

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA SCEXLX1 DE
Schizophyllum commune

Por

M. C. Omar Eduardo Tovar Herrera

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

Enero, 2017

ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA SCEXLX1 DE
Schizophyllum commune

COMITÉ DE TESIS



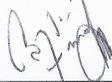
Dra. Katiushka Arévalo Niño (Presidente)



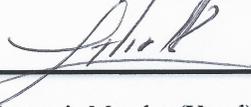
Dr. José Santos García Alvarado (Secretario)



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal (Vocal)



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna (Vocal)



Dra. Lilia Hortencia Morales (Vocal)

ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA SCEXLX1 DE
Schizophyllum commune

Dirección de tesis



Dra. Katiushka Arévalo Niño (Director)



Dr. Jorge Luis Folch Mallol (Director externo)

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por apoyar económicamente mi manutención durante la realización del proyecto de doctorado.

A la Dra. Katiushka Arévalo por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio y permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

Al laboratorio 1, donde compartí muchas cosas con todo el equipo, buenos y malos ratos junto a: Silvia, Mayra, Eugenia, Sasy, Lulú, Orlando, Lucía, Julian, y los que falten..

A mis padres y a mi familia, que a pesar de todo siempre han estado ahí para apoyarme en cualquier decisión que he tomado.

A mis amigos, que siempre me apoyaron y siempre supieron darme palabras de aliento cuando las necesité, nunca me dejaron caer y siempre fueron un apoyo para mí.

A mis compañeros de maestría, quienes siempre estuvieron ahí, e hicieron que los momentos difíciles fueran un poco más sencillos de sobrellevar.

A la Dra. Magda Iracheta, por brindarme apoyo desinteresado e incondicional durante la realización del proyecto.

Al Dr. Jorge Folch, por su asesoría y su voto de confianza al permitirme trabajar en su laboratorio. Gracias por ser tan incluyente.

A Laura Cuervo, por apoyarme y enseñarme tanto durante la estancia. Vaya que pasamos buenos ratos.

A Diana M. Lara, que me has amado, escuchado, apoyado, aconsejado, y acompañado incondicionalmente, desde hace buen tiempo ya. Gracias por enseñarme tanto y aprender conmigo al mismo tiempo. Sin ti nada de esto sería lo mismo. Gracias infinitas!

Agradezco a la vida y a las personas que he conocido, que de alguna u otra manera me han hecho ser lo que soy y llegar hasta aquí. Sé que esto no termina aquí, que hay mucho camino por recorrer y esto apenas comienza. Una vez leí que el que quiere avanzar crea caminos y el que no busca excusas. Nosotros, seguimos caminando.....

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a la gente que ocupó su tiempo en formarme, que sembró algo de provecho en mi, que me ayudó a madurar algún aspecto de mi carácter, que sacó lo mejor de mí, pero sobre todo, se lo dedico a la gente que fue un obstáculo, que dificultó mi camino y me hizo pasar por momentos difíciles, ya que son estos momentos y esas circunstancias las que nos hacen crecer día a día.

A mis amigos, que siempre se quejaron de mi ausencia durante la realización del proyecto: Enrique Oscar, Luis Martínez, Irwin Martínez, Enrique Martínez, Jonatan Guerrero, Angel Alemán, Chuy Tovar Martínez, Dimas, Nestor Aguirre.

Y también a los que nunca se quejaron y entendieron que esto era parte de mi crecimiento y formación: Roberto Figueroa, Liliana Oliva, Mayra Velázquez, Nallely Corrujedo, Nora Naranjos. Con todos ustedes he pasado cosas incomparables y únicas.

A Esther Garza Bustillos, un ejemplo de humanidad. Tu siempre supiste escuchar, callar, acompañar, aguantar, reír, llorar, ayudar, amar. Siempre te recuerdo, y siempre estas presente. Que tu corazón se una con lazos de amor a todo lo existente, hasta que te disuelvas en el mundo...

A Diana M. Lara, que me brindó su amor y su apoyo incondicional, que supo entender y escuchar lo que tenía para decir. Siempre serás el amor de todas mis vidas...

A mis padres y a mi familia, German Tovar Garza, Yolanda Herrera, Armando Tovar, German Tovar, que aunque no saben lo que hago en el laboratorio, se que confían en mi y están orgullosos.



“ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA SCEXLX1 DE SCHIZOPHYLLUM COMMUNE”

El presente trabajo se realizó en el laboratorio L1 del Instituto de Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Este trabajo estuvo dirigido por la Dra. Katiushka Arévalo y el Dr. Jorge Folch, y se contó con el apoyo de los doctores que conforman el comité de tesis.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Componentes de la pared celular de plantas	4
Lignina	6
Hemicelulosa.....	6
Celulosa.....	9
Desconstrucción de la pared celular	12
Desconstrucción de celulosa	12
Proteínas amorfogénicas.....	14
Expansinas	15
Swolleninas.....	16
Looseninas.....	18
Cerato-plataninas.....	19
Expansinas microbianas.....	19
Potencial biotecnológico de <i>Schizophyllum commune</i> en la degradación de lignocelulosa.....	22
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIAL Y MÉTODO.....	28
Cepas y condiciones de cultivo	28
Análisis de secuencia: alineamiento, filogenia y modelado	28
Potencial electrostático de ScExlx1	30
Clonación y expresión heteróloga de ScExlx1	30
Purificación y cuantificación de proteína. SDS-PAGE y Western Blot.....	31
Tratamiento de algodón y avicel con ScExlx1	32
Efecto de sales en la unión de ScExlx1 a polisacáridos.....	33
Análisis por FTIR de avicel y quitina tratados con ScExlx1.....	33
Hidrólisis enzimática	34
Fuerza de rompimiento sobre papel filtro.....	34
Sinergismo entre celulasas y ScExlx1 sobre avicel.....	35
Sinergismo entre quitinasas y ScExlx1 sobre quitina	35
Análisis estadístico	35
RESULTADOS	37
Análisis de secuencia de ScExlx1	37
Producción de ScExlx1 recombinante	45
Efecto de ScExlx1 sobre fibras de algodón y avicel	46
Actividad de ScExlx1 sobre papel filtro.....	48
Unión de ScExlx1 a polisacáridos.....	49
Análisis de cristalinidad e intensidad de puentes de hidrógeno por ATR-FTIR.....	51
Hidrólisis enzimática	53
ScExlx1 y actividad celulasa	53
Sinergismo entre celulasas y ScExlx1	54
ScExlx1 y actividad quitinasa.....	55

Sinergismo entre quitinasas y ScEx1	57
DISCUSIÓN.....	58
LITERATURA CITADA.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la pared celular vegetal.	5
Figura 2. Estructura de la hemicelulosa.	8
Figura 3. Estructura de una microfibrilla de celulosa.	11
Figura 4. Mecanismo propuesto para la amorfogénesis/despolimerización de la celulosa por celulasas.	13
Figura 5. Modo de acción de las polisacárido monooxygenasas.	14
Figura 6. Dominios presentes en las proteínas tipo expansinas	16
Figura 7. Representación esquemática de los genes de expansinas	16
Figura 8. Alineamiento proteico de BsExlx1, PcExl1, EXPB1 y ScExlx1.	39
Figura 9. Filogenia de ScExlx1	40
Figura 10. Estructura de ScExlx1 y comparación con expansinas previamente cristalizadas.	42
Figura 11. Definición del frente y reverso de ScExlx1	44
Figura 12. Distribución de cargas en ScExlx1	45
Figura 13. Purificación y análisis por western blot de la proteína ScExlx1 recombinante.	46
Figura 14. Actividad disruptiva de ScExlx1 sobre fibras de algodón y avicel.	47
Figura 15. Prueba de debilitamiento de papel filtro.	48
Figura 16. Efecto de la adición de NaCl sobre la unión de ScExlx1 a polisacáridos de la pared celular vegetal y quitina.	50
Figura 17. Cambios estructurales generados en avicel y quitina de camarón tratados con ScExlx1.	52
Figura 18. Efecto de ScExlx1 sobre la hidrólisis enzimática de celulosa.	53
Figura 19. Efecto de ScExlx1 en la hidrólisis enzimática de celulosa en un experimento de 48 h.	54
Figura 20. Actividad sinérgica entre ScExlx1 y celulasas a 30°C.	55
Figura 21. ScExlx1 es una proteína activa sobre quitina que incrementa la hidrólisis de quitina.	56
Figura 22. Actividad sinérgica entre ScExlx1 y quitinasas de <i>S. griseus</i>	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de distribución de cargas de la proteína ScExlx1	43
Tabla 2. Expansinas evaluadas por diferentes autores en la prueba de rompimiento de papel filtro.	49
Tabla 3. Unión de ScExlx1 a celulosa y quitina a usando diferentes concentraciones de sal.....	51
Tabla 4. Índice de cristalinidad e intensidad de puentes de hidrógeno en celulosa y quitina tratadas con ScExlx1	52

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	por ciento
v/v	volumen sobre volumen
α	alfa
ANOVA	Análisis de varianza
ATR-FTIR	attenuated total reflectance-fourier transformed infrared
β	beta
BMGY	buffered complex medium containing glycerol
BMMY	buffered complex medium containing methanol
BSA	bovine serum albumin
CDH	celobiosa deshidrogenasa
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
Cel7A	celobiohidrolasa 7
cm^{-1}	centímetro elevado a la menos uno
CMB	carbohydrate binding module
CO	monóxido de carbono
CO ₂	dióxido de carbono
D1	dominio uno
D2	dominio dos
DNA	deoxyribonucleic acid
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
DPBB	double-psi-beta-barrel
EXLA	expansin-like family A
EXLB	expansin-like family B
EXLX	expansin-like from non plant sources
EXPA	expansin protein family A
EXPB	expansin protein family B
FOLy	Fungal Oxidative Lignin Enzymes
GH	glycosyl hydrolase
GHG	greenhouse gas
h	hora

HBI	hydrogen bond intensity
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
JTT	Jones-Thornton-Taylor
kDa	kilodalton
Kg	kilogramo
KOH	hidróxido de potasio
L	litro
LDA	enzimas auxiliares degradadoras de lignina
LO	lignin oxidasas
LOI	lateral order index
LOOL	loosenin like
LPG	gas licuado de petróleo
M	molar
mg	miligramo
µg	microgramo
min	minuto
µl	microlitro
mM	milimolar
µmoles	micromol
NAG	N-acetil glucosamina
NaCl	cloruro de sodio
NaH ₂ PO ₄	fosfato de potasio monobásico
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	neighbor Joining
No.	número
PASC	phosphoric acid swollen cellulose
pb	par de base
PBS	polysaccharide binding surface
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	protein data bank
pH	potencial de hidrógeno

pI	punto isoeléctrico
PMO	polisacárido monooxigenasa
RNA	ribonucleic acid
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TCI	total crystallinity index
U	unidad
VMD	visual molecular dynamics

RESUMEN

La búsqueda de nuevas proteínas con características que mejoren procesos biotecnológicos como la producción de bioetanol de segunda generación es un área que continua en crecimiento. Recientemente, se han descrito proteínas denominadas expansinas provenientes de hongos y bacterias que podrían jugar un papel importante en la hidrólisis de celulosa y materiales lignocelulósicos. En este trabajo, se clonó una expansina designada como ScExlx1 del hongo *Schizophyllum commune*. Esta proteína se expresó en *Pichia pastoris* y fue capaz de mejorar la hidrólisis de celulosa cristalina en un 23% cuando se usó como pretratamiento antes de la adición de una mezcla de celulasas. Además, la expansina ScExlx1 presentó actividad sobre quitina, mejorando la hidrólisis enzimática de este polímero cuando se usó como pretratamiento antes de la adición de una mezcla de quitinasas.

Aunque la función biológica de ScExlx1 en *S. commune* es aun desconocida, esta proteína es un candidato para estudios posteriores dirigidos a responder esta pregunta y a la búsqueda de posibles aplicaciones biotecnológicas en el área de los biocombustibles y la bio-conversión de residuos de la industria agrícola.

ABSTRACT

The search for novel proteins with characteristics that improve biotechnological processes such as the production of second generation bioethanol is an area that continues to grow. Recently, proteins called expansins from fungi and bacteria have been suggested to play an important role in the hydrolysis of crystalline cellulose and lignocellulosic materials. In this work, an expansin protein designated as ScExlx1 of the fungus *Schizophyllum commune* was cloned. The protein was expressed in *Pichia pastoris* and was able to improve the hydrolysis of crystalline cellulose by 23% when used as pretreatment prior to the addition of a mixture of cellulases. In addition, ScExlx1 expansin showed activity on chitin, improving the enzymatic hydrolysis of this polymer when used as pretreatment prior to addition of a mixture of chitinases.

Although the biological function of ScExlx1 in *S. commune* is still unknown, this protein is a candidate for further studies aimed at answering this question and the search for possible biotechnological applications in the area of biofuels and bio-conversion of agroindustrial wastes.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de alternativas a los combustibles fósiles como fuente de energía es una prioridad de urgencia global. La biomasa lignocelulósica tiene el potencial de contribuir a satisfacer la demanda de estos combustibles líquidos, ya que representa la reserva renovable de carbohidratos más grande del mundo y tiene el potencial de convertirse en la principal fuente de azúcares fermentables para la producción de bioetanol. Se estima que sólo en los Estados Unidos, podría recuperarse más de un billón de toneladas de biomasa a partir de la agricultura y el bosque, la cual tiene el potencial de remplazar hasta el 30% del consumo total de gasolina en los Estados Unidos (Chen et al., 2012).

El alto contenido energético y la portabilidad de los combustibles de procedencia biológica, así como su compatibilidad con la infraestructura de transporte existente basada en petróleo, ayuda a explicar su inmenso atractivo como fuente de combustible. Además del creciente uso de biocombustibles como biodiesel y etanol derivado de azúcares o almidón, la evidencia sugiere que los combustibles de transporte derivados de biomasa lignocelulósica representan la fuente alternativa de combustible con el mayor potencial de escalamiento (Rubin, 2008).

La celulosa que se encuentra contenida en la biomasa lignocelulósica es el componente de mayor valor si se pretende aprovechar esta biomasa para producir biocombustibles. Sin embargo, uno de los principales retos para utilizar la celulosa como fuente de carbono es la dificultad para romper su estructura cristalina, que le confiere resistencia ante posibles ataques enzimáticos por microorganismos como hongos y bacterias principalmente, dificultando así su posterior degradación (Martínez et al., 2008). Otra de las grandes problemáticas para el aprovechamiento total de la biomasa lignocelulósica, es resolver su alta resistencia a la degradación para ser transformados en azúcares fermentables. La dificultad para acceder a la celulosa que se encuentra en la pared celular de esta biomasa se debe principalmente a la rígida asociación de la lignina con la celulosa y la hemicelulosa (Khasa et al., 2011). Por esa razón, el primer paso en la utilización de la biomasa lignocelulósica es remover la lignina y/o la hemicelulosa en un

proceso llamado pre-tratamiento, de modo que el polímero de celulosa pueda estar expuesto al ataque de las enzimas celulolíticas para transformarlo en unidades de glucosa (Singh & Chen, 2008).

Un pre-tratamiento apropiado involucra: 1) ruptura de los puentes de hidrógeno en la celulosa cristalina, 2) destrucción del entre cruzamiento entre la matriz de hemicelulosa y lignina, y 3) lavado de la parte porosa y la superficie de la celulosa para la subsecuente hidrólisis enzimática (Mood et al., 2013).

Actualmente, existen diversos métodos para pre-tratar los materiales lignocelulósicos, incluyendo pre-tratamientos físicos (molienda, microondas, extrusión), químicos (álcali, ácido, solventes orgánicos, ozonólisis y líquidos iónicos) y físico-químicos (explosión con vapor, agua caliente, explosión de fibra de amonio, oxidación húmeda y explosión con CO₂) (Mood et al., 2013). Una alternativa a estas tecnologías, es el uso de pre-tratamientos biológicos a través de enzimas como celulasas y enzimas lignolíticas, producidas por hongos. Las enzimas lignolíticas, tienen la capacidad de producir una despolimerización en la estructura de la lignina, generando compuestos de bajo peso molecular que pueden ser asimilados por los microorganismos (Elisashvili et al., 2006). Las celulasas por su parte, favorecen la desorganización de las fibras de celulosa, así como la conversión de la misma en azúcares más simples, que pueden ser incorporados a procesos de fermentación, con la consecuente producción de etanol.

Además de los sistemas celulolíticos típicos que se conocen de algunas bacterias y hongos (endoglucanasas, celobiohidrolasas, celobiosa deshidrogenasas, β -glucosidasas, polisacárido monooxigenasas) existe un grupo de proteínas que aunque no presentan actividad hidrolítica ni oxidativa, favorecen la amorfogénesis de la celulosa contenida en la biomasa vegetal. Estas proteínas son conocidas como proteínas tipo expansinas o proteínas “expansin-like”. Las más estudiadas en los últimos años son las swolleninas de los ascomicetos y una loosenina en el basidiomiceto *Bjerkandera adusta*.

Varios autores han descrito los efectos promotores en la hidrólisis cuando se trata a la celulosa con dominios de unión a celulosa (CBD, “cellulose binding domain”), expansinas de plantas o proteínas tipo-expansinas de *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bjerkandera adusta* y *Aspergillus fumigatus*. Una de estas proteínas es la swollenina del hongo *T. reesei*, sin embargo, en contraste con las celulasas, los niveles de expresión de swollenina en *T. reesei* son relativamente bajos (1mg/L). Por lo tanto, esta swollenina ha sido expresada de manera heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*, no obstante, los niveles de expresión también son bajos (25µg/L) y sólo *Aspergillus oryzae* produce altas concentraciones de esta proteína (50mg/L) (Jäger et al., 2011).

Debido a que los sistemas enzimáticos con los que se cuenta hoy en día, no tienen la eficiencia necesaria para que la producción de bioetanol de segunda generación compita con la de primera generación, es necesario continuar con la búsqueda de proteínas y sistemas celulolíticos que permitan una hidrólisis y bioconversión de celulosa eficiente. Así mismo, el conocimiento de nuevas proteínas y sus características continúa siendo un área de oportunidad en la biotecnología. Por tal motivo, en este trabajo se pretende expresar de manera heteróloga una proteína del basidiomiceto *Schizophyllum commune*, que por su grado de similitud con expansinas bacterianas, pudiera presentar actividad amorfogénica en la celulosa, y de este modo, ser considerada como un componente extra en las preparaciones enzimáticas usadas para el pretratamiento de residuos agrícolas con fines biotecnológicos.

ANTECEDENTES

Componentes de la pared celular de plantas

Cada célula vegetal del planeta se encuentra rodeada de una fuerte pared celular, compuesta de polisacáridos, proteínas, y en algunos casos, moléculas de naturaleza fenólica. Los compuestos fenólicos, notablemente la lignina, constituyen hasta el 30% de algunas paredes celulares secundarias (Glass et al., 2013). En conjunto con las enzimas asociadas a la pared celular, proteínas estructurales y proteoglicanos, estos componentes forman una red compleja con una asociación intrínseca tan fuerte, que provee fuerza y durabilidad a la pared celular de las plantas (Popper et al., 2011), sin dejar de mencionar la protección que brinda contra condiciones ambientales adversas y microorganismos potencialmente patógenos. Cabe mencionar que la pared celular vegetal puede llegar a contener una gran variedad de tipos de carbohidratos, no obstante, el arreglo específico de los carbohidratos presentes varía dependiendo de la especie y el tipo de tejido vegetal (Glass et al., 2013)

La lignocelulosa de las plantas es el material natural más abundante existente sobre el planeta. Se calcula que la producción anual de biomasa vegetal en el mundo es de 200 billones de toneladas (Zhang et al., 2007). Este material, se compone principalmente de 3 bloques poliméricos: lignina, que consta de naturaleza polifenólica, celulosa y hemicelulosa (Fig. 1).

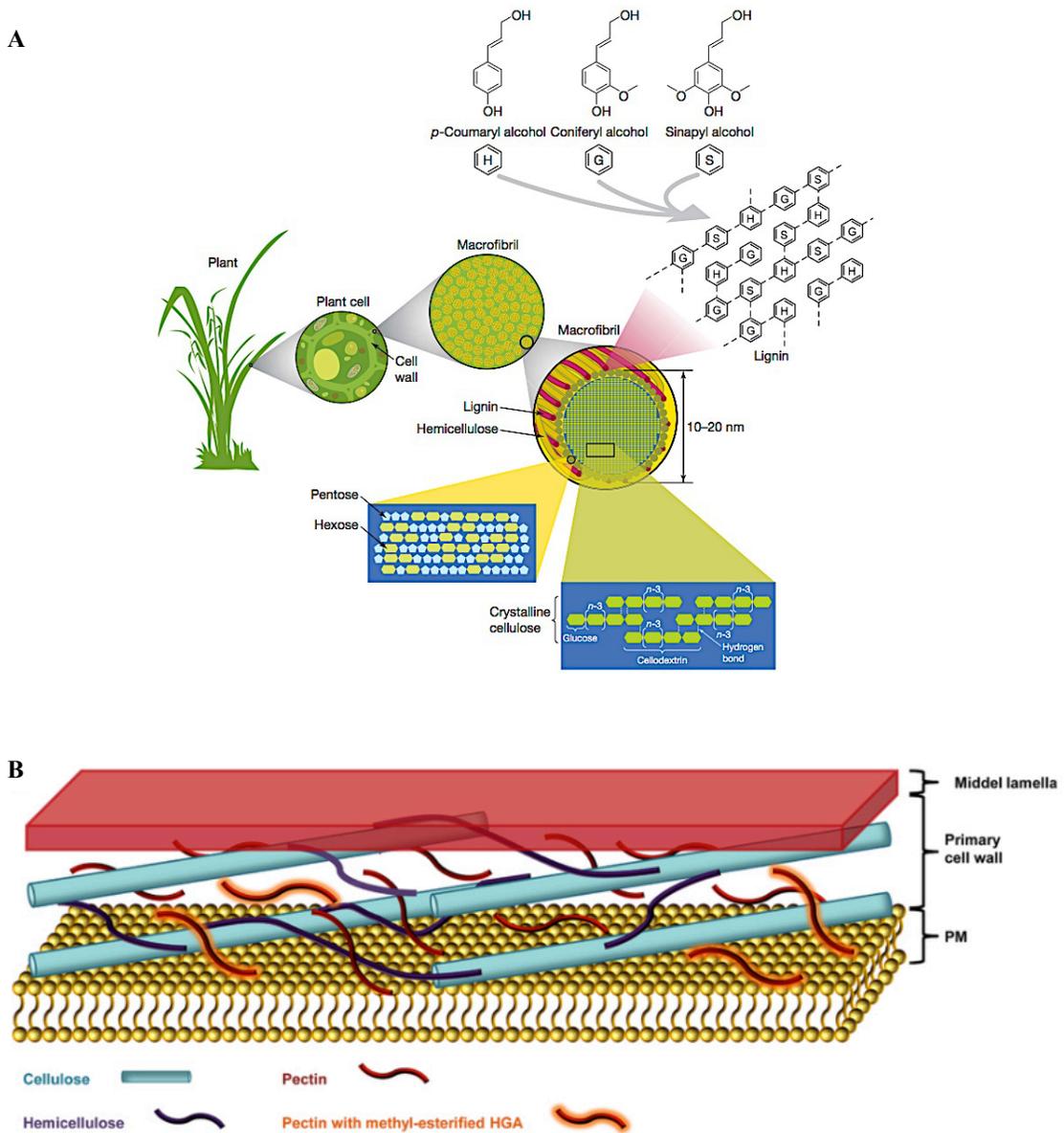


Figura 1. A: Estructura de la pared celular vegetal. Se observan las principales estructuras de los componentes de la pared celular vegetal. Tomado de Rubin (2008). **B: Composición de la pared celular vegetal.** Se observan los principales bloques poliméricos de la pared celular vegetal: Pectina, Celulosa, Hemicelulosa y Lignina. Tomado de Malinovsky et al., (2014) (<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00178>)

Lignina

La lignina es el segundo componente más abundante de la pared celular vegetal y protege a la celulosa contra el ataque hidrolítico de microorganismos saprofitos y patógenos (Ruiz-Dueñas & Martínez, 2009). Su remoción representa un paso clave para el reciclaje del carbono, así como una coyuntura para la utilización industrial de biomasa vegetal (Ruiz-Dueñas & Martínez, 2009). De los microorganismos con capacidad lignolítica, los basidiomicetos son los más potentes, lo que los convierte en un tema de investigación actual muy importante en el ambiente biotecnológico. Uno de los principales aspectos de interés en cuanto a la remoción/degradación de lignina en la biomasa vegetal, es que la lignocelulosa con bajo contenido de lignina o con lignina modificada puede tener rendimientos más altos cuando son sometidas a procesos de sacarificación, un punto clave durante la producción de biocombustibles.

