



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Veracruz

**Análisis genómico *in silico* y clonación de una hidrolasa de
Brevibacillus thermoruber HT42**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.B.Q Norberto Daniel Vázquez Tinajero

Asesores:

Dra. Rosa María Oliart Ros

Dr. Fidel Alejandro Sánchez Flores

H. Veracruz Ver.

Junio 2017

A Dios por permitirme cumplir un paso más en mi vida académica.

A mis papás (Norberto y Hortensia), a mis hermanos (Diego y Edgar) por ser esa fuerza tan grande que no me deja caer y que me apoya incondicionalmente este logro también es de ustedes.

A mi tía Mary y a mis primos por ser un gran apoyo y permitirme con su apoyo alcanzar mis metas.

Al amor de mi vida Carolina, eres mi fuerza y el amor en mi vida, gracias por estar siempre conmigo.

A los amigos que obtuve dentro de esta aventura

RECONOMICIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca concedida para realizar mis estudios de Maestría y la financiación de mi proyecto de investigación.

A la Dra. Rosa María Oliart Ros por su apoyo, consejos, enseñanzas y por siempre motivarme a investigar y ser una persona de excelencia para la investigación.

Al Dr. Fidel Alejandro Sanchez Flores por abrirme un panorama totalmente nuevo de la bioinformática, por sus consejos y asesorías.

Al Dr. Rodolfo Quintana Castro, por sus enseñanzas, consejos y asesorías, durante el proceso de mi investigación.

Al Dr. Miguel Angel García Alvarado por sus asesorías y el interés mostrado a mi investigación.

A la Dra. Carolina Peña Montes, por sus enseñanzas, asesorías y por el apoyo e interés mostrado para llevar a cabo la culminación de mi proyecto.

A todo el cuerpo de catedráticos e investigadores de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos (UNIDA) por sus enseñanzas y dedicación en la formación de nuevos investigadores.

A la M.C. Graciela Espinosa Luna por el tiempo dedicado a enseñarme las técnicas de biología molecular, sus consejos y observaciones.

Resumen

Vázquez Tinajero Norberto Daniel. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos. Junio 2017. "Análisis genómico *in silico* y clonación de una hidrolasa de *Brevibacillus thermoruber* HT42. Asesores: Oliart Ros Rosa María, Sanchez Flores Fidel Alejandro, Quintana Castro Rodolfo, García Alvarado Miguel Angel.

Brevibacillus thermoruber HT42 fue aislado en el laboratorio de Bioquímica de la UNIDA en 2013 (M.C María Teresa Modad Reyes) de una muestra de piedra de tepezil de la zona geotérmica de Los Humeros, Puebla. Del análisis de la secuencia del gen del 16s rRNA se determinó que la cepa pertenece a la especie *Brevibacillus thermoruber* (98 % similitud).

Se han reportado diversas aplicaciones de las bacterias del género *Brevibacillus*, como huésped en la producción de proteínas recombinantes heterólogas, en la biodegradación de sustancias contaminantes, la producción de exopolisacáridos surfactantes, y la síntesis de enzimas como lipasas, proteasas, queratinasas, fosfatasas, acilasas y quitinasas.

El objetivo de este trabajo fue analizar *in silico* el genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42, encontrar genes para enzimas hidrolíticas, seleccionar una para clonarla y expresarla en *Pichia Pastoris* X33.

El genoma de *B. thermoruber* HT42 fue secuenciado en la Unidad de Secuenciación Masiva del DNA, IBT UNAM. Se analizaron los marcos abiertos de lectura obtenidos y se eligieron aquellos que codifican para enzimas hidrolíticas. Por medio de la herramienta BLASTp del NCBI se identificó por homología la función de cada enzima y se comprobaron los dominios funcionales con la herramienta PFAM del EMBI. Se seleccionó un gen que codifica para una quitinasa, se diseñaron oligonucleótidos iniciadores y se amplificó por PCR. El gen obtenido se insertó en el vector pPICZαB (vector shuttle para *E. coli* y *Pichia pastoris*), y con él se transformó *E. coli* DH5α y, a continuación, *Pichia pastoris* X33. La producción de la quitinasa recombinante ChiBVT331 se indujo con metanol. La identidad del gen clonado se verificó por secuenciación, y la proteína se analizó por medio de SDS-PAGE.

El análisis *in silico* del genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42 mostró que tiene 9304 genes de los cuales 157 codifican para hidrolasas de las subclases 3.1, 3.2, 3.4 y 3.5. Posee tres genes que codifican para quitinasas. El gen de quitinasa clonado (*chi331*) tiene un tamaño de 1280 pb, codifica para una proteína de 429 a.a y peso molecular de 47 kDa, con una homología menor al 20 % con otras quitinasas del género *Brevibacillus*. Este es el primer reporte de la presencia de quitinasas en *Breviacillus thermoruber*.

Abstract

Vázquez Tinajero Norberto Daniel. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos. Junio 2017. "Análisis genómico *in silico* y clonación de una hidrolasa de *Brevibacillus thermoruber* HT42. Asesores: Oliart Ros Rosa María, Sanchez Flores Fidel Alejandro, Quintana Castro Rodolfo, García Alvarado Miguel Angel.

Brevibacillus thermoruber HT42 was isolated in the laboratory of Biochemistry of the UNIDA in 2013 (M.C María Teresa Modad Reyes) of a sample of tepezil stone of the geothermal zone of Los Humeros, Puebla. Analysis of the sequence of the 16s rRNA gene determined that the strain belongs to the species *Brevibacillus thermoruber* (98% similarity).

Several applications of *Brevibacillus* genus, as a host in the production of heterologous recombinant proteins, in the biodegradation of pollutants, the production of exopolysaccharides surfactants, and the synthesis of enzymes such as lipases, proteases, keratinases, phosphatases, acylases and chitinases.

The objective of this work was to analyze *in silico* the genome of *Brevibacillus thermoruber* HT42, to find genes for hydrolytic enzymes, to select one to clone it and express it in *Pichia Pastoris* X33. The genome of *B. thermoruber* HT42 was sequenced in the DNA Masive Sequencing Unit, IBT UNAM. The open reading frames obtained were analyzed and those coding for hydrolytic enzymes were chosen. Using the NCBI BLASTp tool, the function of each enzyme was identified by homology and the functional domains were checked with the PFAM tool. A gene encoding a chitinase was selected, primer oligonucleotides were designed and amplified by PCR. The gene obtained was inserted into the vector pPICZαB (vector shuttle for *E. coli* and *Pichia pastoris*), and with it was transformed *E. coli* DH5α and then *Pichia pastoris* X33. Production of recombinant chitinase ChiBVT331 was induced with methanol. The identity of the cloned gene was verified by sequencing, and the protein was analyzed by means of SDS-PAGE.

In silico analysis of the *Brevibacillus thermoruber* HT42 genome showed that it has 9304 genes of which 157 code for hydrolases of subclasses 3.1, 3.2, 3.4 and 3.5. It has three genes that code for chitinases. The cloned chitinase gene (*chi331*) has a size of 1280 bp, codes for a protein of 429 a.a and molecular weight of 47 kDa, with a homology less than 20% with other chitinases of the genus *Brevibacillus*. This is the first report of the presence of chitinases in *Breviacillus thermoruber*.

CONTENIDO

Resumen	iv
Abstract	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1 Introducción	1
2 Antecedentes	3
2.1 Género <i>Brevibacillus</i>	3
2.1.1 Características del género <i>Brevibacillus</i>	3
2.1.2 Características de las especies del género <i>Brevibacillus</i>	4
2.1.3 Metabolismo	8
2.2 Importancia industrial del género <i>Brevibacillus</i>	8
2.2.1 Producción de proteína recombinante	9
2.2.2 Biodegradación	9
2.2.3 Agente de biocontrol	10
2.2.4 Producción de exo-polisacáridos	10
2.3 Descripción del genoma de <i>Brevibacillus</i>	10
2.4 Hidrolasas	12
2.4.1 Hidrolasas termofílicas	13
2.4.2 Hidrolasas reportadas para el género <i>Brevibacillus</i>	14
2.4.3 Genes de hidrolasas del género <i>Brevibacillus</i> reportados en la base de datos del NCBI	15
2.5 Análisis <i>in silico</i> del genoma de especies de <i>Brevibacillus</i>	16

2.6 Quitinasas	18
2.6.1 Quitinasas reportadas en el género <i>Brevibacillus</i>	19
2.7 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión.	20
2.7.1 Quitinasas clonadas en <i>Pichia pastoris</i>	20
3 Hipótesis.....	22
4 Objetivos	22
4.1 Objetivo general.....	22
4.2 Objetivos específicos	22
5 Metodología.....	23
5.1 <i>Brevibacillus thermoruber</i> HT42	23
5.2 Identificación de Hidrolasas <i>in silico</i>	23
5.2.1 Análisis del genoma	24
5.2.2 Elección del gen de interés	24
5.2.3 Diseño de oligonucleótidos de Chi 331	25
5.2.4 Vector de clonación.....	25
5.3 Construcción del vector recombinante pPICZαB <i>chi</i> 331 en <i>E. coli</i> DH5α...	27
5.3.1 Cepas y condiciones de cultivo	27
5.3.2 Extracción del DNA cromosómico	27
5.3.3 Extracción del vector pPICZαB	27
5.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
5.3.5 Digestión de los productos de PCR y del vector	30
5.3.6 Ligación de los productos de PCR y vector.....	30
5.3.7 Obtención de células competentes de <i>E. coli</i> DH5α	31
5.3.8 Transformación de las células competentes de <i>E. coli</i> DH5α	31
5.3.9 Identificación de las células transformadas	31

5.3.10 Confirmación de inserción del gen	32
5.3.11 Electroforesis en gel de Agarosa con Bromuro de Etidio.	33
5.4 Clonación en <i>Pichia Pastoris</i>	33
5.4.1 Obtención de células electrocompetentes de <i>Pichia pastoris</i> X33	33
5.4.2 Digestión del vector recombinante pPICZ α B <i>chi</i> 331	34
5.4.3 <i>Electroporación de Pichia Pastoris</i> X33	34
5.4.4 Identificación de <i>P pastoris</i> X33 recombinante.	35
5.4.5 Confirmación de inserción del gen por PCR de colonia y PCR anidada	35
5.4.6 Inducción de la proteína recombinante ChiBVT331	36
5.4.7 Analisis de la expresión de la proteína recombinante ChiBVT 331 por medio de SDS-PAGE	36
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6.1 Analisis in silico de <i>Brevibacillus thermoruber</i> HT42.....	38
6.2 Identificación del gen <i>chi</i> 331.....	49
6.2.1 Análisis filogenético de quitinasas del género <i>Brevibacillus</i>	51
6.3 Amplificación por PCR del gen de <i>chi</i> 331	52
6.3 Confirmación de amplificación de producto de PCR por secuenciación	52
6.4 Identificación del vector recombinante pPICZ α B <i>chi</i> 331.....	53
6.4.1 Selección de las colonias transformadas de E. coli DH5 α	53
6.4.2 Comprobación por diferencia de tamaño entre el vector pPICZ α B y el vector recombinante pPICZ α B <i>chi</i> 331.....	54
6.4.3 Comprobación de inserción de gen por PCR	55
6.4.4 Comprobación de marco de lectura del gen <i>chi</i> BVT 331	56
6.5 Identificación de la clonación del gen recombinante <i>chi</i> BVT 331 en <i>Pichia Pastoris</i> X33 transformada por electroporación.	57

6.6 Analisis de la expresión de la proteína recombinante ChiBVT 331 por SDS-PAGE.....	59
CONCLUSIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA	62
APENDICE A.....	66
APENDICE B.....	72

LISTA DE TABLAS

TABLA 2.1 Taxonomía del género <i>Brevibacillus</i> (De vos, 2009)	3
TABLA 2.2 Características de las especies del género <i>Brevibacillus</i> (De vos, 2009), (Choi, 2010), (Inan, 2012), (Hatayama, 2014), (Hugon, 2013), (Kim, 2009), (Kadriye, 2016), (Wen-Dong, 2016) y (Takebe, 2012)	5
TABLA 2.3 Características del genoma de las cepas de diferentes especies de <i>Brevibacillus</i> reportadas en NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2015)	11
TABLA 2.4 Clasificación de las hidrolasas (Boyce, 2001)	12
TABLA 2.5 Hidrolasas termófilas de interés industrial (Boyce, 2001)	14
TABLA 2.6 Enzimas reportadas para el género <i>Brevibacillus</i> (Osamu, 1996), (Allan, 2005), (Baek, 2006), (Choi, 2010), (Goto, 2004), (Hatayama, 2014), (Inan, 2012), (Kim, 2009), (Hugon, 2013), (Logan, 2002) y (Takebe, 2012)	14
TABLA 2.7 Genes para hidrolasas de <i>Brevibacillus</i> reportadas en el NCBI	15
TABLA 5.1 Composición para la PCR MyTaqDNA Polymerase™	29
TABLA 5.2 Programa para la PCR	29
TABLA 5.3 Mezcla de MasterMIX® para realizar PCR	32
TABLA 5.4 Programa para PCR de colonia	36
TABLA 6.1 Resumen de la búsqueda <i>in silico</i> de enzimas hidrolíticas en el genoma de <i>Brevibacillus thermoruber</i> HT42	38
TABLA 6.2 Comparación de los genomas reportados para diversas especies del género <i>Brevibacillus</i>	48
TABLA 6.3 Secuencia del péptido señal en nucleótido y en aminoácidos	50
TABLA 6.4 Porcentaje de relación entre los distintos tipos de quitinasas reportadas para el género <i>Brevibacillus</i>	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 5.1 Mapa del vector pPICZ α B	26
FIGURA 6.1 Alineación de la secuencia de aminoácidos del gen <i>chi</i> 331 en la herramienta Blastp.	49
FIGURA 6.2 Alineación de los nucleótidos por medio de la herramienta Pfam	50
FIGURA 6.3 Arbol filogenético de quitinasas reportadas para el genero <i>Brevibacillus</i>	51
FIGURA 6.4 Identificación del peso molecular del gen amplificado por PCR usando electroforesis en gel de agarosa al 1 %.	52
FIGURA 6.5 Colonias transformadas de <i>E. coli</i> DH5 α en Agar LB con Zeocina.	53
FIGURA 6.6 Colonias resembradas de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas.	54
FIGURA 6.7 Electroforesis en gel de agarosa 1 % de los vectores extraídos de las cepas de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas.	55
FIGURA 6.8 Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de PCR utilizando como templado el vector recombinante pPICZ α B <i>chi</i> 331 obtenido de la cepas transformadas.	56
FIGURA 6.9 Analisis de los dominios funcionales del gen <i>chi</i> /BVT 331 obtenido por PCR del vector recombinante pPICZ α B <i>chi</i> 331	57
FIGURA 6.10 Secuencia de aminoácidos codificada por el gen <i>chi</i> /BVT 331	57
FIGURA 6.11 Electroforesis en gen de agarosa al 1 % de los productos de PCR con los oligonucleótidos AOX1.	58
FIGURA 6.12 Electroforesis en gen de agarosa al 1 % de los productos de PCR anidada con los oligos <i>chi</i> 331.	58
FIGURA 6.13 Gel de electroforesis en poliacrilamida de las proteínas producidas por <i>Pichia pastoris</i> X33 transformada con el gen <i>chi</i> /BVT 331.	60

1 Introducción

El análisis genómico *in silico* es una técnica que permite identificar, mediante las herramientas bioinformáticas, los genes que se encuentran presentes dentro del genoma de un microorganismo, los cuales ayuden a entender como se desenvuelve este en su medio ambiente y, a la vez estudiar su potencial biotecnológico, analizando aquellos genes que están involucrados en el metabolismo para la degradación o producción de un compuesto en específico o en la codificación de enzimas de interés industrial.

El género *Brevibacillus* ha demostrado tener un interés industrial debido a la capacidad de ciertas especies de producir exopolisacaridos que se pueden utilizar para la recuperación mejorada del petróleo, la biodegradación de compuestos tóxicos, agentes de biocontrol infectando a nemátodos e insectos y como hospedero para producción de proteínas heterologas (Lee (2004), Bihari (2010), Panda (2014)).

Actualmente existen 26 proyectos (27 contando el de este trabajo) de secuenciación de genomas de distintas especies del género *Brevibacillus* de los cuales solo 2 (*B. brevis* y *B. laterosporus*) se encuentran completos, y los otros se encuentran en distintas etapas de secuenciación.

Las hidrolasas son una familia de enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de diversos tipos de enlaces. La Unión Internacional de Química Aplicada y Pura (IUPAC) establece que este tipo de enzimas pertenecen la familia 3 (Boyce, 2001). A nivel industrial las hidrolasas son ampliamente utilizadas por distintos tipos de industrias como: la alimenticia, farmacéutica, textil o de detergentes, debido a que su uso como aditivo o catalizador, reduce significativamente los costos comparado con los procesos químicos convencionales, además de añadir un valor ecológico, al reducir el uso de sustancias contaminantes dentro de los procesos (Kirk *et al.*, 2002).

Brevibacillus thermoruber HT42 fue aislado de muestras de piedra tipo tepezil a 42 °C en la zona geotérmica de Los Humeros, Puebla. Con el objetivo de encontrar e

identificar enzimas hidrolíticas de interés industrial dentro del genoma de *B. thermoruber* HT42, se extrajo el DNA genómico y se mando a secuenciar a la Unidad de Secuenciación Masiva del DNA del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México.

Se observo que el genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42 consta de 9304 genes de los cuales 157 codifican para hidrolasas de las subclases, 3.1, 3.2, 3.4 y 3.5, entre las que se encontraron: xilanasas, esterases, glicosidasas, lipasas, proteasas, peptidasas, quitinasas, fosfatasas, amilasa, aminidasas, nitrilasa, sulfatasa, exonucleasas, lactamasas, dehalogenasas, y otras hidrolasas que no se lograron identificar.

Se selecciono para clonar y expresar en *Pichia Pastoris* el gen *chi* 331 que codifica para una quitinasa, se eleigió este gen debido a que presentaba un péptido señal lo cual indicaba que esta se exprotaba fuera de la célula y a la importancia industrial que tienen las quitinasas, en la industria agroalimentaria, farmacéutica y química (Dahiya *et al.*, 2006).

2 Antecedentes

2.1 Género *Brevibacillus*

El género *Brevibacillus* pertenece a la familia Paenibacillaceae, y lo conforman 22 especies. En la tabla 2.1 se muestra su ubicación taxonómica.

