



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**Programa de Maestría y Doctorado en
Ciencias Bioquímicas**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Expresión en levadura y caracterización de una nueva proteína tipo
expansina, LOOS1, del hongo basidiomiceto *Bjerkandera adusta***

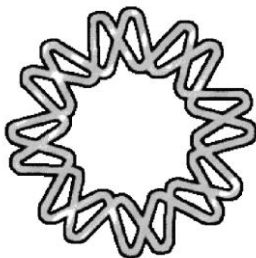
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA



Febrero 2011



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

A los miembros del Comité Tutorial, que con su experiencia e invaluable guía y disposición fueron fundamentales para la realización del proyecto. Gracias por su dedicación.

Dra. Alejandra Covarrubias Robles

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

A los miembros del Jurado de Examen para la Obtención de Grado, por los valiosos comentarios críticos que enriquecieron el manuscrito.

Dr. Federico Sánchez Rodríguez

Dr. Ernesto Pérez Rueda

Dra. Esperanza Martínez Romero

Dra. Claudia Martínez Anaya

Dr. Jorge Luis Folch Mallo

Gracias a Jordi, mi asesor en este proyecto, por la confianza depositada, el apoyo y la sonrisa franca en los logros compartidos.

A Hugo, sin palabras sabes todo lo que siento, tú que me has acompañado en este viaje de la vida, gracias por compartirla conmigo, por ser mi apoyo y darme ánimo siempre para alcanzar las metas.

A los amigos del laboratorio, Laura, Edgar, Catalina, Kenya, Aranza, Rocío, Irán, Nancy y más recientemente, Ramón, me llevo de ustedes lo mejor: su amistad, los recuerdos y las buenas experiencias compartidas que siempre nos harán sonreír.

A mis padres, gracias por darme una maravillosa familia, con valores y unión; por enseñarme que todo se consigue después de mucho trabajo y esfuerzo. Este logro es también para ustedes.

Esta Tesis se realizó con la beca de doctorado otorgada por CONACyT No. 47895.

RESUMEN

Las proteínas llamadas expansinas, identificadas en plantas, tienen la capacidad de relajar los componentes de la pared celular y promover el crecimiento. Estas proteínas participan en diferentes procesos como la organogénesis, la abscisión, la maduración de los frutos, el crecimiento del tubo polínico y otros procesos del desarrollo en donde ocurren modificaciones a la pared celular.

El mecanismo molecular de las expansinas aún es desconocido, sin embargo, se ha propuesto que estas proteínas estarían rompiendo los puentes de hidrógeno que unen entre ellos a los filamentos de celulosa y a la celulosa con otros polisacáridos a través de un proceso no enzimático.

Algunas proteínas tipo expansinas se han identificado en hongos ascomicetos pero no se han reportado en hongos basidiomicetos. En este trabajo, se clonó la secuencia codificante *loos1* de una biblioteca de cDNA del hongo basidiomiceto *Bjerkandera adusta* crecido en paja de trigo, esta secuencia codifica para una proteína tipo expansina llamada loosenina que se expresó en *Saccharomyces cerevisiae*. La proteína tipo expansina, LOOS1, con un tamaño predicho de 13.4 kDa se excretó al sobrenadante del cultivo, se enriqueció por ultrafiltración y se utilizó en ensayos de actividad cuantitativos y cualitativos, mostrando que LOOS1 es capaz de rearrreglar la estructura cristalina de la fibra de algodón y de favorecer la liberación de azúcares reductores después de tratar fibras de algodón y de agave en presencia de una celulasa y una mezcla enzimática comerciales, respectivamente. El principal azúcar que se libera en los ensayos cuantitativos de fibra de agave es la glucosa, lo cual podría ser consecuencia del rearrreglo que causa LOOS1 sobre la estructura de la celulosa favoreciendo la actividad de las celulasas del cóctel. La liberación de xilosa es mínima.

Los análisis bioinformáticos de la secuencia genómica de *loos1* revelan la presencia de 3 intrones en su secuencia genómica. Además del dominio DPBB identificado en la secuencia primaria de LOOS1, el modelamiento estructural de LOOS1 con proteínas expansinas cristalizadas permitió identificar una serie de residuos altamente conservados en el sitio de unión a polisacáridos.

Debido a que LOOS1 es capaz de modificar la estructura de la celulosa y a tolerar diferentes condiciones de pH, la hacen un buen candidato como un aditivo para facilitar de sacarificación enzimática de la biomasa celulósica para mejorar su solubilidad y subsecuente uso en procesos como la obtención de biocombustibles.

Este es el primer reporte de una proteína con actividad expansina de un hongo basidiomiceto expresada en levadura.

ABSTRACT

Expansins, a group of proteins identified in plants have the ability to relax the cell wall components and promote their growth. These proteins participate in processes where modifications to cell wall occur, such as organogenesis, abscission, fruit ripening and growth of the pollinic tube.

The expansins molecular mechanism of action is still unknown; however it has been proposed that they disrupt hydrogen bonds between cellulose filaments and cellulose and other polysaccharides through a non enzymatic process.

In ascomycetes fungi expansin like proteins have been identified, but there are no reports of proteins with this activity in basidiomycetes. In this work, the coding sequence of *loos1* was cloned from a cDNA library of basidiomycete *Bjerkandera adusta* grown on wheat straw. This sequence codes for an expansin like protein that we called loosenin and expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. LOOS1 has a predicted molecular weight of 13.4 kDa and was enriched by ultrafiltration for quantitative and qualitative assays.

After incubation with LOOS1, reducing sugars release from cotton and agave fibers is promoted in presence of commercial cellulases. The main sugar released from agave fibers is glucose as was observed in quantitative assay, which suggests that LOOS1 modifies cellulose structure and enhance the activity of cellulases. Qualitative assay showed that LOOS1 has the ability to modify cellulose structure as was observed in cotton fibers bubbles.

Three introns were identified in *loos1* genomic sequence and a DPBB domain was found in coding sequence of *loos1*. Structural modeling of LOOS1 on crystallized proteins allowed identifying eleven conserved residues in a potential polysaccharide binding site.

Since the properties of LOOS1 allows relaxing cellulose structure it could be a good candidate to enhance enzymatic saccharification of cellulosic biomass by improving its solubility in posterior processes such as obtaining of biofuels.

This is the first report of a protein with expansin activity from a basidiomycete fungi expressed in yeast.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN

Estructura de la pared celular y composición del material lignocelulósico

Celulosa

Cristalinidad de la celulosa

Efecto de la mercerización sobre la cristalinidad de la celulosa

Hemicelulosa

Lignina

Biodegradación del material lignocelulósico

Organismos degradadores de lignocelulosa

Bacterias celulolíticas

Hongos degradadores de lignocelulosos

Celulasas

Estructura de las celulasas

Dominios catalíticos

Módulos de unión a celulosa (CBMs)

Péptido de unión

Tipos de celulasas

Interacciones sinérgicas entre celulasas

Hemicelulasas

Ligninasas (lacasas y peroxidasas)

Superfamilia expansina

Características estructurales de las expansinas

Clasificación de las expansinas

Función biológica de las expansinas

Inmunolocalización de las expansinas

Análisis de la expresión de genes

Expresión ectópica de genes de expansinas

Uso de secuencias antisentido y plantas transgénicas de expansinas

Regulación de los genes de expansinas

Diversidad taxonómica de las expansinas

Otras proteínas con actividad expansina

Potencial biotecnológico de la lignocelulosa

2. JUSTIFICACIÓN

3. ANTECEDENTES

4. HIPÓTESIS

5. OBJETIVO GENERAL

6. OBJETIVOS PARTICULARES

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas

Crecimiento del hongo

Clonación molecular de la secuencia codificante de *loos1*

Extracción de DNA genómico y clonación de la secuencia genómica de *loos1*

Construcción de una librería genómica

Expresión en levadura de la secuencia codificante de *loos1*

Cuantificación de proteína

Enriquecimiento de LOOS1

Mercerización de fibras de algodón

Tratamiento de fibras de algodón con LOOS1

Ensayo cualitativo de LOOS1

Ensayo cuantitativo de LOOS1

Ensayo de azúcares reductores (AR)

Cálculo de la actividad tipo expansina

Estabilidad de LOOS1 a la temperatura y pH

Análisis de la cristalinidad de la celulosa por espectroscopía de infrarrojo

Tratamiento de un sustrato lignocelulósico natural

Ensayo de unión de LOOS1 a polisacáridos

Análisis bioinformático

Predicción de dominios y localización

Análisis filogenético

Modelado por homología de LOOS1

Análisis del promotor de *loos1*

8. RESULTADOS

Secuencia de LOOS1

Organización del gen *LOOS1*

Enriquecimiento de LOOS1

LOOS1 actúa sobre celulosa modificando su estructura

LOOS1 favorece la actividad de una endoglucanasa sobre fibras de algodón

LOOS1 favorece la degradación de material lignocelulósico

LOOS1 favorece la liberación de glucosa del material lignocelulósico

Efecto de la mercerización sobre la liberación de AR

Estabilidad de LOOS1 a la temperatura y al pH

LOOS1 parece modificar la estructura cristalina de la celulosa

LOOS1 se une a polisacáridos

Análisis bioinformático

Alineamiento de secuencias con identidad a LOOS1

Filogenia de LOOS1

Modelado por homología de LOOS1

Análisis del promotor de *loos1*

9. DISCUSIÓN

10. CONCLUSIONES

11. PERSPECTIVAS

12. ANEXO I

13. ANEXO II

14. LITERATURA CITADA

Palabras clave: Lignocelulosa, Degradación, Biocombustibles, Hongos basidiomicetos, Expansinas.

1. INTRODUCCIÓN

La lignocelulosa es el principal y más abundante componente de la biomasa renovable producida por la fotosíntesis; se estima que anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en todo el mundo (Ragauskas *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). La lignocelulosa consta de los tres principales biopolímeros que forman la pared celular de las plantas: celulosa, hemicelulosa y lignina (Zhang and Lynd, 2004), además de pequeñas cantidades de ceniza, proteínas y pectina (Zhong and Ye, 2007).

La celulosa es el biopolímero más abundante en la Tierra, en la naturaleza se encuentra principalmente como componente estructural de la pared celular de las plantas y algas marinas, aunque también es producida por algunos animales como los tunicados y por microorganismos como las bacterias (Lynd *et al.*, 2002). La lignocelulosa no se acumula en la tierra debido a los hongos y bacterias que degradan algunos de los materiales de la pared celular; a pesar de que es un proceso muy lento, estos organismos tienen un papel fundamental en el reciclaje del carbono de regreso al ecosistema (Aro *et al.*, 2005).

Una potencial aplicación a las grandes cantidades de lignocelulosa que se acumulan es la obtención de biocombustibles, considerados como una fuente energética alternativa a los combustibles fósiles actualmente utilizados. Sin embargo, la complejidad y estructura compacta de la lignocelulosa la hacen más difícil de degradar enzimáticamente (Gray *et al.*, 2006).

El principal impedimento para la utilización de la biomasa es, en general, la ausencia de una tecnología de bajo costo dirigida a la recalcitrancia de la biomasa celulósica; una estrategia prometedora involucra la producción de enzimas celulolíticas, la hidrólisis de la biomasa y la fermentación de los azúcares resultantes en productos específicos en un solo proceso utilizando microorganismos celulolíticos (Lynd *et al.*, 2002).

1.1 ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR Y COMPOSICIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

La pared celular es la capa más externa y resistente de la célula vegetal, se localiza en la parte externa de la membrana plasmática. Es una estructura altamente organizada compuesta por diferentes polisacáridos, proteínas y sustancias aromáticas. Esta matriz compleja actúa como determinante de la morfología de la planta (Carpita *et al.*, 2001). Está formada principalmente por celulosa, hemicelulosa y el polímero fenólico lignina y puede presentar un grosor de ~ 0.1 a $10 \mu\text{m}$ que contrasta con los $< 0.01 \mu\text{m}$ de la membrana celular compuesta de fosfolípidos y proteínas (Figura 1) (Fry, 2001). La composición y porcentajes de los polímeros varían entre las diferentes especies de plantas, incluso la composición dentro de una misma planta es distinta de acuerdo a la edad, etapa de crecimiento y otras condiciones (Zhang and Lynd, 2004). La estructura de la pared celular está diseñada para realizar una gran cantidad de funciones opuestas. Por un lado, es

responsable de la resistencia a la tensión, así como de dar forma a la célula y de conferir resistencia contra patógenos; por otro lado, debe ser capaz de mantener una flexibilidad razonable contra la fuerzas de rompimiento y un grado mínimo de permeabilidad para permitir que las moléculas señalizantes puedan entrar a la célula (Levy *et al.*, 2002).

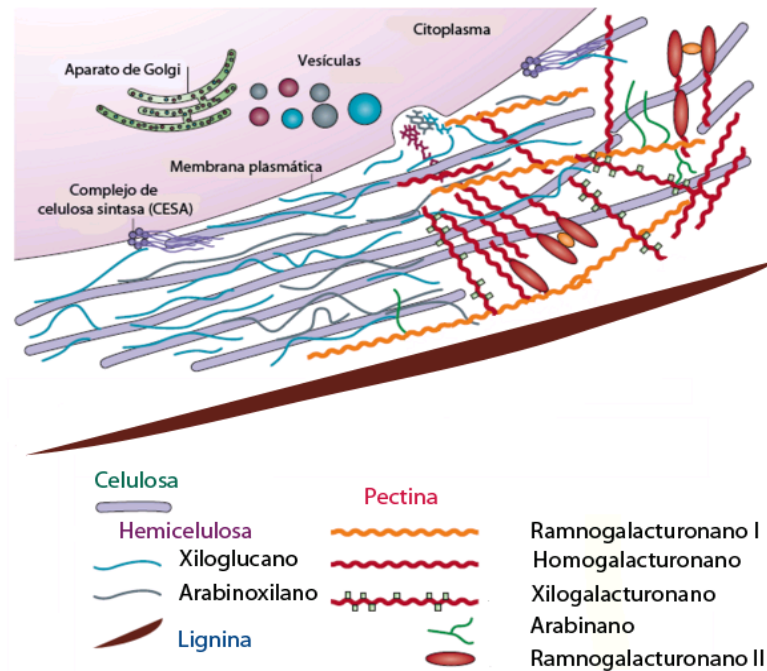


Figura 1. Composición de la pared celular vegetal. La pared celular está formada básicamente por los polisacáridos de celulosa, hemicelulosa y pectina y el polímero fenólico de la lignina. Ésta última forma una matriz que protege a los polisacáridos. Modificado de Cosgrove (2005).

CELULOSA

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza, es altamente estable e insoluble en agua. Se encuentra en la pared celular de las plantas donde es el principal componente, constituye el 50% del peso seco de la madera y dependiendo del origen puede tener un grado de polimerización de alrededor de 2000-25000 unidades de glucosa (Levy *et al.*, 2002; Hildén and Johansson, 2004).

La celulosa está compuesta de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos β -1,4 que forman moléculas de celobiosa (dímero de glucosa unido por un enlace β -1,4) las cuales, a su vez, se estructuran en filamentos de celulosa no ramificados (Pérez *et al.*, 2002). En la naturaleza, la celulosa nunca se encuentra como cadena sencilla, desde el momento de la síntesis se estructura en filamentos los cuales forman las microfibrillas, con un diámetro de 5-15 nm, las cuales pueden contener desde 36 hasta más de 1200 filamentos de celulosa (Figura 2a) (Levy *et al.*, 2002).

Debido a la estructura química de la molécula de glucosa y al enlace glucosídico que forma, se pueden identificar dos extremos en los filamentos de celulosa: el reductor y el no reductor, las unidades de glucosa se adicionan en el extremo reductor, donde el carbono anomérico (C1) está libre y es capaz de formar el enlace glucosídico permitiendo el crecimiento de la cadena (Figura 2b).

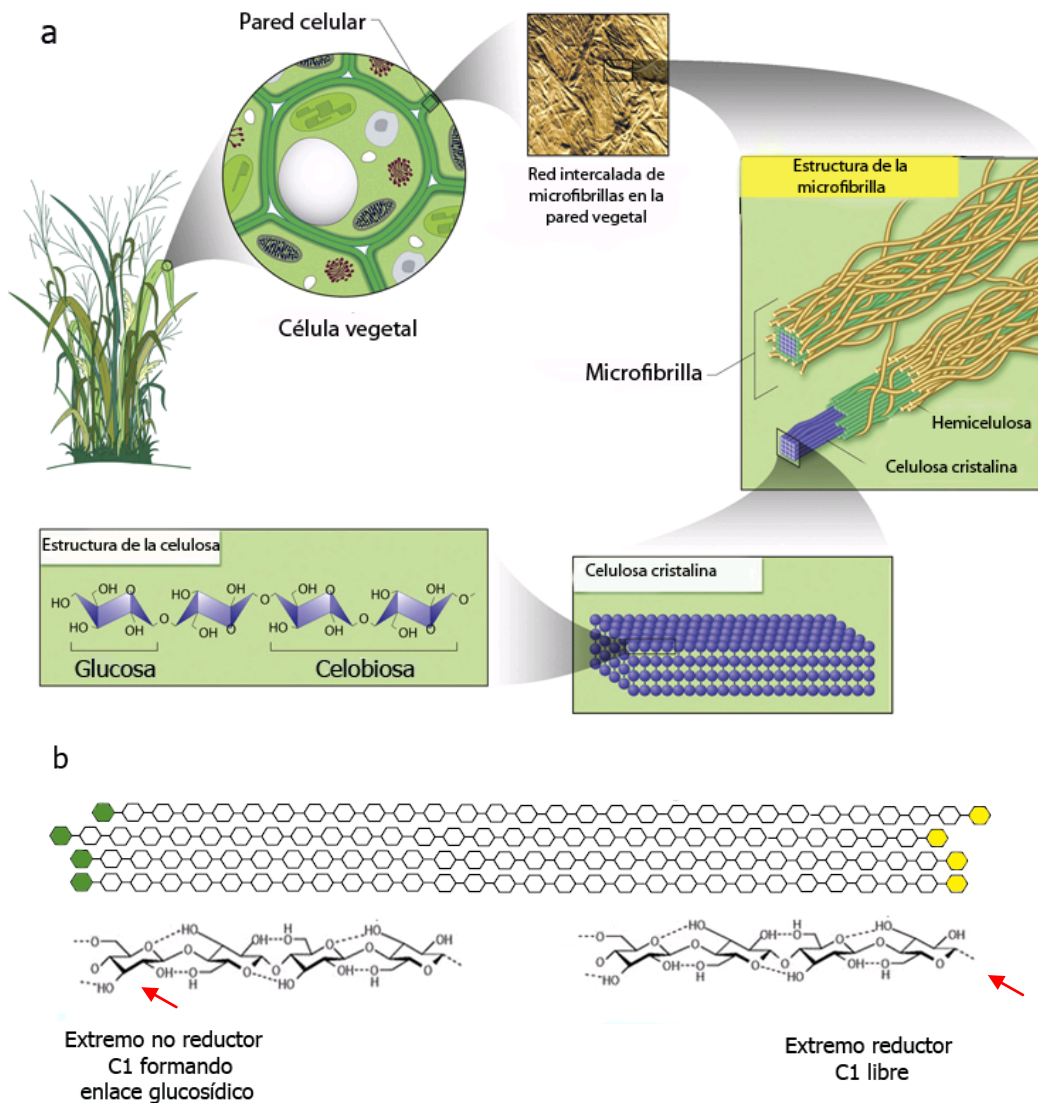


Figura 2. Estructura de la pared celular vegetal. a) La celulosa forma filamentos estructurados en microfibrillas que presentan regiones cristalinas y amorfas rodeadas de la hemicelulosa. (Departamento de energía, USA <http://genomicscience.energy.gov/roadmap>). b) Extremos reductor (amarillo) y no reductor (verde) del filamento de celulosa, la flecha roja señala el carbono anomérico (C1).

La configuración del enlace β glucosídico le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals que forman una estructura cristalina y organizada resistente a la hidrólisis en ciertas áreas de la microfibrilla (Pérez *et*

al., 2002). Las regiones cristalinas altamente organizadas están separadas por celulosa no organizada o amorfa que se presenta en pequeños porcentajes (5-20%), en esta última conformación la celulosa es más susceptible a la degradación enzimática (Atalla, 1993; Béguin and Aubert, 1994).

La celulosa es un sustrato muy resistente que se encuentra entrelazado a su vez con la hemicelulosa y la lignina, formando una estructura altamente resistente a la degradación, por lo que sólo algunos organismos celulolíticos son capaces de hidrolizarla (Hildén and Johansson, 2004).

En la celulosa presente en la naturaleza, el índice de cristalinidad varía entre 40% y 95%, el resto es celulosa amorfa (Hildén and Johansson, 2004). En la Tabla 1 se muestran algunos sustratos con distintos grados de polimerización e índice de cristalinidad.

Tabla 1. Grado de polimerización e índice de cristalinidad de sustratos celulósicos.

Modificado de Percival Zhang *et al.*, (2006).

Sustrato	Grado de polimerización	Índice de cristalinidad
<i>Soluble</i>		
Celodextrinas	2-6	ND
Carboximetilcelulosa (CMC)	100-2000	ND
<i>Insoluble</i>		
Algodón	1000-3000	0.80-0.95
Papel Whatman 1	750-2800	0.45
Celulosa bacteriana	600-2000	0.80-0.95
Avicel PH-101	150-500	0.50-0.60
Solka floc	750-1500	0.40-0.70
Sustratos celulósicos pretratados	400-1000	0.40-0.70

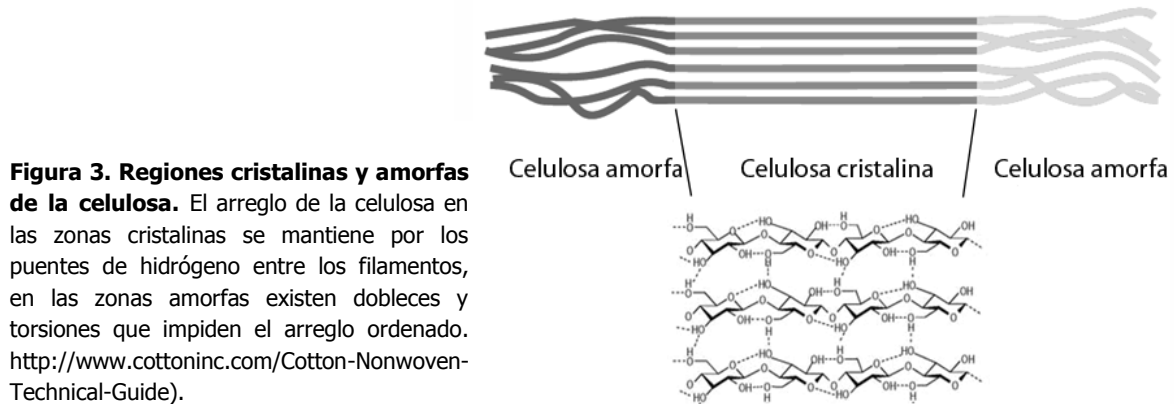
ND, no detectable.

CRISTALINIDAD DE LA CELULOSA

En la naturaleza, la celulosa es sintetizada por las proteínas CESA (Cellulose Synthase) que se encuentran embebidas en la membrana plasmática, en arreglos hexaméricos llamados "partículas rosetas" (Kimura, 1999). Una característica importante de la celulosa es su estructura cristalina, estructura poco común en los polisacáridos. Una vez sintetizados los filamentos de celulosa, éstos se unen por puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, la unión entre los filamentos adyacentes de celulosa se mantiene por fuerzas de van der Waals; a pesar de la debilidad de estas interacciones, su efecto total sobre los residuos de la fibra mantiene las uniones (Pizzi and Eaton, 1985).

La estructura cristalina de la celulosa implica un arreglo estructural en el cual todos los átomos están fijos en posiciones discretas respecto unos de otros. Una característica del arreglo cristalino es

que los filamentos de celulosa que forman las microfibrillas están lo suficientemente empaquetados para evitar la entrada no solamente de enzimas, sino también de moléculas más pequeñas como el agua. Las fibras de celulosa en la naturaleza no son exclusivamente cristalinas, éstas pueden contener regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática, donde la cristalinidad se ha perdido, además de dobleces y torsiones así como microporos en la superficie (Figura 3) (Lynd *et al.*, 2002). La celulosa amorfa difiere de la cristalina en cuanto al patrón que presentan los puentes de hidrógeno que unen los filamentos de celulosa.



La celulosa utilizada para estudios de hidrólisis varía considerablemente en sus características estructurales, por ejemplo, la celulosa microcristalina (Avicel y Sigmacell) es celulosa pura obtenida a partir de tratamientos químicos donde se ha removido la hemicelulosa y las regiones amorfas de la fibra. La complejidad estructural de la celulosa pura y la dificultad para trabajar con sustratos insolubles ha llevado a la utilización de un tipo de celulosa soluble, la carboximetilcelulosa, CMC, que contiene regiones amorfas susceptibles de ser hidrolizadas (Lynd *et al.*, 2002).

EFFECTO DE LA MERCERIZACIÓN SOBRE LA CRISTALINIDAD DE LA CELULOSA

La mercerización o tratamiento alcalino es el proceso por el cual la fibra de celulosa se somete a una interacción con una solución acuosa de una base relativamente concentrada causando un hinchamiento de la fibra, una estructura fibrilar más visible y un cambio en las propiedades mecánicas logrando mayor fuerza de tensión y brillo (Wang *et al.*, 2008; Gemci, 2010).

Durante la mercerización, ocurre un hinchamiento que inicia en las zonas amorfas, lo que causa un rearrreglo de los filamentos con conformación paralela de la celulosa I a una conformación antiparalela llamada celulosa II (Figura 4). El cambio de la celulosa tipo I al tipo II consiste básicamente en una modificación de los puentes de hidrógeno que mantienen unidos los filamentos de celulosa (Fischer *et al.*, 2005).

La mercerización consiste en tratar un sustrato celulósico (algodón, Avicel, fibras naturales) con NaOH al 15-25% a una temperatura de 25-60°C por periodos de tiempo variables (1-18 horas) según

el sustrato, después de este tiempo se lava con agua destilada hasta que el pH es neutro (Langan *et al.*, 2001; Gavillon and Budtova, 2007).

El NaOH causa una disminución en el grado de polimerización de los compuestos, reduciendo el número de monómeros de azúcar que conforman el sustrato y facilitando su degradación enzimática (Wang *et al.*, 2008) (ver Tabla 1). Asimismo, el tratamiento con NaOH a una concentración del 10% causa una transformación en las zonas cristalinas de la celulosa: de celulosa I a celulosa II, aunque la concentración de NaOH para una completa transformación varía de acuerdo al tipo de celulosa en estudio (Zugenmaier, 2001).

La cristalinidad de la celulosa es uno de los principales parámetros para determinar sus propiedades de accesibilidad para la degradación enzimática. La celulosa producida en la naturaleza (madera, algodón, celulosa bacteriana) es cristalina y está constituida principalmente de celulosa I en las zonas cristalinas, la cual puede cambiar a celulosa II por efecto de la mercerización, este tipo de celulosa también es un empaquetamiento cristalino y ordenado irreversible (Fischer *et al.*, 2005; Röder *et al.*, 2006). Se ha propuesto que la estructura cristalina de la celulosa II podría contener también regiones desordenadas o poco homogéneas (Langan *et al.*, 2001).

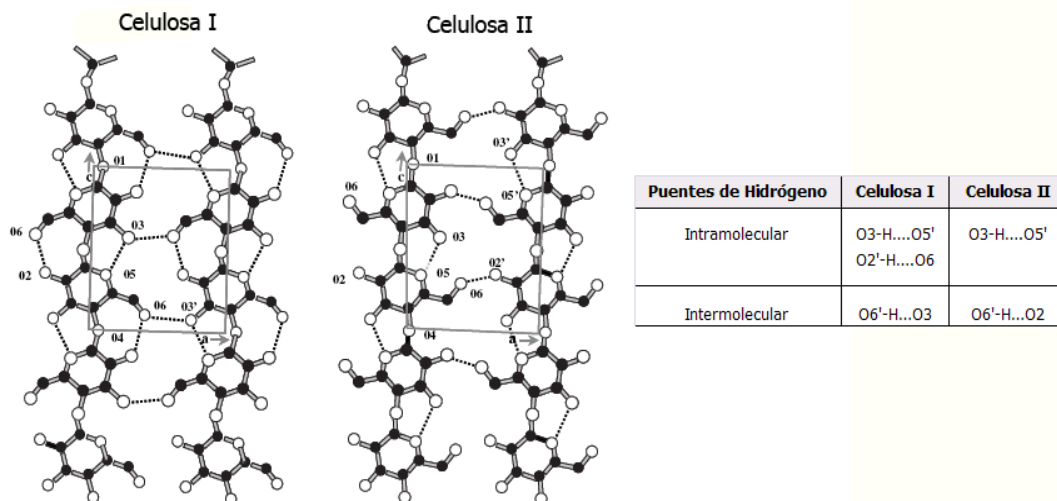


Figura 4. Puentes de hidrógeno intra e intermoleculares de los filamentos de celulosa. El tipo de enlace varía en la celulosa I y celulosa II como se muestra en el cuadro. En la celulosa I, los filamentos de celulosa tienen una orientación paralela y en la celulosa II su orientación es antiparalela. Modificado de Oh *et al.* (2005).

HEMICELULOSA

Le hemicelulosa constituye el 25-30% del total del peso seco de la madera, es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado principalmente por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) usualmente acetiladas que forman cadenas ramificadas, además de los azúcares ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico.

Los azúcares están unidos por enlaces glucosídicos β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 (Pérez *et al.*, 2002) (Figura 5). En contraste con la celulosa, la hemicelulosa posee ramificaciones laterales cortas formadas de distintos azúcares que favorecen su hidrólisis (Pérez *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2005). La hemicelulosa se clasifica en xilanos, xiloglucanos, mananos, glucomanos y glucanos unidos por enlaces β -(1,3, o 1,4). El xilano es el componente más abundante de la hemicelulosa (contribuye con más del 70% de la composición) y está formado por la unión β -1,4 de unidades de D-xilosa. Puede tener diversas sustituciones, originando los arabinoxilanos (si contiene arabinosa) presentes en los pastos o los glucuronoxilanos y glucuronoarabinoxilanos (si contiene residuos glucosa y glucosa-arabinosa, respectivamente) que son los principales componentes de la pared secundaria de las dicotiledóneas. Además de la xilosa, los xilanos pueden contener arabinosa, ácido glucurónico o 4-O-metil éter-ácido glucurónico, ácido acético, ferúlico o ácidos p-coumáricos.

La composición y frecuencia de las ramificaciones depende del origen de la hemicelulosa (Saha, 2003). En las maderas duras (madera de árboles que cambian hojas: álamo, abedul, olmo), la hemicelulosa principal es el xilano, en donde el 60-70% de los residuos de xilosa están acetilados, en tanto que en las maderas suaves (madera de coníferas: pino, cedro), la hemicelulosa principal es el glucomanano (Kumar *et al.*, 2008).

En los mananos y galactomananos de la hemicelulosa el esqueleto principal lo forman residuos de manosa unidos por enlaces β -1,4, y en los glucomanos el esqueleto de manosa está ramificado aleatoriamente con residuos de manosa y glucosa. Todas las hemicelulosas presentan diferencias estructurales entre especies así como entre los diferentes tipos celulares de las plantas (Kumar *et al.*, 2008; Scheller and Ulvskov, 2010).

Los distintos tipos de hemicelulosas son sintetizados por glicosiltransferasas que se localizan en las membranas del aparato de Golgi (Scheller and Ulvskov, 2010).

La función más importante de la hemicelulosa es que actúa como conexión entre la lignina y las fibras de celulosa otorgándole mayor rigidez a la red celulosa-hemicelulosa-lignina. La lignina y la hemicelulosa se mantienen unidos de manera predominante a través de enlaces tipo éster entre la arabinosa de la hemicelulosa y los hidroxilos de la lignina, en tanto que la unión con la celulosa es a través de puentes de hidrógeno (Laureano-Perez *et al.*, 2005).

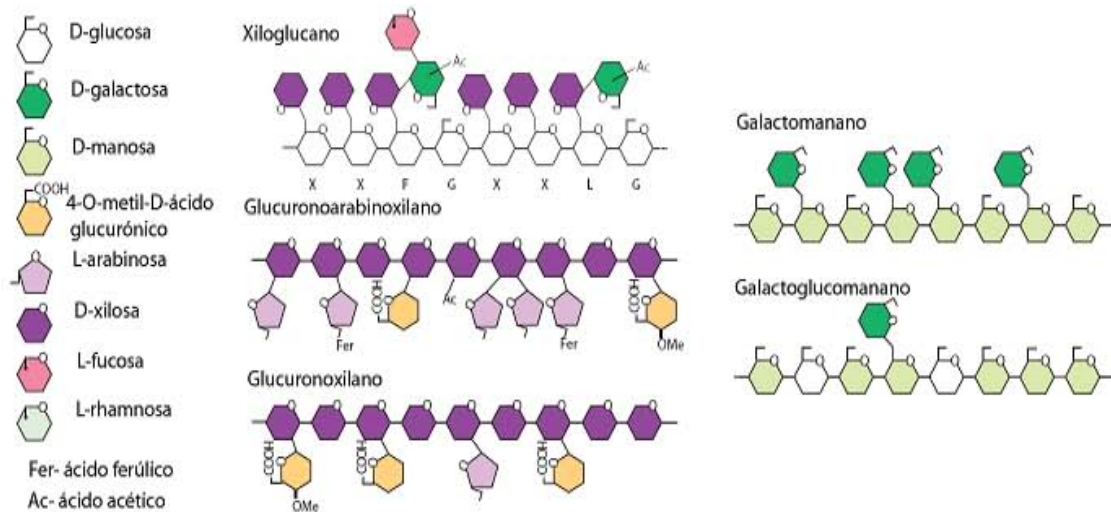


Figura 5. Estructuras de los diferentes tipos de hemicelulosa en las paredes vegetales. Los xiloglucanos, xilanos y mananos pueden estar sustituidos con distintos azúcares o ácidos formando hemicelulosas más complejas. Modificado de Scheller and Ulvskov, 2010.

LIGNINA

La lignina es, después de la celulosa y la hemicelulosa, uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza. Es altamente resistente a la degradación química y biológica y se encuentra como parte de la pared celular confiriendo soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque de los microorganismos. La lignina y la hemicelulosa forman una matriz amorfa en donde las fibras de celulosa se encuentran embebidas y protegidas de la degradación (Sánchez, 2009).

Estructuralmente, la lignina es un heteropolímero irregular, insoluble y ramificado formado por la polimerización de tres alcoholes aromáticos de tipo fenil-propano: alcohol coumarílico (p-hidroxifenol propanol), coniferílico (guaiacil propanol) y sinapílico (siringil propanol) unidos por enlaces C-C y enlaces tipo éter entre los anillos aromáticos; este polímero da rigidez y protege a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa), además de que constituye del 20-30% de la madera de los árboles (Figura 6) (Cunningham and López, 1994; Hammel, 1996; Aro *et al.*, 2005).

