



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Identificación de los genes que codifican la(s) cutinasa(s) con posible actividad degradativa sobre el poliuretano en el hongo *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.I.1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

B.Q.D. Itzayana Chavarría Quintanilla

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera  
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos  
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM  
Dr. Adrián Ochoa Leyva  
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX. Diciembre, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos técnicos**

A los apoyos económicos brindados por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-UNAM IN223317 y IN227620, al Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado-Facultad de Química-UNAM 5000-9117 y a CONACYT proyecto 101737 otorgados a la Dra. Herminia Loza Tavera.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por la formación académica, profesional y personal.

A CONACYT por la beca que me permitió realizar mis estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas, en el periodo de enero 2018 a enero 2020.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para la asistencia al XIII Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos con el propósito de presentar los resultados de mi trabajo.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por su tutoría, por todas las enseñanzas, formación y por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. Martín Vargas Suárez por toda su ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial por sus sugerencias y colaboraciones durante la realización de este trabajo:

Al Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos por su colaboración para el ensamble del genoma.

Al Dr. Adrián Ochoa Leyva y al M. en C. Luigui Gallardo Becerra por su colaboración con el análisis de expresión diferencial.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria de la Facultad de Química, UNAM, en especial a la Q. Marisela Gutiérrez Franco por los análisis de espectroscopía de infrarrojo.

A los miembros de mi jurado de examen por la revisión de esta tesis y su contribución a la mejora del trabajo escrito.

## **Agradecimientos personales**

A mi madre por enseñarme que la perseverancia es lo más importante para lograr algo y a mi padre por enseñarme a ver más allá, a ambos por todo su amor, apoyo y consejos.

A mi hermana Jessica y a José por su hospitalidad, apoyo y compañía. En especial a Jessi por ser siempre mi apoyo de hermana mayor.

A Carlos por su inefable y sempiterno amor.

A mis roomies Marian y Diana Chavira por su amistad, por ser la compañía perfecta durante nuestro camino hacia la ciencia. A Marian por contagiarme de su alegría por las mañanas y a Diana Chavira por todas las pláticas nocturnas que terminaban en mil proyectos dignos de un Nobel.

A mis compañeros del laboratorio 105; a mis compañeras de doctorado Jacqueline e Itzel por su paciencia y ayuda, a Diana Díaz por enseñarme todo acerca de A3.I.1, a Diana Ruiz por todo lo que compartimos juntas, al Dr. Ulises por los consejos en el almuerzo y al Dr. Martín por su habilidad para apoyarnos a todos al mismo tiempo. A todos gracias por su amistad.

# Índice

<b>Índice</b>	iii
<b>Abreviaturas</b>	vi
<b>Índice de tablas y figuras</b>	vii
<b>1. Resumen</b>	1
<b>1. Abstract</b>	2
<b>2. Introducción</b>	3
2.1 Poliuretano: producción y contaminación	3
2.2 Biodegradación de PU	4
2.3 Biodegradación de PU por hongos	5
<b>3. Antecedentes</b>	7
<b>4. Hipótesis</b>	12
<b>5. Objetivos</b>	13
5.1 Objetivo general	13
5.2 Objetivos particulares	13
<b>6. Estrategia experimental</b>	14
<b>7. Materiales y métodos</b>	15
7.1 Cultivo y mantenimiento de <i>Cladosporium tenuissimum</i> A3.I.1	15
7.2 Secuenciación y ensamblaje del genoma de <i>Cladosporium tenuissimum</i> A3.I.1	15
7.2.1 Extracción de DNA genómico	15
7.2.2 Secuenciación del genoma	16
7.2.3 Ensamblaje del genoma	17
7.2.4 Determinación del reordenamiento cromosómico y predicción de genes en <i>Cladosporium tenuissimum</i> A3.I.1	17
7.2.5 Cerrado de gaps y anotación de genes en <i>Cladosporium tenuissimum</i> A3.I.1	18
7.3 Búsqueda de genes de cutinasas en el genoma de <i>Cladosporium tenuissimum</i> A3.I.1	18
7.4 Identificación de las cutinasas con similitudes estructurales con otras proteínas degradadoras de polímeros sintéticos	19
7.4.1 Identificación del gen correspondiente al fragmento de 146 pb amplificado con primers degenerados	19
7.4.2 Predicción de la localización celular de las cutinasas putativas de A3.I.1	19

7.4.3 Modelación por homología de la estructura terciaria de las cutinasas extracelulares de A3.I.1	19
7.4.4 Búsqueda de similitudes estructurales con proteínas caracterizadas	20
7.4.5 Predicción del potencial de contacto y pocket del sitio catalítico de las cutinasas de A3.I.1	20
7.5 Determinación de condiciones de cultivo para el análisis transcriptómico	21
7.5.1 Condiciones de cultivo de los experimentos curso-temporal de <i>Cladosporium tenuissimum</i> A3.I.1	21
7.5.2 Cuantificación de proteínas extracelulares de cultivos con y sin Impranil	22
7.5.3 Cuantificación de actividad de aclaramiento de Impranil	23
7.5.4 Cuantificación de la degradación de Impranil por cultivo	23
7.5.5 Resolución de proteínas extracelulares por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)	24
7.5.6 Zimografías	25
7.5.7. Determinación de cambios en la estructura de MM-Impranil 0.5% por FTIR	26
7.5.8. Secuenciación de transcriptoma y análisis de expresión diferencial	26
7.5.8.1 Extracción de RNA total	26
7.5.8.2 Secuenciación del RNA	27
7.5.8.3 Análisis de expresión diferencial	28
7.5.8.4 Búsqueda de cutinasas con expresión diferencial en Impranil	28
<b>8. Resultados y discusión</b>	29
8.1 Secuenciación y ensamblaje del genoma de <i>Cladosporium tenuissimum</i> A.3.I.1	29
8.1.1 Determinación de las mejores condiciones para la purificación de DNA	29
8.1.2 Ensamblaje del genoma de <i>C. tenuissimum</i> A3.I.1	34
8.1.3 Determinación del reordenamiento cromosómico y predicción de genes en <i>Cladosporium tenuissimum</i> A3.I.1	34
8.2 Identificación de los genes de las cutinasas putativas en el genoma de <i>C. tenuissimum</i> A3.I.1	37
8.2.1 Búsqueda de genes candidatos de cutinasas en <i>C. tenuissimum</i> A3.I.1	37
8.2.2 Anotación funcional de los genes candidatos a cutinasas	38

8.3 Identificación de las cutinasa(s) con posible actividad degradativa sobre el poliuretano	41
8.3.1 Búsqueda de la(s) cutinasas degradadoras empleando las evidencias experimentales obtenidas en el laboratorio	42
8.3.1.1 Cutinasas de A3.I.1 semejantes a la cutinasa 3gbs de <i>Aspergillus oryzae</i> degradadora de polímeros sintéticos	48
8.3.1.2 Cutinasas de A3.I.1 semejantes a la proteína tipo cutinasa 2czq de <i>Cryptococcus sp.</i> S-2 que degrada PLA y PBS	52
8.4 Determinación de las condiciones diferenciales de expresión de la actividad “Impranilasa” para el análisis transcriptómico	55
8.4.1 Evaluación de la actividad “Impranilasa” en medio caldo papa dextrosa (PDB)	55
8.4.2 Evaluación de la actividad “Impranilasa” en medio mínimo dextrosa (MM-dextrosa) a diferentes concentraciones	60
8.5 Identificación de cutinasas degradadoras de Impranil en A3.I.1 por expresión diferencial de genes durante el crecimiento del hongo en Impranil	81
<b>9. Conclusiones</b>	88
<b>10. Perspectivas</b>	90
<b>Referencias</b>	91
<b>Apéndice</b>	97

## Abreviaturas

<b>CTAB</b>	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b>DO</b>	densidad óptica
<b><i>g</i></b>	gravedades
<b>h</b>	horas
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>M</b>	molar
<b>μL</b>	microlitros
<b>mL</b>	mililitro
<b>L</b>	litro
<b>mM</b>	milimolar
<b>MM</b>	medio mínimo mineral
<b>MM-dextrosa</b>	medio mínimo mineral con dextrosa
<b>MM-Impranil</b>	medio mínimo mineral con Impranil
<b>PBS</b>	polibutileno succinato
<b>PBSA</b>	polibutileno succinato adipato
<b>PDA</b>	medio caldo de papa dextrosa sólido
<b>PDB</b>	medio caldo de papa dextrosa líquido
<b>PE-PU</b>	poliéster poliuretano
<b>PLA</b>	ácido poliláctico
<b>PS-PU</b>	poliéster poliuretano
<b>PU</b>	poliuretano
<b>s</b>	segundo
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio
<b>SMRT</b>	secuenciación de molécula única en tiempo real
<b>U</b>	unidades
<b>v/v</b>	relación volumen-volumen

## Índice de tablas y figuras

- Figura 1.** Síntesis de un poliuretano simple.
- Figura 2.** Zimograma de actividad “Impranilasa”.
- Figura 3.** Integridad del gDNA de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 extraído mediante los diferentes protocolos evaluados.
- Figura 4.** Integridad del gDNA de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 enviado a secuenciación.
- Figura 5.** Heatmap post-agrupamiento de interacciones intracromosómicas basadas en HiC en *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1.
- Figura 6.** Barplot de puntajes de evaluación del genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. con BUSCO.
- Figura 7.** Estructura génica de los genes candidatos de cutinasas en *C. tenuissimum* A3.I.1.
- Figura 8.** Árbol filogenético de las 13 cutinasas putativas en *C. tenuissimum* A3.I.1.
- Figura 9.** Modelación por homología de la estructura terciaria de las 10 cutinasas extracelulares codificadas en el genoma de *C. tenuissimum* A3.I.1.
- Figura 10.** Alineamiento del modelo de la cutinasa 6962 de A3.I.1 y la estructura terciaria de cutAory.
- Figura 11.** Modelo de la estructura terciaria de la cutinasa 6962 de A3.I.1 usando como molde la estructura de cutAory.
- Figura 12.** Predicción del potencial de contacto y “pocket” asociado al sitio de unión del sustrato de la cutinasa 6962 de A3.I.1.
- Figura 13.** Alineamientos de las predicciones de las cutinasa 2372, 8471 y 9593 de A3.I.1 y la estructura terciaria de cutCsp.
- Figura 14.** Árbol filogenético de las cutinasas putativas en *C. tenuissimum* A3.I.1 relacionadas con proteínas cristalizadas con las que muestran similitud.
- Figura 15.** Actividad específica de “Impranilasa” a diferentes semanas de cultivo.

- Figura 16.** Crecimiento de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 en MM-Impranil y PDB.
- Figura 17.** SDS-PAGEs y zimogramas de actividad esterasa e “Impranilasa” de proteínas extracelulares de A3.I.1 cultivado en MM-Impranil y en medio PDB.
- Figura 18.** Análisis de proteínas extracelulares de cultivos en MM-Impranil de 5 semanas, para descartar la presencia de otras actividades “Impranilasa”.
- Figura 19.** Biomasa en peso seco de A3.I.1 cultivado en MM-Impranil y en MM-dextrosa a 2 y 4 semanas.
- Figura 20.** Proteína extracelular de cultivos de A3.I.1 a 2 y 4 semanas en MM-Impranil y MM-dextrosa por mg de biomasa.
- Figura 21.** Actividad específica de “Impranilasa” en el SN de cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil y MM-dextrosa.
- Figura 22.** Impranil aclarado por proteína total en el SN de cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil y MM-dextrosa.
- Figura 23.** Impranil aclarado por gramo de biomasa de cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil y MM-dextrosa.
- Figura 24.** Análisis de proteínas extracelulares de cultivos de 4 semanas en MM-Impranil y diferentes concentraciones de MM-dextrosa.
- Figura 25.** Comparación del crecimiento de *C. tenuissimum* A3.I.1 en MM-Impranil y MM-dextrosa 0.27 mM utilizando diferentes tipos de inóculo.
- Figura 26.** Comparación de la biomasa producida inoculando con conidias no germinadas (CNG) y conidias germinadas (CG) en cultivos con MM-Impranil y MM-dextrosa 0.27 mM.
- Figura 27.** Proteína extracelular de cultivos de A3.I.1 de 1 a 4 semanas en MM-Impranil y MM-dextrosa.
- Figura 28.** Actividad específica de “Impranilasa” en proteínas extracelulares de cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil 0.5%.
- Figura 29.** Impranil degradado en cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil 0.5%.

- Figura 30.** Comparación del crecimiento de *C. tenuissimum* A3.I.1 en MM-dextrosa 0.13, 0.20 y 0.27 mM.
- Figura 31.** Biomasa de A3.I.1 cultivado en MM-dextrosa 0.13, 0.20 y 0.27 mM y en MM-Impranil 0.5%.
- Figura 32.** Actividad específica de “Impranilasa” en proteínas extracelulares de cultivos de A3.I.1 en MM-dextrosa 0.13 mM.
- Figura 33.** Comparación del crecimiento de *C. tenuissimum* A3.I.1 en MM-Impranil 0.5% y MM-dextrosa 0.13 mM.
- Figura 34.** Biomasa en peso seco de A3.I.1 cultivado en MM-Impranil 0.5% y en MM-dextrosa 0.13 mM.
- Figura 35.** Proteína extracelular de cultivos de A3.I.1 de 1 a 4 semanas en MM-Impranil 0.5% y en MM-dextrosa 0.13 mM.
- Figura 36.** Impranil degradado en cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil 0.5% inoculado con conidias germinadas.
- Figura 37.** Actividad específica de “Impranilasa” en proteínas extracelulares de cultivos de A3.I.1 cultivado en MM-Impranil 0.5% y en MM-dextrosa 0.13 mM.
- Figura 38** Espectros de FTIR del sobrenadante de cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil 0.5% a diferentes semanas de crecimiento.
- Figura 39.** RNAs de A3.I.1 enviado a secuenciar.
- Figura 40.** Reacciones de PCR de muestras de RNA total tratadas y no tratadas con DNAsa.
- Figura 41.** Reacciones de PCR de muestras de RNA total tratadas con DNAsa.
- Figura 42.** Correlación entre la expresión de genes expresados en Impranil y dextrosa.
- Figura 43.** Predicción del potencial de contacto y “pockets” asociados al sitio de unión del sustrato de las cutinasas de A3.I.1 expresadas diferencialmente en Impranil.

- Tabla 1.** Hongos con capacidad de degradar PU.
- Tabla 2.** Comparación de calidad y rendimiento de gDNA extraído con el kit E.Z.N.A® Fungal Mini y extracción con CTAB.
- Tabla 3.** Comparación de calidad y rendimiento de gDNA extraído con el kit E.Z.N.A® HP Fungal DNA y ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep.
- Tabla 4.** Calidad y rendimiento del gDNA enviado a secuenciación.
- Tabla 5.** Resultados de la secuenciación del genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1.
- Tabla 6.** Genes identificados y longitud de aminoácidos de las probables cutinasas codificadas en el genoma de *C. tenuissimum* A3.I.1.
- Tabla 7.** Familia y dominios identificados en las cutinasas de A3.I.1.
- Tabla 8.** Términos GO asignados a las cutinasas de A3.I.1.
- Tabla 9.** Localización celular de las cutinasas de A3.I.1.
- Tabla 10.** Evaluación de las predicciones de estructura terciaria de las once cutinasas extracelulares de A3.I.1.
- Tabla 11.** Proteínas identificadas en DALI con similitud estructural a las cutinasas extracelulares de A3.I.1.
- Tabla 12.** Evaluación de las predicciones de estructura terciaria de las cutinasas 2806 y cut3791 utilizando como referencia a cutAory.
- Tabla 13.** Posición de los puentes disulfuro de las proteínas de A3.I.1 empleando el programa DiANNA.
- Tabla 14.** Parámetros de calidad de RNA total de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1.
- Tabla 15.** Concentración y parámetros calidad de RNA total después del tratamiento do con DNAsa.

# 1. Resumen

El poliuretano (PU) es un plástico ampliamente utilizado por su versatilidad y bajo costo de producción, lo cual ha generado problemas de acumulación de desechos. La dificultad para reutilizar estos desechos ha puesto la mirada en la biodegradación como una alternativa para contrarrestar este problema. En nuestro grupo de trabajo se identificó una cutinasa extracelular de aproximadamente 23 kDa con actividad degradativa sobre un barniz de poliéster poliuretano (Impranil), que se expresaba a las seis semanas de cultivo en este barniz por el hongo *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.I.1. En este trabajo se identificaron las cutinasas con posible actividad degradativa sobre el poliéster poliuretano (PS-PU), codificadas en el genoma de este hongo. Para ello, se secuenció el genoma de A3.I.1, el cual tiene un tamaño aproximado de 33.69 Mbp. Se identificaron 13 cutinasas putativas de las cuales 10 son extracelulares. Por modelado por homología de estructura terciaria cuatro cutinasas extracelulares mostraron similitud con proteínas capaces de degradar poliésteres sintéticos. La proteína 6962, la más parecida a la cutinasa previamente identificada como degradadora de Impranil, posee gran similitud con una cutinasa degradadora de PBS (polibutileno succinato) y PBSA (polibutileno succinato adipato) de *Aspergillus oryzae* (CutAory). CutAory presenta un tercer puente disulfuro adicional y un surco catalítico profundo y continuo, que las cutinasas canónicas no poseen. Por su parte, las cutinasas 2372, 8471 y 9593 son muy similares a la proteína tipo cutinasa que degrada PLA (ácido poliláctico) y PBS de *Cryptococcus* sp S-2, la cual, a diferencia de otras cutinasas, posee bucles cerca del sitio catalítico, los cuales se propone tienen relación con su capacidad para degradar poliésteres. Se investigó la expresión de las cutinasas de A3.I.1 en MM-Impranil mediante análisis transcriptómico. Para ello, se definió que a las dos semanas de cultivo en MM-Impranil (0.5%) las proteínas extracelulares podían degradar Impranil, mientras que en MM-dextrosa (0.13 mM) no se observó dicha actividad. En estas condiciones, las únicas cutinasas sobre-expresadas en Impranil fueron la 8471 y la 9593, por lo que se sugiere que están involucradas en la degradación de PS-PU complejos, mientras que la cutinasa 6962 podría tener actividad sobre PS-PU menos complejos, en estadios posteriores de cultivo.

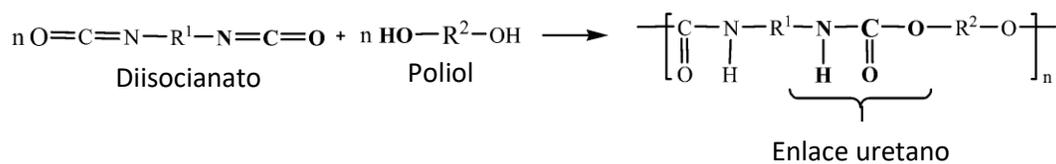
## 1. Abstract

Polyurethanes (PU) are plastics widely used because of their versatility and low production cost, which have generated waste accumulation problems. The difficulty in recycling or managing PU wastes has set the focus on biodegradation as an alternative to counteract this problem. In our research group, we identified an extracellular cutinase (approximately 23 kDa) with degradative activity on the polyester (PS)-PU coating (Impranil), expressed at six weeks of culture in the coating by the fungus *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. In this work, cutinases with possible degradative activity on PS-PU, encoded in the A3.I.1 genome were identified. For that, the A3.I.1 genome was sequenced, having 33.69 Mbp. Thirteen putative cutinases were identified, from which 10 were extracellular. By tertiary structure homology modeling, four extracellular cutinases were found similar to proteins with capacity to degrade synthetic polyesters. Protein 6962, the one with the largest similarity to the cutinase previously identified as Impranil degrader, has great similarity with a PBS (polybutylene succinate) and PBSA (polybutylene succinate adipate) degrading cutinase from *Aspergillus oryzae* (CutAory). CutAory shows an extra third disulfide bridge and a deep and continuous catalytic pocket that canonical cutinases do not have. Cutinases 2372, 8471 and 9593 are very similar to the PLA (poly lactic acid) and PBS-degrading cutinase from *Cryptococcus* sp S-2 and, unlike other cutinases, it has loops near the catalytic site, which have been proposed to be related to polyesters' degradation. A3.I.1 cutinases' expression in MM-Impranil was analyzed by transcriptomics. For this purpose, we defined that at two weeks of culture in MM-Impranil (0.5%), extracellular proteins could degrade the polymer, while in control condition, MM-dextrose (0.13 mM), this activity was not observed. At this conditions, the only over-expressed cutinases in cultures with Impranil were 8471 and 9593 cutinases, so we suggest they are involved in the degradation of complex PS-PU structures, while the 6962 cutinase could have activity on less complex PS-PU, in later times of cultivation.

## 2. Introducción

### 2.1 Poliuretano: producción y contaminación

El Poliuretano (PU) es un polímero sintético que contiene grupos uretano (carbamato). Es generado a partir de la condensación de diisocianatos y polioles (Figura 1). Dependiendo del tipo de poliol más frecuente en su estructura se clasifican en: poliéster poliuretano (PS-PU) y poliéter poliuretano (PE-PU). El PE-PU es más recalcitrante que el PS-PU debido a la energía necesaria para romper sus enlaces (Russell *et al.*, 2011; Mahajan y Gupta, 2015).



**Figura 1.** Síntesis de un poliuretano simple (Modificado de Mahajan y Gupta, 2015).

Desde su invención, a comienzos de la Segunda Guerra Mundial (1938) por Otto Bayer, y hasta la actualidad, la producción de PU ha ido en aumento. Su uso empezó para sustituir a los polímeros que, se sospechaba, liberaban sustancias volátiles orgánicas, pero debido a sus bajos costos en producción, versatilidad y a los numerosos usos como: barnices, revestimientos líquidos, adhesivos, selladores, espumas flexibles, pinturas, partes automotrices etc., su demanda ha ido en aumento (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007; Barratt *et al.*, 2003; Cregut *et al.*, 2013).

En 2018 se produjeron en Europa 61.8 millones de toneladas de plástico, de las cuales el 7.9% fue PU, esto representa aproximadamente 4.8 millones de toneladas. De esta cantidad solo el 32.5% se recicló, el 24.9% se acumuló en vertederos y el 42.6% se recuperó en energía mediante la calcinación (Plasticseurope, 2019). La preocupación ambiental por el incremento de desechos de PU en vertederos inició en la década de los 90's y hasta la actualidad no existe un proceso de reciclaje eficiente debido a la

resistencia del PU a perturbaciones bióticas, sobre todo del PE-PU. Dicho incremento causa cambios de pH en el suelo, impidiendo la adecuada lixiviación del agua de lluvia y haciendo a la tierra infértil (Mahajan y Gupta, 2015). México es el segundo productor de PU en América Latina al producir poco más de 300 mil toneladas anuales. Las principales industrias consumidoras de PU son la automotriz y la de la construcción; su consumo representa el 6% y 8.1% de PIB respectivamente, siendo esta industria muy importante para la economía en México (Amour, 2017).

## 2.2 Biodegradación de PU

Desde hace tiempo la biodegradación se ha considerado como una alternativa para el tratamiento de residuos. La biodegradación implica la utilización de estos residuos por organismos vivos para ser incorporados a sus vías metabólicas. Originalmente se consideró al PU un polímero no biodegradable, sin embargo, se han reportado diversos géneros de bacterias y hongos que tienen la capacidad de degradarlo (C *et al.*, 2007). Entre las bacterias se encuentran, *Corynebacterium* sp. (Kay *et al.*, 1993), *Comamonas acidovorans* TB-35 (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995), *Pseudomonas fluorescens* (Howard y Blake, 1998), *Pseudomonas putida* (Peng *et al.*, 2014) y *Alicyclophilus* sp., BQ1, BQ5 y BQ8, estas últimas aisladas en nuestro grupo de trabajo (Solís-González, 2008; Ocegüera-Cervantes *et al.*, 2007). Entre los géneros de hongos más reportados se encuentran *Alternaria*, *Aspergillus*, *Phoma*, *Penicillium*, *Plectosphaerella*, *Geomyces*, *Nectria* y *Neonectria*, cuya actividad degradativa se evaluó con acceso a fuentes de nutrientes mezclados con PU (Russell *et al.*, 2011; Matsumiya *et al.*, 2010).

### **2.3 Biodegradación de PU por hongos**

La capacidad de los hongos para degradar diversas sustancias orgánicas y algunos xenobióticos se sustenta en una eficiente colonización y la secreción de numerosas enzimas de tipo hidrolítico (Mahajan y Gupta, 2015). En la Tabla 1 se puede observar que en la mayoría de los estudios el sustrato más estudiado ha sido el PS-PU y en pocos estudios se ha analizado la degradación del poliéter-PU (PE-PU), un PU más recalcitrante. También se puede observar que las actividades que con mayor incidencia se han reportado, relacionadas con la degradación del PU son esterasa, proteasa y con menor frecuencia, ureasa. Además, cabe destacar que la mayoría de los hongos identificados con capacidad de degradar PU, pertenecen al phylum *Ascomycota*.

**Tabla 1. Hongos con capacidad de degradar PU (Modificada de Álvarez-Barragán, 2016)**

Nombre del hongo	Tipo de PU	Actividades enzimáticas	Phylum	Referencias
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> <i>Trichoderma</i> sp.	PS-PU y PE-PU	No reportadas	<i>Ascomycota</i>	Darby y Kaplan, 1968
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Cladosporium herbarum</i>	PE-PU	Esterasa	<i>Ascomycota</i>	Filip, 1979
<i>Gliocladium roseum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium citrium</i>	No reportado	Esterasa, proteasa y ureasa	<i>Ascomycota</i>	Pathirana y Seal, 1984
<i>Chaetomium globosum</i> <i>Aspergillus terreus</i>	PS-PU	Esterasa y proteasa	<i>Ascomycota</i>	Boubendir, 1993
<i>Exophialajejan selmei</i>	PE-PU	No reportadas	<i>Ascomycota</i>	Owen <i>et al.</i> , 1996
<i>Penicillium ochrochloron</i> , <i>Nectriaglio cladioides</i> , <i>Geomyces pannorum</i>	PS-PU	No reportadas	<i>Ascomycota</i>	Barratt <i>et al.</i> , 2003
<i>Curvularia senegalensis</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Aureobasidium pullulans</i>	PS-PU	Esterasa	<i>Ascomycota</i>	Crabbe <i>et al.</i> , 1994
<i>Geomyces pannorum</i> , <i>Neonectriaria mulariae</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Penicillium inflatum</i> , <i>P. viridicatum</i>	PS-PU	No reportadas	<i>Ascomycota</i>	Cosgrove <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus niger</i>	PE-PU	No reportadas	<i>Ascomycota</i>	Hincapié-Llanos <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria solani</i>	No reportado	Proteasa	<i>Ascomycota</i>	Ibrahim <i>et al.</i> , 2011
<i>Candida antarctica</i>	PS-PU	Lipasa	<i>Basidiomycota</i>	Shibasaki <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria</i> sp.	PE-PU	Ureasa	<i>Ascomycota</i>	Matsumiya <i>et al.</i> , 2010
<i>Nectria haematococca</i> <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>P. ochrochloron</i>	PS-PU	No reportadas	<i>Ascomycota</i>	Cosgrove <i>et al.</i> , 2010
<i>Mucormycotina</i> sp.			<i>Mucoromycota</i>	
<i>Pestalotiopsis microspora</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Plectosphaerella</i> sp., <i>Bionectria</i> sp., <i>Phaeosphaeria</i> sp., <i>Nectria</i> sp.	PS-PU	Proteasa	<i>Ascomycota</i>	Russel <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp.	No reportado	Proteasa, ureasa, esterasa y lacasa	<i>Ascomycota</i>	Loredo-Treviño <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus flavus</i>	PS-PU	Esterasa	<i>Ascomycota</i>	Mathur y Prasad, 2012
<i>Volutella ciliata</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Trichosporon moniliforme</i> , <i>Bionectria ochroleuca</i> <i>Penicillium roseopurpureum</i> , <i>Penicillium</i> , <i>P. mandriti</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Thermomyces lanuginosus</i> <i>Geomyces pannorum</i>	PS-PU	No reportadas	<i>Ascomycota</i> y <i>Basidiomycota</i>	Zafar, Houlden y Robson, 2013
<i>Candida rugose</i> , <i>Arthrographis kalrae</i> , <i>Apergillus fumigatus</i> , <i>Malbranchea cinnamomea</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Emericella nidulans</i>	PS-PU	No reportadas	<i>Ascomycota</i>	Zafar <i>et al.</i> , 2014
<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cladosporium tenuissimum</i> , <i>C. pseudocladosporioides</i> , <i>C. asperulatum</i> , <i>C. montecillanum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	PS-PU y PE-PU	Esterasa y ureasa	<i>Ascomycota</i>	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
<i>Aspergillus tubingensis</i>	PS-PU	Esterasa y lipasa	<i>Ascomycota</i>	Khan <i>et al.</i> , 2017

### 3. Antecedentes

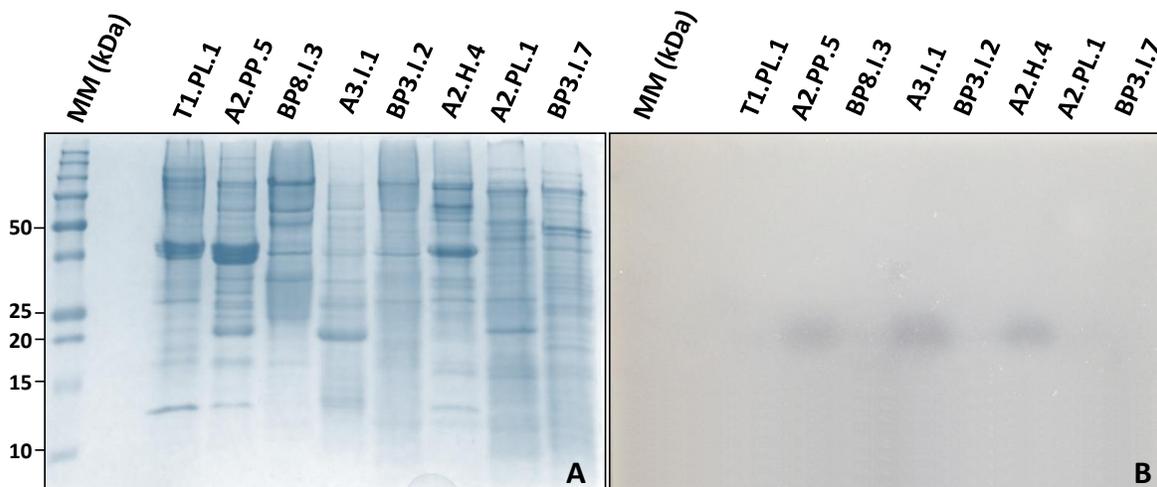
El problema ambiental que los residuos de PU representan y la importancia económica que su producción tiene en nuestro país nos han conducido a investigar los mecanismos de biodegradación que ciertos organismos despliegan, con el objetivo de aportar elementos para el desarrollo de una alternativa biotecnológica a este grave problema. En nuestro laboratorio se aislaron de diferentes muestras medioambientales, cepas de hongos con la capacidad de utilizar PU como única fuente de carbono, empleando un medio mínimo mineral (MM) de sales con diferentes barnices de PU: Impranil® DLN al 0.5%, Hydroform® al 0.3% o Polylack® al 0.3% (s/v). De las cepas aisladas se realizó un escrutinio con base al crecimiento, en dos tipos de barniz de PU (Impranil® DLN y Polylack®) y un polioli poliéster (Rymsapol® 200/107 L-38). Además como otro criterio selectivo se consideró la formación de un halo de degradación, por acción de actividades enzimáticas extracelulares, alrededor del crecimiento de cepas en MM con Impranil® DLN, debido a la propiedad de clarificarse al ser degradado (Howard, 2002), o el poliéster polioli Rymsapol® 200/107 L-38. De este escrutinio se aislaron treinta y un cepas de hongos filamentosos las cuales crecían bajo esas condiciones (Álvarez-Barragán, 2013). Se seleccionaron quince cepas para medir la capacidad de degradar Impranil® DLN en medio líquido empleando turbidimetría y solo ocho cepas mostraron degradación mayor al 70%. De las ocho mejores cepas degradadoras de Impranil, los seis mejores degradadores pertenecían al género *Cladosporium*, incluidas las especies *C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides*, *C. tenuissimum*, *C. asperulatum* y *C. montecillanum*, y los otros dos fueron identificados como *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium chrysogenum*. Se demostró su actividad degradativa sobre el Impranil® DLN mediante espectroscopía de infrarrojo (FTIR), observando la disminución de los grupos funcionales característicos del PU. Incluso se evaluaron las actividades enzimáticas proteasa, esterasa y ureasa empleando medios diferenciales (Álvarez-Barragán, 2013). Además se evaluó la capacidad de estas cepas de degradar espumas de PE-PU observando degradaciones de hasta 67% en peso (Álvarez-Barragán, 2016; Álvarez-Barragán et al., 2016). Por otro lado, para conocer los compuestos derivados del ataque de los hongos al Impranil® DLN se realizó un análisis, mediante cromatografía de gases

acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), del medio donde se cultivaron dos de los hongos con mayor actividad degradativa. Así, se encontró que los compuestos predominantes tienen grupos funciones de tipo éster, diisocianato y alcohol; compuestos esperados con base en la estructura del PS-PU (Álvarez-Barragán, 2016; Álvarez-Barragán et al., 2016).