TABLA 2.1 Taxonomía del género *Brevibacillus* (De vos, 2009)

REINO	Bacteria
PHYLUM	Firmicutes
CLASE	Bacilli
ORDEN	Bacillales
FAMILIA	Paenibacillaceae
GÉNERO	<i>Brevibacillus</i>
ESPECIES	22

2.1.1 Características del género *Brevibacillus*

A partir de las investigaciones que realizó Osamu en 1996, se demostró que las bacterias pertenecientes al grupo de *Bacillus brevis*: *Bacillus brevis*, *Bacillus agri*, *Bacillus centrosporus*, *Bacillus choshinensis*, *Bacillus parabrevis*, *Bacillus parabrevis*, *Bacillus reuszeri*, *Bacillus formosus* y *Bacillus borstelensis* pertenecen a un género diferente, de acuerdo a los estudios filogenéticos que se realizaron del ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) 16s. También se demostró filogenéticamente que *Bacillus laterosporus* y *Bacillus thermoruber* pertenecen al mismo grupo de *Bacillus brevis*. A este nuevo género se le llamó *Brevibacillus*, y agrupa bacterias con las siguientes características (Osamu, 1996):

- Pueden tener metabolismo aeróbico o anaeróbico facultativo
- Tienen forma de bastón o barra
- Pueden ser gram positivos o gram negativos

- Tienen movilidad por un flagelo peritricoso
- Forman endoesporas elipsoidales que son formadas en una hinchada esporangia.
- Las colonias son delgadas, lisas y de un gris amarillento y un pigmento no soluble es producido en agar nutritivo.
- Los ácidos grasos mayoritarios son el ácido 12-metil-tricadecanoico, ácido 13-metil-tetradecanoico y el ácido 12-metil-tetradecanoico.

El género *Brevibacillus* está compuesto por 22 especies que son:

1. *Brevibacillus brevis* (Osamu, 1996)
2. *Brevibacillus agri* (Osamu, 1996)
3. *Brevibacillus aydinogluensis* (Kadriye, 2012)
4. *Brevibacillus borstelensis* (Osamu, 1996)
5. *Brevibacillus centrosporus* (Osamu, 1996)
6. *Brevibacillus choshinensis* (Osamu, 1996)
7. *Brevibacillus fluminis* (Mi-Jin, 2010)
8. *Brevibacillus formosus* (Osamu, 1996)
9. *Brevibacillus fulvus* (Kouta, 2014)
10. *Brevibacillus ginsengisoli* (Sang-Hoon, 2006)
11. *Brevibacillus gelatini* (Kadriye, 2016)
12. *Brevibacillus invocatus* (Logan, 2002)
13. *Brevibacillus laterosporus* (Osamu, 1996)
14. *Brevibacillus levickii* (Allan, 2005)
15. *Brevibacillus limnophilus* (Keiiche, 2004)
16. *Brevibacillus massiliensis* (Perrine, 2013)
17. *Brevibacillus nitrificans* (Fumihiko, 2012)
18. *Brevibacillus panacihumi* (Kyum, 2009)
19. *Brevibacillus parabrevis* (Osamu, 1996)
20. *Brevibacillus reuszeri* (Osamu, 1996)
21. *Brevibacillus sedimini* (Xian, 2016)
22. *Brevibacillus thermoruber* (Osamu, 1996)

2.1.2 Características de las especies del género *Brevibacillus*

Las características de las especies del género *Brevibacillus* se muestran en la tabla 2.2.

TABLA 2.2 Características de las especies del género *Brevibacillus* (De vos, 2009), (Choi, 2010), (Inan, 2012), (Hatayama, 2014), (Hugon, 2013), (Kim, 2009), (Kadriye, 2016), (Wen-Dong, 2016) y (Takebe, 2012)

Especie	Gram	Respiración	Tamaño μm	Características de las colonias	T óptima	pH óptimo	Sitio de aislamiento
<i>Brevis</i>	+	aerobia estricta	0.7-0.9 x 3.0-5.0	Espeso, de color crema y brillantes.	30-50°C	5.5-9	Suelos, polvo, leche, rizósfera y productos de papel
<i>Agri</i>	+	aerobia estricta	0.5-1 x 2.0-5.0	Traslucidas, lisas, pequeñas y circulares	5-40 °C	5.6-9	Suelos, agua, especímenes clínicos, leche esterilizada y plantas farmacéuticas.
<i>Aydinogluensis</i>	+	Aerobias	0.3-0.6 x 2.0-4.3	Lisas, brillantes, de color amarillo pálido y circulares.	35-65	6-10	Lodo y agua de fuentes termales
<i>Borstelensis</i>	+	aerobia estricta	0.5-0.9 x 2.0-5.0	Planas, lisas y circulares	20-50 °C	5.5-5.6	Suelos
<i>Centrosporus</i>	+	aerobia estricta	0.5-1.0 x 2.0-6.0	Sin pigmentos, translucidas, pequeñas, lisas y circulares	10-40	5.6-9	Heces, especímenes clínicos, espinacas y rizósfera de estuarios.
<i>Choshinensis</i>	+	aerobia estricta	0.5 x 3.0	Color amarillo pálido	15-50	5-5.9	Suelo

<i>Fluminis</i>	+	Aerobia estricta		Circulares y blancas	20-45	5.0-8.0	Estuarios
<i>Formosus</i>	+	aerobia estricta	0.5-0.9 x 2.0-5.0	Sin pigmento, planas, lisas y circulares	10-45	5.5-5.6	Suelo
<i>Fulvus</i>	+ o variable	Aeróbica	0.5-0.8 x 2.0-5.0	Circulares, brillantes, pequeñas, con una coloración café en el centro y amarillo en los bordes	20-55	5.0-9.0	Pila de composta
<i>Ginsengisoli</i>	+	aerobia o facultativa mente anaerobia	0.3-0.5 x 3.5-5	Lisas, circulares, color blanco brillante y de forma convexa	20-42	5.0-8.5	Suelo de campos de ginseng
<i>Gelatini</i>	Variable	Facultativa mente anaerobia	0.8-1.0 x 2.0-3.5	Lisas, circulares, de forma convexa y color blanco cremoso	20-50	6.0-9.0	Fuente de agua termal
<i>Invocatus</i>	-	aerobia estricta	0.5-1.0 x 2.0-6.0	Color amarillo parduzco, algunas con zonas blancas en el margen, el centro es opaco, tienen apariencia aceitosa, con superficies sedosas.	15-35	6.0-8.5	Aislado de una planta de fermentación farmacéutica y del antibiótico en crudo.
<i>Laterosporus</i>	+,- y variable	anaerobio facultativo	0.5-0.9 x 2.0-5.0	Lisas, de color blanco crema,	15-50	5.7-7	Suelos, salinas, agua de

				con bordes irregulares.			grifo, larvas de abejas melíferas enfermas, insectos, productos de papel, ambientes marinos e infecciones oculares.
<i>Levickii</i>	+	Microaerofilicas	0.7-0.8 x 2.0-5.0	Circulares, planas, color crema y apariencia mate.	15-55	4.5-6.5	Suelos geotermales.
<i>Limnophilus</i>	Variabile	aerobio estricto	0.5-0.6 x 2.2-4.0	Circulares, lisas, convexas, translucidas y de un color beige pálido	20-45	6.5-8.0	
<i>Massiliensis</i>	+	Aerobias	0.74 x 4.3	Grises	30-45		Flora fecal
<i>Nitrificans</i>	+	Aerobia estricta	0.5-0.7 x 1.7-3.3	Circulares, amarillas y translucidas	16-44	5-8	Plantas de tratamiento de aguas residuales.
<i>panacihumi</i>	+	Aerobia	0.3-0.6 x 4.0-10.0	Circulares y de una coloración amarillo pálido	15-42	5-9	Suelos de campos de ginseng
<i>Parabrevis</i>	+	aerobio estricto	0.5-0.9 x 2.0-4.0	Planas, lisas y con una coloración gris amarillenta.	20-50	5.5-9.0	Especímenes clínicos y quesos
<i>reuszeri</i>	+	aerobio estricto	0.5-0.9 x 2.0-5.0	Planas, lisas y circulares	10-45	5.5-5.6	Suelos

<i>Sediminis</i>	+	Aerobia	4.5-0.7 x 1.5-2.6	Circulares, brillantes, planas y blancas azuladas	37-65	6.0-8.0	Aguas termales
<i>Thermoruber</i>	+	aerobio estricto	0.8-1.0 x 2.5-4.8	Expandidas, lisa, rojas brillantes	38-58	5.0 8.0	Aislado de composta.

2.1.3 Metabolismo

Las especies del género *Brevibacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden ser termófilas, psicrófilas, acidófilas, alcalófilas y halófilas. Pueden utilizar como alimento para su crecimiento una amplia gama de fuentes de carbono, y se han encontrado especies de este género en rocas, suelos, viento, ambientes acuáticos y en los intestinos de varios animales (Panda, 2014).

Estudios que se han realizado a *Brevibacillus brevis* han demostrado que es capaz de usar como fuente de carbono: glucosa, galactosa, manosa, lactosa, maltosa, sacarosa y manitol. Sin embargo se sabe que, a excepción de *Brevibacillus thermoruber* que es capaz de usar D-xilosa como fuente de carbono, ninguna otra especie de *Brevibacillus* es capaz de utilizar como fuente de carbono L-arabinosa y D-xilosa. (Panda, 2014),

También se sabe que *Brevibacillus laterosporus* que puede crecer anaeróbicamente por una parcial o completa desnitrificación, y que las cepas de *Brevibacillus ginsengisoli* pueden crecer anaeróbicamente usando al nitrato como el aceptor final de electrones (Panda, 2014).

2.2 Importancia industrial del género *Brevibacillus*

Especies del género *Brevibacillus* han sido utilizadas para diversas aplicaciones biotecnológicas e industriales, como se ejemplifica a continuación.

2.2.1 Producción de proteína recombinante

Algunas especies se han utilizado como hospederos para la producción de proteínas recombinantes. *B. choshinensis* es una de las especies de *Brevibacillus* con una capacidad excepcional para la expresión de proteínas heterólogas y un excelente hospedador para la producción de proteínas intracelulares solubles en el citoplasma sin la formación de cuerpos de inclusión. El sistema de expresión de *Brevibacillus* permite tener una alta producción de la proteína seleccionada en forma secretada. Existen disponibles comercialmente vectores lanzadera entre *B. choshinensis* y *E. coli* con promotores constitutivos e inducibles. El vector pNCMO2 es uno de los que más se utilizan para la producción de proteínas heterólogas debido a que contiene un promotor P2 derivado de una proteína de la pared de la célula hospedadora *B. choshinensis* (Panda, 2014).

2.2.2 Biodegradación

Se ha estudiado la biodegradación de Polietileno de baja densidad (LDPE) utilizando *B. parabrevis*, el cual puede utilizar una película de LDPE como fuente de carbono y degradarlo completamente a dióxido de carbono, formando biopelículas (Panda, 2014).

El trifenil estaño o TPT es un compuesto disruptor de los sistemas endócrinos, que es un contaminante ambiental altamente tóxico, importante debido a que se utiliza como antiincrustrante en las pinturas y como antifúngico. Se ha observado que *B. brevis* es capaz de realizar una biosorción del TPT y que ésta aumenta agregando H₂O₂, glucosa y ramnolípidos (Panda, 2014).

Brevibacillus sp. P-6 es una cepa que ha mostrado capacidad de remover el fenol en concentraciones menores a 200 mg/L (Panda, 2014)

Mediante un análisis del genoma de *Brevibacillus* sp. cepa BAB-2500 se encontró que posee los genes para la enzima arsenato reductasa, que cataliza la reacción de arsenato a arsenito, y de cistationina β liasa, la cual le confiere resistencia a

aluminio, lo que sugiere que esta cepa puede aplicarse en el mejoramiento de los suelos de cultivo contaminados con metales y ácidos (Panda, 2014).

2.2.3 Agente de biocontrol

Algunas especies tienen aplicación como agentes de biocontrol. Por ejemplo, *Brevibacillus laterosporus* infecta a nemátodos y a insectos del orden de los Lepidópteros y Coleópteros, debido a que produce una proteasa extracelular. Produce también metabolitos con actividad antifúngica, por lo que puede servir como agente de biocontrol de enfermedades en plantas producidas por hongos. *B. brevis* cepa XDH produce un pequeño péptido llamado Tostadina que tiene actividad antibacterial (Panda, 2014).

2.2.4 Producción de exo-polisacáridos

B. brevis es capaz de producir un exopolisacárido que tiene aplicaciones medioambientales e industriales potenciales en la recuperación mejorada del petróleo o para la bioremediación de sitios marinos contaminados con hidrocarburos (Panda, 2014). También ha sido reportado la producción de exopolisacáridos por *Brevibacillus thermoruber* (Radchenkova, 2011).

2.3 Descripción del genoma de *Brevibacillus*

Diversos estudios han analizado el genoma de especies del género *Brevibacillus* y han reportado que se conforma de un solo cromosoma con un tamaño de entre 4.8 y 7 millones de pares de bases (Mb), y con un porcentaje de Guanina-Citosina (GC%) que va del 41% al 58% según el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

De los genomas que se encuentran reportados dentro de esta base de datos, solo de nueve especies de *Brevibacillus* se encuentra la secuencia completa. Las características generales de estos genomas se resumen en la tabla 2.3.

TABLA 2.3 Características del genoma de las cepas de diferentes especies de *Brevibacillus* reportadas en NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2015)

Especie	Cepa	Estado del proyecto	Tamaño del genoma	(GC%)	Genes
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	LMG15441	Completo	5.11 Mb	41.1	4,495
	DSM 25	En proceso	5.28 Mb	40.5	4,755
	GI-9	En proceso	5.18 Mb	40.8	4,555
	PE36	En proceso	5.14 Mb	41.1	4,526
	B9	En proceso	5.27 Mb	41.3	4,561
	Uniss_18	En proceso	5.23 Mb	41.1	4,710
<i>Brevibacillus brevis</i>	NBRC100599	Completo	6.3 Mb	47.3	5,929
	X23	En proceso	6.59 Mb	46.8	6,288
	FJAT-0809-GLX	En proceso	6.02 Mb	47.3	5,596
	DZQ7	En proceso	6.43 Mb	47.4	5,995
	ATCC 35690	En proceso	6.12 Mb	47.3	5,878
	GZDF3.1	En proceso	6.43 Mb	46.8	6,143
	NBRC110488	En proceso	6.28 Mb	47.3	6,045
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	AK1	En proceso	5.16 Mb	52	5,039
	3096-7	En proceso	5.46 Mb	51.4	5,357
	cifa_chp40	En proceso	5.2 Mb	51.9	5,087
<i>Brevibacillus thermoruber</i>	423	En proceso	4.43 Mb	58.4	4,259
	PM1	En proceso	4.93 Mb	57.5	4,809
<i>Brevibacillus agri</i>	5-2	En proceso	5.51 Mb	54.2	5,297
	BAB-2500	En proceso	5.39 Mb	53.5	5,383
<i>Brevibacillus panacihumi</i>		En proceso	5.55 Mb	50.1	5,413
<i>Brevibacillus reuzeri</i>		En proceso	6.99 Mb	47	6,805
<i>Brevibacillus formosus</i>		En proceso	6.22 Mb	47.4	5,748
<i>Brevibacillus massiliensis</i>		En proceso	5.06 Mb	53.1	4,970

<i>Brevibacillus choshinensis</i>		En proceso	6.28 Mb	48.3	6,090
<i>Brevibacillus parabrevis</i>		En proceso	5.65 Mb	51.5	5,371

2.4 Hidrolasas

Las hidrolasas son una familia de enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de enlaces C-C, C-N, C-O, y otro tipo de enlaces, como el enlace anhídrido fosfórico. Debido a la especificidad de estas enzimas es difícil hacer una regla general para nombrarlas, la Unión Internacional de Química Aplicada y Pura (IUPAC) establece que este tipo de enzimas pertenecen a la familia 3 y se clasifican dependiendo del tipo de enlace sobre el que actúan como se muestra en la tabla 2.4 (Boyce, 2001).

TABLA 2.4 Clasificación de las hidrolasas (Boyce, 2001)

EC 3.1	Actúan sobre enlaces éster.
EC 3.2	Actúan sobre enlaces glucosídicos.
EC 3.3	Actúan sobre enlaces éter.
EC 3.4	Actúan sobre enlaces peptídicos.
EC 3.5	Actúan sobre enlaces carbono-nitrógeno no peptídicos.
EC 3.6	Actúan sobre los anhídridos de los ácidos.
EC 3.7	Actúan sobre los enlaces carbono-carbono
EC 3.8	Actúan sobre los enlaces haluro.
EC 3.9	Actúan sobre los enlaces fósforo-nitrógeno.
EC 3.10	Actúan sobre los enlaces azufre-nitrógeno.
EC 3.11	Actúan sobre los enlaces carbono-fósforo.
EC 3.12	Actúan sobre los enlaces azufre-azufre.
EC 3.13	Actúan sobre los enlaces carbono-azufre.

Las hidrolasas tienen diversas aplicaciones dentro de la vida cotidiana, como industriales: las proteasas, amilasas, mannanasas y lipasas se usan como aditivos de los detergentes para mejorar la efectividad de estos, debido a la actividad que tienen para hidrolizar residuos específicos. Las Xilanasas y β -Glucanasas se han utilizado durante décadas como aditivos en la alimentación de animales herbívoros no rumiantes, debido a la incapacidad de estos de degradar alimentos con altos

contenidos de celulosa o hemicelulosa. En la industria alimenticia el uso de enzimas lipolíticas se ha incrementado los últimos años, debido a su uso como emulsificantes, las α -amilasas y las xilanasas se utilizan como aditivos que ayudan a que el pan mantenga la suavidad y la elasticidad, en la actualidad las fosfolipasas se están usando para remover fosfolípidos de aceites vegetales (Kirk *et al.*, 2002).

2.4.1 Hidrolasas termofílicas

Las enzimas termófilas presentan características únicas, como una alta termoestabilidad y resistencia contra agentes desnaturizantes tales como detergentes, agentes caotrópicos, solventes orgánicos y pH's extremos. Estas propiedades de las enzimas termófilas han llamado la atención debido a su posible aplicación en procesos industriales (Niehaus, 1999).

Se ha observado que los procesos industriales que se llevan a cabo a altas temperaturas permiten que haya una mayor biodisponibilidad y solubilidad de los sustratos, también disminuye la viscosidad e incrementa el coeficiente de difusión de estos compuestos (Niehaus, 1999).

Debido a la complejidad de los medios de cultivo y temperaturas de crecimiento de los microorganismos termófilos, la industria ha optado por la clonación de los genes que codifican para estas enzimas termófilas y su inserción en microorganismos mesófilos (Niehaus, 1999).

Se ha observado que las enzimas que han sido clonadas en los organismos mesófilos son capaces de conservar su termoestabilidad, permanecen plegadas a bajas temperaturas, no son hidrolizadas por las proteasas del huésped, y pueden ser fácilmente separadas de las proteínas del hospedero por desnaturización térmica (Niehaus, 1999).

El interés de la industria hacia las enzimas hidrolíticas termófilas es por su capacidad de hidrolizar biopolímeros a las elevadas temperaturas que pueden encontrarse en los procesos industriales. Ejemplos de estas enzimas hidrolíticas que provienen de microorganismos termófilos se presentan en la tabla 2.5.