En las maderas suaves el principal constituyente es el alcohol coniferílico y en las maderas duras son el alcohol coumarílico y sinapílico (Martínez *et al.*, 2005). La lignina es el componente más recalcitrante de degradar del material lignocelulósico y se ha propuesto que este paso es limitante para el uso y la hidrólisis de los polisacáridos que protege, son pocos los organismos que pueden mineralizarla (Cunningham and López, 1994).

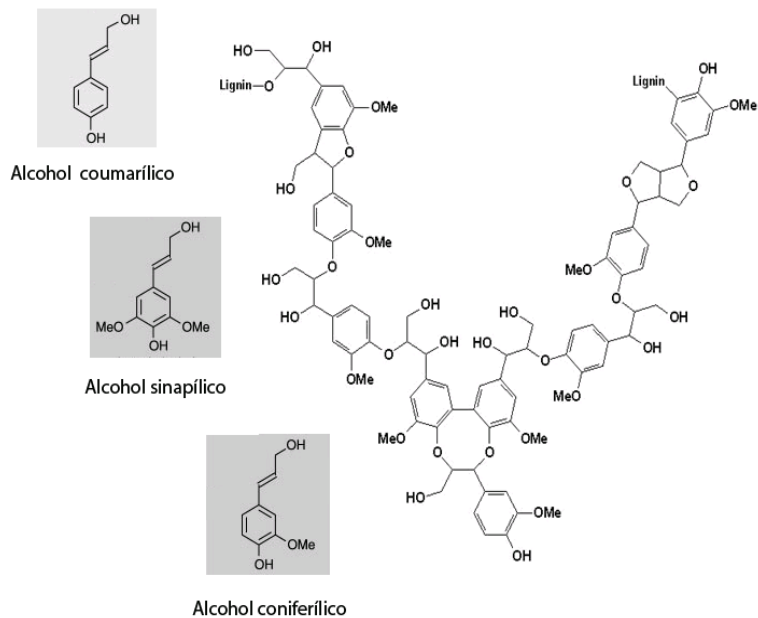


Figura 6. Estructura de la lignina. Por su composición, la lignina confiere resistencia a la degradación química y enzimática. Modificado de Boerjan *et al.*, 2003.

1.2 BIODEGRADACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

ORGANISMOS DEGRADADORES DE LIGNOCELULOSA

Existen diferentes organismos capaces de degradar los componentes del material lignocelulósico, entre los que se encuentran algunos géneros del Dominio Bacteria y hongos del Dominio Eucarya.

Bacterias celulolíticas

Entre las bacterias aerobias y anaerobias existen distintas estrategias para la degradación del material celulolítico. Generalmente, las bacterias anaerobias degradan la celulosa a través de sistemas enzimáticos celulolíticos organizados en complejos localizados en la superficie celular llamados celulosomas (Figura 7). Por el contrario, las bacterias celulolíticas aerobias degradan la celulosa a través de la producción de enzimas extracelulares con actividades de celulasas (Schwarz, 2001).

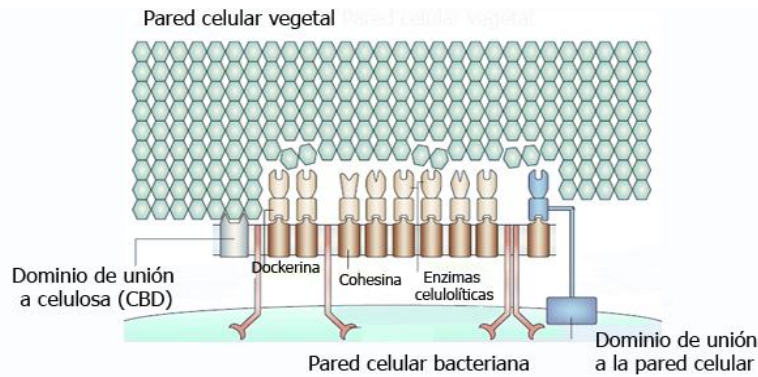


Figura 7. Estructura del celulosoma bacteriano (*Clostridium cellulovorans*). Las enzimas hidrolíticas se encuentran ancladas a la pared celular de la bacteria a través de la proteína dockerina, el dominio de unión a celulosa (CBD) facilita la unión al sustrato. Modificado de Doi and Kosugi (2004).

Se han identificado bacterias aerobias con capacidades celulolíticas del orden Actinomycetales (phylum Actinobacteria) que se localizan en el suelo, el agua, el humus, los desechos agrícolas como la caña de azúcar y las hojas en descomposición (Doi, 2008). En bacterias aerobias como *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa*, *Streptomyces lividans* y *Cellulomonas fimi* se han reportado sistemas enzimáticos de celulasas y xilanasas para degradar los componentes de la pared celular (Arcand *et al.*, 1993; Khanna and Gauri, 1993; Braithwaite *et al.*, 1995).

Las bacterias anaeróbicas del orden Clostridiales (phylum Firmicutes), se localizan generalmente en el suelo, sobre desechos vegetales en descomposición, el rumen de animales, el tracto de las termitas, las compostas, las aguas residuales y las plantas de procesamiento de madera; las bacterias que se encuentran en el rumen de algunos animales y el tracto de las termitas procesan el material vegetal para la nutrición del organismo huésped (Doi, 2008). Algunas bacterias anaerobias con capacidad celulolítica son: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Clostridium cellulovorans*, *C. cellulolyticum* y *C. thermocellum* para las que se tienen caracterizadas celulasas y xilanasas (Lin and Thomson, 1991; Murty and Chandra, 1992; Tomme *et al.*, 1995).

En ambientes extremos también se han identificado microorganismos celulolíticos, como la bacteria antártica *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Sonan *et al.*, 2007).

Existen bacterias como *Azospirillum lipoferum* que poseen lacasas, estas enzimas tienen un papel importante en la utilización de compuestos fenólicos de las plantas y en el transporte de electrones (Givaudan *et al.*, 1993; Alexandre *et al.*, 1999). También se han identificado en bacterias marinas como *Marinomonas mediterranea* (Solano *et al.*, 1997).

Hongos degradadores de lignocelulosa

Los hongos son conocidos como agentes de la descomposición de la materia orgánica en general y de los sustratos celulósicos en particular (Lynd *et al.*, 2002).

Dentro de los hongos, los basidiomicetos son los que realizan de manera más eficiente este proceso, de hecho están considerados como los principales degradadores de los componentes de la madera debido a su habilidad para degradar o modificar la lignina (Lynd *et al.*, 2002; Dashtban *et al.*, 2009; Sánchez, 2009). La capacidad de los hongos para degradar eficientemente la lignocelulosa se ha asociado con el crecimiento del micelio que les permite transportar nutrientes escasos como el nitrógeno y hierro así como también utilizar el sustrato lignocelulósico como su fuente de carbono (Hammel, 1996).

En general, los hongos se pueden clasificar de acuerdo al compuesto degradado y su consistencia en: i) hongos de podredumbre blanca, que son basidiomicetos que degradan simultáneamente la lignina y todos los componentes de la madera hasta CO₂ y H₂O; ii) hongos de podredumbre café, que representan el 7% de los basidiomicetos que degradan los polisacáridos de la madera después de degradar parcialmente a la lignina, lo que produce un material café que contiene lignina oxidada; y iii) hongos de podredumbre blanda, que incluyen ascomicetos que colonizan restos de madera generando un ablandamiento característico en la superficie del tejido tras atacar la madera, de la cual, degradan todos sus componentes con excepción de la lignina de la lámina media (Martínez *et al.*, 2005).

En los hongos, la utilización del material lignocelulósico está ampliamente distribuida desde los Chitridiomycetos hasta los Basidiomicetos.

En los hongos anaerobios Chitridiomycetos se han reportado diversas especies celulolíticas que habitan en el tracto gastrointestinal de animales rumiantes (Lee *et al.*, 1997). Los cinco géneros de hongos anaerobios más estudiados son *Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* y *Piromyces* (Nicholson *et al.*, 2005). Estos hongos, a diferencia de los hongos aerobios, producen grandes complejos multienzimáticos de celulasas y hemicelulasas similares a los celulosomas bacterianos (Eberhardt *et al.*, 2000; Steenbakkers *et al.*, 2001) (Tabla 2).

En los hongos aerobios, que habitan en la hojarasca de los suelos y en los restos de madera, la capacidad celulolítica también está representada, en los Zigomicetos, sólo los hongos del género *Mucor* poseen una actividad celulolítica importante, por el contrario, en los Ascomicetos y Basidiomicetos existe gran número de géneros celulolíticos como *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Schizophyllum*, *Volvariella*, *Pycnoporus* y *Bjerkandera* (Lynd *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2006; Koseki *et al.*, 2008; Quiroz-Castañeda *et al.*, 2009) (ver Anexo I para una explicación detallada acerca de la actividad celulolítica de *P. sanguineus*). Algunos de los hongos ascomicetos aerobios más estudiados por su importancia industrial son *Trichoderma reesei* y *Phanerochaete chrysosporium* (Doi, 2008) (Tabla 2).

Tabla 2. Ejemplos de algunos hongos celulolíticos aerobios y anaerobios, enzimas que producen y sustratos que degradan. Recopilado de Dashtban *et al.* (2009) y Quiroz-Castañeda *et al.* (2010).

	Grupo	Hongo	Enzimas producidas	Sustrato
Hongos Aerobios Enzimas lignocelulolíticas extracelulares	Ascomicetos	<i>T. reesei</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL) Hemicelulasas (Xilanasas)	Paja de trigo
		<i>T. harzianum</i>	Celulasas (CMCasa, CBH) β -1,3 glucanasas	Paja de trigo
		<i>A. niger</i>	Celulasas, Xilanasas	Bagazo de caña de azúcar
	Basidiomicetos	<i>P. chrysosporium</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL) Peroxidasas, Hemicelulasas (Xilanasas)	Aserrín de cedro, semillas de uva, cascarilla de centeno
		<i>F. palustris</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL)	Celulosa microcristalina
		<i>P. sanguineus</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL) Hemicelulasas (Xilanasas)	Paja de trigo, aserrín de cedro, cascarilla de arroz, rastrojo de maíz, cascarilla de <i>Jatropha</i>
		<i>B. adusta</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL) Hemicelulasas (Xilanasas)	
Hongos Anaerobios Celulosomas	Anaeromyces	<i>Anaeromyces mucronatus</i>	Celulasa (CMCasa) Hemicelulasa (Xilanasas)	Heno
	Caecomyces	<i>Caecomyces comunis</i>	Celulasas, Hemicelulasas (Xilanasas, b-D-xilosidasa)	Olote de maíz
	Neocalimastix	<i>Neocalimastix frontalis</i>	Celulasas, Hemicelulasas (Xilanasas, b-galactosidasa)	Fibra de algodón, paja de trigo
	Piromyces	<i>Piromyces sp.</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL) Hemicelulasas (Xilanasas y mananasas)	Olote de maíz
	Orpinomyces	<i>Orpinomyces sp.</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL) Hemicelulasas (Xilanasas y mananasas)	Paja de trigo

Recientemente, ha llamado la atención el estudio de los hongos basidiomicetos de hábitats distintos a la madera, por ejemplo, los que descomponen la basura orgánica y las especies que forman micorrizas, contribuyendo así a tener un mejor panorama de los distintos procesos que tienen estos hongos para degradar la celulosa (Baldrian and Valášková, 2008).

Debido a que los sustratos lignocelulósicos son insolubles, su degradación debe ocurrir de manera extracelular. Los organismos aerobios degradadores de celulosa, tanto bacterias como hongos, son capaces de utilizar la celulosa a través de la producción en grandes cantidades de enzimas extracelulares (Lynd *et al.*, 2002). En los hongos, existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: el sistema hidrolítico, en el que se producen hidrolasas responsables de la degradación de la celulosa (celulasas) y la hemicelulosa (hemicelulasas); y el sistema ligninolítico

oxidativo, que despolimeriza la lignina mediante reacciones de oxidación (peroxidasas y lacasas) y abre los anillos fenólicos (Pérez *et al.*, 2002; Sánchez, 2009). A continuación se hace una descripción de cada una de estas enzimas, destacando a las celulasas.

1.3 CELULASAS

Las celulasas son O-glucósido hidrolasas (GHs) que hidrolizan el enlace β -1,4 de la celulosa. Se encuentran de manera predominante en organismos procariontes y hongos (Hildén and Johansson, 2004). Su tamaño oscila entre 14–170 kDa e involucra un complejo de por lo menos tres actividades diferentes, para llevar a cabo la hidrólisis total de la celulosa (Ponce and Pérez, 2002).

Se han descrito más de una decena de especies de hongos productores de celulasas, destacándose particularmente las especies de *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *A. terreus*, (todos ellos patógenos), *T. reesei*, y *P. chrysosporium* conocidos por su capacidad celulolítica (Cunningham and López, 1994). En la levadura marina *Aureobasidium pullulans* también se han identificado genes de celulasas (Chi *et al.*, 2009).

En el nemátodo *Bursaphelenchus xylophilus* que infecta al pino, se ha identificado una familia de celulasas (GH45) posiblemente obtenidos por transferencia horizontal (Kikuchi *et al.*, 2004).

Actualmente, las GHs están clasificadas de acuerdo a su secuencia de aminoácidos en familias de celulasas [CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes, <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>)], en donde 14 de las 122 familias corresponden a celulasas (Tabla 3).

Tabla 3. Ejemplos de algunas familias de celulasas y su distribución.

Modificado de Polaina and MacCabe (2007).

Familia GH	Actividad	Bacterias	Hongos	Plantas	Aa que participan en la hidrólisis	
					Nucleófilo/base	Donador de protones
1	β -glucosidasa	+	+	+	Ac. Glutámico	Ac. Glutámico
5	Endoglucanasa	+	+	+	Ac. Glutámico	Ac. Glutámico
7	Endoglucanasa		+		Ac. Glutámico	Ac. Glutámico
	Exoglucanasa					
9	Endoglucanasa	+	+	+	Ac. Aspártico	Ac. Glutámico
	Exoglucanasa					
10	Exoglucanasa	+	+	+	Ac. Glutámico	Ac. Glutámico
12	Endoglucanasa	+	+		Ac. Glutámico	Ac. Glutámico
16	Endo-1,3(4)- β -glucanasa	+	+	+	Ac. Glutámico	Ac. Glutámico
45	Endoglucanasa	+	+		Ac. Aspártico	Ac. Aspártico
48	Endoglucanasa	+	+		NI	Ac. Glutámico
51	Endoglucanasa	+	+	+	Ac. Glutámico	Ac. Glutámico

NI, No identificado.

ESTRUCTURA DE LAS CELULASAS

Una característica de la mayoría de las celulasas y otras glucósido hidrolasas es su estructura modular que incluye tres módulos: el módulo catalítico, un péptido de unión (linker) altamente O-glicosilado y un módulo de unión a celulosa (CBM, Cellulose Binding Module) (Figura 8a) (Lynd *et al.*, 2002). Este último dominio facilitaría la hidrólisis de la celulosa al aproximar el módulo catalítico al sustrato (Divne *et al.*, 1998).

La estructura modular no es exclusiva de las celulasas, ya que también se ha encontrado en otras enzimas que degradan la pared celular como las xilanasas, arabinofuronidasas, mananasas y acetilesterasas (Ferreira *et al.*, 1990; Kellett *et al.*, 1990).

DOMINIOS CATALÍTICOS

Los dominios catalíticos de la mayoría de las celulasas abarcan más del 70% de la secuencia total de la proteína. El análisis de los dominios catalíticos a nivel de secuencia muestra que existe una gran variabilidad entre ellos en las diferentes celulasas (Bhat and Bhat, 1997). Las celulasas presentan diferentes arreglos tridimensionales del sitio activo: en forma de túnel para una degradación procesiva tipo exo o en forma de surco o hendidura que permite una degradación tipo endo (Davies and Henrissat, 1995). El rompimiento del enlace glucosídico de la celulosa ocurre a través de un mecanismo de hidrólisis ácida, utilizando un donador de protones y un nucleófilo o base que usualmente son el ácido glutámico y el ácido aspártico (Lynd *et al.*, 2002) (Tabla 3).

MÓDULOS DE UNIÓN A CELULOSA (CBM)

Los módulos de unión a celulosa facilitan la hidrólisis al mantener el módulo catalítico cerca del sustrato a través de la unión al carbohidrato, la presencia del CBM es particularmente importante para el inicio y procesividad de las celulasas (Teeri *et al.*, 1998).

Los CBMs varían de tamaño entre 30 y 200 aminoácidos, pueden existir de uno hasta tres módulos en una proteína, se localizan tanto en el extremo amino como en el carboxilo de la secuencia proteica, uniendo la enzima y concentrándola sobre el sustrato inmovilizado (van Solingen *et al.*, 2001; Shoseyov *et al.*, 2006).

Los aminoácidos del CBM que intervienen en las interacciones son de tipo no polar y en algunas ocasiones polares (Lehtiö *et al.*, 2001). Cuando ocurre la unión del CBM a la celulosa cristalina quedan expuestos los residuos no polares, la mayoría de ellos tirosinas y triptófanos, que exponen la cara plana del anillo aromático hacia el anillo de la piranosa, esta interacción está suplementada por los residuos polares que forman puentes de hidrógeno y la estabilizan (Tomme *et al.*, 1995). Los CBMs se han encontrado en celulasas, pero también en otras enzimas que degradan polisacáridos como hemicelulasas, endomananasas y acetilxilanoesterasas (Margolles-Clark *et al.*, 1996). Se han identificado módulos de unión a celulosa en una esterasa de *Penicillium funiculosum* (Kroon *et al.*, 2000), en arabinofuranosidasas de *Aspergillus kawachii* (Bolam *et al.*, 2004) en pectato liasas de

Pseudomonas cellulose (Brown *et al.*, 2001) y en una β -glucosidasa de *P. chrysosporium* (Lymar *et al.*, 1995). La presencia de CBMs putativos también se ha reportado en endoglucanasas de plantas (Palomer *et al.*, 2004).

PÉPTIDO DE UNIÓN (LINKER)

El péptido de unión es una secuencia de aminoácidos que conecta el módulo de unión a celulosa y el dominio catalítico de las celulasas. Esta región es de 6 a 59 aa y es muy flexible para permitir la función independiente de cada uno de los dominios (Wilson and Irwin, 1999).

Las secuencias del péptido de unión varía entre las enzimas, sin embargo, su composición es típicamente rica en prolina, treonina y serina, como en las secuencias PTPTPTPTT(PT)₇ de la endoglucanasa A de *Cellulomonas fimi* (Shen *et al.*, 1991) y NPSGGNPPGGNPPGTTTTRRPATTTGSSPG de la celobiohidrolasa CBHI de *T. reesei* (Srisodsuk *et al.*, 1993). Los residuos de treonina y serina de los péptidos de unión se encuentran altamente glicosilados para ser protegidas de la proteólisis; cuando el péptido de unión está completamente ausente o es demasiado corto, los dominios de las celulasas se obstruyen entre ellos y la actividad se reduce (Shen *et al.*, 1991; Srisodsuk *et al.*, 1993).

Basados en la similitud del péptido de unión de las celulasas con el de otras proteínas como la inmunoglobulina A₁ y a proteína ribosomal L12, se ha sugerido que estos péptidos de las celulasas actúan como bisagras flexibles entre los dos dominios facilitando su función independiente (Srisodsuk *et al.*, 1993).

TIPOS DE CELULASAS

Las celulasas se clasifican de acuerdo a su actividad enzimática en 3 grupos: exoglucanasas, endoglucanasas y β -glucosidasas; algunas de ellas se han cristalizado, permitiendo deducir su estructura tridimensional (Stone, 2005).

Las **exoglucanasas o celobiohidrolasas** (CBHs) (EC 3.2.1.74; 1,4- β -D-glucanoglucanohidrolasa y EC 3.2.1.91; 1,4- β -D-glucano-celobiohidrolasa) actúan de manera progresiva sobre los extremos reductor y no reductor de las cadenas del polisacárido de celulosa liberando celobiosa como principal producto (Aro *et al.*, 2005). Estas enzimas representan del 40-70% del componente total del sistema de celulasas y son capaces de hidrolizar la celulosa cristalina (Figura 8b).

Son enzimas monoméricas, con un peso molecular entre los 50-65 kDa, aunque en algunos hongos como *Sclerotium rolfsii* son más pequeñas (41.5 kDa) (Sadana and Patil, 1988). En las exoglucanasas, la glicosilación es muy baja (<12%) o nula, su pH óptimo de actividad catalítica es entre 4-5 y su temperatura óptima es de 37 a 60°C dependiendo de la enzima y el sustrato (Hamada *et al.*, 1991; Baldrian and Valášková, 2008).

Las exoglucanasas se han identificado en hongos de podredumbre blanca y blanda, así como en el patógeno de plantas *S. rolfisii*, y sólo en unos pocos basidiomicetos de podredumbre café como *Fomitopsis palustris* (Yoon and Kim, 2005).

Las **endoglucanasas** (EGs) (EC 3.2.1.4; 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasa) cortan de manera azarosa en sitios amorfos internos de la cadena de celulosa, generando oligosacáridos de diferentes longitudes y nuevos extremos de la cadena susceptibles de ser hidrolizados por exoglucanasas (Aro *et al.*, 2005). Se considera que estas enzimas son las que inician el ataque azaroso en múltiples sitios internos de las regiones amorfas de la fibra de celulosa permitiendo la acción subsecuente de las celobiohidrolasas en los extremo reductor y no reductor recién creados (Lynd *et al.*, 1991) (Figura 8b). Las endoglucanasas son monoméricas cuyo peso molecular oscila entre los 22-45 kDa, aunque en algunos hongos como *S. rolfisii* y *Gloeophyllum sepiarium* se han identificado enzimas con el doble del tamaño (Sadana *et al.*, 1984).

En general, las endoglucanasas no están glicosiladas, sin embargo, sí llegan a contener una cantidad relativamente baja de carbohidratos (1-12%) (Baldrian and Valášková, 2008). El pH óptimo para la actividad endoglucanasa es entre 4-5 y solamente la endoglucanasa del basidiomiceto *Volvariella volvacea* expresada heterológicamente en levadura presenta un pH óptimo neutro (Ding *et al.*, 2002); la temperatura óptima de las endoglucanasas oscila entre 50 y 70°C (Valášková and Baldrian, 2006).

Las endoglucanasas se han aislado de hongos basidiomicetos de la podredumbre blanca y café, del patógeno *Sclerotium rolfisii*, la levadura *Rhodotorula glutinis* y del simbiote de termitas *Termitomyces sp.* (Baldrian and Valášková, 2008).

Una hidrólisis exhaustiva de la celulosa también requiere de las **β -glucosidasas** (BGLs) (EC 3.2.1.21), que hidrolizan la celobiosa liberando dos moléculas de glucosa, lo cual contribuye a proveer una fuente de carbono fácilmente metabolizable (Aro *et al.*, 2005) (Figura 8b). Estas enzimas son producidas por hongos de podredumbre blanca y café, así como por hongos que forman micorrizas, patógenos de plantas y levaduras (Baldrian and Valášková, 2008). Las β -glucosidasas tienen un tamaño de 35-640 kDa, existen enzimas de ~100 kDa que son monoméricas y también se han aislado enzimas homo-oligoméricas de la levadura *Rhodotorula minuta* (Onishi and Tanaka, 1996).

La mayoría de las β -glucosidasas están glicosiladas y en algunos casos, como en la BGL de 300 kDa de *Trametes versicolor*, la glicosilación puede ser superior al 90%; tienen un pH óptimo entre 3.5-5.5 y una temperatura óptima en un intervalo de 45-75°C (Dashtban *et al.*, 2009).

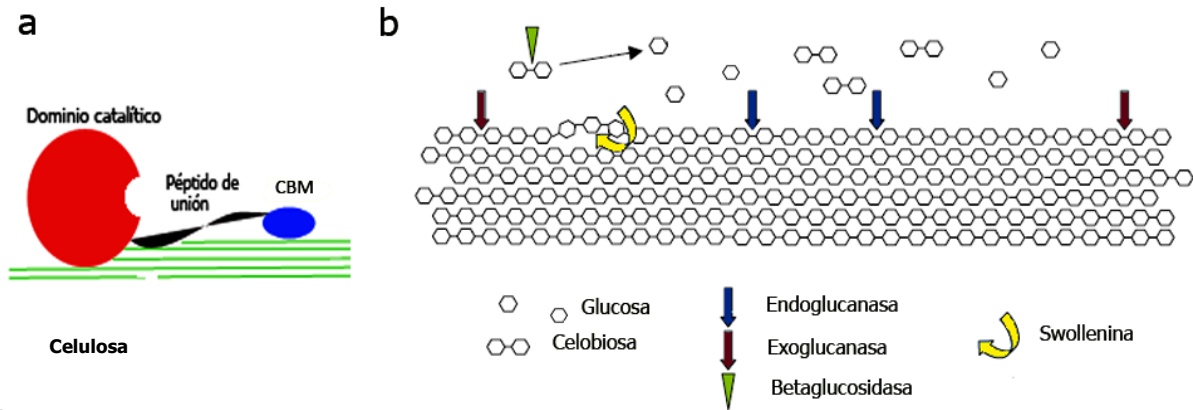


Figura 8. Degradación de la celulosa por la acción sinérgica de las celulasas. a) Estructura modular de la celulasas, poseen un dominio catalítico, un CBM y el péptido de unión. b) Modelo esquemático del sistema celuloalítico. Se muestran los sitios de actividad de las celulasas como parte del mecanismo sinérgico para una degradación eficiente. La función propuesta de la swollenina es romper los puentes de hidrógeno que mantienen unidos los filamentos de celulosa para favorecer la entrada de las celulasas. Modificado de Aro *et al.* (2005).

INTERACCIONES SINÉRGICAS ENTRE CELULASAS

Los sistemas enzimáticos de celulasas presentan una actividad colectiva mucho mayor que la suma de las actividades individuales de las enzimas, un fenómeno conocido como sinergia (Lynd *et al.*, 2002).

La hidrólisis de la celulosa mediada por enzimas es el resultado de una acción sinérgica entre las endoglucanasas y las exoglucanasas para producir celobiosa, que es degradada a glucosa por las β -glucosidasas, la actividad de éstas últimas disminuyen la inhibición por producto (celobiosa) de las celobiohidrolasas y endoglucanasas (Woodward, 1991; Irwin *et al.*, 1993; Lynd *et al.*, 2002). Las actividades complementarias de las endo y exoglucanasas también promueven un mecanismo sinérgico, así mismo, se ha observado sinergia entre dos tipos diferentes de celobiohidrolasas (una que actúa sobre el extremo no reductor, CBHI y otra sobre el extremo reductor, CBHII) y entre endoglucanasas (Irwin *et al.*, 1993; Nidetzky *et al.*, 1994; Mansfield and Meder, 2003).

Se han reportado cuatro tipos de mecanismos sinérgicos: I) sinergia endo-exo; que ocurre entre endo y exoglucanasas, en donde la acción de las endoglucanasas provee cadenas con extremos libres sobre los cuales actúan las exoglucanasas; II) sinergia exo-exo, entre exoglucanasas que actúan sobre los extremos reductores y no reductores de las cadenas de celulosa; III) sinergia entre exoglucanasas y β -glucosidasas que procesan la celobiosa generada como producto final de la acción de las primeras enzimas y, IV) sinergia intramolecular entre el dominio catalítico y CBM de las celulasas (Teeri, 1997).

Los sistemas de celulasas no son solamente una acumulación de enzimas representando los tres tipos de éstas, sino que actúan de manera coordinada para hidrolizar eficientemente la celulosa (Lynd *et al.*, 2002).

1.4 HEMICELULASAS

La hemicelulosa es biodegradada a azúcares monoméricos y ácido acético. El xilano es el principal carbohidrato de la hemicelulosa y su degradación completa requiere la acción cooperativa de varias enzimas hidrolíticas como las xilanasas y otras enzimas accesorias (Pérez *et al.*, 2002). La mayoría de las hemicelulasas son glicósido hidrolasas, aunque algunas hemicelulasas son carbohidrato esterasas que hidrolizan los enlaces éster que unen al acetato o al ácido ferúlico con los azúcares ramificados.

Las **xilanasas** son las principales enzimas que participan en la degradación de la hemicelulosa, dentro de este grupo se encuentran las endoxilanasas (EC 3.2.1.8; endo-1,4- β -D-xilanasas) que actúan sobre la cadena principal del polisacárido rompiendo los enlaces entre las unidades de xilano y liberando oligosacáridos, las **β -xilosidasas** (EC 3.2.1.37; xilano 1,4- β -xilosidasa) liberan xilosa a partir del rompimiento del enlace de los oligosacáridos de xilano (Pérez *et al.*, 2002; Aro *et al.*, 2005). La degradación de la hemicelulosa requiere además de enzimas accesorias como las xilano esterasas, ferúlico y coumárico esterasas, α -arabinofuranosidasas y α -4-metil glucuronosidasas, entre otras, que actúan de manera sinérgica para hidrolizar eficientemente la hemicelulosa (Sánchez, 2009). Las xilanasas, como las enzimas celulolíticas, poseen una estructura a base de dominios catalíticos y de unión; el primero determina la especificidad y reactividad sobre el sustrato mientras que el segundo favorece la unión de la enzima con el sustrato (Pérez *et al.*, 2002) (Figura 9).

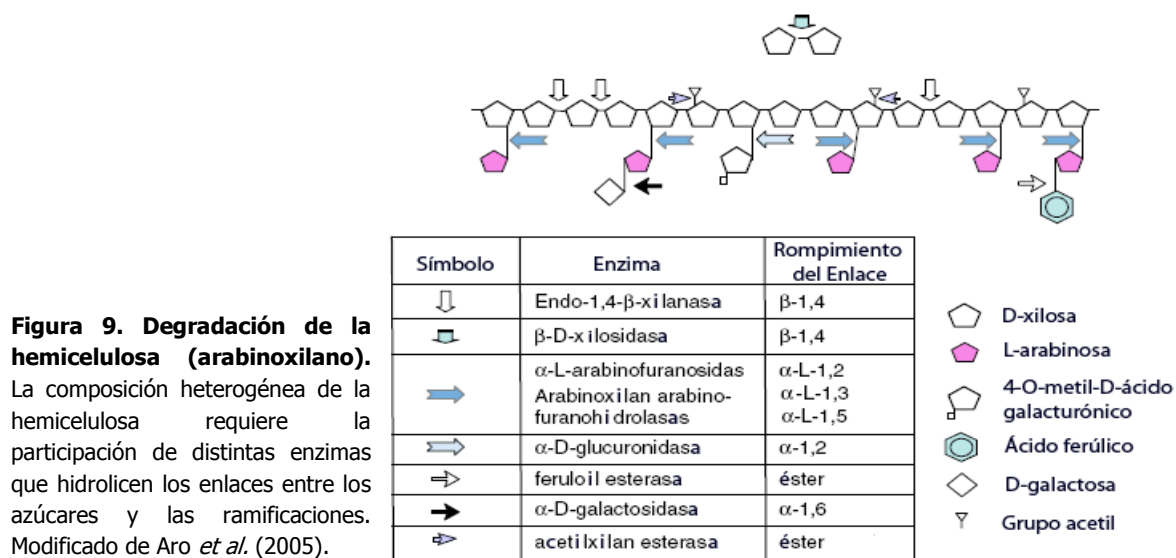


Figura 9. Degradación de la hemicelulosa (arabinoxilano).

La composición heterogénea de la hemicelulosa requiere la participación de distintas enzimas que hidrolicen los enlaces entre los azúcares y las ramificaciones. Modificado de Aro *et al.* (2005).

En diversas especies de *Aspergillus* se han clonado genes que codifican para endoxilanasas y β -xilosidasas, así mismo, también se han clonado genes de xilanasas de hongos como *Penicillium*, *Agaricus bisporus* y *Magnaporthe grisea* (Kimura *et al.*, 1995; Polizeli *et al.*, 2005).

1.5 LIGNINASAS (LACASAS Y PEROXIDASAS)

La despolimerización de la lignina involucra la participación de enzimas oxidativas extracelulares que liberan productos altamente inestables y que posteriormente sufren diferentes reacciones de oxidación (Boerjan *et al.*, 2003).

Los hongos de podredumbre blanca son los organismos degradadores de la lignina más eficientes, estos hongos poseen enzimas que participan en la ligninólisis: **peroxidadas** y **lacasas** (Pérez *et al.*, 2002). Se han caracterizado dos grupos de peroxidadas: la lignino peroxidasa (LiP; EC 1.11.1.14) y la peroxidasa dependiente de manganeso (MnP; EC 1.11.1.13) las cuales son oxidorreductasas que catalizan reacciones oxidativas de compuestos fenólicos y no fenólicos dependientes de peróxido de hidrógeno necesarias para la degradación de la lignina (Pérez *et al.*, 2002). La lignino peroxidasa es una glicoproteína con un grupo hemo en su centro activo, es la peroxidasa más efectiva y puede oxidar los compuestos fenólicos y no fenólicos de la lignina, aminas, éteres aromáticos y aromáticos policíclicos (Sánchez, 2009). La peroxidasa dependiente de manganeso es también una glicoproteína que utiliza el manganeso como sustrato y lo oxida de Mn^{2+} a Mn^{3+} , este último es un fuerte oxidante de los compuestos fenólicos de la lignina (Ikehata *et al.*, 2004).

Desde la clonación de la primera lignino peroxidasa codificada por el gen *lip* de *P. chrysosporium*, muchos otros genes *lip* han sido caracterizados en este hongo, así como también en otros hongos de podredumbre blanca como *T. versicolor*, *Phlebia radiata* y *Pleurotus eryngii* (Jeffries, 1994).

Las lacasas (EC 1.10.3.1; p-difenol dioxígeno oxidorreductasa) son polifenoloxidasas que tienen cuatro iones de cobre en su centro activo y catalizan la oxidación de muchos compuestos fenólicos y no fenólicos en presencia de mediadores acoplando la reducción del oxígeno molecular a agua (Aro *et al.*, 2005). Estas enzimas oxidan la lignina y generan radicales aromáticos altamente inestables que favorecen su despolimerización mediante el rompimiento del enlace éter C4, el rompimiento del anillo aromático y la demetoxilación (Sánchez, 2009) (Figura 10). Las lacasas se han identificado en hongos basidiomicetos como *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *T. versicolor* y *P. sanguineus* (Dantán-González *et al.*, 2008).

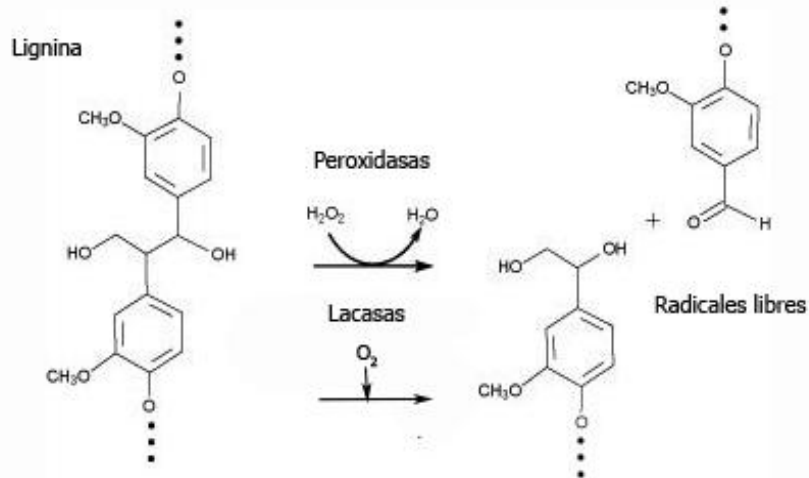


Figura 10. Peroxidasas y lacasas que degradan la lignina. Las peroxidasas y las lacasas catalizan reacciones de oxidación de sustratos fenólicos para producir radicales libres. Las peroxidasas utilizan peróxido de hidrógeno y las lacasas utilizan el oxígeno molecular como donador de electrones.

