forman cisteínas.	
	Ext. coeficiente	158600	
	Abs 0,1% (= 1 g/l)	1.510, suponiendo que todos los residuos de Cys se reducen	
La N-terminal de la secuencia considerada es M (Met).			
Vida media estimada:	La vida media estimada: 30 horas (reticulocitos mamíferos, <i>in vitro</i>). > 20 horas (levaduras, <i>in vivo</i>). > 10 horas (<i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i>).		
Índice de Inestabilidad:	El índice de inestabilidad	(II)	se calcula para ser 34.32
Este clasifica la proteína como estable.			
Índice alifático: 86.75			
Promedio general de hidropaticidad (GRAVY): -0.044			
Índice de adaptación de codones (CAI): 0.665			
Predicción de localización subcelular:	Retículo endoplásmico: 43.5 % Mitocondrial: 34.8 % Nuclear: 17.4 % Citoplasmática: 4.3 %		

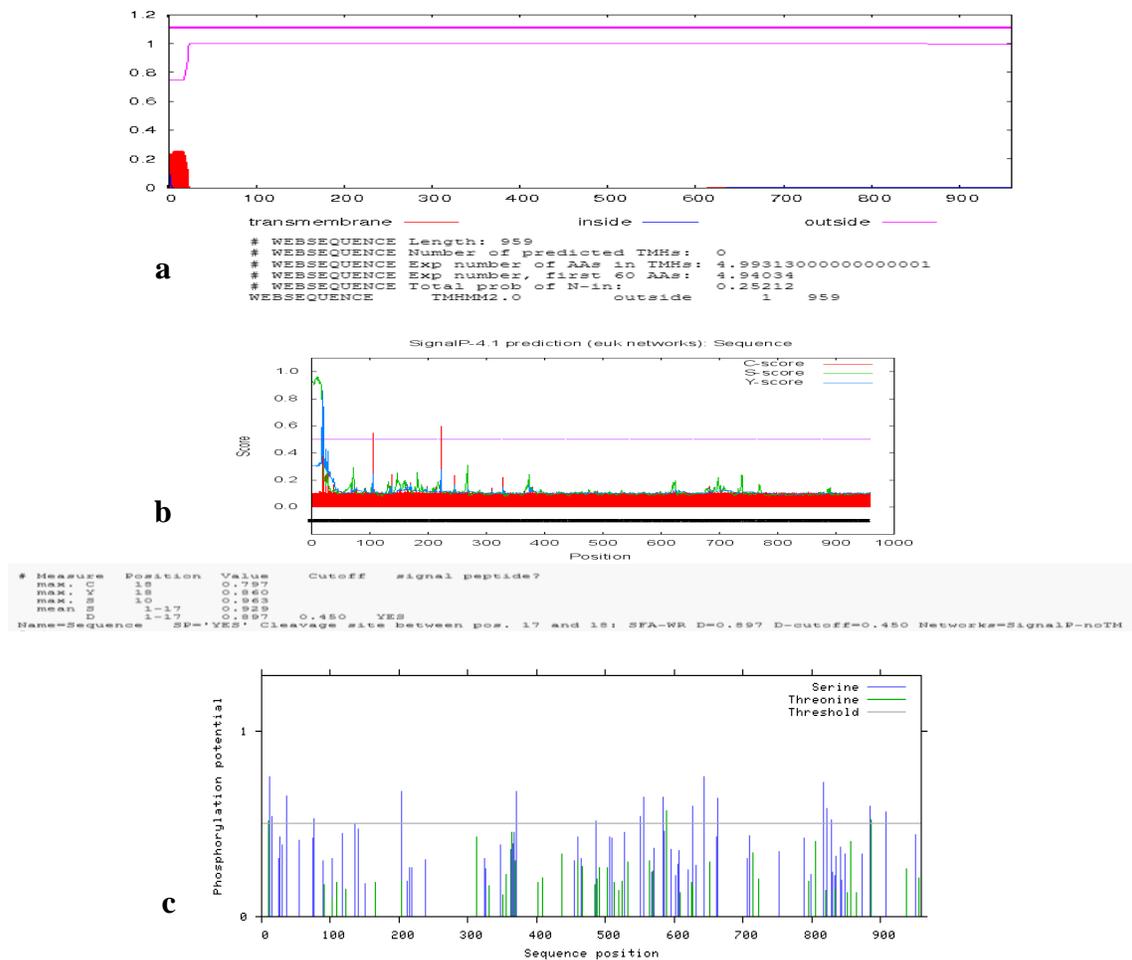


Figura 20. Predicción de dominios transmembranales de la β -glucosidasa de *M. roseri* con número de acceso GenBank ESK88175, derivada del gen tres de la secuencia con número de acceso GenBank AWSO01000688. (a) La proteína predicha pertenece a las glicosil hidrolasas de la familia 3, consta de 959 residuos de aminoácidos y un codón de terminación (TGA) y no presenta hélices integradas a membrana. (b) La predicción fue realizada con los servidores SignalP 3.0 y 4.1. Los resultados muestran que la proteína predicha es secretoria, contiene péptido señal, sitio de división de la peptidasa señal (SPase 1) I, sitio de anclaje, y los aminoácidos forman parte de la péptido señal. (c) En la predicción de sitios posibles de fosforilación, se encontraron 22 sitios de fosforilación, correspondientes a 19 residuos de Serina (Ser) (posiciones 412, 15, 37, 76, 136, 209, 371, 486, 551, 555, 583, 626, 644, 663, 817, 822, 828, 885 y 907) y tres residuos de Treonina (Thr) (10, 589 y 886).

V.III.II. Relaciones filogenéticas entre secuencias de aminoácidos de β -glucosidasa predichas pertenecientes a las glicosil hidrolasas de la familia 1 y 3 de *M. roseri* y otros hongos.

El filograma (Figura 21), muestra las relaciones evolutivas entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas β -glucosidasa predichas de *M. roseri* y las secuencias de aminoácidos de genes codificantes de enzimas β -glucosidasa de otros hongos reportadas en la base de datos GenBank de la NCBI (Cuadro 12).