Metalloproteasa	ND	+																		
Dipeptidasa	ND	+																		

1 *Brevibacillus brevis* 2 *Brevibacillus agri* 3 *Brevibacillus aydinogluensis* 4 *Brevibacillus borstelensis* 5
Brevibacillus centrosporus 6 *Brevibacillus choshinensis* 7 *Brevibacillus fluminis* 8 *Brevibacillus formosus* 9
Brevibacillus fulvus 10 *Brevibacillus ginsengisoli* 11 *Brevibacillus invocatus* 12 *Brevibacillus laterosporus* 13
Brevibacillus levickii 14 *Brevibacillus limnophilus* 15 *Brevibacillus massiliensis* 16 *Brevibacillus nitrificans* 17
Brevibacillus panacihumi 18 *Brevibacillus parabrevis* 19 *Brevibacillus reuszeri* 20 *Brevibacillus thermoruber*

P: Posible Actividad

N.D: No existen Datos

2.4.3 Genes de hidrolasas del género *Brevibacillus* reportados en la base de datos del NCBI

En la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) se encuentran reportadas las secuencias de nucleótidos de genes que codifican para hidrolasas de tres especies de *Brevibacillus* (tabla 2.7). En el caso de *Brevibacillus thermoruber* (motivo de este trabajo) sólo se encuentra la secuencia del gen para una lon proteasa.

TABLA 2.7 Genes para hidrolasas de *Brevibacillus* reportadas en el NCBI

Género	Especie	Gen	Codifica	Fuente
<i>Brevibacillus</i>	<i>brevis</i>		Lon proteasa	(Ito Kimio, 19992)
<i>Brevibacillus</i>	<i>brevis</i>	Ker	Serin-Queratinasa	(Jaouadi Nadia Zarai, 2013)
<i>Brevibacillus</i>	<i>laterosporus</i>	Npr4	Proteasa extracelular	(Tian Baoyu, 2007)
<i>Brevibacillus</i>	<i>laterosporus</i>		Glutaril-7-acilasa	(Aramori Ichiro, 1991)
<i>Brevibacillus</i>	<i>laterosporus</i>	Apr	Precursor de Serin-proteasa	(Huang Xiaowei, 2005)
<i>Brevibacillus</i>	<i>thermoruber</i>	lon	Lon proteasa	(Lee Alan Y. L., 2004)

2.5 Análisis *in silico* del genoma de especies de *Brevibacillus*

El análisis *in silico* de un genoma es una técnica que permite encontrar las secuencias que codifican para productos génicos utilizando herramientas bioinformáticas, y mediante la comparación de secuencias conocidas de estos productos génicos reportados en un microorganismo de la misma especie, género o familia con el genoma que se está analizando.

Este tipo de análisis permite la realización de un trabajo más rápido para poder encontrar la secuencia de un gen de interés, debido a que utiliza la información que se encuentra en las bases de datos en línea, para poder encontrar mediante las secuencias consenso, el gen de interés que se está buscando y estudiando.

Como se mostró en la tabla 2.3, existen proyectos en los que se está secuenciando el genoma de distintas especies de *Brevibacillus*; de esta secuenciación se obtiene información acerca de la cantidad de genes codificantes para diversos productos génicos que pueden ser de interés biotecnológico e industrial.

Existen estudios para el género *Brevibacillus* en los que, mediante un análisis *in silico* del genoma, han encontrado las secuencias de enzimas que permiten explicar las actividades específicas que se han reportado para este género y su utilidad.

Djukic *et al.* (2011) secuenciaron el genoma de *Brevibacillus laterosporus* LMG 15441, que es una bacteria que infecta a las larvas de las abejas melíferas (*Apis mellifera*). Para la elucidación de su secuencia se utilizó un equipo 454 GS FLX de Roche 454 Life Science. Encontró que el genoma de *Brevibacillus laterosporus* tiene un tamaño de 5.1 Mb, y que posee seis grupos de genes híbridos que codifican para policétidos sintasas y péptido sintasas no ribosomales, cinco grupos de genes que codifican para péptido sintasas no ribosomales, y cuatro genes simples que codifican también para péptido sintasas, y que participan en la formación de toxinas que afectan a las larvas de las abejas melíferas. También encontraron genes que codifican para flagelina, proteína que es un componente principal en los flagelos, los cuales se relacionan con el potencial de patogenicidad del microorganismo.

Joshi *et al.* (2013) analizaron el genoma de *Brevibacillus sp.* BAB-2500 aislado de un contaminante de laboratorio. La secuenciación del genoma se realizó en el equipo Ion Torrent Personal Genome. Para la anotación del genoma se utilizaron los programas Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) del NCBI, utilizando GeneMark, Glimmer y el servidor Rapids Annotation Using Subsystems Technologies (RAST) de la base de datos SEED. Encontraron que el genoma tiene un tamaño de 5.3 Mb dentro del cual se localizan 5,457 genes. Dentro del genoma se identificaron genes para la síntesis de las vitaminas B12 y B5. También se identificó un gen que codifica para una arsenato reductasa que cataliza la reacción del arsenato a arsenito, así como un gen que codifica para cistationina β liasa, la cual contribuye en la resistencia a aluminio del *Brevibacillus*. Estos hallazgos pueden sugerir que esta bacteria juega un papel importante en la mejora de la producción de cultivos en suelos contaminados con metales o ácidos. Wang *et al.* (2014) aislaron un *Brevibacillus panacihumi* cepa W25 de un suelo contaminado por hidrocarburos en China, encontrando que es capaz de degradar petróleo crudo en presencia de 40 g/L de NaCl. Para poder entender este comportamiento y encontrar los genes que estaban relacionados con esta actividad, secuenciaron el genoma utilizando el equipo Illumina Hiseq 2000, y encontraron que el tamaño de su genoma es de 5.5 Mb y que contiene alrededor de 5,294 secuencias codificantes. Mediante un análisis se lograron identificar siete genes que participan en la degradación de hidrocarburos: uno codifica para una alcano monooxigenasa y seis codifican para dioxigenasas, que son capaces de romper los anillos aromáticos, confiriendo a esta bacteria la capacidad de degradar los hidrocarburos.

She *et al.* (2014) aislaron un *Brevibacillus agri* cepa 5-2 a partir del agua que se encuentra en pozos petroleros en China, y observaron que este microorganismo es capaz de degradar tetradecano, hexadecano y alcanosulfanatos. Con el fin de estudiar e identificar los mecanismos por medio del cual *Brevibacillus agri* es capaz de degradar estos compuestos hidrocarbonados, se secuenció su genoma, utilizando para esto un equipo de secuenciación Illumina HiSeq 2000 y el programa Velvet 1.2.07; para la predicción y anotación de los genes se utilizó el programa

Glimmer. Encontraron que el genoma tiene un tamaño de 5.5 Mb, en el cual se encuentran 5,067 genes. Se realizó un alineamiento del genoma con la Base de Datos de Grupos Ortólogos (COG) por medio de la herramienta BLASTp del NCBI para poder encontrar los genes funcionales y se identificó la presencia de dos genes que codifican para dos alcanos-1-monooxigenasas, una alcanosulfanato monooxigenasa, una proteína transportadora de alcanosulfanatos, una sulfato permeasa y cinco proteínas transportadoras de sulfatos. Estos genes son capaces de explicar la capacidad de este microorganismo de degradar compuestos hidrocarbonados y organosulfurados.

Li *et al.* (2015) aislaron un *Brevibacillus laterosporus* cepa B9 a partir del suelo de cultivos de arroz (*Oryza sativa*) y encontraron que esta cepa tiene propiedades de biocontrol debido a la formación de una biopelícula y a la producción de antibióticos. Para la secuenciación del genoma de esta bacteria se utilizó un equipo PacBio RS II de la empresa Pacific Biosciences utilizando el programa SMRT Analysis 2.2.1 y la anotación se hizo utilizando el programa en línea del NCBI (PGAAP). Se encontró que el tamaño del genoma es de 5.2 Mb con 5,031 genes. Para poder encontrar los genes que participan en la formación de las biopelícula y de los antibióticos se utilizó la herramienta de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)n, alineando el genoma con los genes de referencia de las bacterias del orden Bacillales. Encontraron solo dos genes asociados a los mecanismos de formación de biopelículas, y genes asociados con la síntesis de cinco diferentes antibióticos: bacitricina, fenanizna, molibdopterina, estreptomina y lantonina. Estos genes se pueden encontrar en grupos de genes operones, sin embargo estos genes que se encontraron pueden explicar la capacidad de agente de biocontrol que tiene esta cepa.

2.6 Quitinasas

Las quitinasas son enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de los enlaces β -1,4-glicosídicos de la quitina. Se encuentran ampliamente distribuidas en la

naturaleza en bacterias, hongos, plantas, insectos y algunos vertebrados (Meena, 2014). Las quitinasas pueden agruparse en 3 familias de glicosil hidrolasas las cuales 18, 19 y 20. Las quitinasas de la familia 18 incluyen quitinasas de bacterias, hongos, virus, algunas plantas y animales, las de familia 19 incluyen quitinasas de plantas (clases I, II y IV) y algunas quitinasas de *Streptomyces*, la familia 20 incluye algunas β -N-acetilhexosaminidasas de bacterias, *Streptomyces* y humanos (Dahiya *et al.* 2006)

Actualmente hay mucho interés en el estudio de las quitinasas debido a sus potenciales aplicaciones biotecnológicas, especialmente en el campo de la agricultura, donde se ha probado su uso como agente de biocontrol de hongos fitopatógenos e insectos nocivos para los cultivos, ya que la quitina es un componente importante de su estructura (exoesqueleto). Se ha sugerido que las quitinasas pueden servir como un componente adicional o alternativo a los pesticidas o fungicidas que se utilizan en la actualidad (Meena, 2014).

Las quitinasas pueden usarse también para la producción de N-acetilglucosamina, quitooligosacaridos y glucosamina, que tienen un potencial farmacéutico inmenso, para la preparación de fármacos. Debido a que muchos hongos producen quitinasas, estas pueden servir para la estimación de la biomasa en suelos por medio de la detección de la actividad quitinolítica, debido a que se ha demostrado la correlación entre esta y la biomasa total de hongos, no así con las bacterias. Un uso médico de las quitinasas sería en su uso como aditivo de los fármacos antifúngicos (Dahiya *et al.* 2006).

2.6.1 Quitinasas reportadas en el género *Brevibacillus*

Se ha reportado la presencia de quitinasas en especies del género *Brevibacillus*. Se estudió una quitinasa extracelular producida por *Brevibacillus formosus* BISR-1, que fue aislada del Gran Desierto de la India. Después de su purificación, se estimó que la proteína tiene un peso molecular de 37.6 kDa, por medio de electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE). En pruebas de actividad se

encontró que la enzima es activa en un rango de pH de 5.0 a 10 y en un rango de temperaturas de 20 a 55 °C (Meena, 2014).

También se han estudiado las quitinasas producidas extracelularmente por *Brevibacillus laterosporus*, que fue aislado del suelo de un pantano en la India. Las quitinasas fueron purificadas usando una columna de afinidad, y se analizó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), en el que se observaron dos bandas de peso molecular de 90 y 70 kDa, las cuales correspondían a una quitodextrinasa (90 kDa) y a una quitinasa (70 kDa). Se encontró que tienen actividad en un rango de pH de 4.0 a 10.0 y a un rango de temperatura de 40 °C a 80 °C (Prasanna, 2013).

2.7 *Pichia pastoris* como sistema de expresión.

Pichia pastoris ha sido utilizado como un sistema de clonación y expresión de enzimas heterólogas, debido a que tiene grandes ventajas como el procesamiento postraduccional de la enzima a expresar, a que permite altos niveles de expresión, la clonación del gen heterólogo se realiza por recombinación genética por homología con el genoma, por lo que una vez obtenida la cepa recombinante, ésta no perderá la información introducida.

La expresión de la proteína recombinante se realiza por inducción con metanol, debido a que durante la recombinación se intercambia el gen de la alcohol oxidasa (AOX1) por una región promotora homóloga del gen AOX1 incluida en el vector a la cual se le inserta el gen de interés. La expresión gen AOX1 es fuertemente regulada por el metanol, lo que se traduce en altos niveles de expresión de la enzima recombinante al momento de la transformación (Invitrogen Corporation).

2.7.1 Quitinasas clonadas en *Pichia pastoris*

Existen estudios de la clonación de quitinasas en *Pichia pastoris* usando diferentes vectores y cepas.

Banani *et al.* (2015) clonaron el gen de una quitinasa de *Metschnikowia fructicola* en una cepa de *Pichia pastoris* KM71 utilizando un vector pPIC9.

Fan *et al.* (2007) clonaron el gen de una quitinasa de *Beauveria bassiana* en *E. coli* BL21 (DE3) y *P. pastoris* GS115 utilizando un vector pET28a y pPIC9K, respectivamente, y encontraron que *P. pastoris* GS115 permitió una mayor expresión de la quitinasa recombinante, además de reportar que la expresión en *E. coli* resultaba en la formación de cuerpos de inclusión, lo cual dificultaba la posterior purificación de la quitinasa recombinante.

Wang & Yang (2009) clonaron el gen de una quitinasa de *Chaetomium cupreum* en una cepa de *Pichia pastoris* GS115 utilizando un vector pPIC9K, encontraron que pasadas 120 horas de inducción la quitinasa presentaba una mayor actividad, lo cual se relacionaba por que a esa hora había una mayor cantidad de la enzima y que esta se encontraba en el sobrenadante, lo que confirmaba la expresión extracelular.

Ueda *et al.* (2017) clonaron el gen de una quitinasa de *Eisenia fetida* en una cepa de *Pichia pastoris* GS115 utilizando un vector pPICZ α A, encontraron que esta quitinasa se expresaba de manera extracelular y que presentaba actividad exoquitinolítica en las pruebas de actividad.

Estas investigaciones muestran que el uso de *Pichia pastoris* como hospedero favorece una alta expresión de las quitinasas clonadas y que, dependiendo del vector, este permite la expresión extracelular de las mismas.

3 Hipótesis

El análisis *in silico* del genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42 permitirá identificar genes que codifican para enzimas hidrolíticas extracelulares.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Clonar y expresar una quitinasa de *Brevibacillus thermoruber* HT42 obtenida a partir del análisis *in silico* del genoma.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar genes que codifican para hidrolasas en el genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42.
- Seleccionar una quitinasa y expresarla en *Pichia pastoris* X33.

5 Metodología

5.1 *Brevibacillus thermoruber* HT42

La cepa utilizada en este trabajo fue *Brevibacillus thermoruber* HT42, que fue aislada por de la zona geotermal Los Humeros, Puebla, a partir de una muestra de 200 g de piedra tipo Tepezil a 42° C (M.C. María Teresa Modad Reyes, tesis en curso, Doctorado Ciencias en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz). Para ello, 40 g de piedra fueron cultivados en 40 mL de medio de cultivo LB (Apéndice B), a 55 °C, por 12 h con agitación a 100 rpm. Posteriormente, por medio de resiembra en placa, se obtuvo el cultivo puro, y se realizó la identificación taxonómica por medio de la secuenciación del gen 16S rRNA y su alineamiento en la base de datos BLASTn (Basic Local Alingment Search Tool), encontrando que presenta una similitud del 98% con un *Brevibacillus thermoruber*.

Para poder realizar una mejor identificación se extrajo el DNA génomico y se mandó a secuenciar a la Unidad de Secuenciación Masiva del DNA del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

5.2 Identificación de Hidrolasas *in silico*

Para llevar a cabo el análisis *in silico* del genoma, se extrajo el DNA cromosómico de *Brevibacillus thermoruber* HT42 utilizando el kit ISOLATE II Genomic DNA de la marca Bioline siguiendo las instrucciones del fabricante.

La secuenciación se llevo a cabo en la Unidad de Secuenciación Masiva del DNA del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

5.2.1 Análisis del genoma

Los resultados de la secuenciación del genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42 se presentaron fragmentados por marcos abiertos de lectura (ORF) (en formato .exe). La lista contiene número ID del ORF, la secuencia, el tamaño en pares de bases, la localización de dominios funcionales, la presencia de péptido señal y la ubicación ontológica del producto génico. El análisis del genoma se realizó buscando en la anotación del genoma el número PFAM correspondiente a distintos tipos de sitios funcionales de hidrolasas, y eligiendo la secuencia de nucleótidos (formato .mod) y determinando la secuencia de aminoácidos de un gen determinado. Con la secuencia, se realizó una búsqueda por medio de la herramienta Blastp del NCBI, para confirmar y conocer el tipo de hidrolasa para el que codifica el gen elegido. La presencia de péptido señal en el gen fue un factor de selección, ya que así se identifican las enzimas que son probables de exportarse fuera de la célula y tener función extracelular. Se analizaron 9304 ORFs.

5.2.2 Elección del gen de interés

Se eligió el gen que codifica para una quitinasa, el cual se nombro “*chi 331*” (*chi* porque que codifica para una quitinasa y 331 por que es su numero de identificación en el genoma), el gen tiene un tamaño total de 1287 pares de bases y codifica para un producto de 429 aminoácidos que, de acuerdo al análisis por medio de la herramienta PFAM, tiene un dominio funcional de Glicosil Hidrolasa 18 el cual pertenece a la superfamilia de las quitinasas. La secuencia completa del gen *chi 331* se encuentra en el apéndice A.

5.2.3 Diseño de oligonucleótidos de Chi 331

Para el diseño de los oligonucleótidos, primero la secuencia de *chi* 331 se analizó por medio de la herramienta en línea NEB cutter de la empresa New England Biolabs (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) para conocer cuáles son las enzimas de restricción que podrían cortar el gen y descartarlas.

Después se seleccionaron dos enzimas de restricción que no cortaran al gen y cuyos sitios estuvieran presentes en el vector pPICZαB: *EcoRI* y *SacII* para incluirlos de manera que flanquearan al gen y se insertara en el vector en el marco de lectura adecuado para la posterior expresión del gen. Los oligonucleótidos quedaron diseñados de la siguiente manera:

Directo (32 bases, T_m= 58 °C *EcoRI*) 5'-CGGAATTCTGACATGTCTATCTTTTCTGTGG-3'

Reverso (30 bases, T_m= 56 °C *SacII*) 5'-TCCCGCGGGACCATTTTCCGTTGCGCTG-3'

Siendo la zona de azul el sitio de restricción y la zona roja la que corresponde al gen.

Se realizó un análisis *in silico* del producto de PCR resultante utilizando los oligos diseñados y el gen *chi* 331 como templado, utilizando el programa Serial Cloner 2.6 y se obtuvo un producto de 1309 pares de bases

Para la determinación de la T_m (melting Temperature o Temperatura de fusión) se utilizó la Regla de Wallace (R. Bruce Wallace, 1979) que solo contempla los nucleótidos que se van alinear, la fórmula es la siguiente:

$$T_m = 2^\circ \text{C} (A+T) + 4^\circ \text{C} (G+C)$$

5.2.4 Vector de clonación

Se utilizará un vector lanzadera (shuttle) pPICZαB para la expresión del gen *chi* 331 en *P. pastoris*. El vector pPICZαB tiene un tamaño de 3,597 pares de bases, cuenta

un sitio múltiple de clonación que incluye un sitio rico en Histidinas que facilita la purificación de la proteína recombinante usando una columna de cromatografía por afinidad, presenta una secuencia de α -factor de *Sacharomyces cerevicae* para permitir la producción extracelular de las proteínas heterologas, presenta un gen *Sh ble* el cual le confiere resistencia a la Zeocina y que sirve como marcador de la inserción del vector, presenta un sitio pUC ori el cual permite la replicación de este vector en *E. coli*, tiene una secuencia del gen AOX1 el cual permite la inserción del gen recombinante en el genoma de *P. pastoris* por medio de un mecanismo de recombinación genética por homología, además de la inducción por metanol de la proteína recombinante.