Hemicelulosa

Las hemicelulosas comprenden los polisacáridos que se encuentran en la pared celular vegetal, que no pertenecen a las pectinas ni a la celulosa (Scheller & Ulvskov, 2010). Una característica de este grupo de polisacáridos es que pueden ser extraídos con tratamiento alcalino (Glass et al., 2013). Estos polisacáridos son muy diferentes unos de otros en cuanto a estructura y propiedades fisicoquímicas. Algunos autores como Glass et al., (2013), agrupan a la hemicelulosa en xiloglucanos, xilanos, mananos y glucomanos, y glucanos β -(1-3, 1-4). Otros polisacáridos como los galactanos, arabinanos y arabinogalactanos, son comúnmente incluidos en el grupo de las hemicelulosas, sin embargo, el hecho de que estos últimos parecen ser parte de las moléculas de pectina, al menos en su síntesis inicial, y no comparten la conformación ecuatorial del enlace β -(1-4) en su estructura principal, algunos investigadores consideran que no deben ser incluidos en el grupo ya bastante heterogéneo de las hemicelulosas (Scheller & Ulvskov, 2010).

Como se menciono anteriormente, las hemicelulosas son un grupo heterogéneo de polisacáridos, cuyo nombre fue adjudicado en una época en que las estructuras químicas no estaban bien comprendidas y su biosíntesis era completamente desconocida (Scheller & Ulvskov, 2010). El término hemicelulosa es por lo tanto arcaico, y varios investigadores han sugerido que no debe ser usado. Sin embargo, se sigue usando el término “hemicelulosa” como un denominador para un grupo de polisacáridos de la pared celular vegetal, que son caracterizados por no ser celulosa ni pectina, y por tener esqueletos de glucosa, manosa o xilosa, unidos mediante enlaces β -(1-4). Estos glucanos tienen la misma configuración ecuatorial en C1 y C4, y por ende, comparten una gran similitud estructural (Fig. 2) (Scheller & Ulvskov, 2010).

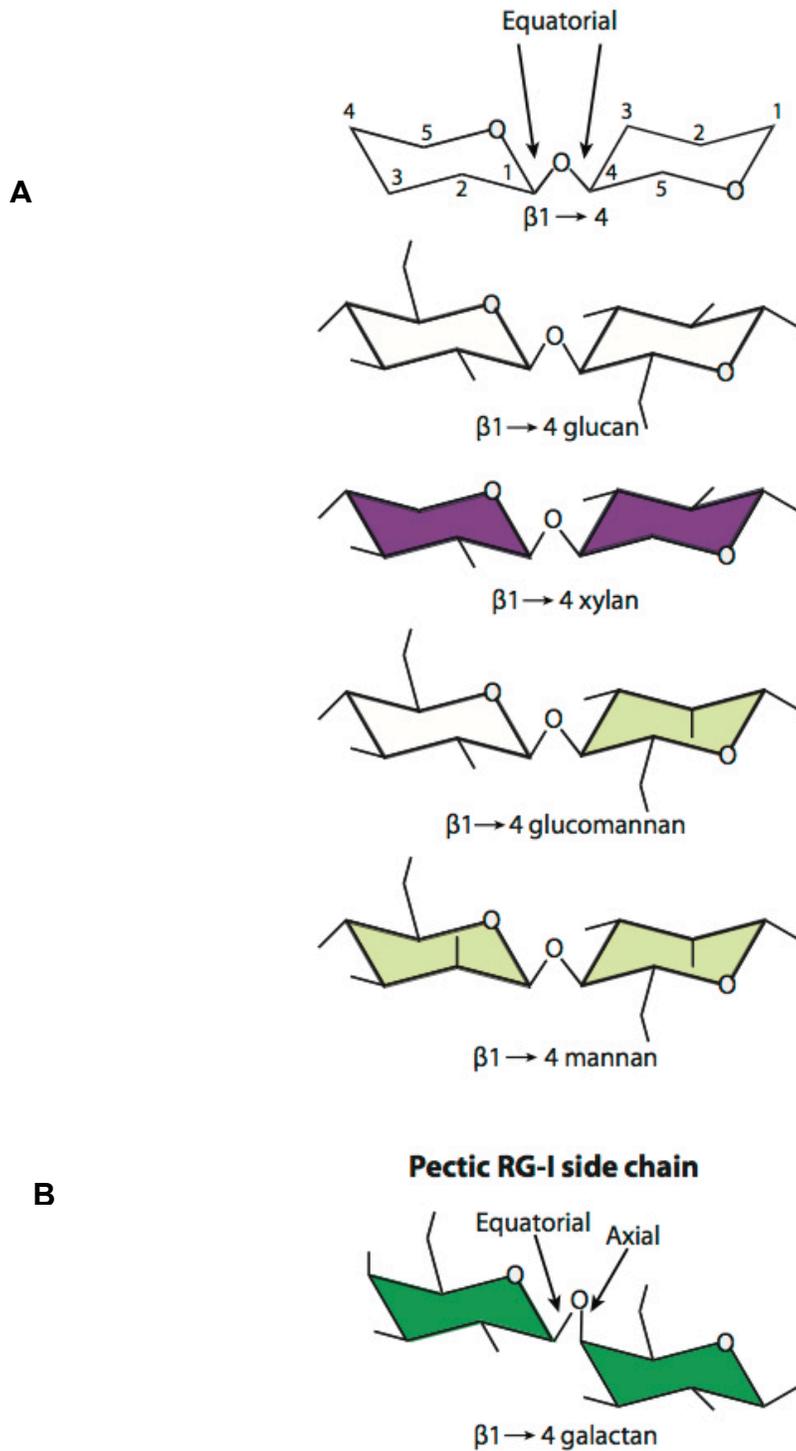


Figura 2. Estructura de la hemicelulosa. A) Las hemicelulosas se caracterizan por mantener un esqueleto de monómeros ligados mediante enlaces β -(1-4), con una configuración ecuatorial entre C1 y C4. B) Los polisacáridos como los galactanos β -(1-4) tienen una configuración axial en C4, y por lo tanto no deben ser considerados hemicelulosas. Tomado de Scheller & Ulvskov (2010).

Celulosa

La celulosa es el principal componente polimérico de la pared celular de las plantas, el polisacárido más abundante sobre el planeta, y una fuente importante de energía renovable (Baldrian & Valášková, 2008). Su composición química es simple, ésta consiste de residuos de D-glucopiranosos unidos mediante enlaces glucosídicos β -1-4 para formar un polímero lineal de alto peso molecular con más de 10 000 residuos (Chen, 2014). La celulosa contiene regiones altamente cristalinas, donde las cadenas individuales están ligadas entre sí, y además, consta de regiones amorfas que se encuentran con un bajo grado de organización (Baldrian & Valášková, 2008).

La unidad repetitiva de la celulosa es la celobiosa. Los grupos hidroxilo presentes en las macromoléculas de celulosa están involucradas en un gran número de puentes de hidrógeno a nivel intra e intermolecular, lo que resulta en arreglos cristalinos con distintos grados de organización (Park et al., 2010).

Actualmente, se han reportado 4 alomorfos cristalinos, identificados por sus patrones característicos de difracción de Rayos X y su espectro de resonancia magnética nuclear de estado sólido ^{13}C (RMN): celulosa I, II, III y IV (S. Park et al., 2010). La celulosa I es la forma más abundante en la naturaleza. La celulosa II puede ser preparada por dos rutas distintas: mercerización (tratamiento alcalino) y regeneración (solubilización y recristalinización subsecuente). Las celulosas III_I y III_{II} pueden ser formadas a partir de celulosa I y II, respectivamente, mediante tratamiento con amonio líquido y la reacción es reversible (Hayashi, Sufoka, Ohkita, & Watanabe, 1975). Las celulosas IV_I y IV_{II} pueden ser obtenidas calentando las celulosas III_I y III_{II}, respectivamente (Gardiner & Sarko, 1985)

La estructura cristalina de la celulosa ha sido estudiada desde su descubrimiento en el siglo XIX. Actualmente, la celulosa I está recibiendo más atención como objeto de investigación, debido a su potencial uso en la producción de bioenergía. Desde entonces, han sido propuestos una serie de modelos de celulosa I, sin embargo, su estructura sigue sin ser comprendida totalmente debido a su complejidad (Park et al., 2010).

Además del grado de susceptibilidad a la hidrólisis enzimática que pueden llegar a presentar los distintos tipos de celulosa que existen en la naturaleza debido a su nivel de organización, se conoce desde hace más de 100 años un tipo de estructuras supramoleculares en la celulosa, llamadas dislocaciones o nódulos. Estas estructuras han sido observadas en madera, fibras del floema, en las plantas de cannabis, lino y ortiga (Thygesen et al., 2011). Las dislocaciones son regiones irregulares dentro de la pared celular que pueden ser inducidas por acción mecánica sobre las fibras después de la cosecha o pueden estar presentes desde antes de cosechar (Eder et al., 2008; Terziev et al., 2005; Thygesen & Asgharipour, 2008). Algunas pocas fibras naturales como el algodón, no contienen dislocaciones al momento de la cosecha. Actualmente, el motivo por el cual existen este tipo de estructuras supramoleculares en las plantas vivas continúa sin conocerse, aunque se ha propuesto que las dislocaciones pueden ser ocasionadas por distintos tipos de acción mecánica, por ejemplo la compresión longitudinal ejercida por el viento en las paredes de la planta (Thygesen & Asgharipour, 2008; Thygesen et al., 2011). De acuerdo con esta teoría, las plantas que son expuestas a condiciones de viento presentan más dislocaciones que las plantas no expuestas (Thygesen & Asgharipour, 2008; Thygesen et al., 2011). Sin embargo, debido a que la sequía también provoca dislocaciones, las condiciones de estrés durante la biosíntesis de microfibrillas son otra posible causa (Thygesen & Asgharipour, 2008; Thygesen et al., 2011).

Se han realizado investigaciones (Ander, 2005) en donde se demuestra que las dislocaciones han logrado reducir la dureza del papel y lo han hecho más susceptible a la hidrólisis ácida. Esta es una de las razones por las que se creyó que las dislocaciones se encontraban formando parte de la celulosa amorfa. Recientemente, (Kawakubo et al., 2010) se han encontrado resultados que parecían fortalecer esta hipótesis. El grupo de Kawakubo investigó la unión de dos módulos de unión a celulosa (Cellulose Binding Module) en pulpa de madera de cedro. En su investigación, se observó que el CBM28 de *Clostridium josui*, un CBM conocido por unirse a cadenas de sacáridos (considerados como celulosa amorfa), se unía a superficies de fibra deslignificada en ciertas regiones. Kawakubo y sus colaboradores interpretaron que estas regiones correspondían a celulosa amorfa, que se encontró sobre la superficie de la fibra y que estuvo expuesta durante el

proceso de deslignificación. Para otros autores (Thygesen et al., 2011), estas regiones parecen ser idénticas a las dislocaciones. Por otro lado, el CBM3 de *Clostridium josui*, conocido por unirse a superficies planas en la celulosa cristalina, no mostró dicha tendencia. Así mismo, en el año 2007 (Filonova et al., 2007), se detectó un incremento en la unión del CMB1 marcado de la celulasa Cel7A (una celobiohidrolasa que actúa sobre celulosa cristalina) de *Hypocrea jecorina* en las dislocaciones de fibras de pulpa de Picea, así como en otros sitios donde las fibras estaban dañadas. Según Thygesen et al., (2011), los resultados contradictorios antes mencionados ilustran que la microestructura de las paredes celulares vegetales es más compleja que lo que puede ser revelado usando pruebas cuyas propiedades de unión han sido caracterizadas basándose en sustratos celulósicos aislados. Así mismo, trabajos recientes de Thygesen y sus colaboradores demuestran que las dislocaciones no son precisamente regiones de celulosa amorfa, sino regiones irregulares que pueden ser ocasionados o existir de manera natural a lo largo de las microfibrillas de celulosa.

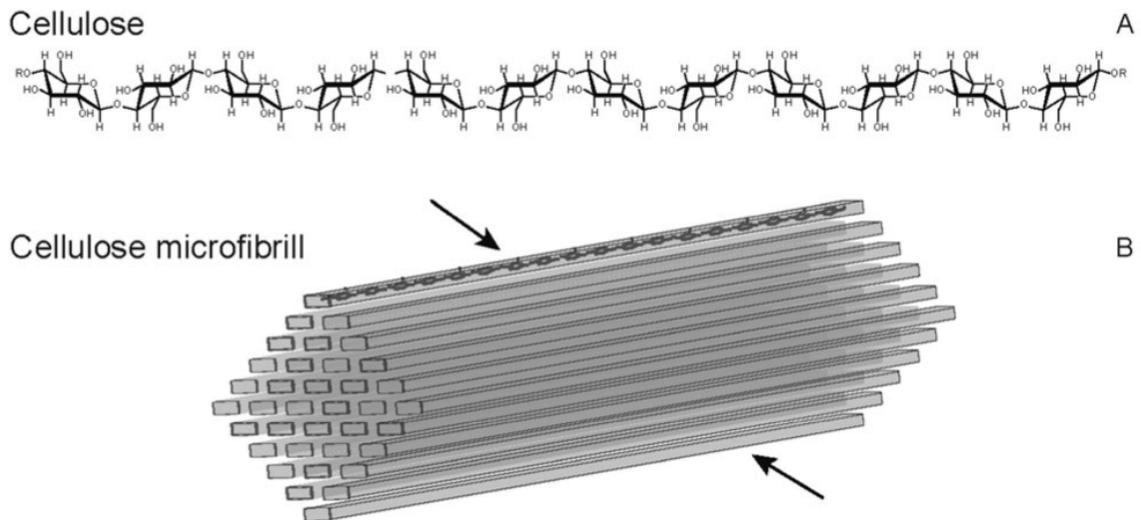


Figura 3. Estructura de una microfibrilla de celulosa. Visualización estructural de una cadena de celulosa (A) y esquema de una microfibrilla de celulosa I β (B). Nótese la simplicidad y homogeneidad de la cadena de celulosa. Las cadenas de celulosa se agregan paralelamente para formar estructuras cristalinas llamadas microfibrillas. Las flechas indican las dos caras hidrofóbicas de la microfibrilla (Beckham et al., 2011), que se cree son puntos de ataque para las celulasas (Y.-S. Liu et al., 2011). Tomado de Horn et al., (2012).

Desconstrucción de la pared celular

Desconstrucción de celulosa

La celulosa es el material que representa el mayor reto dentro de los componentes de la pared celular de las plantas para ser despolimerizado. Parte de esto, se debe a que cada 30-36 cadenas de glucanos forman microfibrillas en la lignocelulosa dentro de la pared celular vegetal, que se agregan de manera lateral mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals para producir estructuras cristalinas (Fig 3.) (Glass et al., 2013; Somerville et al., 2004). La celulosa microcristalina está compuesta de 2 fases cristalinas: I α y I β (Ding & Himmel, 2006; Somerville et al., 2004). A pesar de que ha ocurrido un gran avance en la elucidación de las estructuras cristalinas de la celulosa en las microfibrillas, éstas aún no son bien comprendidas y se requiere un conocimiento más profundo sobre la estructura de la celulosa con el fin de poder lidiar con la recalcitrancia natural de los substratos lignocelulósicos (Arantes & Saddler, 2010).

Los basidiomicetes, son el grupo de degradadores mas potentes de este polímero, gracias a que muchas especies crecen sobre madera muerta o en descomposición, un ambiente rico en celulosa. Sin embargo, se ha visto que los sistemas celulolíticos fúngicos difieren de los complejos sistemas celulolíticos de las bacterias, mientras que las diferencias entre los grupos taxonómicos individuales son menos pronunciadas (Lee et al., 2002).

El arreglo clásico de enzimas fúngicas degradadoras de celulosa, está compuesto por enzimas que realizan cortes dentro (Endoglucanasas) y fuera (Exocelulasas, celobiohidrolasas) de la celulosa. La celobiosa o celooligosacáridos resultantes, son usualmente procesados por β -glucosidasas intracelulares o extracelulares, o bien sometidas a deshidrogenación por la celobiosa deshidrogenasa (Fig. 4) (Baldrian & Valášková, 2008). Además de estas 3 enzimas clásicas, recientemente se ha descrito otra clase de proteínas conocidas como Polisacárido Monooxygenasas (PMO's). Estas proteínas son considerados como un nuevo grupo de jugadores en la descomposición de celulosa, y actúan generando cortes internos de manera oxidativa en la molécula de celulosa, trabajando sinérgicamente con la celobiosa deshidrogenasa y otras enzimas que degradan celulosa (Žifčáková & Baldrian, 2012) (Fig. 5).

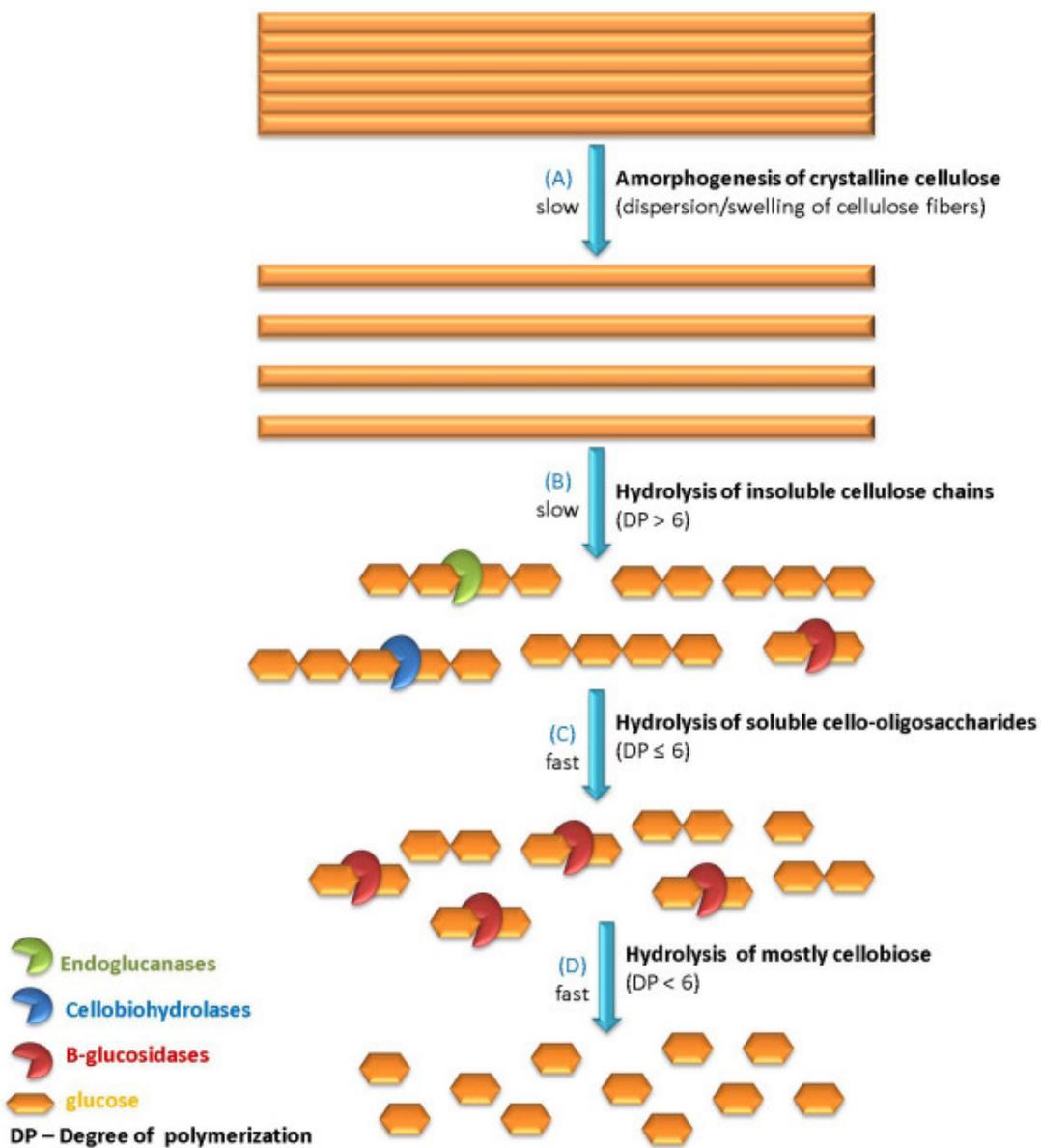


Figura 4. Mecanismo propuesto para la amorfogénesis/despolimerización de la celulosa por celulasas. La amorfogénesis toma lugar a nivel macromolecular por agentes no hidrolíticos. Tomado de: Arantes y Saddler, 2010.

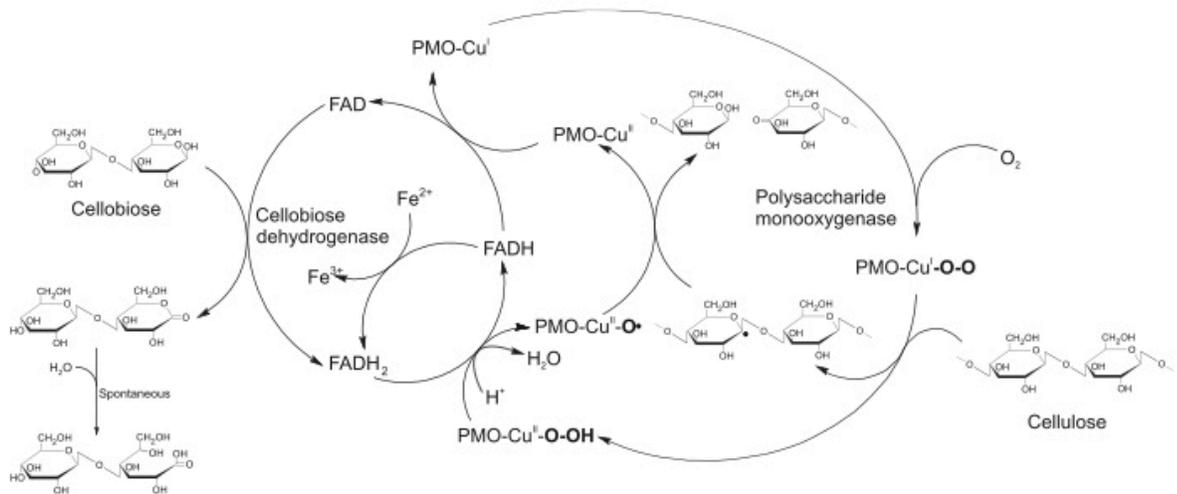


Figura 5. Modo de acción de las polisacárido monooxygenasas. Reacciones catalizadas por la Polisacárido Monooxygenasa y la cooperación propuesta entre PMO y celobiosa deshidrogenasa. Tomado de Žifčáková & Baldrian (2012).