Con el objetivo de detectar algunas de las actividades enzimáticas que han sido relacionadas con la degradación de PU, se realizaron ensayos de difusión radial con substratos selectivos empleando proteínas del sobrenadante de cultivos de las ocho cepas más degradadoras, encontrando que todas las cepas presentaban actividad proteasa y esterasa y solo *Cladosporium asperulatum* BP3.1.2 mostró actividad ureasa. También se realizaron zimografías para estas mismas actividades encontrando en cinco cepas del género *Cladosporium*, una banda de 15 kDa con actividad proteasa; en dos cepas, *Cladosporium tenuissimum* A2.PP.5 y A3.I.1, una banda de 20 kDa con actividad esterasa y en la zimografía para ureasa se detectó una banda a 150 kDa de *Cladosporium asperulatum* BP3.I.2 (Álvarez-Barragán, 2016).

Para determinar si alguna de las proteínas presentes en el sobrenadante del medio de cultivo mostraba una actividad degradadora de PU, se montaron zimografías con Impranil® DLN como sustrato. Los hongos A3.I.1, A2.PP.5 y A2.H.4 presentaron una banda con un tamaño aproximado de 20 kDa con actividad degradadora de Impranil (Figura 2). Las bandas con actividad “Impranilasa” coincidieron con las bandas de actividad esterasa, sugiriendo que la actividad “Impranilasa” podría ser una esterasa. Se cuantificó por turbidimetría la degradación de Impranil® DLN y la actividad específica de los concentrados proteicos de los ocho hongos, coincidiendo en que el hongo que generaba mayor degradación era *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. Se realizaron concentrados proteicos del sobrenadante de la cepa A3.I.1 y se emplearon diferentes técnicas cromatográficas para purificar la enzima responsable de esta actividad (Álvarez-Barragán, 2016). Se logró obtener una fracción bastante pura, que contenía una sola banda con actividad, la cual fue identificada por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en la Universidad de Yale, USA. Los

resultados indicaron que la proteína con actividad “Impranilasa” era una cutinasa perteneciente a la familia de las carbohidrato esterases (Álvarez-Barragán, 2016).



**Figura 2. Zimograma de actividad “Impranilasa”.** Se corrieron 15 µg de proteína de los concentrados proteicos de los hongos en gel SDS-PAGE al 15%. Se utilizó como sustrato un gel de agarosa al 1.4% con Impranil al 1%, los gels fueron acoplados e incubados a 30 °C por 12 h. Marcador molecular (MM): Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). **A)** Patrón de proteínas teñido con solución de Coomassie. **B)** Zimograma de actividad “Impranilasa” (Tomado de Álvarez-Barragán, 2016).

Las cutinasas, también conocidas como cutina hidrolasas (EC 3.1.1.74), son enzimas que catalizan la hidrólisis de la cutina, la cual es un biopolímero complejo de ácidos grasos y forma parte de la estructura de la cutícula de las plantas superiores. Las cutinasas son importantes para procesos industriales, siendo en los últimos años su actividad esterolítica la más estudiada. Además, pueden catalizar reacciones inversas como esterificación, trans-esterificación y aminólisis en disolventes orgánicos (Pio y Macedo, 2009). Existen dos subfamilias de cutinasas, las de tipo 1 y las de tipo 2. La historia evolutiva de la familia de las cutinasas en el phylum *Ascomycota* sugiere que el origen de las dos subfamilias pudo deberse a un evento de duplicación previo a la divergencia de los phyla *Ascomycota* y *Basidiomycota*, razón por la cual la mayoría los miembros de cada phylum poseen cutinasas de tipo 1 y 2 (Skamnioti *et al.*, 2008). Los dos tipos de cutinasas son divergentes en su secuencia dentro del mismo género y especie, así como en el número de genes que las codifican (Skamnioti *et al.*, 2008).

Además, se ha descrito que las cutinasas participan en diferentes funciones del hongo como: unión a esporas, señalización, obtención de fuente de carbono e invasión (Martínez *et al.*, 1992).

La actividad específica de la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1, empleando Impranil® DLN como sustrato, fue de 12.7 µg de Impranil degradado/min/µg de proteína, la mayor en comparación con la de las otras siete cepas estudiadas. La temperatura óptima fue de 25 °C y su pH óptimo de 7.0. Los parámetros cinéticos de la cutinasa pura con el sustrato típico para medir actividad esterasa, *p*-nitrofenilacetato (*p*-NPA) fueron: Km de 3.62 ± 0.12 mM, Vmax de 13.73 ± 0.2 mM/min/µg, Kcat de 5.39 s<sup>-1</sup> y una Kcat/Km de 1.49 mM<sup>-1</sup> (Álvarez-Barragán, 2016).

Dado que *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 es de los hongos más degradadores de Impranil y una cutinasa de este hongo mostró una alta actividad específica sobre el Impranil®, en nuestro laboratorio se intentó clonar el gen que codifica esta actividad para expresarlo en algún sistema recombinante (Domínguez-Malfavón L. 2017. Datos no publicados). En un primer intento para amplificar el gen de la cutinasa de A3.I.1 se utilizó DNA genómico como molde y primers degenerados, sin embargo, no se logró amplificación. Posteriormente se realizaron RT-PCRs a partir de cDNA sintetizado de RNA extraído de micelio de A3.I.1 cultivado en medio con Impranil durante seis semanas, con el propósito de detectar solo los genes expresados. Se logró amplificar un fragmento de 146 pb de un total estimado de 650 pb. A partir de esto se intentó amplificar los extremos 5' y 3' utilizando RACE, pero no fue posible amplificar las secuencias esperadas por lo que no se pudo clonar el gen completo que se expresa en Impranil.

Hasta el momento hay cuatro genomas del género *Cladosporium* secuenciados: *Cladosporium cladosporioides* (ID: PRJNA396076), *Cladosporium* sp. SL-16 (ID: PRJNA415529), *Cladosporium sphaerospermum* UM 843 (Kee-Peng *et al.*, 2012) y *Cladosporium fulvum* v1.0 (de Wit *et al.*, 2012). Los genomas se encuentran en las bases de datos Genome del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), y en Mycocosm del JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>). *Cladosporium fulvum* v1.0 tiene anotadas 11 cutinasas en su genoma y *Cladosporium sphaerospermum* UM843

tiene anotadas 5 cutinasas. En los otros genomas no hay registro de anotación génica para cutinasas.

El objetivo de este proyecto es identificar el o los genes de la cutinasa implicada en la actividad degradativa de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 sobre el Impranil. Para lograrlo: 1) Se llevó a cabo la secuenciación del genoma, ensamble, ordenamiento cromosómico e identificación de los genes de cutinasas putativas. 2) Se identificaron las cutinasas con características estructurales similares a cutinasas degradadoras de polímeros sintéticos. 3) Se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial, para identificar si alguna(s) de las cutinasas con características estructurales similares a cutinasas degradadoras de polímeros sintéticos se expresaron en medio con Impranil. La importancia del proyecto radica en la necesidad de buscar nuevas alternativas a los problemas ambientales derivados de la acumulación de polímeros de PU. Conociendo a los genes implicados se podría dar paso al diseño de sistemas recombinantes y posteriormente al de procesos biotecnológicos que puedan disminuir este problema ambiental.

## 4. Hipótesis

Ya que una cutinasa de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 está involucrada en la degradación del barniz de poliéster poliuretano, Impranil, se propone que esa cutinasa tendría características estructurales similares a otras cutinasas degradadoras de polímeros sintéticos y se sobre-expresaría en cultivos con Impranil.

## **5. Objetivos**

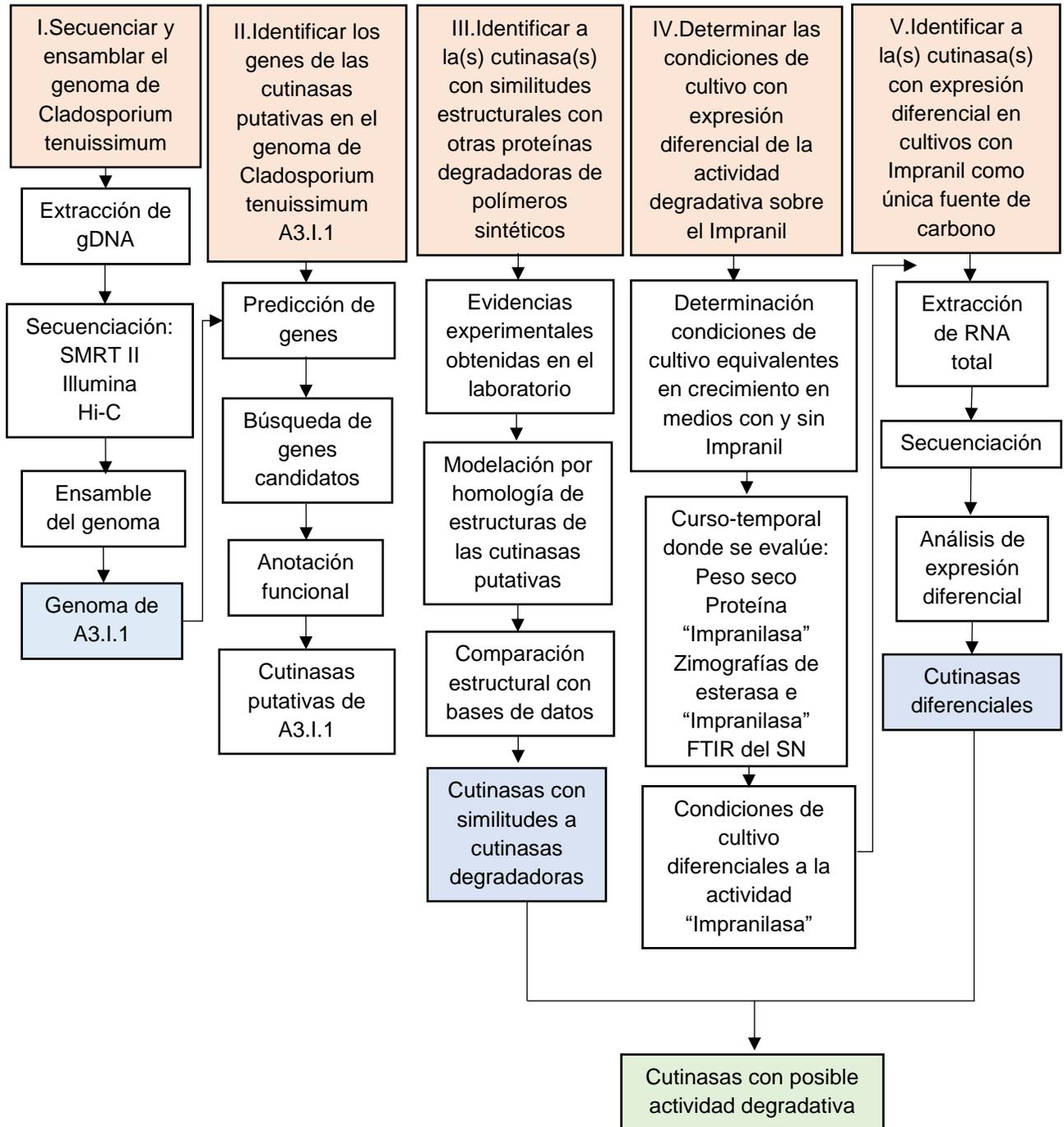
### **5.1 Objetivo general**

Identificar los genes que codifican cutinasas con posible actividad degradativa sobre el poliuretano en el genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1.

### **5.2 Objetivos particulares**

- I. Secuenciar y ensamblar el genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1.
- II. Identificar los genes de las cutinasas putativas en el genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1.
- III. Identificar a la(s) cutinasa(s) con similitudes estructurales con otras proteínas degradadoras de polímeros sintéticos.
- IV. Determinar las condiciones de cultivo con expresión diferencial de la actividad degradativa sobre el Impranil.
- V. Identificar a la(s) cutinasa(s) con expresión diferencial en cultivos con Impranil como única fuente de carbono.

## 6. Estrategia experimental



## **7. Materiales y Métodos**

### **7.1 Cultivo y mantenimiento de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1.**

Para el cultivo de *C. tenuissimum* A3.I.1 se utilizó un medio mineral que contiene fuente de nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas, así como elementos traza: Co, Cu, Zn, Mo (Ver apéndice). Para el medio mineral Impranil (MM-Impranil) se utilizó como única fuente de carbono Impranil® DLN (al 0.5% p/v) marca Bayer, el cual es un polímero alifático con 50% en sólidos y como solvente agua. Para el medio mineral dextrosa (MM-dextrosa), se utilizó como única fuente de carbono dextrosa a diferentes concentraciones. Además se utilizaron medios enriquecidos como medio de caldo de papa dextrosa líquido (PDB) y medio caldo de papa dextrosa sólido (PDA), para los precultivos. El precultivo se realiza a partir de conidias conservadas en glicerol al 30% v/v sembradas por estría masiva en medio PDA por 7 días a 30 °C. A partir de micelio generado del medio PDA se inoculó aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de micelio en medio PDB por 7 días a 30 °C. El micelio obtenido del cultivo en PDB se emplea para posteriores inoculaciones. Cuando los cultivos se realizan a partir de conidias solo se precultivan las conidias conservadas en glicerol 30% en medio PDA. Luego de ser incubadas por 7 días a 30°C, se cosechan las conidias con solución lava hongos, se contaron en cámara de Neubauer y se inocula la cantidad determinada. Las conidias se pueden almacenar en glicerol al 30% a -70 °C, hasta 3 meses después de la cosecha.

### **7.2 Secuenciación y ensamble del genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1**

#### **7.2.1 Extracción de DNA genómico**

Uno de los métodos de secuenciación que se utilizaron requería de DNA genómico de alto peso molecular y una relación Abs<sub>260/280</sub> de 1.8-2.0. Se probaron diferentes protocolos y kits comerciales: purificación de DNA con CTAB (Doyle y Doyle, 1990), E.Z.N.A Fungal DNA Kit, E.Z.N.A HP Fungal DNA Kit y ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit, conjuntamente con modificaciones en el tipo de material biológico que se empleó para la extracción, así como diversas modificaciones a los protocolos originales o sugeridos

por el fabricante del kit, hasta que se encontraron las condiciones con las que se obtiene DNA de la calidad requerida, estas modificaciones se discuten en resultados.

El protocolo que se logró desarrollar después de probar diversas modificaciones en los distintos protocolos y kits de purificación del DNA se describe a continuación:

1. Realizar el cultivo del hongo inoculando 50  $\mu$ L de conidias en 25 mL de PDB en un matraz de 125 mL e incubar a 30 °C durante 7 días (González-Hernández, 2016).
2. Tomar el micelio del medio, lavar con buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 tres veces y secar el excedente de buffer colocando el micelio sobre papel filtro.
3. En un microtubo estéril de 2 mL pesar la cantidad de micelio necesario para la extracción.
4. Macerar el micelio con nitrógeno líquido en mortero y pistilo.
5. Se siguieron los protocolos del método o de los kits en cuestión sugeridos por los fabricantes y, además: se incrementó al doble la cantidad de biomasa, se homogenizó el tejido por 5 min y se realizaron 3 eluciones por columna.
6. Obtenido el DNA, cuantificar su concentración con NanoDrop la cual debe ser >20 ng/ $\mu$ L y determinar la relación Abs<sub>260/280</sub> que debe ser entre 1.8-2.0.
7. Verificar la integridad del DNA en una electroforesis de agarosa al 0.8%.

### **7.2.2 Secuenciación del genoma**

La secuenciación del genoma se llevó a cabo utilizando dos tecnologías: SMRT e Illumina. Después se mejoró el ensamble del genoma con una secuenciación Hi-C proximity ligation.

- Secuenciación en tiempo real de molécula única (SMRT RSII) de Pacific Biosciences (PacBio): Se utilizaron 3 SMART cells con 100X de cobertura y una biblioteca de 20 Kb. La secuenciación se realizó en el Yale Center for Genome Analysis (YCGA), en Yale University, USA.
- Secuenciación por el sistema Illumina: HiSeq 2500 Rapid 100PE con 100X de cobertura que se llevó a cabo en Macrogen, Estados Unidos.

### **7.2.3 Ensamblaje del genoma**

El ensamble híbrido del genoma fue realizado por el Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. Para ensamblar el genoma se utilizó el programa Spades y el mejor ensamble se obtuvo con un Kmero de 97.

### **7.2.4 Determinación del reordenamiento cromosómico en *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1**

Con el objetivo de conocer la cantidad de cromosomas de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 y mejorar el ensamble del genoma, se realizó una secuenciación tipo Hi-C proximity ligation (De-Kayne *et al.*, 2019; Lightfoot *et al.*, 2017). Utilizando el ensamble del genoma antes obtenido y los datos de captura de conformación cromosómica de alto rendimiento se realizó el análisis de datos en Phase Genomics.

Preparación de la muestra:

1. Realizar el cultivo del hongo inoculando 50  $\mu$ L de conidias en 25 mL de PDB en un matraz de 125 mL e incubar a 30 °C durante 7 días (González-Hernández, 2016).
2. Lavar el micelio con buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 tres veces y secar el excedente de buffer colocando el micelio sobre papel filtro.
3. En un tubo Falcon de 15 mL estéril pesar 200 mg de micelio y agregar 10 mL de formaldehído al 1% v/v en agua destilada estéril.
4. Incubar a temperatura ambiente por 20 min, mezclando por inversión cada cinco minutos.
5. Al término del tiempo de incubación agregar al tubo falcón 0.1 g de glicina en polvo, mezclar cuidadosamente hasta homogeneizar.
6. Incubar a temperatura ambiente por 15 min y mezclar por inversión cada 3 minutos.
7. Lavar dos veces el micelio: centrifugar a 1000 x *g* por 1 min descartar el sobrenadante y enjuagar con agua destilada.
8. Realizar el envío de la muestra a Phase-Genomics para su secuenciación y análisis de datos.

El ensamble se evaluó con el programa BUSCO utilizando parámetros predeterminados. Para la evaluación del ensamble se utilizó la base de datos del subphylum Pezizomycotina, la cual contiene 3156 genomas de 50 especies.

### **7.2.5 Cerrado de gaps y anotación de genes en *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1**

Con el objetivo de completar la mayor cantidad de gaps en el ensamble de A3.I.1 se utilizó el programa Sealer (Paulino *et al.*, 2015), utilizando las lecturas de la secuenciación Illumina, se rellenaron los gaps que permitió el programa, los parámetros empleados fueron: K35, K64, K80, K96, -B3000, -F700, -P10.

La predicción de genes, intrones y exones en el genoma se realizó con el proceso automático de anotación “FunGAP”, en general FunGAP tiene tres pasos principales: 1) Preprocesamiento, 2) Predicción de genes, 3) Evaluación y filtrado (Byoungnam *et al.*, 2017). El proceso de anotación se llevó a cabo siguiendo los pasos de la guía práctica de FunGAP (Min y Choi, 2019).

### **7.3 Búsqueda de genes de cutinasas en el genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1**

Para identificar los genes de cutinasas en el genoma de A3.I.1, se utilizó el modelo oculto de Márkov (HMM) del dominio de cutinasas alojado en la base de datos Pfam (PF01083). La búsqueda se realizó con HMMER 3.0 *hmmsearch* en el proteoma predicho de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1, utilizando como valor de corte un E-value  $<10^{-3}$ . Se evaluó la estructura del gen intrón-exón con el servidor “Gene Structure display server 2.0” (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>), se descartaron codones de paro traduciendo los genes de las cutinasas en “Translate” de ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>).

La anotación funcional de los genes candidatos se realizó con ScanProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>) para la identificación de motivos de cutinasas, con HMMSCAN (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) se realizó una búsqueda de la familia a la que pertenecen las secuencias y utilizando InterPro2GO

(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) se asignó función por homología. Por último se realizó un árbol filogenético de las cutinasas putativas de A3.I.1 por el método de Neighbor-Joining utilizando Phylogeny.fr ([http://www.phylogeny.fr/simple\\_phylogeny.cgi](http://www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi)).

## **7.4 Identificación de las cutinasas con similitudes estructurales con otras proteínas degradadoras de polímeros sintéticos**

### **7.4.1 Identificación del gen correspondiente al fragmento de 146 pb amplificado con primers degenerados**

Para identificar a que gen pertenece el fragmento amplificado de 146 pb (Domínguez-Malfavón, datos no mostrados) se utilizó blastn sobre una base de datos constituida por los genes de A3.I.1 predichos por FunGAP como cutinasas y como query el fragmento de 146 pb. La identidad de la proteína identificada se explica en la parte de resultados.

### **7.4.2 Predicción de la localización celular de las cutinasas putativas de A3.I.1**

Para la predicción de la localización celular de las cutinasas putativas de A3.I.1 se utilizó el servidor web DeepLoc-1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>).

### **7.4.3 Modelación por homología de la estructura terciaria de las cutinasas extracelulares de A3.I.1**

El modelado de la estructura terciaria de las cutinasas de A3.I.1 se realizó con el programa SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>) con parámetros predeterminados usando como modelos la base de datos de SwissModel para todas las proteínas, posteriormente se realizó la predicción de dos cutinasa utilizando como modelo la cutinasa de *Aspergillus oryzae* (Uniprot: P52956).

Tanto los modelos que utilizaron como molde la base de datos de SwissModel y la cutinasa de *Aspergillus oryzae* se evaluaron determinando el valor QMEAN (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>), el cual debe ser menor a 0, y la disposición de los aminoácidos en un Ramachandran plot

(<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>), considerando que el porcentaje de aminoácidos en “Región permitida” y “Fuera de región” fuesen igual o menores a 10 y 1%, respectivamente.

La comprobación de posibles puentes disulfuro se realizó utilizando el predictor de puentes disulfuro DiANNA (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>), cuya predicción se hace a partir de la secuencia de aminoácidos. Para todas las visualizaciones y alineamientos de estructuras terciarias de proteínas se utilizó Pymol 2.3 (<https://pymol.org/2/>).

#### **7.4.4 Búsqueda de similitudes estructurales con proteínas caracterizadas**

La búsqueda de similitudes estructurales de los modelos de estructura terciaria de las cutinasas extracelulares de A3.I.1 se realizó utilizando el servidor web Dali (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/>). Se realizó una búsqueda heurística con las proteínas alojadas en el PDB y se consideró la proteína con mayor similitud a cada una de las cutinasas extracelulares identificadas.

#### **7.4.5 Predicción del potencial de contacto y pocket del sitio catalítico de las cutinasas de A3.I.1**

El cálculo del potencial de contacto se realizó en Pymol 2.3 (<https://pymol.org/2/>), la densidad sólida verde que representa el surco en la superficie proximal al sitio activo fue calculada por GHECOM 1.0 (<http://strcomp.protein.osaka-u.ac.jp/ghecom/>) de la siguiente manera:

1. Predecir los pockets de cada proteína con GHECOM 1.0.
2. Descargar el archivo PDB y alinear en PyMoL con su proteína correspondiente.
3. Identificar el pocket de la zona del sitio catalítico.
4. Eliminar del archivo PDB las coordenadas de los pockets que no pertenecen al sitio catalítico y guardar los cambios.
5. Alinear el archivo PDB con su proteína correspondiente y calcular el potencial de contacto en PyMoL.

## **7.5 Determinación de condiciones de cultivo para el análisis transcriptómico**

### **7.5.1 Condiciones de cultivo de los experimentos curso-temporal de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1**

Para el cultivo de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 se utilizó el medio mineral con Impranil al 0.5% v/v como única fuente de carbono (MM-Impranil) (Russel *et al.*, 2010, Álvarez-Barragán, 2013), medio PDB y MM-dextrosa (MM-dextrosa) a distintas concentraciones. Se probaron distintas condiciones de cultivo, como se describe a continuación.

- Curso temporal 1, en MM-Impranil y PDB: los cultivos se sembraron por duplicado en matraces de 250 mL con 75 mL de MM-Impranil y PDB respectivamente, semanalmente durante 6 semanas y fueron incubados de forma estática a 30 °C. Se inocularon con 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente de micelio cultivado en medio PDB por 7 días.
- Curso temporal 2, en MM-Impranil y MM-dextrosa: los cultivos se sembraron en matraces de 125 mL con 40 mL de MM-Impranil o MM-dextrosa con concentraciones de dextrosa al 1.11 mM, 0.83 mM, 0.55 mM, y 0.27 mM, cada semana durante 4 semanas y fueron incubados de forma estática a 30 °C. Se inocularon con 80 mg de micelio cultivado en medio PDB por 7 días.
- Curso temporal 3, en MM-Impranil y MM-dextrosa 0.27 mM: se inoculan 10 millones de conidias germinadas y no germinadas en matraces de 250 mL con 50 mL de MM-Impranil o MM-dextrosa 0.27 mM, un control negativo de MM-Impranil (sin inocular) cada semana durante 4 semanas. Se cultivan de forma estática a 30°C.
- Curso temporal 4, en MM-dextrosa 0.13, 0.20 y 0.27 mM: se inoculan 10 millones de conidias germinadas en matraces de 250 mL con 50 mL de MM-Dextrosa 0.13, 0.20 y 0.27 mM, cada semana durante 4 semanas. Se cultivan de forma estática a 30 °C.
- Curso temporal 5, en MM-dextrosa 0.13 y MM-Impranil se inoculan 10 millones de conidias germinadas en matraces de 250 mL con 50 mL de MM-dextrosa 0.13 o

MM-Impranil, un control negativo de MM-Impranil (sin inocular) cada semana durante 4 semanas. Se cultivan de forma estática a 30 °C.

### **7.5.2 Cuantificación de proteínas extracelulares de cultivos con y sin Impranil**

Las cutinasas son proteínas extracelulares, por lo que es necesario separarlas de residuos del medio que contiene el PU y tejido del hongo, para luego concentrarlas. Esto se realiza con los siguientes protocolos:

#### Concentración de proteínas en cultivos con MM-Impranil

1. Después de la incubación, filtrar el micelio con una gasa doblada en 4 capas.
2. Recuperar el micelio y determinar peso seco.
3. Recuperar el medio de cultivo, medir el volumen y centrifugar a 15,000 x *g*, para sedimentar el Impranil remanente y restos de micelio.
4. Filtrar el medio por membranas Millipore de 0.45 µm para retirar restos de Impranil.
5. Recuperar el sobrenadante y concentrar empleando centricones con membranas de corte de 10 kDa y medir el volumen final.

#### Concentración de proteínas en cultivos con medio PDB

1. Después de la incubación, filtrar el micelio con una gasa doblada en 4 capas.
2. Recuperar el micelio y determinar peso seco.
3. Recuperar el medio de cultivo y centrifugar a 15,000 rpm, para sedimentar restos de micelio.
4. Recuperar el sobrenadante, medir su volumen y adicionar SDS hasta una concentración del 0.5% v/v, para precipitar el almidón de la papa. Dejar reposar en refrigeración por 8 horas.
5. Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos, recuperar el sobrenadante.
6. Dializar el sobrenadante en Buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 por 9 h, recambiar el buffer de fosfatos y dejar durante 12 h.
7. Recuperar el dializado y concentrar en centricones con membranas de corte de 10 kDa.

## Concentración de proteínas en cultivos con MM-Dextrosa

1. Después de la incubación, filtrar el micelio con una gasa doblada en 4 capas.
2. Recuperar el micelio y determinar peso seco.
3. Recuperar el medio de cultivo y centrifugar a 15,000 rpm, para sedimentar restos de micelio.
4. Filtrar el medio por membranas Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  para retirar restos de micelio.
5. Recuperar el sobrenadante, concentrar empleando centricones con membranas de corte de 10 kDa.

### **7.5.3 Cuantificación de actividad de aclaramiento de Impranil**

Para determinar las condiciones de cultivo diferenciales se mide la actividad "Impranilasa", considerada como aclaramiento del Impranil, se realizaron ensayos espectrofotométricos a una  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  para medir por turbidimetría.

1. En tubos de reacción, colocar 6  $\mu\text{g}$  del concentrado proteico de sobrenadante (SN), junto con su control sin proteína y llevar a un volumen final de 180  $\mu\text{L}$  con buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5.
2. Colocar 20  $\mu\text{L}$  de Impranil al 1% y realizar la medición espectrofotométrica inmediatamente después de agregar el sustrato cada 30 segundos por 5 minutos a una  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ .
3. Obtener la cantidad en mg de Impranil aclarado, comparando los valores de Absorbancia con una curva patrón previamente elaborada, que relaciona la  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  con concentraciones conocidas de Impranil.
4. Calcular la actividad específica (mg de Impranil degradados/ $\mu\text{g}$  proteína/min) utilizando una curva patrón previamente elaborada, que relaciona la  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  con concentraciones conocidas de Impranil.

### **7.5.4 Cuantificación de la degradación de Impranil por cultivo**

Para determinar en qué semanas de cultivo se lleva a cabo la mayor degradación de Impranil, se cuantificó la cantidad en gramos de Impranil degradado en total por el cultivo.

1. Después de la incubación, filtrar el micelio con una gasa doblada en 4 capas.

2. Recuperar el medio de cultivo y homogenizar completamente el Impranil.
3. Medir el volumen del medio y tomar una alícuota de 200  $\mu\text{L}$ .
4. Medir la alícuota por turbidimetría a una  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ .
5. Calcular la cantidad de Impranil degradado utilizando una curva patrón previamente elaborada.

### **7.5.5 Resolución de proteínas extracelulares por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)**

La electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante es un método en el que se separan las proteínas presentes en un extracto celular como bandas discretas en un soporte sólido. Las proteínas migran bajo la influencia de un campo eléctrico dependiendo de su carga, masa molecular y estructura tridimensional. En el SDS-PAGE se utiliza dodecilsulfato de sodio, el cual es un detergente aniónico que se une a las proteínas desnaturizándolas confiriéndoles carga negativa, por lo que migran al polo positivo separándose en función de su tamaño molecular (Laemmli, 1970).

1. Realizar el gel SDS-PAGE al 15%.
2. Cargar 4  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards Dual Color, BIORAD).
3. Cargar 4 U de lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (Sigma, No. Cat 95608) como control positivo para actividad esterasa con 5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga.
4. Cargar 15  $\mu\text{g}$  de proteína de concentrado de SN del cultivo de 5 semanas en MM-Impranil como control positivo para actividad "Impranilasa" con 5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga.
5. Cargar 15  $\mu\text{g}$  de proteína de concentrado de SN de cada condición de cultivo, en diferentes pozos con 5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga y correr el gel en una cámara de electroforesis con buffer de corrida 1X a 120 V.
6. Una vez finalizada la corrida, lavar el gel con agua desionizada y renaturalizar las proteínas *in situ* incubando con 20 mL de 2.5% de Tritón X-100 (v/v) por 25 min cada vez (dos veces).
7. Realizar las zimografías para esterasa e "Impranilasa".

8. Después de las zimografías teñir el gel de poliacrilamida con solución de Coomassie por 6 h.
9. Desteñir con solución desteñidora por 2 h para observar las bandas.

### 7.5.6 Zimografías

**Para actividad esterasa** (Díaz *et al.*, 1999)

1. Preparar el sustrato de la actividad esterasa con 800  $\mu$ L de 4-metilumberil butirato 1.6 mM (BioChemica, No. Cat. 19362) y 12 mL de etilenglicol.
2. Agregar el sustrato al gel e incubar 30 min con agitación media a temperatura ambiente, lavar con agua desionizada y revelar con luz UV, para poner en evidencia la actividad de la/las esterasas sobre el enlace éster del butirato, generando el producto fluorescente 4-metilumbeliferona.