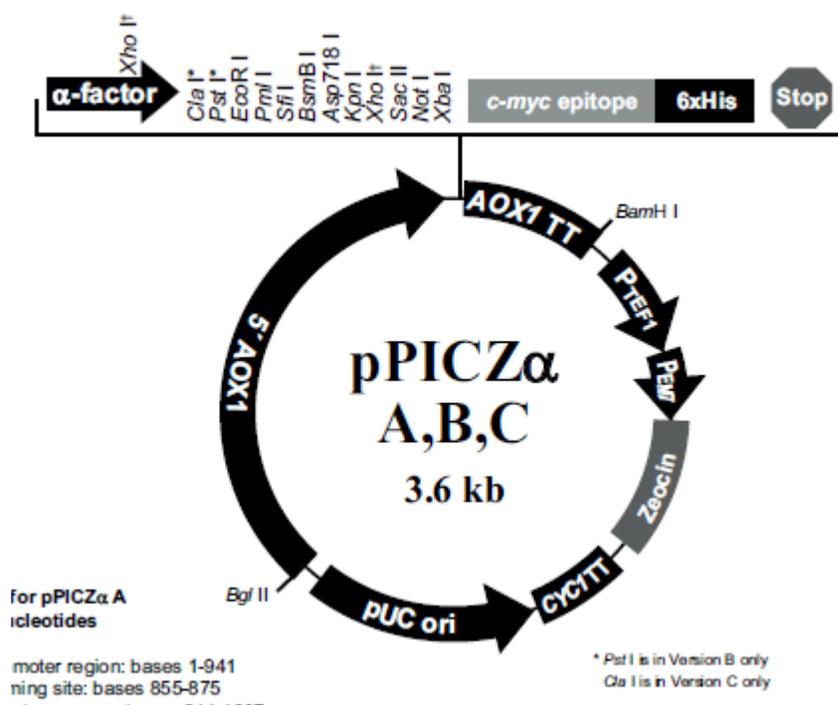


FIGURA 5.1 Mapa del vector pPICZ α B

5.3 Construcción del vector recombinante pPICZαB*chi*331 en *E. coli* DH5α

5.3.1 Cepas y condiciones de cultivo

Se inocularon 200 µL de un cultivo conservado en glicerol de *Brevibacillus thermoruber* HT42 a un tubo de ensayo con 2 mL de medio LB estéril durante 12 horas a 55 °C con una agitación de 150 rpm y también se inocularon 200 µL de un cultivo conservado en glicerol de *E. coli* DH5α con el plasmido pPICZαB a un tubo de ensayo con 2 mL de medio LB esteril con Zeocina (Invitrogen, 25µg/mL) y se creció durante 12 horas a 37 °C y con una agitación de 150 rpm.

5.3.2 Extracción del DNA cromosómico

La extracción del DNA cromosómico de *Brevibacillus thermoruber* HT42 se realizó utilizando el kit ISOLATE II Genomic DNA de la marca Bioline siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.3.3 Extracción del vector pPICZαB

La extracción del vector pPICZαB de *E. coli* DH5α se realizó usando el método de extracción de DNA plámidico por lisis alcalina con duodecil sulfato de sodio (SDS) (Sambrook, 2001). Una vez obtenido el cultivo (inciso 5.2.1), se inoculo a un matraz de 40 mL de medio LB y se cultivaba en las mismas condiciones. Las células se cosecharon por centrifugación a 11, 000 rpm por 5 minutos en una centrifuga Beckman J-2-J21, y se agregan 500 µL de Lisis Alcalina I (Apéndice B), se resuspendio por vortex. A 100 µL del resuspendido, se le agregan 200 µL de solución de Lisis II (Apéndice B) y se mezcla por medio de inversión (5 veces se pone en hielo), y se agregaron 150 µL de solución de Lisis III (Apéndice B) se mezcla por inversión 10 veces y se deja incubar en hielo por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 13, 000 rpm, y al sobrenadante se

le agregó 1 mL de etanol absoluto y se mezcló por vortex 5 segundos, se deja reposar la mezcla durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 5 minutos a 13, 000 rpm. Se retiró el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta, se secaron los tubos poniéndolos sobre una toalla de papel cabeza abajo y se les agregó etanol al 70% (v/v) se agitó por inversión 10 veces y se centrifugó a 13, 000 rpm durante 2 minutos. Se retiró el sobrenadante con una pipeta cuidadosamente y se dejaron secar con la tapa abierta durante 20 minutos, una vez que estuvieron secos se les agregó 50 μ L de solución TE pH (8.0) (Apendice B) y se resuspendió por vortex 5 segundos. Para comprobar la extracción del vector, se sometió una muestra de 10 μ L a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio a 90V por 45 minutos. Los 40 μ L restantes del vector, se purifican con el kit FavorPrep® GEL/PCR purification MiniKit. La concentración de DNA plasmídico se determinó por absorbancia a 260 nm en un equipo Nanodrop 2000c de la marca Thermo Scientific®.

5.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El gen *chi* 331 se amplificó por PCR usando el DNA genómico de *Brevibacillus thermoruber* HT42 como templado, la enzima polimerasa MyTaqDNA Polymerase™ de la marca Biorad y los oligonucleótidos iniciadores diseñados (Sección 5.2.3) se preparó la formulación que se presenta en la tabla 5.1 para la realización de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) con el objetivo de amplificar el gen *chi* 331 para obtener un buen número de copias del gen.

La PCR se realizó en un termociclador T100 Thermo Cycle de la marca Biorad® y se ajustaron las temperaturas usando la Temperatura de desnaturalización del DNA (94 °C), de alineación de los oligonucleótidos tomando en cuenta un promedio entre la temperatura de alineamiento del oligonucleótido Directo (58 °C) y Reverso (56 °C) siendo esta de 57 °C y de elongación (72 °C). En la tabla 5.2 se muestran las condiciones del programa para realizar la PCR.

Se confirmó la amplificación del gen *chi* 331 mediante electroforesis con gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio corriendo el contenido total (100 μ L) de la mezcla de PCR a 90V por 45 minutos se purifica de banda utilizando el kit FavorPrep® GEL/PCR. La concentración del DNA amplificado se determinó por medio del equipo Nanodrop 2000c de la marca Thermo Scientific®.

TABLA 5.1 Composición para la PCR MyTaqDNA Polymerase™

Componente	Volumen (μ L)
Amortiguador MyTaq™	20
MgCl ₂	10
dNTP's	3.5
Oligonucleótido Directo	5
Oligonucleótido Reverso	5
Polimerasa MyTaq™	0.5
DNA	1
H ₂ O libre de nucleasas	55
Total	100

TABLA 5.2 Programa para la PCR

Ciclo	Repeticiones	Temperatura (°C)	Tiempo (mins)
1	1	94	3
2	30	94	1.5
		57	1.5
		72	2.5
3	1	72	7

5.3.5 Digestión de los productos de PCR y del vector

Para poder insertar el gen *chi* 331 en el vector *pPICZαB*, tanto el gen como el vector se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SacII* (Invitrogen®). Para digestión del gen *chi* 331 la reacción se realizó con cada una de las enzimas de manera independiente, por 4 horas a 37 °C; para digerir *pPICZαB* la reacción de digestión se realizó por 1 hora a 37 °C con *SacII* y 1.5 horas con *EcoRI*. La reacción de digestión se realizó agregando 1 μL de enzima a un 1μg de DNA, tanto del inserto como del vector, posteriormente se añadió 2 μL de la solución amortiguadora de reacción específica para cada enzima, y se ajustó la mezcla con agua libre de nucleasas a un volumen total de 20 μL.

La purificación del producto de la reacción de digestión se realizó con el kit FavorPrep® GEL/PCR purification MiniKit al término de cada digestión, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

5.3.6 Ligación de los productos de PCR y vector

Una vez que el inserto y el vector se encontraron purificados, se cuantificó la concentración al final de las dos digestiones por medio de un equipo de Nanodrop 2000c de la marca Thermo Scientific®, y se calculó la cantidad de ng de inserto y de vector para realizar la reacción de ligación, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ng vector} = \frac{\text{Kb Inserto}}{\text{Kb vector}} \times \left(\text{relación molar} \frac{\text{Inserto}}{\text{vector}} \right) = \text{ng inserto}$$

Se utilizó el kit T4 DNA Ligase de la marca Thermo Fisher®, se realizaron las mezclas de vector e inserto utilizando relaciones molares 1:1 y 5:1, se añadió 0.2 μL de la ligasa T4, 2 μL de la solución amortiguadora de reacción y se ajustó a 10 μL. Se incubó la reacción a 22 °C por 1 h, y se utilizó inmediatamente para la transformación o se guardó a -20 °C hasta su utilización.

5.3.7 Obtención de células competentes de *E. coli* DH5 α

La obtención de las células competentes se realizó por el método de cloruro de calcio, inoculando 200 μ L de *E.coli* DH5 α en 2 mL de medio LB estéril a 37 °C durante 12 h a 150 rpm. Posteriormente, se traspasaron los 2 mL a un matraz de 40 mL de medio LB estéril y se cultivó a 37 °C y 150 rpm hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de 0.4. Se centrifugó por 7 min a 4000 rpm a 4 °C, y el paquete celular se resuspendió en 25 ml de CaCl₂ 100mM frío y se mantuvo en hielo durante 5 min. El paquete celular se recuperó por centrifugación a 4000 rpm a 4 °C por 7 min y se resuspendió con 0.5 mL de CaCl₂ 100 mM frío. Las células se mantuvieron en hielo de 1 a 12 horas para utilizarse para la transformación (Cohen, 1972).

5.3.8 Transformación de las células competentes de *E. coli* DH5 α

Para la transformación de las células competentes de *E. coli* DH5 α se tomaron 50 μ L de células competentes y se les adicionó 5 μ L del producto de ligación en un tubo eppendorf, se mezcló suavemente y se incubó el tubo en hielo durante 30 min, después el tubo se incubó a 42 °C en un baño María por 45-60 seg, y se colocó en hielo por 2 min. La mezcla se inoculó en un tubo de ensayo con rosca con 1 mL de medio LB estéril y se incubó por 45 min a 37 °C con una agitación de 150 rpm (Cohen, 1972).

5.3.9 Identificación de las células transformadas

Para la identificación de las células transformadas con el vector recombinante se traspasara el mL de células transformadas a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifugara durante 30 segundos a 5000 rpm a 4 °C, se descartara el sobrenadante, excepto por la gota que queda en el fondo y en esa gota se

resuspenderan las células transformadas, la gota con las células transformadas resuspendidas se inocularan y se cultivara por la técnica de vertido en placa en una caja Petri con medio LB-agar con Zeocina a 37 °C por 12 horas. (Cohen Stanley N., 1972). Las colonias que crecieron en el medio con el antibiótico son las que poseen el vector.

5.3.10 Confirmación de inserción del gen

Se tomaron células de las colonias con un palillo de madera estéril y se sembraron por estriado en una caja Petri con medio LB-agar con zeocina y se cultivaron a 37 °C por 12 h; el palillo con el que se picó la colonia se depositó en un tubo de ensaye con 1 mL de medio LB con zeocina y se cultivó a 37 °C a 150 rpm durante 12 h. Posteriormente, el contenido del tubo se traspasó a un tubo eppendorf estéril y se centrifugó a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se extrajo el vector recombinante usando el método establecido en el apartado 5.2.3. Se utilizó el plásmido extraído como DNA templado para una PCR utilizando el Kit de MasterMIX® de la marca Promega®. La preparación de la mezcla para realizar la PCR se muestra en la tabla 5.3.

TABLA 5.3 Mezcla de MasterMIX® para realizar PCR

Componente	Volumen (μ L)
MasterMIX	5
Oligonucleótido reverso	1.5
Oligonucleótido directo	1.5
DNA	1
H ₂ O libre de nucleasas	1
Total	10

Los parámetros para realizar la PCR son iguales que los que se muestran en la tabla 5.2.

5.3.11 Electroforesis en gel de Agarosa con Bromuro de Etidio.

Mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% se identificaron los productos de PCR, Vector, Digestión, y DNA cromosómico. La preparación del gel se realizó añadiendo 0.3 g de agarosa grado electroforesis a 30 ml de solución TAE 5X, al cual se le añadieron 2 μ L de bromuro de etidio como indicador fluorescente. Se preparó un gel de 7.0 x 7.0 x 0.75 cm, y después de fraguado se cargó la muestra y el marcador de tamaño molecular (GeneRuler 1kb DNA Leader ThermoScientific™) para determinar la presencia y el tamaño de la muestra. El gel se corrió a 90V por 30 o 40 min, dependiendo del tamaño de la muestra. La muestra se preparó mezclando 5 μ L de la muestra con 1 μ L de amortiguador de carga 6x (Apéndice B).

5.4 Clonación en *Pichia Pastoris*

Una vez clonado el gen *chi* 331 en *E. coli* DH5 α , se procedió a clonar el gen en *Pichia pastoris* X33.

5.4.1 Obtención de células electrocompetentes de *Pichia pastoris* X33

Se cultivaron 200 μ L de *Pichia pastoris* X33 en un tubo de ensayo con 2 mL de medio YPD (Apéndice B) durante 12 h, y fueron traspasados a un matraz de 40 mL con medio YPD durante otras 12 h. Una vez alcanzada una densidad óptica a 600 nm con una dilución 1/10 de 0.24, se cosecharon las células por centrifugación a 3,000 rpm, 4 °C por 5 min, y fueron resuspendidas con 8 mL de medio YPD/HEPES pH 8.0 (Apéndice B) con vórtex. Se incubaron a 28 °C durante 15 min y se centrifugó a 3,000 rpm a 4 °C por 5 min, realizando cuatro lavados de la pastilla con 40, 4 y 2 mL de solución de sorbitol 1M a 4 °C, centrifugando a 3,000 rpm a 4

°C entre cada lavado. Por último, se resuspendió la pastilla en 500 µL de solución de sorbitol 1M y se mantuvo el tubo en hielo hasta la utilización de las células para la electroporación (dentro de la primera hora posterior a realizarse la electrocompetencia de las células de *P. pastoris* X33) (Bio-Rad Laboratories Inc.).

5.4.2 Digestión del vector recombinante pPICZαBchi331

El vector recombinante *pPICZαBchi331* tiene que entrar de manera lineal a *P. pastoris* X33 para que pueda ocurrir la recombinación genética por homología y pueda insertarse el gen *chi 331* en el cromosoma. Para linearizar el vector, se digirió con la enzima *PmeI* (Invitrogen®) de la siguiente manera: 1 µg del vector recombinante *pPICZαBchi331* se mezcló con 1 µL de la enzima *PmeI* y 2 µL de la solución amortiguadora de reacción, aforando a un volumen total de 20 µL con agua libre de nucleasas. Se incubó la reacción durante 1 h a 37 °C, se purificó usando el kit FavorPrep® GEL/PCR purification MiniKit, y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% para comprobar la linearización. Se cuantificó la cantidad de vector por absorbancia en un Nanodrop y se utilizó enseguida para la electroporación (puede almacenarse a -20 °C hasta su uso).

5.4.3 Electroporación de *Pichia Pastoris* X33

Para la electroporación, se mezclaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL, 40 µL de células de *P. pastoris* X33 electrocompetentes y 1 µL de ~1 µg del vector recombinante *pPICZαB*, esta mezcla se pone en una cubeta de electroporación marca Bio-Rad® de 0.2 cm, previamente enfriada a -20 °C. Finalmente, se dio 1 pulso de 5.6 segundos a 2000V con un equipo de electroporación Electroporator 2510 Eppendorf® (Bio-Rad Laboratories Inc.).

5.4.4 Identificación de *P. pastoris* X33 recombinante.

Una vez realizada la electroporación, se le agregó 1 mL de una solución de sorbitol 1M a 4 °C a la cubeta de electroporación, y se resuspendieron las células electrotransformadas por pipeteo. La mezcla se transfirió a un tubo de ensayo y se incubó durante una hora a 28 °C; se agregó 1 mL de sorbitol 1M y se incubó nuevamente durante una hora a 28 °C. Los 2 mL se vertió en una caja de YPDS agar con zeocina (100 µg/mL) y, después de dejar secar completamente durante 1 hora, se incubó a 28 °C durante 48 h (Bio-Rad Laboratories Inc.).

5.4.5 Confirmación de inserción del gen por PCR de colonia y PCR anidada

La presencia del gen en el genoma de *P. pastoris* X33 se comprobó por PCR. Del cultivo se tomó una asada y se resuspendieron en 10 µL de agua libre de nucleasas, para romper la pared celular con un choque térmico incubando las células resuspendidas a 95 °C durante 10 min. Se centrifugaron a 13,000 rpm a 4 °C, y se tomó 1 µL del sobrenadante para utilizarlo como DNA templado. La PCR se realizó utilizando el Kit de MasterMIX® de la marca Promega® y los oligonucleótidos universales 5'AOX1 y 3'AOX1. La preparación de la mezcla para realizar la PCR de colonia son iguales a los que se presenta en la tabla 5.3 y las condiciones de PCR que se utilizarón son iguales a las que se muestran en la tabla 5.4. Para confirmar la presencia y tamaño del producto de PCR, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Se realizó una PCR anidada tomando como DNA templado el amplificado de la PCR de colonia y los oligonucleótidos F y R *chi* 331. La preparación de la mezcla para realizar la PCR anidada son iguales a las qu se presentan en la tabla 5.3 y las condiciones son iguales a las presentadas en la tabla 5.2. Para confirmar la presencia y tamaño del producto de PCR, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

TABLA 5.4 Programa para PCR de colonia

Ciclo	Repeticiones	Temperatura (°C)	Tiempo (mins)
1	1	94	2
2	25	94	1
		62	1
		72	1
3	1	72	7

5.4.6 Inducción de la proteína recombinante ChiBVT331

Para llevar a cabo la inducción de la expresión del gen recombinante *chiBVT331*, se inocularon 100 μ L del cultivo conservado en glicerol de *P. pastoris* ChiVBT331 en 2 mL de medio BMGY (Apéndice B) y se incubó durante 12 h. Posteriormente, se inocularon en un matraz con 40 mL de medio BMGY y se incubó hasta que tuviera una densidad óptica a 600 nm de 2. Se cosecharon las células a 3,000 rpm a temperatura ambiente, y se resuspendieron en 40 mL de medio BMMY (Apéndice B) al cual se le agregó 200 μ L de metanol cada 24 horas durante 96 horas, para mantener la inducción de la expresión (Invitrogen Corporation).