1.6 SUPERFAMILIA EXPANSINA

Las expansinas son proteínas que están involucradas en la remodelación de la pared celular a través de inducir la extensibilidad y el relajamiento del estrés de tensión en las paredes celulares de las plantas.

Estas proteínas fueron identificadas en plantas a través de estudios del mecanismo de extensión de la pared celular vegetal dependiente del pH ("crecimiento ácido") (McQueen-Mason *et al.*, 1992).

El pH de la pared celular de las plantas normalmente está determinado por la actividad de una ATPasa de H⁺ localizada en la membrana plasmática que bombea protones a la pared celular, el pH puede ser de 5.5 y disminuir hasta 4.5. Un pH extracelular bajo (<5.5) causa el relajamiento de la pared celular en gran parte por las proteínas expansinas que se encuentran en la pared celular y tienen un pH óptimo ácido (Cosgrove, 2005).

McQueen-Mason *et al.* (1992) aislaron dos proteínas de las paredes celulares de hipocotilos de pepino que inducían la extensión en las paredes celulares previamente inactivadas por calor.

Después de que estos genes que codifican para expansinas se clonaron y secuenciaron (Shcherban *et al.*, 1995), las búsquedas en bases de datos genómicas y EST mostraron que las expansinas están codificadas por familias multigénicas muy grandes identificadas desde las briofitas hasta las angiospermas (Li *et al.*, 2003b). Las expansinas se han encontrado en monocotiledóneas (arroz, maíz), dicotiledóneas (*Arabidopsis*), helechos y musgos.

Posterior al descubrimiento de las expansinas, Cosgrove *et al.* (1997) encontraron que el grupo I de alérgenos de polen de pastos tienen regiones de similitud significativa con la secuencia de

aminoácidos de las expansinas. Por ejemplo, se demostró que el extracto del polen de maíz aplicado a paredes celulares *in vitro* tiene actividad expansina. Algo similar se encontró con alérgenos de polen del grupo I de otras especies de pastos que también presentaron esta actividad, se ha propuesto la función de las proteínas con actividad expansina secretadas por el polen suavizarían el estigma y los tejidos del estilo para facilitar la penetración del polen a través del tubo polínico (Li and Cosgrove, 2001).

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LAS EXPANSINAS

Las expansinas no tienen actividad hidrolítica (glucosidasa), por lo que es probable que los enlaces que rompen sean no covalentes (Cho and Kende, 1997), de hecho, se ha propuesto que las expansinas rompen los puentes de hidrógeno que se encuentran entre los filamentos de celulosa o entre la celulosa y otros polisacáridos (xiloglucanos), a través de un mecanismo no enzimático (McQueen-Mason and Cosgrove, 1994; Wei *et al.*, 2010) (Figura 11).

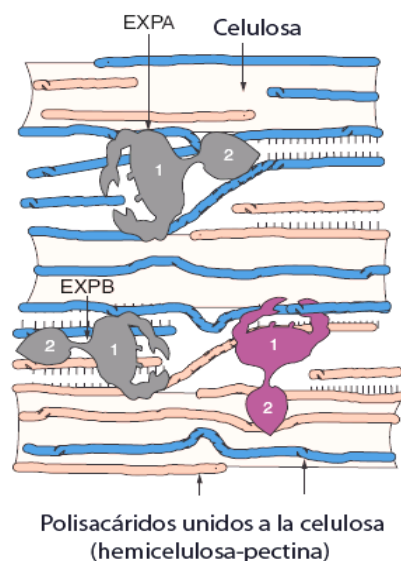


Figura 11. Modelo de la función propuesta de las expansinas. Las expansinas inducen la separación o deslizamiento de los componentes de la pared celular a través del rompimiento de los puentes de hidrógeno que mantienen unidos a la celulosa, hemicelulosa y pectina. Modificado de Sampedro and Cosgrove, 2005.

Las expansinas tienen un tamaño promedio de 25-28 kDa y de manera semejante a las celulasas están organizadas en una estructura modular de dos dominios y un péptido señal de ~20 aminoácidos en la región amino terminal (Cosgrove, 2000). Entre los miembros de las distintas familias de expansinas solamente existe un 20-40% de identidad entre ellas, aunque se ha visto que el grado de conservación es mayor en el dominio I (Sampedro and Cosgrove, 2005).

El **dominio I**, localizado en el extremo amino terminal tiene una estructura DPBB (Double Psi Beta Barrel) y es homólogo al dominio catalítico de los miembros de la familia 45 de glucósido hidrolasas (GH45) que incluye principalmente a β -1,4-endoglucanasas de origen fúngico. El dominio

DPBB de esta familia tiene una estructura de barril β de seis hebras que forma un surco para la unión al sustrato (Sampedro and Cosgrove, 2005), en este dominio se identifican una serie de cisteínas conservadas en los miembros de la familia GH45 que forman puentes disulfuro en las enzimas de hongos (Figura 12). A pesar de la presencia del dominio catalítico GH45 en las expansinas no se ha detectado ningún tipo de actividad hidrolítica en estas proteínas (Sampedro and Cosgrove, 2005).

El **dominio II**, que se ubica en el extremo carboxilo terminal es homólogo a los alérgenos de polen de pastos del grupo 2, y se ha especulado que este dominio podría ser de unión a polisacáridos debido a la presencia de aminoácidos aromáticos y polares presentes en la superficie de la proteína, en donde dos triptófanos y una tirosina forman una plataforma plana de residuos aromáticos que favorece la unión (Cosgrove, 1997, 2000). El dominio II posee un plegamiento de β -sándwich formado por dos cubiertas de 4 láminas β antiparalelas cada una (Figura 12). De hecho, un β -sándwich formado de 3 a 6 láminas β por cubierta es el plegamiento más común en los módulos de unión a carbohidratos que generalmente se unen a sustratos como la celulosa cristalina o la quitina (Kerff *et al.*, 2008).

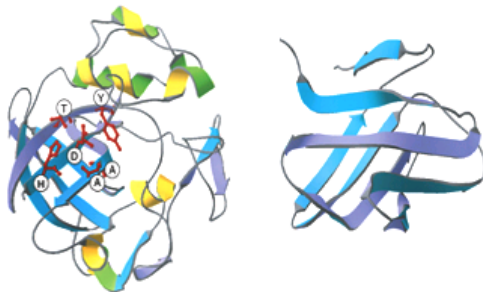
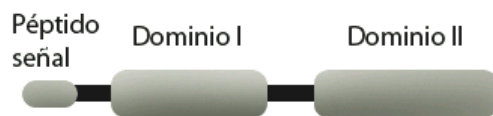


Figura 12. Estructura de las expansinas.

Péptido señal y dominios I y II de las expansinas y sus respectivos arreglos tridimensionales. El dominio I tiene la estructura de un barril β (PDB: 2ENG). Se muestran los aa conservados en las expansinas. En el dominio II, la estructura es de dos láminas β antiparalelas con un plegamiento de β -sándwich tipo inmunoglobulina (PDB: 1WHO). Estructuras tomadas de Sampedro and Cosgrove, 2005.

Whitney *et al.* (2000) incubaron un compuesto de celulosa y xiloglucanos de origen bacteriano con una expansina de pepino y observaron un rápido relajamiento en la estructura del compuesto.

Este resultado utilizando "paredes celulares artificiales" sugiere que las expansinas afectan la unión de los filamentos de celulosa y los xiloglucanos a través de relajar los enlaces que los mantienen unidos.

Recientemente, Wei *et al.* (2010) reportaron que una α -expansina participa de manera sinérgica con una pectino liasa para favorecer la actividad de la enzima mediante el rompimiento de los puentes de hidrógeno que existen entre la pectina y el xiloglucano.

CLASIFICACIÓN DE LAS EXPANSINAS

La Superfamilia expansina está formada por 4 familias: α expansinas (EXPA), β expansinas (EXPB), proteínas tipo expansina A (EXLA) y proteínas tipo expansina B (EXLB) (Sampedro and Cosgrove, 2005).

La **familia EXPA** incluye proteínas que participan en el relajamiento y extensión de la pared celular por un mecanismo dependiente del pH. Estas proteínas participan en procesos del desarrollo como organogénesis (Cho and Cosgrove, 2002), degradación de la pared celular durante la maduración de frutos (Rose *et al.*, 1997; Civello *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 2000) y otros procesos en donde la extensión de la pared celular es crucial (Lee *et al.*, 2001; Cosgrove *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003a). Las EXPA relajan de manera preferente las paredes celulares de plantas dicotiledóneas sobre las paredes de pastos.

La **familia EXPB** incluye a los alérgenos de polen del grupo I de pastos, estas proteínas son secretadas por los granos de polen y se ha propuesto que sus funciones biológicas serían suavizar el estigma y los tejidos del estilo para facilitar la penetración del polen a través del tubo polínico (Cosgrove *et al.*, 1997).

En miembros de la familia de los pastos, como el arroz y el maíz, el número de EXPB es mayor al de las EXPA. Se ha visto que en preparaciones que contienen α expansinas, éstas presentan una baja actividad para relajar la pared celular de los internodos de arroz y coleóptilos de trigo, por el contrario, en preparaciones de polen de maíz que contienen β expansinas se presenta una alta actividad de relajamiento de la pared celular en los coleóptilos. Las EXPB relajan principalmente la pared celular de los pastos, lo contrario a las EXPA, esta selectividad podría ser el reflejo de las diferencias que existen en la composición de la pared celular de los pastos y las dicotiledóneas (Cosgrove *et al.*, 1997). En los pastos, la hemicelulosa es una mezcla de glucanos unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4) y glucuronoarabinosilanos, mientras que en las dicotiledóneas predomina el xilano (Carpita, 1996).

En las **familias EXLA y EXLB** se incluyen proteínas identificadas por análisis de secuencias que a pesar de poseer los dos dominios característicos de las expansinas su secuencia de aminoácidos es divergente al de las familias EXPA y EXPB (Kende *et al.*, 2004).

Los miembros de la familia EXLA tienen el motivo conservado CDRC en el extremo amino terminal del dominio I y en su dominio II tienen una extensión de aproximadamente 17 aminoácidos que no está presente en el resto de las familias de expansinas (Sampedro and Cosgrove, 2005). En el dominio I de las familias EXPA y EXPB se ha identificado el motivo HFD que forma parte del sitio catalítico de las endoglucanasas; los miembros de las familias EXLA y EXLB no poseen este motivo, lo que sugiere que posiblemente su modo de acción difiera al del resto de las expansinas (Sampedro and Cosgrove, 2005) (Figura 13).

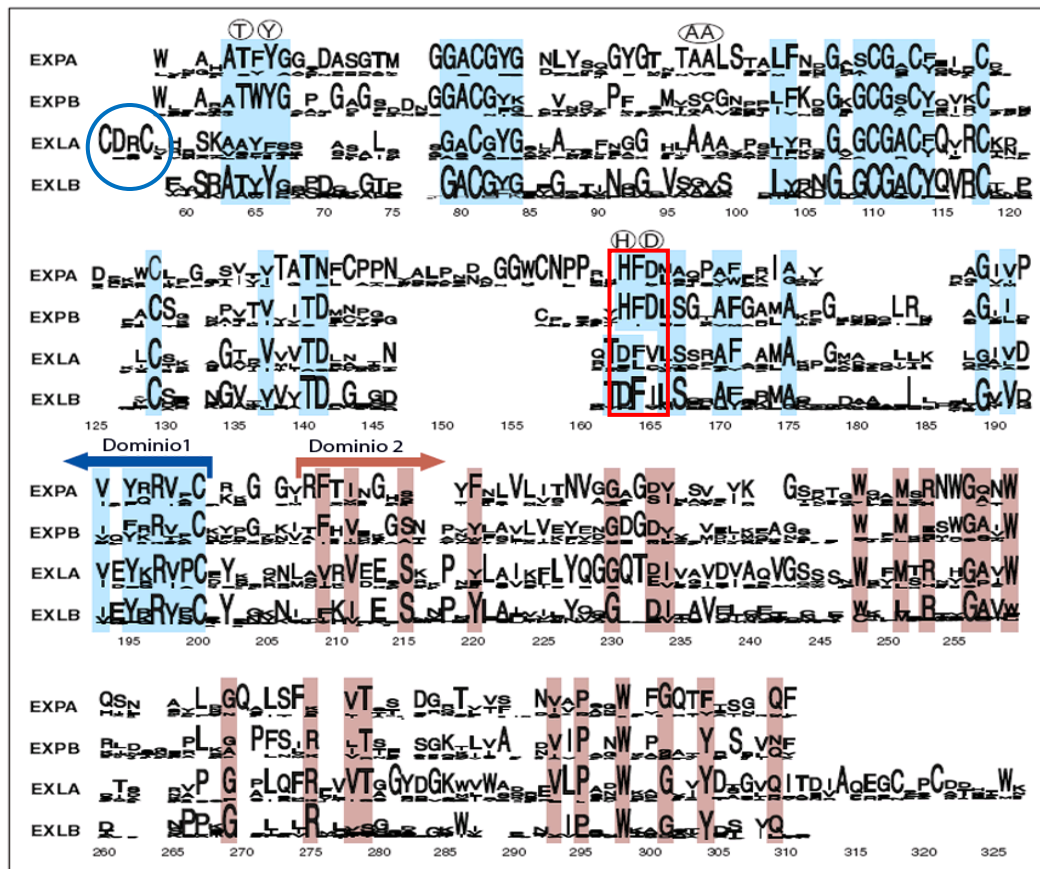


Figura 13. Regiones conservadas en miembros de la Superfamilia expansina. El dominio CDRC (círculo azul) está conservado en la familia EXLA. Se muestra el dominio HFD conservado en las familias EXPA y EXPB (cuadro rojo). Los dominio I y II se separan por flechas (azul y roja, respectivamente). La altura de la letra del aa en cada posición indica el grado de conservación en esa posición. Los aminoácidos que son parte del dominio catalítico GH45 se muestran encerrados en círculos. Modificado de Sampedro and Cosgrove, 2005.

Recientemente, Dermatsev *et al.* (2010) reportaron que una proteína EXLB de tomate podría tener un papel importante en la planta durante las etapas tempranas de la interacción entre la planta y el hongo formador de micorriza *Glomus intraradices*, ya que se observó que un silenciamiento transcripcional parcial de la EXLB causa una reducción en la formación de esporas del hongo y la expansión arbuscular.

Otro grupo de la Superfamilia, es la familia **expansinas tipo X (EXLX)**, que abarca proteínas que tienen una homología distante con los dominios de las EXPA y EXPB y están presentes en organismos distintos de plantas (Kende *et al.*, 2004), como las identificadas en el hongo mucilaginoso *Dictyostelium* (Darley *et al.*, 2003) y en las bacterias *Bacillus subtilis*, *Clavibacter michiganensis* y *Hahella chejuensis* (Laine *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010) .

El nombre de expansina o tipo expansina se reserva para las proteínas que poseen ambos dominios (I y II), las proteínas que sólo tienen uno de éstos no podrán ser clasificadas como expansinas (Kende *et al.*, 2004).

1.7 FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LAS EXPANSINAS

Con la finalidad de evaluar la función biológica de las expansinas se han realizado diversos estudios como: inmunolocalización, análisis de la expresión de genes de expansinas, expresión ectópica de genes de expansinas y reducción de la expresión de expansinas utilizando secuencias antisentido y plantas transgénicas.

INMUNOLocalIZACIÓN DE LAS EXPANSINAS

Estas proteínas se han localizado en los meristemas y zonas de crecimiento de la raíz y el tallo de las plantas, así como también en la formación del primordio de la hoja en los meristemas apicales y en las paredes de las células de la epidermis durante la formación de las raíces (Reinhardt *et al.*, 1998; Cho and Cosgrove, 2002). En estudios de inmunolocalización, las expansinas se han encontrado distribuidas de manera dispersa en la pared celular sin estar restringidas a sitios específicos o en la interfase de la membrana plasmática-pared celular; también se ha observado que las vesículas de Golgi en algunas ocasiones son marcadas con el anticuerpo, lo que indicaría que las expansinas son transportadas a la pared celular a través de la vía de secreción de proteínas (Sampedro and Cosgrove, 2005).

Un estudio de inmunofluorescencia utilizando pelos radicales de maíz mostró que las expansinas se acumulan en el citoplasma y la pared celular del primordio emergente (Baluska *et al.*, 2000). Las expansinas de la familia EXPB son muy abundantes en los granos de polen de los pastos y éstas se han localizado tanto en la superficie del polen como intracelularmente (Staff *et al.*, 1990).

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES

Estudios de la expresión de genes de expansinas por northern blot e hibridación *in situ* han mostrado que estos genes se expresan diferencialmente en distintos órganos, tejidos y tipos celulares y que además responden de distinta manera a los tratamientos con hormonas vegetales, luz y polinización. Estos estudios indican que las expansinas estarían participando en distintos eventos que van desde la germinación y la maduración de frutos, así como en la polinización y la respuesta de crecimiento en condiciones de inundación. Por ejemplo, Reinhardt *et al.* (1998) encontraron que el gen *LeExp18* de una α expansina de tomate se expresaba durante la formación del primordio visible de la hoja en el meristemo apical de plantas de tomate. Durante el crecimiento y maduración de frutos de la planta de tomate y de fresa se ha observado un incremento diferencial en

el contenido de un gen de una α expansina (Civello *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 2000). De manera semejante, en la germinación de plantas de tomate se ha observado que el transcrito de una α expansina se acumula en el endospermo, posiblemente con la finalidad de remodelar la estructura de la pared celular y facilitar la aparición de la radícula (Chen and Bradford, 2000). En maíz, 5 genes de α y β expansinas mostraron una expresión diferencial en las etapas de plantas jóvenes y adultas, así como también en diferentes órganos. En el internodo de la planta de arroz, la hormona vegetal giberelina (GA) induce la expresión de cinco genes de β expansinas que correlaciona con un rápido crecimiento (Lee and Kende, 2001; Wu *et al.*, 2001).

EXPRESIÓN ECTÓPICA DE GENES DE EXPANSINAS

Pien *et al.* (2001) indujeron la expresión local del gen de expansina *CsEx29* de pepino en el primordio incipiente de la hoja en el meristemo apical de plantas de tabaco, los resultados mostraron que la expresión de la expansina es capaz de inducir el crecimiento precoz del primordio de la hoja con un cambio en la filotaxis (disposición que presentan las hojas en el tallo) del meristemo apical.

La aplicación de expansinas en los primordios de la hoja de plantas de tomate forzó su crecimiento obteniendo hojas deformes como lo observaron Fleming *et al.* (1997). La aplicación exógena de expansinas en hipocotilos de *Arabidopsis* puede estimular una elongación comparable con la aplicación de 1 μ M de la hormona vegetal auxina (Cosgrove *et al.*, 2002).

USO DE SECUENCIAS ANTISENTIDO Y PLANTAS TRANSGÉNICAS DE EXPANSINAS

Debido a que las expansinas forman familias multigénicas, ha sido un reto determinar la función biológica de los genes individuales, sin embargo se han logrado algunos avances. Por ejemplo, Cho and Cosgrove (2000) utilizaron la secuencia antisentido de una α expansina y observaron una reducción en su expresión y una disminución significativa en el crecimiento de plantas de *Arabidopsis*. Por otro lado, la supresión del gen *LeEXPA1* de tomate durante la maduración causa una mayor firmeza en el fruto mejorando su tiempo de almacenamiento (Brummell *et al.*, 1999). En la mayoría de los casos, el silenciamiento de los genes de expansinas lleva a la inhibición del crecimiento mientras que una expresión ectópica excesiva conduce a un crecimiento anormal.

Las expansinas se han relacionado con procesos de desarrollo en los cuales ocurre un relajamiento de la pared celular, como la maduración de frutos (Rose *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1999); la formación del xilema (Gray-Mitsumune *et al.*, 2004); la abscisión del desarrollo de plantas parásitas (Belfield *et al.*, 2005); la germinación de semillas (Chen and Bradford, 2000); la penetración del tubo polínico a través del estigma (Cosgrove *et al.*, 1997; Pezzotti *et al.*, 2002); la formación de asociaciones tipo micorriza con hongos simbiotes en raíces (Dermatsev *et al.*, 2010); el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas (Giordano and Hirsch, 2004); el

desarrollo de plantas parásitas (O'Malley and Lynn, 2000) y la rehidratación de la planta de resurrección *Cratogeomachna plantagineum*, que se curvan cuando se seca y se expande cuando se hidrata (Jones and McQueen-Mason, 2004).

Algunas plantas que están adaptadas a ambientes acuáticos responden ante la condición de inundación con una elongación pronunciada, la cual activa la expresión de genes de expansina (Cho and Kende, 1997; Colmer *et al.*, 2004). En arroz, se ha observado que las condiciones de hipoxia e inundación incrementan el nivel de expresión de una α expansina y el crecimiento del coleóptilo; una relación similar se encontró entre el crecimiento de la fibra de algodón y una alta expresión de genes de α expansinas durante la fase temprana de la elongación (Huang *et al.*, 2000; Ruan *et al.*, 2001).

La expresión de genes de expansinas en condiciones de sequía también se ha reportado, por ejemplo, en los brotes de las hojas del pasto tolerante a la temperatura *Agrostis scabra*, se indujo el gen *AsEXP1* de una proteína tipo expansina después de exponerlos una hora a un estrés por calor (Xu *et al.*, 2007). En la planta de resurrección, *C. plantagineum*, se encontró una correlación entre la extensión de las hojas durante la deshidratación con el incremento en los niveles de transcritos de α expansinas en las paredes celulares de las hojas, lo que sugiere un papel de estas proteínas en la regulación del crecimiento de la hoja durante la deshidratación; la función de las expansinas tanto en sequía como en deshidratación aún debe ser investigado (Jones and McQueen-Mason, 2004).

REGULACIÓN DE LOS GENES DE EXPANSINAS

La expresión de algunos genes de α expansinas en plantas está regulada por las hormonas vegetales auxina, giberelina, citocininas, brasinoesteroides y etileno. El análisis en los promotores de expansinas de arroz muestra la presencia de elementos de respuesta a las hormonas vegetales.

Dichos elementos parecen ser más comunes en α expansinas que en β expansinas que podrían estar respondiendo a otros estímulos de regulación (Catalá *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; O'Malley and Lynn, 2000; Lee and Kende, 2001; Sánchez *et al.*, 2004). El análisis de la región del promotor de expansinas de plantas como el arroz, muestran la presencia de elementos de respuesta a etileno (ERE), ácido abscísico (ABRE) y giberelinas (GARE) (Lee *et al.*, 2001). No existen reportes acerca de elementos reguladores identificados en promotores de genes que codifican para proteínas tipo expansina EXLA y EXLB.

DIVERSIDAD TAXONÓMICA DE LAS EXPANSINAS

En *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays* y *Triticum aestivum* se han identificado proteínas expansinas y tipo expansinas (Wu *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003b; Lin *et al.*, 2005). De manera similar, algunos miembros de la superfamilia expansina se han encontrado en plantas como en los helecho *Regnellidium diphyllum* y *Marsilea quadrifolia*, en gimnospermas como el

pino y el álamo, y en el musgo *Physcomitrella patens*, así como en el nemátodo *Globodera rostochiensis* que infecta la papa, en donde estas proteínas favorecerían el proceso de infección (Li *et al.*, 2002; Kudla *et al.*, 2005; Sampedro *et al.*, 2006; Carey and Cosgrove, 2007) (Tabla 4).

Tabla 4. Organismos que poseen proteínas expansinas y proteínas tipo expansinas.

Miembros de la Superfamilia Expansina					
Organismo	EXPA	EXPB	EXLA	EXLB	Referencia
<i>Arabidopsis</i>	26	6	3	1	Sampedro & Cosgrove, 2005
Arroz	33	18	4	1	Sampedro <i>et al.</i> , 2006
Álamo*	27	3	2	4	Sampedro <i>et al.</i> , 2006
Papaya*	15	3	1	0	Paull <i>et al.</i> , 2008
<i>Physcomitrella patens</i>	27	7	0	0	Carey & Cosgrove, 2007
<i>Globodera rostochiensis</i>	0	1	0	0	Kudla <i>et al.</i> , 2005
<i>Zea mays</i>	5	8	0	0	Wu <i>et al.</i> , 2001
<i>Triticum aestivum</i> *	30	0	0	0	Liu <i>et al.</i> , 2007
<i>Pinus taeda</i>	7	1	1	1	Sampedro <i>et al.</i> , 2006

Proteínas con actividad tipo expansina			
Organismo	No.	Tipo de proteína	Referencia
<i>Trichoderma reesei</i> *	3	Proteína tipo expansina	Martínez <i>et al.</i> , 2008
<i>Trichoderma reesei</i>	1	Swollenina	Saloheimo <i>et al.</i> , 2002
<i>Bjerkandera adusta</i>	1	Loosenina	Este trabajo
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	Swollenina	Bouzarelou <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	Swollenina	Chen <i>et al.</i> , 2010
<i>Trichoderma asperellum</i>	1	Swollenina	Brotman <i>et al.</i> , 2008
<i>Postia placenta</i> *	7	Proteína tipo expansina	Martínez <i>et al.</i> , 2009
<i>Dictyostelium discoideum</i> *	5	Proteína tipo expansina	Li <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus subtilis</i>	1	EXLX	Kim <i>et al.</i> , 2009
<i>Hahella chejuensis</i>	1	EXLX	Lee <i>et al.</i> , 2009
Arroz*	80	Proteína tipo expansina	Li <i>et al.</i> , 2003
<i>Laccaria bicolor</i> *	11	Proteína tipo expansina	http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html
<i>Pleurotus ostreatus</i> *	1	Proteína tipo expansina	http://genome.jgi-psf.org/PleosPC15_2/PleosPC15_2.home.html
<i>Neurospora crassa</i> *	2	Proteína tipo expansina	http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html

* Identificadas por secuenciación del genoma.

Algunas expansinas EXLX se han identificado en el hongo mucilaginoso *Dictyostelium discoideum* y en las bacterias *Bacillus subtilis*, *Xylella fastidiosa*, *Clavibacter michiganensis*, así como en la bacteria marina *Hahella chejuensis* (Laine *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Darley *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010).

De estas bacterias, sólo *C. michiganensis* y *X. fastidiosa* son patógenos de plantas, por lo que es posible que las proteínas EXLX que poseen participen en el proceso de colonización; es posible que estas bacterias al ser patógenos de plantas hayan adquirido los genes por transferencia horizontal

(Doolittle, 2000). Por otro lado, *B. subtilis* es una rizobacteria que coloniza la superficie de la raíz eficientemente y podría especularse que la proteína EXLX que posee le sirva para relajar la pared celular facilitando la colonización de la raíz, o bien que participe en la formación o modificación de biopelículas bacterianas que se forman durante el mismo proceso (Kerff *et al.*, 2008)

Las proteínas tipo expansinas identificadas en hongos como *T. reesei*, que es un degradador del material vegetal, podrían favorecer la degradación de la celulosa. De esta forma, las expansinas y proteínas tipo expansinas de hongos podrían estar involucrados en la patogénesis de plantas o en la degradación de la pared celular para utilizar sus componentes como fuente de carbono (Li *et al.*, 2002).

El papel de las proteínas tipo expansinas del hongo mucilaginoso *D. discoideum*, en el cual se han identificado al menos 5 genes de proteínas tipo expansina, es interesante, dado que *D. discoideum* se alimenta principalmente de bacterias, la función de sus proteínas tipo expansinas no estaría relacionada con el proceso de digestión; sin embargo, sí podrían participar en la lubricación del movimiento de los filamentos de celulosa durante su crecimiento y la extensión celular ya que durante ciertas etapas de su desarrollo en el cuerpo fructífero se produce una matriz extracelular celulósica (Li *et al.*, 2002).

1.8 OTRAS PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD EXPANSINA

En hongos ascomicetos como *Trichoderma* y *Aspergillus* se han identificado proteínas con actividad tipo expansina llamadas swolleninas (Saloheimo *et al.*, 2002; Brotman *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010) (Tabla 4).

Saloheimo *et al.* (2002) reportaron la clonación y expresión en *S. cerevisiae* del gen de una swollenina, *swo1*, de *T. reesei* que codifica para una proteína que modifica la estructura de la celulosa de las fibras de algodón (regiones con hinchamientos) sin liberar azúcares reductores.

Swo1 es una proteína con actividad tipo expansina de hongos que contiene un dominio de alérgeno de polen y un dominio de unión a celulosa (Figura 14).

Existen otras swolleninas reportadas en hongos como *Trichoderma asperellum* (Brotman *et al.*, 2008) a la que se le atribuye un papel importante en el proceso de colonización de las raíces de plantas de pepino, ya que cuando se sobreexpresan en el hongo hay un incremento considerable en su capacidad de infección. Las swolleninas también podrían mejorar los procesos de bioconversión de la celulosa, como en *Aspergillus fumigatus*, cuya swollenina purificada y en combinación con una mezcla de celulasas facilitaron la sacarificación del Avicel (Chen *et al.*, 2010).

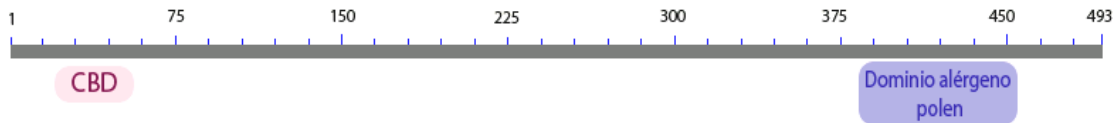


Figura 14. Dominios de la proteína con actividad tipo expansina, swollenina de *T. reesei*. Esta proteína solamente posee el dominio de alérgeno de polen de las expansinas, no tienen el dominio 1 y posee un dominio de unión a celulosa similar al identificado en celulasas.

1.9 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LA LIGNOCELULOSA

El principal objetivo para el uso del material lignocelulósico es tener acceso a la celulosa y hemicelulosa que se encuentran protegidas por la matriz de lignina.

Los desechos lignocelulósicos son producidos en grandes cantidades por la industria maderera, forestal y de jardines así como de las actividades agrícolas (Dashtban *et al.*, 2009). Estos desechos poseen un gran valor por su potencial aplicación en la elaboración de alimentos animales y obtención de biocombustibles. En 2008, aproximadamente el 90% (de un total de 12,335.2 millones de galones) de la producción global de etanol se concentró en dos países, Estados Unidos y Brasil, en éste último el etanol se produce a partir de la caña de azúcar mientras que en Estados Unidos se obtiene del almidón de maíz (Sánchez, 2009). Sin embargo, la utilización tanto del azúcar de caña como del maíz para la producción de etanol crea mucha controversia debido al efecto que causa en la producción de alimentos y sus costos, lo que ha hecho difícil que el etanol sea competitivo en costos con los combustibles fósiles.

Este hecho ha forzado la búsqueda de nuevas alternativas en materia prima para la elaboración de biocombustibles, siendo los desechos lignocelulósicos una posible vía. Un ejemplo del uso de estos desechos es la corporación Iogen que opera en Canadá la planta más grande del mundo de producción de etanol a partir de paja de trigo, avena y centeno, en donde se utilizan 30 toneladas de desechos lignocelulósicos (paja de trigo, avena y centeno) para producir más de 3 millones de litros de etanol diariamente (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006). La degradación de la biomasa lignocelulósica involucra la disponibilidad de la celulosa y la hemicelulosa, así como la subsecuente hidrólisis de estos polisacáridos en azúcares de 5 y 6 carbonos, los cuales son convertidos a etanol por procesos de fermentación.

El principal reto de la conversión de la biomasa en etanol es alcanzar los rendimientos que permitan hacerla competitiva en costos con los combustibles usados actualmente (Dashtban *et al.*, 2009). Para esto debe considerarse que los desechos lignocelulósicos poseen una matriz de lignina que protege a la celulosa y a la hemicelulosa de la degradación, además la celulosa posee regiones cristalinas que dificultan su hidrólisis. Es por esto que se emplean pretratamientos químicos y físicos

como prerrequisito para la degradación, las condiciones que se utilizan son altas temperaturas y soluciones ácidas o básicas, lo que resulta costoso y en muchas ocasiones ineficiente (Tabla 5).

Tabla 5. Tipos de pretratamientos a los que se someten los sustratos lignocelulósicos. Revisado en Sun and Cheng (2002).

Tratamiento	Procedimiento	Sustratos Lignocelulósicos	
Físico	Fragmentación mecánica	Molienda	Bagazo de caña, desechos forestales
	Pirólisis	T > 300 °C, enfriamiento y condensación	Residuos agrícolas
Fisicoquímico	Explosión de vapor	Tratamiento con vapor saturado a T de 160–260°C y $p=$ 0.69–4.83 MPa	Bagazo, desecho de maíz, cáscarilla de arroz, trigo
	Ácido diluido	H ₂ SO ₄ : 0.75-5%, HCl, HNO ₃	Maderas, bagazo de caña, desecho de maíz
	Álcali	NaOH diluido, Ca(OH) ₂ , H ₂ O ₂	
	Ácido concentrado	H ₂ SO ₄ : 10-30%	
	AFEX	Amonio 1-2/kg de masa seca; 90°C (30 min); $p=$ 1.20 MPa	Bagazo, desecho de maíz, cáscara arroz
Químico	Organosolvente	Se utilizan solventes orgánicos (metanol, etanol y acetona) y ácidos inorgánicos como catalizadores (H ₂ SO ₄ ó HCL) que rompen los enlaces de la lignina y la celulosa.	Desechos ricos en lignina
	Ozonólisis	Se utiliza ozono para remover la lignina, no produce residuos tóxicos pero requiere una gran cantidad de ozono lo que eleva los costos	Desechos ricos en lignina
	Explosión con CO ₂	4 kg CO ₂ /kg fibra, $p=$ 5.6 MPa	Bagazo, alfalfa, desecho de papel

Además, durante los pretratamientos se producen compuestos inhibidores de la fermentación como furanos y compuesto fenólicos (Rubin, 2008).

Desde el punto de vista de la utilización de la biomasa con fines biotecnológicos, las expansinas (o proteínas con actividad expansina) representan una herramienta potencial que permitiría optimizar el proceso de degradación del material celulósico, ya que tienen la característica de relajar la pared celular en condiciones ligeramente ácidas ($pH \leq 5.0$), de manera semejante a las condiciones en las que funcionan las celulasas. Actualmente se utilizan pH ácidos (4.8-5) en procesos simultáneos de

sacarificación y fermentación para la obtención de biocombustibles, por lo que las expansinas podrían ser utilizados como aditivos para facilitar la sacarificación enzimática (Baker *et al.*, 2000).

ANTECEDENTES

En el laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología (CeIB-UAEM) se identificó una secuencia codificante de 390 pb de una proteína tipo expansina en una biblioteca de cDNA del hongo basidiomiceto *Bjerkandera adusta* crecido en petróleo. Esta secuencia a la que se llamó loosenina tiene 64% de identidad y 72% de similitud con un hipotético miembro de la familia de expansinas del hongo basidiomiceto *Laccaria bicolor*.