Cuadro 12. Secuencias de aminoácidos de β -glucosidasa predichas pertenecientes a las glicosil hidrolasas de la familia 1 y 3 de *M. roleri* y otros hongos.

Familia correspondiente.	Número de acceso de GenBank.	Subgrupo	Bases idénticas/ total de bases comparadas.	Porcentaje máximo de identidad.	Microorganismos.	
GH1	XP007324515	Subgrupo 1a	398/518	77	<i>Serpula lacrymans</i> var. <i>lacrymans</i> S7.9	
	XP007769881		394/509	77	<i>Coniophora puteana</i> RWD-64-598 SS2	
	ESK92642		545/545	100	<i>Moniliophthora roleri</i> MCA 2997	
	Q25BW4		398/526	76	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	
	EPT01941		306/469	65	<i>Fomitopsis pinicola</i> FP-58527 SS1	
	XP012180013	Subgrupo 1b	309/468	66	<i>Fibroporia radiculosa</i>	
	EGO03448		309/468	66	<i>Serpula lacrymans</i> var. <i>lacrymans</i> S7.3	
	XP007394455		295/469	63	<i>Phanerochaete carnosus</i> HHB-10118-sp	
	XP008041268		303/468	65	<i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1	
				469/469	100	<i>Moniliophthora roleri</i> MCA 2997
	KIK57390	Subgrupo 1c	377/574	63	<i>Gymnopus luxurians</i> FD-317 M1	
	KDQ23418		339/479	71	<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15	
	KDR79471		377/552	68	<i>Galerina marginata</i> CBS 339.88	
	KDR83279		381/551	69	<i>Galerina marginata</i> CBS 339.88	
	ESK95676		580/580	100	<i>Moniliophthora roleri</i> MCA 2997	
	XP003035011		386/549	70	<i>Schizophyllum commune</i> H4-8	
	XP007300060		378/551	69	<i>Stereum hirsutum</i> FP-91666 SS1	
	KDQ55531		380/552	69	<i>Jaapia argillacea</i> MUCL 33604	
GH3	ESK84536	Subgrupo 3a	579/579	100	<i>Moniliophthora roleri</i> MCA 2997	
	KIM77406		290/582	50	<i>Piloderma croceum</i> F 1598	
	KIY66736		286/586	49	<i>Cylindrobasidium torrendii</i> FP15055 ss-10	
	XP007387033		294/590	50	<i>Punctularia strigosozonata</i> HHB-11173 SS5	
	KIL56481		284/566	50	<i>Amanita muscaria</i> Koide BX008	
	XP009543458	Subgrupo 3b	549/846	65	<i>Heterobasidium irregulare</i> TC 32-1	
	ESK95149		850/850	100	<i>Moniliophthora roleri</i> MCA 2997	
	KDR84011		545/843	64	<i>Galerina marginata</i> CBS 339.88	
	KDQ29545		546/848	64	<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15	
	KKA24129	Subgrupo 3c	561/974	58	<i>Rasamsonia emersonii</i> CBS 393.64	
	KIK63662		585/961	61	<i>Gymnopus luxurians</i> FD-317 M1	
	XP003028480		557/927	60	<i>Schizophyllum commune</i> H4-8	
ESK88175	959/959		100	<i>Moniliophthora roleri</i> MCA 2997		