Proteínas amorfógenicas

En años recientes, se han reportado una serie de proteínas que actúan sobre celulosa promoviendo un efecto conocido como “amorfogénesis” (Arantes & Saddler, 2010; Gourlay et al., 2013). Estas proteínas han sido aisladas de bacterias, hongos y plantas, y por lo general no presentan actividad hidrolítica (Baccelli, et al., 2014; Kerff et al., 2008; Pazzagli et al., 2014; Quiroz-Castañeda, et al., 2011; Saloheimo et al., 2002; Sampedro & Cosgrove, 2005; Tovar-Herrera et al., 2015). A pesar de que actualmente no se conoce con exactitud la función biológica de estas proteínas, se cree que pueden ser jugadores clave en la desestructuración de la celulosa para fines biotecnológicos, ya que se ha demostrado experimentalmente que las proteínas amorfógenicas generan zonas con menor grado de organización en la estructura de la celulosa, reducen el tamaño de partícula de Avicel y pueden o no actuar de manera sinérgica con celulasas de diversas fuentes (Baccelli et al., 2014; Jäger et al., 2011; Quiroz-Castañeda et al., 2011; Tovar-Herrera et al., 2015).

Expansinas

Durante los últimos 20 años, comenzó el estudio de una nueva clase de proteínas llamadas expansinas, descritas por primera vez en plantas (McQueen-Mason et al., 1992). La primera característica señalada de las expansinas, fue la relajación de la estructura de la pared celular vegetal y el alargamiento de la célula durante el crecimiento ácido (McQueen-Mason et al., 1992).

Las expansinas son proteínas que están involucradas en el proceso de extensión o crecimiento celular, así como en procesos del desarrollo en los que la pared celular vegetal sufre modificaciones. Las expansinas cumplen con la función de “aflojar” o “relajar” la cohesión que existe entre los componentes de la pared, y de este modo, permiten que otras enzimas y moléculas puedan actuar sobre esta estructura para que ocurra el crecimiento celular (Sampedro & Cosgrove, 2005). Estas proteínas constan de dos dominios y están anteceditas por un péptido señal (Fig 6). Con base en el análisis filogenético de sus secuencias, actualmente se agrupan cuatro familias de expansinas: α -expansinas (EXPA), β -expansinas (EXPB), proteínas tipo expansinas “A” (EXLA) y “B” (EXLB) (Sampedro & Cosgrove, 2005). En los últimos años, el interés por demostrar la actividad de estas proteínas experimentalmente ha incrementado considerablemente.



Figura 6. Representación esquemática de los genes de expansinas. El dominio 1 es homólogo al dominio catalítico de las endoglucanasas de la familia GH45, mientras que el dominio 2 es homólogo al grupo 2 de alérgenos de polen de algunos pastos, cuya función biológica no se conoce.

Una característica de las expansinas es que comparten solamente un 20-40 % de identidad entre las diferentes familias de estas proteínas (Sampedro & Cosgrove, 2005). El dominio 1 de las expansinas mantiene un alto grado de conservación y además tiene homología distante con la familia 45 de las glicosil-hidrolasas (GH45), familia que comprende principalmente endoglucanasas fúngicas (Lombard et al., 2014). Según investigadores (Sampedro & Cosgrove, 2005) el motivo estructural clásico de las

endoglucanasas de la familia 45 (un barril- β de 6 cadenas presentando un surco de unión al sustrato en el dominio catalítico) debería estar presente en las expansinas. A pesar de la similitud estructural, no se ha detectado actividad hidrolítica en α -expansinas ni β -expansinas.

Swolleninas

En el año 2002, se identificó por primera vez en hongos una proteína con una similitud de secuencia considerable a las expansinas originarias de las plantas. La proteína denominada Swollenina, nombrada así por el efecto de “hinchazón” que genera en las fibras de algodón, fue descubierta y estudiada inicialmente en el ascomiceto *Trichoderma reesei* (Saloheimo et al., 2002). Esta proteína contiene una secuencia señal en el extremo N-terminal, seguido de un CMB típico de hongos (Fig. 7), mientras que dos terceras partes de su C-terminal muestran una clara similitud aminoacídica con las expansinas de las plantas (Saloheimo et al., 2002). La swollenina de *T. reesei* fue expresada en *Saccharomyces cerevisiae* y en *Aspergillus niger*, y aunque no se detectó liberación de azúcares reductores en los sobrenadantes del tratamiento en algodón ni papel filtro, se observó un ensanchamiento de las fibras de algodón mediante microscopía y la fuerza tensil del papel filtro logró disminuir un 15-20 % después del tratamiento con swollenina (Saloheimo et al., 2002).



Figura 7. Dominios presentes en las proteínas tipo expansinas, denominadas “swolleninas”.

Así mismo, Yao et al., (2008), clonaron y expresaron de manera heteróloga una swollenina de *Trichoderma pseudokoningii*. Ellos lograron detectar una ligera actividad hidrolítica sobre xilano y los glucanos de la pared celular de levaduras, sin embargo, esta swollenina no presentó actividad hidrolítica aparente sobre carboximetil celulosa, papel filtro, fibras de algodón ni celulosa CF11 en polvo (Yao, et al., 2008).

En el año 2010, un grupo de investigadores clonó y expresó una swollenina de *Aspergillus oryzae*. En su investigación, se determinó que la mejor fuente de carbono para expresar la swollenina fue el glicerol, mientras que la mejor fuente de nitrógeno para expresar swollenina mediante el sistema de *A. oryzae* fue harina de cacahuete. Esta proteína, como la de *T. reesei*, no presentó la capacidad de liberar azúcares reductores por sí misma, sin embargo, al añadir celulasas adicionadas con el sobrenadante de *A. oryzae* sobre papel filtro, el sobrenadante presentó una actividad sinérgica de 52.9 % (Wang et al., 2010).

Además de poder medir la disminución de la fuerza tensil en el papel filtro, ocasionada por el tratamiento con swollenina, el cambio en la estructura de la celulosa, definido como “hinchazón” o “ensanchamiento”, puede ser observado mediante diferentes tipos de microscopía. En el 2011, en la Universidad de Jilin, China, se clonó y expresó en *E. coli* una swollenina de *Trichoderma asperellum*. Esta proteína se usó para observar la modificación de las partículas de Avicel mediante microscopía de luz visible y para evaluar la mejora en la liberación de azúcares reductores al pretratar Avicel con swollenina y una endoglucanasa de *Fervidobacterium nodosum* (Wang et al., 2011). Los resultados del experimento demostraron que al someter las partículas de Avicel al tratamiento con swollenina, el tamaño de dichas partículas disminuyó considerablemente después de 91 h. Asimismo al valorar la mejora en la liberación de azúcares reductores después del tratamiento con swollenina, se observó que lo que limitaba la cantidad de azúcares reductores detectada no era la cantidad de endoglucanasa usada en el experimento, sino la cantidad de swollenina que se usó para pretratar el Avicel (Wang et al., 2011).

Aunque son pocos los estudios que se han realizado en el tema de las swolleninas, el interés por parte de los investigadores cada vez es mayor. Actualmente, la búsqueda de un sistema de expresión eficiente para producir swollenina permanece vigente. En el año 2011, se clonó y expresó una swollenina de *T. reesei* expresada en la levadura *Kluyveromyces lactis*, logrando producir hasta 30 mg/L de swollenina, una producción comparable con aquella obtenida al expresar la misma proteína en *A. oryzae* (59 mg/L)

(Jäger et al., 2011). En su trabajo, Jäger et al., (2011) demostraron que la swollenina clonada lograba reducir la cantidad de aglomerados de celulosa en papel filtro, así como disminuir el tamaño de partícula de papel filtro, α -celulosa y Avicel, incrementar la adsorción de celulasas y disminuir la cristalinidad sobre los sustratos mencionados.

Looseninas

En el año 2011, Quiroz-Castañeda y colaboradores (Quiroz-Castañeda et al., 2011) reportaron el hallazgo de un nuevo grupo de proteínas en el basidiomicete *Bjerkandera adusta*. La proteína denominada “loosenina”, fue descrita como una proteína “tipo-expansina” debido a que parte de su secuencia comparte homología con el dominio DPBB presente en las expansinas de plantas y las endoglucanasas β -1,4 de la familia GH45. A diferencia de las expansinas, las looseninas no cuentan con un segundo dominio, sin embargo, mantienen la capacidad de unirse a polisacáridos como la celulosa y la quitina (Quiroz-Castañeda et al., 2011). La principal actividad de la loosenina, consiste en “aflojar” las fibras de celulosa cristalina que conforman el algodón sin presentar actividad hidrolítica. Asimismo, cuando la loosenina de *B. adusta* se usó para pre-tratar bagazo de agave (un sustrato lignocelulósico recalcitrante), éste fue 7.5 veces más susceptible a la acción de celulasas que el bagazo no tratado.

Tres años mas tarde, Susuki y colaboradores (Suzuki et al., 2014) detectaron y evaluaron la expresión de 13 genes clasificados como proteínas “loosenin-like” (LOOLs), presentes en el hongo *Phanerochaete carnosae*. Al evaluar la relación filogenética entre las proteínas loosenin-like, los autores observaron que 12 de las 13 secuencias formaban dos clases distintas (A y B), agrupándose de manera distinta dependiendo de la presencia o ausencia de 2 inserciones. Por otro lado, las diferentes secuencias de LOOLs exhibieron diferencias en los patrones de expresión dependiendo del sustrato en el que se cultivó *P. carnosae*, e incluso diferencias en la expresión de LOOLs pertenecientes al mismo grupo (fuera A o B).

Cerato-plataninas

Las cerato-plataninas son un grupo de proteínas no catalíticas y fitotóxicas descubiertas en el hongo fitopatógeno *Ceratocystis platani*. Tienen un tamaño de 12.4 kDa y son producidas de manera abundante en etapas tempranas de crecimiento de este hongo cuando es incubado en agitación (Pazzagli et al., 2006). La estructura cristalina de la primer cerato-platanina fúngica reportada, reveló que estas proteínas adoptan una conformación de barril β , similar al que se encuentra en las looseninas, expansinas, endoglucanasas y las proteínas barwin (De Oliveira et al., 2011; Quiroz-Castañeda et al., 2011). Actualmente se han reportado diversas funciones para las cerato-plataninas, ya que se han visto involucradas en: interacciones hongo-planta, desarrollo del hongo, mecanismos de virulencia, como inductores en respuesta de defensa en plantas, presentando actividad tipo-expansina, entre otras (Pazzagli et al., 2014). Debido a su actividad tipo-expansina, se cree que las cerato-plataninas podrían estar involucradas en procesos de remodelación de pared celular (Bacelli et al., 2014).

Expansinas microbianas

El descubrimiento de las expansinas microbianas emergió de estudios sobre el mecanismo del crecimiento celular de plantas y las bases moleculares de la extensibilidad de la pared celular vegetal (Georgelis, Nikolaidis, & Cosgrove, 2015). Las expansinas son proteínas que “aflojan” la pared celular vegetal y están presentes en todas las especies de plantas, sin embargo, también están presentes en algunas bacterias, hongos y otros organismos filogenéticamente distantes, que por lo general colonizan superficies vegetales (Georgelis et al., 2015).

La proteína denominada BsExlx1 de *Bacillus subtilis*, fue la primer expansina reportada proveniente de una fuente no-vegetal (Kerff et al., 2008), la primera expansina microbiana cristalizada, y por lo tanto usada como modelo de estudio para comprender la función de este grupo de proteínas en microbios. BsExlx1, tiene la capacidad de unirse a paredes celulares vegetales, celulosa y peptidoglicano, sin rastros de actividad

lítica como es característico de las expansinas. Por otro lado, aunque se demostró que BsExl1 promueve la extensión de la pared celular vegetal, esta actividad fue 10 veces menor a la reportada para las β -expansinas (Kerff et al., 2008). Uno de los hallazgos más importantes en relación a BsExl1, es que la delección del gen Exl1 disminuye en gran medida la capacidad de *B. subtilis* para colonizar raíces de maíz, lo que podría sugerir que las expansinas bacterianas juegan un papel importante en la interacción bacteria-planta (Kerff et al., 2008).

PcExl1 y HcExl2 son otras de las expansinas bacterianas caracterizadas hasta la fecha (Lee, et al., 2010; Olarte-Lozano et al., 2014). Una de las principales diferencias entre BsExl1 y el par PcExl1-HcExl2, es la naturaleza alcalina y ácida de estas proteínas (respectivamente), lo que les confiere diferentes propiedades de unión a los componentes de la pared celular vegetal (Kerff et al., 2008; Olarte-Lozano et al., 2014). Además, estas diferencias han permitido agrupar a las expansinas microbianas en dos clases principales: acídicas, cuando su pI es menor a 5; básicas, cuando su pI es mayor a 8 (Martinez-Anaya, 2016; Pastor, et al., 2014).

Recientemente, se descubrió por primera vez, la presencia de una expansina bacteriana formando parte del celulosoma de la bacteria *Clostridium clariflavum* (Artzi, et al., 2016). Esta proteína, tuvo la capacidad de mejorar la hidrólisis de celulosa por celulasas cuando fue usada como pretratamiento.

El hallazgo de expansinas microbianas no ha sido exclusivo de bacterias. Actualmente, se han reportado expansinas de origen fúngico que podrían estar cumpliendo diferentes funciones. Por un lado, el análisis transcripcional del hongo *Laccaria bicolor*, permitió detectar que un gen de expansina se expresaba durante el establecimiento de la ectomicorriza, sugiriendo que este hecho podría implicar la participación de la expansina en la remodelación de la pared celular fúngica (Veneault-fourrey et al., 2014). Un año después, nuestro grupo reportó una expansina del basidiomiceto *Schizophyllum commune* (ScExl1). Esta proteína, además de presentar la característica de unión a celulosa como las otras expansinas reportadas, fue capaz de unirse a quitina y mejorar su

hidrólisis cuando se usó como pretratamiento antes de añadir una mezcla de quitinasas (Tovar-Herrera et al., 2015). El hecho de que la pared celular fúngica contiene quitina como uno de sus principales constituyentes, refuerza la hipótesis de que las expansinas fúngicas podrían tener un rol importante durante la remodelación de la pared celular de este grupo de organismos.

Potencial biotecnológico de *Schizophyllum commune* en la degradación de lignocelulosa

Schizophyllum commune es uno de los hongos de pudrición blanca más comunes que existen, puede crecer sobre una amplia variedad de tipos de madera, restos leñosos de arboles, residuos de la industria agrícola, etc. y puede hacerlo en cualquier época del año. Como es característico de los hongos de pudrición blanca, *S. commune* degrada en su totalidad los componentes de la pared celular vegetal, a diferencia de los hongos de pudrición café, que degradan celulosa pero no lignina, dejando un residuo polimérico (Ohm et al., 2010).

En el año 2008 fue creada una base de datos cuya función es clasificar y anotar funcionalmente las oxidorreductasas fúngicas que estuvieran potencialmente involucradas en la degradación de lignina y compuestos aromáticos relacionados (Levasseur et al., 2008). La base de datos recibe el nombre de FOLy (Fungal Oxidative Lignin Enzymes) y las enzimas catalogadas dentro de esta plataforma son llamadas FOLymas.

Estas enzimas comprenden a los siguientes grupos:

- Lignin oxidasas (Familias LO)
- Enzimas auxiliares degradadoras de lignina que generan H₂O₂ para las peroxidasas (Familias LDA)

Las familias LO consisten de lacasas (LO1), lignino peroxidasas, manganeso peroxidasas, peroxidasas versátiles (LO2) y celobiosa deshidrogenasas (CDHs;LO3) (Ohm et al., 2010).

El genoma de *S. commune*, fue secuenciado en el año 2010, y tras su publicación se dio a conocer el inmenso potencial biotecnológico de este microorganismo. En resumen, *S. commune* contiene más FOLymas que hongos de pudrición café como *Postia placenta* y otros basidiomicetos sin actividad lignolítica (*Ustilago maydis* y *Cryptococcus neoformans*), y menos FOLymas que *Coprinopsis cinérea* y *Phanerochaete*

chryso sporium (Ohm et al., 2010).

Respecto a la degradación de polisacáridos, *S. commune* tiene una de las maquinarias mas grandes y completas para degradar celulosa y hemicelulosa de todos los basidiomicetes que han sido secuenciados a la fecha. Este hongo de pudrición blanca contiene 240 candidatos de glicosil hidrolasas, 75 candidatos de glicosil transferasas, 16 candidatos de polisacárido liasas y 30 candidatos de esterasas de carbohidratos codificadas en su genoma. Además de poseer un coctel enzimático para degradar pectina, hemicelulosa y celulosa, cabe mencionar que *S. commune* tiene por lo menos un gen representante de cada familia de las enzimas involucrada en la degradación de polisacáridos de la pared celular vegetal (Ohm et al., 2010), lo que lo convierte en un sujeto de estudio con un potencial de explotación singular.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente, de todos los sectores de la industria en el planeta, el de transporte es el que depende en mayor grado de los combustibles derivados del petróleo. Este sector es responsable del 60% del consumo mundial de petróleo (Balat, 2011). Además, el sector de transporte aporta más del 70% de las emisiones de monóxido de carbono (CO) y 19% de las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) a nivel global (Goldemberg, 2008). Se estima que las emisiones de CO₂ que se generan a partir de un galón de gasolina son alrededor de 8 Kg (Balat & Balat, 2009). En el año 2007, alrededor del mundo transitaron cerca de 806 millones de automóviles y camiones ligeros (Plunkett, 2008). Hoy en día, se han realizado proyecciones que estiman que para el año 2030 estos números se acercarán a los 1.3 billones de vehículos y para el año 2050 habrá más de 2 billones de vehículos transitando por el planeta (fuente: (Balat, 2011), quien cita a (WBCSD, 2004)). Este crecimiento afectará la estabilidad de los ecosistemas, el clima y las reservas de combustibles fósiles a lo largo y ancho de todo el globo terráqueo. El incremento dramático en el precio del petróleo, la naturaleza finita de los combustibles fósiles, el interés creciente y la conciencia sobre el tema del impacto ambiental, especialmente relacionado con las emisiones de gases que generan el efecto invernadero (GHG emissions), y una serie de consideraciones sobre seguridad y salud, están haciendo necesaria la búsqueda de nuevas formas de energía y rutas alternativas para continuar con la capacidad de seguir impulsando los vehículos motorizados del planeta (Balat, 2011).

Un combustible alternativo debe ser técnicamente factible, económicamente competitivo, ambientalmente aceptable y debe contar una rápida disponibilidad (Meher et al., 2006). Con el paso de los años, se han propuesto diferentes combustibles alternativos a los combustibles fósiles, como bioetanol, biodiesel, metanol, butanol, hidrógeno, boro, gas natural, gas licuado de petróleo (LPG), combustible Fischer-Tropsch, combustibles de la serie-p, electricidad y combustibles solares (Balat, 2011). De estos, los biocombustibles como el bioetanol ofrecen una serie de ventajas sobre las

demás alternativas, sin embargo, actualmente se siguen presentando dificultades para implementar la producción de bioetanol proveniente de una fuente de biomasa que no compita con los alimentos, tal es el caso de la biomasa lignocelulósica.

Uno de los principales problemas que se presentan durante la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos, es la dificultad para acceder a las regiones altamente organizadas de la celulosa, de modo que resulta necesario provocar un desorden molecular de las regiones cristalinas de este polímero, permitiendo que las cadenas glucosídicas que se encuentran en la celulosa queden expuestas, proceso que se conoce como amorfogénesis (Arantes & Saddler, 2010).

HIPÓTESIS

La proteína ScEx1 de *Schizophyllum commune* presenta actividad amorfogénica y mejora la hidrólisis de celulosa cristalina.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de una expansina de origen fúngica sobre celulosa cristalina

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Clonar y expresar la proteína ScExlx1 en *P. pastoris*
2. Evaluar la actividad amorfogénica de la proteína sobre fibras de algodón mediante microscopía
3. Evaluar el perfil de unión de ScExlx1 a polisacáridos
4. Evaluar el incremento en la liberación de azúcares reductores sobre fibras de algodón usando como pretratamiento a la proteína ScExlx1
5. Evaluar el incremento en la liberación de azúcares reductores sobre fibras de algodón usando mezclas de expansina y celulasas
6. Evaluar la disminución de la cristalinidad sobre la celulosa tratada con ScExlx1 mediante ATR-FTIR

MATERIAL Y MÉTODO

Cepas y condiciones de cultivo

En este trabajo, se utilizó una cepa del hongo *Schizophyllum commune* RVAN10 aislado de la región noreste del estado de Nuevo León. Para el almacenamiento y propagación de la cepa se utilizaron placas de agar con medio YPD (Yeast extract-peptone-dextrose). *S. commune* fue incubado (por 6 días a 28°C) en medio mínimo mineral (Quiroz-Castañeda et al., 2011) y suplementado con paja de trigo al 2% como única fuente de carbono.

Escherichia coli DH5- α fue usada para la construcción y propagación de plásmidos recombinantes, incubando cada transformante en medio LB (Luria-Bertani) suplementado con el antibiótico apropiado según fuera el caso (ampicilina 100 μ g/ml para pJET-ScExlx1; zeocina 25 μ g/ml para pPicZ α A-ScExlx1) a 37°C por 24 h. Para la expresión heteróloga de ScExlx1 en *Pichia pastoris*, todos los medios y protocolos se describen en el manual de expresión de *Pichia* (Invitrogen, #Cat. K1740-01).

Análisis de secuencia: alineamiento, filogenia y modelado

Las secuencias fueron alineadas con MUSCLE, a través del software Geneious (Version 7.1.5. Biomatters, Ltd.) usando los parámetros por default. Los sitios de glicosilación N y O, puentes disulfuro y la presencia de péptido señal, se analizaron con los servidores Hirst (Hamby & Hirst, 2008), DiANNA 1.1 (Ferrè & Clote, 2005) y SignalP 4.1 (Petersen et al., 2011), respectivamente.

Se prepararon cladogramas de los árboles filogenéticos para describir las relaciones de la expansina derivada del análisis genómico de *S. commune* con otras proteínas expansinas y tipo-expansinas. Para la reconstrucción filogenética, se seleccionaron secuencias previamente caracterizadas/anotadas en el NCBI como proteínas expansinas o expansin-like: 5 secuencias de bacterias (Georgelis et al., 2014; Kerff et al., 2008; Lee et al., 2010; Olarte-Lozano et al., 2014), cuatro de plantas (Yennawar, et al., 2006) y 5 de hongos (*A. niger*, Asper-EXP (Georgelis et al., 2014)) y otras cuatro secuencias que mostraron los

mejores hits durante el análisis por BLAST usando ScExlx1 como anzuelo. De igual manera, se construyó una visualización radial de la divergencia filogenética con el fin de describir la relación entre las subfamilias EXLX1, EXLX2 y ScExlx1 (en ambas subfamilias, sólo se consideraron expansinas que han sido evaluadas experimentalmente). Adicionalmente, otras expansinas no caracterizadas y la proteína Asper-Exp (Georgelis et al., 2014) fueron consideradas.