**Para actividad “Impranilasa”** (Ruiz *et al.*, 1999 modificada por Álvarez-Barragán, 2016).

1. Preparar 20 mL de agarosa al 1.4% con Impranil al 1%, se debe disolver la agarosa y enfriar a 40 °C aproximadamente, antes de agregar el Impranil y disolver de inmediato.
2. Colocar el gel de acrilamida en un recipiente aproximadamente de su tamaño y vaciar el gel de agarosa mientras aún esté líquido, si el recipiente es más grande primero se deben rellenar las orillas con la agarosa sobrante y luego vaciar los 15 mL del gel.
3. Una vez que solidifique el gel sacarlo cuidadosamente del recipiente y colocarlo en un recipiente más grande, mantener la humedad agregando buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 hasta cubrir ambos geles.
4. Incubar los geles sobrepuestos por 12 h en el buffer de fosfatos. Las enzimas aclararán el Impranil al estar en contacto con él, observándose bandas claras en el gel de agarosa de acuerdo al tamaño de la proteína con la actividad aclaradora de Impranil.
5. Luego de la incubación, separar los geles, lavar con agua desionizada y observar el aclaramiento en el gel de agarosa.

### **7.5.7 Determinación de cambios en la estructura de MM-Impranil 0.5% por FTIR.**

Con el objetivo de analizar la biodegradación del Impranil debida a la actividad biológica de A3.I.1 durante su cultivo, se empleó la espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), que permite observar qué grupos funcionales están siendo alterados por la acción enzimática del hongo.

1. Inocular 10 millones de conidias germinadas en matraces de 250 mL con 50 mL de MM- Impranil cada semana durante 3 semanas. Se cultivan de forma estática a 30 °C. Como control negativo se utilizó MM-Impranil (sin inocular).
2. A la cuarta semana, eliminar el micelio y homogenizar el sobrenadante (SN). Tomar 2 mL, pasarlos a un tubo eppendorf de 2 mL y secar a 37 °C.
3. El pellet obtenido fue analizado en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM, por espectroscopía de infrarrojo, utilizando un espectrómetro Perkin Elmer 400 (EE.UU.) y analizando en un intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . La normalización espectral fue realizada con el software Spectrum v6.3.5.0176.

### **7.5.8 Secuenciación de transcriptoma y análisis de expresión diferencial**

#### **7.5.8.1 Extracción de RNA total**

Con el objetivo de conocer la expresión diferencial de genes en cultivos con y sin Impranil, se decidió realizar un análisis del transcriptoma bajo las condiciones de mayor actividad degradativa y ausencia de actividad (condición control). Para ello es necesario extraer RNA total para enviar a secuenciar.

1. Cultivos de *C. tenuissimum*: Por triplicado inocular con 10 millones de conidias germinadas, matraces de 250 mL con 50 mL de MM-dextrosa 0.13 o MM-Impranil 0.5%, un control negativo de MM-Impranil 0.5% (sin inocular), cada semana durante 4 semanas. Cultivar de forma estática a 30 °C.

2. Después de la incubación, tomar el micelio cuidadosamente del matraz, lavar tres veces con buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 y secar el exceso de buffer con papel filtro.
3. Pesar 200 mg de micelio y macerar con nitrógeno líquido en un mortero con pistilo.
4. Extraer RNA total con el reactivo Trizol y cloroformo de acuerdo a las especificaciones del fabricante, precipitar con isopropanol y realizar lavados con etanol al 75% para posteriormente resuspender en agua libre de RNAsas. Determinar concentración y parámetros de calidad.
5. Realizar tratamiento al RNA con DNAsa I RNAsa free 1000 U (1U/ $\mu$ L) de la marca Thermo Scientific Ref EN0521, de acuerdo a las especificaciones del fabricante para eliminar contaminación por gDNA
6. Realizar una PCR para comprobar la ausencia de gDNA, empleando los primers para un fragmento de 230 pb del gen de actina (ACT512F: ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC, ACT783R: TACGAGTCCTTCTGGCCCAT) de hongos. La PCR se realizó con Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la amplificación del DNA genómico (10  $\mu$ M cada cebador, 10 mM de cada desoxinucleósido trifosfato [dNTP], 1  $\times$  Buffer y 1 U de Taq DNA polimerasa). El programa de PCR fue un ciclo de desnaturalización inicial a 98 ° C durante 3 min; 30 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 s, la temperatura de alineamiento es 63 ° C durante 30 s.
7. Cuantificar el RNA total en nanodrop y analizar su integridad en un gel desnaturalizante de agarosa.
8. Liofilizar el RNA obtenido y enviar a secuenciar.

#### **7.5.8.2 Secuenciación del RNA**

Se enviaron 6 muestras de RNA total (tres repeticiones para el control y tres repeticiones para la condición seleccionada) para su secuenciación por la plataforma de Illumina TruSeq 150 PE (paired end), con una cobertura de 20 millones de lecturas por extremo, a Macrogen USA.

### **7.5.8.3 Análisis de expresión diferencial**

Para conocer qué cutinasas están implicadas en el aclaramiento del Impranil fue realizado el análisis de expresión diferencial en el laboratorio del Dr. Adrián Ochoa Leyva (Instituto de Biotecnología, UNAM) por el M. en C. Luigui Gallardo Becerra, de la siguiente manera:

1. Realizar el filtrado de calidad con Trimmomatic, para quitar los adaptadores y remover las lecturas con baja calidad (calidad mínima Q20).
2. Realizar el ensamble *de novo* con Trinity y el alineamiento de cada muestra al ensamblado de referencia.
3. Realizar el análisis de expresión diferencial utilizando un *Fold change*>2 y  $p < 0.05$  con el algoritmo DESeq2.

### **7.5.8.4 Búsqueda de cutinasas con expresión diferencial en Impranil**

Para identificar las cutinasas que se expresan en cultivos con MM-Impranil 0.5%, se realizó una búsqueda de genes de cutinasas en los resultados del análisis de expresión diferencial. Para ello fue necesario:

1. Construir una base de datos para blastn con los genes de expresión diferencial en Impranil.
2. Realizar un alineamiento local con blastn utilizando la base de datos antes construida y como query un archivo fasta con los genes de las cutinasas putativas de A3.I.1.
3. Buscar los alineamientos que muestren un 100% de identidad con los genes de las cutinasas de A3.I.1.

## **8. Resultados y discusión**

### **8.1 Secuenciación y ensamble del genoma de *Cladosporium tenuissimum* A.3.I.1**

Para identificar las cutinasas con posible actividad degradativa sobre el PU, primero secuenciamos el genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. Con el objetivo de obtener un ensamble de calidad utilizamos tres tecnologías de secuenciación. Primero utilizamos una secuenciación Illumina. La segunda tecnología fue una secuenciación en tiempo real de molécula única (SMRT) de Pacific Biosciences, la cual fue elegida por las ventajas que ofrece: 1) El tamaño de lectura es de 10-60 kb, esto permite un ensamble con menor sesgo de amplificación y por consecuencia aumenta a probabilidad de obtener el genoma completo, 2) El número de reads necesario para obtener la cobertura suficiente del genoma es menor en comparación a otras tecnologías, debido a la longitud de los reads y la cobertura uniforme (Berlin *et al.*, 2015; Korfach *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2013). La tercera tecnología de secuenciación empleada fue la plataforma Proxima™ Genome Scaffolding de Phasegenomics, la cual utiliza la tecnología Hi-C, permitiendo que el andamiaje del genoma sea a escala cromosómica, mejorando considerablemente el ensamble del genoma. Esta novedosa tecnología se ha estado utilizando para obtener genomas completos y ordenamientos en 3D de los cromosomas en varios organismos (De-Kayne *et al.*, 2019; Lightfoot *et al.*, 2017).

#### **8.1.1 Determinación de las mejores condiciones para la purificación de DNA**

Inicialmente se probaron dos métodos para la purificación del DNA de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1: el E.Z.N.A® Fungal DNA Mini Kit y el protocolo empleando CTAB descrito por Doyle y Doyle (1990) y modificado por Álvarez-Barragán (2013). La extracción con “E.Z.N.A® Fungal DNA Mini Kit” ofrece un DNA sin contaminantes por las propiedades específicas de unión del DNA a la matriz de sus columnas. Utilizando el protocolo del kit se obtuvo un rendimiento máximo de 9.2 ng DNA/mg de biomasa, una  $Abs_{260}/Abs_{280} = 1.7-1.9$  y fragmentos de DNA de un tamaño

aproximado de 20 Kpb. Analizando los pasos en donde posiblemente se podrían realizar modificaciones para lograr mejores rendimientos y calidad, y llevando a cabo diversas pruebas con ese propósito, se lograron aumentar los rendimientos. Las modificaciones realizadas al protocolo del fabricante y los resultados de dichas modificaciones se describen a continuación:

1. Se aumentó la cantidad de biomasa procesada por ensayo en un 100%. De 100 mg que sugería el protocolo del kit a 200 mg.
2. Tiempo de homogenización: se establecieron 5 min al tiempo de homogenización de las células con los buffers porque el protocolo no indica el tiempo requerido para disgregar, después de varias pruebas se establecieron 5 minutos de homogenización.
3. Se aumentó la cantidad de eluciones de la columna, de una elución indicada en el kit, a tres eluciones. Esto se determinó realizando cinco eluciones y monitoreando la calidad y cantidad de DNA eluído en cada una de ellas, en diferentes pruebas. Con ello se logró un aumento en la cantidad de DNA obtenido, sin detrimento en su calidad.

Con estas modificaciones se obtuvo un rendimiento máximo de 24.8 ng de DNA/mg de biomasa (Tabla 2), lo cual representó un aumento del 169% respecto al rendimiento obtenido con el protocolo original del fabricante, sin menoscabo de la calidad del DNA que siempre mantuvo una relación  $Abs_{260}/Abs_{280} = 1.7-1.9$  y una  $Abs_{260}/Abs_{230} = 1.2-1.4$ . Sin embargo, el tamaño del DNA obtenido, menor a 20 kpb, no era el óptimo sugerido para la secuenciación de PacBio ( $\geq 60$  kpb) (Figura 3A).

**Tabla 2. Comparación de calidad y rendimiento de gDNA extraído con el kit E.Z.N.A® Fungal Mini y extracción con CTAB**

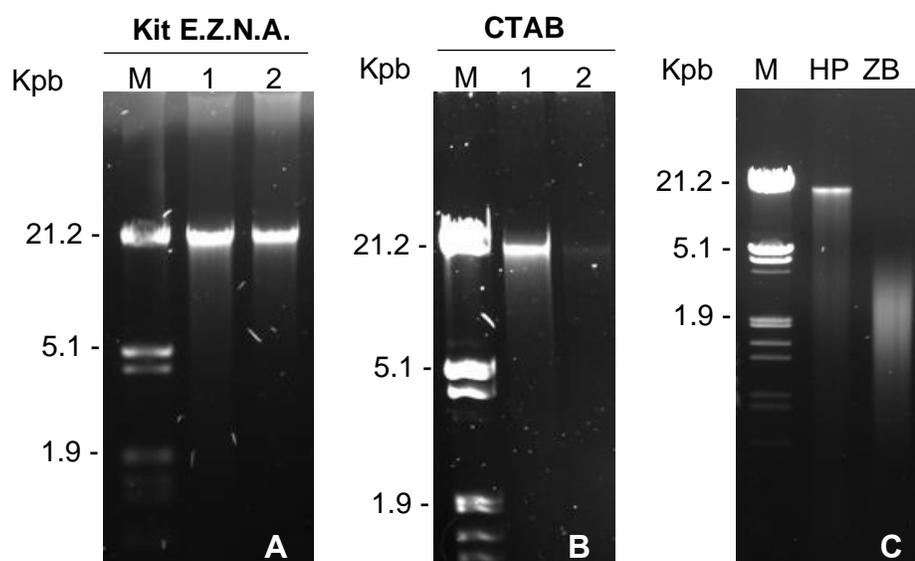
No. Eluciones	Abs <sub>260</sub> / Abs <sub>280</sub>	Abs <sub>260</sub> / Abs <sub>230</sub>	Cantidad (µg)	Rendimiento (ng DNA/mg biomasa)
<b>E.Z.N.A® Fungal DNA Mini Kit</b>				
1 <sup>a</sup>	1.86	1.41	2.98	20.1
2 <sup>a</sup>	1.69	1.28	1.14	
<b>Extracción CTAB</b>				
Extracción CTAB	1.85	0.77	15.9	50.3
Reprecipitación con acetato de amonio	1.6	0.4	2.44	8.1

Con la extracción CTAB (Doyle y Doyle (1990) modificada por Álvarez-Barragán en 2013) se obtuvo un 101% más de DNA que con el kit. Sin embargo, la Abs<sub>230nm</sub> fue alta, lo cual podría deberse a contaminación con fenol o carbohidratos. Para eliminar los residuos de fenol o carbohidratos, el DNA obtenido se re-precipitó con acetato de sodio (Moore y Dowhan, 2002), con lo cual hubo una pérdida del 83% en el rendimiento al pasar de 50.3 ng de DNA/mg de biomasa a 8.1 ng de DNA/mg de biomasa (Tabla 2). El tamaño del DNA obtenido, también fue de 20 Kpb (Figura 3B).

Debido a que con los protocolos que se habían utilizado no se obtuvo DNA de alto peso molecular, se decidió probar el kit E.Z.N.A. HP Fungal DNA, el cual es específico para obtener DNA de 50-70 Kpb; además se utilizó el kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep (donado por el Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos). El DNA obtenido con E.Z.N.A HP Fungal fue también de 20 Kpb y más íntegro que el obtenido con el kit ZymoBIOMICS, el cual generó fragmentos de tamaño bajo (0.5 -5 Kbp). Esto podría deberse a que, para la homogenización del micelio en este kit se utiliza el disruptor celular FastPrep® (Figura 3C). La relación Abs<sub>260</sub>/Abs<sub>280</sub> en ambos casos era adecuada para la tecnología de secuenciación, pero la relación Abs<sub>260</sub>/Abs<sub>230</sub> fue menor a 1.8 (Tabla 3).

**Tabla 3. Comparación de calidad y rendimiento de gDNA extraído con el kit E.Z.N.A® HP Fungal DNA y ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep**

Extracción	Abs <sub>260</sub> / Abs <sub>280</sub>	Abs <sub>260</sub> / Abs <sub>230</sub>	Cantidad total (µg)	Rendimiento (ng DNA/mg biomasa)
E.Z.N.A® HP Fungal DNA Kit	1.89	1.44	5.5	26.5
ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit	1.93	1.71	5.6	37

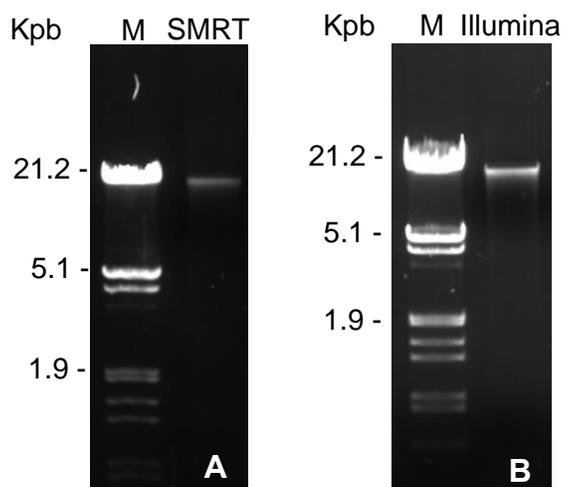


**Figura 3. Integridad del gDNA de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 extraído mediante los diferentes protocolos evaluados. A) Extracción con el kit E.Z.N.A Fungal DNA Mini, 1, 2: Primera y segunda eluciones. B) Extracción con CTAB, 1: DNA de extracción con CTAB, 2: DNA después de precipitar con acetato de sodio/etanol. C) HP: gDNA extraído con el kit E.Z.N.A HP Fungal DNA; ZB: gDNA extraído con el kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep. Agarosa 0.8%, 50 V, marcador Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII*, tinción con bromuro de etidio, 100 ng de DNA por carril.**

Se decidió utilizar la técnica con la que se había obtenido mejor DNA, que fue purificado con el kit HP. Se enviaron a secuenciar para la tecnología de SMRT RS II, 12 µg de gDNA y para el sistema Illumina, 6.7 µg de gDNA ambos del 20 Kpb, alta calidad e integridad (Tabla 4 y Figura 4).

**Tabla 4. Calidad y rendimiento del gDNA enviado a secuenciación**

Técnica de secuenciación	Abs <sub>260</sub> / Abs <sub>280</sub>	Abs <sub>260</sub> / Abs <sub>230</sub>	Cantidad total (µg)	Rendimiento (ng DNA/mg biomasa)
<b>SMRT RS II</b>	1.91	1.44	12	60
<b>Illumina</b>	2.0	1.89	6.7	33.5



**Figura 4. Integridad del gDNA de *Cladosporium tenuissimum* A3.1.1 enviado a secuenciación.** A) gDNA para secuenciación SMRT RS II. B) gDNA para secuenciación Illumina. Tamaño de DNA aproximado de 20 Kpb, agarosa 0.8%, 70 V, marcador Lambda DNA/EcoRI+HindIII, tinción con bromuro de etidio, 100 ng de DNA por carril.

### 8.1.2 Ensamble del genoma de *C. tenuissimum* A3.I.1

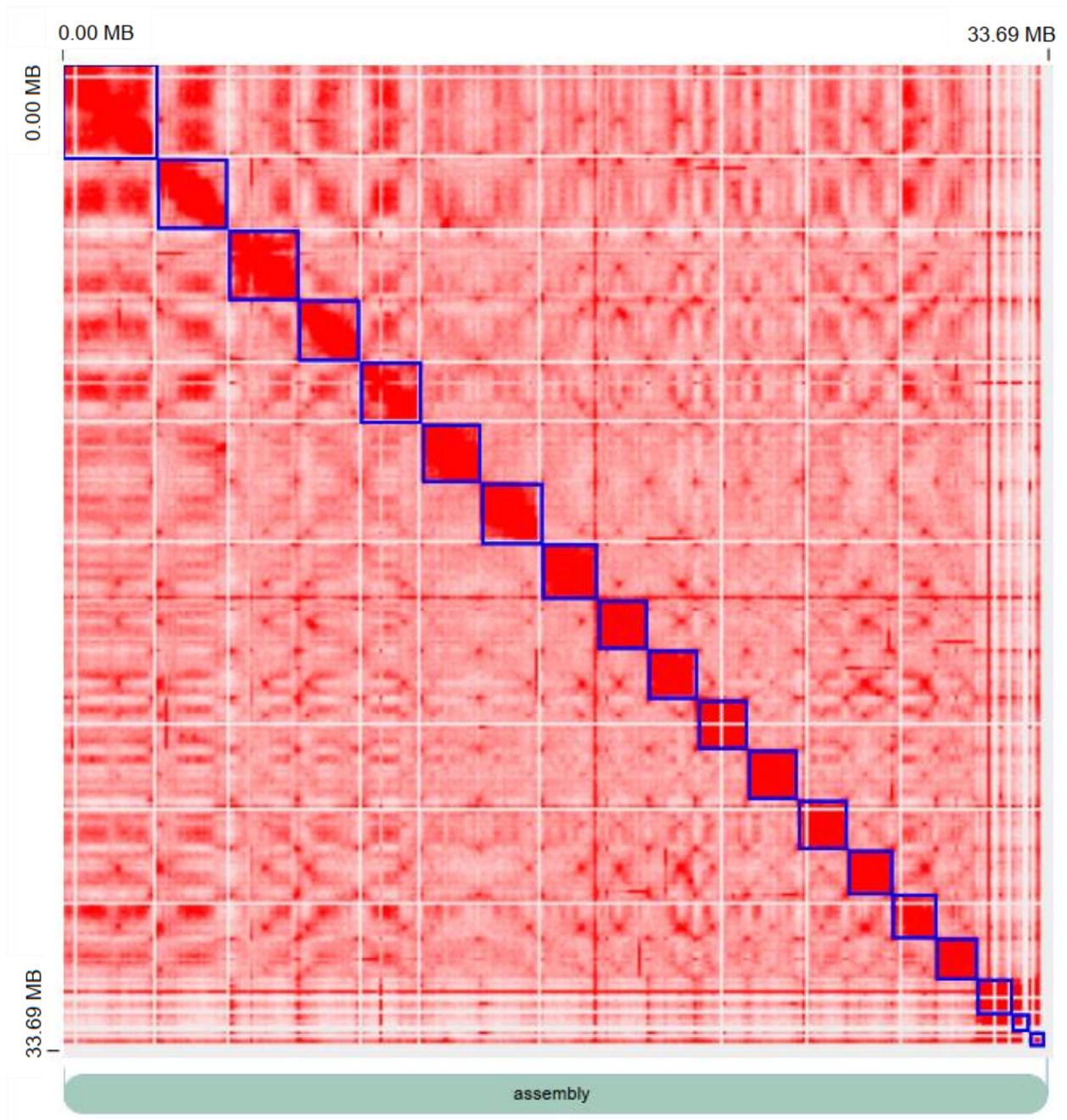
Con los resultados de la secuenciación por SMRT RS II e Illumina (Tabla 5) se realizó un ensamble híbrido del genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 en el Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM por el Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos. El borrador del genoma presentó un tamaño de 33.64 Mb con 53% de GC. Está dispuesto en 444 contigs, de los cuales 78 tienen una longitud mayor a 10 Kpb y 91 una longitud mayor a 5 Kpb y menor a 10 Kpb, el tamaño promedio es de 208,944 pb y un N50 de 1,322,123 pb, valor que corresponde a la longitud del contig más pequeño dentro de un conjunto de contigs cuya suma cubre la mitad del genoma.

**Tabla 5. Resultados de la secuenciación del genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1**

	SMRT RS II PacBio	Illumina
<b>Número de lecturas</b>	256,305	34,744,086
<b>Logitud de lecturas (nt)</b>	20,528	21-101

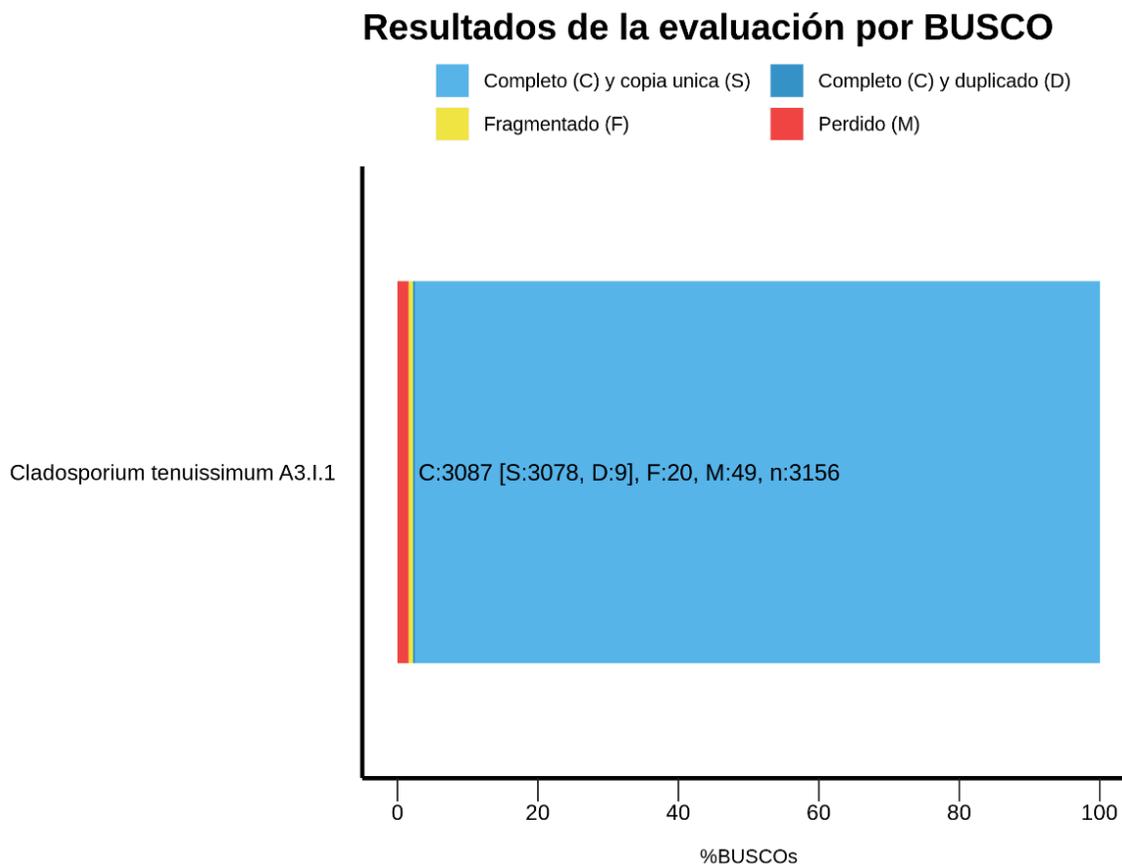
### 8.1.3 Determinación del reordenamiento cromosómico y predicción de genes en *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1

Para conocer la cantidad de cromosomas y mejorar el ensamble del genoma en *C. tenuissimum* A3.I.1 se realizó una secuenciación Hi-C del genoma del hongo. El ensamble final presentó un tamaño de 33.69 Mb, dispuestos en 19 scaffolds, con un N50 de 1,881,040 pb y presentó 93 gaps. Con el programa Sealer (Paulino *et al.*, 2015), fueron cerrados 17 de los 93 gaps en el genoma, representando el 18.3% de gaps. Los 19 scaffolds corresponden al número de cromosomas haploides del hongo (Figura 5).



**Figura 5. Heatmap post-agrupamiento de interacciones intracromosómicas basadas en HiC en *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. Las agrupaciones corresponden a 19 cromosomas haploides delineados por cuadros azules.**

El ensamble de los cromosomas (19 scaffolds) fue evaluado con la búsqueda de genes ortólogos de copia única de una base de datos del subphylum Pezizomycotina (Simão *et al.*, 2015). Los resultados mostraron 98.7% de genes completos, con un 97.5% para copia única y 0.3% para duplicados; 0.6% fueron genes fragmentados y 1.6% de genes no encontradas del genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 (Figura 6). Estos resultados indican que se obtuvo un ensamble del genoma de *C. tenuissimum* A3.I.1. de alta calidad. Utilizando este ensamble se predijeron los genes, intrones y exones con FunGAP (Min y Choi, 2019), el cual predijo 13,823 genes. El genoma de A3.I.1 se subirá a la base de datos Genome del NCBI para su anotación funcional.

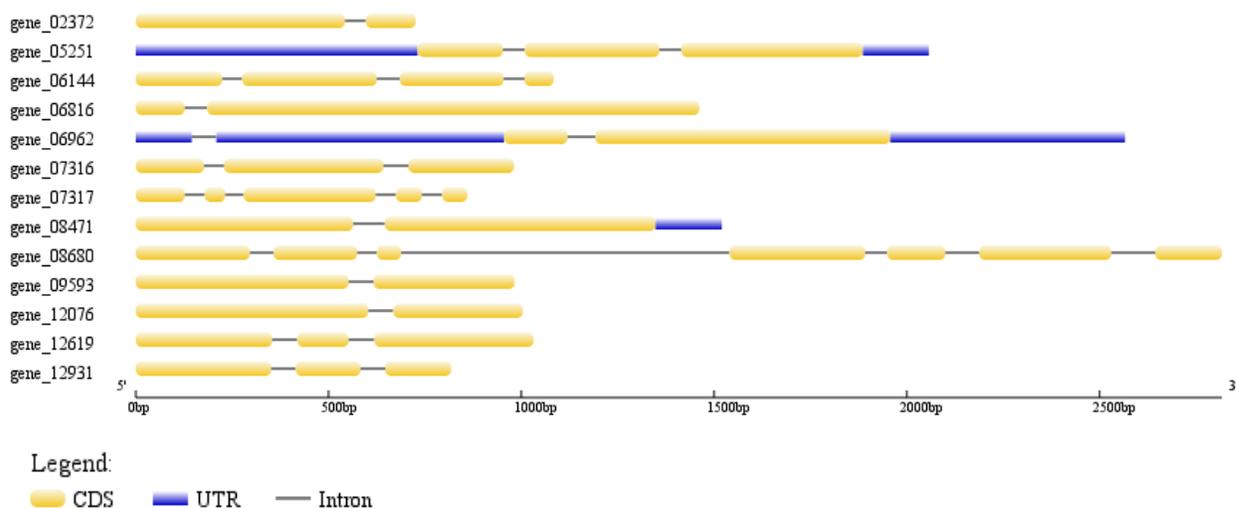


**Figura 6. Barplot de puntajes de evaluación del genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. con BUSCO.** La evaluación se realizó con 3156 perfiles de genes BUSCO de la base de datos del subphylum Pezizomycotina

## 8.2 Identificación de los genes de las cutinasas putativas en el genoma de *C. tenuissimum* A3.I.1

### 8.2.1 Búsqueda de genes candidatos de cutinasas en *C. tenuissimum* A3.I.1

Con el objetivo de determinar cuántos genes de cutinasas están codificados en A3.I.1 se realizó una búsqueda bioinformática en su genoma. Con los resultados de la predicción de genes se realizó una búsqueda de proteínas utilizando el modelo oculto de Márkov del dominio de las cutinasas (PF01083), para ello se utilizó el programa mmsearch y se obtuvieron 13 hits de probables cutinasas (Junier *et al.*, 2001). Para saber si estos genes podrían ser funcionales se analizó la estructura exón-intrón. Los 13 genes tienen en su estructura exones e intrones (Hu *et al.*, 2015) (Figura 7). Posteriormente, los genes fueron traducidos para descartar codones de paro dentro la secuencia. Como ninguno de ellos presentó codones de paro se continuó analizando las secuencias ya traducidas a proteínas.



**Figura 7. Estructura de los genes candidatos de cutinasas en *C. tenuissimum* A3.I.1.**

Las 13 proteínas candidatas de cutinasas encontradas en A3.I.1, tienen una longitud que va de los 213 a los 530 aminoácidos, que concuerda con las longitudes de secuencias de las cutinasas reportadas en la literatura (Skamnioti *et al.*, 2008) (Tabla 6).

**Tabla 6. Genes identificados y longitud de aminoácidos de las probables cutinasas codificadas en el genoma de *C. tenuissimum* A3.I.1**

Identificador del gen	Longitud (aminoácidos)	Identificador del gen	Longitud (aminoácidos)
<b>2372</b>	223	<b>8471</b>	421
<b>5251</b>	346	<b>8680</b>	530
<b>6144</b>	305	<b>9593</b>	305
<b>6816</b>	467	<b>12076</b>	312
<b>6962</b>	309	<b>12619</b>	299
<b>7316</b>	287	<b>12931</b>	229
<b>7317</b>	217		

### 8.2.2 Anotación funcional de los genes candidatos a cutinasas

Para identificar las dominios y motivos asociados a cutinasas, se analizaron las secuencias de aminoácidos de cutinasas con ScanProsite (De-Castro *et al.*, 2006). Seis de las 13 proteínas presentaron motivos de alta probabilidad, de las cuales dos proteínas mostraron motivos de cutinasas (6962, 7316) y cuatro proteínas con un motivo de la serina catalítica de lipasas (5251, 6144, 6816, 12931). Además, se identificó una firma de dominio de unión a carbohidratos y un perfil de sitio de unión a lípidos de lipoproteína de membrana procariota en las proteínas 6144, 6816 respectivamente (Tabla 7). Posteriormente se identificaron las familias a las que pertenecen estas proteínas utilizando la herramienta HMMSCAN (Potter *et al.*, 2018): las 13 proteínas poseen el dominio de la familia cutinasa PF01083 (Tabla 7).