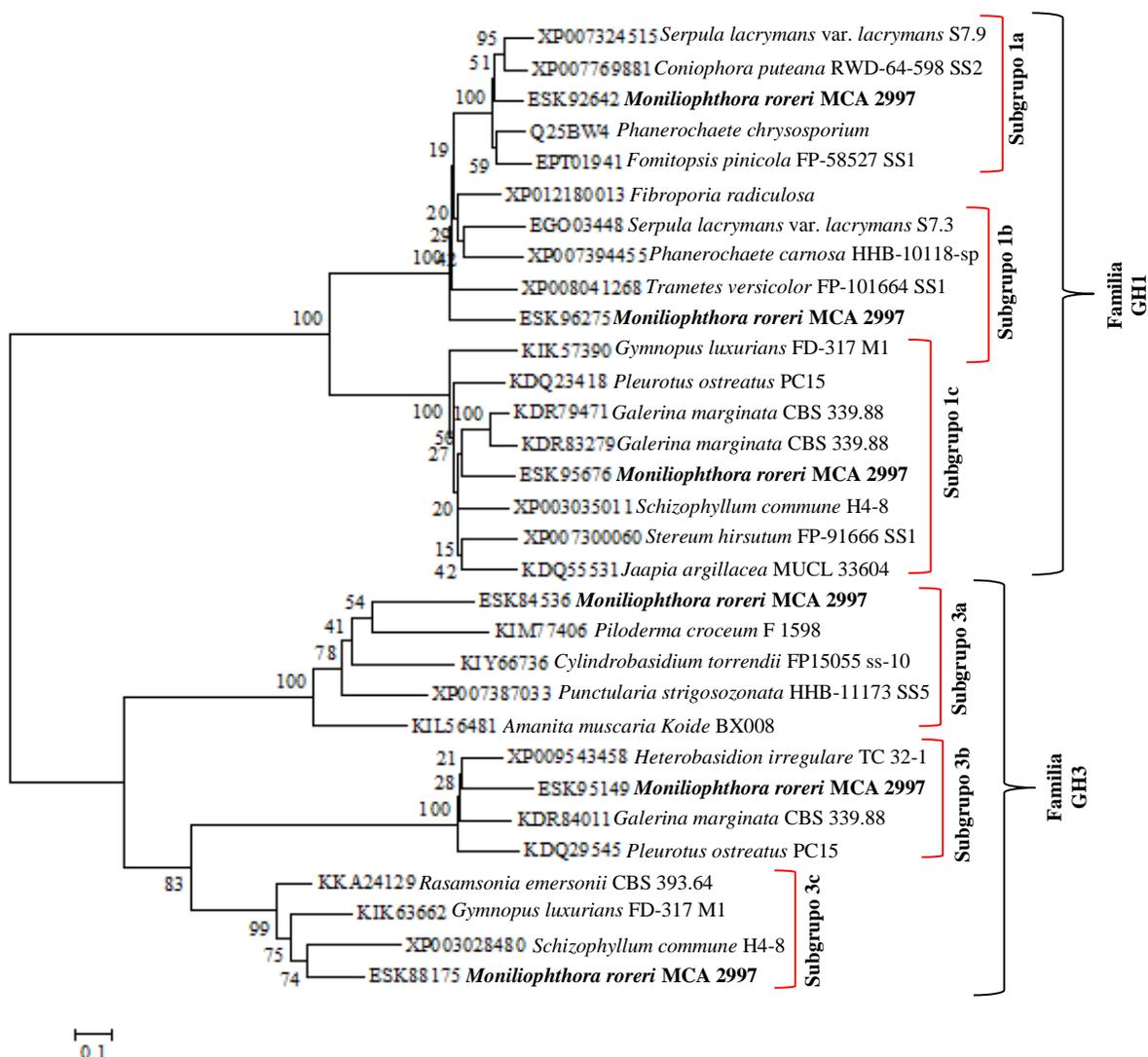


Figura 21. Relaciones filogenéticas entre las secuencias de aminoácidos de proteínas β -glucosidasa predichas de *M. roreri* y de otros hongos. Las secuencias fueron tomadas de la base de datos GenBank del NCBI. La comparación filogenética se basó en el análisis de 684 posiciones aminoacídicas por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P), el método de agrupamiento fue Neighborn-joining. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos (Sustitución de 0.1 aminoácidos/sitio). El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje. El árbol filogenético muestra dicotomía con dos diferentes grupos de β -glucosidasa inferidos por el método de Neighborn-Joining del software MEGA 6.0. L

V.IV DISCUSIÓN.

El proyecto de secuenciación shotgun del genoma completo de *M. roreri*, ha sido depositado en las bases de datos DDBJ/EMBL/GenBank bajo el número de acceso AWSO00000000. La versión descrita por Meinhardt *et al.* (2014), fue registrada como AWSO01000000. Los datos secuenciados pueden ser localizados bajo el título NCBI BioProjects. Los BioProjects PRJNA213737 y PRJNA229176 esta ligado a datos del genoma y transcriptoma respectivamente.

En este estudio, se concluyó mediante un análisis *in silico*, de los genes codificantes de proteínas con péptido señal, con alta probabilidad de ser segregado fuera del hongo, que se produjeron 1355 genes expresados en cierto nivel en muestras de mazorcas de cacao infectadas con *M. royeri* a los 30 y 60 DPI, y fueron detectados por RNA-Seq. Sólo 222 de estos genes fueron expresados diferencialmente entre las fases biotróficas y necrotroóficas, por lo anterior, se deduce que 1133 genes fueron expresados de forma no diferencial, es decir, expresados de manera simultánea en ambas fases. Las similitudes en la expresión génica entre ambas fases son mayores que las disimilitudes. Por ejemplo, los genes que codifican celulasas que degradan la pared celular vegetal, no fueron expresados en la fase biotrófica, sin embargo, se detectó su expresión. Aunque se desconocen las funciones de muchos de estos genes, su expresión aumenta la importancia del papel crítico que desempeñan tales genes en el ciclo de vida de *M. royeri*. Muchos de los genes que codifican proteínas secretadas conocidas, fueron expresados en la fase biotrófica, codifican glicosido hidrolasas putativas (GH) que actúan sobre los oligosacáridos que forman parte de la pared celular vegetal. De los 34 genes de proteínas secretadas, expresados diferencialmente, asociados a la fase biotrófica, 11 fueron glicosil hidrolasas pertenecientes a seis familias de hidrolasas (GH5, GH16, GH18, GH28, GH43, GH92), los cuales permiten a *M. royeri* interactuar con los diferentes componentes bioquímicos de la pared de las células de la mazorca. Todas las enzimas degradadoras de polisacáridos parecen funcionar en conjunto para debilitar las conexiones entre las células vegetales. La pectina es otro componente principal de la matriz intercelular de la cáscara de la mazorca de cacao (Adomako, 1972).

La fase biotrófica de *M. royeri* es una etapa compleja que requiere la modificación y degradación controlada de la pared celular permitiendo la invasión de la mazorca mientras el hongo permanece sin ser detectado sustancialmente por las defensas de la planta. Todos los genes de *M. royeri* codificando enzimas de la pared celular de la mazorca, que son inducidas en la fase biotrófica, son capaz de atacar la matriz del espacio intercelular. Esta interacción, probablemente facilita la penetración y propagación del hongo entre las células, sin provocar importantes respuestas de la planta.

En contraste, el patrón de expresión de genes codificando proteínas secretadas durante la fase necrotroófica de *M. royeri*, sugiere una ruptura mas agresiva de las estructuras de la mazorca y una expresión aumentada de genes codificantes de enzimas aril alcohol oxidasas, lacasas y glioxal oxidasas durante la fase necrotroófica. Lo anterior, sugiere que *M. royeri* hidroliza lignina durante

la fase necrotrófica. Esta evidencia se ve apoyada por el hecho de que tres de los cuatro genes aril alcohol oxidasas y tres de los cuatro genes lacasas, son exclusivamente expresados durante la fase necrotrófica. Otros genes de enzimas con expresión aumentada, pudieran tener una función en las reacciones ligninolíticas que se llevan a cabo en la fase necrotrófica, tales como peroxidasas fúngicas, amina oxidasas con cobre y dos dioxigenasas.

De forma similar a la fase biotrófica, ocho familias GH fueron también inducidas en la fase necrotrófica (Familias GH3, GH5, GH9, GH10, GH16, GH18, GH35 y GH61). Las familias GH de genes compartidos entre ambas fases, incluye la familia GH5, GH16 y GH18. Las familias GH exclusivos de la fase necrotrófica, incluyen enzimas involucradas en la degradación de la pared vegetal o de la mazorca, en compuestos que el hongo puede consumir.

Aunque los detalles específicos sobre la función exacta de los genes de familias GH son escasos, es interesante observar los patrones de expresión diferencial entre las fases biotróficas y necrotróficas (Meinhardt *et al.*, 2014).