Los arboles filogenéticos fueron preparados usando el servidor Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/>), esta plataforma considera varios algoritmos bioinformáticos para construir un árbol filogenético robusto a partir de un set de secuencias (Dereeper et al., 2008; Dereeper, et al., 2010); para la generación de arboles filogenéticos, se utilizó MUSCLE para los alineamientos, Gblocks para el curado automático de los alineamientos (con el fin de eliminar posiciones pobremente alineadas), BioNJ para la construcción del árbol y TreeDyn para las representaciones (Dereeper et al., 2008). El método de Neighbor-Joining (NJ) fue usado para estimar el árbol filogenético; las secuencias alineadas se sometieron a bootstrap con 1000 repeticiones y se utilizó el modelo Jones-Thornton-Taylor (JTT) para estimar las distancias de amino ácidos. Los parámetros usados durante el alineamiento MUSCLE fueron los recomendados por la plataforma Phylogeny.fr (ajustes por default con 16 como numero máximo de iteraciones).

La secuencia de amino ácidos de la expansina ScExlx1 fue sometida al servidor I-TASSER (Zhang & Skolnick, 2013) sin restricciones, con el fin de obtener un modelo tridimensional de la proteína. Una segunda ronda de modelado fue realizada usando el PDB 3D30 como templado. La visualización de los alineamientos estructurales fue obtenida mediante VMD (Visual Molecular Dynamic).

La definición del frente y reverso de la proteína ScExlx1, así como la determinación del potencial electrostático se establecieron tomando como referencia la delimitación de las regiones estructurales definidas para BsExlx1 por Pastor et al. (2014). La visualización de los alineamientos estructurales, la definición de frente y reverso, así como las representaciones de potencial electrostático fueron preparadas en VMD (Visual Molecular Dynamic).

Potencial electrostático de ScExlx1

La definición del frente y el reverso, y la determinación del potencial electrostático de la proteína ScExlx1, se realizaron como se describe por Pastor et al. (2014). La cara frontal de la proteína, corresponde a la superficie de unión a polisacáridos (PBS, por “polysaccharide binding surface”) y contiene además el sitio “activo” de la proteína. El cálculo de la carga neta de la proteína, el D1, el D2, el frente y el reverso, se realizaron a pH 7. El potencial electrostático de ScExlx1 se calculó en el servidor PDB2PQR (Dolinsky, et al., 2004), usando la opción CHARMM para las cargas y un pH 7. La representación de la estructura proteica se realizó con el programa VMD, cargando el archivo pqr, y seleccionando la superficie molecular. El potencial electrostático en la superficie de la proteína se representó con un gradiente de colores que abarcó desde -5e (azul) hasta +5e (rojo) (Pastor et al., 2014).

Clonación y expresión heteróloga de ScExlx1

La extracción de RNA total se realizó por el método de Trizol a partir de cultivos de *S. commune* con 6 días de incubación en medio con paja de trigo. La síntesis de cDNA se llevó a cabo usando el kit “Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit” (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación del cDNA de ScExlx1 se realizó usando primers específicos diseñados a partir del genoma de *S. commune* H4-8 (<http://genome.jgi.doe.gov>; protein ID: 2642684): primer forward ScExlx1F (5'-ggtaccgtccaccacaccaccgcgaa-3') y primer reverse ScExlx1R (5'-tctagaccgaactgcgaccgccctcg-3'). En ambos primers, se añadieron sitios de restricción reconocidos por *KpnI* (Forward) y *XbaI* (Reverse) (secuencias subrayadas). El fragmento de PCR de 654 pb fue purificado y clonado en el vector pJET (Thermo Scientific), resultando en pJET-ScExlx1. El cDNA de ScExlx1 fue secuenciado posteriormente, usando los primers del vector pJET.

El fragmento de cDNA de ScExlx1 clonado en el vector pJET fue digerido con *KpnI* y *XbaI*, y purificado con el kit de extracción GeneJET (Thermo Scientific). En paralelo, el vector pPICZαA fue digerido usando las mismas enzimas de restricción, y ScExlx1 fue

ligado en los sitios correspondientes en pPICZ α A en marco con las regiones codificantes para el factor de secreción- α y la cola de Histidinas en C-terminal. pPicZ α A-ScExl1 fue linearizado con la enzima de restricción *SacI* y usado para transformar *P. pastoris* X-33 mediante electroporación. La selección de transformantes se realizó en placas de YPD con zeocina (100 μ g/ml) (Invitrogen). El vector pPICZ α A sin inserto también fue usado para transformar la cepa X-33 y utilizarla como control negativo.

De todas las clonas transformantes, se seleccionaron 10 al azar para evaluar la expresión de proteína recombinante. La expresión de proteína se llevó a cabo mediante la incubación de las clonas en 12.5 ml de BMGY (buffered complex medium containing glycerol) a 28°C en un agitador orbital a 220 rpm por 18 h, y la expresión fue inducida transfiriendo las células a 50 ml de BMMY (buffered complex medium containing methanol) e incubándolas por 72 h. Cada 24 h el medio de cultivo fue suplementado con 0.5 % (v/v) de metanol estéril. Los sobrenadantes fueron analizados mediante SDS-PAGE para determinar las transformantes con los mayores rendimientos de secreción.

Purificación y cuantificación de proteína. SDS-PAGE y Western Blot

Los sobrenadantes de los cultivos fueron concentrados usando unidades de centrifugación concentradoras Vivaspin (Sartorius) con un cut-off de 10 kDa a 7,000 rpm y 4°C. Los sobrenadantes concentrados fueron cargados en una columna de Niquel HisTrap excel (GE Healthcare) conectada a una bomba peristáltica y previamente equilibrada con buffer de fosfatos (20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol, 0.5 M NaCl pH 7.4). Las fracciones analizadas por SDS-PAGE y western blot fueron mezcladas y dializadas usando unidades de centrifugación Vivaspin acopladas a tazas de diafiltración (Sartorius) y buffer de acetatos (50 mM pH 5).

La concentración de proteína total de los sobrenadantes crudos o las fracciones purificadas fue determinada mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), usando Albumina de suero bovino (BSA) como estándar de calibración. La estimación de masa molecular de ScExl1 fue realizada cargando 5 μ g de proteína en un gel de poliacrilamida al 12 %. Las bandas de proteínas fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie Blue R-250. El marcador de peso molecular PageRuler Plus Pre-

stained Protein Ladder (Thermo Scientific) fue usado para la estimación de masa molecular.

Para el análisis por western blot, ScExlx1 fue corrida en un gel de SDS-PAGE al 12 % y transferida a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) usando un sistema de transferencia húmedo (Bio-Rad). Después de la transferencia, la membrana fue lavada tres veces con buffer de fosfatos adicionado con Tween 20 al 0.1% (PBST) pH 8. La membrana fue bloqueada con PBST y leche descremada (3 %) por 20 min y lavada con PBST. Los anticuerpos c-Myc (9E10) (Santa Cruz Biotechnology) y anti-His (Roche) fueron usados para la inmunodetección (dilución 1:5000) y la señal fue visualizada usando un conjugado de fosfatasa alcalina anti-ratón (Sigma) (dilución 1:10000) incubando 30 min en PBST y leche descremada. La membrana fue lavada tres veces con PBST y se agregó 1 ml de Fast Red TR/Naphtol AS-MX (Sigma) para la detección de fosfatasa alcalina.

La desglicosilación fue realizada usando PNGasa F (New England BioLabs) con el fin de remover los N-glicanos en ScExlx1, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tratamiento de algodón y avicel con ScExlx1

Las fibras de algodón farmacéutico fueron mercerizadas como se describe por (Saloheimo et al., 2002); se incubó 1 mg de fibras de algodón en NaOH al 25% por 15 min a 4°C y después las fibras fueron lavadas con agua destilada hasta alcanzar un pH cercano a la neutralidad. Posteriormente, las fibras de algodón fueron suspendidas en buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5, con 20 µg de ScExlx1. Después de la incubación por 72 h a 25°C se analizó la cantidad de azúcares reductores en el sobrenadante mediante la técnica de DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico), como se describe por (Quiroz-Castañeda et al., 2009). Por otro lado, las fibras fueron lavadas con buffer de acetatos, sonicadas por 1 min y visualizadas por microscopía de campo claro. El avicel PH-101 (Fluka) fue tratado usando 20 µg de ScExlx1 en 1 ml de acetato de sodio e incubado como se mencionó anteriormente. Después de la incubación, los microtubos fueron centrifugados a 13,000 rpm por 5 min y lavados tres veces con buffer de acetatos. Posteriormente, el avicel fue visualizado por microscopía de campo claro. Como

tratamientos control para los experimentos con fibras de algodón y avicel, se utilizaron buffer de acetatos o proteínas del sobrenadante de la cepa de *P. pastoris* transformada con el vector vacío. Para cada experimento se realizaron triplicados.

Efecto de sales en la unión de ScExlx1 a polisacáridos

El perfil de unión a polisacáridos de ScExlx1 se determinó como se describe por Chen et al. 2010 (Chen et al., 2010) con algunas modificaciones. Se incubaron 2.5 mg de Avicel o quitina de camarón con 40 µg de ScExlx1 en buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 7.4, con un rango de concentración de sal de 0 a 500 mM por 15 minutos en agitación. Después de la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente y la proteína no unida se determinó por densitometría con el software Quantity One (Bio-Rad). La cantidad de proteína unida se determinó restando la cantidad de proteína usada para los experimentos menos la cantidad detectada en los sobrenadantes. Para cada experimento se realizaron tres repeticiones.

Análisis por FTIR de avicel y quitina tratados con ScExlx1

Los tratamientos de celulosa y quitina consistieron en incubar 5 mg de cada sustrato con 20 µg/mg de ScExlx1 en 1 ml de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5 a 30°C y 1000 rpm por 2 h. Después de los tratamientos, las muestras fueron centrifugadas 5 min a 5 13000 rpm y los sobrenadantes fueron descartados.

Los espectros ATR-FTIR fueron colectados sobre celulosa y quitina tratadas con ScExlx1 usando un espectrofotómetro FT-IR Nicolet iS10 (Thermo Scientific), equipado con una unidad “ATR Smart Orbit”. Todos los espectros fueron colectados en la región de 600-4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y 64 barridos por muestra. El índice de orden lateral (LOI) propuesto por O'Connor et al. (1958) (O'Connor, DuPre, & McCall, 1958), el índice total de cristalinidad (TCI) establecido por Nelson y O'Connor (Nelson & O'Connor, 1964), y la intensidad de puentes de hidrógeno (HBI) introducido por Nada et al. (2000) (Nada et al., 2000) fueron obtenidos por las relaciones 1429/893 cm^{-1} , 1372/2900 cm^{-1} y 3336/1336 cm^{-1} en el polímero de celulosa. Para la quitina, el índice de cristalinidad fue calculado como se describe por Wu et al. (2005) (Wu, Zivanovic,

Draughon, Conway, & Sams, 2005), obteniendo la relación de las absorbancias 1379/2900 cm^{-1} .

Hidrólisis enzimática

En conjunto con los experimentos de actividad disruptiva de ScExlx1, se realizó un experimento llevado a cabo bajo las mismas condiciones experimentales, más la adición de una mezcla de celulasas de *Trichoderma reesei* (Sigma), con el fin de determinar si el tratamiento con ScExlx1 incrementaba la cantidad de azúcares reductores durante los experimentos. A las fibras de algodón preincubadas con ScExlx1 por 72 h se les añadieron 0.25 U de celulasas y la temperatura se incrementó a 50°C por 3 h. Se tomaron alícuotas de 50 μl a los 0, 5, 10, 20, 40, 60 y 180 minutos. Además de los experimentos celulolíticos con fibras pretratadas con ScExlx1 y adicionadas con celulasas, se realizó un experimento similar, con el objetivo de determinar el efecto de una enzima quitinolítica sobre quitina tratada con ScExlx1. Para lo anterior, se incubaron 5 mg de quitina con ScExlx1 (50 y 100 μg) en buffer de fosfatos pH 7.4 100 mM por 24 h a 25°C. Después de la incubación, se agregó una quitinasa de *Streptomyces griseus* (0.25 U; Sigma) en reacciones de 1 ml y se incubaron por 2 h a 37°C. Las reacciones fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente y se mezclaron 500 μg del sobrenadante con 500 μl de DNS. Las mezclas fueron llevadas a ebullición por 5 min y enfriadas en hielo por 5 min. La cantidad de azúcares reductores liberados fue determinada por el método de DNS usando N-acetil glucosamina (NAG) como estándar de calibración. Como controles se utilizaron buffer de fosfatos pH 7.4 100 mM y albumina de suero bovino (50 μg).

Fuerza de rompimiento sobre papel filtro

La fuerza necesaria para romper papel filtro se determinó como se describe a continuación: se cortaron tiras de papel filtro Whatman No. 3 (10 x 55 mm) y fueron sumergidas en reacciones de 3 ml con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ScExlx1 e incubadas a temperatura ambiente por 1 h. Las mediciones de fuerza para el rompimiento de papel filtro se realizaron en una Máquina Universal (Shimadzu, Modelo AGS-X) con 30 mm de

distancia entre mordazas y una velocidad de cruceta de 1 mm/min. Como controles negativos se usaron buffer de acetato de sodio y BSA, mientras que como control positivo se utilizó urea 8 M. Los experimentos se hicieron por triplicado.

Sinergismo entre celulasas y ScExlx1 sobre avicel

Se determinó si existía sinergismo entre ScExlx1 y una mezcla de celulasas de *T. reesei* en un experimento de 24 h. Un mg de avicel fue incubado con diferentes combinaciones de ScExlx1/celulasas (0.5 U celulasa, 1.5 U celulasa, 20 µg ScExlx1+0.5 U celulasa, 20 µg ScExlx1+1.5 U celulasa, 80 µg ScExlx1+0.5 U celulasa y 80 µg ScExlx1+1.5 U celulasa) en buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5 a 30 °C y 1000 rpm. Durante la reacción, se tomaron alícuotas de 50 µl a los 0, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 12 h y 24 h. La cantidad de azúcares reductores fue cuantificada por la técnica de DNS usando glucosa como estándar de calibración (0.2-2 mg/ml).

Sinergismo entre quitinasas y ScExlx1 sobre quitina

Se determinó si existía sinergismo entre ScExlx1 y una mezcla de quitinasas de *S. griseus* en un experimento de 72 h. Cinco mg de quitina fueron incubados con 100 µg de ScExlx1 (20 µg/mg de quitina) y 0.5 U de quitinasa en buffer de fosfatos 100 mM pH 7.4 a 30°C. Se tomaron alícuotas de 50 µl a los 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h. La cantidad de azúcares reductores se determinó mediante la técnica de DNS usando N-acetil glucosamina como estándar. Para este experimento, se utilizó quitinasa sin ScExlx1 como control.

Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de los datos experimentales, se calcularon las medias aritméticas y las desviaciones estándar. Se aplicaron pruebas de ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Primero, se revisaron las premisas del ANOVA: análisis de homogeneidad de varianza (Hartley-Cochran-Bartlett

test) y distribución normal (Kolmogorov-Smirnov test). Finalmente, se elaboró un análisis post hoc para definir el orden de las diferencias encontradas en los ANOVAS. Para el análisis post hoc, se consideraron las pruebas de Fisher LSD, Tukey HSD y Duncan.

RESULTADOS

Análisis de secuencia de ScExl1

Se realizó una búsqueda en el genoma de *S. commune* H4-8 v3.0 (<http://genome.jgi.doe.gov/Schco3/Schco3.home.html>) para detectar genes de expansinas y proteínas tipo-expansinas usando una secuencia de expansina de *Clavibacter michiganensis* como anzuelo (gi WP_012038166). Solo se encontró una proteína (protein ID: 2642684) de 239 amino ácidos que contenía ambos dominios de las expansinas canónicas (Dominio 1 de amino ácido 20 a 118; Dominio 2 amino ácido 123 a 239). El análisis de la secuencia de nucleótidos (654 pb) de ScExl1 de *S. commune* RVAN10 (No. Acceso GenBank: KP698384) presentó un 97.2% de identidad con la secuencia correspondiente de ScExl1 en *S. commune* H4-8. Las diferencias de amino ácidos entre estas dos secuencias resultaron en 6 cambios en las posiciones: 31 (Ser/Pro), 34 (Asn/Thr), 127 (Val/Ala), 129 (Asp/Tyr), 143 (Asp/Glu) y 225 (Ile/Val). Cuatro de esos cambios aminoacídicos (34, 127, 143 y 225) fueron conservativos, mientras que los cambios en las posiciones 31 y 129 fueron no conservativos (polar sin carga/no polar hidrofóbico; ácido polar/polar sin carga, respectivamente). Cuando se compararon los cambios aminoacídicos globales con otras dos versiones del genoma de *S. commune* (*S. commune* Leonen D v1.0 y Tattone D v1.0, disponibles en <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>), se detectaron 10 cambios aminoacídicos. Los cambios en las posiciones 30 (Thr/Ser), 44 (His/Arg), 170 (Ile/Val), 216 (Ser/Thr) y 221 (Thr/Ser) fueron conservativos; mientras que los cambios restantes fueron: 25 (Met/Thr), no polar hidrofóbico/polar sin carga, 41 (Lys/Gln), polar básico/polar sin carga, 128 y 182 (ambos Asn/Asp) polar sin carga/polar ácido, y 223 (Pro/Ser) no polar hidrofóbico/polar sin carga. Este análisis comparativo entre ScExl1 y las secuencias putativas de expansinas disponibles de *S. commune* no mostraron discrepancias entre los amino ácidos responsables de la unión a polisacáridos ni en el sitio “activo” de la proteína sugerido por Pastor et al. (2014). El análisis por SignalP, detectó la presencia de un péptido señal (señal de corte de Met-1 a Ala-19, score 0.811)

y el análisis por Hirst, detectó un sitio probable de N-glicosilación (Asn-54, score 0.99). No se detectaron sitios de O-glicosilación.

Una característica notable de las expansinas de las plantas de las familias EXPA y EXPB, es que la formación de tres puentes disulfuro en D1 se encuentra altamente conservada (Yennawar et al., 2006). Al igual que en estas proteínas, en ScExlx1 se detectó la presencia de tres sitios susceptibles para la formación de puentes disulfuro en las posiciones 60-86 (score 0.011), 89-107 (score 0.0104) y 110-144 (score 0.0237). Dos de los tres puentes disulfuro se encuentran ubicados en D1, y el tercero entre D1 y D2, indicando una gran similitud entre EXPB1 de *Zea mays* y ScExlx1, que no está presente en BsExlx1 (Kerff et al., 2008; Yennawar et al., 2006).

Por otro lado, un alineamiento que incluyó secuencias de las expansinas: PcEx11 (Olarte-Lozano et al., 2014) y dos expansinas que ya han sido cristalizadas EXPB1 (Yennawar et al., 2006) y BsExlx1 (Kerff et al., 2008) reveló un 29.3/42.6 % de identidad/similitud con ScExlx1, y mostró que 9 de los 10 amino ácidos que forman el surco que potencialmente sirve como sitio de unión a polisacáridos en D1, están estrictamente conservados entre estas proteínas (incluyendo los amino ácidos Thr-12 y Asp-82). Así mismo, los tres residuos aromáticos (Trp-125, Trp-126 y Tyr-157) que forman una superficie plana en BsExlx1, que asemeja al D2 con un CBM (Carbohydrate binding module) tipo A, están sustituidos en ScExlx1 por amino ácidos aromáticos polares/sin carga (equivalentes a Tyr-161, Tyr-162 y Tyr-157). Además, los tres motivos clásicos de las expansinas vegetales (TWYG, GGACG y HFD) están conservados en ScExlx1, presentando ligeras modificaciones (TTYG, GCACS y HLD) (Fig. 8).

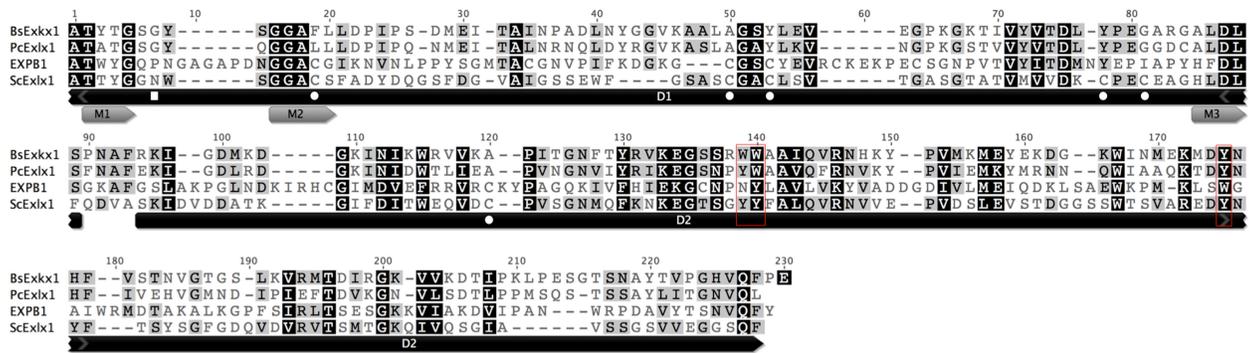


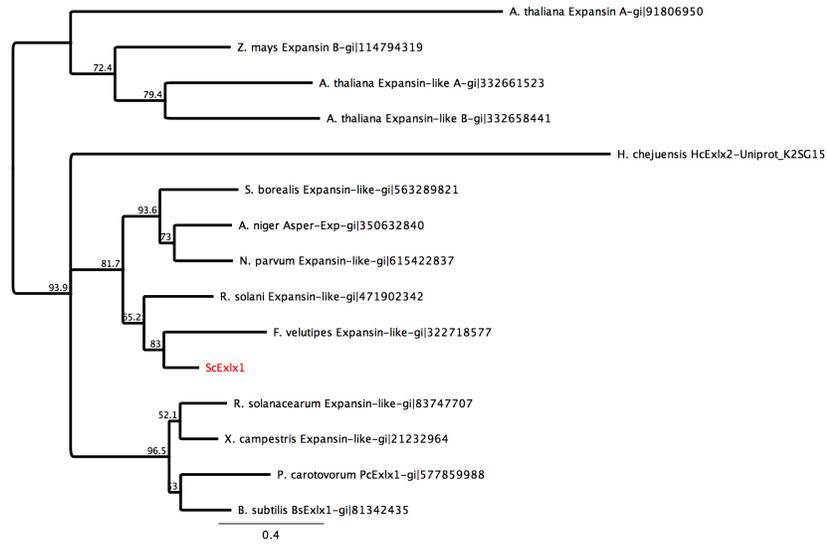
Figura 8. Alineamiento proteico de BsExl1, PcExl1, EXPB1 y ScExl1. Las zonas más oscuras indican alta conservación entre las secuencias. M1, M2 y M3 indican los tres motivos clásicos de las expansinas vegetales. Los amino ácidos en cajas son residuos importantes en la unión y en la actividad en BsExl1. Los cuadros blancos indican sitios blanco de N-glicosilación en ScExl1 y los círculos blancos indican residuos que forman puentes disulfuro.