5.4.7 Analisis de la expresión de la proteína recombinante ChiBVT 331 por medio de SDS-PAGE

Después de 36 y 96 h de la inducción con el metanol, centrifugaron muestras del cultivo y 24 mL del sobrenadante fueron concentrados en un concentrador DNA concentrator MiVac durante 9 horas hasta que quedara a un volumen final de 1 mL. A éste se le agregaron 100 μ L de ácido tricloro acético (TCA) para precipitar las proteínas, se incubó durante 15 min en hielo y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min. Al sobrenadante se le agregaron 200 μ L de acetona pura y se agitó

en vórtex, se centrifugó nuevamente durante 5 min a 13,000 rpm, se retiró la acetona y se dejó evaporar la acetona restante por 2 min. El patrón de proteínas se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % siguiendo la técnica de Lemmli (1970). Se corrió gel durante 1.5 horas y posteriormente el gel se tiñó con azul de comasie (Apéndice B), se destiñó con solución de desteñido (Apéndice B) y se procedió a realizar el análisis del gel usando un fotodocumentador Gel Doc™ Gel Documentation System de la marca Bio-Rad®.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Analisis in silico de *Brevibacillus thermoruber* HT42

El análisis *in silico* del genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42 se realizó según la procedimiento mencionado en la sección 5.2.1, y se encontró que el genoma tiene 9304 genes de los cuales 157 (2 %) codifican para enzimas hidrolíticas de las subclases 3.1 (éster), 3.2 (glicosidasas), 3.4 (enlaces peptídicos), y 3.5 (carbono-nitrógeno), casi todas con más de una copia del gen en diferente posición dentro del genoma: xilanasas (3 genes), esterases (27 genes), glicosidasas (1 gen), lipasas (8 genes), proteasas (20 genes), peptidasas (30 genes), quitinasas (3 genes), fosfatasas (44 genes), amilasa (1 gen), aminidasas (4 genes), nitrilasa (1 gen), sulfatasa (1 gen), exonucleasas (2 genes), lactamasas (1 gen), dehalogenasas (6 genes), y otras hidrolasas que no se lograron identificar (5 genes). Los resultados se muestran en la tabla 6.1, indicando las enzimas hidrolíticas identificadas, el tipo de función, si cuentan con péptido señal y el tamaño del gen y la proteína codificada.

TABLA 6.1 Resumen de la búsqueda *in silico* de enzimas hidrolíticas en el genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42

Enzima	Función	Péptido señal	Tamaño de gen y proteína
Xilanasas	Xilanasas		Tamaño gen: 762 bases Tamaño proteína: 253 a.a.
	Xilanasas	Si	Tamaño gen: 690 bases Tamaño proteína: 229 a.a.
	Xilanasas		Tamaño gen: 789 bases Tamaño Proteína: 262 a.a
Glicosidasa	pseudouridina-5-fosfatoglicosidasa		Tamaño gen: 918 bases Tamaño de Proteína: 305 a.a
Esterasa	Metalofosfoesterasa		Tamaño gen: 795 bases Tamaño de Proteína: 264 a.a

	Esterasa		Tamaño gen: 681 bases Tamaño Proteína: 226 a.a
	Antitoxina (fosfodiesterasa tipo I)	No	Tamaño gen: 1386 bases Tamaño Proteína: 461 a.a
	Enteroquelina esterasa		Tamaño gen: 735 bases Tamaño Proteína: 244 a.a
	Fosfoesterasa		Tamaño gen: 618 bases Tamaño proteína: 205 a.a
	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa		Tamaño gen: 987 bases Tamaño de Proteína: 328 a.a
	Posible fosfodiesterasa	Si	Tamaño gen: 1623 bases Tamaño Proteína: 540 a.a
	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa	Si	Tamaño gen: 837 bases Tamaño proteína: 278 a.a
	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa		Tamaño gen: 741 bases Tamaño proteína: 246 a.a
	Tioesterasa		Tamaño gen: 399 bases Tamaño proteína: 132 a.a
	Posible tioesterasa		Tamaño gen: 1311 bases Tamaño proteína: 436 a.a
	Fosfoesterasa		Tamaño gen: 525 bases Tamaño proteína: 174 a.a
	Esterasa		Tamaño gen: 2418 bases Tamaño proteína: 805 a.a
	Esterasa		Tamaño gen: 2391 bases Tamaño proteína: 796 a.a
	Esterasa		Tamaño gen: 768 bases Tamaño proteína: 255 a.a
	Enteroquelin esterasa		Tamaño gen: 705 bases Tamaño proteína: 234 a.a
	Tioesterasa		Tamaño gen: 471 bases Tamaño proteína: 156 a.a
	2,3 ciclo nucleótido 2- fosfodiesterasa	Si	Tamaño gen: 1989 bases Tamaño proteína: 662 a.a
	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa		Tamaño gen: 720 bases Tamaño proteína: 239 a.a

	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa		Tamaño gen: 729 bases Tamaño proteína: 242 a.a
	Acil CoA tioesterasa		Tamaño gen: 429 bases Tamaño proteína: 142 a.a
	Metalofosfoesterasa		Tamaño gen: 930 bases Tamaño proteína: 309 a.a
	c-di-GMP fosfodiesterasa		Tamaño gen: 1050 Tamaño proteína: 349
	c-di-GMP fosfodiesterasa		Tamaño gen: 1053 bases Tamaño proteína: 350 a.a
	4-hidroxibenzoil-CoA tioesterasa		Tamaño gen: 429 bases Tamaño proteína: 142 a.a
	Glutamato metilesterasa reguladora de la quimiotaxis		Tamaño gen: 1014 bases Tamaño proteína: 337 a.a
	Esterasa		Tamaño gen: 795 bases Tamaño proteína: 264 a.a
Lipasa	Fosfolipasa		Tamaño gen: 948 bases Tamaño proteína: 315 a.a
	Posible fosfolipasa C		Tamaño gen: 792 bases Tamaño proteína: 263 a.a
	Lipasa		Tamaño gen: 813 bases Tamaño proteína: 270 a.a
	Posible lisofosfolipasa (familia alfa/beta hidrolasa)		Tamaño gen: 813 bases Tamaño proteína: 270 a.a
	Lisofosfolipasa	Si	Tamaño gen: 768 bases Tamaño proteína: 255 a.a
	Fosfolipasa		Tamaño gen: 849 bases Tamaño proteína: 282 a.a
	Lipasa		Tamaño gen: 711 bases Tamaño proteína: 236 a.a
	Fosfolipasa		Tamaño gen: 279 bases Tamaño proteína: 92 a.a
Proteasas	Subunidad Clp proteasa ATP dependiente		Tamaño gen: 597 bases Tamaño proteína: 198 a.a
	Lon C proteasa S16		Tamaño gen: 1068 bases Tamaño proteína: 355 a.a

	Zinc proteasa		Tamaño gen: 1215 bases Tamaño proteína: 404 a.a
	Clp proteasa dependiente de ATP unida a una subunidad Clpx		Tamaño gen: 1275 bases Tamaño proteína: 424 a.a
	Lon proteasa		Tamaño gen: 1692 bases Tamaño proteína: 563 a.a
	Lon proteasa		Tamaño gen: 2271 bases Tamaño proteína: 756 a.a
	Subunidad proteolítica Clp proteasa ATP dependiente		Tamaño gen: 582 bases Tamaño proteína: 193 a.a
	Metaloproteasa termofilica		Tamaño gen : 1233 bases Tamaño proteína: 410 a.a
	Proteasa de membrana metalo dependiente		Tamaño gen: 975 bases Tamaño proteína: 324 a.a
	Proteasa dependiente de ATP subunidad HsIV (forma parte del proteosoma 20s)		Tamaño gen: 543 bases Tamaño proteína: 180 a.a
	Proteasa dependiente de ATP subunidad HsIU unida a subunidad ATPasa		Tamaño gen : 1395 bases Tamaño proteína: 464 a.a
	Serin proteasa	Si	Tamaño gen: 1002 bases Tamaño proteína: 333 a.a
	Zinc proteasa		Zinc proteasa Posición: 3209 Tamaño gen: 1293 bases Tamaño proteína: 430 a.a
	Serin proteasa	Si	Tamaño gen: 1314 bases Tamaño proteína: 437 a.a
	Serin proteasa		Tamaño gen: 921 bases Tamaño proteína: 306 a.a
	Proteasa Clp Atp dependiente unida a una subunidad ClpC		Tamaño gen: 2415 Tamaño proteína: 804 a.a
	Serin proteasa		Tamaño gen: 1203 bases Tamaño proteína: 400 a.a

	Serin proteasa		Tamaño gen: 2529 bases Tamaño proteína: 842 a.a
	Proteasa dependiente de Zinc		Tamaño gen: 1095 bases Tamaño proteína: 364 a.a
	RIP metaloproteasa RseP		Tamaño gen: 1269 bases Tamaño proteína: 422 a.a
Peptidasas	Peptidasa		Tamaño gen: 3069 bases Tamaño proteína: 1022 a.a
	Peptidasa		Tamaño gen: 2040 Tamaño proteína: 679 a.a
	Peptidasa s8		Tamaño gen: 1158 bases Tamaño proteína: 385 a.a
	Peptidasa		Tamaño gen: 669 bases Tamaño proteína: 222 a.a
	Aminopeptidasa		Tamaño gen: 1113 bases Tamaño proteína: 370 a.a
	Tripsinpeptidasa		Tamaño gen: 522 bases Tamaño proteína: 173 a.a
	Peptidasa		Tamaño gen: 1296 bases Tamaño proteína: 431 a.a
	Metalopeptidasa		Tamaño gen: 687 bases Tamaño proteína: 228 a.a
	Aminopeptidasa		Tamaño gen: 1113 bases Tamaño proteína: 370 a.a
	Peptidasa U32 (Posible colagenasa)		Tamaño gen: 2493 bases Tamaño proteína: 830 a.a
	Peptidasa s41	Si	Tamaño gen: 1512 bases Tamaño proteína: 503 a.a
	O-sialoglicoproteína endopeptidasa		Tamaño gen: 963 bases Tamaño proteína: 320 a.a
	Peptidasa s8		Tamaño gen: 1071 bases Tamaño proteína: 356 a.a
	Aminopeptidasa		Tamaño gen: 1116 bases Tamaño proteína: 371 a.a
	Spo IVB peptidasa		Tamaño gen: 1215 bases Tamaño proteína: 404 a.a

	Serine-peptidasa	Si	Tamaño gen: 3759 bases Tamaño proteína: 1252 a.a
	GPR endopeptidasa		Tamaño gen: 1107 bases Tamaño proteína: 368 a.a
	Peptidasa		Tamaño gen: 558 bases Tamaño proteína: 185 a.a
	Peptidasa M50		Tamaño gen: 675 bases Tamaño proteína: 224 a.a
	Metalopeptidasa		Tamaño gen: 768 bases Tamaño proteína: 193 a.a
	prsW peptidasa		Tamaño gen: 675 bases Tamaño proteína: 224 a.a
	Signal peptidasa		Tamaño gen: 966 bases Tamaño proteína: 321 a.a
	Peptidasa M28		Tamaño gen: 1083 bases Tamaño proteína: 360 a.a
	Aminopeptidasa		Tamaño gen: 942 bases Tamaño proteína: 313 a.a
	Peptidasa s8		Tamaño gen: 1392 bases Tamaño proteína: 463 a.a
	Peptidasa s8		Tamaño gen: 1659 bases Tamaño proteína: 552 a.a
	Metaloendopeptidasa		Tamaño gen: 1158 bases Tamaño proteína: 385 a.a
	Peptidasa s41		Tamaño gen: 1434 Tamaño proteína: 477 a.a
	Tripsina		Tamaño gen: 354 bases Tamaño proteína: 117 a.a
	Prolil oligopeptidasa		Tamaño gen: 792 bases Tamaño proteína: 263 a.a
Quitinasas	Quitinasa	Si	Tamaño gen: 1287 bases Tamaño proteína: 429 a.a.
	Quitinasa		Tamaño gen: 1665 bases Tamaño proteína: 554 a.a
	Quitinasa	Si	Tamaño gen: 1251

			Tamaño proteína: 416
Fosfatasas	Fosfoserine fosfatasa		Tamaño gen: 456 bases Tamaño proteína: 152 a.a
	Purina NTP pirofosfatasa no canonica		Tamaño gen: 585 bases Tamaño proteína: 194 a.a
	Fructosa 1,6 bifosfatasa		Tamaño gen: 963 bases Tamaño proteína: 320 a.a
	Nucleosido trifosfatasa		Tamaño gen: 480 bases Tamaño proteína: 159 a.a
	Co A pirofosfatasa		Tamaño gen: 678 bases Tamaño proteína: 225 a.a
	Alfa ribazole fosfatasa		Tamaño gen: 633 bases Tamaño proteína: 210 a.a
	Serin/treonin fosfatasa		Tamaño gen: 654 bases Tamaño proteína: 218 a.a
	Inositol monofosfatasa		Tamaño gen: 849 bases Tamaño proteína: 282 a.a
	Posible fosfatasa (Dominio PAP2)		Tamaño gen: 672 bases Tamaño proteína: 223 a.a
	Histidinol fosfatasa		Tamaño gen: 1032 bases Tamaño proteína: 343 a.a
	2-fosfosulfolactato fosfatasa		Tamaño gen: 705 bases Tamaño proteína: 234 a.a
	ADP ribosa pirofosfatasa		Tamaño gen: 564 bases Tamaño proteína: 187 a.a
	Fosfoserin fosfatasa		Tamaño gen: 609 bases Tamaño proteína: 202 a.a
	Fosfoserin fosfatasa		Tamaño gen: 615 bases Tamaño proteína: 204 a.a
	ATPasa		Tamaño gen: 1512 bases Tamaño proteína: 503 a.a
	dUridina-5-trifosfatasa		Tamaño gen: 540 bases Tamaño proteína: 179 a.a
	Posible fosfatasa		Tamaño gen: 1095 bases Tamaño proteína: 364 a.a
	Quimiotaxis fosfatasa		Tamaño gen: 459 bases

		Tamaño proteína: 152 a.a
	Posible fosfatasa	Tamaño gen: 1059 bases Tamaño proteína: 352 a.a
	Metalofosfatasa/5'-nucleotidasa	Tamaño gen: 1878 bases Tamaño proteína: 625 a.a
	Fosfotirosina fosfatasa	Tamaño gen: 471 bases Tamaño proteína: 156 a.a
	Fosfatasa	Tamaño gen: 1137 bases Tamaño proteína: 378 a.a
	Pirofosfatasa inorgánica	Tamaño gen: 498 bases Tamaño proteína: 165 a.a
	ADP ribosa pirofosfatasa	Tamaño gen: 447 bases Tamaño proteína: 148 a.a
	5'-nucleotidasa	Tamaño gen: 801 bases Tamaño proteína: 266 a.a
	Fosfatidilglicero fosfatasa A	Tamaño gen: 561 bases Tamaño proteína: 186 a.a
	Posible fosfatasa	Tamaño gen: 447 bases Tamaño proteína: 148 a.a
	Inositol monofosfatasa	Tamaño gen: 777 bases Tamaño proteína: 258 a.a
	Undecaprenil fosfatasa	Tamaño gen: 789 bases Tamaño proteína: 262 a.a
	2-fosfosulfolactato fosfatasa	Tamaño gen: 732 bases Tamaño proteína: 243 a.a
	Pirofosfatasa	Tamaño gen: 675 bases Tamaño proteína: 224 a.a
	Posible fosfatasa	Tamaño gen: 501 bases Tamaño proteína: 166 a.a
	Exopolifosfatasa	Tamaño gen: 1530 bases Tamaño proteína: 509 a.a
	Tirosin fosfatasa	Tamaño gen: 396 bases Tamaño proteína: 131 a.a
	Histidin fosfatasa	Tamaño gen: 630 bases Tamaño proteína: 209 a.a

	Nucleotidasa		Tamaño gen: 1419 bases Tamaño proteína: 472 a.a
	Fructosa 1,6 bifosfatasa		Tamaño gen: 975 bases Tamaño proteína: 324 a.a
	Fosfatidilglicero fosfatasa		Tamaño gen: 543 bases Tamaño proteína: 180 a.a
	Fosfotirosin fosfatasa		Tamaño gen: 426 bases Tamaño proteína: 141 a.a
	Una proteína de resistencia a la bacitricina con actividad pirofosfato fosfatasa		Tamaño gen: 780 bases Tamaño proteína: 259 a.a
	ADP-ribosapirofosfatasa		Tamaño gen: 450 bases Tamaño proteína: 149 a.a
	Proteina CheC de quimotaxis con actividad fosfatasa		Tamaño gen: 627 bases Tamaño proteína: 208 a.a
	Exopolifosfatasa		Tamaño gen: 948 bases Tamaño proteína: 316 a.a
	Proteina de movimiento flagelar con 2 proteínas CheC de quimiotaxis con actividad fosfatasa		Tamaño gen: 1362 bases Tamaño proteína: 453 a.a
Amilasas	Alfa, alfa fosfotrehalosa		Tamaño gen: 1683 bases Tamaño proteína: 560 a.a
Aminidasas	Beta-n-acetil hexosaminidasa	Si	Tamaño gen: 2073 Tamaño proteína: 690 a.a
	N acetil hexosaminidasa		Tamaño gen: 1359 bases Tamaño proteína: 452 a.a
	Hexosaminidasa		Tamaño gen: 1266 bases Tamaño proteína: 421 a.a
	Hexosaminidasa	Si	Tamaño gen: 2988 bases Tamaño proteína: 995 a.a
Nitrilasas	Nitrilasa		Tamaño gen: 966 bases Tamaño proteína: 321 a.a
Sulfatasa	Sulfatasa que tiene adelante una fosfodiesterasa tipo 1		Tamaño gen: 1521 bases Tamaño proteína: 506 a.a
Exonucleasa	DNA repair exonucleasa		Tamaño gen: 774 bases

			Tamaño proteína: 257
	Exonucleasa subunidad D sbcCD		Tamaño gen: 1248 bases Tamaño proteína: 415 a.a
Lactamasa	Beta lactamasa		Tamaño gen: 750 bases Tamaño proteína: 249 a.a
Dehalogenasa	Haloacid dehalogenasa		Tamaño gen: 651 bases Tamaño proteína: 216 a.a
	Haloacid dehalogenasa		Tamaño gen: 873 bases Tamaño proteína: 290 a.a
	Posible de halogenasa		Tamaño gen: 525 bases Tamaño proteína: 174 a.a
	Haloacid dehalogenasa		Tamaño gen: 726 bases Tamaño proteína: 241 a.a
	Haloacid dehalogenasa		Tamaño gen: 762 bases Tamaño proteína: 253 a.a
	Haloacid dehalogenasa		Tamaño gen: 657 bases Tamaño proteína: 218 a.a
Hidrolasa	Alfa/beta hidrolasa		Tamaño gen: 675 bases Tamaño proteína: 224 a.a
	2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoato hidrolasa		Tamaño gen: 837 bases Tamaño proteína: 278 a.a
	Alfa/beta hidrolasa		Tamaño gen: 729 bases Tamaño proteína: 242 a.a
	Alfa/betahidrolasa		Tamaño gen: 816 Tamaño proteína: 271 a.a
	Proteina hipotética (con posible actividad celulolítica)	Si	Tamaño gen: 1635 bases Tamaño proteína: 544 a.a

En comparación con otros genomas del género *Brevibacillus* reportados, se encontró que, en general, el de *Brevibacillus thermoruber* HT42 tiene un mayor número de genes (9304), a excepción del genoma de *Brevibacillus panacihumi*, que tiene 11051 genes. Además, únicamente en otras dos especies se reporta la

presencia de genes para quitinasas (*Brevibacillus laterosporus* y *brevis*). Los datos se presentan en la tabla 6.2

TABLA 6.2 Comparación de los génomas reportados para diversas especies del género *Brevibacillus*

Genero	Cepa	Número de genes	Quitinasas
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	LMG15441	4609	2
	DSM 25	4886	ND
	GI-9	4625	ND
	PE36	4627	ND
	B9	4683	ND
	Uniss_18	4710	ND
<i>Brevibacillus brevis</i>	NBRC100599	6055	1
	X23	6396	ND
	0809-GLX	5731	ND
	DZQ7	6078	ND
	ATCC 35690	5878	ND
	GZDF3.1	6143	ND
	NBRC 110488	6045	ND
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	AK1	5092	ND
	3096-7	5359	ND
	cifa_chp40	5142	ND
<i>Brevibacillus thermoruber</i>	423	4327	ND
	PM1	4883	ND
	HT42	9304	3
<i>Brevibacillus agri</i>	5-2	5292	ND
	BAB-2500	5330	ND
<i>Brevibacillus panacihumi</i>		11051	ND
<i>Brevibacillus reuzeri</i>		6907	ND
<i>Brevibacillus formosus</i>		5871	ND
<i>Brevibacillus massiliensis</i>		ND	ND
<i>Brevibacillus choshinensis</i>		6090	ND
<i>Brevibacillus parabrevis</i>		5371	ND

6.2 Identificación del gen *chi* 331

Como se mencionó en la sección 5.2.1, por medio de la herramienta Blastp se alinearon las secuencias de aminoácidos reportadas en la anotación del genoma con la base de datos del NCBI, y con la herramienta pFam para determinar los dominios funcionales de cada uno de los marcos abiertos de lectura de enzimas hidrolíticas. Se seleccionó el gen *chi* 331, constituido por 1,287 pb y codifica para una proteína de que tiene tres dominios funcionales de proteínas de unión a la membrana (SLH) y un dominio funcional GH18 de la superfamilia de las quitinasas (Figuras 6.1 y 6.2). Este grupo funcional engloba a las glicosil hidrolasas de bacterias que tienen actividad quitinolítica, como se menciona en la sección 2.6.