**Tabla 7. Familia y dominios identificados en las posibles cutinasas de A3.I.1**

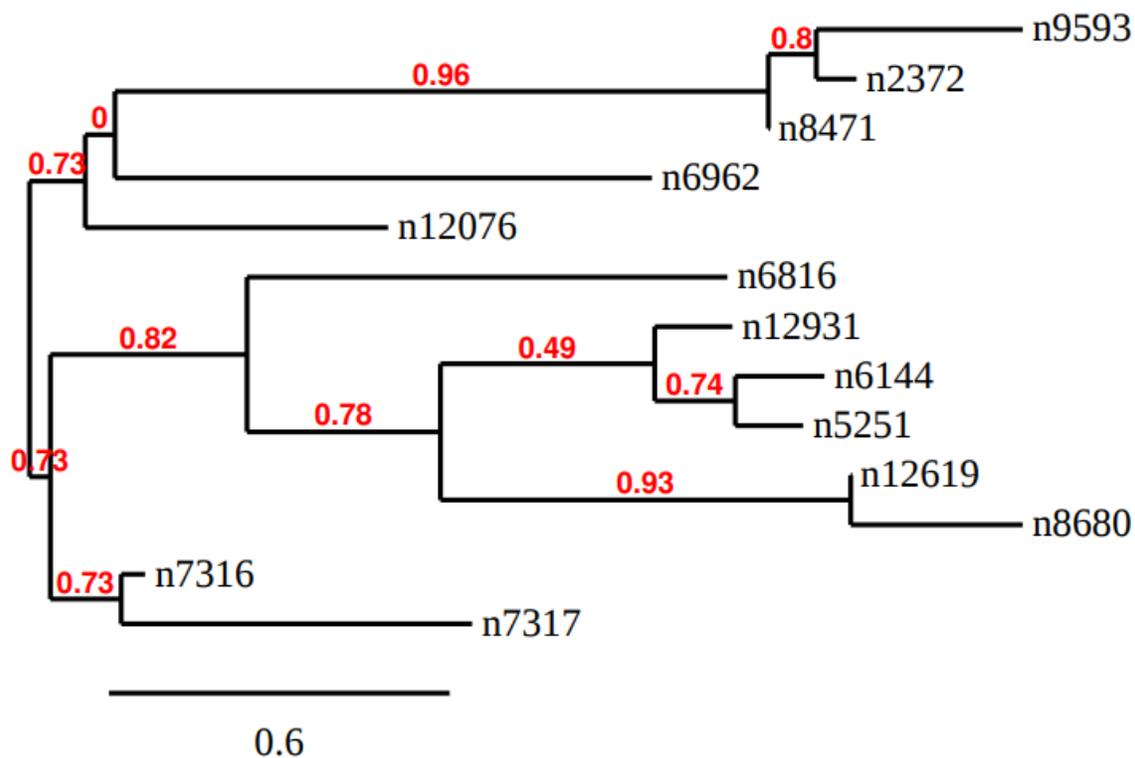
Proteína	Familia	Dominios y motivos
2372		NA
5251		Serina del sitio activo (lipasa)
6144		Dominio de unión a carbohidratos Serina del sitio activo (lipasa)
6816		Perfil de sitio de unión a lípidos de lioproteína de membrana procariota Serina del sitio activo (lipasa)
6962		Cutinasa 1
7316	Cutinasa	Cutinasa 2
7317		NA
8471		NA
8680		NA
9593		NA
12076		NA
12619		NA
12931		Serina del sitio activo (lipasa)

NA: No asignado

Para finalizar la identificación de genes de cutinasas putativas, se realizó la anotación funcional por InterProScan (Quevillon *et al.*, 2005). Las 13 proteínas presentan el término GO para actividad hidrolasa y tres (6962, 7316 y 7317) de estas 13 presentan el término GO para actividad cutinasa, además todas pertenecen a la familia de las cutinasas por lo que pudimos concluir que A3.I.1 posee 13 cutinasas putativas (Tabla 8). Con el objetivo de conocer las relaciones evolutivas que podrían presentarse entre las 13 cutinasas de A3.I.1 se construyó su árbol filogenético utilizando Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008). En la figura 8 se observan dos ramas que provienen del mismo ancestro común, esta separación esta soportada con un 73% probabilidad, así mismo dentro de cada rama se derivan dos más en las cuales se organizan las 13 cutinasas de A3.I.1 y en las ramas derivadas podemos notar que algunas proteínas son muy similares entre ellas (6144, 5251) o diversas pero relacionadas entre sí (2372, 8471, 9593).

**Tabla 8. Términos GO asignados a las posibles cutinasas de A3.I.1**

<b>Proteína</b>	<b>Proceso biológico</b>	<b>Función molecular</b>	<b>Componente celular</b>
<b>2372</b>	NA	Actividad hidrolasa (GO: 0016787)	NA
<b>5251</b>	NA	Actividad hidrolasa (GO: 0016787)	NA
<b>6144</b>	Proceso metabólico de carbohidratos (GO: 0005975)	Actividad hidrolasa (GO: 0016787) Unión de celulosa (GO: 0030248)	Región extracelular (GO: 0005576)
<b>6816</b>	NA	Actividad hidrolasa (GO: 0016787)	NA
<b>6962</b>	NA	Actividad hidrolasa (GO: 0016787) Actividad cutinasa (GO: 0050525)	Región extracelular (GO: 0005576)
<b>7316</b>	NA	Actividad hidrolasa (GO: 0016787) Actividad cutinasa (GO: 0050525)	Región extracelular (GO: 0005576)
<b>7317</b>	NA	Actividad cutinasa (GO: 0050525) Actividad hidrolasa (GO: 0016787)	Región extracelular (GO: 0005576)
<b>8471</b>	NA	Actividad hidrolasa (GO: 0016787)	NA
<b>8680</b>	NA	Actividad hidrolasa (GO: 0016787)	Membrana (GO:0016020)
<b>9593</b>	NA	Actividad hidrolasa (GO: 0016787)	NA
<b>12076</b>	NA	Actividad hidrolasa (GO: 0016787)	NA
<b>12619</b>	NA	Actividad hidrolasa (GO: 0016787)	NA
<b>12931</b>	NA	Actividad hidrolasa (GO: 0016787)	NA



**Figura 8. Árbol filogenético de las 13 cutinasas putativas en *C. tenuissimum* A3.I.1.** Árbol construido por Phylogeny.fr por el método de neighbor-joining, valores de soporte de rama (rojo).

### 8.3 Identificación de las cutinasa(s) con posible actividad degradativa sobre el poliuretano

Para identificar cual(es) cutinasa(s) está(n) involucrada(s) en la degradación del Impranil se emplearon dos estrategias: la primera fue comparar la evidencia experimental previamente obtenida en el laboratorio sobre las características de la cutinasa de A3.I.1 identificada, para posteriormente buscar similitudes estructurales de modelos de la estructura terciaria de las cutinasas de A3.I.1 con proteínas degradadoras de polímeros reportadas en la literatura y la segunda estrategia consistió en el análisis de expresión diferencial durante el crecimiento del hongo en Impranil por un análisis transcriptómico.

### **8.3.1 Búsqueda de la(s) cutinasas degradadoras empleando las evidencias experimentales obtenidas en el laboratorio**

Álvarez-Barragán en 2016 obtuvo información importante acerca de las proteínas involucradas en la degradación del Impranil en A3.I.1, la purificación y posterior identificación por espectrometría de masas en tándem de la proteína con actividad de aclaramiento del polímero la identificó como una cutinasa. Debido a que aún no se había secuenciado el genoma de A3.I.1 no se pudo identificar la proteína a la que pertenecían los péptidos obtenidos por la espectrometría de masas.

Como primera estrategia por identificar que cutinasa participa en la degradación del Impranil se compararon los péptidos obtenidos en la espectrometría de masas con las 13 cutinasas de A3.I.1, resultando que 16 de los 25 péptidos tienen entre 70-90% de identidad con la cutinasa 6962. Además de los péptidos obtenidos en la identificación, Domínguez-Malfavón (datos no publicados) obtuvo un fragmento de cDNA sintetizado a partir de mRNA en condiciones de cultivo iguales a las de la identificación de la proteína, es decir, a las 6 semanas de cultivo en MM con Impranil como única fuente de carbono. La búsqueda de este fragmento de 146 nt traducido en las cutinasas de A3.I.1 mostró un 81% de identidad también con la cutinasa 6962. La identificación de 16 de los 25 péptidos es una prueba de la posible actividad de la proteína 6962 sobre el Impranil. Sin embargo, este hallazgo no demuestra que 6962 sea la cutinasa degradadora, debido a que puede haber más de una cutinasa expresada en esa condición y no estar involucrada con la degradación del Impranil. Debido a que, para dicha identificación se utilizó una base de datos general solo se utilizaron 25 de 267 espectros, cabe la posibilidad de que durante la purificación se aislaran más de una cutinasa, las cuales no fueron diferenciadas durante el análisis de espectros, por lo que, ahora con el genoma de A3.I.1 se podrían reanalizar los espectros de masas con su base de datos de proteínas. Se buscó hacer este análisis, pero no fue posible conseguir un sistema que pudiera darnos resultados.

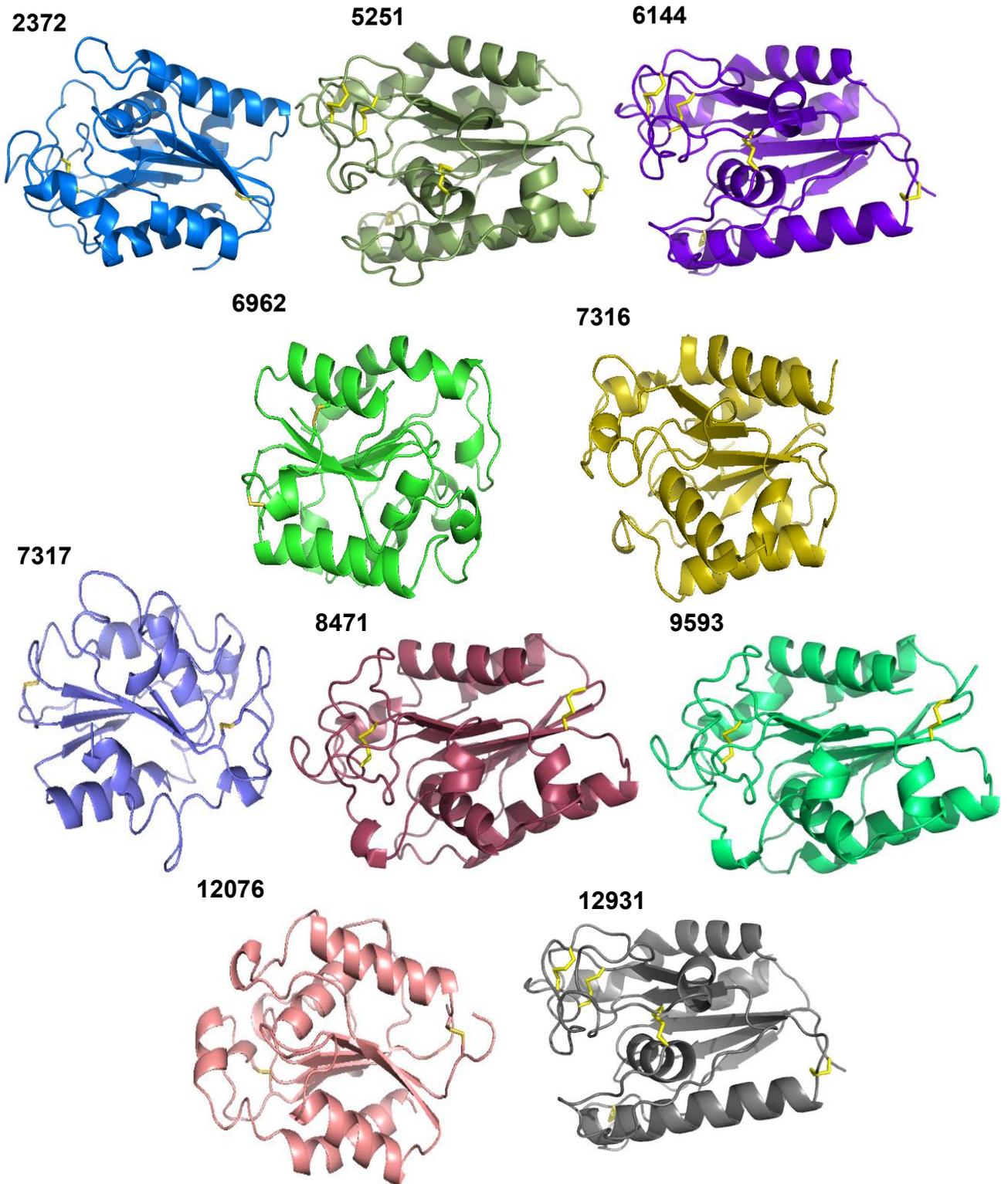
Sabemos que la(s) cutinasa(s) degradadora(s) de Impranil son proteínas extracelulares, por lo que se realizó la predicción de la localización celular de las 13 cutinasas putativas de A3.I.1. En la asignación de términos GO solo cuatro de las 13

cutinasas presentan una localización extracelular (Tabla 8). Sin embargo esta asignación se basa en homología de secuencia y es bien sabido que los métodos basados en aprendizaje automático de características de secuencias tienen mayor precisión en la predicción de la localización celular. Por lo que, con el propósito de predecir de manera más exacta la localización celular de las proteínas de interés se utilizó la red neuronal de aprendizaje profundo, el servidor DeepLoc-1.0, que se basa en características de secuencia y no en homología (Armenteros *et al.*, 2017). De las 13 cutinasas, 10 son extracelulares solubles, una es extracelular de membrana (12619), una de peroxisoma (6816) y otra de membrana (8680).

**Tabla 9. Localización celular de las cutinasas de A3.I.1.**

<b>ID proteína</b>	<b>Localización celular</b>	<b>ID proteína</b>	<b>Localización celular</b>
<b>2372</b>	Extracelular/soluble	<b>8471</b>	Extracelular/soluble
<b>5251</b>	Extracelular/soluble	<b>8680</b>	Membrana celular/membrana
<b>6144</b>	Extracelular/soluble	<b>9593</b>	Extracelular/soluble
<b>6816</b>	Peroxisoma/membrana	<b>12076</b>	Extracelular/soluble
<b>6962</b>	Extracelular/soluble	<b>12619</b>	Extracelular/membrana
<b>7316</b>	Extracelular/soluble	<b>12931</b>	Extracelular/soluble
<b>7317</b>	Extracelular/soluble		

Se ha determinado que la capacidad de miembros de la misma familia de proteínas de utilizar sustratos diferentes se relaciona con pequeñas diferencias estructurales difíciles de estudiar a nivel de secuencia de aminoácidos (Hasegawa y Holm 2009). Para determinar si alguna de las cutinasas extracelulares de A3.I.1 podría tener similitud con proteínas degradadoras de polímeros sintéticos ya cristalizadas, se realizó la modelación por homología de la estructura terciaria de las 10 cutinasas extracelulares de A3.I.1. El modelado se realizó con el servidor SwissModel (Waterhouse *et al.*, 2018) bajo parámetros preestablecidos, utilizando como molde todas las cutinasas incluidas en su base de datos (Figura 9).



**Figura 9. Modelación por homología de la estructura terciaria de las 10 cutinasas extracelulares codificadas en el genoma de *C. tenuissimum* A3.I.1. Los modelos de estructura terciaria se obtuvieron de SwissModel y se visualizaron en PyMol 2.3. Los puentes disulfuro se señalan en amarillo.**

Se obtuvieron los modelos para las 10 cutinasas, las estructuras terciarias de las cutinasas se evaluaron con el QMEAN, el cual es un estimador basado en diferentes propiedades geométricas y proporciona estimaciones de calidad absoluta global. Valores de QMEAN cercanos a 0 indican una buena concordancia con estructuras experimentales de tamaño similar. Los valores positivos indican puntuaciones más altas que las estructuras experimentales en promedio y los valores negativos indican que el modelo tiene puntuaciones más bajas que las estructuras experimentales en promedio. Se consideran predicciones de baja calidad cuando el QMEAN es menor a -4.0 (Benkert *et al.*, 2008). Además de utilizar el valor de QMEAN para la evaluación de las predicciones se generó una Ramachandran plot para cada cutinasa, la cual considera todas las combinaciones posibles de los ángulos de los aminoácidos en un péptido de acuerdo a su estructura secundaria (Carugo y Carugo, 2013). Existen tres zonas en la Ramachandran plot (favorecida, permitida y fuera de región) en donde se disponen a los aminoácidos de acuerdo a su ángulo. El porcentaje ideal para la zona favorecida es  $\geq 90\%$ , de la zona permitida de  $\leq 10\%$  y para la zona no permitida hasta 1%. Bajo los criterios anteriores, las predicciones de estas once cutinasas de A3.I.1 resultaron ser adecuadas (Tabla 10).

**Tabla 10. Evaluación de los modelos de estructura terciaria de las diez cutinasas extracelulares de A3.I.1**

Proteína	SwissModel QMEAN (> -4.0)	Ramachandran plot		
		aa en región favorecida (≥90%)	aa en región permitida (≤10%)	aa fuera de región (Hasta 1%)
<b>2372</b>	-1.40	96	3	1
<b>5251</b>	-0.73	94.1	5.4	0.5
<b>6144</b>	-0.55	95	4.5	0.5
<b>6962</b>	-0.53	95.7	3.8	0.5
<b>7316</b>	-2.25	94	5.4	0.5
<b>7317</b>	-2.08	91.7	7.8	0.6
<b>8471</b>	-1.66	96.3	2.6	1
<b>9593</b>	-1.57	95.9	3.6	0.5
<b>12076</b>	-2.98	93.7	5.7	0.6
<b>12931</b>	-0.55	95	4.5	0.5

La búsqueda de similitudes estructurales entre los modelos de las cutinasas y otras proteínas, nos puede permitir identificar pequeñas diferencias entre estas cutinasas. Si al compararlas se encuentran similitudes con otras proteínas que ya han sido caracterizadas como degradadoras de polímeros sintéticos, podríamos sugerir que estas cutinasas tienen una función similar. Esta estrategia genera mejores resultados que la relación de función por homología de secuencia debido a que las mutaciones conducen a cambios en la estructura tridimensional de regiones periféricas, conservando la geometría del sitio catalítico (Hasegawa *et al.*, 2009). Con el objetivo de identificar similitudes estructurales relacionadas a la degradación de polímeros sintéticos entre las 10 cutinasas extracelulares de A3.I.1 y proteínas alojadas en la base de datos del Protein Data Bank (PDB), se realizó una búsqueda de similitudes estructurales empleando los modelos antes generados en el servidor Dali (Holm, 2019). Con este análisis se

identificaron las proteínas con mayor similitud con cada una de las 10 cutinasas extracelulares de A3.I.1 (Tabla 11). En total se encontraron seis diferentes proteínas con similitud a las 10 cutinasas de A3.I.1. De estas seis proteínas, dos de ellas tienen capacidad de degradar poliésteres sintéticos como: polibutileno succinato (PBS), polibutileno succinato adipato (PBSA) y el plástico bio-basado ácido poliláctico (PLA). Interesantemente, cuatro cutinasas de A3.I.1 mostraron similitud con estas dos cutinasas.

**Tabla 11. Proteínas identificadas en DALI con similitud estructural a las cutinasas extracelulares de A3.I.1**

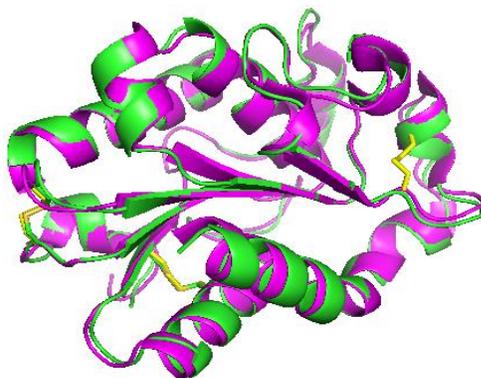
Cutinasa de A3.I.1	ID PDB	Proteína	Organismo
2372	2czq*	Proteína tipo cutinasa (Degrada PLA y PBS)	<i>Cryptococcus sp.</i> S-2
8471			
9593			
5251	1bs9	Acetil xilano esterasa	<i>Talaromyces purpureogenus</i>
6144			
12931			
6962	3gbs*	Cutinasa (Degrada PBS y PBSA)	<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 42149
7316	3esb	Cutinasa	<i>Fusarium solani subsp. pisi</i>
7317	5ajh	Subunidad de proteosoma	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 204508/S288c
12076	4oyy	Cutinasa	<i>Humicola insolens</i>

\*Proteínas degradadoras de polímeros sintéticos

### 8.3.1.1 Cutinasas de A3.I.1 semejantes a la cutinasa 3gbs de *Aspergillus oryzae* degradadora de polímeros sintéticos

La proteína 3gbs es una cutinasa de *Aspergillus oryzae* (cutAory) que degrada polibutileno succinato (PBS) y polibutileno succinato adipato (PBSA). Se ha comparado la estructura terciaria de cutAory con la cutinasa de *Fusarium solani* (cutFuso) que no presenta la capacidad de degradar polímeros sintéticos. Las diferencias estructurales entre estas dos cutinasas son: que en cutAory se presenta un tercer puente disulfuro que le confiere termo-estabilidad y una tríada catalítica topológicamente favorecida con un surco continuo y profundo, que se relacionó con la capacidad de degradar poliésteres sintéticos (Lui *et al.*, 2009).

La cutinasa 6962 es la más parecida a cutAory. En el modelo de esta cutinasa se observaron dos puentes disulfuro. Mediante alineamientos múltiples de secuencia se identificó que presenta dos cisteínas en la misma posición donde se forma el tercer puente disulfuro en cutAory, además los alineamientos de las estructuras tridimensionales de 6962 con cutAory mostraron similitud (Figura 10), por lo que no podemos saber si tercer puente disulfuro está o no presente en la proteína.

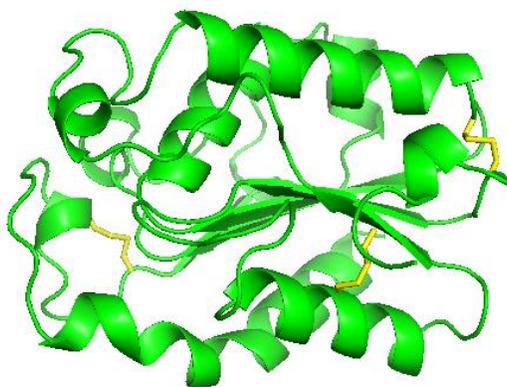


**Figura 10. Alineamiento del modelo de la cutinasa 6962 de A3.I.1 y la estructura terciaria de cutAory.** Magenta: Cutinasa de *Aspergillus oryzae* (cutAory); Verde: Cutinasa 6962 de A3.I.1; Amarillo: puentes disulfuro.

Con el objetivo de demostrar que la formación del tercer puente disulfuro en la proteína 6962 si es factible, se repitió su predicción de estructura terciaria utilizando como molde únicamente la cutinasa de *Aspegillus oryzae* (cutAory). Este nuevo modelo presentó parámetros de calidad dentro de lo establecido (Tabla 12) y tres puentes disulfuro (Figura 11). Sin embargo, esto no es evidencia definitiva de la existencia de ese tercer puente disulfuro en estas proteínas.

**Tabla 12. Evaluación del modelo de estructura terciaria de la cutinasa 6962 utilizando como referencia a cutAory**

Proteína	SwissModel QMEAN (> -4.0)	Ramachandran plot		
		aa en región favorecida (≥90%)	aa en región permitida (≤10%)	aa fuera de región (hasta 1%)
<b>6962</b>	-0.54	95.1	4.3	0.5



**Figura 11. Modelo de la estructura terciaria de la cutinasa 6962 de A3.1.1 usando como molde la estructura de cutAory.** El modelo de estructura terciaria se obtuvo de SwissModel y se visualizó en PyMol 2.3. Verde, cutinasa 6962; en amarillo se marcan tres puentes disulfuro.

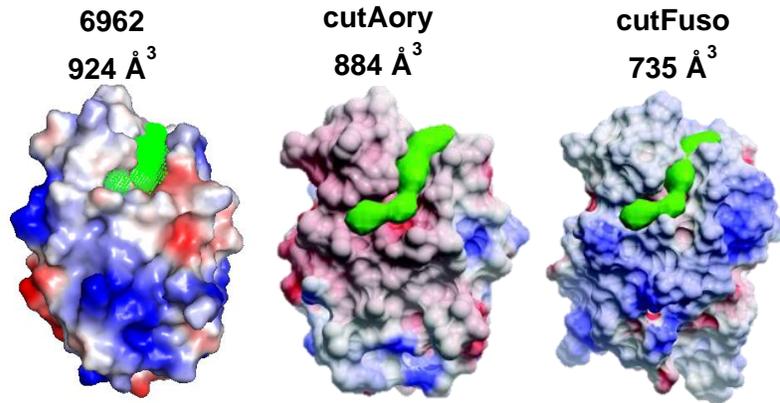
Para tratar de comprender por qué el programa SwissModel no predijo el tercer puente disulfuro en la proteína 6962 cuando se empleó como modelo todas las cutinasas de su base de datos y si lo predice cuando se usa cutAory como molde, se analizó el programa con el que se hace la predicción de los puentes disulfuro, DISULFIND (Ceroni *et al.*, 2006). Este programa es una combinación de algoritmos de aprendizaje automático para predecir los puentes disulfuro a partir de la secuencia de aminoácidos. Primero utiliza un clasificador binario que predice el estado de oxidación de cada cisteína y en segundo lugar, las cisteínas que se sabe que participan en la formación de puentes se emparejan para obtener un patrón de conectividad (Ceroni *et al.*, 2006). Si bien, la mayoría de los predictores de puentes disulfuro se basan en esas dos premisas, hay un constante mejoramiento de los algoritmos. Existen programas que consideran otros parámetros para la predicción de puentes disulfuro. DiANNA (Ferrè y Clote, 2005), por ejemplo, es una red neuronal artificial que toma en cuenta, primero, la predicción de la estructura secundaria de la proteína, para luego realizar alineamientos múltiples de la secuencia de interés contra su base de datos. La estructura secundaria predicha y el perfil de alineamientos se utilizan en la fase de entrenamiento de la red neuronal artificial. Después, se predice el estado de oxidación de las cisteínas y luego a cada par de cisteínas en la secuencia de la proteína se le asigna una probabilidad de formar un enlace disulfuro. Finalmente, considera la interacción de los residuos vecinos a la cisteína para producir la predicción de conectividad final (Ferré y Clote, 2005). Con base en lo anterior la predicción de puentes disulfuro podría ser mejor con DiANNA que con DISULFIND, ya que DiANNA utiliza no solo parámetros químicos, sino también biológicos y evolutivos al realizar alineamientos múltiples y predecir la estructura secundaria. Al utilizar DiANNA para predecir los puentes disulfuro de la secuencia de aminoácidos de la cutinasa 6962 de A3.I.1, se obtuvieron tres puentes disulfuro (Tabla 13).

**Tabla 13. Posición de los puentes disulfuro de la proteína de A3.I.1 empleando el programa DiANNA**

Número de puentes predichos	Posición en 6962
1	38-117
2	64-77
3	179-186

Las principales diferencias entre cutAory y cutFuso son: a) la presencia de un tercer puente disulfuro adicional y b) un sitio catalítico topológicamente favorecido con un surco continuo y profundo (Lui *et al.*, 2009). Con el objetivo de determinar si alguna de las dos cutinasas putativas identificadas en A3.I.1 poseía un surco continuo y profundo semejante a las cutinasas con capacidad de degradar polímeros sintéticos, se calculó el potencial de contacto (PyMoL 2.3) y los “pockets” asociados a los sitios de unión de las dos cutinasas de A3.I.1. Los “pockets” se predijeron con el programa GHECOM. Su algoritmo se basa en considerar que puede haber “pockets” para ligandos pequeños y grandes, en los que se considera no solo el tamaño sino también la profundidad (Kawabata, 2009). Una vez obtenidos los “pockets” se seleccionó el que estuviera en la zona de la tríada catalítica y se alineó en PyMoL a la imagen tridimensional del cálculo del potencial de contacto. La cutinasa 6962 de A3.I.1 presenta una predicción del surco catalítico profundo y continuo similar al de cutAory (Figura 12).

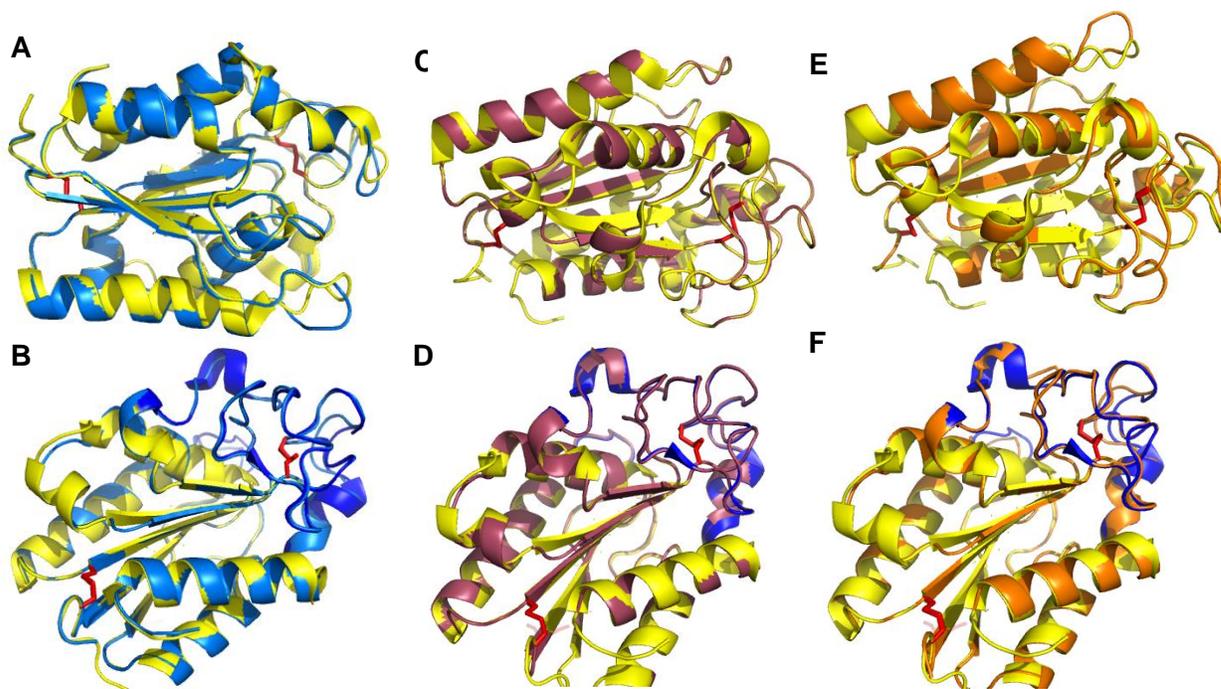
Las diferentes herramientas bioinformáticas empleadas para analizar la posible estructura de la cutinasa 6962 permiten proponer la existencia de tres puentes disulfuro y un surco profundo y continuo en estas proteínas. La similitud entre 6962 con cutAory sugiere que estas cutinasas podrían presentar capacidad para degradar el Impranil.



**Figura 12. Predicción del potencial de contacto y “pocket” asociado al sitio de unión del sustrato de la cutinasa 6962 de A3.I.1.** Las predicciones del potencial de contacto y visualización se realizaron con PyMol 2.3, los “pockets” (verde) se calcularon con el programa GHECOM. El potencial de contacto y pocket (verde) de cutAory y cutFuso fueron obtenidos de Lui *et al.*, 2009.

### 8.3.1.2 Cutinasas de A3.I.1 semejantes a la proteína tipo cutinasa 2czq de *Cryptococcus sp. S-2* que degrada PLA y PBS

La otra proteína que degrada polímeros sintéticos es 2czq. Ésta es una proteína tipo cutinasa proveniente del hongo *Cryptococcus sp. S-2* (cutCsp) esta proteína tiene la capacidad de degradar PLA y PBS. Sus características bioquímicas indicaron que se trataba de una lipasa, sin embargo, no exhibía similitud significativa en su secuencia con ninguna lipasa reportada hasta ese momento y presentó similitud estadísticamente poco significativa a las cutinasas (Masaki *et al.*, 2005). Las cutinasas 2372, 8471 y 9593 de A3.I.1 son las más parecidas a cutCsp, sus estructuras tridimensionales son muy similares (Figura 13).



**Figura 13. Alineamientos de las predicciones de las cutinasa 2372, 8471 y 9593 de A3.I.1 y la estructura terciaria de cutCsp.** Amarillo: Proteína tipo cutinasa de *Cryptococcus sp.* S-2 (cutCsp); A) y B): alineamientos con cutinasa 2372 de A3.I.1 (Azul); C) y D): alineamientos con cutinasa 8471 de A3.I.1 (Violeta); E) y F): alineamientos con cutinasa 9593 de A3.I.1 (Anaranjado); Rojo: puentes disulfuro; Azul marino: regiones propuestas con posible participación en la degradación de poliésteres sintéticos.

En el análisis de estructura de esta proteína realizado por Kodama y colaboradores en 2009, también se realizó una comparación con la cutinasa de *Fusarium solani*. Derivado de las diferencias, proponen distintas regiones que podrían estar involucradas en la capacidad de esta proteína en degradar poliésteres, estas regiones se resaltan en azul marino en los alineamientos B, D y F en la figura 38; donde además se observa una impresionante similitud con las tres cutinasas de A3.I.1 (2372, 8471 y 9593). Hasta el momento no hay otra proteína similar a cutCsp, razón por la cual la fuerte similitud que tiene con tres proteínas de A3.I.1 nos hace sugerir que estas podrían poseer la capacidad de degradar poliésteres sintéticos; en este caso podrían degradar Impranil.