HIPÓTESIS

La proteína tipo expansina del hongo basidiomiceto *B. adusta* permitirá relajar la estructura de la celulosa y mejorar la utilización del material celulósico al favorecer una mayor liberación de azúcares reductores después de tratar el material con enzimas hidrolíticas.

OBJETIVO GENERAL

Clonación del gen y caracterización de la proteína tipo expansina, loosenina, del hongo basidiomiceto *B. adusta* expresada en levadura.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Clonación del gen *loos1* de una loosenina de *B. adusta*.
- Subclonación del gen *loos1* para su expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y obtención de las cepas transformadas.
- Caracterización de la proteína expresada heterológamente:
 - Evaluación de la actividad expansina en ensayos cualitativos y cuantitativos.
 - Evaluación de la estabilidad de LOOS1 a la temperatura y pH.
 - Efecto de la actividad de LOOS1 sobre el material lignocelulósico en la liberación de azúcares reductores por celulasas comerciales.
- Análisis bioinformático de la secuencia:
 - Identificación y análisis bioinformático de la región promotora del gen *loos1*.
 - Análisis filogenético y modelado tridimensional.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS UTILIZADAS

El hongo basidiomiceto *B. adusta* UAMH 8258 (Wang *et al.*, 2003) fue cedido por el Dr. R. Vázquez-Duhalt del IBT-UNAM. La cepa de *S. cerevisiae* W303a (*MAT α can1-100 ade2-1 his3-11, 15 leu2-3,12 trp1-1 ura3-1*) se utilizó para expresar heterológamente LOOS1. La cepa de *E. coli* DH5 α se utilizó para la propagación de plásmidos y su manipulación de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989).

CRECIMIENTO DEL HONGO

Para su almacenamiento, se creció un inóculo de *B. adusta* en una caja de medio PDA sólido (Papa-Dextrosa-Agar) durante 9 días a 28°C. Una vez crecido el micelio, se cortaron fragmentos del micelio de ~0.25 cm² que sirvieron para inocular los medios de cultivo de manera aséptica.

Para que el hongo agotara la fuente de carbono del medio PDA, el inóculo se creció únicamente en medio mineral sólido (7.8 mg/L CuSO₄·5H₂O, 18 mg/L FeSO₄·7H₂O, 500 mg/L MgSO₄·7H₂O, 10 mg/L ZnSO₄, 50 mg/L KCl, 1 g/L K₂HPO₄ y 2 g/L NH₄NO₃, 1.5% agar; pH 5, ajustado con ácido fosfórico, modificado de Inglis *et al.* (2000)) por 5 días a 28°C.

Posteriormente, el micelio se creció en medio mineral suplementado con paja de trigo al 2% durante 5 días a 28°C y con agitación orbital a 200 rpm. La paja de trigo (*Triticum aestivum*) se molió en un molino de café (Braun) hasta que se observó un polvo homogéneo (partículas de 0.5-3 mm).

CLONACIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE *loos1*

La secuencia de *loos1* se identificó originalmente en un análisis por BLAST de clonas obtenidas de una biblioteca de cDNA de *B. adusta* crecido en presencia de petróleo (Cuervo *et al.*, en preparación). La secuencia fue amplificada por PCR usando oligonucleótidos específicos y como templado se utilizó el cDNA sintetizado por transcripción reversa (Superscript II, Invitrogen) a partir de 1 μ g de RNA total extraído por el método de Trizol (Invitrogen) del micelio de *B. adusta* crecido en medio mineral con paja de trigo al 2% por 5 días a 28°C y 200 rpm.

Los oligonucleótidos utilizados fueron LOOS1fwd: 5'-CGGAATTCATGTTCTTCAACG-3' y LOOS1rev: 5'-CCTCGAGCTAATCCAGGT-3', que tienen sitios de corte de *Eco*RI y *Xho*I (subrayado) en los extremos 5' y 3' respectivamente, para facilitar los subsecuentes pasos de clonación. El fragmento amplificado de 390 pb se purificó y clonó en el vector pGEM-T (Promega) originando la construcción pGEM-LOOS1 cuya secuencia se confirmó (Macrogen USA).

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO Y CLONACIÓN DE LA SECUENCIA GENÓMICA DE *loos1*

Se colectó el micelio de *B. adusta* crecido de 7 días en medio mineral líquido a 28°C con paja de trigo al 2% y se congeló en presencia de nitrógeno líquido. El DNA genómico extraído con el kit UltraClean Megaprep Soil DNA (MoBio) se utilizó como molde para una amplificación por PCR con los oligonucleótidos LOOS1fwd y LOOS1rev. El producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T (Promega), se generó la construcción pGEM-LOOS1g y se confirmó su secuencia (Macrogen USA).

CONSTRUCCIÓN DE UNA LIBRERÍA GENÓMICA

Para conocer la secuencia del promotor de *loos1*, se utilizó el kit Genome Walker Universal (Clontech) siguiendo las instrucciones del proveedor y como se describe brevemente. El DNA genómico de *B. adusta* se digirió con 4 enzimas de restricción y a los fragmentos obtenidos después de la digestión se les ligaron adaptadores en sus extremos, de esta forma se obtuvieron 4 colecciones de fragmentos digeridos no clonados llamadas librerías Genome Walker.

Sobre la secuencia del exón más cercano al extremo 5' del cDNA de *loos1* se diseñaron dos oligonucleótidos según las especificaciones del kit (26–30 nucleótidos de largo y un contenido de GC de 40–60%): ExpaGW1: CCA TCA CCA TGT TGC AAC CCA GTA GG y ExpaGW2: AGC GAG AAC AGA AAC GAA GAT GGC TGC (Figura 15).

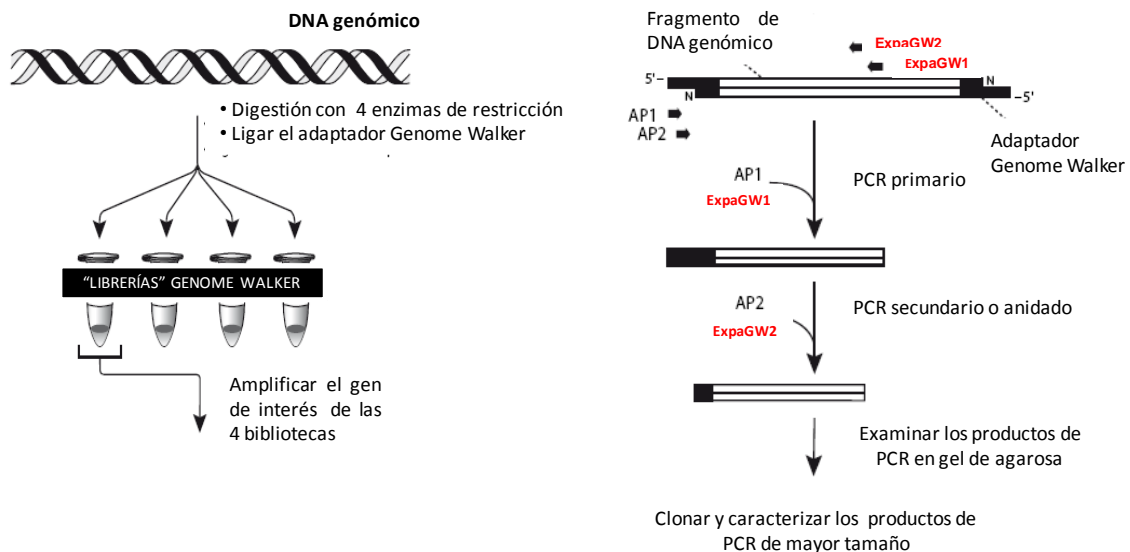


Figura 15. Esquema del protocolo de Genome Walker. La amplificación de productos de PCR se logra empleando los oligonucleótidos de los adaptadores y los específicos de la secuencia de interés y utilizando como templado las 4 librerías Genome Walker obtenidas por digestión del DNA genómico.

Con el oligonucleótido ExpaGW1 y el oligonucleótido del adaptador provisto en el kit (AP1) se hizo un PCR primario utilizando las 4 librerías como templado. El producto del PCR se diluyó y se utilizó como templado para el PCR secundario o anidado usando el oligonucleótido específico ExpaGW2 y el oligonucleótido del adaptador (AP2). Ambas reacciones de PCR se sometieron a una electroforesis y se compararon las bandas amplificadas de productos de alto peso molecular (>1000 pb). Cada uno de los fragmentos de DNA (que inician en la secuencia conocida del cDNA y se extienden en la región desconocida del DNA genómico) se clonaron, secuenciaron y ensamblaron para su análisis (Macrogen USA). El kit Genome Walker es un método simple para identificar secuencias desconocidas de DNA genómico adyacentes a una secuencia conocida de cDNA.

EXPRESIÓN EN LEVADURA DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE *LOOS1*

De una maxipreparación del vector pGEM-LOOS1 se hizo una digestión con *EcoRI* y *XhoI* liberando el fragmento de 390 pb que se subclonó en el vector pSAL3 (Figura 16) (Mascorro-Gallardo *et al.*, 1996), generando el vector pSAL3-LOOS1. Células de levadura se transformaron con el vector pSAL3-LOOS1 o con el vector pSAL3 por el método de acetato de litio (Gietz and Schiestl, 2007) seleccionando en medio sólido SC-Ura menos [0.67% Yeast Nitrogen Base (Difco), 2% dextrosa (Baker), adenina 20 mg/L, leucina 60 mg/L, triptófano 20 mg/L e histidina 20 mg/L (Sigma-Aldrich)].

Después de tres días de incubación a 28°C, una colonia de cada transformación se creció en un preinóculo de 20 ml de medio SC-Ura menos a 28°C y 250 rpm hasta una fase log (DO 0.4-0.6), en este punto se hizo una dilución a una DO 0.1 en 1 L de medio SC-Ura menos adicionando Cu_2SO_4 a una concentración final de 50 μM e inhibidores de proteasas (Complete® Roche). Finalmente, las células se crecieron a una DO de 0.8, se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 4000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se almacenó a la misma temperatura hasta su utilización.

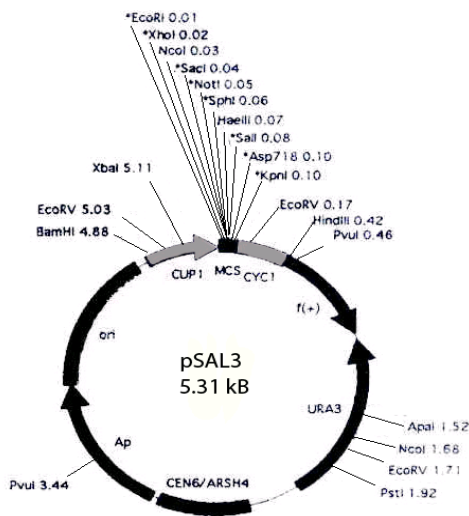


Figura 16. Mapa del vector de expresión pSAL3. El vector pSAL3 es centromérico con un sitio de clonación múltiple, posee el promotor inducible por cobre CUP1 lo que permite la expresión regulada del gen, además de un marcador de resistencia ampicilina (bacteria) y el marcador de auxotrofia *URA3* (Mascorro-Gallardo *et al.*, 1996). La secuencia codificante de *loos1* se clonó en los sitios *EcoRI* y *XhoI*.

CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA

La concentración de proteína se determinó por el método de Löwry (Lowry *et al.*, 1951) con el reactivo de Folin (Hycel México) y utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA).

ENRIQUECIMIENTO DE LOOS1

El sobrenadante recuperado de 1 L de cultivo de levadura se concentró por ultrafiltración utilizando una membrana de 10 kDa (Amicon stirred cell 8400, Ultracell, Millipore) y después una membrana de 30 kDa (Amicon Ultra 4 Centrifugal Filter, Millipore). El filtrado se recuperó y concentró nuevamente en una membrana de 10 kDa (Amicon Ultra 4 Centrifugal Filter, Millipore) en un volumen final de 200 μ l (lo que equivale a una concentración de 5000 veces). El sobrenadante de levaduras transformadas con el vector pSAL3 se concentró por ultrafiltración con una membrana de 10 kDa. La pureza y la estimación del peso molecular de LOOS1 se evaluaron resolviendo 20 μ g de proteína en una electroforesis en geles de SDS-PA al 15%. Después de la electroforesis el gel se tiñó con azul de Coomassie 0.125% (Brilliant Blue R-250, Sigma).

MERCERIZACIÓN DE FIBRAS DE ALGODÓN

Se mercerizaron 7 mg de algodón (Protec-México) o 3 mg de Avicel con NaOH al 25% a 4°C durante 15 minutos. Las fibras de algodón se lavaron 4 veces con agua destilada para eliminar el exceso de base y se agregaron 500 μ l de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.

Las fibras de algodón o el Avicel mercerizado se sometieron a diferentes tratamientos independientes durante 8 horas: 1) incubación con buffer de acetato de sodio; 2) 20 μ g LOOS1; 3) 20 μ g LOOS1 y 0.5 U de una endoglucanasa comercial (Sigma-Aldrich) y 4) 0.5 U de una endoglucanasa comercial. Las fibras de algodón y el Avicel sin mercerizar se sometieron a los mismos tratamientos.

TRATAMIENTO DE FIBRAS DE ALGODÓN CON LOOS1

Se mercerizaron 7 mg de fibras de algodón comercial (Protec-México) con NaOH 25% de acuerdo a Saloheimo *et al.* (2002). El tratamiento de las fibras con LOOS1 y los tratamientos control fueron los mismos para todas las muestras: incubación de las fibras mercerizadas en 1 ml de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5 durante 8 horas a 25°C con: **(a)** 20 μ g de LOOS1 enriquecida, **(b)** 20 μ g de proteínas del sobrenadante de levaduras transformadas con pSAL3, **(c)** buffer de acetato de sodio y **(d)** 0.5 U de una endoglucanasa comercial de *Trichoderma viride* (Sigma-Aldrich E.C 3.2.1.4, No. Catálogo C-1794).

ENSAYO CUALITATIVO DE LOOS1

Las fibras de algodón de las reacciones mencionadas arriba se sonicaron (Ultrasonic cleaner 1510, Branson) por 1 minuto y las fibras se visualizaron por microscopía de contraste de fases (Zeiss) (Unidad de Microscopía, IBT-UNAM).

ENSAYO CUANTITATIVO DE LOOS1

A todas las reacciones (excepto la que ya había sido incubada previamente con la endoglucanasa) se les agregó 0.5 U de endoglucanasa comercial de *T. viride* y se incubaron a 50°C. Se tomaron alícuotas de 50 µl a los 10, 20, 40 y 60 minutos después de añadir la endoglucanasa y se midieron los AR liberados. Los triplicados se obtuvieron de ensayos independientes.

ENSAYO DE AZÚCARES REDUCTORES (AR)

Los azúcares reductores son aquellos que, como la glucosa, fructosa, lactosa, arabinosa y maltosa presentan un carbono libre (el C1 o carbono anomérico) en su estructura y pueden actuar en condiciones alcalinas como agentes reductores (reducen a otros compuestos y se oxidan).

Para medir los AR se utilizó el protocolo del ácido 3,5-dinitrosalicílico descrito por Miller (1959); este compuesto tiene una coloración amarillo-naranja que cambia a tonos rojos después de la ebullición de acuerdo a la cantidad de AR presentes en la reacción.

Se prepararon 100 ml de una solución de 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) [30 g de Tartrato de sodio-potasio (Baker), 1.6 g de NaOH (Baker) y 1 g DNS (Sigma-Aldrich); mezclados en este orden en agua tibia].

A continuación se describe brevemente cómo se realizó el ensayo. Se tomaron alícuotas de 50 µl a los 10, 20, 40, y 60 minutos después de haber agregado la endoglucanasa o la mezcla enzimática comercial a la reacción que contenía las fibras de algodón o de agave previamente incubadas con la proteína LOOS1 enriquecida, se mezclaron con 50 µl de DNS, se hirvieron 5 minutos e inmediatamente se enfriaron en hielo 5 minutos. Finalmente se agregaron 500 µl de agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (BioMate, ThermoSpectronic). Los valores de absorbancia se compararon con una curva estándar de glucosa de 0.1 a 2 mg/ml, los valores se graficaron contra el tiempo y el valor de la pendiente se calculó para determinar la velocidad de la reacción.

CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD TIPO EXPANSINA

Las regiones relajadas en la fibra de algodón por la actividad de LOOS1 serían susceptibles a ser hidrolizadas por endoglucanasas, es por esto que su actividad se calculó indirectamente al medir los

AR liberados por la endoglucanasa como un indicativo de la actividad de LOOS1. La "actividad enzimática" tipo expansina de LOOS1, se midió de manera indirecta a partir de la actividad de una endoglucanasa, ya que la actividad de ésta depende directamente de la actividad de LOOS1 sobre el sustrato.

La "actividad enzimática específica", (AE, en UI/mg proteína) de LOOS1 se calculó con el cociente de la cantidad de AR liberados después del tratamiento LOOS1/endoglucanasa y la cantidad de proteína utilizada en el ensayo (20 µg). Aunque la LOOS1 no tiene actividad hidrolítica, con este cálculo se refleja indirectamente el grado de desorganización de la fibra causado por la misma a través de la medición de los AR que se liberan después de la incubación con la endoglucanasa.

ESTABILIDAD DE LOOS1 A LA TEMPERATURA Y pH

Para evaluar la estabilidad de LOOS1 a diferentes temperaturas se incubaron 7 mg de fibras de algodón con 20 µg de LOOS1 por 8 horas a 15, 25, 40, 60 y 80°C en 1 ml de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5. De manera similar, la estabilidad al pH se evaluó incubando las fibras por 8 horas a 25°C con 20 µg de LOOS1 en un intervalo de pH 3 a 10 utilizando 1 ml de los buffers: McIlvaine 50 mM (pH 2 y 3), buffer de citrato de sodio 50 mM (pH 4-8) y borato-HCl 50 mM (pH 10). En todos los casos, después de la incubación se adicionó la celulasa comercial y se midió la liberación de AR.

ANÁLISIS DE LA CRISTALINIDAD DE LA CELULOSA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

20 mg de Avicel PH-101 (Fluka) se incubaron con o sin LOOS1 en 1 ml de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5 por 8 horas a 25°C. Las muestras se centrifugaron 1 minuto a 14 000 rpm, se lavaron 3 veces con agua destilada y se secaron por centrifugación con vacío (Thermo Savant) por 10 minutos. Los espectros IR se obtuvieron en los 4000-450 cm⁻¹ en un FT-IR Bruker Vector 22 espectrómetro mezclando las muestras con KBr y compactándolas en una tableta (Dr. Herbert Hopfl, CIQ-UAEM).

TRATAMIENTO DE UN SUSTRATO LIGNOCELULÓSICO NATURAL

Fibras de bagazo de *Agave tequilana* (Tilzagave S.A de C.V) se cortaron en pedazos de 2.5-5 mm de largo y se lavaron con agua destilada por 5 noches consecutivas hasta que no se detectaran AR.

Después, 25 mg de estas fibras se mercerizaron con NaOH por 15 minutos a 4°C e incubaron en buffer de acetatos 50 mM pH 5 por 8 horas a 25°C con 20 µg de LOOS1 enriquecida o con 20 µg de las proteínas del sobrenadante de levaduras transformadas con pSAL3 y se agregó 1 µl de la mezcla enzimática comercial GC-220 (Genencor-Danisco) que contiene actividad celulolítica y xilanolítica y se incubó a 50°C. La medición de AR se hizo a los 10, 20, 40 y 60 minutos como se describió anteriormente. Se hicieron triplicados de experimentos independientes.

Para determinar el tipo de azúcar reductor que se está liberando después del tratamiento de LOOS1 y de la mezcla enzimática, se utilizaron los kits D-Glucose-GOPOD assay (glucose oxidase/peroxidase, GOPOD), D-xylose assay y D-galactose assay (Megazyme) para la medición de glucosa, xilosa y galactosa, respectivamente, siguiendo las instrucciones del proveedor.

ENSAYO DE UNIÓN DE LOOS1 A POLISACÁRIDOS

Se realizó el ensayo de unión a polisacáridos descrito por Chen *et al.* (2010). Brevemente, 100 mg de los sustratos Avicel PH-101 (Fluka), quitina y xilano de avena (Sigma-Aldrich) se resuspendieron en 200 µl de buffer de fosfatos 15 mM pH 7.4-NaCl 150 mM. Se agregaron 20 µg de LOOS1 y la mezcla se agitó suavemente en vórtex durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante que correspondía a la fracción no unida. La pastilla del sustrato se lavó 4 veces con buffer de fosfatos 15 mM pH 7.4-NaCl 150 mM y la proteína se disoció del sustrato al hervirla por 5 minutos en buffer de Laemmli 5X, el sobrenadante recuperado correspondía a la fracción unida. Ambas fracciones (unida y no unida) se separaron mediante electroforesis SDS-PA en geles al 15% y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie 0.125% (Brilliant Blue R-250, Sigma).

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Predicción de dominios y localización

Los dominios conservados se identificaron con los programas CDD (Conserved Domain Database-NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) e InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>). La localización subcelular se predijo con el programa Wolf PSORT <http://wolffpsort.org/>. La identificación de la secuencia del péptido señal se obtuvo con el programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y los potenciales sitios de sufrir una O-glicosilación se predijeron con NetOglyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). La predicción de estructuras de alfa hélices y láminas beta se realizó con el programa SCRATCH Protein Prediction (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/index.html>). Con el programa Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) se predijo la posición del promotor en la secuencia genómica ensamblada obtenida por Genome Walker.

Análisis filogenético

Para determinar la relación filogenética de la loosenina de *B. adusta* con las expansinas se obtuvieron secuencias proteicas de miembros de las 4 familias de expansinas reportadas en el sitio web (www.bio.psu.edu/expansins/nomenclature.htm) mantenido por Daniel Cosgrove. También se obtuvieron 4 secuencias de swolleninas de la base de datos de NCBI y secuencias de expansinas tipo

EXLX reportadas por Lee *et al.* (2010). La LOOS1 de *B. adusta*, (no. acceso GenBank GU322016) y proteínas de *Laccaria bicolor*, *Neurospora crassa*, *Candida tropicalis*, *Ustilago maydis*, *Trichoderma atroviride*, y *Coprinopsis cinerea* también se utilizaron en el análisis filogenético (Tabla 6). Estas secuencias se alinearon con el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y se construyó un árbol por el método de Neighbor Joining (NJ) con el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). Las relaciones filogenéticas inferidas a partir de los valores de bootstrap de 1500 réplicas se tomaron como representativas de la historia evolutiva de los taxa analizados.

Modelado por homología de LOOS1

Con el programa PHYRE (Protein Fold Recognition) se identificaron planteados para el modelado por homología de LOOS1 (Kelley and Sternberg, 2009). La proteína completa se modeló utilizando el programa modeller9 v7 (Eswar *et al.*, 2006) utilizando los alineamientos de secuencias obtenidos con PHYRE y se generaron 5 modelos con un nivel de dinámica molecular refine.very_slow. Los modelos estructurales se compararon con el programa Pymol Molecular Viewer, (DeLano Scientific LLC) (Dr. Lorenzo Segovia, IBT-UNAM).

Análisis del promotor de *loos1*

El análisis de la región promotora de 2000 pb de *loos1* se hizo con el programa Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). Se utilizaron los programas P-Match (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/pmatch/bin/p-match.cgi>) y Patch (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/patch/bin/patch.cgi>) para identificar sitios potenciales de unión de factores transcripcionales (FT) así como las bases de datos TFsitscan (www.ifti.org), TFsearch (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) y FTFD (Fungal Transcription Factor Database, <http://ftfd.snu.ac.kr>).

Los programas Patch y P-Match identifican en el DNA los sitios de unión de factores transcripcionales que se encuentran en la base de datos de TRANSFAC 7.0.

Se utilizó la secuencia del promotor de *loos1* para hacer una búsqueda por BLAST en las bases de datos de los genomas de los hongos *L. bicolor*, *P. chrysosporium*, *A. niger* y *N. crassa*. En las secuencias de los promotores se identificaron algunos sitios de unión de FT, de los cuales se evaluó su conservación a través de un alineamiento con ClustalW2 que permitiera identificar las regiones conservadas. De esta forma se evaluaría la conservación de los potenciales sitios de unión de FT que participan en la regulación del gen.

Tabla 6. Secuencias utilizadas para construir el árbol filogenético por NJ.

Nombre (NCBI ID)	Organismo	Nombre (NCBI ID)	Organismo
AtEXPA1 (AAG60095)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	OsEXLB1 (AAO33384)	<i>Oryza sativa</i>
AtEXPA2 (U30481)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	OsEXLA1 (AAM52409)	<i>Oryza sativa</i>
AtEXPA3 (AC004684)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	OsEXLA2 (Q7XCLO)	<i>Oryza sativa</i>
AtEXPA4 (AC003674)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TaSwo1 (EU370698)	<i>Trichoderma asperellum</i>
AtEXPA5 (U30478)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TrSwo1 (AJ245918)	<i>Trichoderma reesei</i>
AtEXPA6 (U30480)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TpSwo1 (EUC137149)	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>
AtEXPA7 (AC025416)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AfSwo1 (AB539167)	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AtEXPA8 (AC002336)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PaEXLX (gi 50121146)	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
AtEXPA9 (AY054586)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BsEXLX (PDB: 2bh0)	<i>Bacillus subtilis</i>
AtEXPA10 (AF229437)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RsoEXLX (gi 83747707)	<i>Ralstonia solanacearum</i>
AtEXPA11 (AF332436)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PpaEXLX (gi 149922302)	<i>Plesiocystis pacifica</i>
AtEXPA13 (AY113990)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LcEXLX (gi 171061047)	<i>Leptothrix colodnii</i>
AtEXPA14 (AY087629)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SaEXLX (gi 115373847)	<i>Stigmatella aurantiaca</i>
AtEXPA15 (AY072167)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	HcEXLX (HCH_03669)	<i>Hahella chejuensis</i>
AtEXPA16 (NM_115407)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CaEXLX (gi 229246366)	<i>Catenulispora acidiphila</i>
AtEXPA17 (NM_116393)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MspEXLX (gi 238061663)	<i>Micromonospora sp.</i>
AtEXPA18 (AF332444)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SsEXLX (gi 254404534)	<i>Streptomyces sviveus</i>
AtEXPA19 (AAW29468.1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NmEXLX (gi 229224499)	<i>Nakamurella multipartite</i>
AtEXPA21 (NM_123288)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CmEXLX (gi 148272660)	<i>Clavibacter michiganensis</i>
AtEXPA22 (NM_123289)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BaLoos1 (GU322016)	<i>Bjerkandera adusta</i>
AtEXPB1 (NM_127640)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LbLoos1 (ERD15021.1)	<i>Laccaria bicolor</i>
AtEXPB2 (NP_564860.3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LbLoos2 (EDR03591.1)	<i>Laccaria bicolor</i>
AtEXPB3 (NM_118965)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LbLoos3 (EDR03593.1)	<i>Laccaria bicolor</i>
AtEXPB4 (NM_130074)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LbLoos4 (ERD14854)	<i>Laccaria bicolor</i>
AtEXPB5 (NM_115921)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NcLoos2 (XP_959591.1)	<i>Neurospora crassa</i>
AtEXLA1 (NM_114466)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CtLoos1 (XP_002545265.1)	<i>Candida tropicalis</i>
AtEXLA2 (AF378855)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	UmLoos1 (XP_758408.1)	<i>Ustilago maydis</i>
AtEXLA3 (NM_114465)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TaLoos1 (http://genome.jgi-psf.org/Triat1/Triat1.home.html)	<i>Trichoderma atroviride</i>
AtEXLB1(AT4G17030)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	FGENESH1_PM.C_SCAFFOLD_1200024312000243)	
		CcLoos1 (XP_001828783.1)	<i>Coprinopsis cinerea</i>

8. RESULTADOS

SECUENCIA DE *loos1*

Después del análisis de 768 secuencias de la biblioteca sustractiva de cDNA de *B. adusta* (Cuervo *et al.*, en preparación) se identificó una secuencia a la que se nombró loosenina1 (*loos1*).

La secuencia de *loos1* de 390 pb codifica para una proteína de 129 aa, en la cual se identificó un dominio DPBB en el extremo carboxilo terminal con la herramienta CDD. En el extremo amino terminal la proteína LOOS1 se identificó un potencial péptido señal de 20 aminoácidos de acuerdo al análisis obtenido con el programa SignalP. El péptido señal podría estar dirigiendo a la proteína a la ruta secretora como se predice con PSORT y tener una localización extracelular (Figura 17).

ORGANIZACIÓN DEL GEN *loos1*

Los fragmentos de PCR de alto peso molecular (>1000 pb) secuenciados que se obtuvieron con el kit Genome Walker se ensamblaron en una secuencia de 2 kb y utilizando el programa Promoter Prediction se identificó un potencial promotor en la región 5' del gen *loos1*.

Se logró identificar un promotor (core promoter) de 50 pb que contiene la caja TATA a -25 pb del sitio de inicio de la transcripción. Se estimaron también las regiones 5' y 3' no traducidas de 98 y 100 nt respectivamente y una potencial señal de poliadenilación (Figura 17).

Se clonó la secuencia del promotor de *loos1* utilizando el kit Genome Walker Universal (Clontech) y se analizó la secuencia que abarca una región de 2.3 kb hacia el extremo 5'.

El alineamiento de la secuencias genómicas y codificante de *loos1* permitió identificar tres intrones: I, II y III, dos de los cuales (II y III) presentaron el par canónico de donador-aceptor 5'-GU...AG-3'. La longitud de los intrones fue de 55, 53 y 52 nt, respectivamente, lo que concuerda con el tamaño promedio de los intrones de hongos filamentosos (50-70 pb). Debido a la presencia de los intrones, la secuencia genómica incrementó en 160 nt respecto a la secuencia de cDNA, obteniendo una secuencia genómica total de *loos1* de 550 nt. Las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) se estima que consisten en 98 y 100 nt, respectivamente (Figura 17).

Utilizando el programa NetOGlyc 3.1 se predicen 2 potenciales sitios de O-glicosilación en los aminoácidos T125 y T127 de LOOS1. No se predicen sitios de N-glicosilación.

1 CAAACGGACACGCAGAATCGTATATAATAGAGGACCGGGGCAAGCAATGGTCTCTGCAGAGTTGACCTCTCCACCTACCGCTCCTTCGCACTTTCCTTTC

Caja TATA TSS +1

101 TCCCGGCCCGGTGCCACCTTTTCCCGCTCAGCTCAGATTACGACATGTTCTTCAACGCAGCCATCTTCGTTTCTGTTCTCGCTGTTGTCGGCTTTGT

5'UTR

M F F N A A I F V S V L A V V G F V

201 TATCGCTGCTCCTACTGGGTGCAACATGGTGATGGTACgtggggtcggcgagacggggtggacggaggcttgataagttttccctctaggtacCTTTT

I A

A P T G L Q H G D G T Intrón I F

301 ACGCCACGGGCTTGGGTGCTTGCGGCAAGGTCAACGTCGACACGGACATGATCGCAGCAGTGTGCGACCAGTTCTTCAACAGCTTCCGtaagtaggaca

Y A T G L G A C G K V N V D T D M I A A V S H Q F F D S F P

401 tcgaacttgccctacacctcgtttaacctccaatgttcagCGGAGCAGGCGCAACCCGAACAACAACCAATTTGCGGAAGGGCTGCGACGGTACACC

Intrón II

G A G A N P N N N P I C G R T A T V H

501 gtaagtgttataagtaacttgattatccacacgctcaccaatatgattgtagACGGGTCAAAGACGATCAAGGTTGATCACCACCGCTGTGGCGGAT

Intrón III

H G S K T I K V Q I T D R C G G

601 GCAAGGGCGCAACCGATCTGGATTTCTGCCCTCCGCCTTCAACAAGCTTGCAGACCCAGCGTCGGCCGTATTCCGATCACCTGGACCCCTGGATTAGAG

C K G A T D L D F S P S A F N K L A D P S F G R I P I T W T L D Stop

701 TTGCAACGAGAGGATCACACTTTCTGGTTACGACCTAGACAACCTGTACAGTGCTTGAGCTGCAAAATGTCAGGTTTGGAGGAGTTTTTCCACACTGC

3'UTR Señal predicha de poliadenilación

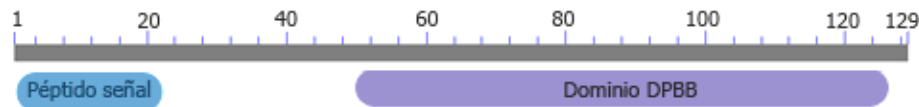


Figura 17. Secuencia de DNA genómico y de aminoácidos de LOOS1. Se muestran los 3 intrones (I, II y III) y la secuencia codificante de *loos1*. Las secuencia 5'UTR y 3'UTR están indicadas, así como la posible señal predicha de poliadenilación AAATG y las T125 y T127 predichas O-glicosiladas (subrayado). En el extremo amino terminal se señala un potencial péptido señal de 20 aa (sombreado) y en el extremo carboxilo se señala la secuencia que corresponde al dominio DPBB (punteado). Se muestra también la secuencia de LOOS1 y el dominio DPBB identificado en el extremo carboxilo terminal.

En la búsqueda de secuencias con BLASTp se identificaron distintos porcentajes de identidad que LOOS1 tiene con diferentes proteínas predichas o anotadas como expansinas de hongos basidiomicetos y ascomicetos (Tabla 7).

Tabla 7. Identidad de LOOS1 con otras proteínas de hongos.

Número de acceso	Descripción actividad [Organismo]	% Identidad aa
BASIDIOMICETOS		
ADI72050.1	loosenina [<i>Bjerkandera adusta</i>]	
XP_001873229.1	Proteína familia expansina [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]	64%
BAH80450.1	Enzima putativa formadora de riboflavina-aldehído [<i>Lentinula edodes</i>]	54%
XP_002912124.1	Enzima putativa formadora de riboflavina-aldehído [<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama 7130]	57%
ACZ59470.1	Proteína familia expansina [<i>Flammulina velutipes</i>]	54%
XP_003029770.1	Proteína de la familia expansina sin modulo catalítico [<i>Schizophyllum commune</i> H4-8]	53%
XP_003033878.1	Proteína hipotética [<i>Schizophyllum commune</i> H4-8]	53%
XP_758408.1	Proteína hipotética UM02261.1 [<i>Ustilago maydis</i> 521]	49%
ASCOMICETOS		
XP_001387493.1	Enzima putativa formadora de riboflavina-aldehído [<i>Pichia stipitis</i> CBS 6054]	56%
EEQ45357.1	Proteína hipotética conservada [<i>Candida albicans</i> WO-1]	52%
XP_002419772.1	Proteína no anotada [<i>Candida dubliniensis</i>]	52%
XP_460115.2	DEHA2E18744p [<i>Debaryomyces hansenii</i>]	52%
XP_002842519.1	Proteína no anotada [<i>Tuber melanosporum</i>]	51%
XP_002545265.1	Proteína predicha [<i>Candida tropicalis</i> MYA-3404]	50%
XP_001524386.1	Proteína hipotética conservada [<i>Lodderomyces elongisporus</i> NRRL YB-4239]	50%
XP_001274340.1	Enzima putativa formadora de riboflavina-aldehído [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	48%
XP_001259643.1	Enzima putativa formadora de riboflavina-aldehído [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181]	42%

ENRIQUECIMIENTO DE LOOS1

La proteína LOOS1 de 129 aa se expresó heterológamente en *S. cerevisiae* bajo un promotor regulable por cobre y se enriqueció por ultrafiltración (concentrada 5000 veces, de 1 L se obtienen 150 µg de proteína). Las preparaciones del extracto crudo y de la proteína enriquecida mostraron que el peso molecular de LOOS1 es de ~15 kDa (Figura 18), mientras que el tamaño predicho con ProtParam (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/protparam>) de la proteína madura es de 11.2 kDa. Esta

diferencia en el tamaño sugiere algún tipo de modificación transcripcional, posiblemente una O-glicosilación en las T125 y T127 como se había predicho, aunque estos datos aún se tienen que confirmar.