El análisis bioinformático realizado, en el presente trabajo, a los tres genes GH3 (ESK95149, ESK88175 y ESK84536) reportados en el proyecto de secuenciación del hongo, indica que las proteínas se localizan en el citoplasma, retículo endoplásmico y citoplasma respectivamente. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, los genes que codifican celulasas que degradan la pared celular de plantas, no se expresaron en aumento pero se detectó su expresión. Por otro lado, los tres genes de la familia GH1 (ESK96275, ESK95676, ESK92642) se localizan en el citoplasma, extracelular y mitocondria respectivamente. Por lo anterior, nos surge la siguiente pregunta: ¿Cuál de los genes GH1 y GH3 es responsable de la actividad enzimática de β -glucosidasa detectada durante el cultivo del hongo en el sistema FES usando BCA y CCA como sustratos inductores? Al respecto, podemos sugerir que la proteína con número de acceso GenBank ESK95676 perteneciente a la familia GH1, pudiera ser la responsable de la actividad enzimática determinada en el presente trabajo.

La predicción de las secuencias motifs y el análisis de las relaciones filogenéticas, permitio asignar las proteínas codificantes β -glucosidasa predichas de *M. roreri*, a cada una de las familias GH1 y GH3. El parentesco de las seis β -glucosidasa predichas de *M. roreri* fue investigado en la base de datos de la NCBI usando el BLASTP y todos los hits resultaron ser proteínas β -glucosidasa pertenecientes a los grupos GH1 y GH3.

Fang *et al.*, (2010) clonaron y caracterizaron una β -glucosidasa (Bgl1A) a partir de una librería metagenómica microbiana marina con excelente tolerancia a glucosa. La proteína fue identificada como un miembro de la familia GH1 y fue recombinantemente expresada, purificada y bioquímicamente caracterizada. La secuencia deducida de Bgl1A consiste de 442 aminoácidos, con un peso molecular predicho de 49895 Da y comparte una similitud del 98% con la secuencia más alta de la β -glucosidasa de *Alteromonadales bacterium* TW-7. Al igual que todas las enzimas GH1 representativas, Bgl1A adopta esencialmente el típico plegamiento de barril $(\alpha/\beta)_8$ de la familia GH1, misma que comparten varias secuencias idénticas. En el subsitio glicona o subsitio-1, los residuos conservados requeridos para la actividad catalítica de las enzimas GH1, están todos presentes en Bgl1A. El protón catalítico donador, Glu²⁵¹ en Bgl1A, está bien conservado entre todas las proteínas GH1. La secuencia alrededor de Glu⁴⁸⁵ en Bgl1A es [VLMCI]-[LYIF]-[IV]-[STV]-E485-N-G-[VIARL], consistente con el patrón consenso de [LIVMFSTC]-[LIVFYS]-[LIV]-[LIVMST]-E-N-G-[LIVMFAR]-[CSAGN] (PROSITE: PS00572), bien conservado entre las proteínas GH1. Bgl1A mostró más del 80% de actividad enzimática en el intervalo de pH 5.5 - 7.5, con valor máximo alcanzando de pH 6.5, definido como el pH óptimo. De forma similar a los resultados descritos por Fang *et al.*, (2010), la actividad de β -glucosidasa de *M. royeri* MROCP expresada, tuvo un comportamiento similar (discutido en el capítulo IV). Los autores también reportaron que la Bgl1A hidrolizó esculina, salicina y celotetraosa a una medida limitada, sin embargo, no se detectó actividad para hidrolizar lactosa, maltosa, sucrosa y CMC. Los resultados anteriores indican que la Bgl1A, es miembro de las GH1. Sin embargo, se desconoce si es una aryl- β -glucosidasa o celobiosa.

Fan *et al.*, (2011) clonaron y caracterizaron un gen que codifica una β -glucosidasa adaptada al frío (BglU) a partir de *Micrococcus antarcticus*. El análisis de la secuencia reveló que la BglU contiene un ORF de 1419 pb que codifica una proteína de 472 aminoácidos. Con base en las predicciones de los dominios catalíticos putativos, BglU fue clasificado como un miembro de la familia de GH1. La enzima BglU recombinante fue purificada, el SDS-PAGE y la tinción en geles nativos indicó que es una proteína monomérica con un peso molecular aparente de 48, 000 Da. Este fue el primer informe de caracterización de una β -glucosidasa adaptada al frío perteneciente a GH1 de una bacteria psicrotolerante.

Nair *et al.*, (2015) realizaron la identificación y caracterización de la secuencia del gen GH de *Pythium myriotylum* PmGH1 por PCR usando oligonucleótidos iniciadores consenso. La

clonación de la secuencia del gen completo reveló un gen de 1230 pb. El análisis reveló que el gen PmGH1 codifica para una proteína citoplasmática de 421 aminoácidos, peso molecular de 46,770 Da y un *pI* teórico de 8.11. La estructura terciaria de la secuencia de aminoácidos deducida, muestra el típico plegamiento de barril (α/β)₈ de la familia GH1. La caracterización de la secuencia PmGH1 identificó los residuos del sitio activo conservados, a saber Glu 181 y Glu 399, que funcionan como un catalizador ácido-base y nucleófilo catalíticamente activo respectivamente. El análisis filogénico indicó una afiliación más cercana de PmGH1 con secuencias de la familia GH1. De forma similar a los trabajos antes descritos, tres secuencias β -glucosidasa putativas de *M. roreri*, comparten las características principales de la familia GH1. Se trata de proteínas que se caracterizan por contar con un sitio activo cuya secuencia patrón consenso es: [LIVMFSTC]-[LIVFYYS]-[LIV]-[LIVMST]-E-N-G-[LIVMFAR]-[CSAGN] (PROSITE: PS00572), un extremo amino terminal cuya secuencia consenso patrón es F-x-[FYWM]-[GSTA]-x-[GSTA](2)-[FYNH]-[NQ]-x-E-x-[GSTA] y un aminoácido E que funciona como nucleófilo.