Las cutinasas 5251, 6144 y 12931 muestran similitud estructural con acetil xilano esterasas. Estas enzimas, al igual que las cutinasas, pertenecen a la familia de las

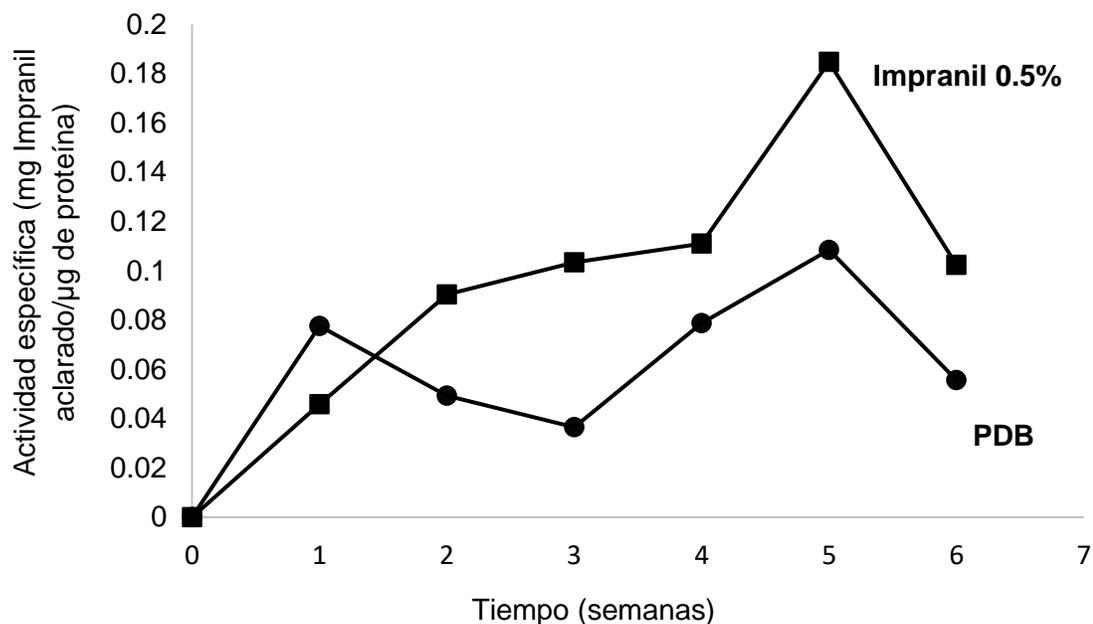


## **8.4 Determinación de las condiciones diferenciales de expresión de la actividad “Impranilasa” para el análisis transcriptómico**

Se han identificado los genes de cutinasas putativas presentes en el genoma de A3.I.1. Con el objetivo de identificar a las cutinasas involucradas en la degradación del Impranil, se decidió realizar un análisis transcriptómico de expresión diferencial. Para ello, se determinaron las condiciones de cultivo donde la actividad de aclaramiento solo se presente en cultivos con Impranil, comparando con un cultivo proveniente de una fuente de carbono diferente. Por medio del análisis del transcriptoma, se podrá saber qué genes de cutinasas se expresan durante el aclaramiento del Impranil.

### **8.4.1 Evaluación de la actividad “Impranilasa” en medio caldo papa dextrosa (PDB)**

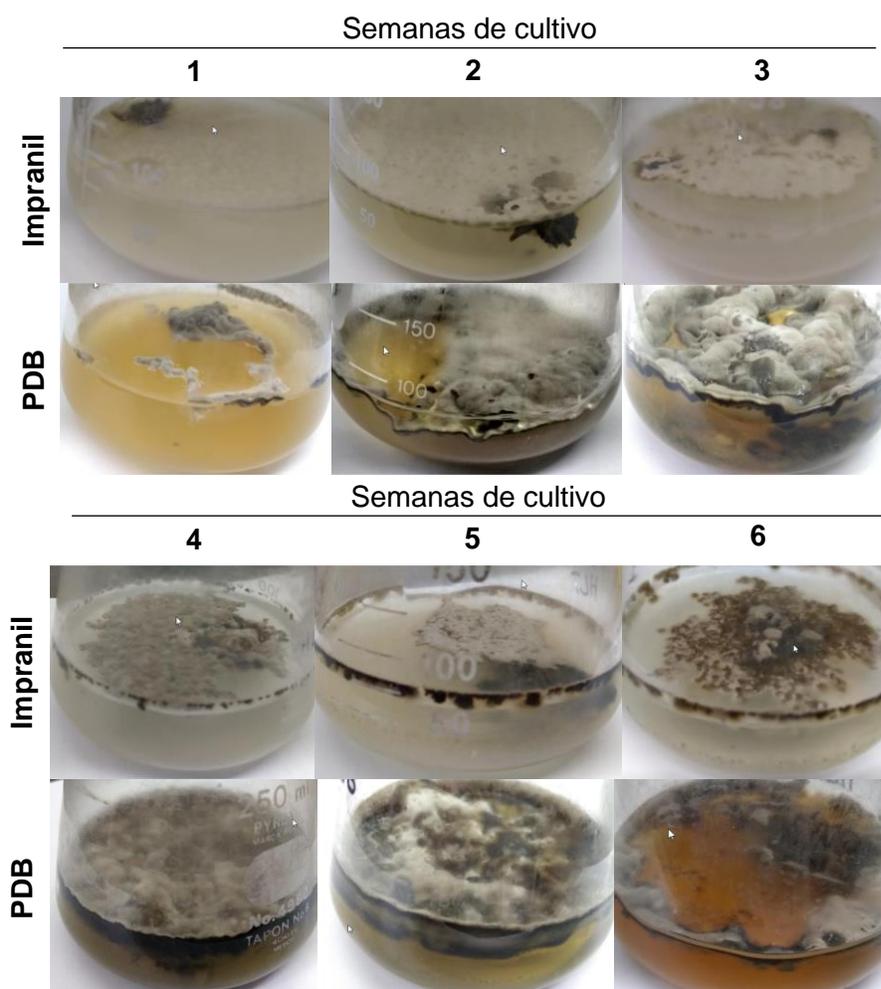
Primeramente, se realizó un análisis curso-temporal con mediciones semanales de la actividad “Impranilasa” en concentrados de proteína extracelular de cultivos en MM-Impranil y en PDB, durante 6 semanas, observándose que se presentaba actividad en los dos medios, siendo en general un 50% mayor en MM-Impranil que en medio PDB. En la quinta semana se presentó la mayor actividad de proteínas extracelulares de aclaramiento del Impranil en ambos cultivos, siendo la actividad “Impranilasa” en MM-Impranil 80% mayor en comparación con la observada en el medio PDB; lo que indica que la expresión aumenta en presencia de Impranil (Figura 15).



**Figura 15. Actividad específica de “Impranilasa” a diferentes semanas de cultivo.** La actividad “Impranilasa” se midió por espectrofotometría a una  $Abs_{600nm}$  utilizando 6  $\mu g$  de proteína por ensayo cada semana, en MM-Impranil (cuadros) y medio PDB (círculos). Cultivos estáticos a 30 °C, inoculado con 1  $cm^2$  de micelio obtenido a partir de un precultivo de 7 días en PDB,  $n=1$ .

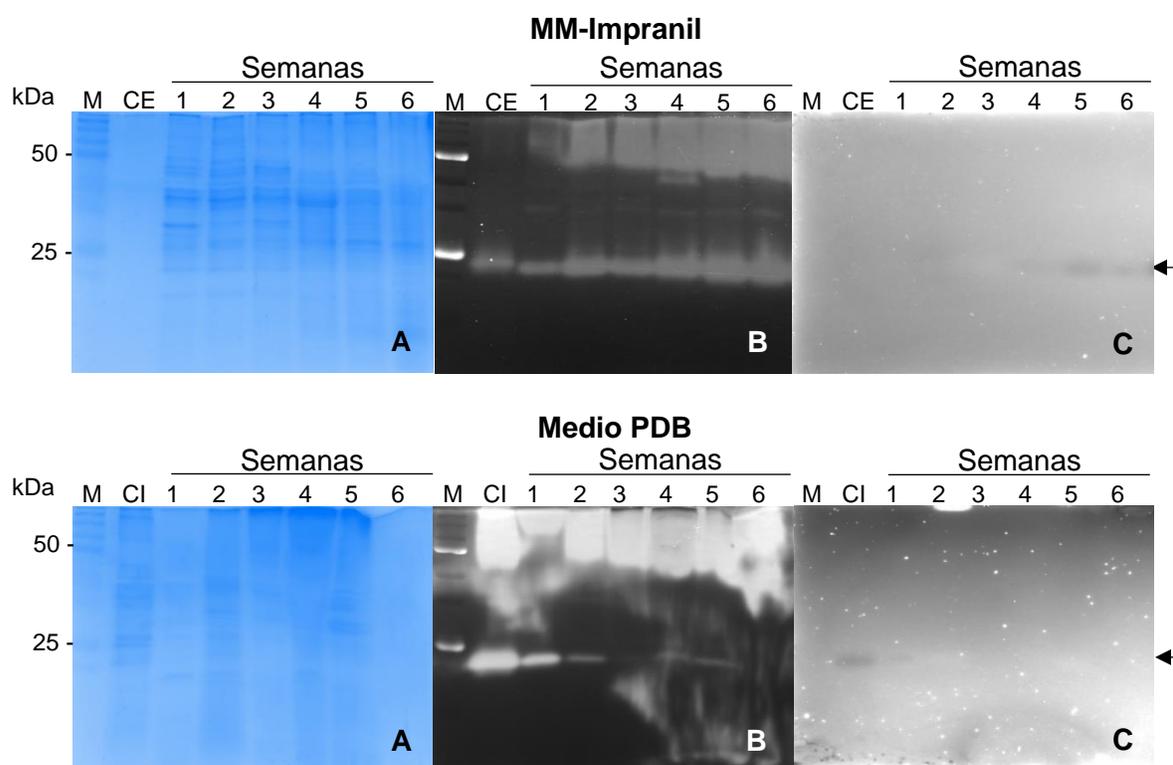
Asimismo, se observó que el crecimiento de los cultivos en MM-Impranil y en medio PDB no era equivalente, aunque se inocularon con la misma cantidad de micelio, presentándose mucho mayor crecimiento en medio PDB (Figura 16). Esto se debe a que el medio PDB es un medio rico y tiene compuestos que favorecen el crecimiento fúngico, a diferencia del MM-Impranil que solo contiene el polímero como fuente de carbono. Estos resultados no nos permitieron comparar los micelios obtenidos en estos dos medios en las semanas analizadas, porque la actividad registrada podría estar influenciada por la cantidad de biomasa producida. Por lo tanto, solo se pudo concluir que a las 5 semanas de desarrollo del hongo hay mayor actividad “Impranilasa” en ambos medios.

La cuantificación espectrofotométrica de la actividad “Impranilasa” es el ensayo principal para demostrar el aclaramiento de Impranil. Este ensayo se complementó con el análisis de las proteínas del SN (sobrenadante) de los cultivos, mediante SDS-PAGE, además de la determinación del aclaramiento del Impranil *in situ* mediante una zimografía (Ruiz *et al.*, 1998; Álvarez-Barragán *et al.*, 2016) y la zimografía de actividad esterasa.



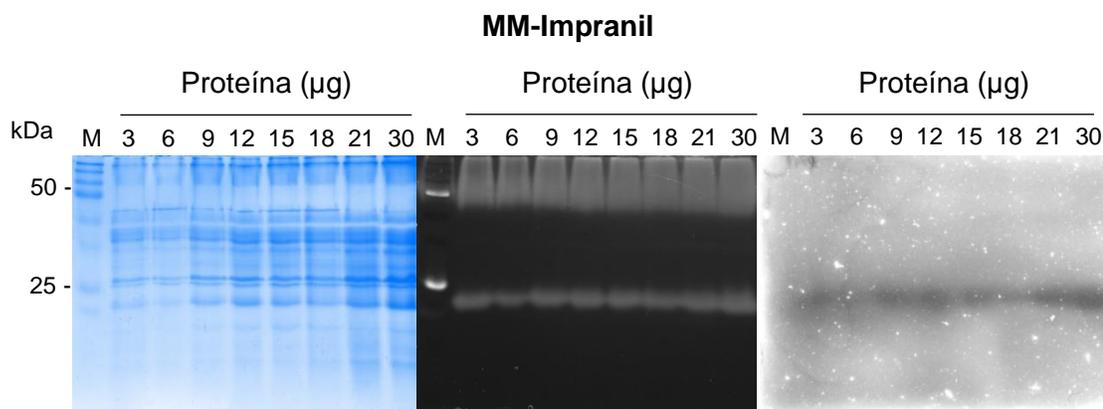
**Figura 16. Crecimiento de *Caldosporium tenuissimum* A3.I.1 en MM-Impranil y PDB.** Cada matraz fue inoculado con 1 cm<sup>2</sup> de micelio obtenido a partir de un precultivo de 7 días en PDB. Se incubó a 30 °C sin agitación por 6 semanas, tomando registros fotográficos semanales.

Se observó una gran cantidad de proteínas con actividad esterasa en el concentrado extracelular de ambos medios en la parte superior de los zimogramas para esterasa. Se observó claramente una banda de 20 kDa en MM-Impranil que se incrementaba con respecto al tiempo de cultivo, la cual solo se observó claramente a la primera semana y tenuemente en las siguientes semanas en PDB (Figura 17). Esta banda mostró actividad “Impranilasa” en proteínas de MM-Impranil de 4 y 5 semanas, pero no en proteínas de PDB. Lo cual concuerda con la menor actividad Impranilasa detectada en PDB en el ensayo espectrofotométrico.



**Figura 17. SDS-PAGEs y zimogramas de actividad esterasa e “Impranilasa” de proteínas extracelulares de A3.1.1 cultivado en MM-Impranil y en medio PDB.** Los paneles superiores corresponden al análisis de proteínas extracelulares obtenidas de MM-Impranil. Los paneles inferiores corresponden al análisis de proteínas extracelulares obtenidas de medio PDB. A) Gel teñido con solución Coomassie. B) Zimografía de actividad esterasa. C) Zimografía de actividad “Impranilasa”. Para la zimografía de actividad esterasa se empleó como sustrato 4-metilumbeliferil butirato (1.6 mM), para la zimografía de actividad “Impranilasa” se empleó un gel de agarosa acoplado conteniendo Impranil 1%. Control positivo esterasa (CE), 4U Lipasa de *Pseudomonas fluorescens*; control positivo “Impranilasa” (CI), 15 µg de proteína extracelular de cultivo en MM-Impranil de 5 semanas. SDS-PAGE 15%, se cargaron 15 µg de proteína por carril de las diferentes semanas.

Para descartar la posibilidad de la existencia de otras proteínas con actividad “Impranilasa” en el concentrado proteico extracelular de MM-Impranil, se realizaron zimografías para esterasa e “Impranilasa” con concentraciones crecientes de proteína de cultivos de 5 semanas en MM-Impranil (semana con la mayor actividad enzimática). No se observó otra banda de aclaramiento además de la ya identificada a aproximadamente 20 kDa, ni siquiera con el doble de proteína de la empleada en el ensayo anterior (30  $\mu$ g), por lo que se concluyó que la(s) cutinasa(s) presentes en esta banda son las principalmente involucradas en el aclaramiento de Impranil observado en el SN de cultivos de A3.I.1 en medio MM-Impranil (Figura 18).

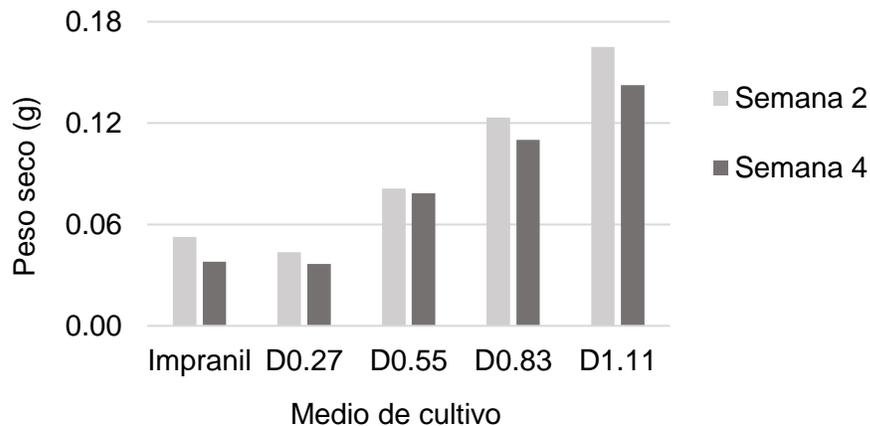


**Figura 18. Análisis de proteínas extracelulares de cultivos en MM-Impranil de 5 semanas, para descartar la presencia de otras actividades “Impranilasa”.** Zimografía de actividad esterasa empleando como sustrato 1.6 mM de 4-metilumbeliferil butirato; zimografía de actividad “Impranilasa” en gel de agarosa acoplado con Impranil 1%; SDS-PAGE 15%.

#### **8.4.2 Evaluación de la actividad “Impranilasa” en medio mínimo dextrosa (MM-dextrosa) a diferentes concentraciones**

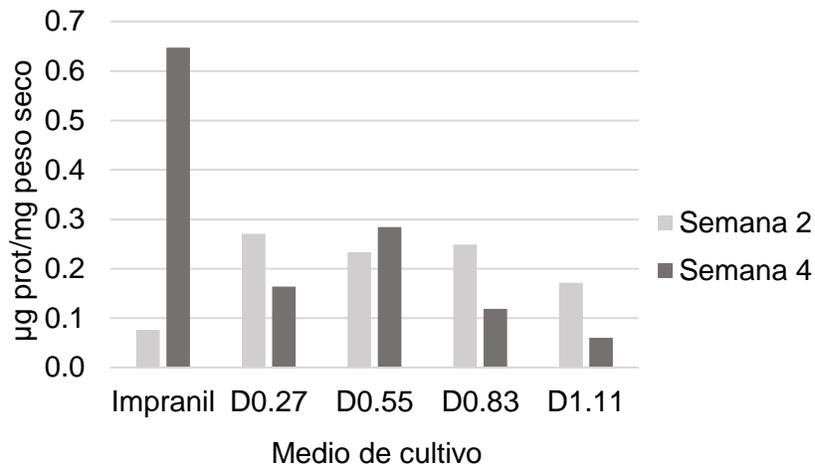
Debido a que el crecimiento de A3.I.1 en MM-Impranil y en PDB no fue equivalente, y a que las proteínas obtenidas de medio PDB podrían estar afectadas por el tratamiento que se les da para eliminar el almidón del medio de cultivo (SDS y dos diálisis de 9 y 12 h antes de concentrar las proteínas), se decidió modificar el medio de cultivo control cambiando de PDB a un medio con composición conocida, con los mismos minerales que el MM-Impranil pero con dextrosa como fuente de carbono. El medio mineral dextrosa (MM-dextrosa) se utiliza normalmente a 1.11 mM de dextrosa, pero se decidió probar también concentraciones menores de dextrosa para determinar qué concentración genera un crecimiento similar al de A3.I.1 en Impranil (0.5%). Así, se probaron las concentraciones 1.11 mM, 0.83 mM, 0.55 mM, 0.27 mM. También se decidió inocular a los cultivos con 80 mg de micelio, en lugar de con 1 cm<sup>2</sup>, por considerar una medida más precisa. Solo se pudieron analizar las semanas 2 y 4 debido a problemas de contaminación de cultivos. El objetivo de este experimento fue determinar qué concentración de dextrosa en el MM es equivalente en biomasa generada al MM-Impranil, por lo que fue suficiente analizar las semanas 2 y 4.

En el cultivo con MM-dextrosa se generó más biomasa en función del aumento de la concentración de dextrosa. La biomasa generada en medio Impranil fue equivalente a la generada en MM-dextrosa 0.27 mM (Figura 19). A las 2 y 4 semanas de cultivo se observa prácticamente el mismo crecimiento para cada tratamiento, lo que sugiere que el mayor crecimiento del hongo se alcanza antes de las 2 semanas de cultivo.



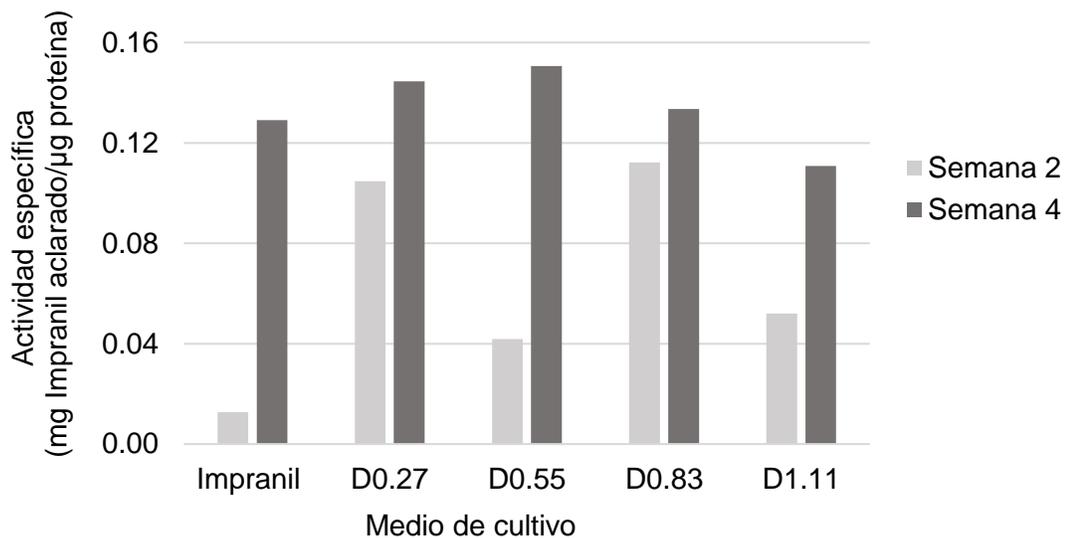
**Figura 19. Biomasa en peso seco de A3.I.1 cultivado en MM-Impranil y en MM-dextrosa a 2 y 4 semanas.** Impranil, MM-Impranil (0.5%); D, MM-dextrosa. Los números representan las concentraciones de dextrosa en mM que se probaron. Cultivos estáticos a 30 °C. Inóculo, 80 mg de micelio de precultivo en PDB de 7 días a 30 °C, n=2.

La cantidad de proteína extracelular expresada por mg de biomasa fue de casi el doble en MM-Impranil de 4 semanas comparada con los cultivos en dextrosa. Esto es interesante en dos aspectos: primero, a pesar de que no hay aumento en la biomasa entre la semana 2 y 4 en cultivos en Impranil, el micelio sigue secretando proteínas extracelulares, sin que esto redunde en un aumento de su biomasa; y segundo, los hongos cultivados en dextrosa no secretan tanta proteína extracelular como el cultivo en Impranil. La mayor cantidad de proteína extracelular en cultivos con MM-Impranil seguramente es generada por la maquinaria bioquímica de la que tiene que hacer uso el hongo para crecer en el medio en donde la única fuente de carbono es el Impranil. A diferencia de cultivos con dextrosa donde la fuente de carbono puede ser consumida directamente y no necesita ser degradada a componentes más pequeños para ser utilizada por el metabolismo del hongo (Figura 20).



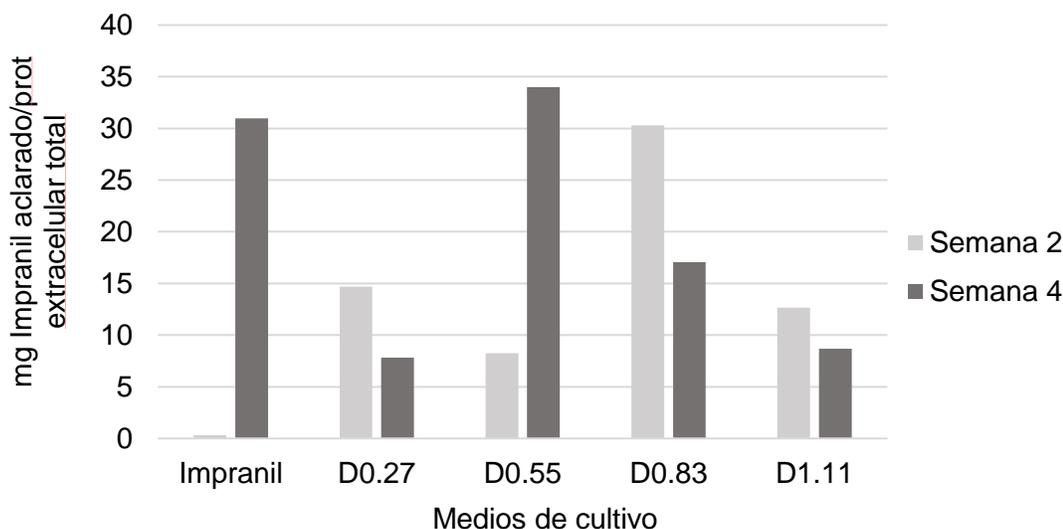
**Figura 20. Proteína extracelular de cultivos de A3.I.1 a 2 y 4 semanas en MM-Impranil y MM-dextrosa por mg de biomasa.** Se eliminó el micelio y el Impranil remanente y se concentró la proteína del sobrenadante por ultrafiltración. La proteína se midió por Bradford. Impranil, MM-Impranil (0.5%); D, MM-dextrosa. Los números representan las concentraciones en mM de dextrosa que se probaron. Cultivo estático a 30 °C. Inóculo, 80 mg de micelio de precultivo en PDB de 7 días a 30 °C, n=2.

La actividad específica de “Impranilasa” es muy semejante en micelio cultivado en MM-Impranil y micelio cultivado en las distintas concentraciones de MM-dextrosa, cuantificado a la cuarta semana de cultivo; aunque en la segunda semana las actividades son variables, sin una tendencia dependiente de la concentración de dextrosa en el medio (Figura 21).



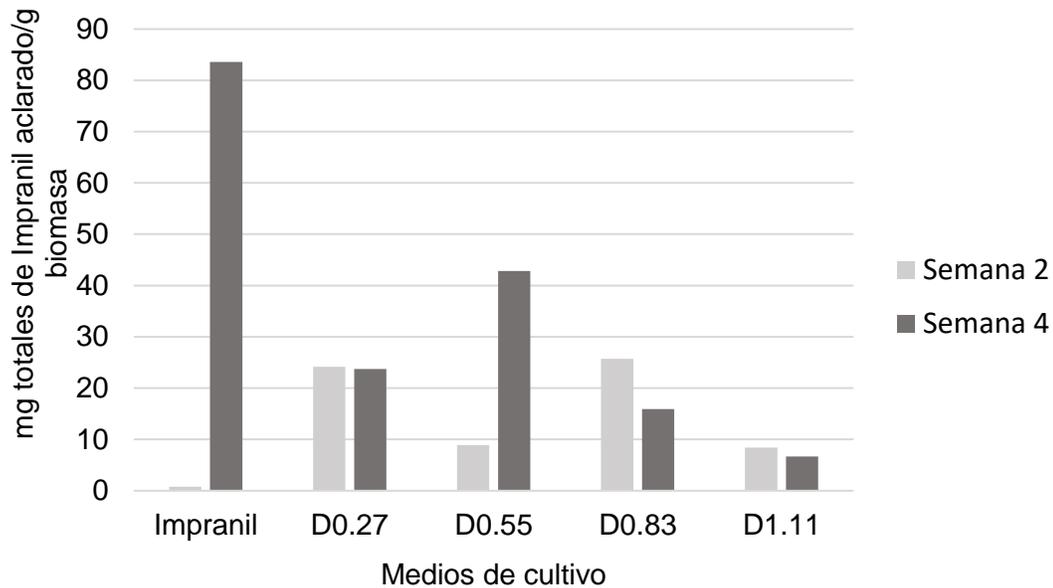
**Figura 21. Actividad específica de “Impranilasa” en el SN de cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil y MM-dextrosa.** La actividad “Impranilasa” se midió por espectrofotometría a una  $Abs_{600nm}$ . Impranil, MM-Impranil; (0.5%); D, MM-dextrosa. Los números representan las concentraciones de dextrosa en mM que se probaron. Cultivos estáticos a 30 °C. Inóculo, 80 mg de micelio de precultivo en PDB de 7 días a 30°C, n=2.

Si bien la actividad específica es similar en todos los cultivos en la semana 4 (semana antes de la mayor actividad), en medio Impranil hay mayor cantidad de proteína extracelular por cultivo, en comparación con los cultivos con MM-dextrosa. Al calcular la cantidad de Impranil (mg) aclarado por µg de proteína extracelular total se observó que la actividad degradadora de Impranil es mayor en proteínas extracelulares del cultivo en MM-Impranil que en cultivos en MM-dextrosa; con excepción del cultivo en MM-dextrosa al 0.55 mM en el cual, la cantidad de mg Impranil aclarado por µg de proteína total del sobrenadante es ligeramente mayor que en MM-Impranil (Figura 22).



**Figura 22. Impranil aclarado por proteína total en el SN de cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil y MM-dextrosa.** La cantidad (mg) de Impranil aclarado por  $\mu\text{g}$  de proteína total del SN fue calculada a partir de la actividad específica y la cantidad de proteína en el cultivo. Impranil, MM-Impranil (0.5%); D, medio con dextrosa. Los números representan las concentraciones en mM que se probaron. Cultivos estáticos a 30 °C. Inóculo, 80 mg de micelio de precultivo en PDB de 7 días a 30°C, n=2.

La biomasa generada en cultivos con MM-dextrosa fue mayor en comparación con cultivos en MM-Impranil. Considerando la biomasa por cultivo, la relación de mg Impranil aclarado por g de biomasa generada es mayor en cultivos con MM-Impranil en comparación con las todas las concentraciones en MM-dextrosa en cultivos de 4 semanas (Figura 23). Sin embargo, en cultivos de 2 semanas de crecimiento la actividad “Impranilasa” ya se expresaba en todos los cultivos en MM-dextrosa, mientras que en el cultivo en MM-Impranil era muy bajo. Esto indica que el hongo creciendo en Impranil, a la semana 2, produce muy poca actividad degradadora de Impranil, quizá por su lento desarrollo.

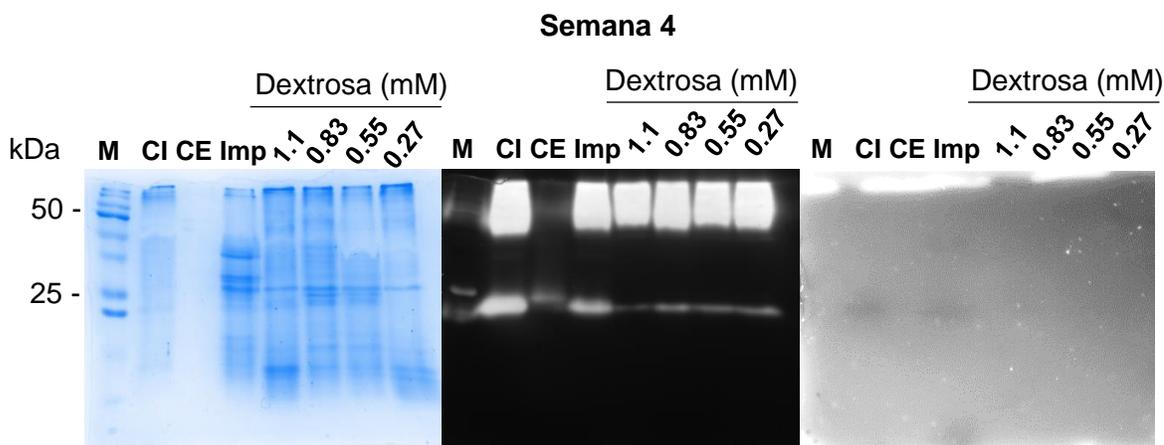


**Figura 23. Impranil aclarado por gramo de biomasa de cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil y MM-dextrosa.** Esta relación se calculó a partir de los mg totales de Impranil aclarado (considerando proteína extracelular total) y biomasa total (g). Impranil, MM-Impranil (0.5%); D, medio con dextrosa. Los números representan las concentraciones en mM que se probaron. Cultivos estáticos a 30 °C. Inóculo, 80 mg de micelio de precultivo en PDB de 7 días a 30 °C, n=2.

Para confirmar que la actividad “Impranilasa” observada en estos análisis se debía a la cutinasa de 23 kDa, previamente identificada en nuestro laboratorio (Álvarez-Barragán, 2016), se realizaron zimografías para actividad esterasa e “Impranilasa” en concentrados de proteína extracelular de cuatro semanas. En el zimograma para esterasa se observó mayor actividad en MM-Impranil que en MM-dextrosa. Mientras que en el zimograma para “Impranilasa” el aclaramiento *in situ* solo se observa en el concentrado de MM-Impranil (Figura 24).