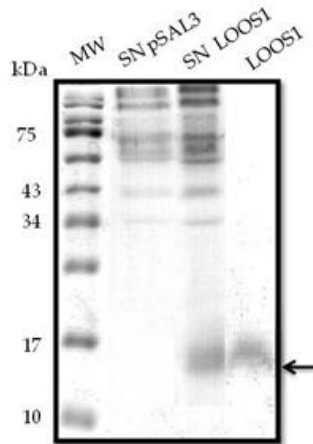


Figura 18. Enriquecimiento de LOOS1. Gel SDS-PAGE 15% con las proteínas de los sobrenadantes de levadura transformados con el vector pSAL3 (SN pSAL3), con pSAL3-LOOS1 (SN LOOS1) y LOOS1 enriquecida (20 μ g). Con la flecha se señala el tamaño de LOOS1. MW, Molecular Weight marker.

LOOS1 ACTÚA SOBRE CELULOSA MODIFICANDO SU ESTRUCTURA

La actividad de LOOS1 (20 μ g), del extracto crudo (20 μ g), de una endoglucanasa comercial (control) o del buffer de acetato de sodio (control) sobre las fibras de algodón visualizadas al microscopio mostró que las fibras tratadas con los controles mantuvieron su estructura homogénea, con un ancho de la fibra entre los 13 y 17 μ m (Figura 19, arriba). Por el contrario, las fibras tratadas con LOOS1 mostraron cambios locales en su estructura observadas como zonas relajadas o burbujas a lo largo de la fibra con al menos 40 μ m de ancho (Figura 19, abajo), 2.6 veces más respecto a las fibras control (Figura 19, arriba). La apariencia de estas burbujas depende de la concentración de LOOS1 ya que en las fibras tratadas con 20 μ g de proteína se observó en promedio 1 burbuja/campo (ancho promedio 52.25 μ m \pm 10.07) y cuando se utilizaron 40 μ g de proteína se observaron 1.6 burbujas/campo (ancho promedio 66.62 μ m \pm 10.62). Estos datos se compararon con los obtenidos en los controles donde no se observaron burbujas evidentes del mismo tipo.

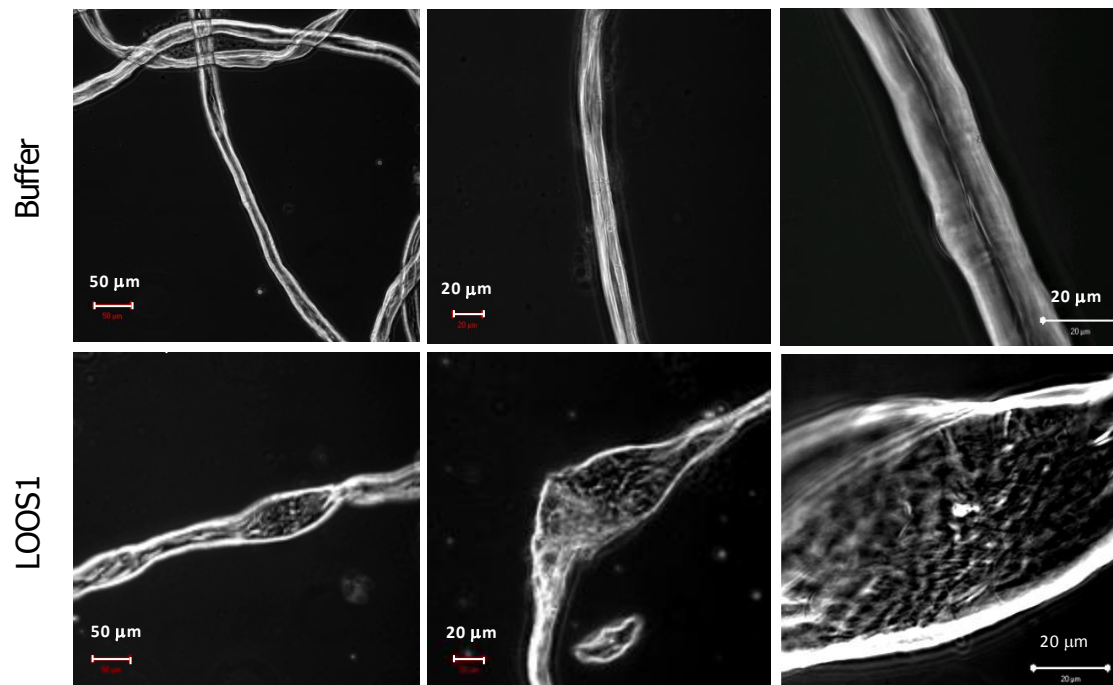


Figura 19. LOOS1 modifica la estructura de la celulosa. Micrografías de fibras de algodón observadas por contraste de fases incubadas con buffer de acetato de sodio pH 5 (arriba) o con LOOS1 (abajo). Las estructuras en forma de burbuja se observaron en las muestras tratadas con LOOS1. Las observaciones se hicieron a diferentes aumentos: 20X (izquierda), 40X (centro) y 100X (derecha).

LOOS1 FAVORECE LA ACTIVIDAD DE UNA ENDOGLUCANASA SOBRE FIBRAS DE ALGODÓN

A las fibras de algodón tratadas durante 8 horas con 20 μg de LOOS1 enriquecida se les agregó 0.5 U de una endoglucanasa comercial. Después del tratamiento se liberaron AR a una velocidad de 1.12 $\mu\text{mol}/\text{minuto}$, la actividad específica de LOOS1 fue de 56 UI/mg proteína. La velocidad de liberación de AR fue directamente proporcional a la cantidad de LOOS1 utilizada en la reacción, ya que cuando se utilizaron 40 μg de proteína se liberaron 2.19 μmol AR/minuto y se obtuvo una actividad específica de 55 UI/mg proteína. En las muestras control no se detectaron AR, lo que indica que el tratamiento de mercerización no causa alteraciones en la estructura de las fibras capaces de liberar AR en presencia de la endoglucanasa (Figura 20a). LOOS1 no tiene una actividad celulolítica ya que en ausencia de la endoglucanasa no se detectaron AR.

LOOS1 FAVORECE LA DEGRADACIÓN DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Se analizó el efecto de incubar fibras de *Agave tequilana* con LOOS1 y después tratarlas con la mezcla comercial de celulasas y xilanasas (GC-220). Después de 8 horas de incubación con LOOS1 y de 10 minutos de incubación con la mezcla enzimática, las fibras de agave tratadas previamente con LOOS1 liberaron 3.2 veces más AR que las muestras tratadas únicamente con la mezcla comercial,

después de 1 hora de incubación se liberaron 7.5 veces más AR. En las muestras control la cantidad de AR liberados es mínima (Figura 20b).

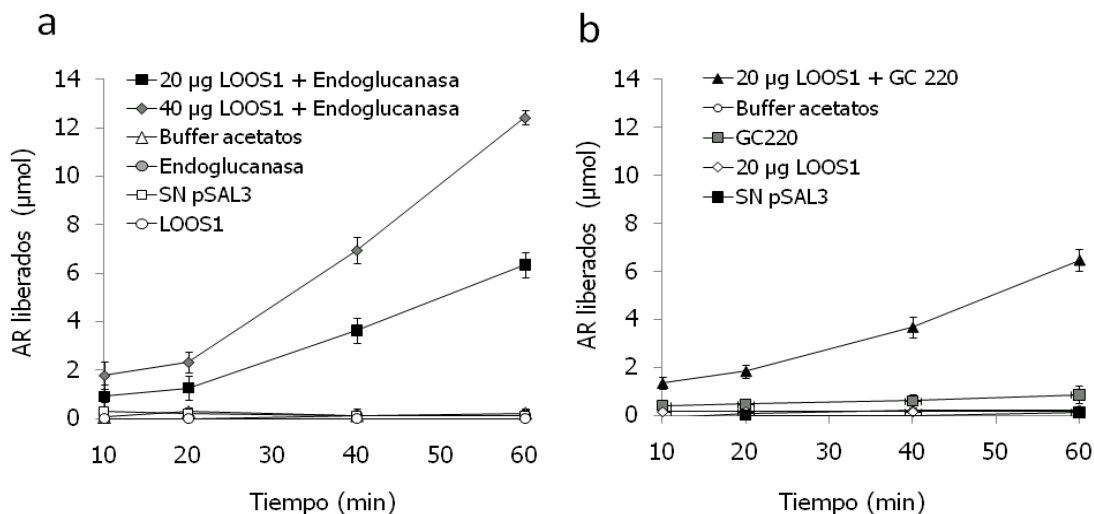


Figura 20. LOOS1 favorece la liberación de AR de fibra de algodón y agave. (a) Efecto de LOOS1 sobre la liberación de AR de fibras de algodón. La velocidad de reacción (pendiente) utilizando 20 µg y 40 µg de LOOS1 es de 1.12 y 2.19 µmol/min, respectivamente. (b) Efecto de LOOS1 sobre la liberación de AR de fibras de bagazo de agave tratadas con la mezcla comercial de celulasas y xilanasas (GC220). El valor de la pendiente utilizando 20 µg de LOOS1 es de 1.1 µmol/min. Los experimentos se hicieron por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar.

LOOS FAVORECE LA LIBERACIÓN DE GLUCOSA DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Utilizando el kit de medición de glucosa y xilosa (Megazyme) se detectó que la glucosa es el principal azúcar reductor liberado por la fibra de agave, alcanzando hasta 689 µg/ml de glucosa (0.689 g/L) después del tratamiento de la LOOS1 y la mezcla enzimática. La cantidad de xilosa que se libera es muy baja (Tabla 8). El tratamiento de mercerización favorece la liberación de glucosa de la fibra de agave ya que se libera el doble de glucosa en la fibra mercerizada tratada con LOOS1 y la mezcla enzimática, respecto a la que no se mercerizó. Por otro lado, también se observó que el simple proceso de mercerización no es suficiente para liberar una cantidad importante de glucosa, como se observa en el control (buffer de acetato de sodio).

Tabla 8. Efecto de la actividad de LOOS1 en la liberación de glucosa y xilosa de sustratos mercerizados o no mercerizados.

Tratamiento	Glucosa ($\mu\text{g/ml}$)	Xilosa ($\mu\text{g/ml}$)
Fibra de agave mercerizada		
Buffer acetato de sodio	5.40 \pm 1.46	0.05 \pm 0.00001
LOOS1	8.11 \pm 1.77	0.15 \pm 0.00003
LOOS1+Coctel GC220	689.99 \pm 36.71	ND
Coctel GC220	20.81 \pm 1.50	ND
Fibra de agave no mercerizada		
Buffer acetato de sodio	0.03 \pm 0.03	0.12 \pm 0.00010
LOOS1	7.23 \pm 0.13	1.40 \pm 0.00005
LOOS1+Coctel GC220	326.69 \pm 34.86	0.07 \pm 0.00008
Coctel GC220	12.67 \pm 16.64	0.04 \pm 0.00011

Se muestra la desviación estándar de 3 experimentos independientes. ND, no detectable.

EFFECTO DE LA MERCERIZACIÓN SOBRE LA LIBERACIÓN DE AR

En las fibras de algodón mercerizadas se observó una mayor liberación de AR respecto a las fibras no mercerizadas (Figura 21).

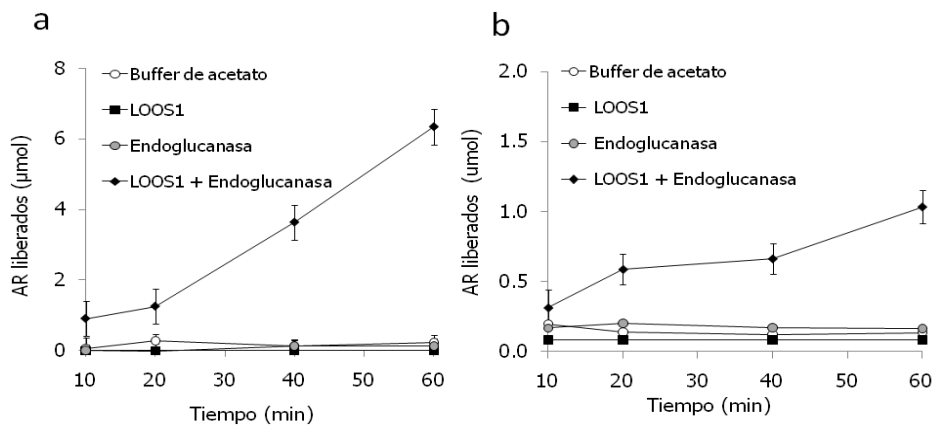


Figura 21. Efecto de la mercerización de la fibra de algodón sobre la liberación de AR. a) Fibras de algodón mercerizado y b) no mercerizado (ver escala). La cantidad de AR liberados después de mercerizar es mayor respecto a las fibras no mercerizadas después del tratamiento con LOOS1 y de agregar endoglucanasa comercial (rombos negros en a) y b)). En los controles la cantidad de AR liberados es baja. Los experimentos se hicieron por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar.

Un resultado similar se obtuvo con las muestras de Avicel mercerizado y no mercerizado, en donde se liberan más AR en las muestras mercerizadas (Figura 22).

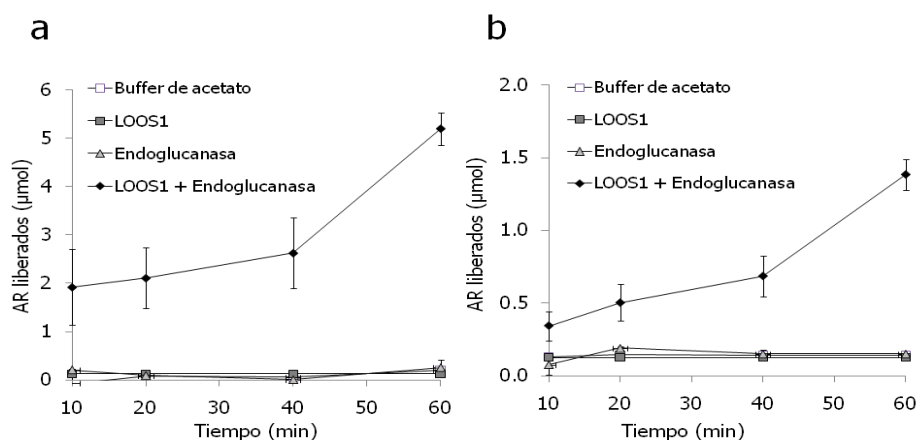


Figura 22. Efecto de la mercerización del Avicel sobre la liberación de AR. a) Avicel mercerizado y b) no mercerizado (ver escala). La cantidad de AR liberados después de mercerizar es mayor que en las fibras no mercerizadas. En los controles la cantidad de AR liberados es baja. Los experimentos se hicieron por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar.

ESTABILIDAD DE LOOS1 A LA TEMPERATURA Y AL pH

Dado que la robustez de las enzimas es un factor clave en las aplicaciones industriales, se realizó un análisis de la tolerancia a la temperatura y al pH de LOOS1. La termoestabilidad de LOOS1 después de incubarla a diferentes temperaturas, agregar la endoglucanasa comercial y monitorear la liberación de AR a 50°C mostró que la actividad específica a 25°C fue de 55.58 UI/mg proteína, 8 veces mayor que la actividad específica observada a 15°C. No se detectaron AR después del tratamiento a 40°C y a temperaturas superiores, lo que indicó que LOOS1 no es termoestable (Figura 23a). La tolerancia de LOOS1 al pH se evaluó en diferentes soluciones buffer desde pH 3 hasta 10. A pH 3, LOOS1 retuvo el 42.6% de su actividad original (24.17 UI/mg proteína comparado con 56.7 UI/mg proteína alcanzado a pH 5). A pH neutro, la actividad remanente de LOOS1 fue de 49.5% y 10.6% a pH 10 (Figura 23b).

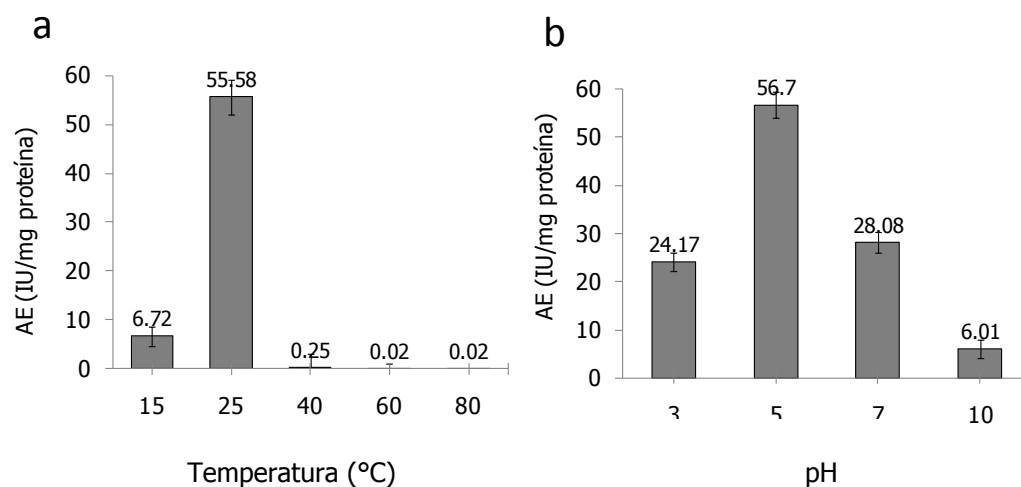


Figura 23. Termoestabilidad y estabilidad al pH de LOOS1. Actividad específica de una endoglucanasa sobre fibras de algodón previamente tratadas con LOOS1 incubadas a diferentes temperaturas (a) y pH (b). Los experimentos se hicieron por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar. Los valores sobre las barras indican el valor de la AE.

LOOS1 PARECE MODIFICAR LA ESTRUCTURA CRISTALINA DE LA CELULOSA

Una modificación en el arreglo espacial de la molécula de celulosa y sus componentes (interacciones intra e intermoleculares) es detectable en un espectro infrarrojo (IR). Después de incubar celulosa cristalina (Avicel) con 20 μg de LOOS1 se observaron cambios en su estructura.

El cambio de la cristalinidad de la celulosa I a celulosa II por efecto de la mercerización se puede observar en varios picos definidos en la región de 1500 a 800 cm^{-1} (Tabla 9).

En el Avicel, que tiene estructura de celulosa I, se detecta un pico a 1430 cm^{-1} que cambia a 1420 cm^{-1} después del tratamiento con NaOH 25% o con LOOS1. Se observa también que la banda a 1115 cm^{-1} disminuye su intensidad después de la incubación del Avicel con NaOH 25% y NaOH 25% con LOOS1. En la banda de 895 cm^{-1} ocurre un cambio del pico a 900 cm^{-1} , además hay un aumento en la intensidad de la banda después del tratamiento del Avicel con LOOS1 o con NaOH 25% (Figura 24).

En general, después de la mercerización la banda de 1430 cm^{-1} disminuye y eventualmente desaparece, mientras que la banda de 895 cm^{-1} muestra un marcado incremento. Otras bandas importantes que se identificaron en la muestra de Avicel con buffer de acetatos están a 1283 cm^{-1} y 1375 cm^{-1} las cuales disminuyen después de mercerizar el Avicel.

El resultado preliminar de la modificación de la estructura cristalina del Avicel por LOOS1 utilizando espectroscopía de infrarrojo aún debe ser confirmado debido a las dificultades para reproducirlo. Se sugiere utilizar otras técnicas como la espectroscopía Raman o la difracción de rayos

X que se ha reportado para el análisis de la estructura de la celulosa (Schenzel and Fischer, 2001; Bansal *et al.*, 2010).

Tabla 9. Bandas características de los espectros de IR relacionados con la transformación de la celulosa I a celulosa II por tratamiento con NaOH. Revisado de Oh *et al.* (2005).

Características	Celulosa I (cm-1)	Celulosa II (cm-1)	Asignación del cambio
Cambio en el pico	1430	1420	Doblamiento CH2 en C6
	1165	1162	Estiramiento COC del plano en C6
	1032	1019	Estiramiento CO en C6
	895	900	Estiramiento COC en el enlace Betaglicosídico
Disminución en la intensidad del pico	1375	1375	Doblamiento COH en plano del C-2 o C-3
	1283	1283	Doblamiento COH en plano del C-2 o C-3
	1115	1115	Estiramiento del anillo en el plano

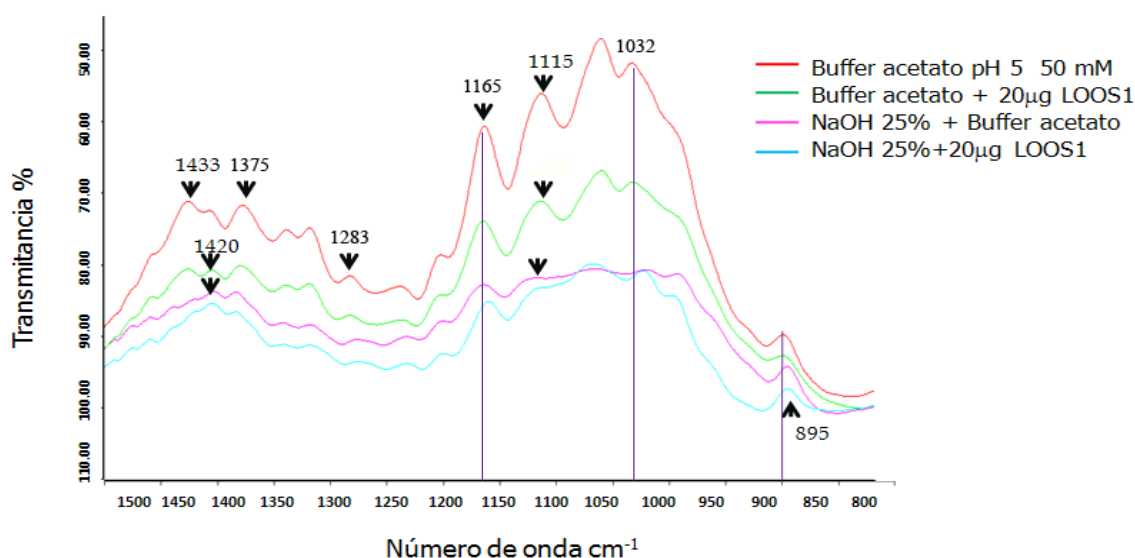


Figura 24. LOOS1 parece modificar la estructura cristalina del Avicel. Espectro IR de Avicel sometido a diferentes tratamientos, se muestran los picos importantes que indican el cambio de la estructura cristalina de la celulosa I a celulosa II. Las líneas evidencian el cambio de la posición del pico.

LOOS1 SE UNE A POLISACÁRIDOS

La proteína LOOS1 es capaz de unirse específicamente a sustratos como el Avicel y la quitina, un polisacárido de (β-1,4) N-acetil-D-glucosamina ampliamente distribuido en la naturaleza y presente en la pared celular de los hongos. Como se muestra en la Figura 25, LOOS1 tiene una afinidad por la

celulosa cristalina y la quitina, sin embargo no se observó una unión específica por el xilano de avena dado que LOOS1 se encontró en la fracción unida y no unida.

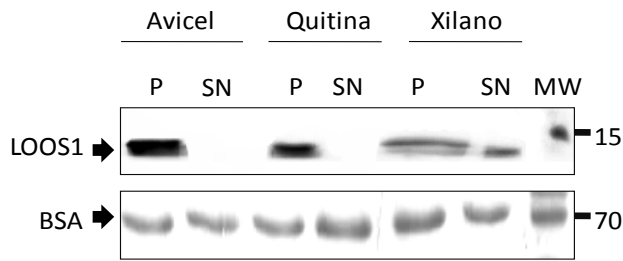


Figura 25. LOOS1 se une a polisacáridos. Se observa la afinidad de LOOS1 a Avicel y a quitina. La unión al xilano de avena no es específica. P, pastilla (fracción unida) y SN, sobrenadante (fracción no unida). BSA, control.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOOS1

Alineamiento de secuencias con identidad a LOOS1

Como resultado de la búsqueda de secuencias de proteínas por BLASTp, se identificaron diversas secuencias de proteínas de hongos que presentan porcentajes altos de identidad. Algunas de estas secuencias pertenecen a hongos filamentosos y otras a especies de levaduras no celulolíticas como *Candida sp.* Estas secuencias se alinearon y se identificaron los aminoácidos conservados entre ellas, también se identificaron 4 cisteínas estrictamente conservadas que forman dos puentes disulfuro (Figura 26). Las posiciones conservadas en la superposición estructural corresponden a aminoácidos que forman el posible sitio de unión a polisacáridos.

Los aminoácidos que forman el potencial surco de unión a polisacáridos altamente conservados también se identificaron en las secuencias de proteínas de hongos con los que LOOS1 presenta identidad (Ver Tabla 7 para revisar porcentajes de identidad).



Figura 26. Alineamiento de la proteína LOOS1 y proteínas de hongos. Los residuos equivalente se indican con . o : y los conservados con asteriscos. Los residuos que forman el posible sitio de unión a polisacáridos se muestran resaltados en amarillo y cian y las 4 cisteínas conservadas se señalan con flechas. En el recuadro se señala el motivo conservado DLD(F/V/L).

Filogenia de LOOS1

El árbol filogenético construido en MEGA 4 con el método de Neighbor Joining mostró que LOOS1 se ubica en un grupo distinto al de las proteínas de la superfamilia expansina y al de las swolleninas, las cuales se agrupan en sus respectivos clados (Figura 27). Otras proteínas que se agrupan con LOOS1 son de otros hongos como *Laccaria bicolor*, *Ustilago maydis*, *Coprinopsis cinerea* (basidiomicetos), *Trichoderma atroviride* y *Neurospora crassa* (ascomiceto) y levaduras como *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis*.

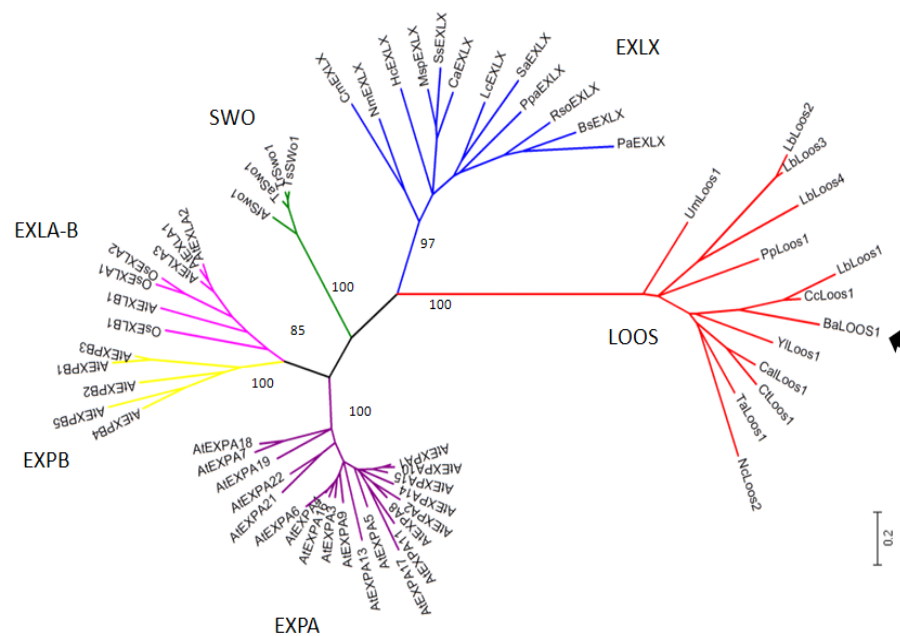


Figura 27. Posición filogenética de LOOS1. Árbol filogenético obtenido por el método NJ, LOOS1 se señala con una flecha y se muestran los valores de bootstrap en cada rama. Un árbol similar se obtuvo utilizando solamente el dominio DPBB de las secuencias.

Modelado por homología de LOOS1

En el programa PHYRE se identificaron 2 expansinas y un homólogo de expansina con valores de E significativos (entre 1.4×10^{-6} y 3.7×10^{-10}). Las secuencias corresponden a la EXLX1 de la bacteria *Bacillus subtilis* (PDB:2BH0), al alérgeno de polen PHL P1 (dominio N-terminal) del pasto *Phleum pratense* (PDB:1N10) y a una EXPB de maíz (PDB:2HCZ). Las secuencias tienen una precisión estimada del 100%, indicando una asignación exitosa del plegamiento sobre el dominio DPBB. La identidad a nivel de las secuencias primarias es de 19, 19 y 20% respectivamente (datos no mostrados), lo que sugiere que LOOS1 es un homólogo lejano de las expansinas.

Se reconstruyeron los modelos de LOOS1 a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de 2BH0, 1N10 y 2HCZ utilizados como plantillas. Los 5 modelos obtenidos son

esencialmente idénticos, con un RMSD (Root Mean Square Deviation) promedio de 0.4 Å. Las estructuras 2BH0 y 1N10 tienen un RMSD de aproximadamente 1.4 Å y 2HCZ de 0.5 Å (Figura 28). El valor de RMSD de las estructuras alineadas indica las divergencias entre ellas. LOOS1 solamente posee el dominio DPBB como se observó en el análisis del plegamiento.

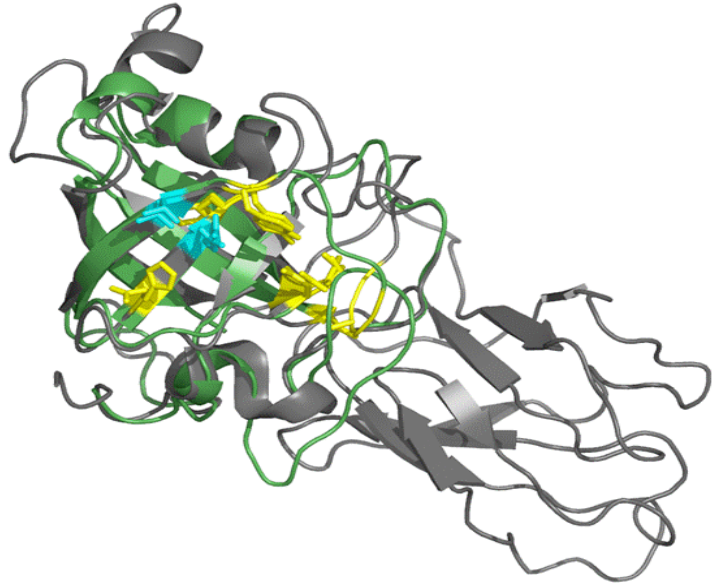


Figura 28. Superposición estructural del modelo de LOOS1 (verde) con 2HCZ (gris). Los residuos identificados como parte del sitio de unión a polisacáridos en 2BH0 se muestran en amarillo (estrictamente conservados) y en cian (conservados). Los residuos conservados corresponden a los que reportan Kerff *et al.* (2008).

Cuando se sobrepone el modelo de LOOS1 y los modelos de 2BH0, 1N10 y 2HCZ se identifican algunos residuos conservados. En LOOS1, la T31 y el D105 corresponden a los residuos conservados T12 y D82 de la EXLX1 de *B. subtilis* que forman un puente de hidrógeno entre el hidroxilo de la treonina y el grupo carboxilo del aspartato. Otros residuos que muestran una conservación de secuencia entre la loosenina y las otras tres estructuras son G38, A39, G75, T92 y D93 (Figura 29).

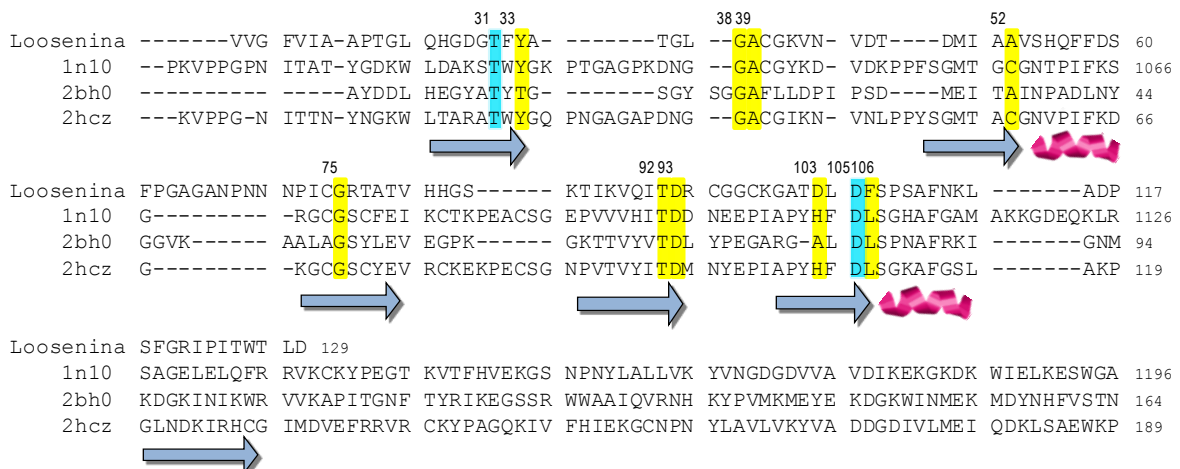


Figura 29. Alineamiento de las secuencias utilizadas en la superposición tridimensional. Se alinearon las secuencias de aa de 1N10, 2BH0 y 2HCZ con LOOS1. Los sitios de unión a polisacáridos conservados se muestran en amarillo y cian. La estructura secundaria se indica en flechas (láminas beta) y hélices (alfa hélices).

Análisis del promotor de *loos1*

Las bases de datos de factores transcripcionales permitieron identificar potenciales sitios de unión de factores de transcripción en una región de 2.3 Kb que precede al sitio de inicio de la transcripción del gen *loos1*, las cuales podrían estar relacionados con su regulación.

De la búsqueda de secuencias de promotores en las bases de datos de los genomas de algunos hongos, solamente en *Laccaria bicolor* se identificaron 2 promotores que presentan identidad con la secuencia del promotor de *loos1*. Los genes de estos promotores corresponden a secuencias de proteínas anotadas como miembros de la familia de expansinas de este hongo.