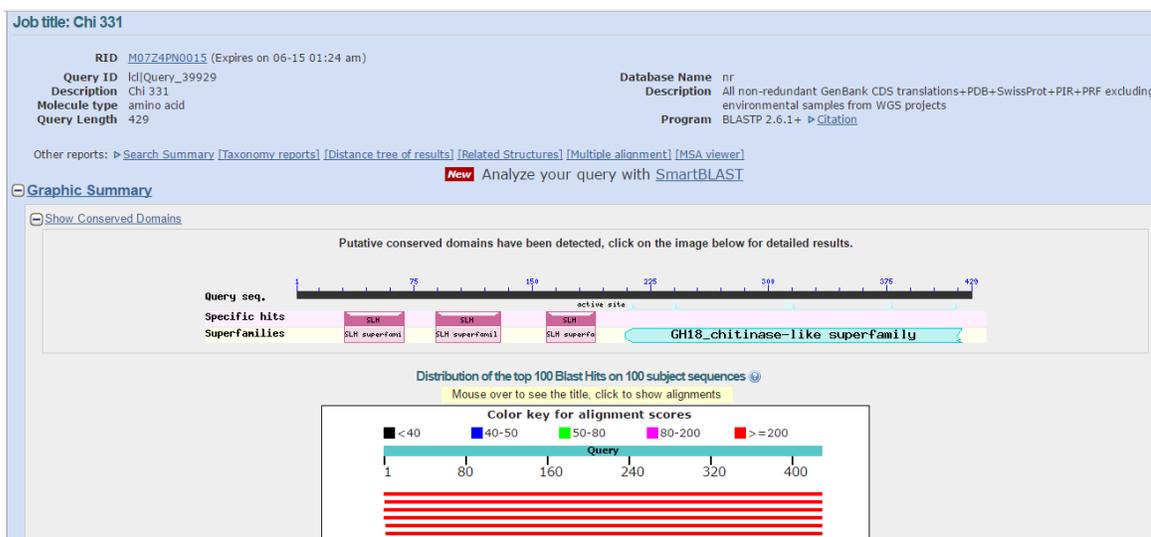


FIGURA 6.1 Alineación de la secuencia de aminoácidos del gen *chi* 331 en la herramienta Blastp.

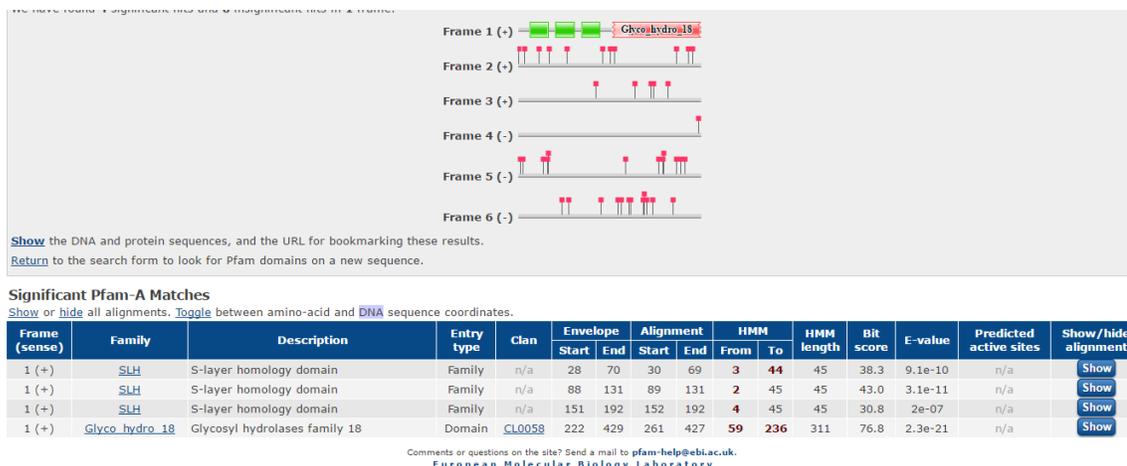


FIGURA 6.2 Alineación de los nucleótidos por medio de la herramienta Pfam.

La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos se muestran en la Tabla 6.3, así como la localización del péptido señal (letras en rojo), ubicado por medio de la herramienta en línea SignalP 4.1 en los primeros 69 pb del gen, así como en los primeros 23 aminoácidos de la secuencia de la proteína.

TABLA 6.3 Secuencia del péptido señal en nucleótido y en aminoácidos

Núcleotidos	<p>ATGACATGTCTATCTTTTCTGTGGATCGTTTCCCTCCTGTTCTCGACCGTCGCGGTGCCCGCGTCCGACG GCCAAAACCATGCCGCTGCGGGACATTTCCGACAGCTATGCGGAAGAGCAGATCCTGTCGCTGGTTCA GGCCGGCGTGATTGTCGGCGACCCCGACGGCTATTTCCACCCACCAGCCCGTCAAACGGGCGGAG TTCGTCGCGATGCTGAACCGCACGCTGGGAATCCGCCCGTCTCCAGCCAGATTCAGGCCACTCGGA CGTGCCGAAATACGCTTGGGCTACGGCGACGTGCAGGCTTCCGCCGCCTTGGGCATCGTCAACGGC ACCAGCGTGACGACCTTCGCGCGGAATCGGACGCTCACCCGCCAGGAAGCGGCCGTTATCATCATGC GGCGTTGGGCACAAAGCCGAACGGGACGGCGAGCCTCCCGTCCGCGGATTCCTCCCGGATATCGG CGTGGCCAAACCGTACGTACGCAAGCGCTCAAGACCGAGCTGCTGGTGGTCCGCTACGCGGGTACTT CCGCCCACTGACCCGCTCAGCAGGGAAGAGACAGCCGTCATCCTGCATCGGGTGTGACGCGTCTG GACAAACAGCCGGCCAAGCCTCCCGTCTCCTCGGCTGGCAGTACCTGACGACCACCCAGGAATTTCT CCAAGTGGTGAACGGCTCGGAGGTAAACAGCTCTCGCCCGCTGGTCTTTCTGGATCCGGACGGG TCCGTATCCGATCCGCCGAACCTGCCCTCGTCCAGTGGGCACACGAAAAGGGAAGCGGGTGTGGG CGCTGTTCCGCAACCGCTTTGACGCGAAGGCGACACACGAGGCCCTGTCCGCCCGGCCAAGCGGG ACGCCATCGTGGACAAGCTGGCCGCGCTCGTCCGAGAAGTACCACTGGACGGGATCAACGCTCGACTTT GAGAGCATGTATGCGGATGACCGGGACGTCTTACC CGCTTTGTCCGCGAAGTCTCGCCGCCCTTC ATGCAAAGGGAGCGGTCGTCTCCGTCGACGTGCCGCGGATTTGCGCAGTGAAGGAGCGATCCCTA CGACTATGCGGCATTGTCCCAACATGCCGATTACCTGGTGTGATGGCGTACGAAGAGCATTGGAGCG GCGGTCCGAAAGCCGGTTCCGTCTCCTCCCTGCCGTGGCTGGCCGACAGCATCTCCGGACTGATTGG ACGGGTCCCGGCCGGGAAGCTGATCGTGGGTCTGCCGCTCTACACGCGGGATTGGTATCAGGCGAAC GGAAAATGG</p>
Aminoácidos	<p>MTCLSFLLWIVSLLFLTVAVPASTAKTMPLRDISDSYAEQILSLVQAGVIVGDPDGYFHPHQPVKRAEFVAML NRTLGIKRPVSSQIQAYSQVDPKYAWAYGDVQASAALGIVNGTSVTTFAPNRTLTRQEAIVIIMRALGTPKNGTA SLPVADSSRISAWAKPYVSEALKTELLVGYAGYFRPTDPLSREETAVILHRVLRTRLDKQPAKPPVVLGWQYL TTTQEFLLVNGSEVNTLSRWFLLDPDGSVSDSAEPALVQWAHEKGRVWALFNGRFDKATHEALSAP AKRDAIVDKLAALVEKYQLDGINVDFESMYADDRDVFATVRELSAALHAKGAVVSDVPRDLRSDWSDPY DYAALSQHADYLVLMAYEEHWSGGPKAGSVSSLPWLADSSISGLIGRVPAGKLIVGLPLVTRDWYQANGKW</p>

6.2.1 Análisis filogenético de quitinasas del género *Brevibacillus*

Se realizó un análisis filogenético comparando la secuencia del gen *chi* 331 con los otros genes de quitinasas encontrados en *Brevibacillus thermoruber* HT42 y otros reportados en la base de datos del NCBI para el género *Brevibacillus*: *chi* 5096 y *chi* 1721 de *Brevibacillus thermoruber* HT42, genes de *Brevibacillus laterosporus* 1 y 2 y *Brevibacillus brevis*. Se realizó el programa Clustal Omega del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y se obtuvo el árbol que se muestra en la Figura 6.3 con las relaciones que se muestran en la Tabla 6.4.

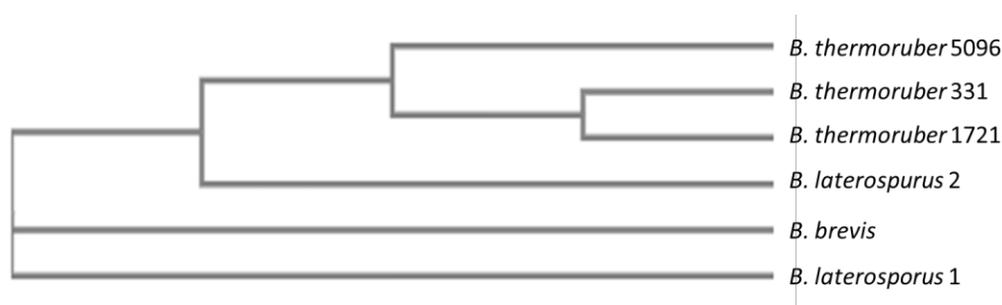


FIGURA 6.3 Árbol filogenético de quitinasas reportadas para el género *Brevibacillus*

TABLA 6.4 Porcentaje de relación entre los distintos tipos de quitinasas reportadas para el género *Brevibacillus*

<i>Brevibacillus</i>	<i>thermoruber</i> 5096	<i>thermoruber</i> 1721	<i>laterosporus</i> 2	<i>brevis</i>	<i>laterosporus</i> 1
<i>B. thermoruber</i> 331	23.81 %	31.33 %	14.49 %	17.32 %	13.09 %

Como puede observarse, el gen *chi* 331 tiene una baja homología con los otros dos genes de quitinasas que tiene *Brevibacillus thermoruber* HT42 (5096 y 1721), y aún menor con quitinasas de otras especies de *Brevibacillus* (*laterosporus* y *brevis*).

6.3 Amplificación por PCR del gen de *chi 331*

El gen *chi 331* fue amplificado por PCR y el producto se muestra en la Figura 6.4. El tamaño aparente del gen es de 1,309 pb, que coincide con el tamaño esperado de acuerdo a la información del análisis *in silico*.

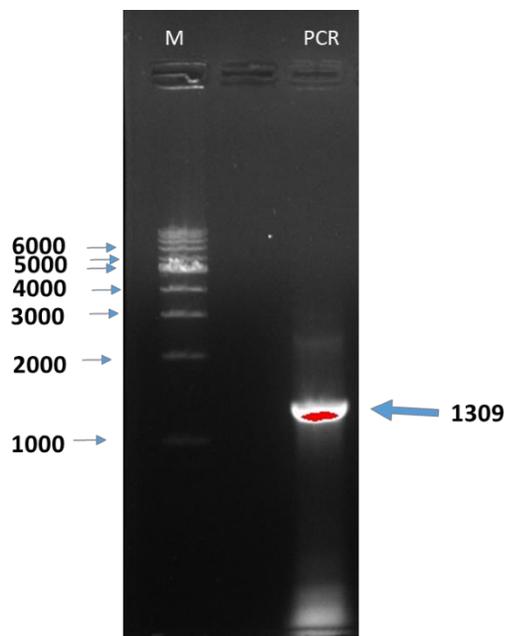


FIGURA 6.4 Identificación del peso molecular del gen amplificado por PCR usando electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Carril 1: Estandar de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Leader ThermoScientific™); Carril 2: espacio; Carril 3: *chi 331* amplificado de PCR.

6.3 Confirmación de amplificación de producto de PCR por secuenciación

El producto de amplificación del gen *chi 331* fue purificado a partir de la banda del gel de electroforesis y fue secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las secuencias fueron analizadas con el programa Chromas 2.6.2 para poder visualizar las secuencias de los archivos. La secuencia

obtenida con el oligonucleotido reverso tenía una secuencia 3' a 5' por lo que se obtuvo su complemento 5'a 3' por medio de la herramienta en línea de Reverse Complement Tool de la página www.bioinformatics.com. Las secuencias de los oligonucleotidos directo y complementario del reverso se compararon para obtener la secuencia completa, así como modificar las bases que se encontraban erróneas, usando el programa Sequencher 4.1.4. Se alineó la secuencia con la que se obtuvo del análisis *in silico* usando el programa en línea BLASTp del NCBI, y se encontró que la secuencia del fragmento amplificado por PCR tiene una homología del 99% con la secuencia del gen *chi* 331 y con una cobertura del 94%. Además también se realizó una traducción de la proteína por medio de la herramienta en línea Translate Tool de la página www.expasy.com. y se analizó por medio de la herramienta pFam y se corroboró que los dominios funcionales coincidieron con los del gen *chi* 331. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la secuenciación realizada por el IBT se encuentra en el apéndice A.

6.4 Identificación del vector recombinante pPICZ α B*chi*331

6.4.1 Selección de las colonias transformadas de *E. coli* DH5 α

Después del proceso de transformación de *E. coli* DH5 α con el vector pPICZ α B*chi*331, se obtuvieron 84 colonias capaces de crecer en presencia de zeocina, lo que indica que poseen el vector (Figura 6.5).

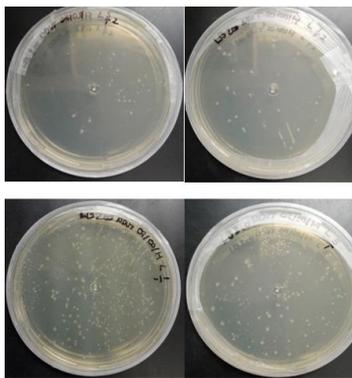


FIGURA 6.5 Colonias transformadas de *E. coli* DH5 α en Agar LB con Zeocina.

Las 84 colonias se resembraron en nuevas cajas para poder identificarlas y se cultivaron a las mismas condiciones durante 12 horas como se muestra en la Figura 6.6.

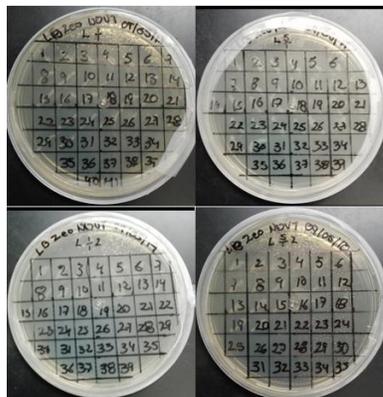


FIGURA 6.6 Colonias resembradas de *E. coli* DH5 α transformadas.

6.4.2 Comprobación por diferencia de tamaño entre el vector pPICZ α B y el vector recombinante pPICZ α B*chi331*

A partir de las cepas de *E. coli* DH5 α transformadas, se realizó la extracción del plásmido recombinante pPICZ α B*chi331* de las 84 muestras y se comparó su tamaño con el del vector pPICZ α B por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El análisis mostró que sólo cinco cepas resultaron positivas al vector recombinante, observándose una diferencia de tamaño de 1309 pares de bases con respecto al vector no recombinante, tal como se muestra en la Figura 6.7.