Nakajima *et al.*, (2011) identificaron, clonaron y caracterizaron una β -glucosidasa de *Ustilago esculenta*, dando como resultado una proteína de 91000 Da que comparte una similitud del 90% de identidad significativa con una β -glucosidasa putativa de la familia GH3 de *Ustilago maydis*. Con base en la secuencia de ADN de la β -glucosidasa GH3 de *U. maydis*, se clono por PCR un gen que codifica una β -glucosidasa GH3 putativa en *U. esculenta* (Uebgl3A). De acuerdo a la secuencia de aminoácidos deducida, la proteína tiene un peso molecular de 91000 Da. La Uebgl3A recombinante expresada en *Aspergillus oryzae* libera glucosa a partir de oligosacáridos con enlaces β -1-3, β -1-4 y β -1-6, y a partir de polisacáridos 1,3-1,4- β -glucano y laminarina, indicando que Uebgl3A es una β -glucosidasa. El análisis cinético mostró que UeBgl3A hidroliza preferentemente laminaritriose y laminaritetraose. Estos resultados sugieren que UeBgl3A es una enzima clave que produce glucosa a partir de laminarioligosacáridos durante el crecimiento de *U. esculenta* en laminarina.

Abdeljalil *et al.*, (2013) amplificaron un gen β -glucosidasa (Smbgl3) de *Stachybotrys microspora* por PCR usando oligonucleótidos universales diseñados a partir de un alineamiento múltiple de la familia 3. La región codificantes de Smbgl3 consiste de 2640 pb interrumpidos por dos intrones de tamaños variados (53 pb, para el intrón 2 y 74 pb, para el intrón 1). Los ORFs codifican para una proteína putativa de 856 aminoácidos con una masa molecular predicha de 93600 Da. Un sitio de división putativo de un péptido señal entre el aminoácido 25 y 26. La β -glucosidasa (Smbgl3)

pertenece a la familia GH3. La expresión de la β -glucosidasa de la familia 3 fue estudiada en cultivos con glucosa y celulosa, monitoriando la cantidad de sus transcritos por RT-PCR. Los resultados del análisis de expresión por RT-PCR mostraron que la señal con celulosa fue más alta, tomando como control interno el gen de actina (house keeping), a la expresión sobre el medio conteniendo glucosa. Estos resultados sugieren, de alguna forma, la expresión constitutiva del gen β -glucosidasa de la familia 3, así como su alta resistencia a la inhibición de glucosa. El análisis zimograma mostró la producción de la enzima β -glucosidasa GH3 cuando el hongo fue cultivado con cada una de las fuentes de carbono: glucosa, celulosa o salvado de trigo, confirmando el patrón de expresión constitutiva del gen Smbgl3.

Se ha reportado que *A. oryzae* secreta dos β -glucosidasas distintas cuando es cultivado en cultivos líquidos sobre varios sustratos. La forma mayor tuvo un peso molecular de 130000 Da y fue altamente inhibida por glucosa. La forma menor fue inducida más eficientemente en medios ricos en quercetina, representando no más del 18% de actividad total de β -glucosidasa, pero mostrando una alta tolerancia a la glucosa. Este gen también fue mejor inducido por lactosa y sucrosa. La laminaribiosa y la gentibiosa fueron encontrados ser sustratos específicos para esta forma menor. Una β -glucosidasa tolerante a glucosa fue purificada a partir de *A. niger* (Yan y Lin, 1997), y de *Candida peltata* (Saha y Bothast, 1996).

La predicción de la localización subcelular indicó que *M. royeri* produce β -glucosidasa intracelular y extracelular (citoplásmica, mitocondrial, retículo endoplásmico, extracelular incluyendo pared celular). Estos resultados son similares a lo reportado para *Phanerochaete chrysosporium*, que produce tres diferentes β -glucosidasas de localización extracelular, intracelular y de unión a pared celular, dependiendo de la fuente de carbono. Interesantemente, la celulosa induce β -glucosidasa intracelular y extracelular (Deshpande *et al.*, 1978), mientras que la celubiosa induce β -glucosidasa intracelular y de unión a pared celular (Smith y Gold, 1979). Los estudios de expresión, de los genes bgl1A y bgl1B por RT-PCR, muestran que bgl1A fue expresado constitutivamente medios con glucosa y celobiosa, mientras que bgl1B fue expresado en cultivo de celobiosa, pero fue reprimido en medios con glucosa (Tsukada *et al.*, 2006).

Tang *et al.*, (2014), clonaron, secuenciaron y expresaron un gen de β -glucosidasa a partir de *A. oryzae* GIF-10. El gen consta de una secuencia de 2903 pb, con un ORF de 2586 nucleótidos y codifica para una secuencia de 862 aminoácidos con una señal de secreción potencial. El peso molecular de la proteína fue de 91400 Da, un punto isoeléctrico (*pI*) de 4.8. El análisis del

polipéptido reveló una señal de secreción potencial, indicando que la localización de la β -glucosidasa madura es extracelular. Los primeros 20 aminoácidos fueron asignados al péptido señal. El análisis de secuencias patrón con PROSITE (Servidor ExPASy) reveló la firma patrón del sitio activo de las GH3. El alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos, reveló algunos motifs conservados tales como DDKT-HELYLWPFADA, LK-ELGFQGF-MSDW y TVLLKN-G-PLP, y algunos aminoácidos pertenecientes a las β -glucosidasa de la familia GH3, tales como EL, G y D. En la familia GH3, el nucleófilo catalítico D281 y el ácido/base G276 o un aminoácido equivalente son altamente conservados (Xu *et al.*, 2011).

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas β -glucosidasa predichas de *M. royeri* con número de acceso ESK96275, ESK95676, ESK92642, ESK95149, ESK88175 y ESK84536, y 26 secuencias de aminoácidos de genes codificantes de enzimas β -glucosidasa de otros hongos reportadas en la base de datos GenBank de la NCBI (Cuadro 12) fueron seleccionadas y alineadas con ClustalX. El árbol concenso generado por el método de NJ mostró dicotomía con dos grupos distintos de secuencias de aminoácidos (Familia GH1 y Familia GH3 Figura 33).