Las secuencias de los 2 promotores se alinearon con la del promotor de *loos1* utilizando ClustalW2. El programa P-Match identificó secuencias reguladoras dentro de las regiones conservadas, entre las que se encuentran la caja TATA que es identificada por la TBP (TATA Binding Protein), así las como secuencias de unión de los factores transcripcionales Gata, AbaA, MCM1, StuAp y Ste11, entre otros. Sin embargo, quedaba la posibilidad de que estos sitios de unión fueran identificados al azar y sin ninguna especificidad, fue por esto que se utilizó la herramienta random sequence (<http://embnet.ccg.unam.mx/rsa-tools/>) para generar secuencias al azar con el mismo contenido de A, T, G y C que la secuencia del promotor de *loos1*, esto con la idea de evaluar si los sitios de unión de FTs identificados en el alineamiento con las 3 secuencias se encontrarían al azar o si eran específicos. Nuevamente, se encontró que los sitios de unión de Gata, AbaA, MCM1, StuAp y Ste11, pueden ser encontrados en secuencias generadas al azar.

A pesar de que en *L. bicolor* se encontraron 2 promotores con identidad al promotor de *loos1*, se trata de un número reducido de secuencias de promotores utilizados (3 secuencias) para llevar a cabo un análisis sobre los elementos reguladores identificados, lo que no permite tener resultados concluyentes. Debido a esto, se decidió hacer una búsqueda de los promotores de las secuencias con las que la proteína LOOS1 presentara un mayor porcentaje de identidad. Sobre el alineamiento de dichas secuencias (11 en total) se utilizó la herramienta Clustal-profile para alinear la secuencia del promotor de *loos1*, desafortunadamente, no fue posible identificar ningún patrón o secuencia conservada entre éstas. Posiblemente debido a que existe una divergencia entre las secuencias de los promotores que impiden lograr un arreglo de secuencias conservadas.

9. DISCUSIÓN

El descubrimiento de nuevas enzimas que participen en la degradación del material lignocelulósico a través de la modificación de la estructura de la celulosa o hemicelulosa, aumentando su accesibilidad, ofrece la oportunidad de mejorar la eficiencia de este proceso.

Además de las expansinas descritas en plantas y otros organismos, en el hongo *T. reesei* se ha identificado una proteína llamada swollenina (SWO1), que es capaz de modificar el arreglo ordenado de las fibras de algodón y papel filtro (Saloheimo *et al.*, 2002). A pesar de que la swollenina no se ha clasificado como una expansina por no poseer los dos dominios característicos de estas proteínas (sólo tiene el dominio de alérgenos de polen y un módulo de unión a celulosa) sí se ha observado su capacidad para causar modificaciones a la fibra de algodón sin causar una liberación de AR.

El hecho de que existan dominios tipo expansina en diferentes microorganismos podría tener diversos sentidos biológicos. Podrían relajar la pared celular del sustrato (por ejemplo, celulosa) para tener una mejor accesibilidad al mismo, como en el caso del nemátodo *Globodera rostochiensis*, patógeno de la papa que utiliza la expansina Gr-EXPB1 para relajar la estructura de la pared celular del huésped y favorecer su invasión (Qin *et al.*, 2004). En *Trichoderma asperellum*, se ha encontrado que una swollenina participa favoreciendo el proceso de colonización de raíces tejidos vegetales al remodelar la pared celular (Brotman *et al.*, 2008). Otra función importante sería para favorecer procesos de simbiosis entre plantas y hongos como la que ocurre entre el hongo formador de micorrizas *Glomus intraradices* y la planta del tomate, donde la expansina de la planta EXLB1 se expresa en eventos previos a la invasión del hongo en la raíz favoreciendo la colonización por la hifa del hongo (Dermatsev *et al.*, 2010).

Se ha sugerido también que las proteínas con dominios de expansinas participarían en procesos de rearrreglos de la pared celular de manera similar al papel de las expansinas en células vegetales.

Por ejemplo, en *Aspergillus nidulans* se identificó la proteína Eg1D, una endoglucanasa con un dominio tipo expansina, que se ha propuesto que participaría en el remodelamiento de la pared celular durante la germinación de conidiosporas, donde se le ha localizado (Bouzarelou *et al.*, 2008).

En este trabajo, reportamos un nuevo tipo de proteína con actividad expansina, LOOS1, del hongo basidiomiceto *B. adusta*. En la estructura del gen *loos1*, se identificaron tres intrones con un tamaño promedio de 53 nt, esta longitud parece ser común en hongos, ya que se ha visto que en los ascomicetos *A. nidulans*, *N. crassa* y en el basidiomiceto *Cryptococcus neoformans* el tamaño de sus intrones tiene una longitud de 50-70 nt, un tamaño mucho menor al reportado en levaduras como *S. cerevisiae* donde el tamaño de los intrones es de 401-2000 nt (Kupfer *et al.*, 2004). Parece que en hongos ascomicetos y basidiomicetos, los intrones son cortos pero están en mayor número en el genoma, por el contrario, en las levaduras los intrones son largos pero hay una cantidad considerablemente menor en el genoma (Kupfer *et al.*, 2004).

LOOS1 es capaz de relajar la estructura de la fibra de algodón, causando hinchamientos locales como los observados en las micrográficas del algodón incubado con LOOS1, además estos hinchamientos no se observaron en las fibras incubadas con buffer de acetatos, lo que evidencia la actividad de la proteína. Se sugiere que LOOS1 se une a la celulosa del algodón a través de ciertos aminoácidos de su secuencia, y que al igual que las expansinas, causa modificaciones en los puentes de hidrógeno de la estructura ordenada de la celulosa convirtiéndolas en regiones menos ordenadas o amorfas que son fácilmente hidrolizadas por las celulasas.

La observación de zonas relajadas en las fibras de algodón ya se había reportado en swolleninas de hongos con actividad tipo expansina (Saloheimo *et al.*, 2002).

Por otro lado, existe una dependencia entre la dosis de proteína utilizada y la liberación de AR, a mayor cantidad de LOOS1 utilizada durante la incubación es mayor la cantidad de AR liberados. Es importante destacar que la liberación de AR solamente ocurre después del tratamiento con LOOS1, ya que se observó que la actividad de la endoglucanasa comercial no es suficiente para liberar AR, lo que es un indicativo de la actividad de LOOS1 sobre la celulosa del algodón.

La degradación de un sustrato lignocelulósico como la fibra de agave también se favorece en presencia de LOOS1 y de la mezcla comercial de celulasas y xilanasas, de hecho, en presencia de LOOS1 se liberan 7.5 veces más AR respecto a la muestra no tratada con la proteína.

El principal azúcar que se libera de la fibra de agave es la glucosa, lo que sugiere que LOOS1 actúa sobre la celulosa del sustrato causando rearrreglos en su estructura y facilitando su posterior degradación. La liberación de xilosa es mínima por lo que podría pensarse que LOOS1 tenga mayor especificidad por la celulosa que por la hemicelulosa, o bien, que el sustrato posea bajas cantidades de xilosa. Es importante remarcar que, de acuerdo al origen del sustrato lignocelulósico, la composición de la hemicelulosa varía; y en el caso del agave [35% celulosa, 12.6% xilanos (hemicelulosa) y 22.1% lignina] hay un porcentaje significativo de xilosa contenida en el xilano, lo que sugiere que LOOS1 sí dispone de la hemicelulosa pero es incapaz de modificarla.

Además, LOOS1 tiene un pH óptimo del mismo valor (pH 5) que el de la mayoría de las enzimas celulolíticas, lo que podría favorecer su utilización a manera de pretratamiento permitiendo una degradación eficiente de la celulosa y de otros sustratos de importancia industrial y económica.

Aunque las expansinas no hidrolizan la celulosa, se ha reportado que incrementan la hidrólisis de la celulosa, por ejemplo, Baker *et al.* (2000) utilizaron una EXPB (Zeam1) de maíz como aditivo en la sacarificación enzimática de celulosa cristalina (Sigmacell) y de aserrín de álamo previamente tratado con ácido. Las proteínas de hongos con actividad expansina también promueven la sacarificación de sustratos al desarrugar su estructura cristalina, como la swollenina de *Aspergillus fumigatus* que actúa sobre celulosa cristalina (Avicel) facilitando su sacarificación (Chen *et al.*, 2010), así como también las expansinas de bacterias, como la EXLX de *B. subtilis*, que incrementa la sacarificación del papel filtro en combinación con la mezcla comercial de celulasas, Celluclast (Kim *et al.*, 2009).

El tratamiento de mercerización del material celulósico causa un hinchamiento local aumentando el área de la superficie y disminuyendo el grado de polimerización y la cristalinidad (Goswami *et al.*, 2009). Además, permite que haya una mejor visualización y dispersión de la luz lo que mejora la observación de las fibras de algodón (Qin *et al.*, 2008).

El NaOH causa una modificación en los dominios cristalinos de la celulosa, cambiándola de celulosa I a celulosa II. En esta nueva estructura cristalina de la celulosa II, LOOS1 sería capaz de romper los puentes de hidrógeno y hacerla susceptible de ser hidrolizada por la endoglucanasa. En la celulosa I hay dos puentes de hidrógeno intramoleculares y en la celulosa II se ha perdido un puente de hidrógeno intramolecular entre el C2 y el C6, por lo que es probable que este nuevo arreglo favorezca la entrada de LOOS1 a la celulosa, facilitando así su actividad.

Después de la mercerización bajo las condiciones probadas (NaOH 25%, 4°C por 15 minutos) no se observó una disolución del sustrato celulósico, Wang *et al.* (2008) reportan que el tratamiento del algodón con NaOH a 4°C durante 25 horas solamente causa que un 5% del sustrato celulósico se disuelva, lo que sugiere que el tratamiento utilizado no causa la disolución de la fibra.

En las fibras de algodón mercerizado se liberaron 6 veces más AR que en las fibras no mercerizadas (6.34 vs 1.03 μmol de AR) lo que indica que el efecto del tratamiento sobre las fibras sí influye en la actividad de LOOS1. Un resultado similar se observó en el Avicel mercerizado, en donde se liberaron 3.7 veces más AR que con el Avicel no mercerizado (5.19 vs 1.38 μmol de AR). Un resultado similar se encontró al comparar la cantidad de AR liberados de la fibra de agave ya que se liberan 2 veces más AR después del tratamiento de mercerización (3.80 vs 1.81 μmol de AR) (datos no mostrados).

Se sugiere que el tratamiento de mercerización podría ser considerado como un pretratamiento del material lignocelulósico en donde ocurre una modificación de la celulosa I a la celulosa II, éste último estado la hace más susceptible de ser hidrolizada (Sun and Cheng, 2002).

La celulosa puede sufrir cambios en su estructura, específicamente en la cristalinidad; la forma natural más abundante de la celulosa es la llamada celulosa I o celulosa nativa (posee dominios cristalinos) en la que por procesos de mercerización pueden cambiar a la celulosa II, una estructura también cristalina y ordenada (Festucci-Buselli *et al.*, 2007). Estas modificaciones en la cristalinidad de la celulosa pueden ser detectadas por espectroscopía de infrarrojo.

El espectro IR de las muestras de Avicel tratadas con LOOS1 sugiere que la proteína sí causa modificaciones en la cristalinidad, las cuales se observaron como cambios en la región de vibraciones de estiramiento de los grupos OH en el rango de frecuencia de enlaces intramoleculares (1500 a 800 cm^{-1}). Las modificaciones en la estructura del Avicel (de celulosa I a II) después de los tratamientos con LOOS1 o NaOH ocurren principalmente en el C6 y C2 del anillo, los carbonos que participan en la formación de los puentes de hidrógeno intra e intermoleculares de las regiones cristalinas (Baldinger, 2000), lo que sugiere fuertemente que la actividad de LOOS1 sobre un sustrato cristalino causa

cambios en su cristalinidad, posiblemente no con la misma eficacia que la mercerización pero sí hay cambios evidentes en el arreglo espacial de los enlaces de la celulosa.

Por otro lado, es importante destacar que se logró la expresión de LOOS1 en levadura, a diferencia de las expansinas de plantas, las cuales no se han podido expresar heterológamente, debido posiblemente a la diferencia en el uso de codones entre los organismos o a problemas con el plegamiento.

El péptido señal predicho en la secuencia de LOOS1 es reconocido por *S. cerevisiae* dado que la proteína se encontró en los sobrenadantes del cultivo. El peso molecular aparente de LOOS1 (~15 kDa) observado en el gel desnaturalizante es mayor que el predicho por la secuencia primaria (11.2 kDa) lo que sugiere una modificación postraducciona. De hecho, en la secuencia de LOOS1 se predicen dos sitios de O-glicosilación en las treoninas de las posiciones 115 y 117, pero no de sitios de N-glicosilación. Se ha reportado que *S. cerevisiae* generalmente ensambla O-glicanos en el grupo OH de aminoácidos como serina y treonina, estos azúcares usualmente son cortos y consisten de manosas unidas por enlaces $\alpha(1-2)$ (Tanner and Lehle, 1987). En algunas proteínas de hongos como *T. reesei*, la exoglucanasa Cel7A está O-glicosilada con una cadena lineal de hasta 3 residuos de manosa (Goto, 2007), por lo que se sugiere que este tipo de modificaciones sí ocurre en hongos.

Los hongos han desarrollado diversos mecanismos para adaptarse a los distintos ambientes, lo cual implica que los mecanismos que regulan la expresión de los genes respondan a los diferentes factores externos o durante las asociaciones que establecen con otros organismos.

Los factores de transcripción (FT) tienen un papel esencial dentro de las vías de transducción de señales, siendo el último enlace entre el flujo de la señal y la expresión del gen. A partir, del análisis de los genomas y de los elementos reguladores de un promotor es difícil predecir tanto la funcionalidad de estos elementos como la de los FTs, sin embargo, es posible hacer predicciones acerca de la regulación transcripcional con cierta confiabilidad a través de distintas herramientas bioinformáticas. En hongos, este tipo de análisis es limitado debido a que no se conocen por completo los FTs generales que se pueden encontrar en hongos y cuáles de éstos son específicos de ciertas especies (Shelest, 2008).

El análisis de 3 secuencias de promotores (2 de *L. bicolor* y el de *loos1*), no permite tener un resultado concluyente, ya que son pocas secuencias y los sitios de unión de los FTs varían en la secuencia, lo que permite suponer que estas secuencias se encontraron de forma azarosa debido a los bajos porcentajes de identidad. Así mismo, al no haber identificado un patrón conservado en el alineamiento de las 11 secuencias sugiere que la divergencia entre éstos es tal, que posiblemente su regulación ocurra de distintas maneras.

Para evaluar la funcionalidad de los elementos reguladores identificados en un promotor es necesario hacer ensayos, por ejemplo, de PCR tiempo real en donde se analice si efectivamente hay una regulación por estos procesos, o bien a través del uso de genes reporteros o la mutación dirigida

de los sitios de unión de FTs, con lo cual podría confirmarse si son secuencias potenciales de regulación.

Para conocer si LOOS1 se agrupaba en alguna de las subfamilias expansinas conocidas (EXPA, EXPB, EXLA, EXLB y EXLX), o si se agrupa de manera independiente con otras proteínas con actividad expansina reportada en hongos, se hicieron reconstrucciones filogenéticas con el método de Neighbor Joining utilizando la secuencia completa de la proteína como se recomienda en el sitio de las expansinas <http://homes.bio.psu.edu/expansins/>.

La reconstrucción filogenética muestra que LOOS1 se agrupa con proteínas tipo loosenina de origen fúngico, tanto de hongos filamentosos como de levaduras. Lo cual sugiere que estas proteínas forman un grupo diferente al de las familias de expansinas establecidas.

La presencia de estas proteínas en hongos como *L. bicolor* o *N. crassa* podría explicarse debido a que son organismos capaces de degradar el material celulósico, por lo que tal vez, utilicen las proteínas con actividad loosenina que tienen para este fin. Sin embargo, la presencia de las proteínas tipo loosenina en levaduras no celulolíticas como *Candida* o *Yarrowia*, causa interés debido a la función que podrían tener en organismos no celulolíticos. La pared celular de las levaduras está formada principalmente (entre 80-90%) por mananos (unidos por enlaces β -1,4), glucanos (unidos por enlaces β -1,6 y β -1,3) y quitina en menor porcentaje (2-4% en *S. cerevisiae* y 0.6-9% en *Candida albicans*) que le confieren resistencia de la pared celular (Kollár *et al.*, 1997; Chaffin *et al.*, 1998). Es posible que las levaduras posean proteínas cuya función sea la de reorganizar la estructura de los componentes de su propia pared celular durante el crecimiento, de manera similar a las expansinas que modifican la pared celular vegetal para promover su crecimiento.

En el análisis del modelado por homología de LOOS1 con proteínas cristalizadas se encontró que el dominio DPBB de LOOS1 se pliega de manera semejante al dominio DPBB identificado en una β expansina de maíz, la conservación estructural de este dominio sugiere que el arreglo tridimensional es importante para la actividad modificadora de LOOS1, además conserva los residuos que podrían estar participando en la unión al polisacárido.

Kerff *et al.* (2002) identificaron 4 posiciones importantes para la unión a polisacáridos, que corresponden a Y33 de LOOS1, (conservada en 2HCHZ y 1N10, y cambiada por T en 2BH0), A52 (conservada en 2BH0, pero cambia por C en 2HCHZ y 1N10), y D106 y F109 (conservada como L en 2HCHZ, 2BH0 y 1N10). Excepto por la posición G75, todos estos residuos son parte de un surco que se propone actúa como el sitio de unión a polisacáridos a través de puentes de hidrógeno. El modelo sugiere que LOOS1 es una proteína capaz de unirse a los polisacáridos.

El dominio DPBB (PFAM CL0199), con una estructura de barril β de seis hebras que forma un surco para la unión al sustrato es común en las estructuras de algunas proteínas de las familias: 3D, Barwin, Cerato-plataninas, DPBB1 y Glucosil hidrolasas 45 (GH45) (Castillo *et al.*, 1999).

Este dominio se ha identificado en proteínas relacionadas con la inducción de necrosis en plantas (Cerato-plataninas), en endoglucanasas (GH45) y en proteínas que inducen el sistema de defensa en plantas (proteínas Barwin); en todas estas proteínas es necesario un dominio de unión a polisacáridos.

Es interesante que la estructura de LOOS1 esté formada sólo por un dominio (DPBB), lo que sugiere que éste sea suficiente para unirse al sustrato y modificar su estructura, como lo sugieren los aminoácidos conservados que están relacionados con la unión a polisacáridos.

Además, LOOS1 al carecer del dominio II y debido a su tamaño pequeño podría tener una mayor movilidad para actuar.

En el dominio DPBB se ha identificado un motivo conservado en la Superfamilia expansina: la secuencia HFDL (Sampedro and Cosgrove, 2005). En las proteínas de hongos con similitud a la loosenina esta secuencia conservada cambia por la secuencia DLD(F/V/L). Destaca el hecho de que la histidina no está presente en las proteínas de hongos y en su lugar se encuentre un ácido aspártico. En la segunda posición, el cambio es de una fenilalanina por una leucina, ambos, aminoácidos no polares. En la tercera posición, se conserva el ácido aspártico mientras que en la cuarta posición la variabilidad es mayor, ya que puede haber una fenilalanina, valina o leucina, todos ellos aminoácidos no polares. Es importante resaltar que el dominio DLD(F/V/L) posee 3 aminoácidos (1ª, 3ª y 4ª posición) que participan en la unión al polisacárido, por lo que es posible que los cambios observados no alteren la función de las proteínas tipo looseninas.

Para que las enzimas celulolíticas hidrolicen eficientemente los sustratos lignocelulósicos primero debe ser posible tener un acceso a la celulosa que se encuentra empaquetada en las microfibrillas y recubierta por la hemicelulosa y la lignina. El proceso llamado amorfogénesis, que es el aumento en el área de la celulosa relajada por la acción de proteínas no hidrolíticas permitiría la entrada de las celulasas haciendo más eficiente el proceso de sacarificación (Arantes and Saddler, 2010). Se sugiere que la proteína LOOS1, con actividad amorfogénica sobre la celulosa, podría tener un papel importante en este proceso, facilitando la entrada de las enzimas hidrolíticas y haciendo más eficiente la degradación.

La función biológica de la loosenina de *B. adusta* todavía debe ser clarificada. Es posible que el hongo utilice esta proteína para degradar eficientemente la lignocelulosa en combinación con las celulasas, xilanasas y ligninasas, sin embargo, también se propone una función fisiológica de LOOS1 en el hongo, participando en el rearrreglo de la pared celular del hongo permitiendo el crecimiento de la hifa, como se ha sugerido para la proteína Eg1D de *Aspergillus nidulans* que posee el dominio DPBB (Bouzarelou *et al.*, 2008). El ensayo de unión a polisacáridos mostró que LOOS1 se une a la celulosa cristalina y a la quitina, componentes de la pared celular de las plantas y de los hongos, respectivamente. Esto sugiere que posiblemente LOOS1 sea capaz de rearrreglar la estructura de estos polisacáridos, ya sea para favorecer una posterior degradación enzimática, como en el caso de

la celulosa, o bien, para remodelar la estructura de la pared celular de los hongos con lo que favorecería el crecimiento de los mismos. La unión de LOOS1 a quitina tiene sentido si se considera que esta proteína presenta una identidad significativa con proteínas de levaduras no celulolíticas, las cuales requerirían de una actividad amorfogénica para remodelar su propia pared celular y favorecer su crecimiento. El hecho de encontrar a LOOS1 tanto en el sobrenadante como en la pastilla del xilano de avena sugiere que la unión no es específica, por lo que es posible que debido a la composición del polisacárido (>70% xilosa, 15% glucosa y 10% arabinosa) LOOS1 no pueda unirse fuertemente y se localice en las dos fracciones.

Es importante destacar que no existen reportes de proteínas con actividad amorfogénica en hongos basidiomicetos, y LOOS1 parece ser un buen candidato con aplicaciones industriales como un aditivo para incrementar la producción de AR a partir de la biomasa vegetal. En hongos basidiomicetos y ascomicetos se han identificado proteínas tipo looseninas cuya actividad aún no se ha analizado, lo que abre la posibilidad de encontrar proteínas con características semejantes en especies de interés como *N. crassa*, *T. atroviride*, *L. bicolor*, *P. sanguineus*, entre otros (Dantán-González *et al.*, 2008) de este último, su actividad celulolítica y xilanolítica se ha evaluado (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2009).

En este trabajo se mostró que LOOS1 es una proteína capaz de modificar la estructura de la celulosa, y que el Avicel y el algodón, compuestos de celulosa cristalina, son modificados por la función que la proteína posee, lo que refuerza su papel dentro del proceso de amorfogénesis.

CONCLUSIONES

- Se identificó un nuevo gen, *loos1*, cuyo producto presenta homología a proteínas anotadas como expansinas.
- La secuencia de *loos1* de 390 pb codifica para una proteína de 129 aa que posee un péptido señal funcional de 20 aa. La secuencia genómica de 551 pb de *loos1* contiene 3 intrones.
- En el modelo tridimensional de LOOS1 se identificaron aminoácidos que forman parte del sitio de unión a polisacáridos, y se confirmó que LOOS1 une a polisacáridos (celulosa y quitina) como se observó en los ensayos de unión.
- A diferencia de las expansinas de plantas, en este trabajo se logró la expresión exitosa de *loos1* en *S. cerevisiae*.
- LOOS1 de *B. adusta* es un nuevo tipo de proteína con actividad amorfogénica, compuesta de un dominio tridimensionalmente homólogo al DPBB de las expansinas.
- LOOS1 favorece la liberación de azúcares reductores de la fibra de algodón y de un sustrato natural (fibra de agave).
- LOOS1 muestra actividad en un amplio rango de pH, lo que le permitiría actuar en conjunto con las celulasas (pH 5).
- Las modificaciones de LOOS1 sobre la estructura de la celulosa, se pueden registrar por espectroscopía de infrarrojo.

LITERATURA CITADA

Alexandre, G., Bally, R., Taylor, B., Zhulin, I., 1999. Loss of cytochrome oxidase activity and acquisition of resistance to quinone analogs in a laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum* Journal of Bacteriology 181, 6730–6738.

Arantes, V., Saddler, J., 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. Biotechnology for Biofuels 3, 4.

Arcand, N., Kluepfel, D., Paradis, F., Morosoli, R., Shareck, F., 1993. Beta-mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the manA gene and characterization of the enzyme. Biochemical Journal 290, 857-863.

Aro, N., Pakula, T., Pentilla, M., 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiology Reviews 29, 719-739.

Atalla, R., 1993. The Structures of Native Celluloses. 10th international symposium on wood and pulping chemistry, TAPPI Press; Volume 1: pp. 608-614

Baker, J., King, M., Adney, W., Decker, S., Vinzant, T., Lantz, S., Nieves, R., Thomas, S., Li, L.-C., Cosgrove, D., Himmel, M., 2000. Investigation of the cell-wall loosening protein expansin as a possible additive in the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Applied Biochemistry and Biotechnology 84-86, 217-223.

Baldinger, T., Moosbauer, J and Sixta, H., 2000. Supermolecular structure of cellulosic materials by fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) calibrated by WAXS and ¹³C NMR. Lenzing Berichte 79, 15-17.

Baldrian, P., Valášková, V., 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS Microbiology Reviews 32, 501-521.

Baluska, F., Salaj, J., Mathur, J., Braun, M., Jasper, F., Samaj, J., Chua, N., Barlow, P., Volkmann, D., 2000. Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-

supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. Developmental Biology 227, 618–632.

Bansal, P., Hall, M., Reaff, M., Lee, J., Bommarius, A., 2010. Multivariate statistical analysis of X-ray

data from cellulose: A new method to determine degree of crystallinity and predict hydrolysis rates. Bioresource Technology 101, 4461-4471.

Béguin, P., Aubert, J.P., 1994. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiology Reviews 13, 25-58.

Belfield, E., Ruperti, B., Roberts, J., McQueen-Mason, S., 2005. Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. Journal of Experimental Botany 56, 817-823.

Bhat, M., Bhat, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnology Advances 15, 583-620.

Birnboim, H., 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods in Enzymology 100, 243-255.

Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. Annual Review of Plant Biology 54, 519–546.

- Bolam, D., Xie, H., Pell, G., Hogg, D., Galbraith, G., Henrissat, B., Gilberth, H., 2004. X4 modules represent a new family of carbohydrate-binding modules that display novel properties. *Journal of Biological Chemistry* 279, 22953–22963.
- Bouzarelou, D., Billini, M., Roumelioti, K., Sophianopoulou, V., 2008. EglD, a putative endoglucanase, with an expansin like domain is localized in the conidial cell wall of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 45, 839-850.
- Braithwaite, K.L., Black, G.W., Hazlewood, G.P., Ali, B.R., Gilbert, H.J., 1995. A non-modular endo-beta-1,4-mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa*. *Biochemical Journal* 305, 1005-1010.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., Chet, I., 2008. Role of Swollenin, an Expansin-Like Protein from *Trichoderma*, in Plant Root Colonization. *Plant Physiology*. 147, 779-789.
- Brown, I., Mallen, M., Charnock, S., Davies, G., Black, G., 2001. Pectate lyase 10A from *Pseudomonas cellulosa* is a modular enzyme containing a family 2a carbohydrate-binding module *Biochemical Journal* 355, 155–165.
- Brummell, D., Harpster, M., Civello, P., Palys, J., Bennett, A., Dunsmuir, P., 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11, 2203-2216.
- Carey, R.E., Cosgrove, D.J., 2007. Portrait of the expansin superfamily in *Physcomitrella patens*: comparisons with angiosperm expansins. *Annals of Botany* 99, 1131-1141.
- Carpita, N., 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 445-476.
- Carpita, N., Tierney, M., Campbell, M., 2001. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant Molecular Biology* 47, 1-5.
- Castillo, R.M., Mizuguchi, K., Dhanaraj, V., Albert, A., Blundell, T.L., Murzin, A.G., 1999. A six-stranded double-psi beta barrel is shared by several protein superfamilies. *Structure* 7, 227-236.
- Catalá, C., Rose, J., Bennett, A., 2000. Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant Physiology* 122, 527-534.
- Civello, P.M., Powell, A.L.T., Sabehat, A., Bennett, A.B., 1999. An Expansin Gene Expressed in Ripening Strawberry Fruit. *Plant Physiology* 121, 1273-1279.
- Colmer, T., Peeters, A., Wagemaker, C., Vriezen, W., Ammerlaan, A., Voeselek, L., 2004. Expression of alpha-expansin genes during root acclimations to O₂ deficiency in *Rumex palustris*. *Plant Molecular Biology* 56, 423-437.
- Cosgrove, D., Bedinger, P., Durachko, D., 1997. Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94, 6559-6564.
- Cosgrove, D., Li, L., Cho, H., Hoffmann-Benning, S., Moore, R., Blecker, D., 2002. The growing world of expansins. *Plant Cell Physiology* 43, 1436-1444.
- Cosgrove, D.J., 1997. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 9, 1031-1041.
- Cosgrove, D.J., 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407, 321-326.

- Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 850-861.
- Cunningham, E., López, D., 1994. Etanol de lignocelulósicos: Tecnología y perespectivas. Ed. CYTED. Universidad de Santiago de Compostela., 354.
- Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martinez, J.P., 1998. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. *Microbiology and Molecular Biology Review* 62, 130-180.
- Chen, F., Bradford, K., 2000. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiology* 124, 1265-1274.
- Chen, X.-a., Ishida, N., Todaka, N., Nakamura, R., Maruyama, J., Takahashi, H., Kitamoto, K., 2010. Promotion of Efficient Saccharification with *Aspergillus fumigatus* AfSwo1 Towards Crystalline Cellulose. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2556-2561.
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J., Wang, X., 2009. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnology Advances* 27, 236-255
- Cho, H., Cosgrove, D., 2000. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 9783-9788.
- Cho, H.T., Cosgrove, D.J., 2002. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 3237-3253.
- Cho, H.T., Kende, H., 1997. Expression of Expansin Genes Is Correlated with Growth in Deepwater Rice. *Plant Cell* 9, 1661-1671.
- Dantán-González, E., Martínez-Anaya, C., Méndez-Sánchez, M., González, M.C., Palomares, L.A., Folch-Mallol, J., 2008. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat. *International Microbiology* 11, 163-169.
- Darley, C.P., Li, Y., Schaap, P., McQueen-Mason, S.J., 2003. Expression of a family of expansin-like proteins during the development of *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Letters* 546, 416-418.
- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W., 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences* 5, 578-594.
- Davies, G., Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853-859.
- Dermatsev, V., Weingarten-Baror, C., Resnick, N., Gadkar, V., Wininger, S., Kolotilin, I., Mayzlish-Gati, E., Zilberstein, A., Koltai, H., Kapulnik, Y., 2010. Microarray analysis and functional tests suggest the involvement of expansins in the early stages of symbiosis of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on tomato (*Solanum lycopersicum*). *Molecular plant pathology* 11, 121-135.
- Ding, S., Ge, W., Buswell, J., 2001. Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *European Journal of Biochemistry* 268, 5687-5695.
- Ding, S., Ge, W., Buswell, J., 2002. Secretion, purification and characterisation of a recombinant *Volvariella volvacea*

endoglucanase expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Enzyme and Microbial Technology 31, 621–626.

Ding, S., Ge, W., Buswell, J., 2006. Cloning of multiple cellulase cDNAs from *Volvariella volvacea* and their differential expression during substrate colonization and fruiting. FEMS Microbiol Letters 263, 207–213.

Divne, C., Stahlberg, J., Teeri, T., Jones, T., 1998. High-resolution Crystal Structures Reveal How a Cellulose Chain is Bound in the 50 Å Long Tunnel of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Journal of Molecular Biology 275, 309–325.

Doi, R., 2008. Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome & non-cellulosome producers. Annals of the New York Academy of Sciences 1125, 267–279.

Doi, R., Kosugi, A., 2004. Cellulosomes: plant cell wall degrading enzyme complexes. Nature reviews microbiology 2, 541–551.

Doolittle, W., 2000. The nature of the universal ancestor and the evolution of the proteome. Current Opinion in Structural Biology 10, 355–358.

Eberhardt, R.Y., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., 2000. Primary sequence and enzymic properties of two modular endoglucanases, Cel5A and Cel45A, from the anaerobic fungus *Piromyces equi*. Microbiology 146, 1999–2008.

Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M., Madhusudhan, M., Eramian, D., Shen, M., Pieper, U., Sali, A., 2006. Comparative protein structure modeling using Modeller. Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al Chapter 5, Unit 5-6.

Feinberg, A.P., Vogelstein, B., 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction

endonuclease fragments to high specific activity. Analytical Biochemistry 132, 6–13.

Ferreira, L., Durrant, A., Hall, J., Haziewood, G., Gilbert, H., 1990. Spatial separation of protein domains is not necessary for catalytic activity or substrate binding in a xylanase. Biochemical Journal 269, 261–264.

Festucci-Buselli, R.A., Otoni, W.C., Joshi, C.P., 2007. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 19, 1–13.

Fischer, S., Schenzel, K., Fischer, K., Diepenbrock, W., 2005. Applications of FT Raman Spectroscopy and Micro Spectroscopy Characterizing Cellulose and Cellulosic Biomaterials. Macromolecular Symposia 223, 41–56.

Fleming, A., McQueen-Mason, S., Mandel, T., Kuhlemeier, C., 1997. Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin. Science 276, 1415–1418.

Fry, S., 2001. Plant cell walls Encyclopedia of life sciences <http://www.els.net>, DOI 10.1038/npg.els.0001682. Chichester: Nature Publishing Group.

Gavillon, R., Budtova, T., 2007. Kinetics of Cellulose Regeneration from Cellulose-NaOH-Water Gels and Comparison with Cellulose-N-Methylmorpholine-N-Oxide-Water Solutions. Biomacromolecules 8, 424–432.

Gemci, R., 2010. Examining the effects of mercerization process applied under different conditions to dimensional stability. Scientific Research and Essays 56, 560–571.

Gietz, R.D., Schiestl, R.H., 2007. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nature Protocols 2, 35–37.

Giordano, W., Hirsch, A., 2004. The expression of MaEXP1, a *Melilotus alba*

- expansin gene, is upregulated during the sweetclover-*Sinorhizobium meliloti* interaction. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17, 613-622.
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M., Bally, R., 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere : evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters* 108, 205–210.
- Goswami, P., Blackburn, R.S., El-Dessouky, H.M., Taylor, J., White, P., 2009. Effect of sodium hydroxide pre-treatment on the optical and structural properties of lyocell. *European Polymer Journal* 45, 455-465.
- Goto, M., 2007. Protein O-Glycosylation in Fungi: Diverse Structures and Multiple Functions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 1415-1427.
- Gray-Mitsumune, M., Mellerowicz, E., Abe, H., Schrader, J., Winzell, A., Sterky, F., Blomqvist, K., McQueen-Mason, S., Teeri, T., Sundberg, B., 2004. Expansins abundant in secondary xylem belong to subgroup a of the alpha-expansin gene family. *Plant Physiology* 135, 1552-1564.
- Gray, K., Zhao, L., Emptage, M., 2006. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology* 10, 141–146.
- Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M., Liden, G., Zacchi, G., 2006. Bio-ethanol, the fuel of tomorrow from the residues of today. . *Trends in Biotechnology* 24, 549-556.
- Hamada, N., Ishikawa, K., Fuse, N., 1991. Purification, characterization and gene analysis of exo-cellulase II (Ex-2) from the white rot basidiomycete *Irpex lacteus*. . *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87, 442–451.
- Hammel, K.A., 1996. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. *New Journal of Chemistry* 20, 195-198.
- Hildén, L., Johansson, G., 2004. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnology Letters* 26, 1683-1693.
- Huang, J., Takano, T., Akita, S., 2000. Expression of α -expansin genes in young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 211, 467-473.
- Ikehata, K., Buchanan, I., Smith, D., 2004. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal of Environmental Engineering and Science* 3, 1–19.
- Inglis, G.D., Popp, A.P., Selinger, L.B., Kawchuk, L.M., Gaudet, D.A., McAllister, T.A., 2000. Production of cellulases and xylanases by low-temperature basidiomycetes. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 860-865.
- Irwin, D., Spezio, M., Walker, L., DB, W., 1993. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnology and Bioengineering* 42, 1002–1013.
- Jeffries, T., 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. *Biochemistry of Microbial Degradation*. Pp 233-277, Kluwer Academic Publishers, C. Ratledge (ed). Netherlands.
- Jeya, M., Nguyen, N., Moon, H., Kim, S., Lee, J., 2010. Conversion of woody biomass into fermentable sugars by cellulase from *Agaricus arvensis*. *Bioresource Technology* 101, 8742-8749.
- Jones, L., McQueen-Mason, S., 2004. A role for expansins in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *FEBS Letters* 559, 61-65.