Analizando estos resultados se observa una inconsistencia entre la cuantificación de la degradación medida espectrofotométricamente y los resultados observados en estos geles. La cuantificación espectrofotométrica mostró un 50% menos de actividad específica en MM-dextrosa comparado con MM-Impranil por lo que se esperaría ver, en los zimogramas de proteínas de MM-dextrosa, bandas con menos señal de aclaramiento, pero no se observó ni rastro de señal. Esto puede ser debido a que esas cantidades de

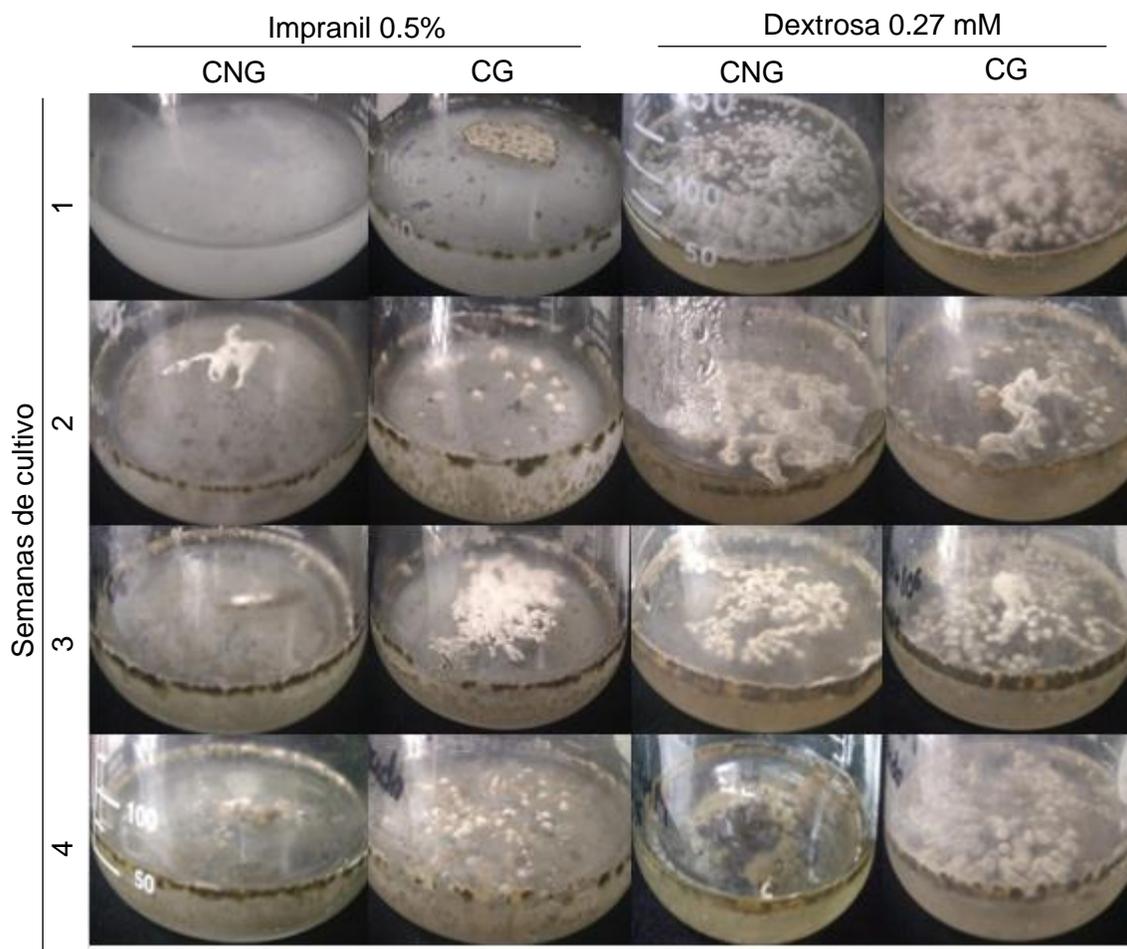
proteína, 50% menores, podrían estar abajo del umbral de detección del zimograma. Otra razón podría ser que la actividad aclaradora en MM-dextrosa dependiera de la actividad de otras proteínas que no se revelan en el zimograma por no haberse podido renaturalizar *in situ* después del SDS-PAGE.



**Figura 24. Análisis de proteínas extracelulares de cultivos de 4 semanas en MM-Impranil y diferentes concentraciones de MM-dextrosa.** Zimografía de actividad esterasa empleando como sustrato 1.6 mM de 4-metilumbeliferil butirato; zimografía de actividad “Impranilasa” en gel de agarosa acoplado con Impranil 1%; Control positivo esterasa CE, 4U Lipasa de *Pseudomonas fluorescens*; control positivo “Impranilasa” CI, 15 µg de proteína extracelular de cultivo en MM-Impranil de 5 semanas. Imp, MM-Impranil (0.5%). SDS-PAGE 15%, se cargaron 15 µg de proteína por carril de cada condición. Cultivos estáticos a 30 °C. Inóculo, 80 mg de micelio de precultivo en PDB de 7 días a 30°C.

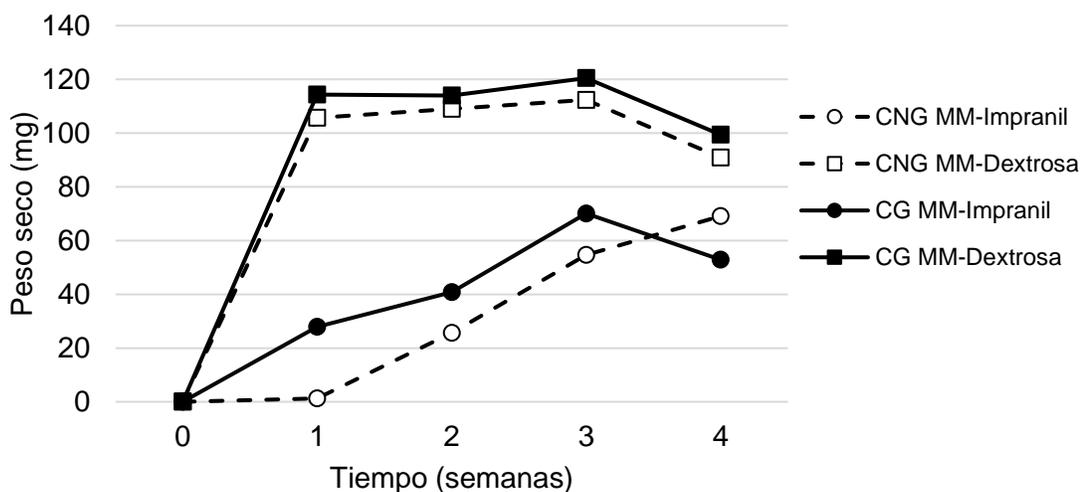
Estos resultados permitieron determinar que MM-dextrosa 0.27 mM es el medio donde se genera una cantidad de biomasa comparable a la que se genera en MM-Impranil al 0.5%. Sin embargo, cuando se emplea micelio como inóculo se detecta actividad “Impranilasa” en las proteínas extracelulares, además de que se manipula más el inóculo, lo que genera mayor riesgo de contaminación. Por esta razón, se realizó otro análisis curso-temporal, en el que se inoculó con conidias para homogenizar el tipo de inóculo y poder realizar comparaciones correctas entre lotes de semanas distintas.

Se probaron dos tipos de inóculos: 10 millones de conidias germinadas (CG) y 10 millones de conidias no germinadas (CNG), en MM-Impranil 0.5% y MM-dextrosa 0.27 mM por cuatro semanas de cultivo. En general, se observó un menor crecimiento de A3.I.1 en MM-Impranil 0.5% que en MM-dextrosa 0.27 mM y hubo mayor crecimiento en ambos medios cuando se inoculaba con CG (Figura 25).



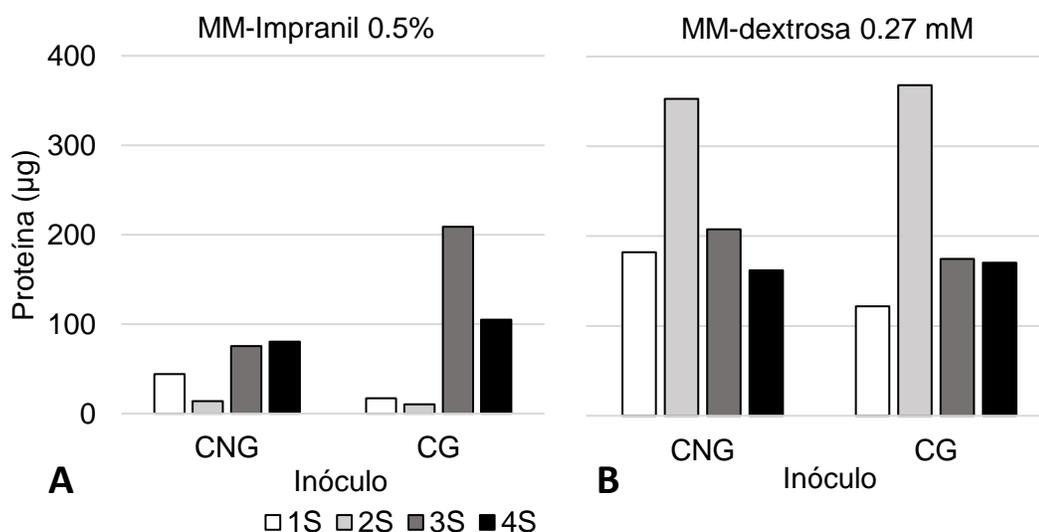
**Figura 25. Comparación del crecimiento de *C. tenuissimum* A3.I.1 en MM-Impranil y MM-dextrosa 0.27 mM utilizando diferentes tipos de inóculo.** Cada matraz fue inoculado con 10 millones de conidias. CNG: conidias no germinadas, CG: conidias germinadas (12 h en MM-dextrosa 0.27 mM). Se incubó a 30 °C estático por 4 semanas.

Esta observación se comprobó con la determinación del peso seco de la biomasa, se produjo más del doble de biomasa en MM-dextrosa 0.27 mM que en MM-Impranil 0.5%. La biomasa de cultivos en MM-dextrosa 0.27 mM fue semejante, tanto cuando se emplearon CG como CNG para todos los tiempos analizados, debido probablemente a que la dextrosa es una fuente de carbono de fácil asimilación lo que genera un rápido desarrollo del tejido miceliar (Paulsen y Holmes, 2014). En cambio, en MM-Impranil 0.5%, se observó un retraso de una semana en el crecimiento al inicio de la fase exponencial cuando se inocularon CNG, comparado con CG; quizá debido a que las estas últimas ya han activado su metabolismo y obtenido el agua y nutrientes necesarios para empezar su fase de crecimiento miceliar (Paulsen y Holmes, 2014) (Figura 26).



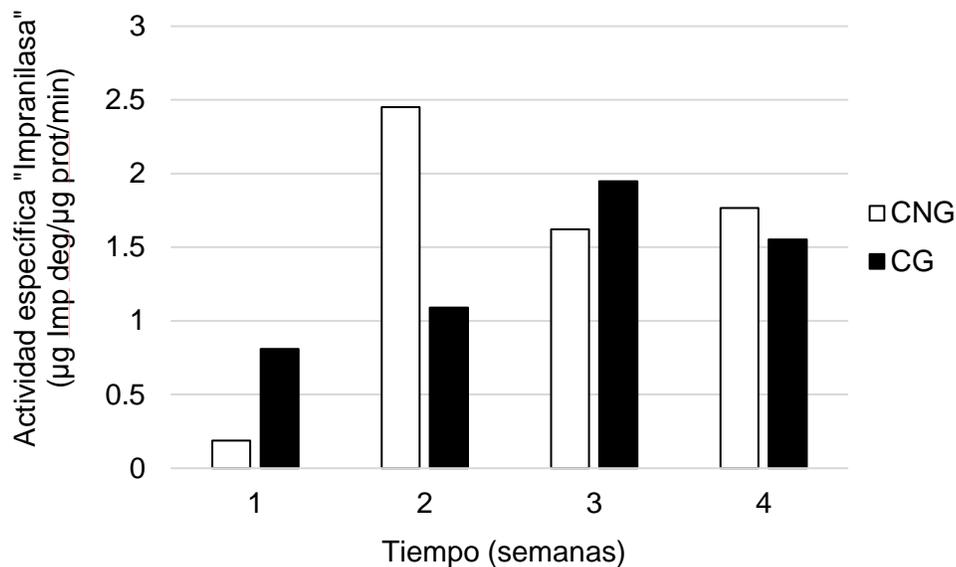
**Figura 26. Comparación de la biomasa producida inoculando con conidias no germinadas (CNG) y conidias germinadas (CG) en cultivos con MM-Impranil y MM-dextrosa 0.27 mM.** La biomasa se determinó por peso seco. Cultivos estáticos a 30 °C. Inóculo, 10 millones de conidias, la germinación es por 12 h en MM-dextrosa 0.27 mM. n=2.

La cantidad de proteína extracelular generada en cultivos con MM-Impranil, inoculado con CG fue mayor respecto a cuando se inoculaba con CNG en la tercera y cuarta semana. Por el contrario, en MM-dextrosa no hubo diferencias entre inocular con CG y CNG y la mayor cantidad de proteína extracelular se observó en la segunda semana (Figura 27).



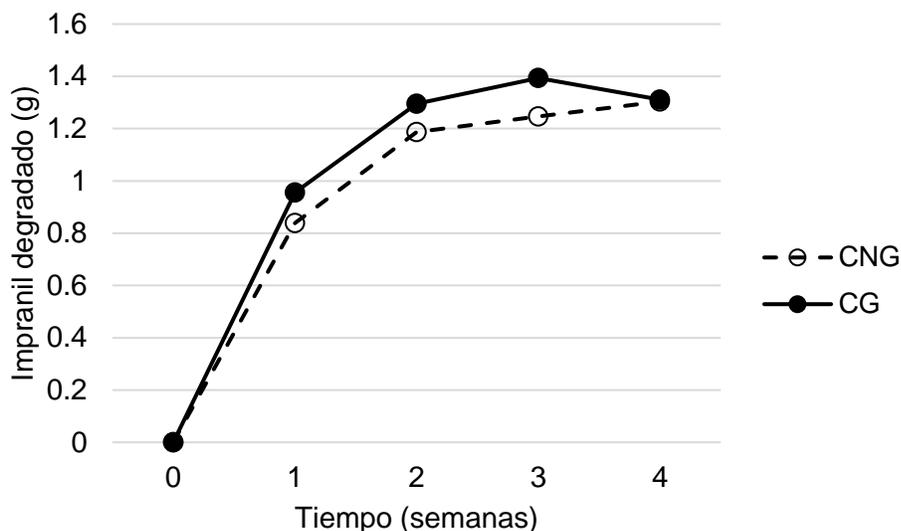
**Figura 27. Proteína extracelular de cultivos de A3.1.1 de 1 a 4 semanas en MM-Impranil y MM-dextrosa.** A) Proteína total en MM-Impranil; B) Proteína total en MM-dextrosa. Se eliminó el micelio y el Impranil remanente y se concentró la proteína del sobrenadante por ultrafiltración. La proteína se midió por Bradford. CNG, conidias no germinadas; CG, conidias germinadas; 1-4S, semanas de cultivo. Cultivo estático a 30 °C. Inóculo, 10 millones de conidias. n=2.

Cuando se midió la actividad “Impranilasa” utilizando 6 µg de proteína extracelular, en MM-dextrosa no se detectó actividad, mientras que en los cultivos con MM-Impranil se detectó durante todo el experimento, observándose la mayor actividad en la segunda semana en cultivos inoculados con CNG; mientras que en cultivos con CG, la mayor actividad fue en la tercera semana. Esta diferencia podría ser debida al tiempo que tardan las conidias germinadas en MM-dextrosa 0.27 mM en adaptarse al MM-Impranil (Figura 28).



**Figura 28. Actividad específica de “Impranilasa” en proteínas extracelulares de cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil 0.5%.** La actividad “Impranilasa” se midió por espectrofotometría a una  $Abs_{600nm}$  utilizando 6 µg de proteína por ensayo. Cultivos estáticos a 30 °C. CNG, conidias no germinadas; CG, conidias germinadas. Inóculo, 10 millones de conidias. n=2

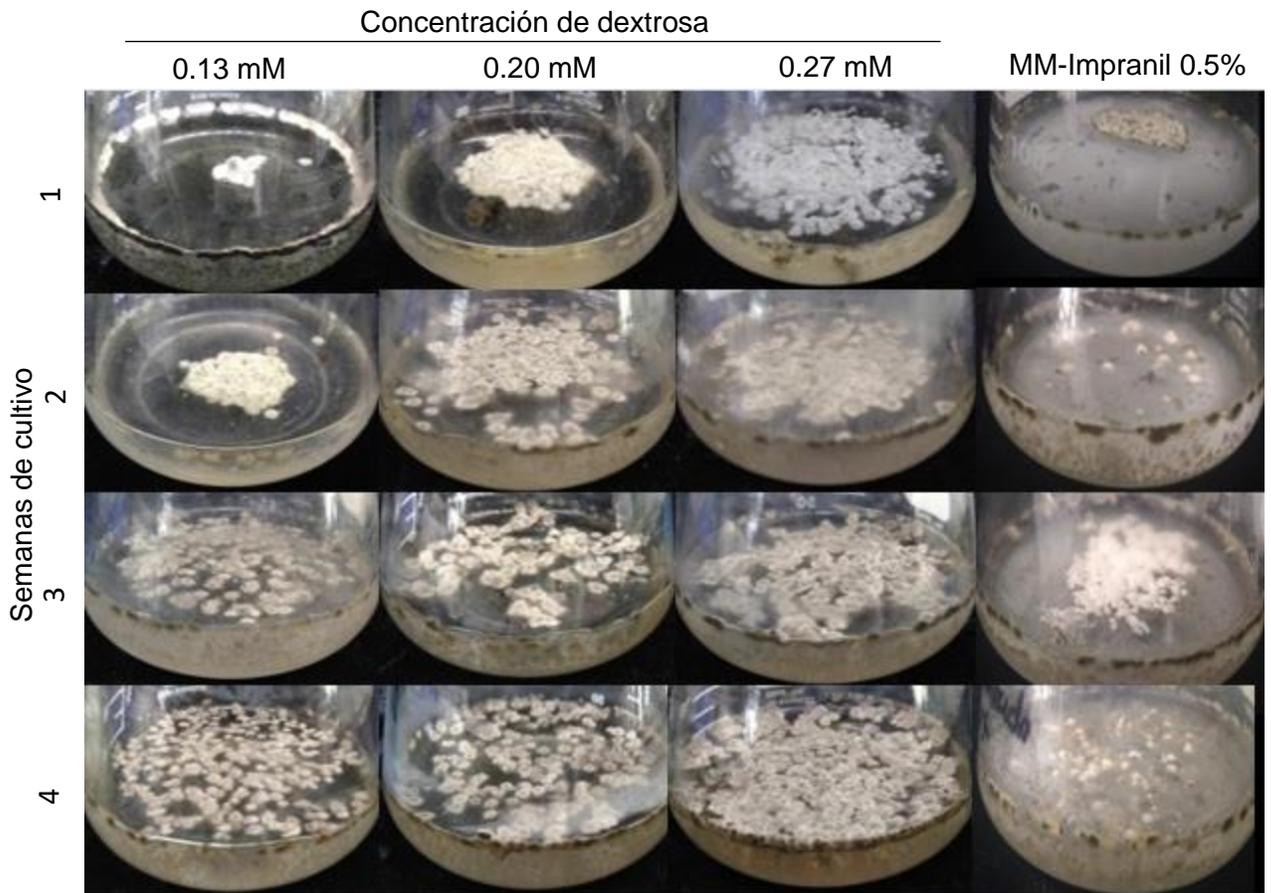
Aunque dependiendo del tipo de inóculo cambia la semana de máxima expresión de la actividad “Impranilasa”, la cantidad de Impranil degradado por cultivo es la misma para ambos tipos de inóculo (Figura 29); por lo que se seleccionó como inóculo de los siguientes experimentos a las conidias germinadas, ya que éstas producen mayor cantidad de biomasa y proteína en MM-Impranil 0.5% y no hay diferencia en la degradación del polímero.



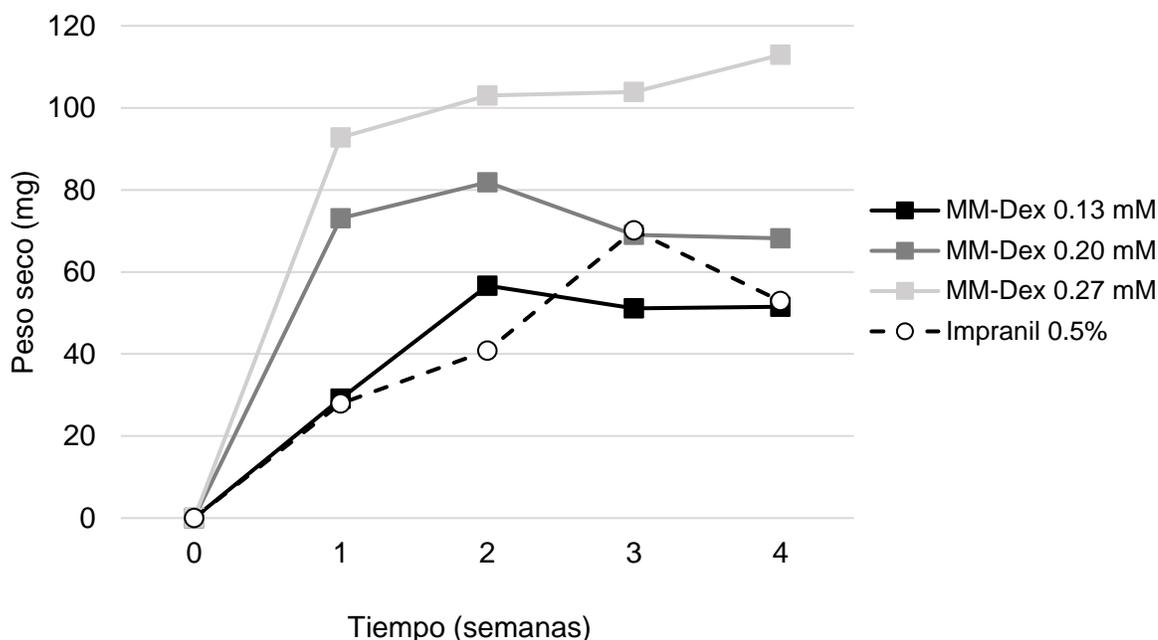
**Figura 29. Impranil degradado en cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil 0.5%.** Cuantificación por espectrofotometría a una  $Abs_{600nm}$  comparando contra un control (MM-Impranil 0.5% sin inocular) incubado bajo las mismas condiciones que el cultivo respectivo a la semana de crecimiento. Cultivos estáticos a 30 °C. CNG, conidias no germinadas; CG, conidias germinadas. Inóculo, 10 millones de conidias. n=2

Debido a que se generó mayor cantidad de biomasa en MM-dextrosa 0.27 mM que en MM-Impranil 0.5% (Figura 26), se buscó una concentración de dextrosa que produjera una cantidad equivalente de la biomasa producida en MM-Impranil. Para ello se evaluaron concentraciones de dextrosa menores a 0.27 mM (0.13, 0.20 y 0.27 mM) analizando los cultivos por cuatro semanas.

El crecimiento de A3.I.1 en MM-dextrosa inoculado con CG aumentó conforme a la concentración de dextrosa en el medio (Figura 30). La producción de biomasa de cultivos en MM-dextrosa 0.13 mM fue similar a la producida en cultivos con MM-Impranil 0.5% (Figura 31), por lo que se eligió esta concentración de dextrosa como la condición control en la que se cultivará A3.I.1 para el análisis transcriptómico.

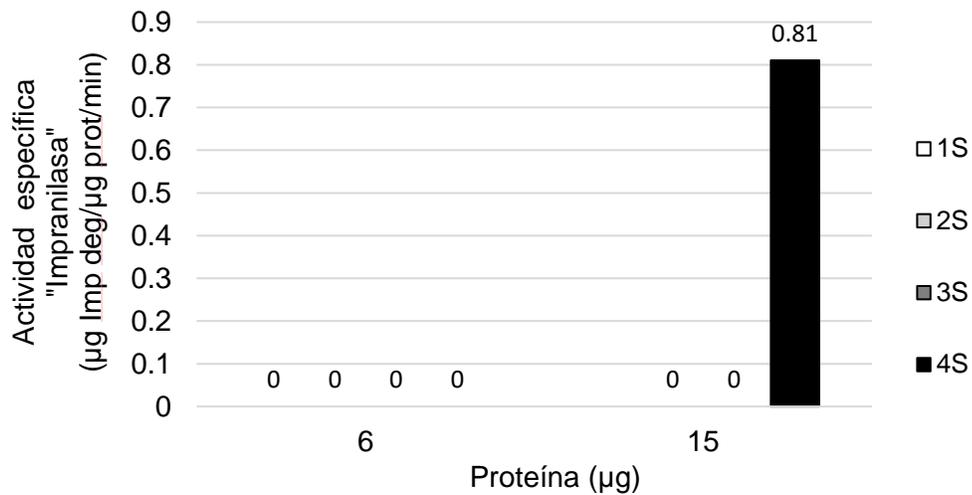


**Figura 30. Comparación del crecimiento de *C. tenuissimum* A3.I.1 en MM-dextrosa 0.13, 0.20 y 0.27 mM.** Cada matraz fue inoculado con 10 millones de conidias germinadas (12 h en MM-Dextrosa 0.27 mM). Se incubó a 30 °C sin agitación por 4 semanas.



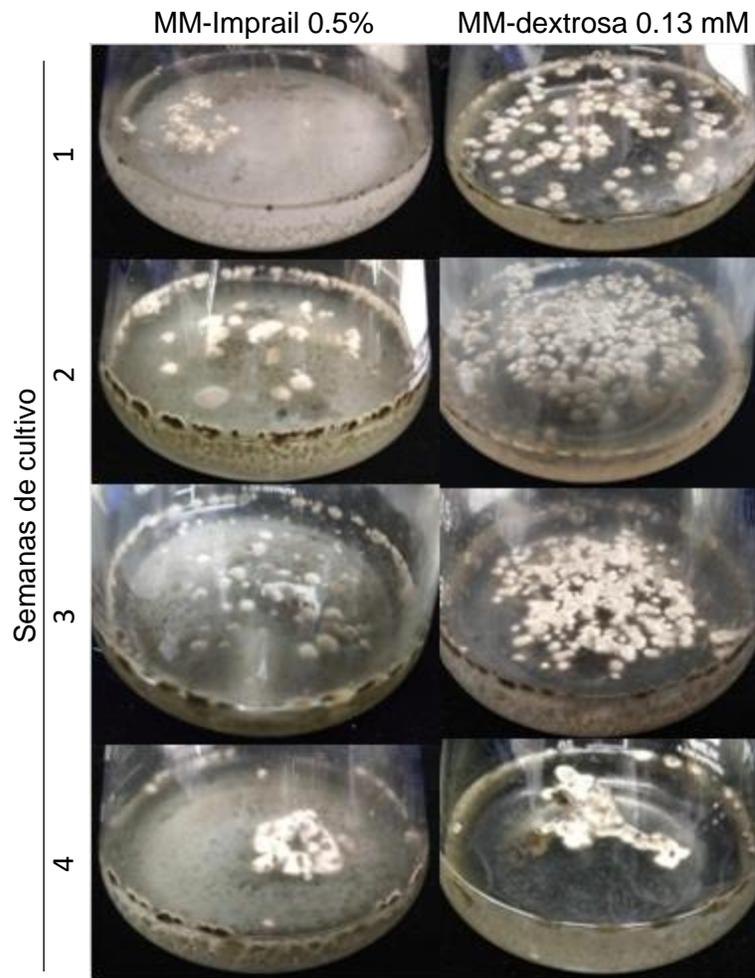
**Figura 31. Biomasa de A3.I.1 cultivado en MM-dextrosa 0.13, 0.20 y 0.27 mM y en MM-Impranil 0.5%.** Peso seco de la biomasa generada por semana de cultivo con conidias germinadas. Cultivos estáticos a 30 °C. Inóculo, 10 millones de conidias, la germinación es por 12 h en MM-Dextrosa 0.27 mM. n=2

Congruente con los resultados anteriores, no se detectó actividad “Impranilasa” en proteína extracelular en cultivos con ninguna de las concentraciones de dextrosa, utilizando 6 µg de proteína para el ensayo. Para asegurar que la ausencia de actividad “Impranilasa” en los cultivos con dextrosa no fuera debida a una baja cantidad de proteína empleada en el ensayo enzimático, se realizaron ensayos con 15 µg de proteína. Con esta cantidad de proteína en el ensayo se detectó actividad “Impranilasa” en la cuarta semana (0.81 µg Impranil degradado/µg proteína/min), pero no en las semanas previas, la cual fue 2.4 veces menor que la detectada en MM-Impranil 0.5% (1.95 µg Impranil degradado/µg proteína/min) (Figura 32).

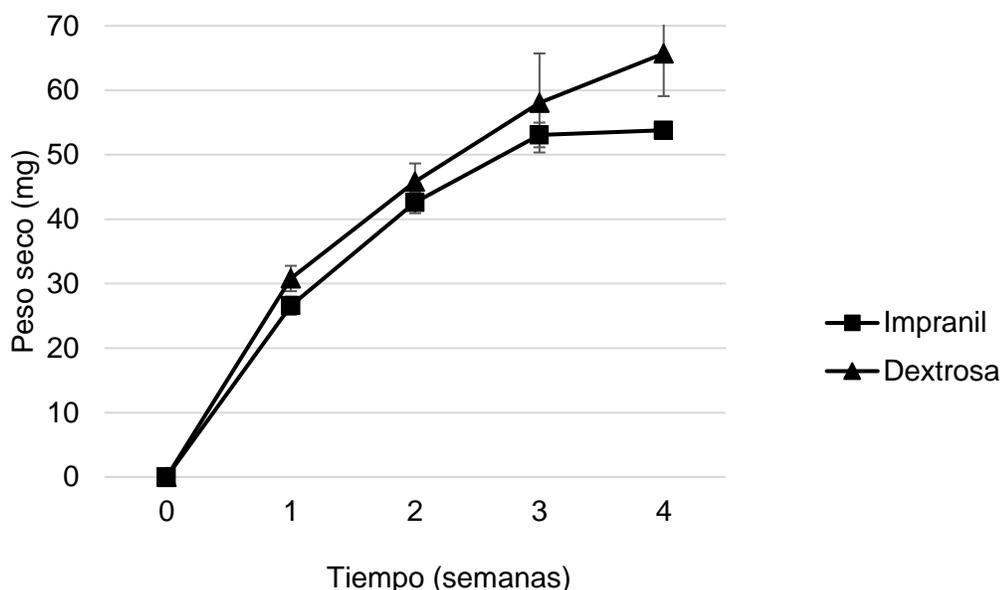


**Figura 32. Actividad específica de “Impranilasa” en proteínas extracelulares de cultivos de A3.I.1 en MM-Dextrosa 0.13 mM.** La actividad “Impranilasa” se midió por espectrofotometría a una  $Abs_{600nm}$  utilizando 15 µg de proteína por ensayo n=2. 1S-4S: semanas de cultivo. Cultivos estáticos a 30 °C, inoculados con 10 millones conidias germinadas. No pudo medirse la actividad con 15 µg de proteína a la semana 1 por falta de proteína.

Para comprobar este comportamiento, posteriormente se realizó un curso temporal por triplicado, utilizando para la condición control cultivos de dos semanas en MM-dextrosa 0.13 mM y para la condición de interés cultivos de dos semanas en MM-Impranil inoculado ambos con 10 millones de conidias germinadas. El crecimiento del hongo es similar a los resultados anteriores aumentan conforme aumentan las semanas de cultivo (Figura 33), la generación de biomasa es similar durante las primeras tres semanas de cultivo; siendo mayor en MM-dextrosa 0.13 mM a la cuarta semana, la segunda semana de crecimiento es en la que la cantidad de biomasa generada es equivalente en ambos medios de cultivo (Figura 34).