El análisis *in silico* mostró que las seis proteínas β -glucosidasa predichas de *M. royeri*, pertenecen a las glicosil hidrolasas de la familia 1 y 3, agrupadas en el GH1 (ESK96275, ESK95676, ESK92642) y GH3 (ESK95149, ESK88175 y ESK84536) respectivamente. GH1 se integra por tres subgrupos 1a, 1b y 1c, bien definidos y contienen una de las tres proteínas β -glucosidasa predichas GH1 de *M. royeri*. GH3 forma tres 3a, 3b y 3c, bien definidos y contienen una de las tres proteínas β -glucosidasa predichas GH3 de *M. royeri*. Es importante señalar que el subgrupo 3b ha presentado un proceso evolutivo más reciente, comparado con los subgrupos 3a y 3c. Los subgrupos formados dentro de cada Grupo indican la evolución de la β -glucosidasa en diferentes hongos.

La comparación de la secuencia de aminoácidos (filogenia) de las dos familias de enzimas β -glucosidasa, sugiere que las β -glucosidasa GH3 lo integran enzimas más antiguas y probablemente evolucionaron a partir de una enzima ancestral común. Del mismo modo, las β -glucosidasa GH1, lo integran enzimas que pudieron haber evolucionado de forma separada. Sin embargo, es probable que ambos grupos de enzimas tengan un ancestro común.

La industria demanda enzimas estables, activas y económicas. Para dar solución a estas necesidades es necesario comprender, entre otras cosas, los mecanismos de acción de las enzimas, así como la regulación de su expresión en microorganismos celulolíticos (Gutierrez-rojas *et al.*,

2014). En este contexto, la disponibilidad de herramientas computacionales de alto rendimiento, ha proporcionado mejores oportunidades para caracterizar a las proteínas y determinar su función. En el presente estudio se generó una visión de las características bioquímicas y fisicoquímicas, así como una previsión de la evolución de las enzimas β -glucosidasa predichas descritas en el genoma de *M. roreri*.

V.V CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos en el análisis *in silico* de los genes β -glucosidasa de *M. roreri*, podemos concluir lo siguiente:

1. El genoma de *M. roreri* contiene una familia compuesta por seis genes codificantes de enzimas con actividad de β -glucosidasa / 6-fosfo- β -glucosidasa / β -galactosidasa, implicadas en el metabolismo y transporte de carbohidratos, cada subgrupo integrado por tres enzimas pertenecientes a las familias GH1 y GH3.
2. El análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos con número de acceso GenBank ESK96275, ESK95676 y ESK92642, confirma que las enzimas β -glucosidasa predichas de *M. roreri*, pertenecen a la familia GH1, y las secuencias de aminoácidos con número de acceso GenBank ESK84536, ESK95149 y ESK88175, confirma que las enzimas β -glucosidasa predichas de *M. roreri*, pertenecen a la familia GH3.
4. El valor de CAI sugiere que los seis genes codificantes de las enzimas β -glucosidasa predichas son altamente expresadas.
5. La proteína de la familia GH1 y con número de acceso GenBank ESK95676, de localización extracelular, podría ser la responsable de la actividad β -glucosidasa de *M. roreri* MROCP expresada en el sistema FES usando BCA y CCA como substratos inductores.
6. La predicción de la localización subcelular de las enzimas β -glucosidasa de las familias GH1 y GH3 de *M. roreri*, muestra que son de localización intracelular y extracelular.

V.VI LITERATURA CITADA.

- Abdeljalil S., Trigui-Lahiani H., Lazzez H., Gargouri A. 2013. Cloning, Molecular Characterization, and mRNA Expression of the Thermostable Family 3 β -Glucosidase from the Rare Fungus *Stachybotrys microspora*. *Mol Biotechnol.* 54: 842-852.
- Adomako D. 1972. Cocoa pod husk pectin. *Phytochemistry.* 11 (3): 1145.
- Altschul S., F., Gish W., Miller W., Myers E., W., Lipman D., J. 1990 Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 3: 403-410.
- Chen G., L., Chang Y., J., Hsueh C., H. 2013. PRAP: an ab initio software package for automated genome-wide analysis of DNA repeats for prokaryotes. *Bioinformatics* 29: 2683-2689.
- Chen L., H., Xiong Z.H., Sun L., L., Yang J., Jin Q. 2012. VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 40: 641-645.
- Deshpande V., Eriksson K., E., Pettersson B. 1978. Production, purification and partial characterization of 1,4- β -glucosidase enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*. *European Journal of Biochemistry.* 90: 191-198.
- Dias Z., Dias U., Setubal J., C. 2012. SIS: a program to generate draft genome sequence scaffolds for prokaryotes. *BMC Bioinf.* 13.
- Fan H., X., Miao L., L., Liu H., C., Liu Z., P. 2011. Gene cloning and characterization of a cold-adapted β -glucosidase belonging to glycosyl hydrolase family 1 from a psychrotolerant bacterium *Micrococcus antarcticus*. *Enzyme and Microbial Technology.* 10 (1): 95-99.
- Fang Z., Fang W., Liu J., Hong Y., Peng H., Zhang X., Sun B., Xiao Y. 2010. Cloning and Characterization of a β -Glucosidase from Marine Microbial Metagenome with Excellent Glucose Tolerance. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20 (9): 1351-1358.
- Gutiérrez-Rojas I., Moreno-Sarmiento N., Montoya D. 2014. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Rev Iberoam Micol.*
- Hemmerich C., Buechlein A., Podicheti R., Revanna K., V., Dong Q. 2010. An Ergatis-based prokaryotic genome annotation web server. *Bioinformatics* 26:1122-1124.
- Khorshidi R., Hassani A. 2013. Comparative analysis between TOPSIS and PSI methods of materials selection to achieve a desirable combination of strength and workability in Al/SiC composite. *Mater. Des.* 52: 999-1010.
- Kurokawa S., Kabayama J., Hwang S., D., Nho S., W., Hikima J., Jung T., S., Sakai M., Kondo H., Hirono I., Aoki T. 2013. Comparative genome analysis of fish and human isolates of *Mycobacterium marinum*. *Mar. Biotechnol. (NY)* 15: 596-605.
- Langille M., G., Hsiao W., W., Brinkman F., S. 2008. Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach. *BMC Bioinf.* 9: 329.
- Matsuzaki Y., Sato T., Akiyama Y. 2009. *In silico* screening of protein-protein interactions with all-to-all rigid docking and clustering: an application to path way analysis. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 7: 991-1012.
- Meinhardt L., W., Lacerda C., G., G., Thomazella P., T., D., Teixeira P., J., Falsarella C., M., Schuster C., S., Carlson J., E., Guiltinan M., J., Mieczkowski P., Farmer A., Ramaraj T., Crozier J., Davis R., E., Shao J., Melnick R., L., Pereira G., A., G., Bailey B., A. 2014. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. *BMC Genomics.* 15:164.
- Nair R., A., Geethu C., Sangwan A., Pillai P., P. 2015. Sequence and Bioinformatic Analysis of Family 1 Glycoside Hydrolase (GH) 1 Gene from the Oomycete *Pythium myriotylum* Drechsler. *Applied Biochemistry and Biotechnology.*
- Nakajima M., Yamashita T., Takahashi M., Nakano Y., Takeda T. 2011. Identification, cloning, and characterization of β -glucosidase from *Ustilago esculenta*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 93 (5): 1989-1998.
- Saha B., C., Bothast R., J. 1996. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel β -glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and Environmental Microbiology.* 62: 3165-3170.
- Saloheimo A., Aro N., Ilmén M., Pentilla M. 2000. Isolation of the ace1 gene encoding a cys2-His2 transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter cbh1 of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry.* 275: 5817-5825.
- Segura J., Jones P., F., Fernandez-Fuentes N. 2012. A holistic *in silico* approach to predict functional sites in protein structures. *Bioinformatics* 28: 1845-1850.
- Smith M., H., Gold M., H. 1979. *Phanerochaete chrysosporium* β -glucosidase: induction, cellular localization, and physical characterization. *Applied and Environmental Microbiology.* 37: 938-942.
- Rye C., S., Withers S., G. 2000. Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology.* 4: 573-580

- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- Tang Z., Liu S., Jing H., Sun R., Liu M., Chen H., Wu O., Han X. Cloning and expression of *A. oryzae* β -glucosidase in *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep*.
- Thompson J., D., Gibson T., J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D., G. 1997 The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25:4876-4882.
- Tsukada T., Igarashi K., Yoshida M., Samejima M. 2006. Molecular cloning and characterization of two intracellular β -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73: 807-814.
- Van Haagen H., H., Hoen P., A., De Morree A., Van Roon-Mom W., M., Peters D., J., Roos M., Mons B., Van Ommen G., J., Schuemie M., J. 2011. *In silico* discovery and experimental validation of new protein-protein interactions. *Proteomics* 11: 843-853.
- Xu R., Teng F., Zhang C., Li D. 2011. Cloning of a gene encoding β -glucosidase from *Chaetomium thermophilum* CT2 and its expression in *Pichia pastoris*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 20: 16-23.
- Yan T., R., Lin C., L. 1997. Purification and characterization of a glucose tolerant β -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 61: 965-970.
- Zeilinger S., Ebner A., Marosits T., Mach R., Kubicek C., P. 2001. The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the *cbh2* (cellobiohydrolase II-gene) activating element. *Molecular Genetics and Genomics*. 266 (1): 56-63.

CAPÍTULO VI

VI.I CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.

VI.I.I CONCLUSIONES.

1. La amplificación y secuenciación del gen 18S ADNr, permitió comprobar la identidad molecular del hongo inductor de β -glucosidasa, como *Moniliophthora roreri*.
2. *Moniliophthora roreri* produce enzimas extracelulares con actividad de β -glucosidasa cultivado bajo el sistema FES empleando BCA y CCA como sustratos.
3. El análisis “*in silico*” de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las β -glucosidasa contenidas en el genoma de *M. roreri*, permitió confirmar la clasificación de las β -glucosidasa como pertenecientes a las familias GH1 y GH3; además, de predecir las características fisicoquímicas, bioquímicas y filogenéticas.

VI.I.II RECOMENDACIONES.

1. Realizar el estudio de producción de enzimas celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasa), hemicelulasas (xilanasas y mananasas), degradadoras de pectina (poligalacturonasas, exopoligalacturonasas y exo-poli- α -galacturonosidasas) y pared celular (endo-poligalacturonasa, galactano 1,3-beta-galactosidasa, glicosil hidrolasa de pared celular, catalasa, acetilxilano esterasa y xilanasas A) de *M. roreri* cultivado en sistemas de FES y fermentación en estado líquido (FEL), empleando diversos residuos agrícolas, tratados y sin previo tratamiento.
2. Realizar el estudio de producción de enzimas celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasa), hemicelulasas (xilanasas y mananasas) y degradadoras de pectina (poligalacturonasas, exopoligalacturonasas y exo-poli- α -galacturonosidasas) y pared celular (endo-poligalacturonasa, galactano 1,3-beta-galactosidasa, glicosil hidrolasa de pared celular, catalasa, acetilxilano esterasa y xilanasas A) de *M. roreri* cultivado en sistemas de FES y fermentación en estado líquido (FEL), empleando mezclas formuladas de diversos residuos agrícolas, tratados o sin previo tratamiento según corresponda.

3. Por ultimo, por los resultados obtenidos se debe considerar la purificación de todas las enzimas antes mencionadas.

VI.I.III SIGNIFICANCIA E IMPACTO DEL ESTUDIO

La incorporación de fuentes accesibles y de bajo costo tales como el BCA, incluido en el medio para la producción de enzimas lignocelulósicas ayudará a disminuir los costos de producción de complejos enzimáticos que hidrolizan residuos celulósicos para la formación de jarabes fermentados que podrán ser utilizados en la producción de bioetanol.

ANEXOS.

Anexo I: Fórmula para calcular la actividad enzimática.