- Kellett, L., Poole, D., Ferreira, L., Durrant, A., Hazlewood, G., Gilbert, H., 1990. Xylanase B and an arabinofuranosidase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. cellulosa contain identical cellulose-binding domains and are encoded by adjacent genes. *Biochemistry Journal* 272, 369-376.
- Kelley, L.A., Sternberg, M.J.E., 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4, 363-371.
- Kende, H., Bradford, K., Brummell, D., Cho, H.T., Cosgrove, D., Fleming, A., Gehring, C., Lee, Y., McQueen-Mason, S., Rose, J., Voesenek, L.A., 2004. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Molecular Biology* 55, 311-314.
- Kerff, F., Amoroso, A., Herman, R., Sauvage, E., Petrella, S., Filee, P., Charlier, P., Joris, B., Tabuchi, A., Nikolaidis, N., Cosgrove, D.J., 2008. Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105, 16876-16881.
- Khanna, S., Gauri, 1993. Regulation, purification, and properties of xylanase from *Cellulomonas fimi*. *Enzyme and Microbial Technology* 15, 990-995.
- Kikuchi, T., Jones, J., Aikawa, T., Kosaka, H., Ogura, N., 2004. A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *FEBS Letters* 572, 201-205.
- Kim, E.S., Lee, H.J., Bang, W.G., Choi, I.G., Kim, K.H., 2009. Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 102, 1342-1353.
- Kim, J., Cho, H., Kende, H., 2000. α -Expansins in the semiaquatic ferns *Marsilea quadrifolia* and *Regnellidium diphyllum*: evolutionary aspects and physiological role in rachis elongation. *Planta* 212, 85-92.
- Kimura, I., Sasahar, H., Tajima, S., 1995. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80, 334-339.
- Kimura, S., 1999. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *Plant Cell* 11, 2075-2085.
- Kollár, R., Reinhold, B.B., Petráková, E., Yeh, H.J.C., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., Cabib, E., 1997. Architecture of the Yeast Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry* 272, 17762-17775.
- Koseki, T., Yuichiro, M., Shinya, F., Kazuo, M., Tsutomu, F., Kiyoshi, I., Yoshihit, S., Haruyuki, I., 2008. Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 1279-1285.
- Kroon, P., Williamson, G., Fish, N., Archer, D., Belshaw, N., 2000. A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *European Journal of Biochemistry* 267, 6740-6752.
- Kudla, U., Qin, L., Milac, A., Kielak, A., Maissen, C., Overmars, H., Popeijus, H., Roze, E., Petrescu, A., Smant, G., Bakker, J., Helder, J., 2005. Origin, distribution and 3D-modeling of Gr-EXPB1, an expansin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *FEBS Letters* 579, 2451-2457.

- Kumar, R., Singh, S., Singh, O., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35, 377-391.
- Kupfer, D.M., Drabenstot, S.D., Buchanan, K.L., Lai, H., Zhu, H., Dyer, D.W., Roe, B.A., Murphy, J.W., 2004. Introns and Splicing Elements of Five Diverse Fungi. *Eukaryotic Cell* 3, 1088-1100.
- Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laine, M.J., Haapalainen, M., Wahlroos, T., Kankare, K., Nissinen, R., Kassuwi, S., Metzler, M.C., 2000. The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* plays a role in virulence and contains an expansin-like domain. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57, 221-233.
- Langan, P., Nishiyama, Y., Chanzy, H., 2001. X-ray Structure of Mercerized Cellulose II at 1 Å Resolution. *Biomacromolecules* 2, 410-416.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B., 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 124, 1081-1099.
- Lee, H.J., Lee, S., Ko, H.J., Kim, K.H., Choi, I.G., 2010. An expansin-like protein from *Hahella chejuensis* binds cellulose and enhances cellulase activity. *Molecules and Cells* 29, 379-385.
- Lee, S., Ha, J., Kang, H., McAllister, T., KJ, C., 1997. Overview of energy metabolism, substrate utilization and fermentation characteristics of ruminal anaerobic fungi. *Korean Journal of Animal Nutrition Feedstuffs* 21, 295-314.
- Lee, Y.-E., Lowe, S.E., Zeikus, J.G., 1993. Regulation and Characterization of Xylanolytic Enzymes of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 763-771.
- Lee, Y., Choi, D., Kende, H., 2001. Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 527-532.
- Lee, Y., Kende, H., 2001. Expression of β -expansins is correlated with elongation of internodes in deepwater rice. *Plant Physiology*, 985-997.
- Lehtiö, J., Wernerus, H., Samuelson, P., Teeri, T., Stahl, S., 2001. Directed immobilization of recombinant *staphylococci* on cotton fibres by functional display of a fungal cellulose binding domain. *FEMS Microbiology Letters* 195, 197-204.
- Levy, I., Shani, Z., Shoseyov, O., 2002. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-[β]-glucanase and cellulose-binding domains. *Biomolecular Engineering* 19, 17-30.
- Li, L., Bedinger, P.A., Volk, C., Jones, A.D., Cosgrove, D.J., 2003a. Purification and Characterization of Four β -Expansins (Zea m 1 Isoforms) from Maize Pollen. *Plant Physiology* 132, 2073-2085.
- Li, L., Cosgrove, D., 2001. Grass group I pollen allergens (β -expansins) lack proteinase activity and do not cause wall loosening via proteolysis. *European Journal of Biochemistry* 268, 4217-4226.
- Li, Y., Darley, C., Ongaro, V., Fleming, A., Schipper, O., Baldauf, S., McQueen-Mason, S., 2002. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiology* 128, 854-864.

- Li, Y., Jones, L., McQueen-Mason, S., 2003b. Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 603-610.
- Lin, L., Thomson, J., 1991. An analysis of the extracellular xylanases and cellulases of *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. *FEMS Microbiology Letters* 84, 197-204.
- Lin, Z., Ni, Z., Zhang, Y., Yao, Y., Wu, H., Sun, Q., 2005. Isolation and characterization of 18 genes encoding α - and β -expansins in wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Genetics and Genomics* 274, 548-556.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Lymar, E., Li, B., Renganathan, V., 1995. Purification and characterization of a cellulose-binding beta-glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2976-2980.
- Lynd, L., Cushman, J., Nichols, R., Wyman, C., 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science* 15, 1318-1323.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 506-577.
- Mansfield, S., Meder, R., 2003. Cellulose hydrolysis the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. *Cellulose* 10, 159-169.
- Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Soderlund, H., Pentilla, M., 1996. Acetyl xylan esterase from *Trichoderma reesei* contains an active site serine and a cellulose-binding domain. *European Journal of Biochemistry* 237, 553-560.
- Martínez, Á.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., Río, J.C.d., 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8, 195-204.
- Mascorro-Gallardo, J.O., Covarrubias, A.A., Gaxiola, R., 1996. Construction of a CUP1 promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 172, 169-170.
- Mateos, P.F., Jimenez-Zurdo, J.I., Chen, J., Squartini, A.S., Haack, S.K., Martinez-Molina, E., Hubbell, D.H., Dazzo, F.B., 1992. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1816-1822.
- McQueen-Mason, S., Cosgrove, D.J., 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 6574-6578.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J., 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4, 1425-1433.
- Miller, G., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Murty, M.V.S., Chandra, T.S., 1992. Purification and properties of an extra cellular xylanase enzyme of *Clostridium* strain SAIV. *Antonie van Leeuwenhoek* 61, 35-41.
- Nicholson, M.J., Theodorou, M.K., Brookman, J.L., 2005. Molecular analysis of the anaerobic rumen fungus *Orpinomyces* - insights into an AT-rich genome. *Microbiology* 151, 121-133.

- Nidetzky, B., Steiner, W., Hayn, M., Claeysens, M., 1994. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interactions. *Biochemical Journal* 298, 705–710.
- O'Malley, R., Lynn, D., 2000. Expansin message regulation in parasitic angiosperms: marking time in development *Plant Cell* 12, 1455-1465.
- Oh, S., Yoo, D., Shin, Y., Kim, H., Kim, H., Chung, Y., Park, W., Youke, J., 2005. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 340, 2376–2391.
- Ohnishi, Y., Nagase, M., Ichiyanagi, T., Kitamoto, Y., Aimi, T., 2007. Transcriptional regulation of two endoglucanase-encoding genes (*cel3A* and *cel4*) from the wood-degrading basidiomycete *Polyporus arcularius*. *FEMS Microbiology Letters* 274, 218-225.
- Onishi, N., Tanaka, T., 1996. Purification and properties of a galacto- and gluco-oligosaccharide-producing betaglycosidase from *Rhodotorula minuta* IFO879. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82, 439–443.
- Palomer, X., Domínguez-Puigjaner, E., Vendrell, M., Llop-Tous, I., 2004. Study of the strawberry cell endo-beta-(1,4)-glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Plant Science* 167, 509–518.
- Parry, N.J., Beever, D.E., Owen, E., Nerinckx, W., Claeysens, M., Van Beeumen, J., Bhat, M.K., 2002. Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 404, 243-253.
- Percival Zhang, Y.H., Himmel, M.E., Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24, 452-481.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, A., De la Rubia, T., Martínez, E., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 5.
- Pezzotti, M., Feron, R., Mariani, C., 2002. Pollination modulates expression of the PPAL gene, a pistil-specific beta-expansin. *Plant Molecular Biology* 49, 187-197.
- Pien, S., Wyrzykowska, J., McQueen-Mason, S., Smart, C., Fleming, A., 2001. Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98, 11812-11817.
- Pizzi, A., Eaton, N., 1985. The structure of cellulose by conformational analysis 2. The cellulose polymer chain. *Journal of Macromolecular Science* 22, 105-137.
- Polaina, J., MacCabe, A., 2007. Industrial enzymes. Structure, function and applications. Cellulases for biomass conversion. Springer, The Netherlands 35-51.
- Polizeli, M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J., Amorim, D., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 577–591.
- Ponce, N., Pérez, A., 2002 Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y Perspectiva* 21, 273-277.
- Qin, C., Soykeabkaew, N., Xiuyuan, N., Peijs, T., 2008. The effect of fibre volume fraction and mercerization on the properties of all-cellulose composites. *Carbohydrate Polymers* 71, 458-467.

- Qin, L., Kudla, U., Roze, E.H.A., Goverse, A., Popeijus, H., Nieuwland, J., Overmars, H., Jones, J.T., Schots, A., Smant, G., Bakker, J., Helder, J., 2004. Plant degradation: A nematode expansin acting on plants. *Nature* 427, 30-30.
- Quiroz-Castañeda, R., Pérez-Mejía, N., Martínez-Anaya, C., Acosta-Urdapilleta, L., Folch-Mallol, J., 2010. Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. *Biodegradation*, 1-8.
- Quiroz-Castañeda, R.E., Balcazar-Lopez, E., Dantan-Gonzalez, E., Martinez, A., Folch-Mallol, J., Martinez-Anaya, C., 2009. Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electronic Journal of Biotechnology* [online] 12, DOI: 10.2225/vol2212-issue2224-fulltext-2223 Available from Internet: <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol2212/issue2224/full/2223/index.html>.
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Jr., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R., Tschaplinski, T., 2006. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science* 311, 484-489.
- Reinhardt, D., Wittwer, F., Mandel, T., Kuhlemeier, C., 1998. Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. *Plant Cell* 10, 1427-1437.
- Röder, T., Moosbauer, J., Fasching, M., Bohn, A., Fink, H., Baldinger, T., Sixta, H., 2006. Crystallinity determination of native cellulose comparison of analytical methods. *Lenzinger Berichte* 86, 85-89.
- Rose, J.K.C., Cosgrove, D.J., Albersheim, P., Darvill, A.G., Bennett, A.B., 2000. Detection of Expansin Proteins and Activity during Tomato Fruit Ontogeny. *Plant Physiology* 123, 1583-1592.
- Rose, J.K.C., Lee, H.H., Bennett, A.B., 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94, 5955-5960.
- Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum, C.M., Henikoff, S., 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research* 26, 1628-1635.
- Ruan, Y., Llewellyn, D., Furbank, R., 2001. The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K⁺ transporters and expansin. *Plant Cell* 13, 47-60.
- Rubin, E., 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454, 841-845.
- Sadana, J., Lachke, A., Patil, R., 1984. Endo-(1-4)-beta-D-glucanases from *Sclerotium rolfsii* purification, substrate specificity, and mode of action. *Carbohydrate Research* 133, 297-312.
- Sadana, J., Patil, R., 1988. 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase from *Sclerotium rolfsii*. *Methods in Enzymology* 160, 307-314.
- Saha, B., 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 279-291.
- Saloheimo, M., Lehtovaara, P., Penttila, M., Teeri, T., Stahlberg, J., Johansson, G., Pettersson, G., Claeysens, M., Tomme, P., Knowles, J., 1988. EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the

characterization of both gene and enzyme. *Gene* 63, 11–22.

Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyssonen, E., Bhatia, A., Ward, M., Penttila, M., 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry* 269, 4202–4211.

Sampedro, J., Carey, R., Cosgrove, D., 2006. Genome histories clarify evolution of the expansin superfamily: new insights from the poplar genome and pine ESTs. *Journal of Plant Research* 119, 11–21.

Sampedro, J., Cosgrove, D.J., 2005. The expansin superfamily. *Genome biology* 6, 242.

Sánchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27, 185–194.

Sánchez, M., Mateos, I., Labrador, E., Dopico, B., 2004. Brassinolides and IAA induce the transcription of four α -expansin genes related to development in *Cicer arietinum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 709–716.

Scheller, H., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61, 263–289.

Schenzel, K., Fischer, S., 2001. NIR FT Raman spectroscopy a rapid analytical tool for detecting the transformation of cellulose polymorphs. *Cellulose* 8, 49–57.

Schwarz, W., 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 634–649.

Shcherban, T., Shi, J., Durachko, D., Guiltinan, M., McQueen-Mason, S., Shieh, M., Cosgrove, D., 1995. Molecular cloning and sequence analysis of expansins, a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell

wall extension in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92, 9245–9249.

Shelest, E., 2008. Transcription factors in fungi. *FEMS Microbiology Letters* 286, 145–151.

Shen, H., Schmuck, M., Pilz, I., Gilkes, N., Kilburn, D., Miller, R., Warren, R., 1991. Deletion of the linker connecting the catalytic and cellulose-binding domains of endoglucanase A (CenA) of *Cellulomonas fimi* alters its conformation and catalytic activity. *Journal of Biological Chemistry* 266, 11335–11340.

Shoseyov, O., Shani, Z., Levy, I., 2006. Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Application. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 283–295.

Solano, F., Garcia, E., Perez de Egea, E., Sanchez-Amat, A., 1997. Isolation and characterization of strain MMB-1 a novel melanogenic marine bacterium. *Applied Environmental Microbiology* 63, 3499–3506.

Sonan, G., Receveur-Brechot, V., Duez, C., Aghajari, N., Czjzek, M., Haser, R., Gerday, C., 2007. The linker region plays a key role in the adaptation to cold of the cellulase from an Antarctic bacterium. *Biochemical Journal* 407, 293–302.

Srisodsuk, M., Reinikainen, T., Penttila, M., Teeri, T., 1993. Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. *Journal of Biological Chemistry* 268, 20756–20761.

Staff, I., Taylor, P., Smith, P., Singh, M., Knox, R., 1990. Cellular localization of water soluble, allergenic proteins in rye-grass (*Lolium perenne*) pollen using monoclonal and specific IgE antibodies with immunogold probes. *The Histochemical Journal* 22, 276–290.

- Steenbakkers, P.J.M., Li, X.-L., Ximenes, E.A., Arts, J.G., Chen, H., Ljungdahl, L.G., Op den Camp, H.J.M., 2001. Noncatalytic Docking Domains of Cellulosomes of Anaerobic Fungi. *Journal of Bacteriology* 183, 5325-5333.
- Stone, B., 2005. Cellulose: Biogenesis and Biodegradation. *Encyclopedia of Sciences*, 1-41.
- Sul, O., Kim, J., Park, S., Son, Y., Park, B., Chung, D., Jeong, C., Han, I., 2004. Characterization and molecular cloning of a novel endoglucanase from *Trichoderma* sp. C-4. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 63-70.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83, 1-11.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., Tanaka, T., 2005. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100, 637-643.
- Tanner, W., Lehle, L., 1987. Protein glycosylation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 906, 81-99.
- Teeri, T., 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases *Trends in Biotechnology* 15, 160-167.
- Teeri, T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C., Jones, T., 1998. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? *Biochemical Society Transactions* 26, 173-178.
- Tomme, P., Warren, R., Gilke, N., 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances In Microbial Physiology* 37, 1-81.
- Valásková, V., Baldrian, P., 2006. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* – production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology* 152, 3613-3622.
- van Solingen, P., Meijer, D., van der Kleij, W., Barnett C, Bolle, R., Power, S., Jones, B., 2001. Cloning and expression of an endocellulase gene from a novel streptomycete isolated from an East African soda lake. *Extremophiles* 5, 333-341.
- Vite Vallejo Odón. (2009) El papel de la N-glicosilación sobre la actividad de la lacasa de *Pycnoporus sanguineus* cepa CEIBMD001. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM.
- Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R., Pickard, M., 2003. Manganese-lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese *Canadian Journal of Microbiology* 49, 675-682.
- Wang, Y., Zhao, Y., Deng, Y., 2008. Effect of enzymatic treatment on cotton fiber dissolution in NaOH/urea solution at cold temperature. *Carbohydrate Polymers* 72, 178-184.
- Wei, W., Yanga, C., Luoa, J., Lua, C., Wub, Y., Yuana, S., 2010. Synergism between cucumber alpha-expansin, fungal endoglucanase and pectin lyase. *Journal of Plant Physiology* 167, 1204-1210.
- Whitney, S., Gidley, M., McQueen-Mason, S., 2000. Probing expansin action using

cellulose/hemicellulose composites. *Plant Journal* 22, 327–334.

Wilson, D., Irwin, D., 1999. Genetics and Properties of Cellulases. *Advances in Biochemical Engineering. Biotechnology* 65, 1-21.

Woodward, J., 1991. Synergism in cellulase systems. *BioresourceTechnology* 36, 67–75.

Wu, Y., Meeley, R., Cosgrove, D., 2001. Analysis and expression of the α -expansin and β -expansin gene families in maize. *Plant Physiology* 126, 222-232.

Xu, J., Tian, J., Belanger, F.C., Huang, B., 2007. Identification and characterization of an expansin gene *AsEXP1* associated with heat tolerance in C3 *Agrostis grass* species. *Journal of Experimental Botany* 58, 3789-3796.

Yoon, J., Kim, Y., 2005. Degradation of Crystalline Cellulose by the Brown-rot Basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *The Journal of Microbiology* 43, 487-492

Zhang, Y.H.P., Ding, S.Y., Mielenz, J.R., Cui, J.B., Elander, R.T., Laser, M., Himmel, M.E., McMillan, J.R., Lynd, L.R., 2007. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 97, 214-223.

Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering* 88, 797-824.

Zhong, R., Ye, Z.-H., 2007. Regulation of cell wall biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 564-572.

Zugenmaier, P., 2001. Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. *Progress in Polymer Science* 26, 1341-1417.

ANEXOS. I

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE *P. sanguineus* EN PAJA DE TRIGO

La importancia de las celulasas para la industria (bioenergía, textil, papel, alimenticia, etc.) genera una motivación para desarrollar mejores preparaciones de estas enzimas para la hidrólisis de la pared celular de células vegetales. Los hongos de podredumbre blanca como los basidiomicetos poseen las enzimas necesarias para una degradación eficiente del sustrato lignocelulósico, por esta razón es importante determinar la actividad celulolítica que tiene *P. sanguineus* cuando crece en paja de trigo. Además de conocer las condiciones óptimas de crecimiento para la producción de celulasas del hongo, es necesario saber cuál es la temperatura y el pH óptimos de las celulasas así como evaluar su estabilidad a la temperatura y al pH.

MATERIALES Y MÉTODOS

CRECIMIENTO DEL HONGO EN PAJA DE TRIGO EN MEDIO SÓLIDO Y LÍQUIDO

Para su almacenamiento, se creció un inóculo de *P. sanguineus* en una caja de medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar) o GMY (1% glucosa, 0.35% extracto de malta, 0.25% extracto de levadura, 0.2% KH_2PO_4 y 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5% agar, pH 4.5 ajustado con ácido fosfórico) durante 9 días.

Una vez crecido el micelio, se cortaron fragmentos del micelio de $\sim 0.25 \text{ cm}^2$ que sirvieron para inocular los medios de cultivo de manera aséptica. La paja de trigo se molió en un molino de café (Braun) hasta que se observó un polvo homogéneo.

Medio sólido: Para garantizar que el hongo utilizara la paja de trigo (*T. aestivum*) como única fuente de carbono, los inóculos se crecieron inicialmente por 5 días a 28°C en medio mineral sólido (7.8 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 18 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 500 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L ZnSO_4 , 50 mg/L KCl, 1 g/L K_2HPO_4 y 2 g/L NH_4NO_3 , 1.5% agar; pH ajustado a 5, o 4 y 6 cuando fue necesario, con ácido fosfórico). Del micelio crecido, se tomaron inóculos de $\sim 0.25 \text{ cm}^2$ que se crecieron por triplicado en medio mineral sólido con paja de trigo al 2% durante 12 días a 28°C.

Medio líquido: El hongo se creció por triplicado durante 9 días a 28°C y 200 rpm (agitación orbital) en matraces de 250 ml que contenían 100 ml de medio mineral con paja de trigo al 2% estéril.

ENSAYOS ENZIMÁTICOS Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Los ensayos enzimáticos se realizaron únicamente con los sobrenadantes de *P. sanguineus* recuperados del crecimiento en medio sólido debido a que la actividad en esta condición es mayor que en el cultivo en líquido, además de la practicidad en el manejo de los cultivos.

Para evaluar la actividad celulolítica de *P. sanguineus*, el contenido de las cajas de Petri incubadas por 12 días a 28°C se centrifugó 5 minutos a 4000 rpm a 4°C (las cajas se colectaron diariamente durante los 12 días) para colectar el sobrenadante que se filtró en membranas de nitrocelulosa (Millipore) de 0.45 µm, el volumen recuperado (entre 3-4 ml) se utilizó en los ensayos de actividad celulolítica.

Los ensayos de actividad celulolítica se realizaron en tubos eppendorf de 1.5 ml utilizando 2% CMC (Sigma-Aldrich) en buffer de citratos 50 mM y pH 5 estéril. La reacción de ensayo contenía: 500 µl de CMC 2%, 200 µl de sobrenadante y 300 µl de buffer de citratos 50 mM pH 5, y se incubó a 50°C durante 1 hora tomando alícuotas de 50 µl a diferentes tiempos. Estas alícuotas se utilizaron para el ensayo de AR.

Para calcular la actividad específica (AE) se determinó la concentración de proteína en mg/ml por el método de Löwry *et al.* (1951) con una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA).

ENSAYO DE AR

La cantidad de AR se calculó con una curva estándar de glucosa o xilosa de 0.1 a 2 mg/ml. Una unidad (UI) de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de azúcar reductor (glucosa o xilosa) por minuto. Los AR liberados se graficaron contra el tiempo y la pendiente se calculó para determinar la velocidad de la reacción. Los AR liberados vs. tiempo y la cantidad de proteína se utilizaron para calcular la actividad enzimática.

TEMPERATURA Y pH ÓPTIMOS DE PRODUCCIÓN DE CELULASAS (CMCasas)

Para evaluar la temperatura óptima de producción de celulasas, el hongo se creció por triplicado en medio mineral sólido pH 5 con 2% de paja de trigo a 28, 32 y 37°C durante 9 días. El micelio se colectó a los días 7, 8 y 9. Para determinar el pH óptimo de producción de celulasas el hongo se creció a 28°C en un medio con el pH ajustado a 4, 5 y 7.5. Posteriormente se realizó el ensayo para medir los AR y se calculó la actividad específica en cada condición.

TEMPERATURA Y pH ÓPTIMOS DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

Para determinar la temperatura y pH óptimo de la actividad celulolítica del sobrenadante del hongo se midió la actividad enzimática en las reacciones de ensayo, con la excepción de que se

utilizaron diferentes temperaturas desde 30 hasta 90°C y valores de pH de 3 a 8 usando buffer de citratos 50 mM.

ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA A TEMPERATURA Y pH

Para evaluar la termoestabilidad de las enzimas celulolíticas se tomaron alícuotas de 100 µl del sobrenadante y se incubaron a diferentes temperaturas desde 30 hasta 90°C (intervalos de 10°C) durante 1 hora, posteriormente la reacción de ensayo se realizó en condiciones estándar (pH 5 y 50°C) y se determinó la actividad celulolítica residual.

Para evaluar la estabilidad a pH, alícuotas del sobrenadante se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en diferentes soluciones buffer: McIlvane (pH 2-3), buffer de citratos (pH 4-8) y buffer de borato (pH 9-10). La actividad celulolítica residual se midió a pH 5 y 50°C.

ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y XILANOLÍTICA DE LAS ENZIMAS DEL SOBRENADANTE DE *P. sanguineus*

La actividad celulolítica se determinó midiendo los AR liberados en la reacción de ensayo utilizando diferentes sustratos: CMC (2%), Avicel (2%) y celobiosa (0.5%) disueltos en buffer de citratos 50 mM pH 5; mientras que la actividad xilanolítica se midió utilizando xilano de abedul (1%) y xilano de avena (1%) como sustratos en el mismo buffer. El ensayo de medición de AR se realizó bajo las condiciones mencionadas previamente.

PRECIPITACIÓN CON ACETONA DE PROTEÍNAS DEL SOBRENADANTE DE *P. sanguineus*

Se hicieron tres cortes de acetona: 20, 50 y 80%. Se tomaron 40 ml del sobrenadante de *P. sanguineus* crecido en paja de trigo sólido y se adicionaron 10 ml de acetona fría, se incubó 1 hora a -20°C y se centrifugó a 4,000 rpm durante 30 minutos a 4°C, la pastilla recuperada se secó a temperatura ambiente. Al sobrenadante recuperado se le adicionaron 30 ml de acetona fría y se repitió la operación, finalmente, a la pastilla recuperada se le agregaron 120 ml y se sometió al mismo tratamiento. Las pastillas se resuspendieron en buffer de Laemmli 5X (Laemmli, 1970) y se reservaron para los geles de detección de actividad celulolítica y xilanolítica en donde se separaron las proteínas por SDS-PAGE.

GELES PARA DETECTAR ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y XILANOLÍTICA

Para preparar el gel de actividad celulolítica se siguió el protocolo descrito por Mateos *et al.* (1992) con algunas modificaciones.

Se preparó un gel al 10% de acrilamida y se realizó una electroforesis en gel (SDS-PAGE). Las proteínas precipitadas con acetona se mezclaron con buffer de carga Laemmli 5X (1M Tris-HCl pH

6.8, 20% SDS, 25% glicerol, 1% azul de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol), se hirvieron 5 minutos y se enfriaron en hielo para después someterse a electroforesis a 100 V. Después, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie 0.125% (Brilliant Blue R-250, Sigma).

En la electroforesis nativa, las proteínas se mezclaron con el buffer de Laemmli 5X sin β -mercaptoetanol y sin calentar y se sometieron a electroforesis a 100 V. Posteriormente, el gel se lavó 3 veces con buffer de fosfato de potasio 10 mM-ácido cítrico (PCA; pH 5.2) con intervalos de 40 minutos.

Se preparó un gel de agarosa al 0.5% conteniendo CMC al 0.2% en buffer PCA 50 mM sobre el cual se colocó el gel nativo y se incubó en una cámara húmeda a 30°C durante 6 horas, posteriormente, el gel de agarosa se tiñó con una solución de rojo Congo 0.1% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavó con NaCl 1M durante 20 minutos.

Para analizar la actividad xilanolítica se preparó un gel al 10% de acrilamida y se realizó una electroforesis en gel (SDS-PAGE). Se analizó la actividad xilanolítica de acuerdo al protocolo descrito por Lee *et al.* (1993). Brevemente, en el gel separador se agregó 0.2% xilano de abedul antes de la polimerización, las muestras de proteínas se mezclaron con buffer de Laemmli 5X no desnaturizante, se hirvieron 5 minutos y se enfriaron en hielo antes de ser sometidas a electroforesis desnaturizante a 100 V.

Para evaluar la actividad xilanolítica, al gel separador también se le agregó 0.2% xilano de abedul y las muestras se cargaron en buffer de Laemmli 5X no desnaturizante y sin hervir.

Después de la electroforesis se hicieron dos lavados del gel de 30 minutos en buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5 que contenía 25% de isopropanol y un lavado de 15 minutos en buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.

Posteriormente, el gel fue incubado en buffer de acetato de sodio 50 mM por 5 minutos a 60°C y teñido con una solución de rojo Congo 0.1% durante 10 minutos a temperatura ambiente y desteñido con NaCl 1M. Para facilitar la documentación fotográfica se lavó el gel en una solución de ácido acético 5% causando el oscurecimiento del gel y destacando las bandas de actividad. El peso molecular aparente de las bandas se estimó con un marcador de peso (SM0661 Page Ruler protein ladder-Fermentas).

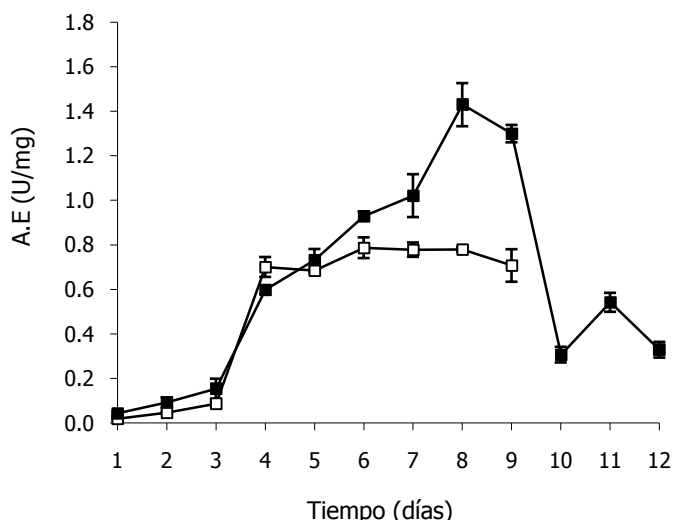
RESULTADOS

ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE *P. sanguineus*

La actividad celulolítica se evaluó creciendo el hongo en medio mineral sólido y líquido con 2% de paja de trigo a 28°C por 12 y 9 días respectivamente. La mayor actividad específica (AE) en sólido es al día 8 (1.43 U/mg) y en medio líquido al día 6 (0.78 U/mg) (Figura 30). Los ensayos enzimáticos

se realizaron solamente con los sobrenadantes de *P. sanguineus* crecido en medio sólido debido a que la actividad observada en esta condición es mayor que en el cultivo en líquido.

Figura 30. La actividad de las enzimas del sobrenadante de *P. sanguineus* es mayor en el cultivo sólido. La AE es mayor en medio sólido que en medio líquido. La máxima actividad celulolítica es al día 8 y al día 6 en medio sólido (cuadros negros) y medio líquido (cuadros blancos) con paja de trigo, respectivamente. Los experimentos se hicieron por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar.



LA TEMPERATURA Y EL pH ÓPTIMO DE PRODUCCIÓN DE CELULASAS ES A 28°C Y pH 5

De las distintas condiciones de temperatura y pH evaluadas en el crecimiento del hongo, la temperatura y el pH óptimos para producir celulasas en *P. sanguineus* fueron a 28°C y pH 5 (Figura 31). En estas condiciones de incubación las enzimas tienen una actividad específica de 1.4 UI/mg de proteína.

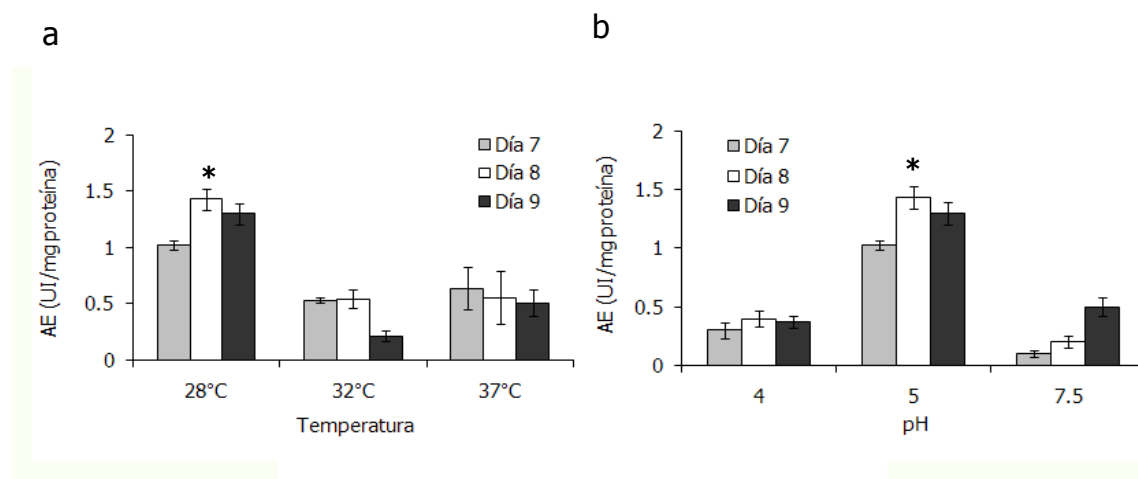


Figura 31. Efecto de la temperatura y el pH del medio de crecimiento sobre la actividad de las enzimas de *P. sanguineus*. La temperatura a) y el pH b) óptimos para producir celulasas es a 28°C y pH 5 durante 8 días de incubación. En asterisco se muestran las condiciones óptimas. Los experimentos se hicieron por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar.

LA TEMPERATURA Y pH ÓPTIMO PARA LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS ES DE 50°C Y pH 5

El efecto de las diferentes temperaturas y pH sobre la actividad de las celulasas se muestran en la Figura 32. La temperatura y el pH óptimo de actividad de las celulasas presentes en el sobrenadante del hongo fueron a 50°C y a pH 5.