Las cepas que mostraron diferencia de tamaño fueron:

- 1.- L 1/1 2-9
- 2.- L 1/1 2-10
- 3.- L 1/1 2-15
- 4.- L 5/1 2-4**
- 5.- L 5/1 2-19

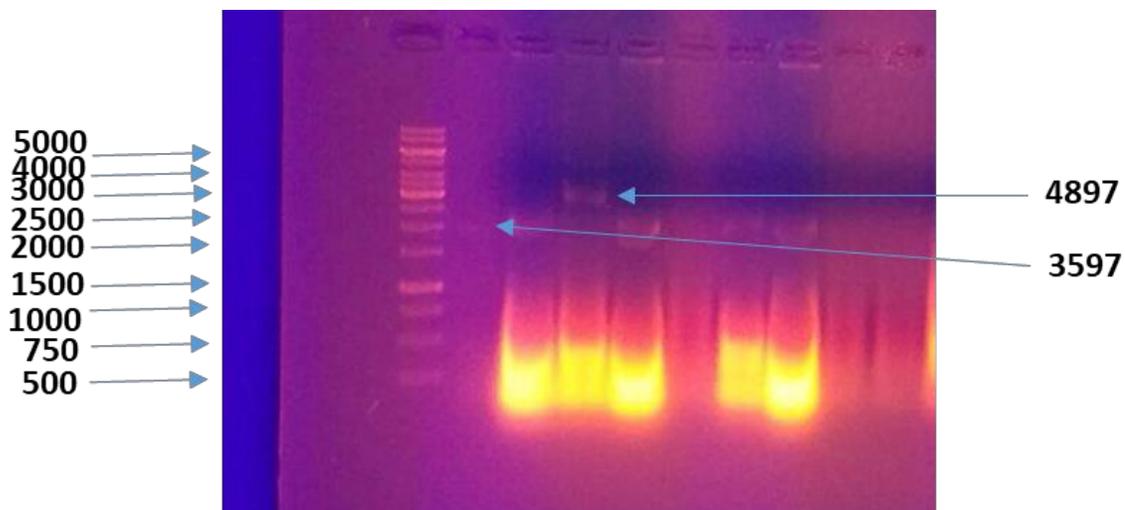


FIGURA 6.7 Electroforesis en gel de agarosa 1 % de los vectores extraídos de las cepas de *E. coli* DH5 α transformadas. Carril 1: Estandar de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Leader ThermoScientific™); Carril 2: pPICZ α B; Carril 3: L 5/1 2-3; Carril 4: L 5/1 2-4; Carril 5: L 5/1 2-6; Carril 6: L 5/1 2-7; Carril 7: L 5/1 2-8; Carril 8: L 5/1 2-10; Carril 9: L 5/1 2-11; Carril 10: L 5/1 2-12.

6.4.3 Comprobación de inserción de gen por PCR

Se realizó una comprobación de inserción del gen haciendo una PCR con los oligonúcleotidos del gen *chi* 331, se utilizó como templado el vector extraído de las cinco cepas que presentaron diferencia de tamaño, se utilizó las condiciones de PCR establecidas en el punto 5.3.4. Se analizó en un gel de electroforesis al 1 % y se observó que con todas las cepas se obtuvo un fragmento amplificado del tamaño esperado para el gen *chi* 331 (1309 pb), tal como se muestra en la Figura 6.8.

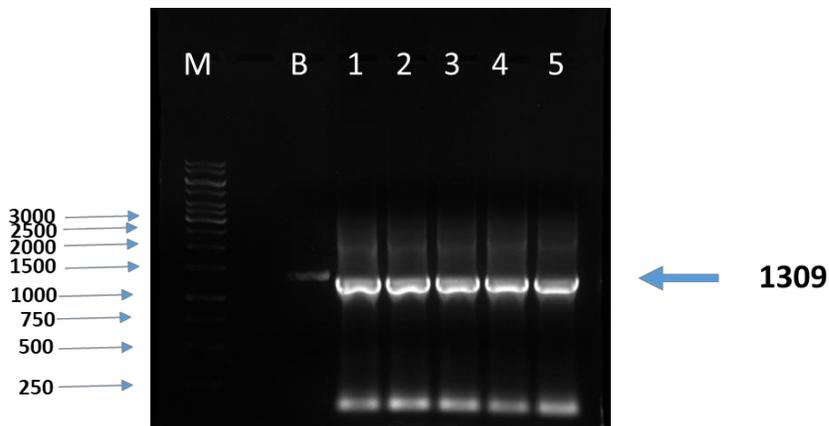


FIGURA 6.8 Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de PCR utilizando como templado el vector recombinante pPICZ α B*chi*331 obtenido de la cepas transformadas. Carril 1: Estandar de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Leader ThermoScientific™); Carril 2: espacio; Carril 3: *chi* 331; Carril 4: L 1/1 2-9; Carril 5: L 1/1 2-10; Carril 6: L 1/1 2-15; Carril 7: L 5/1 2-4; Carril 8: L 5/1 2-19.

6.4.4 Comprobación de marco de lectura del gen *chi*BVT 331

Para determinar que el inserto del gen *chi*BVT 331 haya quedado en el marco de lectura correcto, se realizó una PCR con las condiciones establecidas en el punto 5.4.5 con los oligonúcleotidos universales AOX1 utilizando uno de los vectores recombinante. El fragmento amplificado fue secuenciado, se identificó la secuencia donde se encontraba el α -factor y, al traducirla *in silico* se observó que el marco de lectura era el correcto. Los resultados se muestran en las Figuras 6.9 y 6.10

Sequence search results
[Show](#) the detailed description of this results page.
 We found 5 Pfam-A matches to your search sequence (all significant)

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.
[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches
[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
MF_alpha_N	Mating factor alpha precursor N-terminus	Family	n/a	3	88	4	88	2	88	88	104.1	2.6e-30	n/a	Show
SLH	S-layer homology domain	Family	n/a	124	166	126	165	3	44	45	37.8	1.3e-09	n/a	Show
SLH	S-layer homology domain	Family	n/a	186	229	187	229	2	45	45	42.5	4.4e-11	n/a	Show
SLH	S-layer homology domain	Family	n/a	251	292	252	292	4	45	45	30.3	2.8e-07	n/a	Show
Glyco_hydro_18	Glycosyl hydrolases family 18	Domain	CL0058	326	561	361	534	59	239	311	73.9	1.6e-20	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.
 European Molecular Biology Laboratory

FIGURA 6.9 Analisis de los dominios funcionales del gen *chi*BVT 331 obtenido por PCR del vector recombinante pPICZα*Bchi*331

 **Expasy** Biominformatics Resource Portal

Translate

Home | [Contact](#)

Translate Tool - Results of translation

[Open reading frames](#) are highlighted in **red**. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5'3' Frame 1

```

MetRFPSIFETAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEGVSLEKREAE
AAGILTCLSLFLWIVSLLFLLTVAVPASTAKT MetPLRDISDSYAEQILSLVQAGVIVGDDPGYFHPHQPVKRAEFVA MetLNRTLGIKRPVS
SQQQAYSQVDPKYAWAYGDDVQASAAALGIVNGTSVTTFAPNRTLTRQEAAVIIMetRALGTPKNGTASLPVADSSRISAWAKPYVSEALK
TELLVGYAGYFRPTDPLSREETAVILHRVLRDLKQPAKPPVVLGWQYLTITTTQEFLLQVNGSEVNTLSRWFLLDPDGSVSDSAEPA
LVQWAHEKGRVWALFGRNFDKATHEALSAPAKRDAIVDKLAALVEKYQLDGINVDFES MetYADDRDVFTAFVRELSAALHAKGA
VVSVDVPRDLRSDWSDPYDYAALSQHADYLVLMetAYEEHWSGGPKAGSVSSLPWLADSSISGLIGRVPAGKLVGLPLYTRDWYQAN
GKWRGAAASFLEOKLISEEDLNSAVDHHHHHH
  
```

5'3' Frame 2

FIGURA 6.10 Secuencia de aminoácidos codificada por el gen *chi*BVT 331

Como se observa en la Figura 6.10, el marco de lectura es correcto y se observa el sitio rico en histidinas en el extremo carboxilo de la proteína, el cual permite que la proteína recombinante ChiBVT 331 pueda ser purificada posteriormente usando una columna de afinidad. Las secuencia de nucleótidos y aminoácidos se encuentran en el anexo A.

6.5 Identificación de la clonación del gen recombinante *chi*BVT 331 en *Pichia Pastoris* X33 transformada por electroporación.

Se realizó la comprobación de la clonación del gen recombinante *chi*BVT 331 en *Pichia pastoris* X33 por medio de PCR de colonia y PCR anidada, y se confirmó que la clonación se realizó de manera adecuada al coincidir los tamaños de los productos de amplificación por PCR, con los oligonucleótidos universales AOX1 y

los del gen *chi 331*, con los tamaños esperados (1897 con los oligos AOX1 y 1309 con los oligos del gen *chi 331*) (Figuras 6.11 y 6.12).

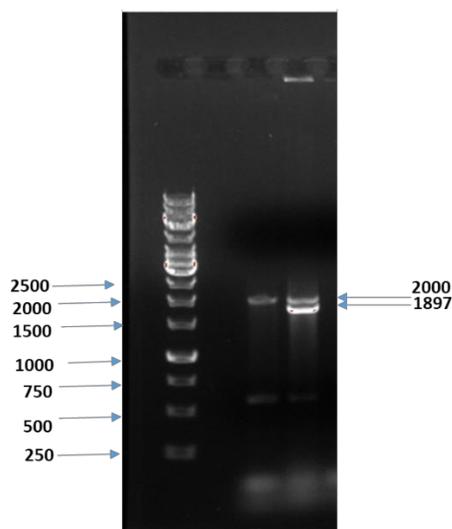


FIGURA 6.11 Electroforesis en gen de agarosa al 1 % de los productos de PCR con los oligonucleótidos AOX1. Carril 1: Estandar de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Leader ThermoScientific™); Carril 2: espacio; Carril 3: PCR con *P. pastoris* X33 no transformada; Carril 4: PCR de *P. pastoris* X33 transformada

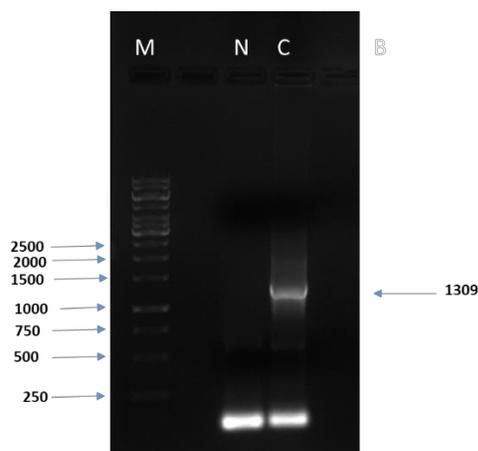


FIGURA 6.12 Electroforesis en gen de agarosa al 1 % de los productos de PCR anidada con los oligos *chi 331*. Carril 1: Estandar de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Leader ThermoScientific™); Carril 2: espacio; Carril 3: PCR anidada con *P. pastoris* X33 no transformada; Carril 4: PCR anidada de *P. pastoris* X33 transformada

En la PCR de colonia se puso como control negativo *P. pastoris* X33 sin transformar y se puede observar cómo a partir de *P. pastoris* ChiBVT 331 se obtienen dos bandas a la altura de 2000 y 1897 pb. *P. pastoris* tiene dos genes del mismo tamaño (2000 pb) que codifican para la alcohol oxidasa, pero al ocurrir el intercambio génico por homología, el gen de AOX1 se intercambia por el gen *chi* 331 con un fragmento del vector, lo que hace que el tamaño del amplificado sea menor (1897 pb).

6.6 Analisis de la expresión de la proteína recombinante ChiBVT 331 por SDS-PAGE

Se realizó la inducción de la producción de la proteína recombinante ChiBVT 331 con metanol, durante 36 y 96 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se concentraron y se analizaron por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida. En la figura 6.13 se muestran los resultados obtenidos, donde puede observarse una banda de proteína de 47 KDa en la muestra de la inducción por 36 horas, que coincide con el peso teórico de la proteína Chi 331 y que está ausente en la cepa no transformada (carril 2), lo que indica que sí se produjo la quitinasa recombinante.

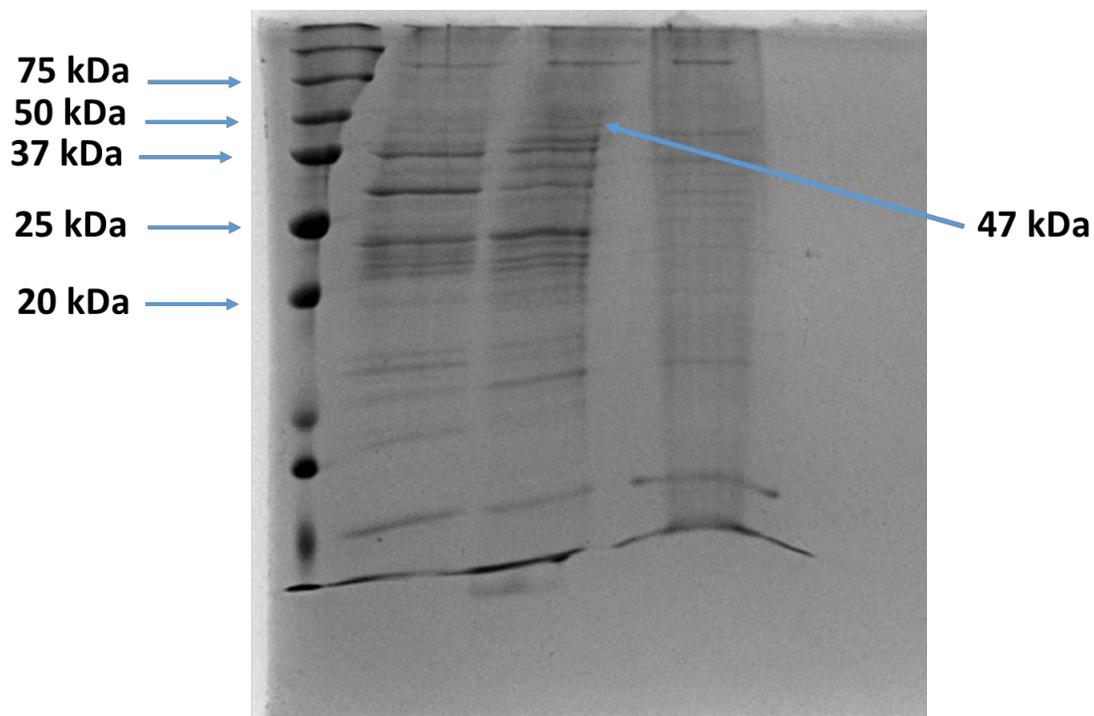


FIGURA 6.13 Gel de electroforesis en poliacrilamida de las proteínas producidas por *Pichia pastoris* X33 transformada con el gen *chiBVT* 331. Carril 1: estándar de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Xtra Standards Bio-Rad); Carril 2: proteínas producidas por la cepa de *P. pastoris* X33 no transformada; Carril 3: proteínas producidas después de 36 h de inducción con metanol; Carril 4: proteínas producidas después de 96 h de inducción con metanol.

CONCLUSIONES

Brevibacillus thermoruber HT42 posee un buen número de enzimas hidrolíticas, lo que le permite utilizar diversas fuentes de carbono, en relación con el medio complejo del que fue aislado (suelo de zona geotérmica).

Brevibacillus thermoruber HT42 posee genes para tres quitinasas diferentes, dos extracelulares y una intracelular. Este es el primer reporte de la presencia de quitinasas en la especie *Brevibacillus thermoruber*.

Fue posible clonar y expresar exitosamente el gen *chiBVT* 331 en *Pichia pastoris* X33.

La quitinasa recombinante ChiBVT 331 tiene una baja homología (en secuencia y tamaño) con otras quitinasas reportadas para especies del género *Brevibacillus*.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, T., & Kotasthane, A. (2012). Chitinolytic assay of indigenous Tricoderma isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *Springer Open Journal* .
- Allan R. N., L. L. (2005). *Brevibacillus levickii* sp. nov. and *Aneurinibacillus terranovensis* sp. nov., two novel thermoacidophiles isolated from geothermal soils of northern Victoria Land, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1039-1050.
- Aramori Ichiro, F. M. (1991). Cloning and nucleotide sequencing of a novel 7B-(4-carboxybutanamido)cephalosporanic acid acylase gene of *Bacillus laterosporus* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* , 7848-7855.
- Baek Sang-Hoon, I. W.-T.-S.-M.-T. (2006). *Brevibacillus ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2665-2669.
- Banani, H., Spadaro, D., Zhang, D., Matic, S., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2015). Postharvest application of a novel chitinase cloned from *Metschnikowia fructicola* and overexpressed in *Pichia pastoris* to control brown rot of peaches. *International Journal of Food Microbiology*, 54-61.
- Bihari Zoltan, V. D. (2010). Degradation of native feathers by a novel keratinase-producing, thermophilic isolate, *Brevibacillus thermoruber* T1E. *Z. Naturforsch*, 134-140.
- Bio-Rad Laboratories Inc. (s.f.). *Gene Pulser Xcell Electroporation System*.
- Boyce Sinead, T. F. (2001). Enzyme classification and nomenclature. *Encyclopedia of life sciences*.
- Choi Mi-Jin, B. J.-Y.-J.-J. (2010). *Brevibacillus fluminis* sp. nov., isolated from sediment of estuarine wetland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1595-1599.
- Cohen Stanley N., C. A. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci*, 2110-2114.
- Dahiya, N., Tewari, R., & Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 773-782.
- De vos Paul, G. G.-H. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer.
- Djukic Marvin, P. A. (2011). Genome sequence of *Brevibacillus laterosporus* LMG 15441 a pathogen of invertebrates. *Journal of Bacteriology*, 5535-5536.
- Fan, Y., Zhang, Y., Yang, X., Pei, X., Guo, S., & Pei, Y. (2007). Expression of a *Beauveria bassiana* chitinase (Bbchit1) in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 93-99.

- Goto Keiichi, F. R. (2004). Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (=NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus* sp. nov. and *Brevibacillus limnophilus* sp. nov. . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 419-427.
- Hatayama Kouta, S. H. (2014). *Brevibacillus fulvus* sp. nov., isolated from a compost pile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 506-512.
- Huang Xiaowei, T. B. (2005). An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Research in Microbiology* , 719-727.
- Hugon Perrine, M. A.-C.-E. (2013). Non-contiguous finished genome sequence and description of *Brevibacillus massiliensis* sp. nov. *Standar in genomic sciences*, 1-14.
- Inan Kadriye, C. S. (2012). *Brevibacillus aydinogluensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from Karakoc hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 849-855.
- Invitrogen Corporation. (s.f.). EasySelect Pichia Expression Kit a Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*.
- Ito Kimio, U. S. (1992). Cloning, characterization and inactivation of the *Bacillus Brevis lon* gene. *Journal of Bacteriology*, 2281-2287.
- Jaouadi Nadia Zarai, R. H. (2013). Biochemical and molecular characterization of a Serine Keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities. *Plos One*.
- Joshi M. N., S. A. (2013). Draft genome sequence of *Brevibacillus* sp. strain BAB-2500, a strain that might play an important role in agriculture. *Journals ASM*.
- Kadriye Inan, A. O. (2016). *Brevibacillus gelatini* sp.nov., isolated from hot spring in Turkey. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 712-718.
- Khan, F. I., Bisetty, K., Singh, S., Permaul, K., & Hassan, M. I. (2015). Chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP and its biotechnological applications. *Extremophiles*.
- Kim Myung Kyum, S. S.-C. (2009). *Brevibacillus panacihumi* sp. nov., a B-glucosidase-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1227-1231.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 345-351.
- Lee Alan Y. L., T. S.-S.-Y.-H. (2004). Identification of a gen encoding *lon* protease from *Brevibacillus thermoruber* WR-249 and biochemical characterization of its thermostable recombinant enzyme . *Eur. J. Biochem.* , 834-844.
- Li Gengmi, X. J. (2015). Full genome sequence of *Brevibacillus laterosporus* strain B9, a biological control strain isolated from Zhejiang, China. *Journal of Biotechnology*, 77-78.