Con respecto al análisis filogenético, se pueden observar dos grupos en el cladograma (Fig. 9A); uno que agrupa expansinas de plantas (incluyendo miembros de expansinas tipo A, B, expansin-like A y expansin-like B), que fueron usadas para enraizar el árbol, y un segundo cluster que agrupa expansinas previamente caracterizadas (Kerff et al., 2008; Lee et al., 2013; Lee et al., 2010; Olarte-Lozano et al., 2014) y otras proteínas fúngicas anotadas como expansinas en la base de datos del NCBI. El análisis filogenético mostró que ScExl1 se agrupa directamente con otras expansinas fúngicas (Ascomycota y Basidiomycota) y forma un nodo con una expansina del basidiomiceto *Flammulina velutipes* (un hongo endófito) que no ha sido evaluada experimentalmente (Fig. 9A). Además, se observa una segunda sub-rama con las expansinas bacterianas. Es importante notar que la expansina HcExl2, forma un grupo separado, sin mostrar relación filogenética directa con el resto de las expansinas bacterianas.

Por otra parte, se obtuvo una visualización radial para describir las relaciones entre diferentes subfamilias Exlx. Lee et al. (2010) propusieron que las expansinas Exlx se dividían en dos diferentes subfamilias cuando encontraron que HcExl2 no se agrupaba con BsExl1. Con esta observación, ellos definieron una nueva subfamilia de expansinas, denominada Exlx2, pero esta propuesta continúa siendo controversial. La visualización filogenética radial reveló una marcada divergencia filogenética entre ScExl1 con las familias Exlx1 y Exlx2, lo que no resulta sorprendente, dado que ScExl1

es una proteína de origen fúngico y Exlx1 y Exlx2 son expansinas bacterianas. Cabe mencionar, que la única expansina fúngica reportada se agrupa junto con ScExlx1 (Fig. 9B).

A)



B)

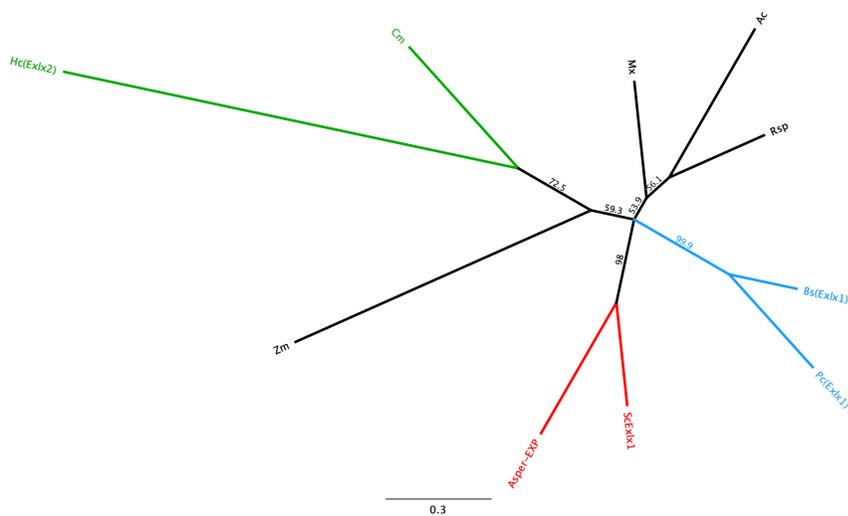


Figura 9. Filogenia de ScExlx1. A) Relación filogenética de ScExlx1 con expansinas y proteínas expansin-like de plantas, bacterias y hongos. Las longitudes de las ramas representan la cantidad de cambios genéticos entre un nodo y sus descendientes. B) Divergencia filogenética entre subfamilias de expansinas. Ac. *Acidovorax citruli* (gi|120612050); Mx. *Myxococcus xanthus* (gi|108762346); Rsp. *Roseiflexus* sp. (gi|148655687); Cm. *Clavibacter michiganensis* (gi|148272660). Hc. *Hahella chejuensis* (Uniprot: K25G15); Pc. *Pectobacterium carotovorum* (gi|577859988); Bs. *Bacillus subtilis* (PDB 3D30). Asper-EXP. *Aspergillus niger* (gi|350632840).

En un primer intento por modelar a ScExlx1, I-TASSER seleccionó como moldes a las expansinas de la base de datos PDB (Protein Data Bank): 3D30 (BsExlx1 de *Bacillus subtilis*), 2HCZ (EXPA de *Zea mays*), y 4JCW (Exlx de *Clavibacter michiganensis*). El modelo tridimensional obtenido, comenzando en Arg-20 (el péptido señal fue removido antes del modelado) arrojó un TM-score de 0.73 ± 0.10 y un C-score de 0.14. En esta primera ronda, el PDB 3D30 fue identificado por I-TASSER como el mejor molde. Con el fin de obtener un modelo tridimensional más preciso, sometimos una segunda ronda de modelado usando como molde el PDB 3D30 para obtener un modelo definitivo (Fig. 10A) con TM-score de 0.8 ± 0.10 y C-score de 0.49. Estos valores respaldan la alta confianza en la calidad del modelo obtenido, y además sugieren que ScExlx1 podría presentar actividad expansina.

Cuando se comparó el número de residuos con carga positiva (Arg+Lys) en ScExlx1 con BsExlx1, encontramos una diferencia marcada (Fig. 10C). La figura 10B muestra los residuos con carga positiva en las expansinas previamente cristalizadas: BsExlx1 (27), EXPB (26), Clavibacter Exlx (19). ScExlx1 presentó 13 residuos con carga positiva, incluso menos que PcExlx1 (16). Esta característica soporta las propiedades acídicas de ScExlx1 (pI 4.6).

Se realizó un alineamiento estructural entre los modelos de BsExlx1 (PDB 3D30) y ScExlx1 (Fig. 10C). El alineamiento reveló una diferencia importante en la región N-terminal de ambas proteínas, ya que ScExlx1 presentó una inserción de 37 amino ácidos que esta ausente en BsExlx1. La función de esta inserción no se conoce aún en las expansinas, pero ha sido observada en expansinas de plantas (Yennawar et al., 2006) y hongos (Asper-Exp) (Georgelis et al., 2014). Esta extensión en la región N-terminal de ScExlx1 y Asper-Exp sugiere una diferencia estructural entre las expansinas bacterianas, fúngicas y vegetales.

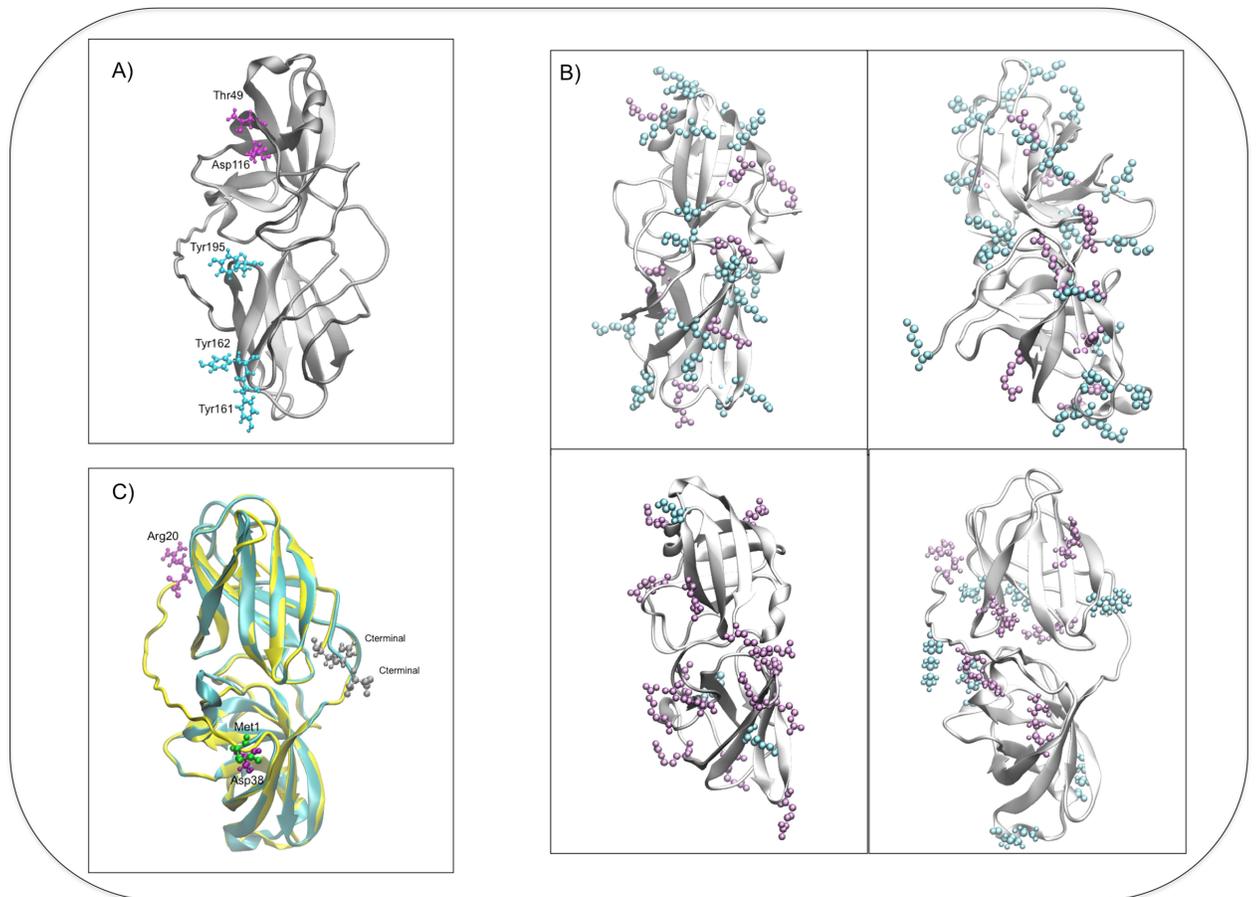


Figura 10. Estructura de ScExl1 y comparación con expansinas previamente cristalizadas. A) Modelo tridimensional de ScExl1. La mayoría de los amino ácidos conservados entre expansinas microbianas y vegetales en D1 se muestran en color magenta (Thr-49 y Asp-116). Los residuos de unión a polisacáridos en D2 se muestran en color cian (Tyr-160, Tyr-161 y Tyr-195). B) Modelos tridimensionales que muestran los amino ácidos con carga positiva (Arg+Lys) entre diferentes proteínas EXLX reportadas previamente y ScExl1 (Lisina-cian/Arginina-magenta). Esquina superior izquierda, PDB: 3D30. Esquina superior derecha, PDB: 2HCZ. Esquina inferior izquierda, PDB: 4JCW. Esquina inferior derecha, ScExl1 C) Alineamiento estructural entre ScExl1 (amarillo) y BsExl1 (cian) donde se observa una extensión en el N-terminal de ScExl1 que esta ausente en BsExl1.

El análisis de cargas y potencial electrostático de la proteína ScExlx1, se resume en la tabla 1 y la figura 11. La carga neta global de la proteína ácida ScExlx1 (pI 4.6) a pH 7 fue de -15e. Así mismo, el frente (PBS) y el reverso de la proteína presentaron carga negativa, manteniendo una polaridad frente-reverso de +1.

Tabla 1. Análisis de distribución de cargas de la proteína ScExlx1.

	Proteína	D1	D2	Frente	Atrás
Total de cargas	33	17	16	19	14
Cargas positivas	9	3	6	6	3
Cargas negativas	24	14	10	13	11
Carga neta	-15	-11	-4	-7	-8

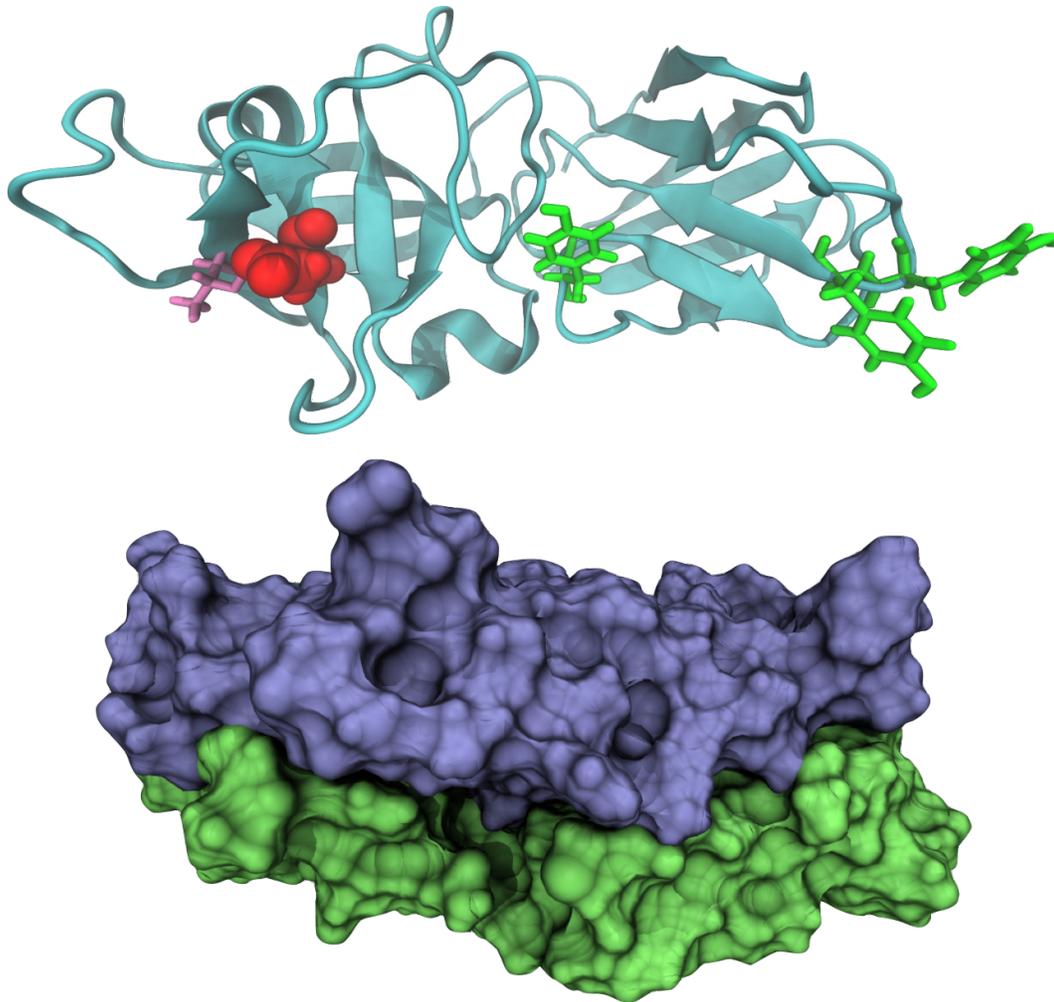


Figura 11. Definición del frente y reverso de ScExl1. La imagen superior muestra el modelo estructural de la proteína ScExl1, resaltando a los principales aminoácidos involucrados en la unión a polisacáridos en color verde, mientras que el aminoácido “catalítico” equivalente a Asp82 en BsExl1 está representado en color rojo. La treonina equivalente a Thr12 en BsExl1 esta representada en color morado. La imagen inferior muestra la definición del frente y reverso de ScExl1. La región morada corresponde a la cara donde se encuentra el PBS (la cara que interacciona con el sustrato) y el reverso de la proteína se representa en color verde. Los aminoácidos que forman parte del frente de la proteína son: 25-64, 80-99, 102-115, 132-149, 170-182, 207-211. Los aminoácidos que conforman el reverso de la proteína son: 24, 65-79, 100, 101, 116-131, 150-169, 183-206, 212-218.

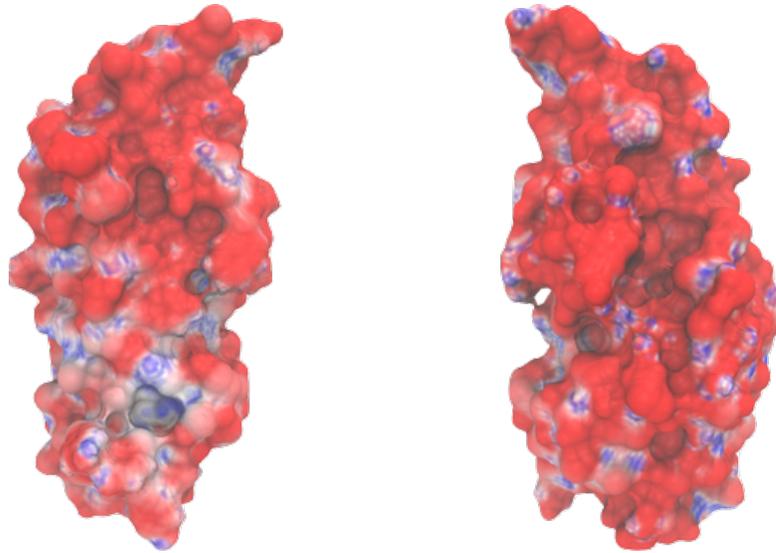


Figura 12. Distribución de cargas en ScExlx1. El potencial electrostático está representado en la superficie de la proteína (de rojo a azul, -5 kT/e a + 5kT/e). La región frontal de ScExlx1 (izquierda) presentó una carga neta de $-7e$, mientras que el reverso de la proteína presentó una carga neta de $-8e$. ScExlx1 presentó una polarización de $+1$, un nivel bajo comparado con otras expansinas microbianas.

Producción de ScExlx1 recombinante

El producto génico de ScExlx1 fue clonado en marco con las secuencias codificantes para el factor de secreción alfa de levaduras y una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal de la proteína. El gen recombinante fue expresado mediante el promotor AOX inducible con metanol de *P. pastoris*. La proteína fue purificada y la detección se realizó mediante SDS-PAGE, en donde se observó la presencia de tres bandas proteicas con masas moleculares de ~ 24 , ~ 28 (tamaño esperado) y ~ 30 kDa (Fig. 13A). La confirmación de que las tres bandas correspondían a ScExlx1 se realizó mediante western blot, detectando la presencia del epítipo *myc* y la etiqueta de histidinas en la proteína recombinante (Fig. 13B).

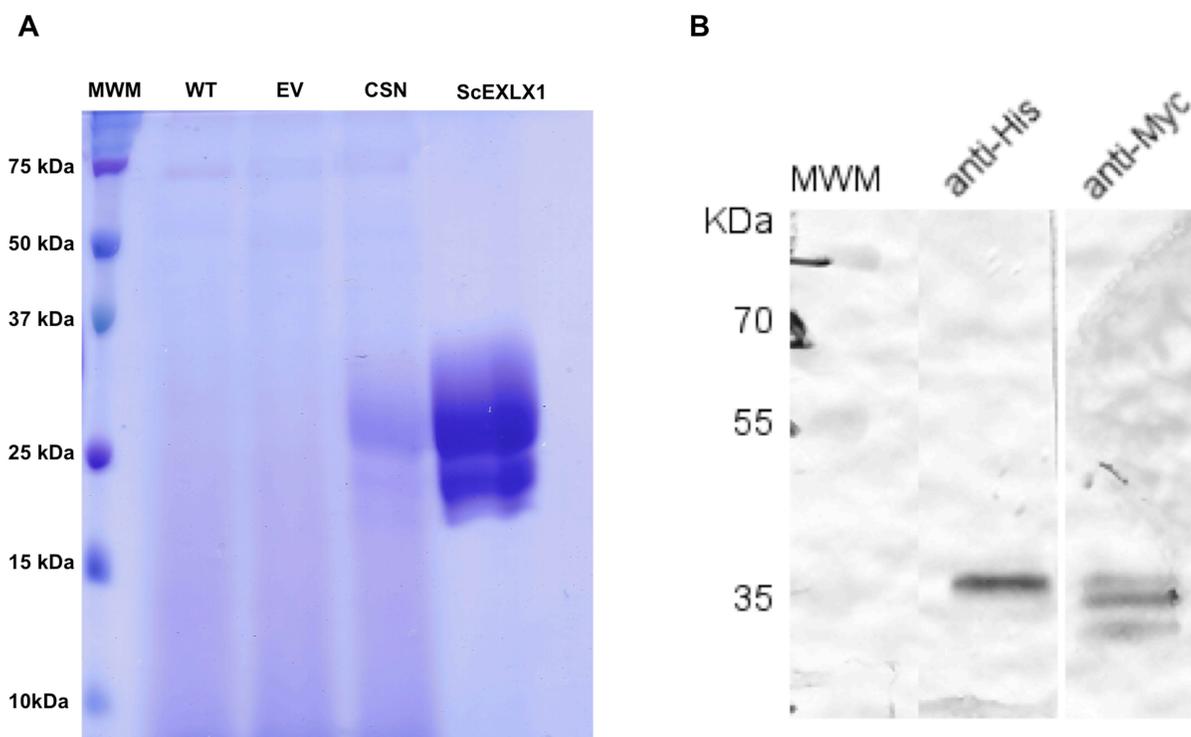


Figura 13. Purificación y análisis por western blot de la proteína ScExlx1 recombinante. A) SDS-PAGE de las cepas control y recombinantes. Sobrenadantes de la cepa silvestre de *P. pastoris* X-33 (WT). Sobrenadante de la cepa *P. pastoris* X-33 transformada con el vector pPICZ α A vacío (EV). Sobrenadante de la cepa *P. pastoris* transformada con pPICZ α A-ScExlx1 (CSN). ScExlx1 Purificada. B) Análisis por western blot de ScExlx1.

Efecto de ScExlx1 sobre fibras de algodón y avicel

Se evaluó el efecto de ScExlx1 sobre fibras de algodón mercerizado y avicel, considerando que expansinas y proteínas expansin-like de diferentes fuentes han demostrado ser activas sobre celulosa (Georgelis et al., 2014; Kerff et al., 2008; Olarte-Lozano et al., 2014). Las fibras tratadas con buffer o con el sobrenadante de la cepa transformada con el vector vacío (“mock”), no mostraron cambios visuales cuando fueron observados por microscopía de campo claro, mientras que las fibras incubadas con ScExlx1 presentaron un efecto “burbuja” similar al reportado por trabajos previos (Saloheimo et al., 2002; Quiroz-Castañeda et al., 2011) cuando se trataron fibras de algodón con proteínas expansin-like (Fig. 14A y 14B). Además cuando el avicel se incubó con ScExlx1, se observó una reducción en el tamaño de partícula cuando se

comparó con los tratamientos control (Fig. 14C y 14D). Estos resultados confirman que ScExlx1 es una proteína funcional y es activa sobre celulosa cristalina.