La temperatura óptima para la actividad de las celulasas del hongo fue a 50°C; a 60°C las enzimas mantienen el 85.7% de actividad y se mantiene en niveles considerables hasta los 80°C donde el 67.2% de su actividad permanece; a 90°C la actividad es nula. (Figura 32a). Esto indica que las celulasas de *P. sanguineus* tienen una temperatura óptima de 50°C y se mantienen activas hasta en un 67% de su actividad hasta a los 80°C experimentando desnaturalización a los 90°C, donde no hay actividad.

El pH óptimo de actividad de las celulasas del sobrenadante del hongo se observó en el buffer de citratos pH 5. Incluso en las soluciones con pH 6, 7 y 8 se mantiene el 80.5%, 63.7% y 58.8% de su actividad. Sin embargo, en soluciones a pH 3 y 4 la actividad celulolítica es baja, manteniendo sólo el 26% y 38% de su actividad respectivamente (Figura 32b).

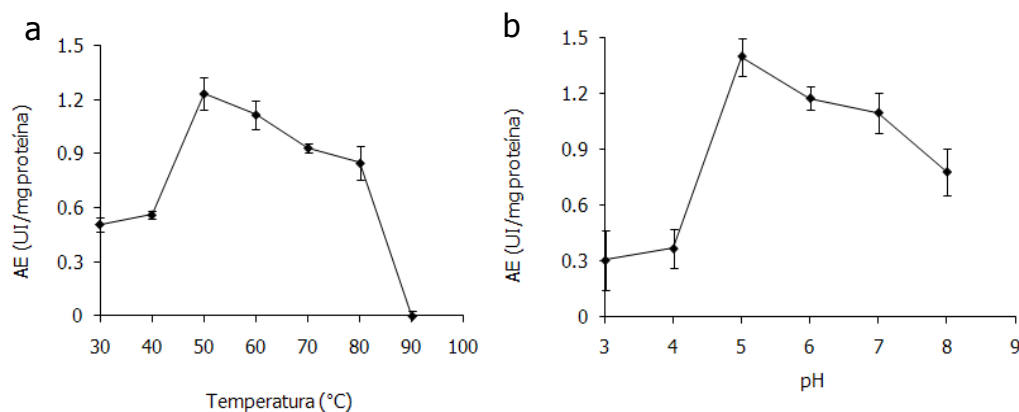


Figura 32. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de las enzimas de *P. sanguineus*. La temperatura óptima de las celulasas es a 50°C y mantienen hasta el 67% de su actividad a 80°C (a). El pH 5 es el óptimo para la actividad de las celulasas e incluso mantiene el 58% de su actividad a pH 8 (b).

LAS ENZIMAS DE *P. sanguineus* SON TERMOESTABLES Y TOLERAN AMPLIOS INTERVALOS DE pH

La estabilidad de las enzimas a la temperatura y al pH se midió realizando incubaciones del sobrenadante a diferentes temperaturas y soluciones buffer durante 1 hora, posteriormente la reacción de ensayo se realizó bajo condiciones estándar (50°C y buffer de citratos 50 mM pH 5).

Las enzimas del sobrenadante se mantienen estables a 30°C y 40°C con una actividad residual del 97% y 99% respectivamente, la máxima actividad se observó después de incubar a 50°C, (considerada el 100% de actividad). A 60°C se mantiene un 84.69% de la actividad y a 70°C sólo 4% de la actividad permanece después del tratamiento, finalmente, la actividad a 80°C y 90°C presenta niveles casi nulos (Figura 33a). Estos datos muestran que las celulasas son muy estables a temperaturas dentro del rango 30-60°C mientras que a temperaturas superiores a 70°C experimentan desnaturalización y pierden su actividad.

Las celulasas muestran una actividad significativa en un intervalo de pH de 3 a 8, ya que después de la incubación mantienen el 54.9% y 74.7% de su actividad respectivamente; a diferencia del 0.74% de actividad residual registrada a pH 10 (Figura 33b). Estos resultados muestran que las celulasas son muy estables dentro de un intervalo amplio de pH, que va de pH 3 a pH 8.

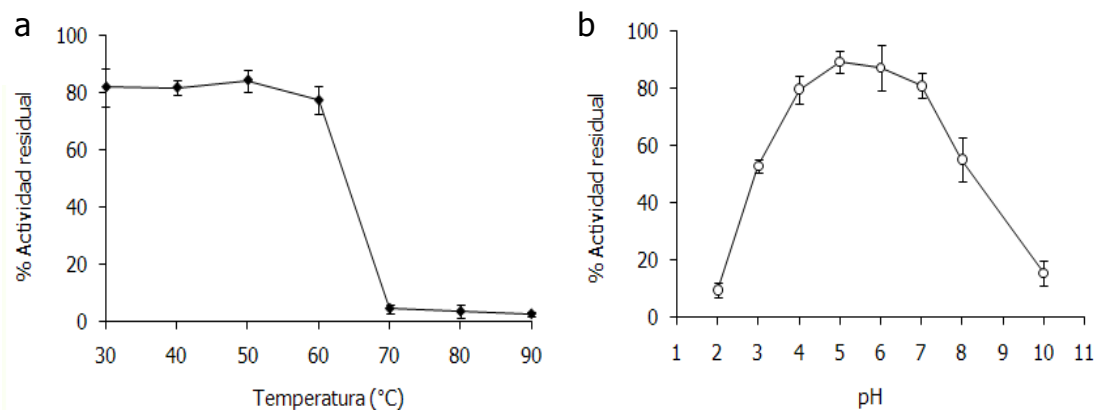


Figura 33. Las enzimas de *P. sanguineus* toleran amplios intervalos de temperatura y pH. Las celulasas son estables en el intervalo de temperatura de 30 a 60°C (a) y toleran intervalos de pH de 4-8 (b). Los experimentos se hicieron por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar.

EL SOBRENADANTE DE *P. sanguineus* POSEE ENZIMAS CELULOLÍTICAS Y XILANOLÍTICAS

Se analizó la actividad celulolítica y xilanolítica de las enzimas del sobrenadante de *P. sanguineus* mediante la incubación de la reacción de ensayo con los sustratos: Avicel, celobiosa, CMC, xilano de abedul y de avena. La temperatura de incubación fue a 50°C en buffer de citratos 50 mM pH 5.

La actividad específica de las enzimas en el Avicel, la celobiosa y la CMC fue de 0.262 U/mg, 0.309 U/mg y 1.43 U/mg respectivamente, mientras que las actividades de las enzimas xilanolíticas fueron de 0.31 U/mg y 0.494 U/mg en xilano de avena y de abedul, respectivamente (Figura 34).

La degradación de estos sustratos muestra que tanto celulasas como xilanasas están presentes en el sobrenadante y que la actividad sobre CMC es mayor que en Avicel y celobiosa. Estos sustratos serían hidrolizados específicamente por exoglucanasas y β glucosidasas respectivamente, en tanto que la actividad sinérgica de endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas estaría actuando sobre

la CMC. La actividad xilanolítica de las enzimas del sobrenadante es mejor en el sustrato de abedul, sobre el cual actuarían una batería de enzimas distinta a la que actúa sobre el xilano de avena.

El xilano de abedul es considerado del tipo de madera dura mientras que el xilano de avena es de madera suave, la diferencia entre estos se basa en el principal componente de hemicelulosa que poseen, en la madera dura es el glucuronoxilano y en la madera suave el galactoglucomanano (Sjostrom, 1993), lo que implica el uso de enzimas específicas para la degradación de un sustrato o el otro.

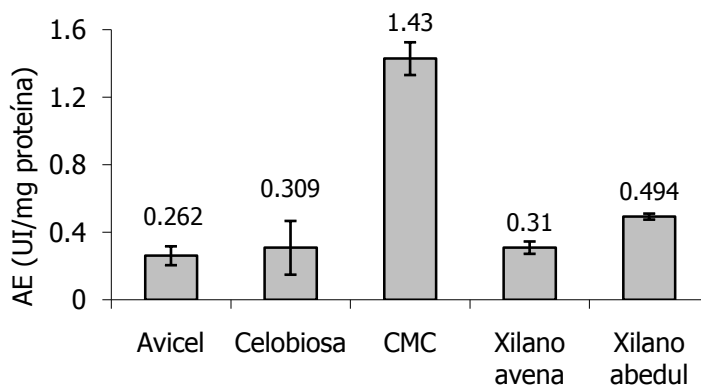


Figura 34. El sobrenadante de *P. sanguineus* posee diferentes actividades enzimáticas. Se evaluó la actividad de las exoglucanasas (Avicel), endoglucanasas (CMC) y betaglucanasas (celobiosa), así como de xilanasas (Xilano avena y abedul). Los experimentos se hicieron por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar.

GELES PARA DETECTAR ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y XILANOLÍTICA

Se hizo un análisis cualitativo de actividad para evaluar cuántas proteínas con actividad celulolítica y xilanolítica están presentes en el sobrenadante de *P. sanguineus* crecido en paja de trigo 2%.

Se hicieron geles de actividad SDS-PA en donde se separaron las proteínas precipitada con acetona al 20% y 80%, un gel se tiñó con azul de Coomassie, el gel nativo renaturalizado se utilizó para transferirse a un gel de agarosa con CMC 0.2% en el ensayo de actividad celulolítica y el gel de actividad SDS-PA se utilizó para el ensayo de actividad xilanolítica.

La actividad celulolítica de las enzimas del sobrenadante se evaluó en el gel de agarosa con CMC teñido con rojo Congo 0.1%, donde se aprecian halos (zonas claras) de la actividad enzimática. En las proteínas precipitadas con acetona al 20% y al 80% se observan halos de un tamaño aparente de 40 kDa y 25 kDa, respectivamente (Figura 35a y b). El tamaño aparente de estas proteínas es resultado de la comparación con el gel SDS-PA teñido con Coomassie.

La actividad xilanolítica se evaluó en un gel de SDS-PA con xilano de abedul al 0.1%, en donde hay dos zonas claras que reflejan la actividad de las enzimas sobre el sustrato. En las proteínas

precipitadas con acetona al 20% y 80% se aprecian halos de actividad aparentemente de 90 kDa y 50 kDa, respectivamente (Figura 35c y d).

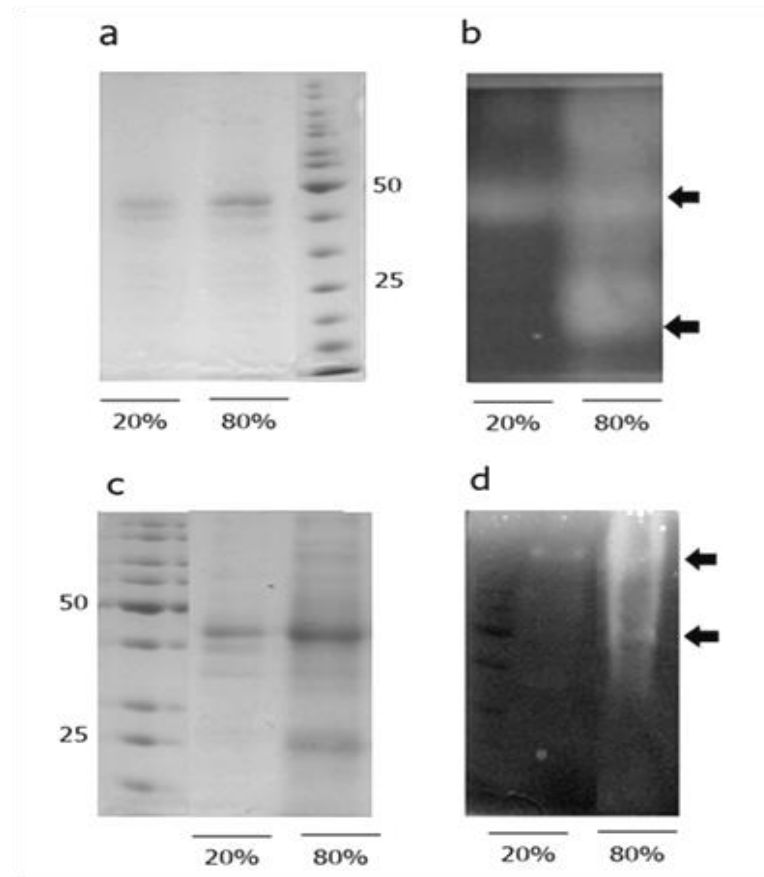


Figura 35. Zimogramas de actividad de las enzimas de *P. sanguineus*. (a) Gel nativo teñido con azul de Coomassie, donde se separaron 25 μ g de proteína precipitadas con 2 acetona al 20 y 80%, las bandas de proteína de un tamaño aparente de 25-50 kDa corresponden con los halos de actividad. (b) Gel de agarosa con 0.2% de CMC teñido con rojo Congo, las zonas claras reflejan la actividad celulolítica. (c) Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. (d) Gel SDS-PA al 10% con 0.1% de xilano donde se aprecian los halos de actividad xilanolítica. Con flechas se señalan los tamaños aparentes de las proteínas, así como los tamaños de las bandas del marcador de peso.

DISCUSIÓN

La celulosa es el principal componente de la biomasa, es el biopolímero más abundante en la naturaleza y una fuente atractiva para la obtención de combustible y en procesos industriales (Mansfield and Meder, 2003). Los grandes volúmenes de desechos celulósicos que se generan anualmente como parte de la actividad forestal, agrícola e industrial proveen una fuente de carbono de bajo costo, sin embargo, son difíciles de aprovechar debido a la recalcitrancia en su degradación a componentes más sencillos (Bhat and Bhat, 1997).

Por esta razón, es importante evaluar la capacidad hidrolítica de los hongos degradadores de la madera para lograr una mejor digestión del material celulósico.

En este trabajo se ha evaluado la actividad celulolítica de las enzimas del sobrenadante de cultivos de *P. sanguineus* crecido en paja de trigo.

P. sanguineus es un hongo de podredumbre blanca que crece en sustratos celulósicos como la paja de trigo y produce enzimas con actividades celulolíticas y xilanolíticas. En medio sólido el micelio se extiende sobre la superficie de la caja y su máxima actividad es el día 8. A partir del análisis de la actividad celulolítica en sólido se encontró que la temperatura y pH óptimos del hongo para la producción de celulasas son 28°C y pH 5.

La temperatura de 50°C y el pH 5 son los parámetros óptimos de la actividad de las enzimas del sobrenadante. Estas propiedades son similares a las encontradas para la mayoría de las celulasas de hongos (Lynd *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2002). El amplio rango de estabilidad a la temperatura (30°C-60°C) y pH (3-8) de las enzimas representa una ventaja, ya que se sugiere que son enzimas con propiedades interesantes para aplicaciones en diversos procesos en la industria.

Además, las enzimas celulolíticas termoestables podrían tener potencial para ser utilizadas en el procesamiento de alimentos y la obtención de biocombustibles (Bhat and Bhat, 1997)

Se evaluó la actividad de las enzimas del sobrenadante utilizando diferentes sustratos, los resultados muestran la presencia de los 3 tipos de enzimas celulolíticas; exo, endo y β -glucanasas, liberadas por el hongo para degradar la paja de trigo. De manera semejante, se detectó una actividad xilanolítica y se sugiere que por la distinta composición del xilano de abedul y de avena, el tipo de xilanasas que participa en la degradación de cada sustrato sea diferente.

Es importante resaltar la actividad de las endoglucanasas para hidrolizar el sustrato de CMC ya que estas enzimas son ampliamente utilizadas en la extracción de jugos, aceites y en la industria textil (Parry *et al.*, 2002).

Los pretratamientos químicos a los que debe someterse la biomasa previo al proceso de sacarificación consisten en solubilizar la lignina y la hemicelulosa permitiendo el acceso a las fibras de celulosa (Lynd *et al.*, 2002). Es por esto que se sugiere que estas actividades del sobrenadante del hongo podrían tener aplicaciones interesantes como parte de un pretratamiento biológico tal y como se ha reportado para muchos hongos de podredumbre blanca. La ventaja del pretratamiento biológico es el bajo costo de energía que se requiere y las condiciones suaves en que ocurre (Sun and Cheng, 2002). Existen reportes previos acerca de la utilización de los hongos de podredumbre blanca para lograr altos niveles de sacarificación de la celulosa (Taniguchi *et al.*, 2005; Jeya *et al.*, 2010). En los geles para detectar la actividad celulolítica se observaron zonas claras de aproximadamente 25-50 kDa, mientras que en el gel de actividad xilanolítica estas zonas claras corresponden a bandas de proteína de un tamaño aproximado de 50 kDa y 90 kDa, estos intervalos de tamaño son semejantes al tamaño de celulasas y xilanasas reportadas (Pérez *et al.*, 2002).

ANEXOS. II

CLONACIÓN DE GENES DE CELULASAS DE *P. sanguineus*

Una vez que se había evaluado la actividad celulolítica de *P. sanguineus* se decidió clonar los genes de celulasas con actividad endo y exoglucanasa. Con la consideración de que al tratarse enzimas de un hongo basidiomiceto posiblemente su actividad sea mayor a la de otras enzimas reportadas. Los grandes volúmenes de desechos celulósicos generados anualmente como parte de la actividad forestal, agrícola e industrial podrían ser una fuente de carbono de bajo costo (Bhat and Bhat, 1997). Actualmente es necesario usar tratamientos que involucran procesos amigables para el medio ambiente y una alternativa es la degradación de la celulosa por un proceso sinérgico y coordinado mediado por celulasas (Lynd *et al.*, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

EXTRACCION DE RNA

Se extrajo el RNA total del micelio de *P. sanguineus* crecido durante 5 días en medio mineral líquido con paja de trigo 2% utilizando Trizol (Invitrogen). El micelio esférico formado se filtró, se congeló y pulverizó en presencia de nitrógeno líquido. El RNA se cuantificó midiendo la absorbancia a 260/280 nm en el espectrofotómetro (BioMate, ThermoSpectronic) y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1.2% en presencia de formaldehído (2.2% final).

CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE CDNA

Se utilizó 1 µg de RNA para sintetizar el cDNA con el kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) con el que se construyó una biblioteca de cDNA de *P. sanguineus* utilizando el kit Creator™ SMART™ cDNA Library Construction (Clontech). El vector pDNR-Lib (Figura 36) en el que están clonados los cDNAs posee un marcador de resistencia a cloramfenicol y sitios para secuenciación con los oligos M13fwd y M13rev.

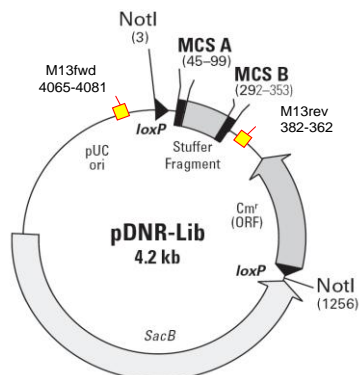


Figura 36. Vector pDNR-Lib (Clontech) utilizado en la biblioteca de cDNA de *P. sanguineus*. Los cDNAs se clonaron en la región entre el sitio de clonación múltiple A y B (MCS A y MCS B). El vector posee un marcador de resistencia a cloramfenicol y los sitios de unión de los oligonucleótidos M13fwd y M13rev para su secuenciación.

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA AMPLIFICAR REGIONES DE GENES DE CELULASAS

Se hizo una búsqueda de secuencias de DNA de celulasas (exoglucanasas, endoglucanasas y β -glucosidasas) de hongos basidiomicetos en las bases de datos WWW-Query (http://pbil.univ-lyon1.fr/search/query_fam.php) y NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Estas secuencias fueron utilizadas por el Dr. Pablo Vinuesa (CCG-UNAM), para el diseño de tres pares de oligonucleótidos degenerados para celulasas de hongos que se utilizaron en reacciones de PCR (Tabla 10).

En un intento por diseñar oligonucleótidos utilizando el programa CODEHOP disponible en línea (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>), se utilizaron las secuencias de celulasas seleccionadas de las bases de datos y se reconstruyeron las filogenias con el programa MEGA3. En los alineamientos se buscaron bloques de regiones conservadas utilizando el programa Blocks Multiple Alignment Processor (http://blocks.fhcrc.org/blocks/process_blocks.html), con esta información se diseñaron el par de oligonucleótidos COD3-COD4 con el programa CODEHOP (COnsensus DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>) (Rose *et al.*, 1998).

Tabla 10. Pares de oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR para amplificar genes de celulasas.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Celulasa blanco	Referencia
COD1-COD2	CAGT GCGGTGGTRWYGGCTGGAC GCACCTTGGCCACGGWRTCRARCCA	Celulasa	Dr. Pablo Vinuesa (CCG-UNAM)
COD3-COD4	TGCTGCTCTGAGATGGAYATYTTGG AGAGCATGTTGGCGTCGTCTCYTCCCA	Celulasa	Este trabajo
COD5-COD6	ACCCAGGGCAAYMSYAAYTAYGACG RGTYTCRAAGTAWGCYTGGAAACCAKGT	Celulasa	Dr. Pablo Vinuesa (CCG-UNAM)
COD7-COD8	CAACGAGTCGKGYGCNGARTTYGG CCGTCCGARTCDAGRTAYTGRTCAT	Celulasa	Dr. Pablo Vinuesa (CCG-UNAM)
VOL1-VOL2	GGNTAYTGYGAYDSNCARTG ATRTCCATYTCNDWRCARCA	Exoglucanasa	Ding <i>et al.</i> , 2006
Endopolfwd-Endopolrev	ATGAAYGARCCNCA YGA SWRTC NARRTAYTTRTGNAC	Endoglucanasa	Ohnishi <i>et al.</i> , 2007

Se utilizaron los oligonucleótidos degenerados VOL1:(5'-3') GGNTAYTGYGAYDSNCARTG y VOL2:(5'-3'): ATRTCCATYTCNDWRCARCA diseñados por Ding *et al.* (2006) basados en el dominio conservado GYCD A(R/G/C/Y)QC y CCN(I/L/K/M/F/S/T/Y)EMDI de la familia 3 de celobiohidrolasas del hongo *Volvariella volvacea* (Tabla 10).

El par de oligonucleótidos Endopolfwd:(5'-3') ATGAATGARCCNCA YGA y Endopolrev:(5'-3') SWRTC NARRTAYTTRTGNAC diseñados por Ohnishi *et al.* (2007) también se utilizaron para amplificar la región conservada MNEPHD y VH KYLDS, respectivamente, encontrada en endoglucanasas de hongos filamentosos como *P. chrysosporium* (Wymelenberg *et al.*, 2005), *T. reesei* (Saloheimo *et al.*,

1988) y *Trichoderma sp.* C-4 strain (Sul *et al.*, 2004). Con estos oligonucleótidos se lograron amplificar una región de una endoglucanasa del hongo basidiomiceto *Polyporus arcularius*.

OBTENCIÓN DE SONDAS HOMÓLOGAS DE CELULASAS

Los productos de PCR amplificados utilizando los pares de oligonucleótidos VOL1-VOL2 y Endopolfwd-Endopolrev se purificaron siguiendo las instrucciones del kit QIAEX II Gel Extraction (Quiagen). Las bandas purificadas se clonaron en el vector pJET1 según las instrucciones del kit GeneJET PCR Cloning kit (Fermentas), excepto las bandas purificadas de la amplificación con los oligos VOL1-VOL2 que se clonaron en el vector pJET1.2 del kit CloneJET PCR Cloning (Fermentas).

Se transformaron por electroporación 50 μ l de bacterias *E. coli* DH5 α y se seleccionaron en medio LB adicionado con 100 μ g/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) a 37°C.

Se seleccionaron colonias transformantes de cada construcción y se verificó por PCR en colonia la presencia del inserto y el tamaño del fragmento esperado. Posteriormente se aisló el DNA de estos plásmidos (Birnboim, 1983) y se confirmó su secuencia (Macrogen USA).

MARCAJE DE LAS SONDAS HOMÓLOGAS UTILIZADAS EN EL ESCRUTINIO DE LA BIBLIOTECA Y EN EL NORTHERN BLOT

Los productos de PCR de 137 y 202 pb amplificados con los oligos VOL1-VOL2 y Endopolfwd-Endopolrev, respectivamente, se marcaron radioactivamente usando el método descrito por (Feinberg and Vogelstein, 1983) utilizando (α -32P) dCTP. Este método se basa en la utilización de una mezcla al azar de hexanucleótidos que actúan como iniciadores para la acción del fragmento Klenow de la DNA polimerasa lo que resulta en una incorporación de nucleótidos radioactivos en la sonda de manera más eficiente.

ESCRUTINIO DE LA BIBLIOTECA DE cDNA

Se realizaron dos escrutinios, uno con la sonda homóloga de exoglucanasas (137 pb) y otro con la sonda homóloga de endoglucanasas (202 pb).

Se tomaron 100 μ l de un tubo que contenía la biblioteca de cDNA y se creció en 3 ml de medio LB durante tres horas, se prepararon las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} y se platearon 50 μ l en cajas de Petri con medio LB sólido y cloranfenicol (30 μ g/ml).

Se utilizó la dilución 10^{-6} para platear 150 μ l (~1000 colonias) en cajas de Petri de 14 cm de diámetro con medio LB y cloranfenicol y se incubaron a 37°C. En cada escrutinio se utilizaron 5 cajas. Las colonias se transfirieron por capilaridad a membranas de nylon (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Estas membranas se incubaron en solución desnaturante (0.5 N NaOH/1.5 M NaCl) durante 5 minutos y 2 veces en solución neutralizante (1.5 M NaCl/1 M Tris pH 7.5) durante 3

minutos. Se lavaron con agitación en 2X SSC (Salt Sodium Citrate) hasta eliminar totalmente los residuos celulares, las membranas se secaron sobre papel y el DNA se fijó a las membranas con luz ultravioleta.

Las membranas se prehibridaron a 42°C durante 2 horas con 10 ml de buffer de prehibridación: 5 ml de formamida, 2.5 ml de 2X SSC, 0.5 ml de solución de Denhardt 100X, 0.040 ml de EDTA 0.25 M pH 8, 0.1 ml de Tris 1 M pH 7.5 1%, 0.1 ml de SDS 10X, 0.250 ml de DNA de esperma de salmón (10 mg/ml, Sigma-Aldrich) y 1.510 ml de agua estéril. El DNA de esperma de salmón y el agua se colocaron en baño María por 5 minutos y después se enfriaron en hielo, enseguida se agregó el resto de los componentes. Después de la prehibridación, se agregó la sonda marcada radioactivamente, previamente desnaturalizada y las membranas se incubaron a 42°C durante 12 horas en un buffer de hibridación con la misma composición que el buffer para prehibridar pero sin DNA de esperma de salmón.

Después de hibridar, se hizo un lavado de 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de SSC 2X y SDS 0.1%, seguido de 2 lavados de 30 minutos a 50°C con una solución SSC 0.1X y SDS 0.1%, finalmente, las membranas se lavaron durante 10 minutos a 50°C en SSC 0.1X.

Las membranas marcadas se expusieron a una película Kodak X-Omat a -70°C.durante 24 horas antes de ser reveladas. A las clonas positivas de cada escrutinio se les extrajo el DNA plasmídico y se secuenciaron utilizando el oligonucleótido M13fwd del vector pDNR-Lib.

NORTHERN BLOT

Se extrajo el RNA total del micelio de *P. sanguineus* crecido durante 5 en medio mineral líquido con paja al 2% con el reactivo de Trizol (Invitrogen). Se separaron aproximadamente 30 µg de RNA total en geles de agarosa al 1.2% en presencia de formaldehído (2.2% final). Se hicieron dos lavados de los geles de 30 minutos cada uno utilizando SSC 10X (NaCl 1.5M, citrato de sodio 150 mM).

Posteriormente el RNA fue transferido por capilaridad a membranas de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech). El RNA se fijó a las membranas con luz ultravioleta antes de teñirse con azul de metileno 0.03% (BioRad) en acetato de sodio 0.5M pH 5.2 para verificar la transferencia realizada. Se utilizó el marcador de peso molecular RiboRuler High Range RNA Ladder (Fermentas).

Las membranas se prehibridaron, hibridaron y lavaron bajo las mismas condiciones utilizadas en el escrutinio de la biblioteca de cDNA. Para la hibridación se utilizaron las sondas homólogas para exoglucanasas y endoglucanasas obtenidas con los oligonucleótidos VOL1-VOL1 y Endopolfwd-Endopolrev, respectivamente. Las membranas marcadas se expusieron a una película Kodak X-Omat a -70°C.durante 8 días antes de ser reveladas.

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE SONDAS HOMÓLOGAS DE CELULASAS

El resultado de la secuenciación mostró que la banda de ~150 pb amplificada con los oligonucleótidos VOL1-VOL2 corresponde a una región de 137 pb cuya secuencia: 5'-GGTTATTGTGATAGGCAGTGCCCGCACGACATCAAGTTCATTAACGGCGAGGCCAACATCCTCGGGTGGGCTCCCTCCTCGAGCGACCCCAACGCTGGTACTGGCCAATACGGTACCTGCTGCACAGAGATGGACAT-3' analizada con el programa BLASTx (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) mostró que tiene identidad con exoglucanasas de hongos basidiomicetos como *Polyporus arcularius* (85%) *Schizophyllum commune* (80%), *Irpex lacteus* (80%) *Volvariella volvacea* (76%), entre otras secuencias.

De las bandas amplificadas en la reacción de PCR utilizando el par de oligonucleótidos Endopolfwd-Endopolrev, la secuencia de la banda de 202 pb: 5'-ATGAATGAGCCACACGAGACTCCCTGCCTACGTCCGCGAGATGAAGAAGTACCACCTCGCACATCACTACAAGAACTTCGACCTTGGCTTCGGAGTGACGAGCAAGATCTGGGACTACGTGTTCAACACCGTCTGGTGGTTTGA GGCTCAGAGGGTTGTTGTGACCTCCCTTGCCCGCGCCGTCCACAAATACCTAGACAA-3' presentó identidad del 92% con la secuencia de la endoglucanasa cel4 del hongo basidiomiceto *Polyporus arcularius*.

En las pruebas de PCR con el resto de los pares de oligonucleótidos no fue posible amplificar una banda que correspondiera a secuencias de celulasas.

CLONAS DE CELULASAS OBTENIDAS EN EL ESCRUTINIO DE LA BIBLIOTECA DE CDNA

Las sondas homólogas fueron marcadas radioactivamente y se utilizaron en el escrutinio de la biblioteca de cDNA de *P. sanguineus*, lo que permitió la identificación de una clona de exoglucanasa (EXO19) de 429 pb y otra de endoglucanasa (EXO6) de 270 pb. Estas clonas se secuenciaron:

EXO19 (5'-3')

ATGTCCATCGAGGCCAACAAAGGTTTACAAGATCACGAACGCCAAGGGCGGCACCGTCTCGACCTTTCTGGCGGCCAGGACGGCTCGCCTATCACTGGATACCAGTGGCACAGCGGCGCAAACCAGAGGTGGCACTTGAGCAGCACGGAGACGTGTACC GCTTCAAGAACGCCGCAACTGGGCTCTTCATCAGCGTCGATGGCGAGCCAAAACTTCGCACCCATCATTGCGTCCAGCA AGTGGGCAGACTTCGAGATCAGGCCCGACAGCAAGGATCCCTCGACGTTCCAGGGTGTTCCTCAAGGGCACGAACTTCGTT CCGGACTTGAGCGACCACGGCAACCCCAACCCGGGTACGCTGTACCCTCTGGGAGAGCTGGGAGGGCGGTAGCAACCA GACCTGGAGGTTTCGAGGAGGCTGCGTAG

ENDO6 (5'-3')

ATGCGAGAAGATGGTCGGAGGGCGAGGACGAGGAGCCCATCCCGATGTGGCTTGC GGCTATCCAGGAGGAGAGCTACTGATGAGGCTACCGCTTCGCTGGGCCCGCAAAGTAACGTATCCAGCATTGATTCCTGTTTCGATTACGCATTGGGCTTG TGACGAACTATTTCACTCTCCACTCGCAATTTAGCGAGGTTGGTACATACCTGNTTGTGGTCGCTAGGATTGATGATA CTGCAANCTTGTTTGATTCCGGTGGCTGA

De acuerdo al tamaño reportado de endoglucanasas (22-45 kDa) y exoglucanasas (50-65 kDa) de basidiomicetos se consideró la posibilidad de que las clonas EXO19 y ENDO6 estuvieran incompletas. Si así fuera, esto indicaría que algunos de los mRNA que se clonaron durante la construcción de la biblioteca de cDNA estaban incompletos, por esta razón se hizo un northern blot para evaluar el tamaño de los mensajeros. Es posible que durante la construcción de la biblioteca, en el fraccionamiento por tamaño del cDNA se hayan seleccionado insertos de bajo peso molecular y clonado preferentemente sobre los insertos más grandes, esto no implica que solamente se clonaran mRNAs pequeños ya que de esta misma biblioteca de cDNA de *P. sanguineus* se ha clonado el gen completo de una lacasa de 1600 pb aproximadamente (Vite, 2009).

NORTHERN BLOT

El tamaño del mRNA correspondiente a la exoglucanasa (EXO19) y endoglucanasa (ENDO6) de *P. sanguineus* es de 1500 y 2000 bases, respectivamente (Figura 37). Esto permite corroborar que la secuencia de las clonas de la biblioteca de cDNA seleccionadas en el escrutinio están incompletas por lo que es necesario obtener la secuencia íntegra para su posterior subclonación en vectores de expresión en levadura.

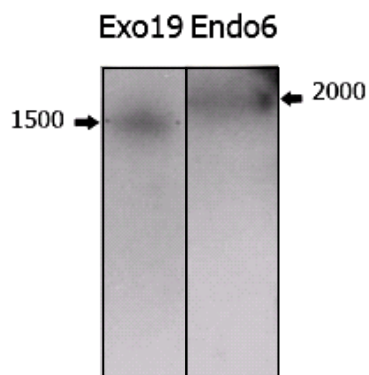


Figura 37. Ensayo tipo northern blot utilizando sondas de endo y exoglucanasas. Se utilizó el RNA extraído de micelio de *P. sanguineus* crecido en medio mineral con paja de trigo 2% durante 5 días. El tamaño del mRNA que codifica para la exoglucanasa y la endoglucanasa es de 1500 y 2000 pb, respectivamente.

DISCUSIÓN

Los hongos poseen enzimas que se encargan de la degradación de la celulosa: las endoglucanasas y exoglucanasas que liberan celobiosa y celo-oligosacáridos que son procesados hasta unidades de glucosa por las β -glucosidasas (Baldrian and Valášková, 2008).

En este trabajo se hizo un escrutinio de una biblioteca de cDNA de *P. sanguineus* para clonar genes de celulasas por hibridación con sondas homólogas de exo y endoglucanasas, permitiendo la identificación de dos clonas: EXO19 y ENDO6.

El tamaño de la secuencia de estas clonas sugiere que se trata de clonas incompletas debido a que el tamaño reportado de los genes de celulasas es superior a los 1000 pb (Ding *et al.*, 2001).

Además el ensayo northern blot muestra que el tamaño de los mRNAs de la exo y endoglucanasa es mucho mayor que el tamaño de las clonas de la biblioteca de cDNA. Por esta razón se vuelve indispensable lograr la identificación y clonación de la secuencia completa de cada enzima ya que se espera que las celulasas de un hongo basidiomiceto sean mejores que las de hongos ascomicetos, debido a que degradan todos los componentes de la madera (lignina, celulosa y hemicelulosa) hasta agua y oxígeno.