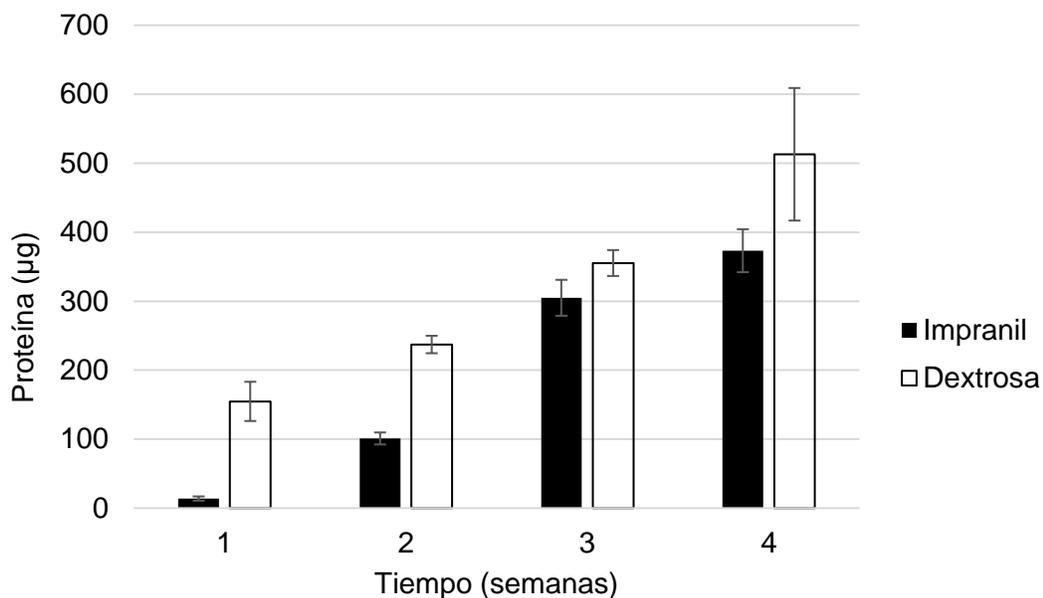


**Figura 33. Comparación del crecimiento de *C. tenuissimum* A3.I.1 en MM-Imprail 0.5% y MM-dextrosa 0.13 mM.** Cada matraz fue inoculado con 10 millones de conidias germinadas (12h en MM-dextrosa 0.27 mM). Se incubó a 30 °C estático por 4 semanas.

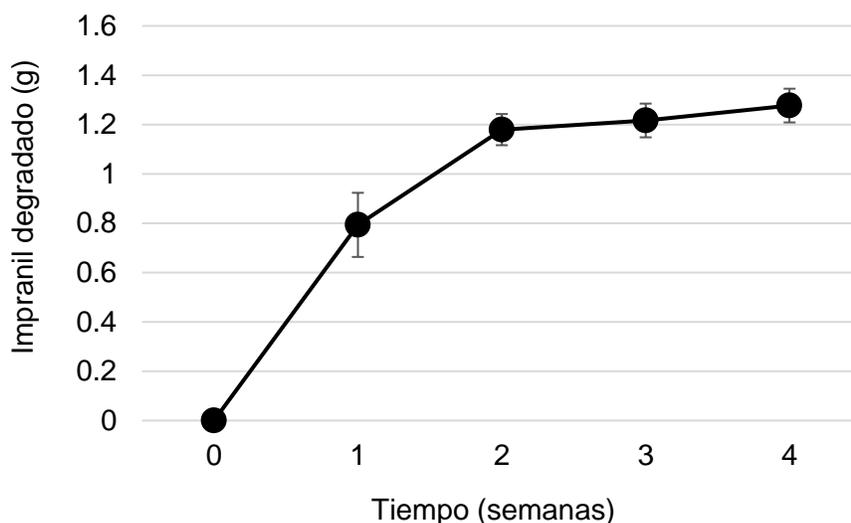


**Figura 34. Biomasa en peso seco de A3.I.1 cultivado en MM-Impranil 0.5% y en MM-dextrosa 0.13 mM.** Impranil, MM-Impranil (0.5%); Dextrosa, MM-dextrosa 0.13 mM. Cultivos estáticos a 30 °C por 4 semanas, inoculados con 10 millones conidias germinadas (12h en MM-Dextrosa 0.27 mM), n=3.

La cantidad de proteína producida por cultivo es mayor en cultivos en MM-Dextrosa 0.13 mM, en comparación con la producida en cultivos con MM-Impranil 0.5%. En ambos aumenta conforme aumentan las semanas de crecimiento (Figura 35). Se calculó la cantidad de Impranil degradado por cultivo y se observó que durante las primeras dos semanas se degrada la mayor parte del Impranil hasta en un 70% del total en el cultivo (Figura 36), a pesar de que en estas semanas la producción de proteína no supera los 300 µg por cultivo. Esto podría sugerir que la mayoría de las proteínas expresadas durante las primeras dos semanas son proteínas involucradas en la degradación del Impranil.

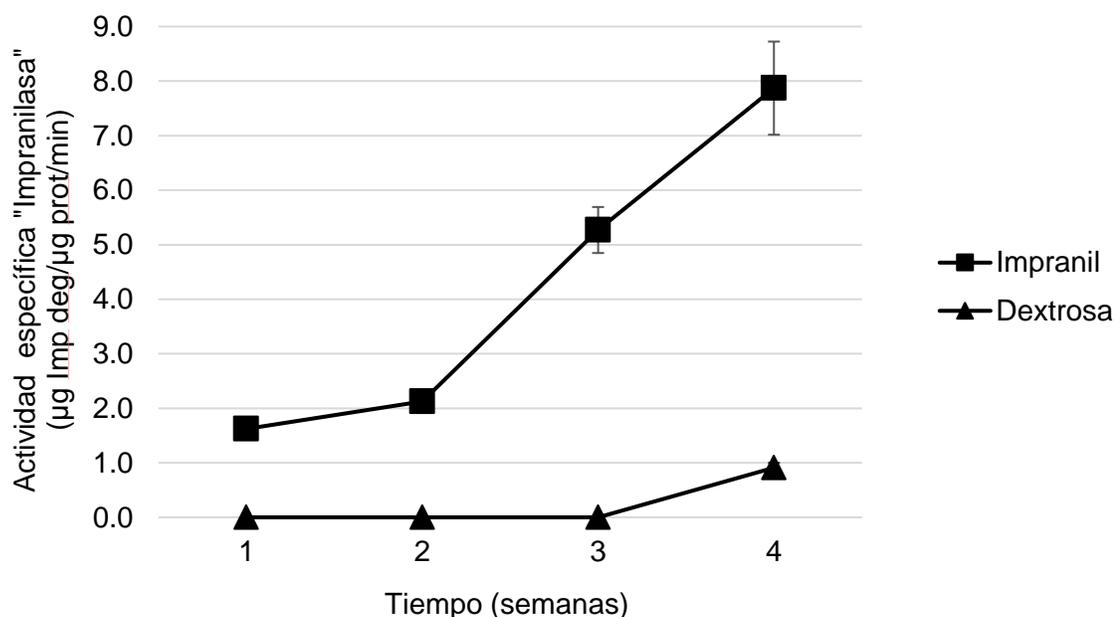


**Figura 35. Proteína extracelular de cultivos de A3.I.1 de 1 a 4 semanas en MM-Impranil 0.5% y en MM-dextrosa 0.13 mM.** Impranil, MM-Impranil (0.5%); Dextrosa, MM-dextrosa 0.13 mM. Se eliminó el micelio y el Impranil remanente y se concentró la proteína del sobrenadante por ultrafiltración. La proteína se midió por Bradford. Cultivos estáticos a 30 °C por 4 semanas, inoculados con 10 millones conidias germinadas (12h en MM-Dextrosa 0.27 mM), n=3.



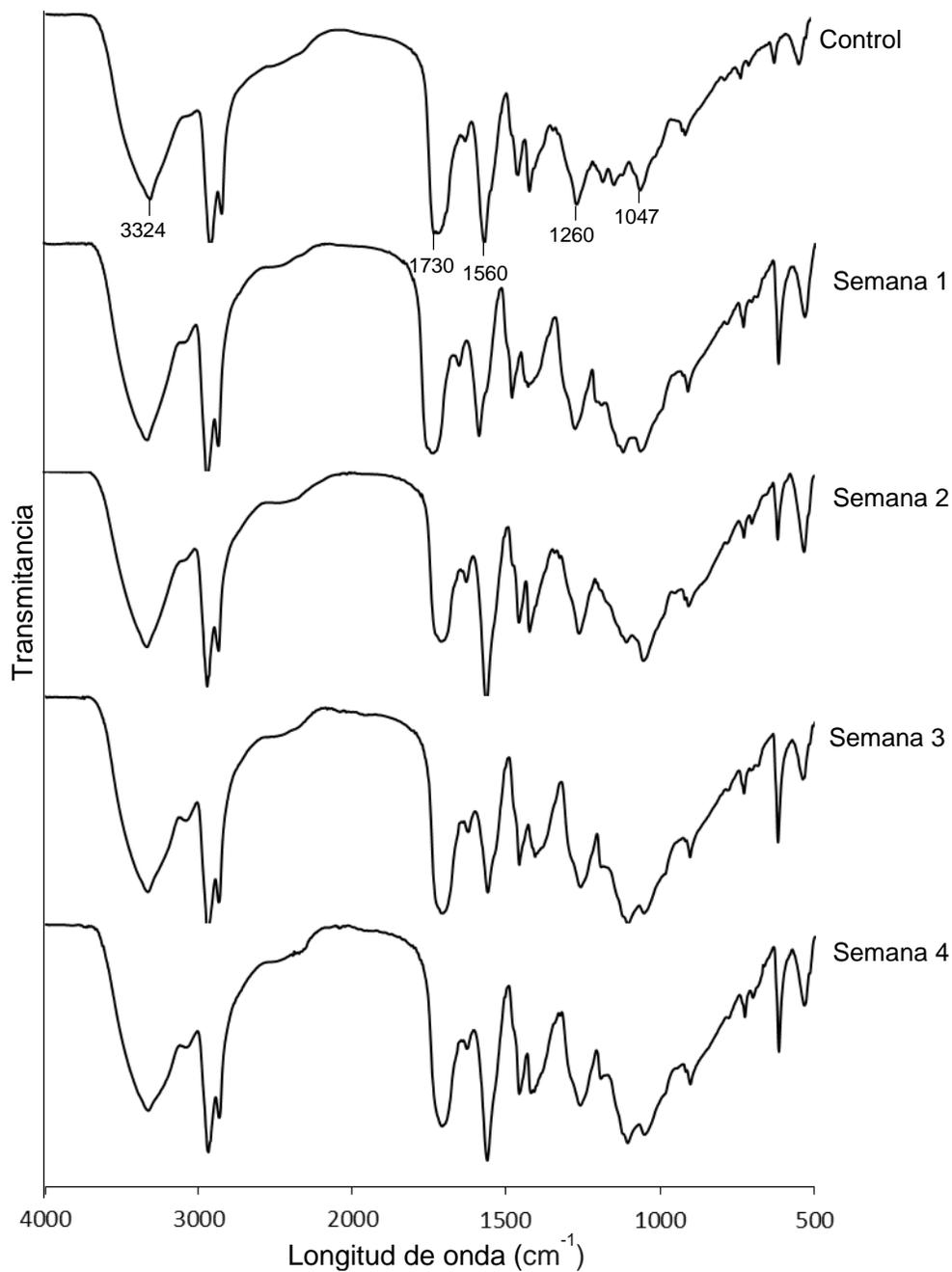
**Figura 36. Impranil degradado en cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil 0.5% inoculado con conidias germinadas.** Cuantificación por espectrofotometría a una  $Abs_{600nm}$  comparando contra un control (MM-Impranil 0.5% sin inocular) incubado bajo las mismas condiciones que el cultivo respectivo a la semana de crecimiento. Cultivos estáticos a 30 °C por 4 semanas, inoculados con 10 millones conidias germinadas (12 h en MM-dextrosa 0.27 mM), n=3.

La actividad "Impranilasa" solo se detecta en concentrados proteicos provenientes de MM-Impranil, esta actividad aumenta conforme aumentan las semanas de cultivo (Figura 37). Debido a que solo se detectó actividad "Impranilasa" en concentrados de proteínas extracelulares provenientes de cultivos de cuatro semanas en MM-Dextrosa 0.13 mM utilizando 15  $\mu\text{g}$  de proteína y no así en concentrados de cultivos con dos semanas de crecimiento. Se estableció que la condición diferencial serían cultivos de dos semanas de crecimiento en MM-Impranil 0.5% y MM-dextrosa 0.13 mM respectivamente, inoculando con 10 millones de conidias germinadas. Bajo estas condiciones de cultivo no se detecta actividad "Impranilasa" en MM-dextrosa 0.13 mM ni duplicando la cantidad de proteína empleada en el ensayo, en concentrados de proteínas extracelulares de MM-Impranil 0.5% se presenta una actividad específica de 2.1  $\mu\text{g}$  Impranil degradado/ $\mu\text{g}$  proteína/minuto, además en esta semana se degrada el 69% del Impranil total en el cultivo.



**Figura 37. Actividad específica de "Impranilasa" en proteínas extracelulares de cultivos de A3.1.1 cultivado en MM-Impranil 0.5% y en MM-dextrosa 0.13 mM.** La actividad "Impranilasa" se midió por espectrofotometría a una  $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ . Cultivos estáticos a 30 °C por 4 semanas, inoculados con 10 millones conidias germinadas (12h en MM-dextrosa 0.27 mM), n=3.

Con el objetivo de comprobar que el Impranil estaba siendo afectado químicamente por la actividad biológica de A3.I.1., se analizaron sobrenadantes de cultivos a diferentes semanas de crecimiento del hongo, empleando espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier. Los grupos funcionales característicos del PU son:  $3324\text{ cm}^{-1}$  (alcohol/aminas),  $1730\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento del enlace C=O de grupo uretano o éster),  $1560\text{ cm}^{-1}$  (flexión del N-H + estiramiento del C-N de urea/uretano),  $1260\text{ cm}^{-1}$  (flexión de N-H y vibración de C-N en uretano),  $1047\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento del enlace C-O-C del uretano) (McCarthy *et al.*, 1997). En la segunda semana de crecimiento la señal del estiramiento del enlace C=O del grupo uretano o éster ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ) disminuyó considerablemente, así como el pico de la flexión del N-H o vibración del CN en el grupo uretano ( $1560\text{ cm}^{-1}$ ), aumentado de nuevo a la semana 3, para mantenerse constante a la semana 4 (Figura 38). Estos resultados muestran que a la segunda semana de crecimiento la actividad del hongo generó cambios en los grupos funcionales del Impranil, lo que refleja su degradación. Por lo tanto, realizar el análisis de expresión diferencial a la segunda semana de crecimiento del hongo aportará información importante acerca de las proteínas que podrían estar actuando durante el proceso de biodegradación del PU.



**Figura 38. Espectros de FTIR del sobrenadante de cultivos de A3.I.1 en MM-Impranil 0.5% a diferentes semanas de crecimiento.** Control (MM-Impranil 0.5% sin inocular). Cultivos estáticos a 30 °C por 4 semanas, inoculados con 10 millones conidias germinadas (12 h en MM-dextrosa 0.27 mM), se cosecharon y se filtraron en papel Whatman™ No. 41, se secaron a 37 °C y se analizaron por espectroscopía de FTIR (n=3).

## **8.5 Identificación de cutinasas degradadoras de Impranil en A3.I.1 por expresión diferencial de genes durante el crecimiento del hongo en Impranil**

Por trabajos previos en nuestro laboratorio, hemos demostrado que las cutinasas están involucradas en la degradación del poliéster poliuretano. En este trabajo se identificaron 13 genes de cutinasas putativas en el genoma de A3.I.1, de los cuales por similitud con cutinasas degradadoras de poliésteres sintéticos, cuatro cutinasas podrían corresponder a cutinasas involucradas en la degradación del Impranil. Con el objetivo de identificar a las cutinasas involucradas en la degradación del Impranil se decidió realizar un análisis transcriptómico de expresión diferencial, para saber qué genes de cutinasas están presentes en el aclaramiento del Impranil.

La identificación de genes involucrados en la actividad aclaradora de Impranil mediante el análisis de transcritos, implica la identificación de las condiciones en las que se detecte la expresión diferencial de genes. La condición de interés se definió como el crecimiento del hongo en MM-Impranil 0.5%; para la extracción de RNA se utilizó micelio de dos semanas de crecimiento inoculado con 10 millones de conidias germinadas. El control de este análisis fue micelio de dos semanas de crecimiento en MM-dextrosa 0.13 mM, en donde no se detectó actividad "Impranilasa".

La extracción de RNA total se hizo por triplicado. Para cada condición se utilizó el reactivo TRIzol®, basado en la extracción con fenol y tiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). Se obtuvieron más de 40 µg de RNA total por muestra biológica con relaciones  $Abs_{260}/Abs_{280}$  y  $Abs_{260}/Abs_{230} > 2.0$  (Tabla 14). Las muestras de RNA fueron tratadas con DNAsa para eliminar contaminación con DNA. Después del tratamiento con DNAsa hubo una pérdida de un 80%, lo cual indica que la preparación de RNA estaba contaminada con DNA. Las relaciones de calidad  $Abs_{260}/Abs_{280}$  y  $Abs_{260}/Abs_{230}$  no se vieron afectadas después del tratamiento con DNAsa (Tabla 15).

**Tabla 14. Parámetros de calidad de RNA total de *Cladosporium tenussimum* A3.I.1.**

Tratamiento	Concentración (ng/μL)	Abs <sub>260</sub> /Abs <sub>280</sub>	Abs <sub>260</sub> /Abs <sub>230</sub>	Rendimiento (ng RNA/ mg biomasa)	Total de RNA (μg)
D1	1727.7	2.16	2.28	0.43	86
D2	1465.6	2.15	2.16	0.36	73
D3	1380	2.16	2.45	0.33	69
I1	463.1	2.12	1.99	0.43	46
I2	405.4	2.11	1.98	0.40	40.5
I3	418.7	2.12	2.04	0.41	41.5

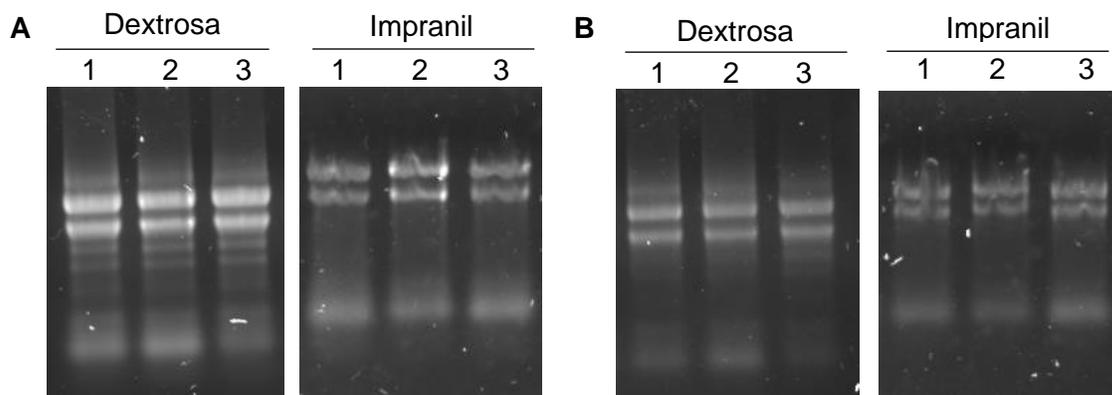
D, Dextrosa 0.13 mM; I, Impranil 0.5 %; 1-3, Repetición biológica.

**Tabla 15. Concentración y parámetros calidad de RNA total después del tratamiento con DNAsa.**

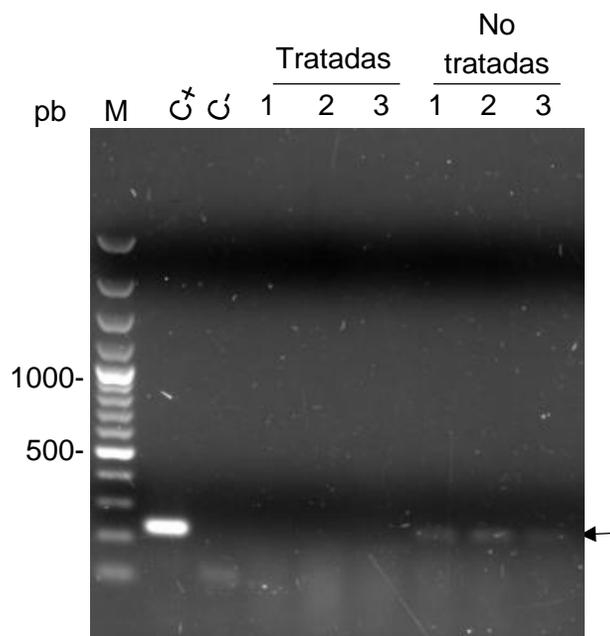
Tratamiento	Concentración (ng/μL)	Abs <sub>260</sub> /Abs <sub>280</sub>	Abs <sub>260</sub> /Abs <sub>230</sub>	Cantidad disponible (μg)
D1	346.7	2.08	2.26	17
D2	328.2	2.07	2.23	16
D3	291.8	2.08	2.24	14
I1	132.57	2.09	2.10	5.3
I2	110.7	2.11	2.18	5.5
I3	123.48	2.08	2.17	6.1

D, Dextrosa 0.13 mM; I, Impranil 0.5 %; 1-3, Repetición biológica.

Se verificó la integridad del RNA con y sin tratamiento con DNAsa en un gel de agarosa desnaturizante (Figura 38). Además, se realizó una PCR para amplificar un fragmento de 230 pb del gen de actina, para comprobar que no hubiera contaminación con DNA. Previamente se comprobó la efectividad del tratamiento con DNAsa realizando PCRs de RNA no tratado y tratado, solo se presentó amplificado en el RNA no tratado con DNAsa, por lo que al no aparecer amplificado después del tratamiento con DNAsa, se descarta que exista contaminación por DNA (Figura 39).

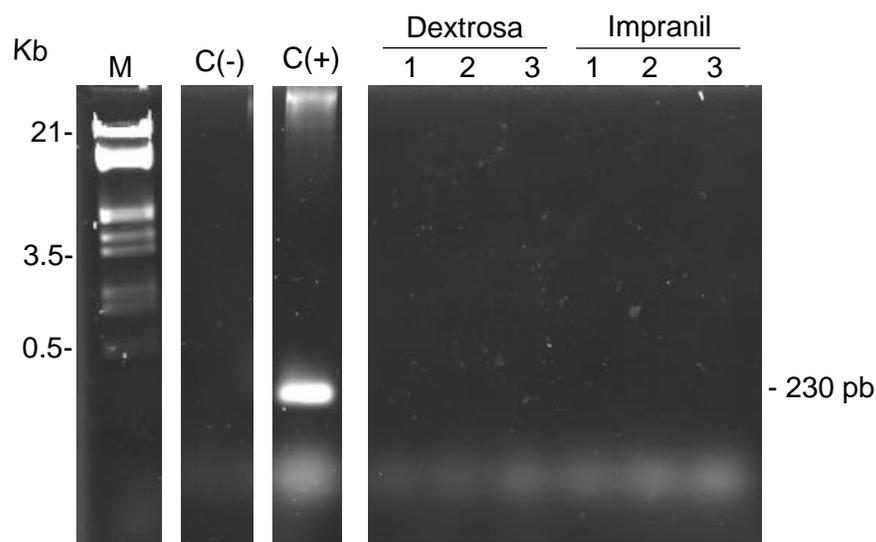


**Figura 38. RNAs de A3.I.1 enviado a secuenciar.** A) RNA extraído con Trizol; 1-3, Repetición biológica, B) RNA tratado con DNAsa; 1-3, repetición biológica. Gel de agarosa con formaldehído 1%, 500 µg de RNA por carril.



**Figura 39. Reacciones de PCR de muestras de RNA total tratadas y no tratadas con DNAsa.** Se emplearon primers para amplificar un segmento de 230 pb del gen de actina. M, GeneRuler 100 pb Plus (Thermo Scientific); C(+), 100 ng de gDNA A3.I.1; C(-), sin molde; 1-3, repetición biológica. Se emplearon 200 ng de molde en las PCRs con las muestras de RNA. La flecha señala el producto de la amplificación.

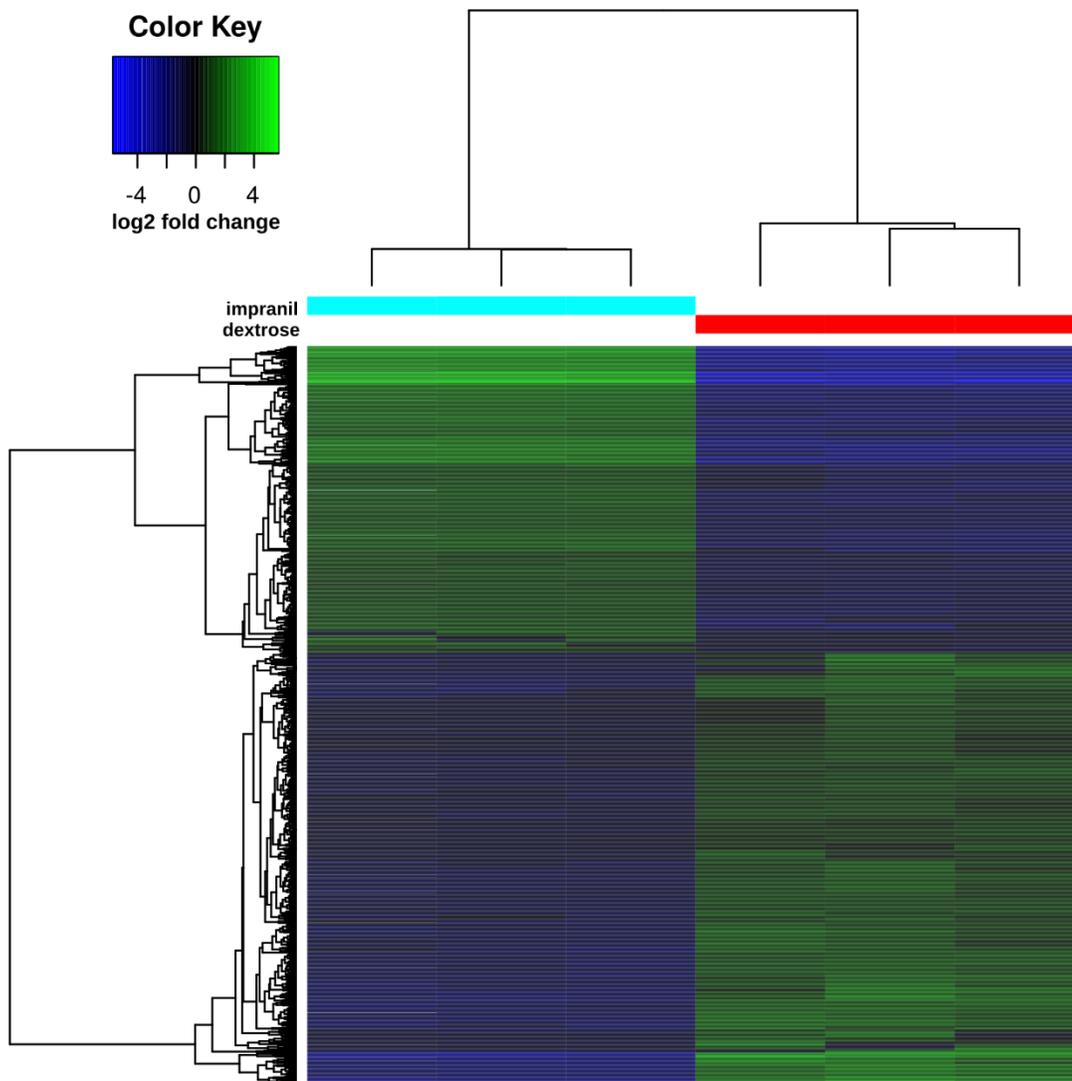
Posteriormente se realizó la PCR a las muestras que se enviaron a secuenciar, la amplificación fue negativa para todas las muestras tratadas con DNAsa (Figura 40). Las preparaciones de RNA total libre de DNA, de cada condición, por triplicado fueron enviadas a Macrogen para su procesamiento y secuenciación.



**Figura 40. Reacciones de PCR de muestras de RNA total tratadas con DNAsa.** Se emplearon primers para amplificar un segmento de 230 pb del gen de actina. M, Lambda DNA/EcoR1 + HindIII; C(+), 100 ng de gDNA A3.I.1; C(-), sin molde; 1-3, repetición biológica. Se emplearon 200 ng de molde en las PCRs con las muestras de RNA.

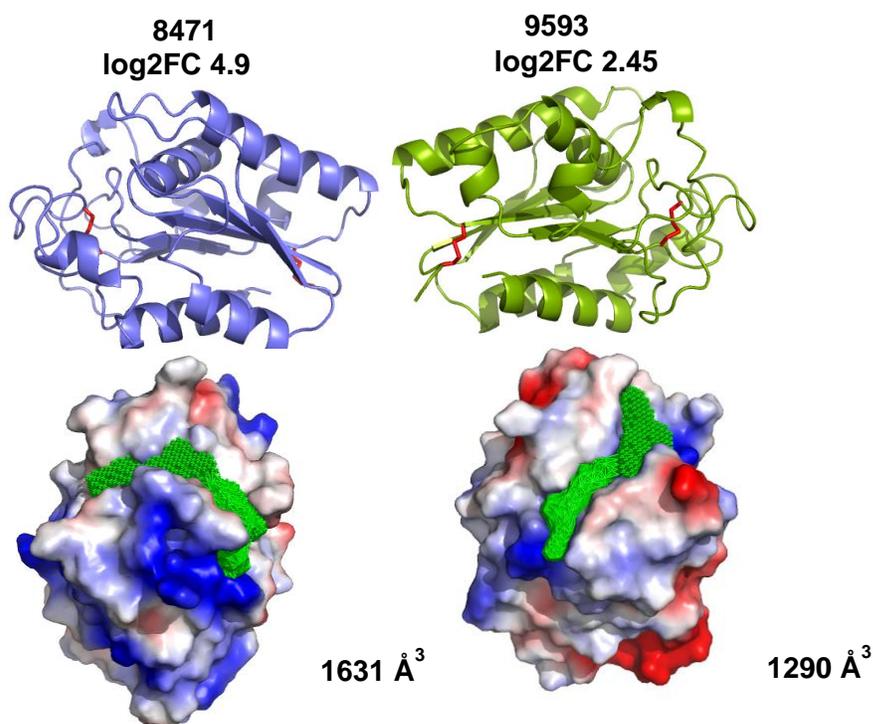
El análisis de calidad, ensamble y análisis de expresión diferencial fue realizado por Luigui Gallardo Becerra del laboratorio del Dr. Adrián Ochoa Leyva en el IBT. Obtuvimos en promedio 13 millones de lecturas por muestra, de las cuales cerca del 45% se eliminó después del filtrado de calidad, quedando en promedio por muestra 6 millones de lecturas. El ensamble *de novo* identificó 12,405 genes con un 53.5% GC, en promedio un contig tenía 2,962 nt. Se alinearon los reads de cada muestra con el ensamble *de novo*, presentando una cobertura de 89-94%. Estos resultados muestran que la secuenciación permitió obtener la cantidad suficiente de reads con buena calidad.

En el análisis de expresión diferencial se observaron 1342 genes expresados diferencialmente: 784 sobre-expresados en dextrosa y 558 sobre-expresados en Impranil. La correlación de las muestras fue excelente mostrando que los genes sobre-expresados en Impranil están sub-expresados en dextrosa y viceversa (Figura 41).



**Figura 41. Correlación entre la expresión de genes expresados en Impranil y Dextrosa. Cian, Impranil; Rojo, dextrosa.**

Para identificar a la(s) cutinasa(s) expresadas en Impranil, se realizó una búsqueda de los 13 genes de cutinasas en la lista de genes sobre-expresados en Impranil. Se identificaron dos cutinasas sobre-expresadas la 8471 con un Log2FC de 4.9 y la 9593 con un Log2FC de 2.45 con respecto a la expresión en dextrosa. Con base en estos resultados y por la similitud de estas dos cutinasas con la proteína tipo cutinasa de *Cryptococcus sp.* S-2 (cutCsp) que degrada poliésteres sintéticos, sugerimos que las cutinasas 8471 y 9593 tienen la capacidad de degradar poliéster poliuretano. Además de la similitud estructural de las cutinasas 8471 y 9593 de A3.I.1 con cutCsp, ellas muestran una predicción del pocket del sitio catalítico con un volumen mayor al 40% con respecto al de la cutinasa 6962 (Figura 42). Estos resultados nos llevan a sugerir que el aumento de volumen en el pocket del sitio catalítico podría relacionarse con la capacidad de degradar poliésteres sintéticos (Kodama *et al.*, 2009).



**Figura 42. Predicción del potencial de contacto y “pockets” asociados al sitio de unión del sustrato de las cutinasas de A3.I.1 expresadas diferencialmente en Impranil.** Las predicciones del potencial de contacto y visualizaron se realizaron con PyMol 2.3, los “pockets” se calcularon con el programa GHECOM.