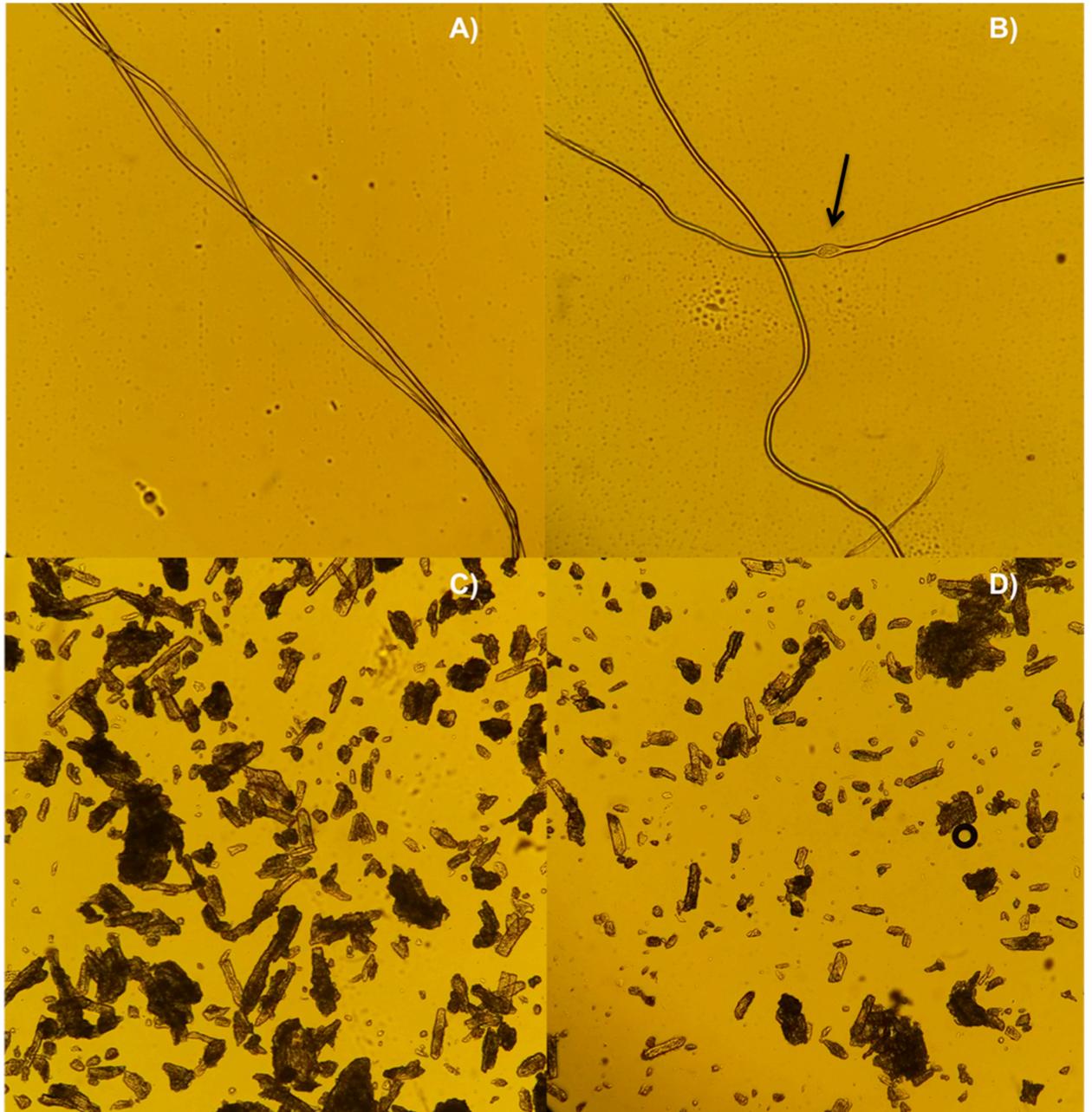


Figura 14. Actividad disruptiva de ScExlx1 sobre fibras de algodón y avicel. Microscopía de campo claro (10X) de fibras de algodón y avicel incubadas con ScExlx1 o proteínas del sobrenadante mock por 72 h a 25°C. A) Efecto de proteínas del sobrenadante mock actuando sobre fibras de algodón. B) Efecto “burbuja” en fibras de algodón generado por ScExlx1. C) Efecto de proteínas del sobrenadante mock sobre avicel. D) Reducción en el tamaño de partícula de avicel mediado por ScExlx1.

Actividad de ScExlx1 sobre papel filtro

Se ha demostrado que las expansinas de bacterias y hongos son capaces de debilitar papel filtro con diferentes grosores (Georgelis et al., 2014; Georgelis, Tabuchi, Nikolaidis, & Cosgrove, 2011; Lee et al., 2010; Olarte-Lozano et al., 2014). Esta propiedad se basa en la premisa de que las expansinas pueden debilitar la red de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares que estabilizan a las fibras de celulosa. Como se ha reportado para otras expansinas, ScExlx1 fue capaz de disminuir la fuerza necesaria para romper papel filtro, incluso cuando se usó a concentraciones de 40 $\mu\text{g/ml}$, dos veces menos la cantidad de expansina usada en otros trabajos (Fig. 15) (Georgelis et al., 2014, 2011; Olarte-Lozano et al., 2014). La tabla 2, muestra una comparativa de los resultados obtenidos para el experimento de rompimiento de papel filtro con expansinas microbianas y la cantidad de expansina usada en cada experimento.

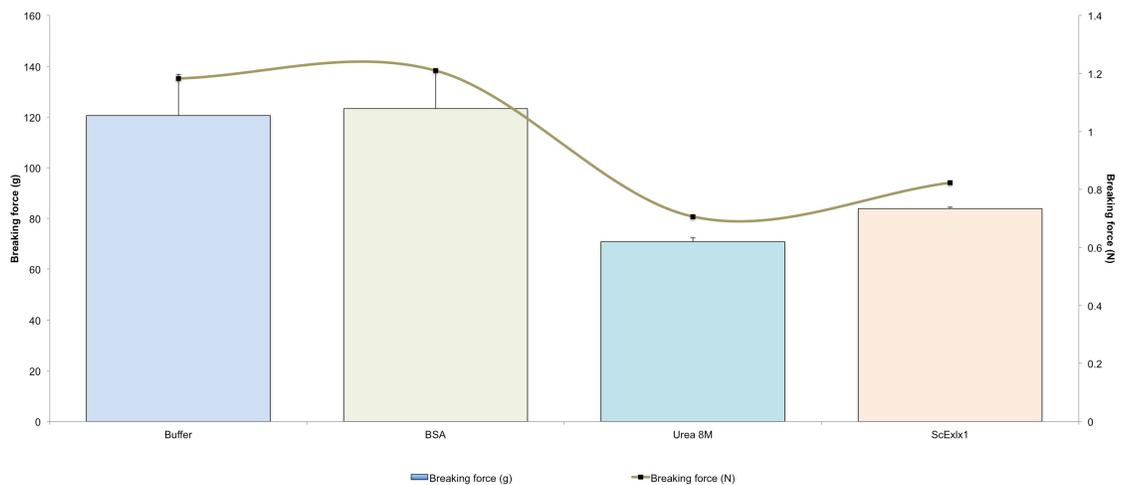


Figura 15. Prueba de debilitamiento de papel filtro. Como controles negativos se utilizaron BSA y buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5. Como control positivo se utilizó Urea 8 M. La proteína ScExlx1 es capaz de disminuir la cantidad de fuerza necesaria para romper las tiras de papel filtro.

Tabla 2. Expansinas evaluadas por diferentes autores en la prueba de rompimiento de papel filtro.

ScExlx1 es una de las expansinas mas activas sobre papel filtro, incluso cuando es usada en concentraciones bajas.

Expansina	Organismo	Reducción en la fuerza	Papel filtro No.	Tiempo de incubación	Cantidad de expansina	Referencia
PcExlx1	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	20%	1	1 h	120 µg/ml	Olearte et al., 2014
BsExlx1	<i>Bacillus subtilis</i>	20%	3	4 h	120 µg/ml	Georgelis et al., 2011
Xantho-EXP	<i>Xanthomonas campestris</i>	~24.5%	3	4 h	120 µg/ml	Georgelis et al., 2013
Ralstonia-EXP	<i>Ralstonia solanacearum</i>	~21%	3	4 h	120 µg/ml	Georgelis et al., 2013
Clavi-EXP	<i>Clavibacter michiganensis</i>	~17%	3	4 h	120 µg/ml	Georgelis et al., 2013
Asper-EXP	<i>Aspergillus niger</i>	~34%	3	4 h	120 µg/ml	Georgelis et al., 2013
CclExlx1	<i>Clostridium clariflavum</i>	44%	3	1 h	600 µg /ml	Artzi et al., 2016
ScExlx1	<i>Schizophyllum commune</i>	30.5%	3	1 h	40 µg/ml	Tovar et al., 2015

Unión de ScExlx1 a polisacáridos

Recientemente se han evaluado las capacidades de unión y el efecto de sales en la unión de expansinas bacterianas a diferentes polisacáridos (avicel, xilano y peptidoglicano) (Kerff et al., 2008; Olarte-Lozano et al., 2014). Tras este antecedente, se evaluaron las capacidades de unión de ScExlx1 a avicel y xilano usando diferentes concentraciones de sal, y además, se incluyó quitina en los experimentos de unión, dado que algunas proteínas tipo-expansinas han sido capaces de unirse a este polímero (Chen et al., 2010; Quiroz-Castañeda et al., 2011).

ScExlx1 fue capaz de unirse a avicel, xilano y quitina. Sin embargo, al aumentar la concentración de sal usada en los experimentos no se detectaron diferencias en la capacidad de unión a celulosa bajo las condiciones usadas en este trabajo (Fig. 16A y Tabla 3), un comportamiento distinto al reportado para las expansinas bacterianas de *Pectobacterium carotovorum* (PcExlx1) y *Bacillus subtilis* (BsExlx1) (Kerff et al., 2008;

Olarte-Lozano et al., 2014). De manera similar, la unión de ScExlx1 a quitina no fue afectada de manera significativa cuando se usaron mayores concentraciones de sal durante los experimentos (Fig. 16B).

A pesar de la evidencia previa de que la sal puede afectar hasta en un 90% la capacidad de BsExlx1 a xilano (Georgelis et al., 2011), no se observó un efecto aparente conforme se adicionaron mayores concentraciones de sal cuando se analizó la unión a este polisacárido (Fig. 16C).

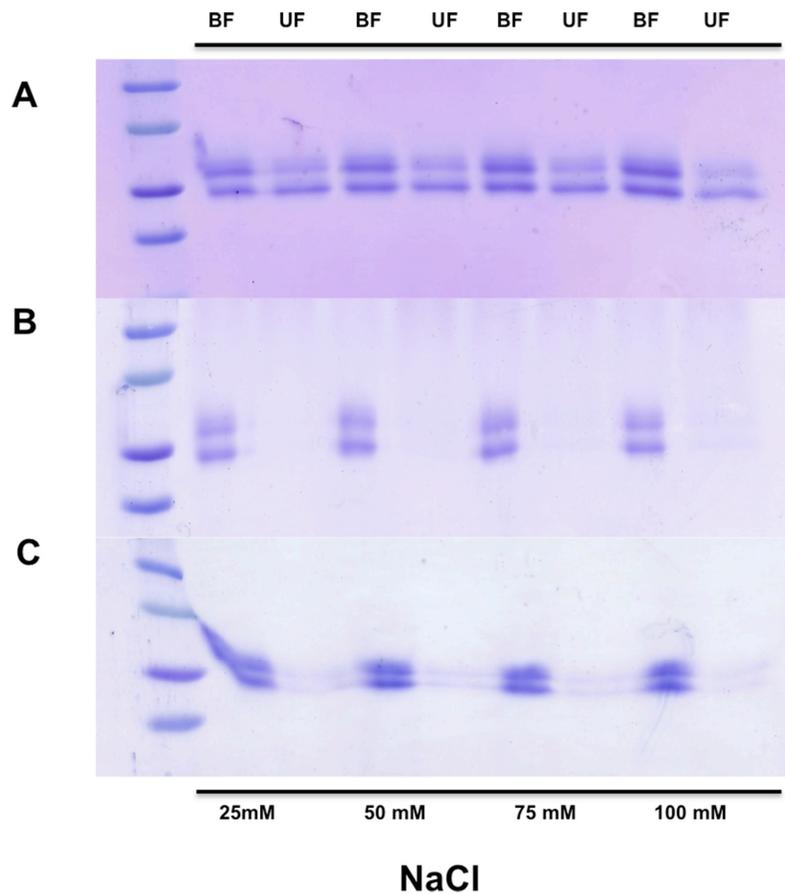


Figura 16. Efecto de la adición de NaCl sobre la unión de ScExlx1 a polisacáridos de la pared celular vegetal y quitina. Efecto de NaCl sobre la unión a: A) avicel; B) quitina; C) xilano. BF=fracción unida; UF=fracción no unida.

Tabla 3. Unión de ScExlx1 a celulosa y quitina a usando diferentes concentraciones de sal.

Proteína unida		
NaCl (mM)	Avicel	Quitina
0	33.07 ± 0.59 ^a	29.62 ± 1.20 ^a
100	33.60 ± 0.25 ^a	31.36 ± 0.80 ^{a,b}
200	35.15 ± 0.99 ^{a,b}	32.96 ± 2.02 ^b
350	35.45 ± 0.08 ^{a,b}	33.72 ± 0.05 ^{b,c}
500	36.78 ± 0.76 ^b	36.41 ± 0.76 ^c

*Diferentes letras indican diferencias significativas.

Análisis de cristalinidad e intensidad de puentes de hidrógeno por ATR-FTIR

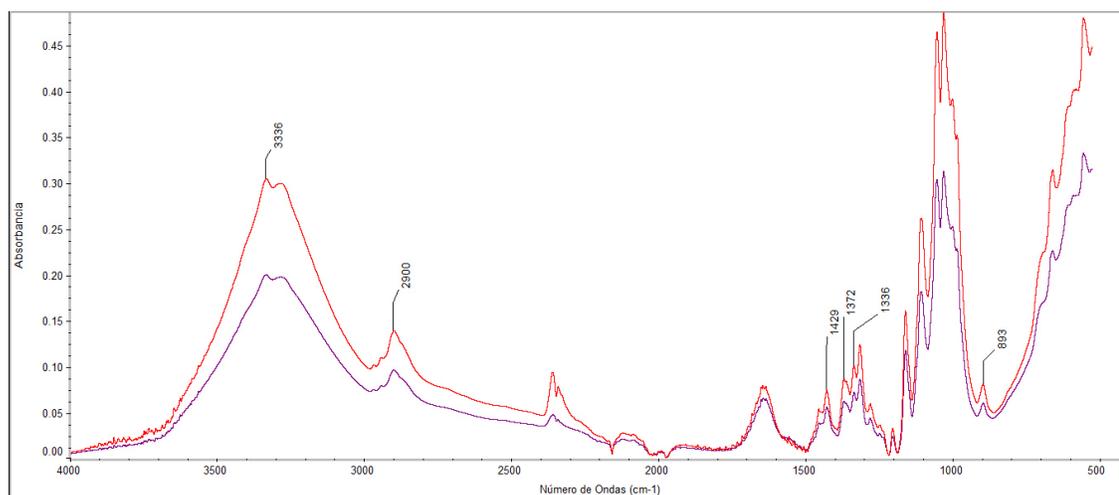
La tabla 4, muestra los valores de LOI, TCI y HBI correspondientes a avicel. Aunque los valores LOI y TCI no presentaron un cambio sustancial, se detectó una pequeña disminución en el valor HBI. Estos resultados indican que ScExlx1 no altera las regiones cristalinas ni amorfas del polímero de celulosa; por lo tanto LOI y TCI no presentaron modificaciones (Fig. 17A).

En el caso de la quitina, las bandas a 3480, 3400, 3270 y 3100 cm^{-1} han sido involucradas en la formación de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares entre los grupos OH-3 y CH₂OH (24). Adicionalmente, la banda a 1415 cm^{-1} ha sido relacionada con la simetría local de los polisacáridos y rearrreglos en los puentes de hidrógeno en las regiones amorfas (24). Nosotros no detectamos ningún cambio en la región 3480-3400 cm^{-1} , y solo detectamos ligeros cambios en las bandas a 3100 y 1425 cm^{-1} (Fig. 17B).

Tabla 4. Índice de cristalinidad e intensidad de puentes de hidrógeno en celulosa y quitina tratadas con ScExlx1.

Polímero	Tratamiento	LOI	TCl	HBI	CI
		(α 1429/893)	(α 1372/2900)	(α 3336/1336)	(α 1379/2900)
Celulosa	Buffer	0.936	0.609	3.030	-
	ScExlx1	0.931	0.625	2.803	-
Quitina	Buffer	-	-	-	1.082
	ScExlx1	-	-	-	1.388

A)



B)

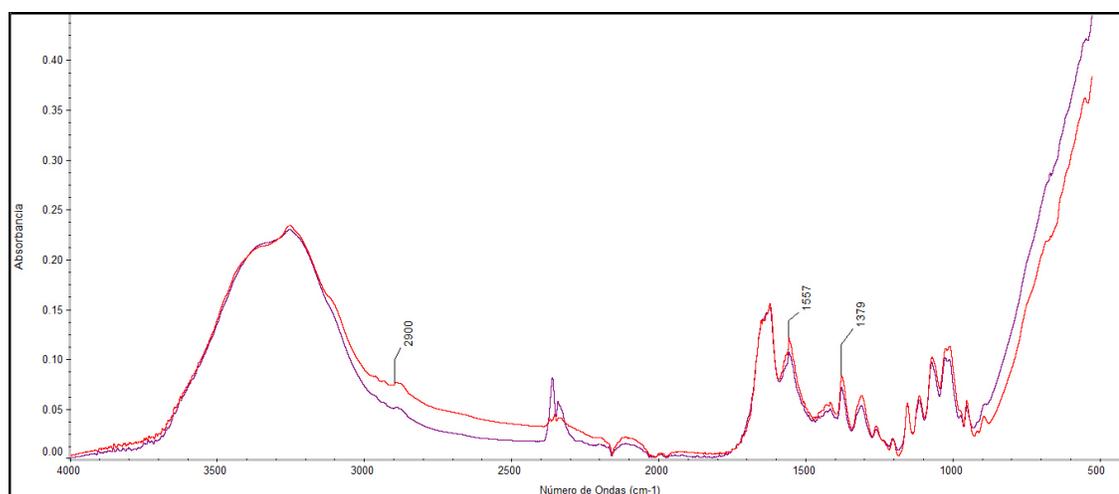


Figura 1. Cambios estructurales generados en avicel y quitina de camarón tratados con ScExlx1. Los experimentos se realizaron usando 5 mg de cada sustrato con 20 μ g/mg de ScExlx1 en 1 ml de buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5 a 30°C y 1000 rpm por 2 h. A) Espectro infrarrojo de avicel tratado con ScExlx1 (morado) y buffer de acetato de sodio (rojo). B) Espectro infrarrojo de quitina tratada con ScExlx1 (morado) y buffer de acetato de sodio (rojo).

Hidrólisis enzimática

ScExlx1 y actividad celulasa

Una de las características más importantes a determinar en este trabajo de ScExlx1 fue determinar si ScExlx1 ocasionaba un incremento en la actividad celulolítica cuando se usaba en conjunto con una mezcla de celulasas de *T. reesei*. Se produjeron un total de 6.9 μ moles de glucosa cuando las reacciones de hidrólisis de celulosa se llevaron a cabo con las fibras de algodón pretratadas con ScExlx1, mientras que en los controles no pretratados se liberaron 5.6 μ moles en un experimento de 3 h (Fig. 18). Cuando el experimento se realizó por 48 h se observó el mismo comportamiento, dado que se produjeron 11.1 μ moles de glucosa a partir de las fibras pretratadas con ScExlx1, mientras que en el control no pretratado se liberaron solamente 8.9 μ moles (Fig. 19). Cuando las fibras de algodón se incubaron solamente con ScExlx1, no se detectaron azúcares reductores en el sobrenadante.

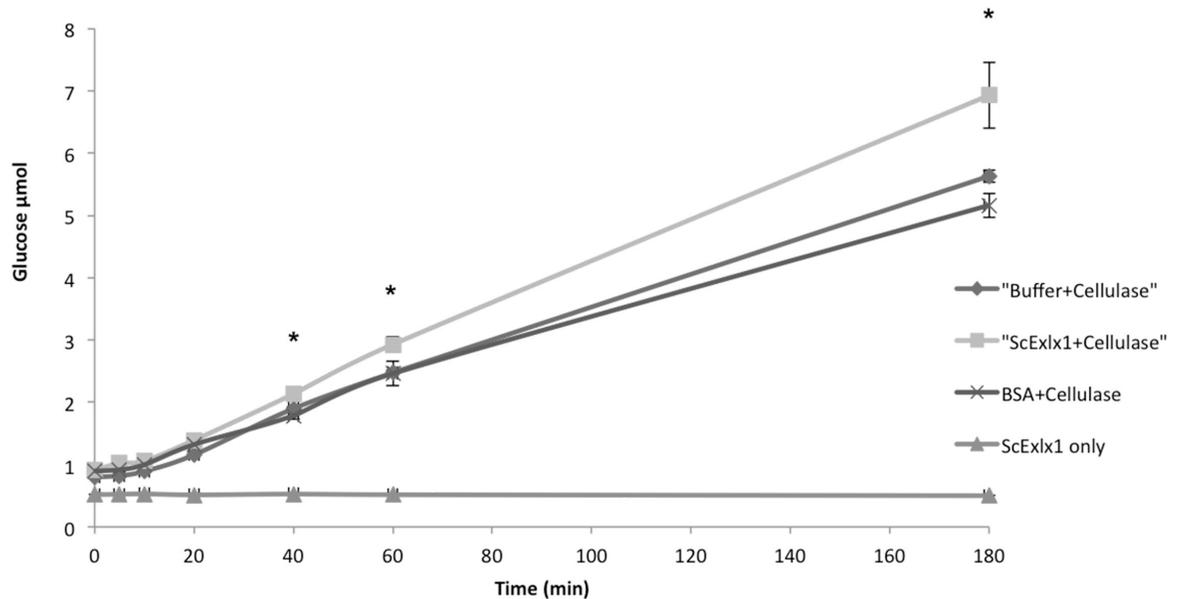


Figura 2. Efecto de ScExlx1 sobre la hidrólisis enzimática de celulosa. Las fibras de algodón mercerizadas (1 mg) fueron incubadas con 20 μ g de ScExlx1, 20 μ g de BSA o buffer de acetato de sodio (pH 5) por 72 h a 25°C. Después de la incubación, la temperatura fue elevada a 50°C y a cada reacción se

le agregó una mezcla de celulasas de *T. reesei* (0.25 U) en un experimento de 3 h. Los azúcares reductores fueron cuantificados por el método de DNS y se compararon con una curva de glucosa. Los experimentos fueron realizados por triplicado y las barras indican desviaciones estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p < 0.05$) en cada punto.

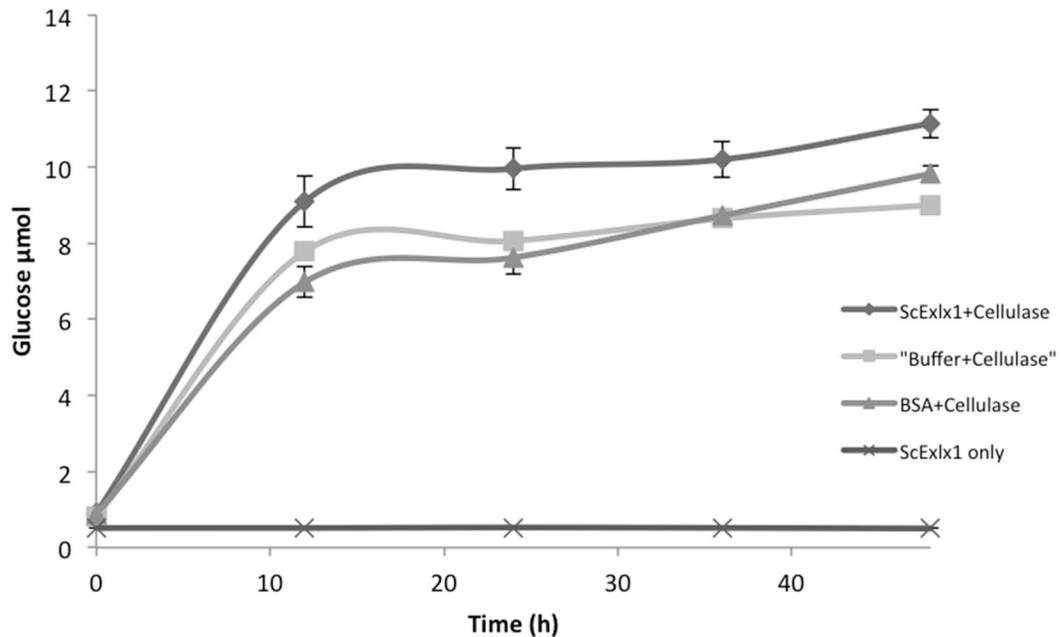


Figura 3. Efecto de ScExl1 en la hidrólisis enzimática de celulosa en un experimento de 48 h. Las fibras de algodón mercerizado (1 mg) fueron incubadas con 20 μg de ScExl1, 20 μg de BSA o buffer de acetato de sodio (pH 5) por 72 h a 25°C. Después de la incubación, la temperatura fue elevada a 50°C y se agregó una mezcla de celulasas de *T. reesei* (0.25 U). Las reacciones fueron incubadas por 48 h y se determinaron los azúcares reductores liberados como se describió previamente.