Actividad total (U ml⁻¹)

$$\text{U ml}^{-1} = \frac{(\text{Abs 410 nm}) (\text{factor de dilución de técnica}) (\text{factor de dilución de muestra})(\text{factor de la curva 9.840})}{(\text{Tiempo de incubación})}$$

Actividad específica (U mg⁻¹ proteína total)

$$\text{U mg}^{-1} \text{ Proteína total} = \frac{\text{U ml}^{-1}}{\text{mg ml}^{-1} \text{ de proteína}}$$

Anexo II: Registro GenBank NCBI de *Moniliophthora roreri* Cepa MROCP No. Acceso KMJ998972 gen 18S ADNr.

Moniliophthora roreri isolate MROCP 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KM998972.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

```

LOCUS      KM998972                1737 bp    DNA     linear   PLN 17-JAN-2015
DEFINITION Moniliophthora roreri isolate MROCP 18S ribosomal RNA gene, partial
            sequence.
ACCESSION  KM998972
VERSION    KM998972.1  GI:746589920
KEYWORDS   -
SOURCE     Moniliophthora roreri
ORGANISM   Moniliophthora roreri
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;
            Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Marasmiaceae;
            mitosporic Marasmiaceae; Moniliophthora.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1737)
AUTHORS    Concepcion-Brindis,A., Bautista-Munoz,C., Ortiz-Garcia,C.,
            Boldo-Leon,X., Hernandez-Velez,R. and Martinez-Carrera,D.
TITLE      Determination of extracellular enzyme activity and identification
            of beta-glucosidase genes from Moniliophthora roreri
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 1737)
AUTHORS    Concepcion-Brindis,A., Bautista-Munoz,C., Ortiz-Garcia,C.,
            Boldo-Leon,X., Hernandez-Velez,R. and Martinez-Carrera,D.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (15-OCT-2014) Ciencia de Alimentos e Ingenieria, Colegio
            de Postgraduados, Periferico Carlos A. Molina, Km 3.5 Carr.
            Cardenas-Huimanguillo, H. Cardenas, Tabasco 86500, Mexico
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
            source                1..1737
                                     /organism="Moniliophthora roreri"
                                     /mol_type="genomic DNA"
                                     /isolate="MROCP"
                                     /isolation_source="cocoa fruit"
                                     /host="Theobroma cacao L."
                                     /db_xref="taxon:221183"
                                     /cell_type="micelio"
                                     /country="Mexico"
                                     /collection_date="01-Sep-2013"
                                     /collected_by="Magdiel Torres De La Cruz"
                                     /identified_by="Andres Concepcion Brindis"
            rRNA                  <1..>1737
                                     /product="18S ribosomal RNA"
ORIGIN
1  cgtagtcat  tgcttgctc  aaagattaag  ccatgcatgt  ctaagtataa  acaagtttgt
61  actgtgaac  tgcgaatggc  tcattaatc  agttatagtt  tatttgatga  taccttgcta
121  catggataac  tgtggaatt  ctagagctaa  tacatgcatt  aaagccccga  cttctgggag
181  ggggtgattt  attagataaa  aaaccaacgc  ggctcgcgcc  tcacttgggt  attcataata
241  acttctcga  tcgcatggcc  ttgtgccggc  gatgcttcat  tcaaatatct  gccctatcaa
301  ctttcgatgg  taggatagag  gcctaccatg  gtttcaacgg  gtaacgggga  ataagggttc

```

Anexo II (Continuación): Registro GenBank NCBI de *Moniliophthora roreri* Cepa MROCP
No. Acceso KMJ998972 gen 18S ADNr.

```
361 gattccggag agggagcctg agaaacggct accacatcca aggaaggcag caggcgcgca
421 aattacccea tcccgacacg ggggaggtagt gacaataaat aacaaatag ggctctttg
481 ggtcttataa ttggastgag tacaatttaa atccctaac gaggaacaa tggagggcaa
541 gtctggtgcc agcagccgcg gtaattccag ctccaatagc gtatatataa gttggtgag
601 ttaaaaagct cgtagttaa cttcaggcct ggttgggagg tccgctaac ggcgtgtact
661 gtctgactgg gtcttacctc ttggtgagcc ggcgtgccct ttattggtgt gcgtcgggaa
721 accaggactt ttacccttgag aaaaattagag tgttcaaaagc aggcctatgc ctgaatacat
781 tagcatgaa taatagaata ggacgtgagg ttctatttg ttggttcta gagtcgccgt
841 aatgattaat agggatagtt gggggcattg gtattgagtc gctagagggt aaattcttgg
901 attgactcaa gaccaactac tgcgaaagca tttgccaaagc atgttttcat taatcaagaa
961 cgaaggttag gggatcgaaa acgatcagat accgtttagc tcttaacagt aaactatgcc
1021 gactagggat cggacgacct caattttgat gcgtcgttcg gcaccttacg agaaatcaaa
1081 gtctttgggt tctgggggga gtatggtcgc aaggctgaaa cttaaaggaa ttgacgggag
1141 ggcaaccaca ggtgtgggagc ctgaggctta attgactca acacggggaa actcaccagg
1201 tccagacata actaggattg acagattgat agctcttca tgattttatg ggtgggggtg
1261 catggccgtt cttagtgggt gggagtgatt gtctggttaa tccgataac gaacgagacc
1321 ttaacctgct aatatagacg gccgactttg gttggcctcc gtcttcttag agggactgtc
1381 agcgtctagc tgacggagat ttgaggcaat aacaggctcg tgatgccctt agatgttctg
1441 ggccgcacgc gcgctacact gacagagcca gcgagtgctc accttggccg aaaggctctg
1501 gtaactctgt gaactctgt cgtgctgggg atagagcatt gcaattattg ctctcaacg
1561 aggaatacct agtaagcgcg agtcacacg ttgctgtgat tacgtccctg cctttgtac
1621 acaccgcccg tcgctactac cgattgaatg gcttagtgag gtctccggat tggcttcggg
1681 gagccggcaa cggcaccctg tcgctgagaa gttgatcaaa cttggtcatt taggtga
```

//