Con base en los resultados de la identificación de la “Impranilasa” por espectrometría de masas (Álvarez-Barragán, 2016), se esperaba que en el crecimiento de A3.I.1 en Impranil, la proteína sobre-expresada fuera la cutinasa 6962, pero no fue así. Esto probablemente se deba a las diferencias en las condiciones de cultivo: la identificación de la proteína con actividad “Impranilasa” se realizó en cultivos de seis semanas de crecimiento inoculados con micelio y para el análisis de expresión diferencial se utilizaron cultivos de dos semanas de crecimiento inoculados con conidias germinadas. Esto sugiere que la expresión de las cutinasas podría ser diferente a lo largo del tiempo de cultivo, expresándose en principio las cutinasas con capacidad de actuar sobre el polímero en su estado más complejo (8471 y 9593) y después quizá las cutinasas con actividad sobre los derivados más sencillos (6962). Esta expresión diferencial de cutinasas se ha observado en el sistema cutinolítico del hongo *Aspergillus nidulans* y se ha propuesto un mecanismo de regulación, donde la degradación inicial de la cutina se lleva a cabo por la isoforma ANCUT3, los monómeros de cutina que resultan de su actividad inducen la expresión de ANCUT1 y ANCUT2, las cuales son las principales cutinasas degradadoras de la cutina. Además, es interesante saber que existe una cutinasa (ANCUT4) cuya inducción se debe a la presencia de estrés oxidativo (Bermúdez-García *et al.*, 2019). Este estudio nos lleva a pensar que algo similar podría estar ocurriendo en *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1, pero en este caso al ser el Impranil un polímero tan complejo, la degradación inicial podría llevarse a cabo por las cutinasas 8471 y 9593.

Se tendrá que comprobar la participación de las cutinasas 6962, 8471 y 9593 en la degradación del Impranil, cuantificando la expresión génica a 6 semanas de cultivo en MM-Impranil. Así mismo la clonación de los genes y la expresión recombinante de las proteínas, permitirá su caracterización enzimática *in vitro* en la degradación del Impranil y otros polímeros similares. Además, sería interesante estudiar de la misma manera a la cutinasa 2372 que posee similitudes estructurales con proteínas que degradan polímeros sintéticos.

## 9. Conclusiones

- Se secuenció el genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 encontrando que tiene 33.69 Mpb distribuidas en 19 cromosomas en condición haploide.
- A3.I.1 posee 13 cutinasas putativas. Las cutinasas 2372, 6962, 8471 y 9593 presentaron gran similitud con cutinasas que degradan poliésteres sintéticos, con base en estas similitudes sugerimos que poseen la capacidad para degradar el PS-PU (Impranil).
- *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 degrada en dos semanas el 70% del Impranil en medios de cultivo que contienen 0.5% de este poliéster poliuretano.
- La actividad degradadora de Impranil fue detectada durante las primeras tres semanas de crecimiento en medio con Impranil (0.5%), pero no en medio con dextrosa (0.13 mM), inoculados con conidias germinadas. A la cuarta semana, último tiempo de análisis, esta actividad también se presentó en medio con dextrosa, aunque en baja expresión.
- Los genes de las cutinasas 8471 y 9593 fueron sobre-expresados diferencialmente en medios con Impranil como única fuente de carbono a las dos semanas de cultivo. Estas cutinasas poseen alta similitud con una proteína tipo cutinasa de *Cryptococcus* sp. S-2 capaz de degradar poliésteres. Por lo que se propone que estas proteínas poseen capacidad de degradar Impranil.
- Si bien en trabajos previos se identificó que una cutinasa era responsable de la degradación del Impranil y ésta fue identificada en el genoma como la cutinasa 6962, no se observó una mayor expresión de este gene en cultivos con Impranil a las dos semanas. No se descarta la posibilidad de que este gen se expresa en cultivos más avanzados de crecimiento que fue cuando esta cutinasa fue identificada experimentalmente (6 semanas).

- Sugerimos que el proceso de degradación del Impranil por *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1, se lleva a cabo escindiendo primeramente los poliésteres más complejos por acción de las cutinasas 8471 y 9593, que poseen un surco catalítico profundo. Posteriormente, los poliésteres más sencillos podrían ser degradados por la cutinasa 6962 en estadios posteriores de cultivo.

## 10. Perspectivas

- Expresar de manera recombinante a las cutinasas 2372, 6962, 8471 y 9593 para evaluar su actividad sobre el Impranil y otros polímeros similares.
- Análisis de los genes que se sobre-expresan en medios con Impranil y su implicación bioquímica y metabólica con la degradación del poliéster poliuretano.
- Identificación de los compuestos de degradación del Impranil que se generan de cultivos de diferentes semanas de crecimiento con A3.I.1.

## Referencias

- Álvarez-Barragán J. 2016. Caracterización de la biodegradación de poliuretano por hongos filamentosos e identificación de la enzima extracelular responsable. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.
- Álvarez-Barragán J, Domínguez-Malfavón L, Vargas-Suárez M, González-Hernández R, Aguilar-Osorio G, Loza-Tavera H. 2016. Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams. *Appl Environ Microbiol*, 82:5225-5235.
- Álvarez-Barragán J. 2013. Aislamiento e identificación de hongos capaces de degradar poliuretano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Amour, P. 2017. Presentación de UTECH Las Americas. Tomado de: [http://rim.com.mx/PORTAL/Services?operacion=busqueda\\_nota&M%C3%89XICO,%20SEGUNDO%20PRODUCTOR%20DE%20POLIURETANO%20&id\\_nota=93](http://rim.com.mx/PORTAL/Services?operacion=busqueda_nota&M%C3%89XICO,%20SEGUNDO%20PRODUCTOR%20DE%20POLIURETANO%20&id_nota=93) (Último acceso el 21 de enero del 2020).
- Armenteros A, Sønderby C, Sønderby S, Nielsen H, Winther O. 2017. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*. 33:3387-3395.
- Barratt S, Ennos A, Greenhalgh M, Robson G, Handley P. 2003. Fungi are the predominant micro-organisms responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities. *J Appl Microbiol*. 95:78-85.
- Benkert P, Tosatto SC and Schomburg D. 2008. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins*. 71: 261-277.
- Berlin K, Koren S, Chin CS, Drake JP, Landolin JM, Phillippy AM. 2015. Assembling large genomes with single-molecule sequencing and locality-sensitive hashing. *Nat Biotechnol*, 33:623-630.
- Bermúdez-García E, Peña-Montes C, Martins I, Pais J, Pereira C, Sánchez S, Farrés A. 2019. Regulation of the cutinases expressed by *Aspergillus nidulans* and evaluation of their role in cutin degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 103(9):3863-3874.
- Boubendir A. 1993. Purification and biochemical evaluation of polyurethane degrading enzymes of fungal origin. *Diss Abstr Int*. 53:4632-4638
- Byoungnam M, Igor VG, In-Geol C. 2017. FunGAP: Fungal Genome Annotation Pipeline using evidence-based gene model evaluation. *Bioinformatics*. 33:2936-2937
- Carugo O, Carugo KD. 2013. Half a century of Ramachandran plots. *Acta Cryst D*. 69: 1333-1341.

- Ceroni A, Passerini A, Vullo A, Frasconi P. 2006. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res*, 34(Web Server issue):W177–W181.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Cosgrove L, McGeechan PL, Handley PS, Robson GD. 2010. Effect of biostimulation and bioaugmentation on degradation of polyurethane buried in soil. *App Environ Microbiol*, 76:810-819.
- Cosgrove L, McGeechan PL, Robson GD, Handley PS. 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Appl Environ Microbiol.* 73:5817-5824.
- Crabbe JR, Campbell JR, Thompson L, Walz SL, Schultz WW. 1994. Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *Int Biodeterior Biodegrad.* 33:103-113.
- Cregut M, Bedas M, Durand-Thouand MJ, Thouand G. 2013. New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. *Biotechnol Adv.* 31:1634-1647.
- Darby RT, Kaplan AM. 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *App Microbiol.* 16:900-905.
- De-Castro E, Sigrist C, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux P, Gasteiger E, Bairoch A, Hulo N. 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* 34:W362-W365.
- De-Kayne R, Zoller S, Philine G, Feulner D. 2019. A de novo chromosome-level genome assembly of *Coregonus* sp. “Balchen”: one representative of the Swiss Alpine whitefish radiation. *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/771600>.
- De Wit PJ, Van Der Burgt A, Ökmen B, *et al.* 2012. The genomes of the fungal plant pathogens *Cladosporium fulvum* and *Dothistroma septosporum* reveal adaptation to different hosts and lifestyles but also signatures of common ancestry. *PLoS Genet.* 8: e1003088. doi:10.1371/journal.pgen.1003088
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue):W465-W469.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus.* 12:13-15.
- Ferrè F, & Clote P. 2005. DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res.* 33(Web Server issue): W230-W232.
- Filip Z. 1979. Polyurethane as the sole nutrient source for *Apergillus niger* and

- Cladosporium herbarum*. Eur J Appl Microbiol Biotechnol. 15:20-24.
- González-Hernández RA. 2016. Optimización del cultivo de hongos filamentosos para biodegradar espumas de poliéter poliuretano y determinación de actividades enzimáticas relacionadas. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.
- Hasegawa H, Holm L. 2009. Advances and pitfalls of protein structural alignment. Curr. Opin. Struct. Biol. 19: 381-389.
- Hincapié-Llanos GA, Ramírez-Cardona ME. 2009. Evaluación de la biodegradación aerobia de poliuretano residual generado en la industria de fabricación de refrigeradores. Revista Investigaciones Aplicadas. 5:15-25.
- Holm L. 2019. Benchmarking fold detection by DaliLite v.5. Bioinformatics. btz536. PMID: 31263867
- Howard GT. 2002. Biodegradation of polyurethane: A review. Int Biodet Biodeg. 49:245-252.
- Howard GT, Blake RC. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. Int Biodet Biodeg. 43:7-12.
- Hu B, Jin J, Guo AY, Zhang H, Luo J, Gao G. 2015. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server. Bioinformatics. 31:1296-1297.
- Ibrahim IN, Maraqa A, Hameed KM, Saadoun IM, Maswadeh HM. 2011. Assessment of potential plastic-degrading fungi in Jordanian habitats. Turk J Biol. 35:551-557.
- Junier T, Pagni M, Bucher P. 2001. hmmsearch: a motif arrangement language and search program. *Bioinformatics*. 17:1234-1235.
- Käll L, Krogh A, Sonnhammer EL. 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction the Phobius web server. Nucleic Acids Res. 35(Web Server issue): W429-W432.
- Kay MJ, McAbe RW, Morton LGH. 1993. Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. Int Biodet Biodeg. 31:209-225.
- Kawabata T. 2009. Detection of multiscale pockets on protein surfaces using mathematical morphology. Proteins. 78:1195-1211.
- Khan S, Nadir S, Shah ZU, Shan AA, Karunarathana SC, Xu J, Khan A, Hasan F. 2017. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. Environ Pollut. 225:469-480.
- Kodama Y, Masaki K, Kondo H, Suzuki M, Tsuda S, Nagura T, Shimba N, Suzuki E and Lefuji H. 2009. Crystal structure and enhanced activity of a cutinase-like enzyme from *Cryptococcus* sp. strain S-2. Proteins. 77: 710-717.
- Korlach J, Bjornson KP, Chaudhuri BP, Cicero RL, Flusberg BA, Gray JJ, Turner S W. 2010. Chapter 20. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules.

- Meth. Enzymol. 472:431-455.
- Li H, Benedito VA, Udvardi MK, Zhao P. 2009. TransportTP: A two-phase classification approach for membrane transporter prediction and characterization. *Bioinformatics* 10:418.
- Lightfoot DJ, Jarvis DE, Ramaraj T, Lee R, Jellen EN, Maughan PJ. 2017. Single-molecule sequencing and Hi-C-based proximity-guided assembly of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) chromosomes provide insights into genome evolution. *BMC Biol.*15:74.
- Liu Z, Gosser Y, Baker PJ, Ravee Y, Lu Z, Alemu G, Montclare JK. 2009. Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *J Am Chem Soc* 131:15711-15716.
- Loredo-Treviño A, García G, Velasco-Téllez A, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. 2011. Polyurethane foam as substrate for fungal strains. *Adv Biosc Technol.* 2:52-58.
- McCarthy SJ, Meis GF, Mitchell N, Gunatillake PA, Heath G, Brandwood A, Schindhelm K. 1997. In-vivo degradation of polyurethanes: transmission-FTIR microscopic characterization of polyurethanes sectioned by cryomicrotomy. *Biomater.* 18:1387-1409.
- Mahajan N, & Gupta P. 2015. New insights into the microbial degradation of polyurethanes. *RSC Adv.* 5:41839-41854.
- Martinez C, De Geus P, Lauwereys M, Matthyssens G, Cambillau C. 1992. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*, 356:615-618.
- Masaki K, Ramudu-Kamini N, Ikeda H, Lefuji H. 2005. Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus* sp. Strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7548-7550.
- Mathur G, Prasad R. 2012. Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus*. *Appl Biochem Biotechnol.* 167:1595-1602.
- Matsumiya Y, Murata N, Tanabe E, Kubota K, Kubo M. 2010. Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. *J Appl Microbiol.* 108:1946-1953.
- Min B, Choi IG. 2019. Practical guide for fungal gene prediction from genome assembly and RNA-Seq reads by FunGAP. *Gene Prediction. Methods Mol. Biol.*, vol 1962.
- Mishra NK, Chang J, Zhao PX. 2014. Prediction of membrane transport proteins and their substrate specificities using primary sequence information. *PloS One.* 9: e100278.
- Moore D, Dowhan D. 2002. Purification and Concentration of DNA from Aqueous Solutions. *Curr Protoc Mol Biol.* 59: 2.1.1-2.1.10.
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Kimpara N, Nakahara T. (1995). Isolation and

- characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS*. 129:39-42.
- Ng KP, Yew SM, Chan CL, Soo-Hoo TS, Na SL, Hassan H, Ngeow YF, Hoh CC, Lee KW, Yee WY. 2012. Sequencing of *Cladosporium sphaerospermum*, a *Dematiaceous fungus* isolated from blood culture. *Eukaryot Cell*. 11:705-6. doi: 10.1128/EC.00081-12.
- Oceguera-Cervantes A, Carrillo-García A, López N, Bolaños-Nuñez S, Cruz-Gómez MJ, Wacher C, Loza-Tavera H. 2007. Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus sp.* strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. *Appl Environ Microbiol*. 73:6214-6223.
- Omasits U; Ahrens CH; Müller S, Wollscheid B. 2014. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*. 30:884-886.
- Owen S, Otani T, Masaoka S, Ohe T. 1996. The biodegradation of low-molecular-weight urethane compounds by a strain of *Exophiala jeanselmei*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 60:244-248.
- Pao SS, Paulsen IT, & Saier MH. 1998. Major facilitator superfamily. *MMBR*. 62:1–34.
- Pathirana RA, Seal KJ. 1983. *Gliocadium roseum* (Bainier), a potential biodeteriogen of polyester polyurethane elastomers. *Biodeter*. 5:679-689.
- Paulino D., Warren RL., Vandervalk B.P. *et al.* 2015. Sealer: a scalable gap-closing application for finishing draft genomes. *BMC Bioinformatics*. 16:230
- Paulsen, I., Holmes, A. (2014). *Environmental Microbiology: Methods and Protocols* (2da ed). Humana Press. doi 10.1007/987-1-62703-712-9
- Peng YH, Shih YH, Lai YC, Liu YZ, Liu YT, Lin NC. (2014). Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain. *Environ Sci Pollut Res Int*. 21:9529-9537.
- Pio TF, Macedo GA. 2009. Chapter 4 Cutinases: Properties and Industrial Applications. *Adv Appl Microbiol*, 66:77-95.
- PlasticsEurope. 2018. *PlasticsEurope Annual Review 2017-2018*. Tomado de: <https://www.plasticseurope.org/en/resources/market-data>.
- Potter S, Luciani A, Eddy S, Park Y, Lopez R, Finn R. 2018. HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Res*. 46: W200-W204.
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, & Lopez R. 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res*. 33(Web Server issue), W116–W120.
- Roberts RJ, Carneiro MO, Schatz MC. 2013. The advantages of SMRT sequencing. *Genome Biol*, 14:2-5.
- Ruiz C, Main T, Hilliard N, Howard GT. 1998. Purification and characterization of two

- polyurethane enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 43:43-47.
- Russell JR, Huang J, Anand P, Kucera K, Sandoval AG, Dantzler KW, Strobel SA. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl Environ Microbiol*. 77:6076-6084.
- Simão F, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva E, Zdobnov E. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*. 31:3210-3212.
- Shibasaki S, Kawabata A, Tanino T, Kondo A, Ueda M, Tanaka M. 2009. Evaluation of the biodegradability of polyurethane and its derivatives by using lipase-displaying arming yeast. *Biocontrol Sci*. 14:171-5.
- Skamnioti P, Furlong RF, Gurr SJ. 2008. Evolutionary history of the ancient cutinase family in five filamentous Ascomycetes reveals differential gene duplications and losses and in *Magnaporthe grisea* shows evidence of sub- and neo-functionalization. *New Phytol*. 180:711-721.
- Solís-González CJ. 2008. Caracterización del crecimiento de *Alicyclophilus sp.* BQ5 en poliuretano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Song J, Tan H, Perry AJ, Akutsu T, Webb GI, Whisstock JC and Pike RN. 2012. PROSPER: an integrated feature-based tool for predicting protease substrate cleavage sites. *PLoS ONE*. 7: e50300.
- Stanke, M., & Morgenstern, B. 2005. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucleic Acids Res*. 33(Web Server issue):465-467.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3 Schrödinger, LLC.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 46(W1), W296-W303.
- Zafar U, Nzeram P, Langarica-Fuentes A, Houlden A, Heyworth A, Saiani A, Robson GD. 2014. Biodegradation of polyester polyurethane during commercial composting and analysis of associated fungal communities. *Biores Technol*. 158:374-377.
- Zafar U, Houlden A, Robson GD. 2013. Fungal communities associated with the biodegradation of polyester polyurethane buried under compost at different temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 79:7313-7324.

## Apéndice

### Preparación de medios de cultivo y conservación de conidias

#### 1. Medio papa dextrosa agar (PDA) para 1 L

Papa de cáscara blanca	250 g
Dextrosa	20 g
Agar	20 g

1. Lavar y rallar los 250 g de papa, después hervir la papa en un litro de agua destilada por 20 minutos.
2. Filtrar por 5 capas de gasa y reponer el agua perdida para obtener 1 L, dividir en alícuotas de 250 mL. Agregar 5 g de agar y 5 g de dextrosa por cada 250 mL, después de haber aforado. Esterilizar por autoclave a 121 °C/15 minutos.

**Nota:** para preparar cajas de PDA el medio se debe verter en las cajas Petri cuando aún este tibio, evitando la presencia de grumos, se deja solidificar y se invierten. Todo debe hacerse en zona aséptica.

#### 2. Medio papa dextrosa broth (PDB) para un 1 L

Papa de cáscara blanca	250 g
Dextrosa	20

1. Lavar y rallar los 250 g de papa, después hervir la papa en un litro de agua destilada por 20 minutos.
2. Filtrar por 5 capas de gasa y centrifugar a 8,000 rpm 10 minutos. Utilizar el sobrenadante (tirar el pellet) y reponer el agua perdida para obtener 1 L, dividir en alícuotas de 250 mL. Agregar 5 g de dextrosa por cada 250 mL, después de haber aforado y esterilizar por autoclave a 121 °C/15 minutos.

### 3. Medio mínimo mineral (MM) basado en el medio empleado por Russel *et al.*, 2011

#### Solución A (10 X) para 1 L

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 26.18 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 61.80 g

#### Solución B (100 X) para 1 L

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 103.30 g

MgSO<sub>4</sub> 3.01 g

#### Solución C (1000 X) para 1 L

FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O 39.70 g

ZnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O 2.92 g

CoCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O 3.86 g

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 2.47 g

CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 1.47 g

CuCl<sub>2</sub> 1.48 g

MnCl<sub>2</sub> 1.51 g

#### Ácido (10 X) para 1L

HCl 18 L

1. Preparar las soluciones A y B, esterilizar en autoclave 121°C/15 min.
2. Preparar la solución C (elementos traza) disolviendo cada uno de los elementos en 50 mL de agua destilada y esterilizar por autoclave a 121°C/ 15 min, una vez estériles juntar todos los elementos traza y aforar a 1 L con agua destilada estéril.

3. Para realizar el medio, agregar la cantidad correspondiente de soluciones A, B y C. Agregar el agua desionizada (estéril) y agregar la fuente de carbono correspondiente y después agregar el HCl y ajustar el pH a 6.

#### 4. Medio mínimo con Impranil® DLN al 0.5% para 2 L (MM-Impranil 0.5%)

Agua desionizada	1754.4 mL
Solución A	200 mL
Solución B	20 mL
Solución C	2 mL
Impranil® DLN	20 mL
Ácido 10 X	3.6 mL

1. Mezclar 1700 mL de agua desionizada con 200 mL de solución A, después adicionar 20 mL de solución B y agitar hasta homogenizar las soluciones.
2. Adicionar 20 mL de Impranil® DLN (ver nota) y agitar hasta homogenizar completamente el Impranil en la solución.

**Nota:** Tomar en cuenta que en la ficha técnica del barniz de poliuretano base agua, se indica que el contenido de sólido es 50% por lo que para obtener una solución con una concentración al 0.5% hay que agregar el 1% de barniz referente al volumen total que se desea preparar.

3. Adicionar 2 mL de solución C y agitar hasta homogenizar las soluciones, después adicionar 3.6 mL de ácido 10 X y agitar hasta homogenizar. Por último adicionar 54.4 mL de agua desionizada y agitar hasta homogenizar por completo.

#### 5. Medio mínimo con Dextrosa (MM-Dextrosa)

Realizar la mezcla de las soluciones de la misma manera que en la preparación del MM-Impranil 0.5% cambiando la adición de Impranil® DLN por 20 mL de una solución de dextrosa cuya concentración sea la necesaria para la concentración total requerida en 2 L.

## 6. Solución lava-hongos para 500 mL

NaCl	0.9 g
Tween 80	0.5 mL

1. En 400 mL de agua desionizada disolver el NaCl y posteriormente adicionar y disolver el Tween 80. Aforar a 500 mL y almacenar en frasco ambar.

## Gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

### 1. Preparación de soluciones

#### Acrilamida 30% para 100 mL

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8g

1. Precaución: la acrilamida es neurotóxica cuando no se ha polimerizado por lo tanto siempre usar guantes para manejarla. Se supone que ya polimerizada no es venenosa pero podrían quedar moléculas sin polimerizar. Por lo tanto siempre usar guantes, aunque esté polimerizada.
2. Pesar los compuestos, disolverlos en 80 ml de agua en una parrilla con agitación y un poco de calor. Aforar a 100 ml con agua desionizada en una probeta, filtrar la mezcla en un embudo con un filtro Whatman No. 1 u otro de poro grande, después de que se haya disuelto completamente se almacena a 4°C.

#### Buffer separador para 100 mL

Tris-base	18.17 g
SDS al 20%	1 ml

1. Pesar el Tris, disolverlo en 80 ml de agua desionizada y ajustar el pH. Agregar el SDS y aforar a 100 ml. Almacenar a temperatura ambiente.

**Nota:** Ajustar el pH a 8.8 con HCl 12 N

### Buffer apilador para 100 mL

Tris-base	6.06 g
SDS al 20%	2 ml

1. Pesar el Tris disolverlo en 80 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 6.8.
2. Agregar el SDS y aforar con agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

**Nota:** Ajustar el pH a 6.8 con HCl 12N

### Buffer de carga 5X para 10 mL

Tris 1M pH 6.8	3.125 mL
Glicerol	5 mL
SDS (1% final)	0.5 g
Azul de bromofenol 10%	0.2 mL

$\beta$ -mercaptoetanol (ver nota)

1. Pesar y medir los ingredientes y llevarlos a 10 ml con agua desionizada.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

**Nota:** Inmediatamente antes de usar agregar 4  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol por 20  $\mu$ L de buffer de carga. El buffer de esta receta es 5 veces concentrado es decir debes usar 1/5 de buffer de carga por 1 volumen de tu muestra.

### Buffer de corrida 10X para 1 L

Tris-base ( <b>NO</b> Tris-HCl)	30 g
Glicina	144 g
SDS	10

1. Disolver en 600 ml de agua desionizada la glicina, calentar y un poco y agitar.
2. Agregar el Tris y esperar a que casi por completo este solubilizado.

3. Checar el pH, debe estar entre 8.3 y 8.8. No ajustarlo, si no está a ese pH es que se peso mal el Tris o se uso Tris-HCl. Volver a pesar, pero correctamente.
4. Agregar el SDS en polvo, disolverlo y ajustar el volumen a 1000 ml en una probeta. Almacenar a temperatura ambiente.
5. Antes de usarlo para correr tu gel, medir 70 ml de este buffer 10X y llevarlo a 700 ml con agua desionizada.

### **Persulfato de amonio al 20% para 10 mL**

Persulfato de amonio	200 mg
----------------------	--------

Este reactivo es higroscópico y puede deteriorarse creando problemas de gelificación. Se recomienda mantenerlo guardado en un desecador a temperatura ambiente.

1. Pesar el reactivo, disolverlo en 10 ml de agua desionizada.
2. Hacer alícuotas de 500 µL en tubos eppendorf, etiquetarlas y congelarlas a -20°C. Al momento de usar, descongelar un tubo
3. Se puede descongelar hasta 3 ó 4 veces más. Después es mejor desecharlo y usar otro nuevo.

### **Colorante Coomassie para teñir geles para 100 mL. Coomassie 0.05% en 50% metanol: 10% ácido acético glacial**

Coomassie brilliant blue R250	0.05 g
Metanol QP	50 mL
Agua desionizada	45 mL
Ácido acético glacial	10 mL

1. Pesar y medir los reactivos, disolverlos en vaso de precipitado de vidrio (no usar de plástico) y almacenar a temperatura ambiente.

**Nota:** El coomassie se une a proteínas por lo cual se recomienda usar guantes para prepararlo.

### **Fijador y desteñidor para 250 mL (20% Metanol: 7.5% ácido acético)**

Ácido acético glacial	18.75 mL
Metanol grado técnico	50 L

1. Medir los reactivos, aforar a 250 ml y almacenar a temperatura ambiente.

### **Solución de MUF-butirato 50 mM**

1. Disolver 74 mg del 4-metilumbeliferil butirato en 6 ml de dimetilsulfóxido (DMSO).
2. Separar en alícuotas de 1 ó 2 ml y etiquetar con la fecha y concentración (50 mM)
3. Almacenar a -20 °C. Deja de ser estable si se descongela más de 4 veces.
4. Para realizar la dilución a 1.6 mM se utiliza etilenglicol. Preparar solo lo necesario para un gel (3 ml)

### **Solución de Tritón-X100 2.5% para 1 L**

Tritón-X100	25 L
-------------	------

1. Disolver 12 mL de la solución de Tritón-X100 en 500 mL de agua desionizada y aforar a 1 L.

### **1. Preparación del gel SDS-PAGE al 15%**

#### **Gel Separador 15% para 2 geles**

H <sub>2</sub> O desionizada	2.5 mL
Buffer separador	2.5 mL
Acilamida al 30%	5 mL
Persulfato de amonio al 20%	62.5 µL
TEMED	6.2 µL

1. Armar al equipo de Bio-Rad para preparación de geles, utilizar los cristales de 1 mm de espesor, asegurarse que se encuentren completamente limpios y desengrasados.
2. Mezclar, el agua, el buffer separador y la acrilamida (30%).
3. Agregar casi al mismo tiempo el persulfato y el TEMED, agitar un poco y verter entre los cristales.
4. Poner inmediatamente un poço de etanol encima, esto para facilitar la polimerización y alinear el gel.
5. Dejar polimerizar y quitar perfectamente todo el etanol.

### **Gel apilador para 2 geles**

H <sub>2</sub> O desionizada	2.4 mL
Buffer apilador	1.04 mL
Acrilamida al 30%	700 µL
Persulfato de amonio al 20%	30 µL
TEMED	5 µL

1. Se prepara de la misma forma que el gel apilador.
2. Se verte encima del gel separador y se le coloca inmediatamente el peine separador. Dejar polimerizar para poder desprender el peine.

### **Extracción de DNA con CTAB-Cloroformo**

#### **Buffer de extracción para 1 L**

Tris HCl pH 8.0 1 M	100 mL
Solución de NaCl 5 M	280 mL
Solución de EDTA 0.5 M	40 mL

CTAB

20 g

Llevar a un volumen final de 1 L con agua desionizada.

1. Macerar 200 mg de micelio con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y colocar el polvo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
2. Adicionar 600  $\mu$ L de buffer de extracción, vortexear por un minuto e inmediatamente después incubar a 65 °C por 30 min.
3. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente y agregar 250  $\mu$ L de acetato de potasio 5 M, mezclar vigorosamente por 1 minutos.
4. Centrifugara 12,000 rpm a 4 °C por 5 minutos y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (medir el volumen).
5. Agregar 1  $\mu$ L de RNAsa e incubar por 15 minutos a 37 °C.
6. Agregar un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v), mezclar en el vortex.
7. Centrifugar a 12,000 rpm a 4 °C por 5 minutos y nuevamente colocar el sobrenadante en un tubo nuevo.
8. Agregar 660  $\mu$ L de isopropanol frío e incubar por 2 h a -20 °C.
9. Centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos a 4 °C y descartar el sobrenadante.
10. Lavar tres veces la pastilla de DNA con 1 mL de etanol al 70% y dejar secar a temperatura ambiente.
11. Resuspender el DNA con 100  $\mu$ L de agua desionizada estéril a 60 °C.

## **Electroforesis de DNA y RNA**

### **Gel de agarosa para electroforesis de DNA (0.8%)**

Agarosa	28 mg
Buffer TAE 1X	35 mL

1. Limpiar cuidadosamente el soporte para el gel, los peines, y la cámara de electroforesis para asegurar que estén libres de grasa y polvo.
2. Pesar la agarosa y transferir a un matraz estéril de 125 mL.

3. Añadir el buffer y calentar hasta la completa disolución de agarosa. Dejar enfriar sin permitir que solidifique.
4. Verter el gel en el soporte y colocar el peine. Dejar solidificar por aproximadamente 15 minutos antes de retirar el peine.

**Buffer TAE 50X para gel de electroforesis de DNA, para 1 L**

Tris base	242 g
0.5 M EDTA, pH 8.0	100 mL
Ácido acético glacial	57.1 mL

1. Mezclar en agua desionizada y aforar a 1 L y esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb por 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.
2. Para preparar 1 L de buffer TAE 1X para preparar geles y buffer de corrida para electroforesis de DNA, tomar 20 mL de Buffer TAE 50X y aforarlos a 1 L con agua desionizada.

**Gel de agarosa desnaturalizante para electroforesis de RNA (1%)**

Agarosa	28 mg
Buffer MOPS 1X	35 mL

1. Limpiar cuidadosamente el soporte para el gel, los peines, y la cámara de electroforesis para asegurar que estén libres de grasa y polvo.
2. Pesar la agarosa y transferir a un matraz estéril de 125 mL.
3. Añadir el buffer y calentar hasta la completa disolución de agarosa. Dejar enfriar sin permitir que solidifique.
4. Verter el gel en el soporte y colocar el peine. Dejar solidificar por aproximadamente 15 minutos antes de retirar el peine.

### **Buffer MOPS 1X para gel de electroforesis de RNA, para 500 mL**

MOPS	2.5 g
Acetato de sodio	0.25 g
EDTA	0.186 g

1. Disolver MOPS, acetato de sodio y EDTA en aproximadamente 200 mL de agua DEPC con agitación.
2. Aforar a 500 mL con agua DEPC.
3. Para preparar 500 mL de buffer de corrida para electroforesis de RNA, tomar 491 mL de Buffer MOPS 1X y añadir 9 mL de formalina (formaldehído al 37%).

### **Solución de EtBr 120 pg/mL para tinción de geles de agarosa, para 100 mL**

Solución de EtBr 4 mg/mL	3 $\mu$ L
Buffer TAE 1X	100 mL

1. Mezclar la solución de EtBr en un recipiente con Buffer TAE 1X.
2. Colocar el gel de agarosa a teñir, asegurándose de que esté sumergido completamente.
3. Dejar tiñendo el gel en la oscuridad aproximadamente 15 min, digitalizar la imagen inmediatamente.