- Logan N. A., F. G. (2002). Polyphasic identification of *Bacillus* and *Brevibacillus* strains from clinical, dairy and industrial specimens and proposal of *Brevibacillus invocatus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 953-966.
- Meena, S., Gothwal, R. K., Mohan, M. K., & Ghosh, P. (2014). Production and purification of a hyperthermostable chitinase from *Brevibacillus formosus* BISR-1 isolated from the Great Indian Desert soils. *Extremophiles*, 451-462.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 426-428.
- Niehaus F., B. C. (1999). Exrmophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 711-729.
- Panda Amrita Kumari, B. S. (2014). *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 623-639.
- Prasanna, L., Eijsink, V. G., Meadow, R., & Gaseidnes, S. (2013). A novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 1601-1611.
- R. Bruce Wallace, J. S. (1979). Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to Φ X 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Research*, 3543-3558.
- Radchenkova Nadya, T. A. (2011). Biosynthesis of an Exopolysaccharide produced by *Brevibacillus thermoruber* 438. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 77-79.
- Reese, J. M. (1969). The chitinase of *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 689-696.
- Rodriguez Gomez, C. (2002). *Aislamiento y caracterización parcial de bacterias termófilas de aguas termales y su posible aplicación en la biodesulfuración y recuperación mejorada del petróleo*. Veracruz, Veracruz.
- Russell, J. S. (2001). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shaoqing Yang a, X. F. (2016). Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. *Food Chemistry*, 1041-1048.
- She Yuehui, W. W. (2014). Genome sequence of *Brevibacillus agri* strain 5-2, isolated from the formation water of petroleum reservoir. *Marine Genomics*, 123-125.
- Shida Osamu, T. H. (1996). Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Sistematic Bacteriology*, 939-946.
- Takebe Fumihiko, H. K. (2012). *Brevibacillus nitrificans* sp. nov., a nitrifying bacterium isolated from a microbiological agent for enhancing microbial digestion in sewage tratment tanks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2121-2126.

- Tian Baoyu, Y. J.-Q. (2007). Role of an extracellular neutral protease in infection against nematodes by *Brevibacillus laterosporus* G4. *Appl Microbiol Biotechnol*, 373-380.
- Trudy H Grossman, E. S. (1998). Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*, 95-103.
- Ueda, M., Shioyama, T., Nakadoi, K., Nakazawa, M., Sakamoto, T., Iwamoto, T., & Sakaguchi, M. (2017). Cloning and expression of a chitinase gene from *Eisenia fetida*. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- V.K, L. (1970). Determination of protein molecular weight in polyacrylamide gels. *Nature*, 680-5.
- Wang Xinxin, J. D. (2014). Draft genome sequence of *Brevibacillus panacihumi* strain W25, a halotolerant hydrocarbon-degrading bacterium. *Journals ASM*.
- Wang, Y.-J., & Yang, Q. (2009). Cloning and Expression of a Novel Chitinase chi58 from *Chaetomium cupreum* in *Pichia pastoris*. *Biochem Genet*, 547-558.
- Wen-Dong Xian, Y.-R. Y.-G.-M.-J. (2016). *Brevibacillus sediminis* sp. nov., isolated from a hot spring in Tibet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 548-553.

APENDICE A

Secuencia de nucleótidos del gen *chi* 331 tiene un tamaño de 1287 pb

5'-

ATGACATGTCTATCTTTTCTGTGGATCGTTTCCCTCCTGTTCCCTGACCGTCGC
 GGTGCCCGCGTCGACGGCCAAAACCATGCCGCTGCGGGACATTTCCGACA
 GCTATGCGGAAGAGCAGATCCTGTGCTGGTTCAGGCCGGCGTGATTGTGC
 GCGACCCCGACGGCTATTTCCACCCCCACCAGCCCGTCAAACGGGCGGAGT
 TCGTCGCGATGCTGAACCGCACGCTGGGAATCCGCCCGTCTCCAGCCAGA
 TTCAGGCCTACTCGGACGTGCCGAAATACGCTTGGGCCTACGGCGACGTGC
 AGGCTTCCGCCGCTTGGGCATCGTCAACGGCACCCAGCGTGACGACCTTCG
 CGCCGAATCGGACGCTCACCCGCCAGGAAGCGGCCGTTATCATCATGCGG
 GCGTTGGGCACAAAGCCGAACGGGACGGCGAGCCTCCCCGTGCGCCGATTC
 CTCCCGGATATCGGCGTGGGCCAAACCGTACGTCAGCGAAGCGCTCAAGAC
 CGAGCTGCTGGTTCGGCTACGCGGGGTACTIONCCGCCCACTGACCCGCTCA
 GCAGGGAAGAGACAGCCGTCATCCTGCATCGGGTGCTGACGCGTCTGGACA
 AACAGCCGGCCAAGCCTCCCGTCGTCCTCGGCTGGCAGTACCTGACGACCA
 CCCAGGAATTTCTCCAAGTGGTGAACGGCTCGGAGGTCAACACGCTCTCGC
 CCCGCTGGTTCTTTCTGGATCCGGACGGGTCCGTATCCGATTCCGCCGAAC
 CTGCCCTCGTCCAGTGGGCACACGAAAAAGGGAAGCGGGTGTGGGCGCTG
 TTCGGCAACCGCTTTGACGCGAAGGCGACACACGAGGCCCTGTCGGCCCC
 GGCCAAGCGGGACGCCATCGTGGACAAGCTGGCCGCGCTCGTCGAGAAGT
 ACCAACTGGACGGGATCAACGTCGACTTTGAGAGCATGTATGCGGATGACC
 GGGACGTCTTCACCGCGTTTGTCCGCGAACTCTCGGCCGCCCTGCATGCAA
 AGGGAGCGGTGCTCTCCGTGACGTGCCGCGCGATTTGCGCAGTGACTGG
 AGCGATCCCTACGACTATGCGGCATTGTCCCAACATGCCGATTACCTGGTGC
 TGATGGCGTACGAAGAGCATTGGAGCGGCGGTCCGAAAGCCGGTTCCGTCT
 CCTCCCTGCCGTGGCTGGCCGACAGCATCTCCGGACTGATTGGACGGGTCC
 CGGCCGGGAAGCTGATCGTGGGTCTGCCGCTCTACACGCGGGATTGGTATC
 AGGCGAACGGAAAATGG-3'

Secuencia de aminoácidos del gen *chi* 331 con un tamaño de 429 a.a

MTCLSFLWIVSLLFLTVAVPASTAKTMPLRDISDSYAEEQILSLVQAGVIVGDPDG
YFHPHQPVKRAEFVAMLNRTLGIKRVSSQIQAYS DVPKYAWAYGDVQASAALGI
VNGTSVTTTFAPNRTLTRQEAAVIIMRALGTKPNGTASLPVADSSRISAWAKPYVS
EALKTELLVGYAGYFRPTDPLSREETAVILHRVLTRLDKQPAKPPVVLGWQYLTT
TQEFLQLVNGSEVNTLSRWFFLDPDGSVSDSAEPALVQWAHEKGKRVWALF
GNRFDKATHEALSAPAKRDAIVDKLAALVEKYQLDGINVDFESMYADDRDVFT
AFVRELSAALHAKGAVVSVDVPRDLRSDWSDPYDYAALSQHADYLVLMAYEEH
WSGGPKAGSVSSLPWLADSIISGLIGRVPAGKLIVGLPLYTRDWYQANGKW

Secuencia recibida por parte del Instituto de Biotecnología de la UNAM del gen *chi* 331 con un tamaño de 1219 pb

5'-

TTTCCTCCTGTTCCCTGACCGTCGCGGTGCCCGCGTCGACGGCCAAAACCAT
 GCCGCTGCGGGACATTTCCGACAGCTATGCGGAAGAGCAGATCCTGTCGCT
 GGTTACAGGCCGCGGTGATTGTCGGCGACCCCGACGGCTATTTCCACCCCA
 CCAGCCCGTCAAACGGGCGGAGTTCGTCGCGATGCTGAACCGCACGCTGG
 GAATCCGCCCCGTCTCCAGCCAGATTCAGGCCTACTCGGACGTGCCGAAAT
 ACGCTTGGGCCTACGGCGACGTGCAGGCTTCCGCCGCCTTGGGCATCGTCA
 ACGGCACCAGCGTGACGACCTTCGCGCCGAATCGGACGCTCACCCGCCAG
 GAAGCGGCCGTTATCATCATGCGGGCGTTGGGCACAAAGCCGAACGGGAC
 GGCGAGCCTCCCCGTGCGCGATTCTCCCGGATATCGGCGTGGGCCAAAC
 CGTACGTCAGCGAAGCGCTCAAGACCGAGCTGCTGGTCCGGCTACGCGGGG
 TACTTCCGCCCCACTGACCCGCTCAGCAGGGAAGAGACAGCCGTCATCCTG
 CATCGGGTGCTGACGCGTCTGGACAAACAGCCGGCCAAGCCTCCCGTCGTC
 CTCGGCTGGCAGTACCTGACGACCACCCAGGAATTTCTCCAACCTGGTGAAC
 GGCTCGGAGGTCAACACGCTCTCGCCCCGCTGGTTCTTTCTGGATCCGGAC
 GGGTCCGTATCCGATTCCGCCGAACCTGCCCTCGTCCAGTGGGCACACGAA
 AAAGGGAAGCGGGTGTGGGCGCTGTTCCGGCAACCGCTTTGACGCGAAGGC
 GACACACGAGGCCCTGTCGGCCCCGGCCAAGCGGGACGCCATCGTGGACA
 AGCTGGCCGCGCTCGTCGAGAAGTACCAACTGGACGGGATCAACGTGACT
 TTGAGAGCATGTATGCGGATGACCGGGACGTCTTCACCGCGTTTGTCCGCG
 AACTCTCGGCCGCCCTGCATGCAAAGGGAGCGGTCTCTCCGTGACGCTGC
 CGCGCGATTTGCGCAGTGAAGTGGAGCGATCCCTACGACTATGCGGCATTGT
 CCCACCATGGCGAATACCTGATGCTGATGGCGTACGCAGAGCACTGGAGCG
 TCGATCCGAAAGCCGGATTCCGGCTCCTCCCTGCCGTGGCTGGCCGACAGC
 ATCTCCGACTGATTGGACGGGTCCCGGCCGGGAAGCTGATCGTGGGTCTG
 CC-3'

Secuencia de aminoácidos del gen *chi* 331 recibida por el IBT con un tamaño de 390 a.a

MPLRDISDSYAEQILSLVQAGVIVGDPDGYFHPHQPVKRAEFVAML
NRTLGIKRPVSSQIQAYSQVDPKYAWAYGDVQASAALGIVNGTSVTTFA
PNRTLTRQEAAVIIMRALGKPNGTASLPVADSSRISAWAKPYVSEAL
KTELLVGYAGYFRPTDPLSREETAVILHRVLTRLDKQPAKPPVVLGW
QYLTTTQEFLQLVNGSEVNTLSRWFFLDPDGSVSDSAEPALVQWA
HEKGKRVWALFGNRFDAKATHEALSAPAKRDAIVDKLAALVEKYQLD
GINVDFESMYADDRDVFTAFVRELSAALHAKGAVVSVDVPRDLRSD
WSDPYDYAALSHHGEYLMLMAYAEHWSVDPKAGFRLLPVAVAGRQH
LRTDWTGPGREADRGSA

Secuencia de nucleótidos en marco de lectura recibida por el IBT del gen recombinante *chi*BVT 331

5'-

ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTA
GCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTG
AAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTG
CCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCC
AGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAA
GCTGCAGGAATTCTGACATGTCTATCTTTTCTGTGGATCGTTTCCCTCCTGTT
CCTGACCGTCGCGGTGCCCGCGTCGACGGCCAAAACCATGCCGCTGCGGG
ACATTTCCGACAGCTATGCGGAAGAGCAGATCCTGTCGCTGGTTCAGGCCG
GCGTGATTGTCGGCGACCCCGACGGCTATTTCCACCCCCACCAGCCCGTCA
AACGGGCGGAGTTCGTCGCGATGCTGAACCGCACGCTGGGAATCCGCCCC
GTCTCCAGCCAGATTCAGGCCTACTCGGACGTGCCGAAATACGCTTGGGCC
TACGGCGACGTGCAGGCTTCCGCCGCTTGGGCATCGTCAACGGCACCCAG
CGTGACGACCTTCGCGCCGAATCGGACGCTCACCCGCCAGGAAGCGGCCG
TTATCATCATGCGGGCGTTGGGCACAAAGCCGAACGGGACGGCGAGCCTCC
CCGTCGCCGATTCTCCCGGATATCGGCGTGGGCCAAACCGTACGTCAGCG
AAGCGCTCAAGACCGAGCTGCTGGTTCGGCTACGCGGGGTA CTTCGCCCCCA
CTGACCCGCTCAGCAGGGAAGAGACAGCCGTCATCCTGCATCGGGTGTGA
CGCGTCTGGACAAACAGCCGGCCAAGCCTCCCGTCGTCCTCGGCTGGCAGT
ACCTGACGACCACCCAGGAATTTCTCCA ACTGGTGAACGGCTCGGAGGTCA
ACACGCTCTCGCCCCGCTGGTTCTTTCTGGATCCGGACGGGTCCGTATCCG
ATTCCGCCGAACCTGCCCTCGTCCAGTGGGCACACGAAAAAGGGAAGCGGG
TGTGGGCGCTGTTTCGGCAACCGCTTTGACGCGAAGGCGACACACGAGGCC
CTGTCCGCCCCGGCCAAGCGGGACGCCATCGTGGACAAGCTGGCCGCGCT
CGTCGAGAAGTACCAACTGGACGGGATCAACGTGCACTTTGAGAGCATGTAT
GCGGATGACCGGGACGTCTTCACCGCGTTTGTCCGCGAACTCTCGGCCGCC
CTGCATGCAAAGGGAGCGGTCGTCTCCGTGACGTGCCGCGCGATTTGCGC
AGTGACTGGAGCGATCCCTACGACTATGCGGCATTGTCCCAACATGCCGATT

ACCTGGTGCTGATGGCGTACGAAGAGCATTGGAGCGGCGGTCCGAAAGCC
GGTCCGTCTCCTCCCTGCCGTGGCTGGCCGACAGCATCTCCGGACTGATT
GGACGGGTCCCGGCCGGGAAGCTGATCGTGGGTCTGCCGCTCTACACGCG
GGATTGGTATCAGGCGAACGGAAAATGGAGGGGGGGCGGCCGCCAGCTTTC
TAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTGACCATCA
TCATCATCATCAT-3'

Secuencia de aminoácidos en marco de lectura recibida por el IBT del gen recombinante *chi*BVT 331

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYS DLEGDF
DVAVL PFSNSTNNGLLFINTTASIAAKEEGVSLEKREAEAAGILTCLS
FLWIVSLLFLTVAVPASTAKTMPLRDISDSYAE EQILSLVQAGVIVGDP
DGYFH PHQPVKRAEFVAMLNRTL GIRPVSSQIQAYS DVPKYAWAYGD
VQASAALGIVNGTSVTT FAPNRTLTRQEAAVIIM RALGTKPNGTASLP
VADSSRISAWAKPYVSEALKTELLVGYAGYFRPTDPLSREETAVILHR
VLTRL DKQPAKPPVVLGWQYLTTTQEFLQLVNGSEVNTLS PRWFFLD
PDGSVSDSAEPALVQWAHEK GKRVWALFGNRFD AKATHEALSAPAK
RDAIVDKLAALVEKYQLDGINVDFESMYADDRDVFTAFVRELSAALH
AKGAVVSVDVPRDLRSDWSDPYDYAALSQHADYLVLMAYEEHWSG
GPKAGSVSSLPWLADSI SGLIGRVPAGKLIVGLPLYTRDWYQANGKW
RGAAASFLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

APENDICE B

Medios de cultivo

LB (Invitrogen Corporation)

Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de Levadura	10
Peptona	5
NaCl	5
Agar	20

LB+Zeocina (Invitrogen Corporation)

Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de Levadura	10
Peptona	5
NaCl	5
Agar	20
Zeocina	Agregar 250 μ L

Ajustar pH a 7.5

YPD (Invitrogen Corporation)

Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de Levadura	10
Peptona	20
Dextrosa	20
Agar	20

YPDS+Zeocina (Invitrogen Corporation)

Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de Levadura	10
Peptona	20
Dextrosa	20
Sorbitol	182.2
Agar	20
Zeocina	Agregar 1 mL

Ajustar pH a 7.5

YPD/HEPES (Bio-Rad Laboratories Inc.)

Compuesto	Volumen (mL)
Medio YPD	100
HEPES 1M pH 8.0	20

BMGY (Invitrogen Corporation)

Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de Levadura	10
Triptona	20
YNB	1.34
Biotina 20 mg/100 mL	2 mL
Glicerol 10% (v/v)	100 mL
Solución amortiguadora de fosfatos 1M pH 6.0	100 mL

BMMY (Invitrogen Corporation)

Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de Levadura	10
Triptona	20
YNB	1.34
Biotina 20 mg/100 mL	2 mL
Metanol	5 mL
Solución amortiguadora de fosfatos 1M pH 6.0	100 mL

Soluciones

Sorbitol 1M (Bio-Rad Laboratories Inc.)

Compuesto	Concentración (g/L)
Sorbitol	182.2

Solución de Lisis I (Sambrook, 2001)

Compuesto	Concentración (mM)
Glucosa	50
Tris-HCl pH 8.0	25
EDTA pH 8.0	10

Solución de Lisis II (Sambrook, 2001)

Compuesto	Concentración
NaOH	0.2 N
SDS	1% (w/v)

Solución de Lisis III (Sambrook, 2001)

Compuesto	Concentración (mL)
Acetato de potasio 5 M	60
Ácido acético glacial	11.5
Agua	28.5

TE (pH8.0) (Sambrook, 2001)

Compuesto	Concentración (mM)
Tris-HCl pH 8.0	100
EDTA pH 8.0	10

Solución de tñido (Laemmli, 1970)

Compuesto	Concentración
Azul brillante Coomassie R-250	2.5 g
Metanol	450 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Aforar a 1L con agua bidestilada	

Solución de desteñido (Laemmli, 1970)

Compuesto	Concentración
Metanol	200 mL
Ácido acético glacial	150 mL
Aforar a 1L con agua bidestilada	

HEPES 1M pH 8.0 (Bio-Rad Laboratories Inc.)

Compuesto	Concentración (g/ 100mL)
HEPES	23.8

Ajustar el pH a 8.0