Sinergismo entre celulasas y ScExl1

Se evaluaron diferentes condiciones experimentales para determinar si la combinación de una expansina de origen fúngico y una mezcla de celulasas exhibían un comportamiento sinérgico. Antes de las primeras 2 horas del experimento no se detectaron diferencias importantes entre los diferentes tratamientos. Sin embargo, a partir de la segunda hora, se detectó un incremento significativo (37% más) en la cantidad de glucosa liberada a partir de avicel en el tratamiento C0.5+E20, cuando se

comparó con el tratamiento C0.5 (Fig. 20). Esta diferencia se mantuvo durante todo el experimento. Así mismo, se produjeron cantidades similares de glucosa en los tratamientos C1.5 y C0.5+E20 a las 4 y 24 h, lo que sugiere que el uso de ScExl1 podría reducir la cantidad de celulasa necesaria cuando se pretende llevar a cabo procesos de sacarificación. Por otro lado, no se encontró diferencia estadística entre los tratamientos C1.5+E20 y C1.5+E80 en ninguno de los puntos evaluados, indicando que el efecto de la expansina podría no ser dosis dependiente.

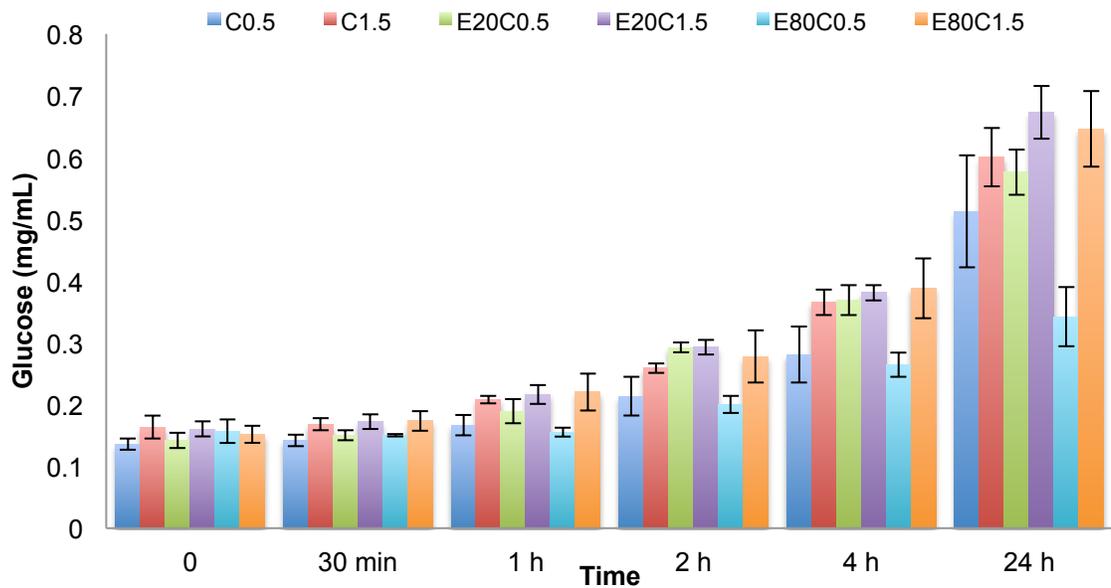


Figura 20. Actividad sinérgica entre ScExl1 y celulasas a 30°C. Un miligramo de avicel fue incubado con diferentes combinaciones de ScExl1/celulasas (0.5 U celulasa, 1.5 U celulasa, 20 µg ScExl1+0.5 U celulasa, 20 µg ScExl1+1.5 U celulasa, 80 µg ScExl1+0.5 U celulasa y 80 µg ScExl1+1.5 U celulasa) en buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5 a 30 °C y 1000 rpm.

ScExl1 y actividad quitinasa

Diferentes proteínas expansin-like han mostrado capacidades de unión a quitina (Chen et al., 2010; Quiroz-Castañeda et al., 2011). Sin embargo, resulta interesante que no existen reportes sobre el efecto de una expansina o una proteína expansin-like sobre el polímero de quitina. Por esta razón, se realizó un pretratamiento de quitina con ScExl1 antes de añadir una mezcla de quitinasas de *Streptomyces griseus*. Este experimento resultó en la liberación de dos veces más NAG cuando se hidrolizó la quitina tratada con ScExl1

cuando se comparó con los controles tratados con buffer y BSA (Fig. 21). Al duplicar la cantidad de ScExlx1 (100 μ g) durante el pretratamiento de quitina, la cantidad de NAG liberada incrementó 0.2 veces mas cuando se comparó con la concentración usada de ScExlx1 en el experimento original (50 μ g).

Estos resultados indican que ScExlx1 es capaz de modificar el polímero de quitina, un aspecto interesante dado que la pared celular fúngica está compuesta principalmente por este polisacárido. Probablemente, las expansinas de hongos podrían jugar un rol importante durante la remodelación de pared celular de estos organismos, aunque se necesita más evidencia para verificar la función de las expansinas fúngicas.

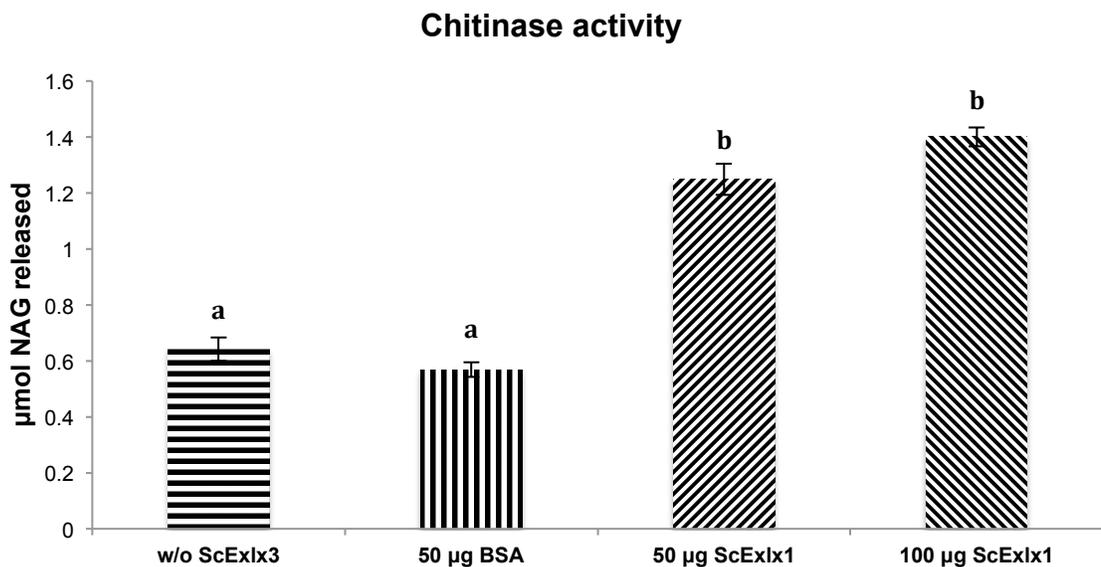


Figura 21. ScExlx1 es una proteína activa sobre quitina que incrementa la hidrólisis de quitina. La quitina de camarón (5 mg) se incubó con 50 y 100 μ g de ScExlx1, 50 μ g de BSA, o buffer de fosfato de sodio 100 mM pH 7 por 24 a 25°C. Después de la incubación, la temperatura se incrementó a 37°C y se agregó una quitinasa de *S. griseus* (0.25 U). Después de 2 horas de incubación, se determinó la cantidad de N-acetil glucosamina liberada mediante el método de DNS. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Las barras indican la desviación estándar y cada letra indica diferencia estadística en los tratamientos $p(>0.05)$.

Sinergismo entre quitinasas y ScExlx1

Se investigó el efecto en la hidrólisis enzimática de quitina al combinar una quitinasa y ScExlx1. En general, se observó un comportamiento sinérgico de la mezcla ScExlx1/quitinasa después de 48 y 72 h, indicando menores velocidades de reacción que en las mezclas de ScExlx1/celulosa (Fig. 22). Sin embargo, la diferencia entre la reacción de ScExlx1/quitinasa y el tratamiento control fue similar al observado en las reacciones ScExlx1/celulosa (39.4 y 37%, respectivamente). Al final del experimento, se liberaron 7.36 mg/ml de NAG por la combinación ScExlx1/quitinasa, mientras que en el tratamiento control se produjeron 5.28 mg/ml de NAG. Este resultado demuestra el efecto sinérgico de la combinación de una expansina con una quitinasa.

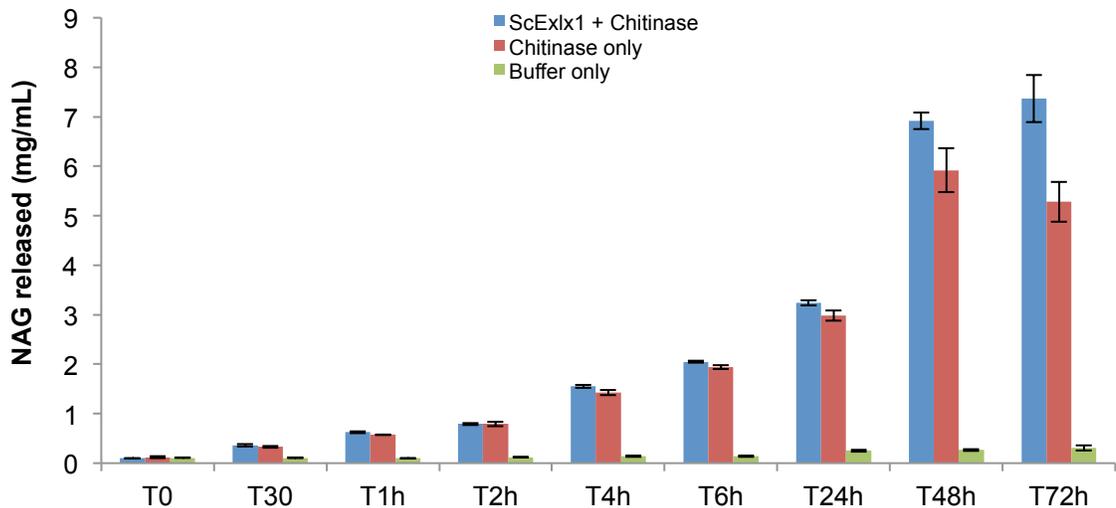


Figura 22. Actividad sinérgica entre ScExlx1 y quitinasas de *S. griseus*. Cinco miligramos de quitina fueron incubados con 100 μ g de ScExlx1 (20 μ g/mg de quitina) y 0.5 U de quitinasa en buffer de fosfatos 100 mM pH 7.4 a 30°C. Se tomaron alícuotas de 50 μ l a los 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h. La cantidad de N-acetil glucosamina liberada se determinó por el método de DNS. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

DISCUSIÓN

Schizophyllum commune es uno de los hongos más ampliamente distribuidos, y puede ser encontrado en casi todos los continentes, a excepción de la Antártida (Ohm et al., 2010). Aunque *S. commune* ha sido encontrado causando enfermedades en humanos, animales y árboles, su nicho ecológico es adoptar un estilo de vida saprobio causando pudrición blanca en la madera (Kano et al., 2002; Ohm et al., 2010; Premamalini et al., 2011; Tanaka et al., 2008). Después de que el genoma de *S. commune* fue secuenciado, se reveló su enorme potencial como fábrica de proteínas microbianas para la desconstrucción de paredes celulares vegetales, y considerando este antecedente, en este trabajo se estudió la proteína ScExlx1, descubierta mediante el análisis genómico de *S. commune*.

Se evaluó el efecto de ScExlx1 sobre fibras de algodón. Reportes previos han descrito el efecto de proteínas expansin-like sobre papel filtro, avicel, PASC (Phosphoric acid-swollen cellulose) y fibras de algodón (Jäger et al., 2011; Quiroz-Castañeda et al., 2011; Saloheimo et al., 2002). Como miembro de la superfamilia de las expansinas, ScExlx1 causó una modificación en la anatomía de la celulosa cristalina, lo que sugiere, que este efecto podría servir para incrementar la hidrólisis de celulosa por *S. commune* cuando vive como hongo de pudrición blanca. Del mismo modo, se ha propuesto que el efecto “burbuja” generado por la looseningina (Quiroz-Castañeda et al., 2011), swollenina (Saloheimo et al., 2002) y ScExlx1, ayuda en la etapa de amorfogenesis durante la degradación de lignocelulosa con enzimas hidrolíticas.

Un descubrimiento interesante fue que el análisis de secuencia reveló un ligero cambio en los amino ácidos (no polares a ligeramente polares) responsables de la unión a polisacáridos en el dominio 2 (Fig. 8). Este hecho no alteró la capacidad de ScExlx1 para unirse a celulosa y xilano que se había reportado previamente para expansinas de fitopatógenos (PcExlx1), bacterias del suelo (BsExlx1) y la bacteria marina (HcExlx2) (Kerff et al., 2008; Lee et al., 2010; Olarte-Lozano et al., 2014).

En un estudio reciente, Pastor et al. (2014) realizó un análisis sobre el potencial electrostático de 44 expansinas bacterianas, cuyas secuencias estaban disponibles en el NCBI. El análisis reveló que la mayoría de las expansinas bacterianas evaluadas en ese

trabajo presentaban un pI entre 4.5-5.96 (50%; expansinas ácidas) y 8.2-9.8 (44%; expansinas alcalinas), mientras que sólo 4 expansinas presentaron un pI neutro (9%) (Pastor et al., 2014). Otra característica importante de las expansinas bacterianas, es la polaridad que presentan la cara frontal y reversa de estas proteínas, ya que en 94% de las expansinas bacterianas, el frente es más negativo que el reverso (Pastor et al., 2014). ScExlx1 presentó una carga neta global de -15e, el PBS -7e y el reverso de la proteína una carga de -8e, generando una polaridad de +1. Singularmente, ScExlx1 presentó un PBS menos negativo que el reverso de la proteína, contrario a lo observado en la mayoría de las expansinas bacterianas (Pastor et al., 2014). Se ha propuesto que la magnitud de la polaridad podría ser directamente proporcional a la actividad específica de las expansinas, sin embargo, esta hipótesis no ha sido comprobada (Pastor et al., 2014).

Otro punto importante en relación a las expansinas, es la interacción que pueden presentar con algunas sales. Conforme a este punto, algunos investigadores han evaluado el efecto de NaCl sobre las interacciones proteína-proteína y proteína-ligando (Dumetz, et al., 2007; Kerff et al., 2008; Olarte-Lozano et al., 2014; von Hippel et al., 1969). La unión de ScExlx1 a avicel no fue afectada por la adición de NaCl, incluso a concentraciones de 0.5 M, como se demostró por densitometría y el análisis estadístico (Fig. 16 y Tabla 3), sugiriendo que la interacción de la sal con el complejo ScExlx1-celulosa es diferente al reportado para otras expansinas microbianas (Kerff et al., 2008; Lee et al., 2010; Olarte-Lozano et al., 2014), en donde la adición de sal afecta de manera positiva (PcExlx1) y negativa (BsExlx1) la capacidad de unión de las expansinas. Con respecto a la capacidad de unión a xilano, se observó un comportamiento similar al mostrado cuando se usó avicel. Es probable que las interacciones hidrofóbicas sean más importantes en la unión de ScExlx1 a sus sustratos que las interacciones electrostáticas, o quizás, se requieran mayores concentraciones de NaCl para lograr detectar algún efecto (>0.5 M). Otra posibilidad es que al usar una menor cantidad de sustrato los cambios en la unión puedan ser más fáciles de percibir. Un dato interesante, es el hecho de que HcExlx2 tiene la habilidad de unirse en mayor medida a xilano que a celulosa (Lee et al., 2013), lo que sugiere que las expansinas bacterianas podrían tener diferentes blancos en el arquitectura de la pared celular vegetal, ya que BsExlx1 tiene la capacidad

de unirse con mayor afinidad a las paredes celulares completas, mientras que PcExlx1 se une mejor a celulosa (Kerff et al., 2008; Kim, et al., 2013; Olarte-Lozano et al., 2014). Además de estos dos componentes de la pared celular vegetal, evaluamos la capacidad de unión de ScExlx1 a quitina, un polisacárido de la pared celular fúngica, debido a que proteínas como la swollenina, una proteína “expansin-like”, loosenina, que contiene sólo el D1 de las expansinas canónicas, ZmEXPB (una expansina vegetal), BsExlx1 y HcExlx2 han presentado mejores capacidades de unión a quitina que a celulosa. En relación a lo anterior, los experimentos de densitometría mostraron un pequeño incremento en la cantidad de proteína unida cuando se compararon los valores de proteína unida usando 0 y 0.5 M de NaCl. (Fig. 16). En general, estos resultados sugieren que las expansinas bacterianas y fúngicas pueden presentar diferentes interacciones dependiendo de la matriz de polisacárido con la que interactúan, y también podemos sugerir (pero no concluir) que las interacciones entre ScExlx1-polisacárido no son de naturaleza iónica. Sin embargo, aunque se pueden presentar diferentes comportamientos en la unión de cada expansina a xilano o celulosa cristalina en presencia de NaCl, se hubiera esperado una interacción de carácter iónico entre ScExlx1-quitina y ScExlx1-xilano, dado que se ha reportado que los aminoácidos Tyr-161, Tyr-162 y Tyr-195 en D2, participan en la unión a polisacáridos en las expansina microbianas (Georgelis et al., 2011), y podrían contribuir en la formación de puentes de hidrógeno mediante sus cadenas laterales con ambos polisacáridos. Es probable que se requiera analizar diferentes condiciones experimentales para detectar un efecto mas pronunciado.

Es importante destacar que en el campo biotecnológico, esta propiedad de “tolerancia” a sales en ScExlx1, pudiera ser útil de diversas formas, por ejemplo: 1) la necesidad de nuevas proteínas adaptadas para la tecnología de líquidos iónicos usados para la producción de biocombustibles celulósicos avanzados, y 2) la adición de acetato ha demostrado incrementar la capacidad hidrolítica de algunas quitin-desacetilasas (Zhao, et al., 2010), de modo que ScExlx1 podría ayudar a desacetilar el polímero de quitina en la presencia de estas enzimas en un ambiente halófilo, con el fin de producir quitosan, un producto biotecnológico de alto valor agregado. Esta característica de tolerancia a sales,

convierte a ScExl1 en un candidato ideal para estudios posteriores con una base de estructura-función y posibles aplicaciones industriales.

En relación a los análisis por FTIR, se sabe que los grupos hidroxilo presentes en la estructura de celulosa están involucrados de manera directa en el establecimiento de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, generando diferentes estructuras con distinto grado de cristalinidad y alterando las propiedades vibracionales de la macromolécula de celulosa (Park et al., 2010; Taylor & White, 2010). Se ha reportado que las expansinas son capaces de actuar sobre las paredes celulares vegetales, presentando una actividad disruptiva y actuando como agentes “aflojantes” (Cosgrove, 2000; Sampedro & Cosgrove, 2005). Además, estas proteínas son activas sobre redes de celulosa aislada (Georgelis et al., 2014, 2011; Kerff et al., 2008; X. Liu, et al., 2014; Martellini et al., 2013; Olarte-Lozano et al., 2014; Tovar-Herrera et al., 2015) y recientemente se ha sugerido que actúan también sobre el polímero de quitina, ya que un estudio demostró la expresión específica de una proteína tipo-expansina durante el establecimiento de la interacción planta-ectomicorriza (Veneault-Fourrey et al., 2014), y una expansina fúngica ha demostrado incrementar la hidrólisis enzimática de quitina cuando se preincubó con la expansina (Tovar-Herrera et al., 2015).

El análisis por FTIR ha sido útil para estudiar de manera cualitativa los patrones de puentes de hidrógeno y cristalinidad en celulosa y biomasa lignocelulósica (Sawatari, 1996; Taylor & White, 2010; Xu, et al., 2013). Además, esta técnica es ampliamente usada para la caracterización de quitina y quitosan obtenido de diferentes fuentes (Kaya, et al., 2014; Pires, et al., 2014; Wu et al., 2005). En este trabajo, obtuvimos los espectros FTIR a partir de celulosa y quitina tratados con la proteína ScExl1, con el fin de determinar cualitativamente si el tratamiento con la expansina fúngica era capaz de modificar sus estructuras en términos de cristalinidad e intensidad de puentes de hidrógeno, dada la actividad disruptiva de puentes de hidrógeno que presentan las expansinas (Fig. 17A y 17B).

A pesar de que LOI y TCI no presentaron cambios en la estructura de la celulosa, la intensidad de puentes de hidrógeno en la molécula de celulosa fue alterada por ScExl1, lo cual es consistente con el primer modo de acción que se reportó para las expansinas por McQueen y Cosgrove en 1995 (McQueen-Mason, et al., 1995). En cuanto a la

quitina, es probable que se requieran condiciones experimentales distintas para lograr detectar cambios mas pronunciados (por ejemplo, tiempos de incubación mas largos) en su estructura. Sin embargo, los cambios detectados podrían estar implicados en rearrreglos en el patrón de puentes de hidrógeno que estén ocurriendo en la estructura de quitina.

Con respecto a la hidrólisis enzimática, existen diversos antecedentes enfocados a la mejora de hidrólisis de lignocelulosa usando expansinas y proteínas expansin-like (Chen et al., 2010; Georgelis et al., 2014; Gourlay et al., 2013; Jäger et al., 2011; Kang, et al., 2013; Kim, et al., 2009; Lee et al., 2010; Olarte-Lozano et al., 2014; Quiroz-Castañeda et al., 2011; Wang et al., 2010; Yao et al., 2008). En este trabajo se evaluó el efecto de ScExlx1 sobre la hidrólisis enzimática de celulosa mediante dos métodos: 1) como pretratamiento antes de la adición de una mezcla de celulasas; 2) en conjunto con una mezcla de celulasas. Cuando ScExlx1 fue usada como pretratamiento, se observó una mejora en la hidrólisis de 23%, mientras que cuando se usó en conjunto con las celulasas, la mejora observada fue de 37%. Ambos métodos presentan un efecto positivo sobre la hidrólisis de celulosa cristalina, aunque cada uno de ellos puede tener diferentes inconvenientes; como tiempo de incubación, en el caso del uso de ScExlx1 como pretratamiento (72 h de incubación antes de añadir celulasas) o competencia entre ScExlx1 y celulasas por los sitios de unión en la celulosa (no se observaron mejoras en la hidrólisis al incrementar la cantidad de expansina usada), en el caso del uso de ScExlx1 en conjunto con la mezcla de celulasas, como ha sido reportado por otros autores para BsExlx1 (Kim et al., 2013).

Un dato interesante, es el hecho de que no se detectó actividad sinérgica cuando los experimentos se realizaron a 50°C (datos no mostrados), indicando que la proteína ScExlx1 no presenta características de termotolerancia, como es común para las expansinas. Contrastando con estos resultados, Liu et al (2014) reportó que una expansina de tomate, denominada LeEXP2 tiene la capacidad de actuar de manera sinérgica con una endoglucanasa a 50°C, generando entre 1.4-9.8 veces mas glucosa liberada cuando se comparó con el tratamiento control. Por otro lado, hay trabajos en donde la combinación de expansina/celulasas da lugar a una reducción en la cantidad de azúcares reductores, particularmente cuando se usan altas dosis de expansina o celulosa

(Kim et al., 2009; Liu et al., 2014). En gran medida, esta es una de las razones por las que la combinación de expansinas y proteínas tipo-expansina con celulasas para fines de sacarificación, continua siendo una cuestión controversial.

Además de determinar el efecto de ScExlx1 sobre celulosa, se determinó la actividad de la expansina de *S. commune* sobre quitina. El uso de ScExlx1 logró mejorar la hidrólisis de quitina así fuera usada como pretratamiento o en conjunto con quitinasas. Es posible que la alteración de los puentes de hidrógeno que las expansinas fúngicas generan en la celulosa, también ocurra en la estructura de quitina, debilitando las cadenas paralelas y antiparalelas que la conforman. Sin embargo, aunque en el caso de la celulosa, se ha demostrado que las interacciones entre D2-celulosa y D1-celulosa, son hidrofóbicas y electrostáticas (respectivamente) (Silveira & Skaf, 2016), no existen trabajos que sugieran el papel que juega la carga positiva del polímero de quitina en la interacción expansina-quitina. Es probable, que al menos en el caso de ScExlx1, la interacción entre D1-quitina se vea favorecida (con respecto a la interacción D1-celulosa), ya que la quitina presenta una carga global positiva y la región frontal del D1 (la cara que interacciona con el sustrato) de la mayoría de las expansinas bacterianas (Pastor et al., 2014) y ScExlx1 presenta una carga negativa.

Finalmente, este es el primer reporte que muestra el efecto de una expansina sobre el polímero de quitina. Este hecho es muy interesante por dos principales razones: 1) El efecto en la mejora de hidrólisis de quitina puede ser explotado de diversas maneras, ya que este polímero ha ganado gran interés por parte de la comunidad científica debido a sus numerosas aplicaciones médicas y biotecnológicas (Dutta, et al., 2004; Park & Kim, 2010); 2) existe la posibilidad de que ScExlx1 este actuando como un factor de remodelación de pared celular fúngica, permitiendo que las células de *S. commune* crezcan en un modo similar a como trabajan las expansinas vegetales. Sin embargo, aun no se conoce el efecto que ScExlx1 genera sobre la quitina.

LITERATURA CITADA

- (WBCSD), W. B. C. for S. D. (2004). *Mobility 2030: meeting the challenges to sustainability. The sustainable mobility project*. Geneva, Switzerland.
- Ander. (2005). Characterization of industrial and laboratory pulp fibres using HCl, Cellulase and FiberMaster analysis. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*.
<http://doi.org/10.3183/NPPRJ-2005-20-01-p115-121>
- Arantes, V., & Saddler, J. N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 4.
<http://doi.org/10.1186/1754-6834-3-4>
- Artzi, L., Morag, E., Shamsoum, M., & Bayer, E. A. (2016). Cellulosomal expansin : functionality and incorporation into the complex *Biotechnology for Biofuels*
Cellulosomal expansin : functionality and incorporation into the complex.
Biotechnology for Biofuels. <http://doi.org/10.1186/s13068-016-0474-5>
- Baccelli, I., Luti, S., Bernardi, R., Scala, A., & Pazzagli, L. (2014). Cerato-platanin shows expansin-like activity on cellulosic materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1), 175–84. <http://doi.org/10.1007/s00253-013-4822-0>
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858–875. <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Balat, M., & Balat, H. (2009). Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Applied Energy*, 86, 2273–2282.
<http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.03.015>
- Baldrian, P., & Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), 501–21. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x>
- Beckham, G. T., Matthews, J. F., Peters, B., Bomble, Y. J., Himmel, M. E., & Crowley, M. F. (2011). Molecular-level origins of biomass recalcitrance: decrystallization free energies for four common cellulose polymorphs. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 115(14), 4118–27. <http://doi.org/10.1021/jp1106394>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Chen, H. (2014). *Biotechnology of Lignocellulose* (1st ed.). Springer Netherlands. <http://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7>
- Chen, X., Ishida, N., Todaka, N., Nakamura, R., Maruyama, J., Takahashi, H., & Kitamoto, K. (2010). Promotion of efficient Saccharification of crystalline cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swol. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), 2556–61. <http://doi.org/10.1128/AEM.02499-09>
- Chen, Y., Stevens, M. a, Zhu, Y., Holmes, J., Moxley, G., & Xu, H. (2012). Reducing acid in dilute acid pretreatment and the impact on enzymatic saccharification. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(5), 691–700. <http://doi.org/10.1007/s10295-011-1068-7>
- Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802), 321–6. <http://doi.org/10.1038/35030000>
- De Oliveira, A. L., Gallo, M., Pazzagli, L., Benedetti, C. E., Cappugi, G., Scala, A., ... Cicero, D. O. (2011). The structure of the elicitor cerato-platanin (CP), the first member of the CP fungal protein family, reveals a double ????-barrel fold and carbohydrate binding. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 17560–17568. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.223644>
- Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J.-M., & Blanc, G. (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 8. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-10-8>
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., ... Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36. <http://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
- Ding, S.-Y., & Himmel, M. E. (2006). The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 597–606. <http://doi.org/10.1021/jf051851z>
- Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., & Baker, N. A. (2004). PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics

- calculations. *Nucleic Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.).
<http://doi.org/10.1093/nar/gkh381>
- Dumetz, A. C., Snellinger-O'brien, A. M., Kaler, E. W., & Lenhoff, A. M. (2007). Patterns of protein protein interactions in salt solutions and implications for protein crystallization. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 16, 1867–1877. <http://doi.org/10.1110/ps.072957907>
- Dutta, P. K., Dutta, J., & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan : Chemistry , properties and applications, 63(January), 20–31.
- Eder, M., Terziev, N., Daniel, G., & Burgert, I. (2008). The effect of (induced) dislocations on the tensile properties of individual Norway spruce fibers. *Holzforschung*, 62(1), 77–81. <http://doi.org/10.1515/HF.2008.011>
- Elisashvili, V., Asatiani, M., Kvesitadze, G., Kachlishvili, E., & Penninckx, M. (2006). Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology*. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.033>
- Ferrè, F., & Clote, P. (2005). DiANNA: A web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Research*, 33. <http://doi.org/10.1093/nar/gki412>
- Filonova, L., Kallas, A. M., Greffe, L., Johansson, G., Teeri, T. T., & Daniel, G. (2007). Analysis of the surfaces of wood tissues and pulp fibers using carbohydrate-binding modules specific for crystalline cellulose and mannan. *Biomacromolecules*, 8, 91–97. <http://doi.org/10.1021/bm060632z>
- Gardiner, E. S., & Sarko, A. (1985). Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. 16. The crystal structures of celluloses IVI and IVII. *Canadian Journal of Chemistry*, 63(1), 173–180. <http://doi.org/10.1139/v85-027>
- Georgelis, N., Nikolaidis, N., & Cosgrove, D. J. (2014). Biochemical analysis of expansin-like proteins from microbes. *Carbohydrate Polymers*, 100, 17–23. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.094>
- Georgelis, N., Nikolaidis, N., & Cosgrove, D. J. (2015). Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6534-0>
- Georgelis, N., Tabuchi, A., Nikolaidis, N., & Cosgrove, D. J. (2011). Structure-function analysis of the bacterial expansin EXLX1. *The Journal of Biological Chemistry*,

- 286(19), 16814–23. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.225037>
- Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H. D., & Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annual Review of Microbiology*, 67(June), 477–98. <http://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044>
- Goldemberg, J. (2008). Environmental and ecological dimensions of biofuels. In *Proceedings of the conference on the ecological dimensions of biofuels, Washington, DC*. Washinton, DC. Retrieved from <https://www.esa.org/biofuels/docfiles/Biofuels08Program.pdf>
- Gourlay, K., Hu, J., Arantes, V., Andberg, M., Saloheimo, M., Penttilä, M., & Saddler, J. (2013). Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. *Bioresource Technology*, 142, 498–503. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.053>
- Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G. H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77–93. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>
- Hamby, S. E., & Hirst, J. D. (2008). Prediction of glycosylation sites using random forests. *BMC Bioinformatics*, 9, 500. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-9-500>
- Hayashi, J., Sufoka, A., Ohkita, J., & Watanabe, S. (1975). Confirmation of existence of cellulose III(I), III(II), IV(I), and IV(II) by x-ray method. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters*, 13, 23–27.
- Jäger, G., Girfoglio, M., Dollo, F., Rinaldi, R., Bongard, H., Commandeur, U., ... Büchs, J. (2011). How recombinant swollenin from *Kluyveromyces lactis* affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 33. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-4-33>
- Kang, K., Wang, S., Lai, G., Liu, G., & Xing, M. (2013). Characterization of a novel swollenin from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose. *BMC Biotechnology*, 13(1), 42. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-13-42>
- Kano, R., Oomae, S., Nakano, Y., Minami, T., Sukikara, M., Nakayama, T., & Hasegawa, A. (2002). First Report on *Schizophyllum commune* from a Dog, 40(9), 3535–3537. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3535>

- Kawakubo, T., Karita, S., Araki, Y., Watanabe, S., Oyadomari, M., Takada, R., ... Watanabe, T. (2010). Analysis of exposed cellulose surfaces in pretreated wood biomass using carbohydrate-binding module (CBM)-cyan fluorescent protein (CFP). *Biotechnology and Bioengineering*, *105*, 499–508. <http://doi.org/10.1002/bit.22550>
- Kaya, M., Seyyar, O., Baran, T., & Turkes, T. (2014). Bat guano as new and attractive chitin and chitosan source, 1–10.
- Kerff, F., Amoroso, A., Herman, R., Sauvage, E., Petrella, S., Filée, P., ... 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 of the United States of America*, *105*(44), 16876–81. <http://doi.org/10.1073/pnas.0809382105>
- Khasa, Y. P., Gupta, R., & Kuhad, R. C. (2011). Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. *Carbohydrate Polymers*. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.074>
- 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. <http://doi.org/10.1002/bit.22193>
- Kim, I. J., Ko, H.-J., Kim, T.-W., Choi, I.-G., & Kim, K. H. (2013). Characteristics of the binding of a bacterial expansin (BsEXLX1) to microcrystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, *110*(2), 401–7. <http://doi.org/10.1002/bit.24719>
- Lee, H. J., Kim, I. J., Kim, J. F., Choi, I.-G., & Kim, K. H. (2013). An expansin from the marine bacterium Hahella chejuensis acts synergistically with xylanase and enhances xylan hydrolysis. *Bioresource Technology*, *149*, 516–9. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.086>
- 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*(4), 379–85. <http://doi.org/10.1007/s10059-010-0033-z>
- Lee R. Lynd, Paul J. Weimer, Willem H. van Zyl, I. S. P. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular*

- Biology Reviews*, 66(3), 506–577. <http://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506>
- Levasseur, A., Piumi, F., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Asther, M., Delattre, M., ... Record, E. (2008). FOLy: an integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 45(5), 638–45. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.01.004>
- Liu, X., Liu, C., Ma, Y., Hong, J., & Zhang, M. (2014). Heterologous expression and functional characterization of a novel cellulose-disruptive protein Le EXP2 from *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Biotechnology*, 186, 148–155. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.07.013>
- Liu, Y.-S., Baker, J. O., Zeng, Y., Himmel, M. E., Haas, T., & Ding, S.-Y. (2011). Cellobiohydrolase hydrolyzes crystalline cellulose on hydrophobic faces. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 11195–201. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.216556>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42, D490-5. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Martellini, F., Faoro, F., Carresi, L., Pantera, B., Baccelli, I., Maffi, D., ... Pazzagli, L. (2013). Cerato-populin and cerato-platanin, two non-catalytic proteins from phytopathogenic fungi, interact with hydrophobic inanimate surfaces and leaves. *Molecular Biotechnology*, 55(1), 27–42. <http://doi.org/10.1007/s12033-012-9618-4>
- Martinez-Anaya, C. (2016). Understanding the structure and function of bacterial expansins: a prerequisite towards practical applications for the bioenergy and agricultural industries. *Microbial Biotechnology*. <http://doi.org/10.1111/1751-7915.12377>
- Martínez, C., Balcázar, E., Dantán, E., & Folch, J. (2008). Celulasas fúngicas : Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética, 119–131. Retrieved from http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2008/mi08-3_4i.pdf
- McQueen-Mason, Simon J. And Cosgrove, D. J. (1995). Expansin Mode of Action on Cell Walls. *Plant Physiology*, 107, 87–100.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D. M., & Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous

- proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*, 4(November), 1425–33. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=160229&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- MEHER, L., NAIK, S., & VIDYASAGAR, D. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>
- Nada, A. A. M. A., Kamel, S., & El-Sakhawy, M. (2000). Thermal behaviour and infrared spectroscopy of cellulose carbamates. *Polymer Degradation and Stability*, 70(3), 347–355. [http://doi.org/10.1016/S0141-3910\(00\)00119-1](http://doi.org/10.1016/S0141-3910(00)00119-1)
- Nelson, M. L., & O'Connor, R. T. (1964). Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. *Journal of Applied Polymer Science*, 8(3), 1325–1341. <http://doi.org/10.1002/app.1964.070080323>
- O'Connor, R. T., DuPre, E. F., & McCall, E. R. (1958). Applications of Infrared Absorption Spectroscopy to Investigations of Cotton and Modified Cottons: Part II: Chemical Modifications. *Textile Research Journal*, 28(7), 542–554. <http://doi.org/10.1177/004051755802800702>
- Ohm, R. a, de Jong, J. F., Lugones, L. G., Aerts, A., Kothe, E., Stajich, J. E., ... Wösten, H. a B. (2010). Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nature Biotechnology*, 28(9), 957–63. <http://doi.org/10.1038/nbt.1643>
- Olarte-Lozano, M., Mendoza-Nuñez, M. a, Pastor, N., Segovia, L., Folch-Mallol, J., & Martínez-Anaya, C. (2014). PcEx11 a novel acid expansin-like protein from the plant pathogen *Pectobacterium carotovorum*, binds cell walls differently to BsEXLX1. *PloS One*, 9(4), e95638. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0095638>
- Park, B. K., & Kim, M.-M. (2010). Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 5152–64. <http://doi.org/10.3390/ijms11125152>
- Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. a, & Johnson, D. K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 10.

<http://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>

- Pastor, N., Sonia, D., Ernesto, P., Segovia, L., & Mart, C. (2014). Electrostatic analysis of bacterial expansins, (November), 1–9. <http://doi.org/10.1002/prot.24718>
- Pazzagli, L., Pantera, B., Carresi, L., Zoppi, C., Pertinhez, T. A., Spisni, A., ... Cappugi, G. (2006). Cerato-platanin, the first member of a new fungal protein family: cloning, expression, and characterization. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *44*, 512–521. <http://doi.org/10.1385/CBB:44:3:512>
- Pazzagli, L., Seidl-Seiboth, V., Barsottini, M., Vargas, W. A., Scala, A., & Mukherjee, P. K. (2014). Cerato-platanins: elicitors and effectors. *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology*, *228*, 79–87. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.02.009>
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*. <http://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Pires, C. T. G. V. M. T., Vilela, J. A. P., & Airoidi, C. (2014). The effect of Chitin Alkaline Deacetylation at Different Condition on Particle Properties. *Procedia Chemistry*, *9*, 220–225. <http://doi.org/10.1016/j.proche.2014.05.026>
- Plunkett, J. (2008). *Plunkett's automobile industry Almanac 2008: automobile, truck and specialty vehicle industry market research, statistics, trends & leading companies*. Houston, Tx: Plunkett Research. Retrieved from <https://www.amazon.com/Plunketts-Automobile-Industry-Almanac-2008/dp/1593920946>
- Popper, Z. a, Michel, G., Hervé, C., Domozych, D. S., Willats, W. G. T., Tuohy, M. G., ... Stengel, D. B. (2011). Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 567–90. <http://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103809>
- Premamalini, T., Ambujavalli, B. T., Anitha, S., Somu, L., & Kindo, A. J. (2011). Schizophyllum commune a causative agent of fungal sinusitis: a case report. *Case Reports in Infectious Diseases*, *2011*, 821259. <http://doi.org/10.1155/2011/821259>
- Quiroz-Castañeda, R. E., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., Martínez, A., Folch-Mallol, J., & Martínez Anaya, C. (2009). Characterization of cellulolytic activities

- of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(4). <http://doi.org/10.2225/vol12-issue4-fulltext-3>
- Quiroz-Castañeda, R. E., Martínez-Anaya, C., Cuervo-Soto, L. I., Segovia, L., & Folch-Mallol, J. L. (2011). Loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. *Microbial Cell Factories*, 10, 8. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-10-8>
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), 841–5. <http://doi.org/10.1038/nature07190>
- Ruiz-Deñás, F. J., & Martínez, A. T. (2009). Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 164–77. <http://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00078.x>
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyysönen, E., ... Penttilä, 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(17), 4202–4211. <http://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03095.x>
- Sampedro, J., & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6(12), 242. <http://doi.org/10.1186/gb-2005-6-12-242>
- Sawatari, C. (1996). A Fourier transform spectroscopic analysis of the character of hydrogen bonds in amorphous cellulose, 31(3), 393–399.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263–89. <http://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Silveira, R. L., & Skaf, M. S. (2016). Molecular dynamics of the *Bacillus subtilis* expansin EXLX1 : interaction with substrates and structural basis of the lack of activity of mutants †. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18, 3510–3521. <http://doi.org/10.1039/C5CP06674C>
- Singh, D., & Chen, S. (2008). The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(3), 399–417. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1706-9>

- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., ...
 Youngs, H. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science (New York, N.Y.)*, *306*(5705), 2206–11.
<http://doi.org/10.1126/science.1102765>
- Suzuki, H., Vuong, T. V., Gong, Y., Chan, K., Ho, C. Y., Master, E. R., & Kondo, A. (2014). Sequence diversity and gene expression analyses of expansin-related proteins in the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete carnos*a. *Fungal Genetics and Biology*, *72*(June), 115–123. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.05.008>
- Tanaka, H., Takizawa, K., Baba, O., Maeda, T., Fukushima, K., Shinya, K., & Kosuge, J. (2008). Basidiomycosis: *Schizophyllum commune* osteomyelitis in a dog. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, *70*(11), 1257–9. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19057147>
- Taylor, J., & White, P. (2010). Attenuated total reflectance Fourier-transform Infrared spectroscopy analysis of crystallinity changes in lyocell following continuous treatment with sodium hydroxide, 103–115. <http://doi.org/10.1007/s10570-009-9378-x>
- Terziev, N., Daniel, G., & Marklund, A. (2005). Dislocations in Norway spruce Wbres and their eVect on properties of pulp and paper. *Holzforschung*, *59*, 163–179. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=16568594>
- Thygesen, L. G., & Asgharipour, M. R. (2008). The effects of growth and storage conditions on dislocations in hemp fibres. *Journal of Materials Science*, *43*(10), 3670–3673. <http://doi.org/10.1007/s10853-008-2587-0>
- Thygesen, L. G., Hidayat, B. J., Johansen, K. S., & Felby, C. (2011). Role of supramolecular cellulose structures in enzymatic hydrolysis of plant cell walls. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *38*(8), 975–83. <http://doi.org/10.1007/s10295-010-0870-y>
- Tovar-Herrera, O. E., Batista-García, R. A., Sánchez-Carbente, M. D. R., Iracheta-Cárdenas, M. M., Arévalo-Niño, K., & Folch-Mallol, J. L. (2015). A novel expansin protein from the white-rot fungus *Schizophyllum commune*. *PLoS ONE*, *10*(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122296>

- Veneault-fourrey, C., Commun, C., Kohler, A., Morin, E., Balestrini, R., Plett, J., ... Martin, F. (2014). Genomic and transcriptomic analysis of *Laccaria bicolor* CAZome reveals insights into polysaccharides remodelling during symbiosis establishment. *FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY*, (September).
<http://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.007>
- von Hippel, P. H., Schleich, T., Timasheff, S. N., & Fasman, G. D. (1969). Effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. In *Structure and Stability of Biological Macromolecules* (Vol. 2, pp. 417–574).
- Wang, M., Cai, J., Huang, L., Lv, Z., Zhang, Y., & Xu, Z. (2010). High-level expression and efficient purification of bioactive swollenin in *Aspergillus oryzae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(7), 2027–36. <http://doi.org/10.1007/s12010-010-8978-0>
- Wang, Y., Tang, R., Tao, J., Gao, G., Wang, X., Mu, Y., & Feng, Y. (2011). Quantitative investigation of non-hydrolytic disruptive activity on crystalline cellulose and application to recombinant swollenin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(5), 1353–63. <http://doi.org/10.1007/s00253-011-3421-1>
- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F. A., Conway, W. S., & Sams, C. E. (2005). Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3888–3894.
<http://doi.org/10.1021/jf048202s>
- Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., & Wang, D. (2013). Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques : A mini-review. *Applied Energy*, 104, 801–809. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.12.019>
- Yao, Q., Sun, T.-T., Liu, W.-F., & Chen, G.-J. (2008). Gene Cloning and Heterologous Expression of a Novel Endoglucanase, Swollenin, from *Trichoderma pseudokoningii* S38. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(11), 2799–2805. <http://doi.org/10.1271/bbb.80124>
- Yennawar, N. H., Li, L.-C., Dudzinski, D. M., Tabuchi, A., & Cosgrove, D. J. (2006). Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a beta-expansin and group-1 pollen allergen from maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

the United States of America, 103(40), 14664–71.

<http://doi.org/10.1073/pnas.0605979103>

Zhang, Y. P., Ding, S., Mielenz, J. R., Cui, J., Elander, R. T., Laser, M., ... Tech, V.

(2007). Fractionating Recalcitrant Lignocellulose at Modest Reaction Conditions.

Biotechnology and Bioengineering, 97(2), 214–223. <http://doi.org/10.1002/bit>

Zhang, Y., & Skolnick, J. (2013). Segment assembly , structure alignment and iterative simulation in protein structure prediction, 2–5.

Zhao, Y., Park, R.-D., & Muzzarelli, R. a a. (2010). Chitin deacetylases: properties and

applications. *Marine Drugs*, 8(1), 24–46. <http://doi.org/10.3390/md8010024>

Žifčáková, L., & Baldrian, P. (2012). Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose. *Fungal Ecology*, 5(5), 481–489.

<http://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.05.001>

RESUMEN BIOGRÁFICO

M.C. Omar Eduardo Tovar Herrera
Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA SCEXLX1
DE *Schizophyllum commune*

Campo de Estudio: Biotecnología

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 21 de Abril del año 1988.
Hijo de Germán Tovar Garza y Yolanda Herrera Romero. Hermano de Germán
Everardo Tovar Herrera y Armando Guadalupe Tovar Herrera.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas en el año 2010 con el título
de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Del año 2011 al 2013 cursé una Maestría en
Ciencias con orientación en Microbiología y del año 2014 al año 2017, un Doctorado
en Ciencias con especialidad en Microbiología, ambos en la misma institución de la
que egresé.

Experiencia Profesional: Apoyo en actividades de docencia e investigación en el
laboratorio de Biotecnología Industrial de la Facultad de Ciencias Biológicas de la
UANL en el período 2011-2017.