



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Análisis estructural *in silico* de proteínas amorfogénicas tipo
looseninas”

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
JOSE ALBERTO MENA NERI

DIRECTOR O CODIRECTORES
RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO, 2021

Aprobación de tesis y registro de comité revisor

“Análisis estructural *in silico* de proteínas amorfogénicas tipo looseninas”

Tesis realizada por: **Jose Alberto Mena Neri** bajo la dirección del Comité Revisor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el título de:

LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

COMITÉ REVISOR

Director de tesis: Dr. Ramon Alberto Batista García

Revisor: Dra. Ma. Del Rayo Sánchez Carbante

Revisor: Dr. Jorge Luis Folch Mallo

Revisor: Dr. Maikel Gilberto Fernández López

Revisor: Mtro. Yordanis Pérez Llano

Cuernavaca, Morelos, 02 de 02 de 2021.

AGRADECIMIENTOS

La universidad me abrió las puertas para crecer académicamente. Asimismo, mis profesores que me compartieron sus conocimientos y consejos día con día. Mi familia siempre me apoyo de principio a fin al igual que mis amigos. Agradezco a los directivos que me apoyaron en cada paso de mi formación. Agradezco también a mi director de tesis que siempre me ayudo sin problema alguno, mostrándome su apoyo incondicional.

DEDICATORIAS

Dedico este trabo a mis padres y a mi hermano. Ellos siempre estuvieron a mi lado, apoyándome para llevar a cabo mi formación académica.

ÍNDICE

Contenido

1.- Introducción.....	9
1.1.- Biorefinerías	11
1.2.- Composición de la lignocelulosa	16
1.2.1.- Celulosa.....	17
1.2.2.- Hemicelulosa.....	18
1.2.3.- Lignina.....	19
1.3.- Organismos capaces de degradar los componentes de la lignocelulosa	21
1.4.- Enzimas que participan en la hidrólisis de la lignocelulosa	23
1.4.1.- Mecanismo de la hidrólisis enzimática de celulosa	25
1.5.- Proteínas con la capacidad de remodelar la pared celular.....	26
1.5.1.- Generalidades	26
1.5.2.- Expansinas.....	29
1.5.3.- Looseninas.....	36
1.6.- Otras proteínas con actividad tipo expansina	41
1.6.1.- Swolleninas	41
1.6.2.- Cerato plataninas	43
1.6.3.- Comparación estructural entre las proteínas con actividad tipo expansina	45
2.- Antecedentes	46
3.- Justificación.....	46
4.- Hipótesis	47
5.- Objetivo	47
5.1.- Objetivos específicos.....	47
6.- Metodología.....	48
6.1.- Selección de proteínas con dominio DPBB.....	48
6.2 Depuración del set de secuencias de posibles looseninas.....	50
6.3.- Alineamiento de las secuencias.....	51
6.4.- Análisis filogénico.....	52
6.5.- Modelado de posibles looseninas	¡Error! Marcador no definido.
7.- Resultados parciales.....	53
8.- Bibliografía	64

RESUMEN

El material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades. Su impedimento para utilizarlo, es la falta de una tecnología de bajo costo para degradar la fracción recalcitrante de la biomasa.

La lignocelulosa está constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina, es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis (Aprox. 200,000 millones de toneladas en el mundo). La pared celular de las plantas está constituida por lignocelulosa.

La celulosa: Es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4. Estructurada en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidos por puentes de H y fuerza de van de wals. Origina una estructura resistente a la hidrólisis y posee regiones susceptibles a la degradación enzimática. Sintetizada también por bacterias del género *Acetobacter*. *La Hemicelulosa:* Es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas y hexosas que forman cadenas ramificadas. Recubre la superficie de las fibras de celulosa. *La lignina:* Es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado por alcoholes aromáticos. Da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales. Es altamente resistente a la degradación química y biológica.

Recientemente se hicieron estudios en hongos basidiomicetos como *Pycnoporus sanguineus* y *Bjerkandera adusta* para identificar enzimas y proteínas con potencial uso para la degradación de biomasa vegetal, principalmente desechos agrícolas. En particular, en el hongo *Bjerkandera adusta* en el cual se ha identificado una proteína que tiene la capacidad de modificar el arreglo compacto de la estructura de la pared celular ya que separa las fibras de celulosa. Las fibras sueltas son así susceptibles de ser cortadas por las celulasas con mayor facilidad.

Proteínas con esta actividad solamente se habían descrito en plantas (llamadas "expansinas" porque al desestabilizar la pared celular permiten la expansión celular) y recientemente en algunos hongos del género *Trichoderma* y *Aspergillus* (llamadas swolleninas, del inglés *swell*, "hinchar" las fibras vegetales al desordenar su

estructura y permitir la entrada de agua); sin embargo, en los hongos basidiomicetos no había reportes de que tuvieran este tipo de proteínas. En base a estudios, se demostró, que esta proteína, a la que llamaron “loosenina” (del inglés loose, aflojar), es capaz de desarreglar la estructura ordenada de fibras de algodón. Como consecuencia de este cambio en la estructura de las fibras de celulosa, el tratamiento con loosenina también es capaz de favorecer la acción de celulasas, permitiendo la liberación de glucosa a partir de fibras de algodón.

Palabras clave: Amorfogénicas, looseninas, celulosa, dominio DPBB, bioetanol.

Summary

Lignocellulosic material is attractive due to its low cost and high availability in various climates and locations. Its impediment to use it is the lack of a low-cost technology to degrade the recalcitrant fraction of the biomass.

Lignocellulose is made up of cellulose, hemicellulose and lignin, it is the main and most abundant component of the biomass produced by photosynthesis (Approx. 200,000 million tons in the world). The cell wall of plants is made up of lignocellulose.

Cellulose: It is a polymer of D-glucose linked by β -1,4 glucosidic bonds. Structured in long linear chains (microfibrils) linked by H bridges and van de wals force. It originates a structure resistant to hydrolysis and has regions susceptible to enzymatic degradation. Also synthesized by bacteria of the genus *Acetobacter*. Hemicellulose: It is a complex polymer of heteropolysaccharides formed by pentoses and hexoses that form branched chains. Coats the surface of cellulose fibers. Lignin: It is an amorphous, three-dimensional heteropolymer and branched by aromatic alcohols. It gives structural support, rigidity, impermeability and protection to structural polysaccharides. It is highly resistant to chemical and biological degradation.

Studies were recently carried out on basidiomycete fungi such as *Pycnoporus sanguineus* and *Bjerkandera adusta* to identify enzymes and proteins with potential use for the degradation of plant biomass, mainly agricultural waste. In particular, in the *Bjerkandera adusta* fungus in which a protein has been identified that has the ability to modify the compact arrangement of the cell wall structure since it "relaxes" the cellulose fibers. The loose fibers are thus susceptible to being cut by cellulases more easily.

Proteins with this activity had only been described in plants (called "expansins" because by destabilizing the cell wall they allow cell expansion) and recently in some fungi of the genus *Trichoderma* and *Aspergillus* (called swollenins, from the English swell, "swelling" the plant fibers by cluttering its structure and allowing water to enter); however, in basidiomycete fungi there were no reports that they had this type of protein. Based on studies, it was shown that this protein, which they called "loosenin"

(from the English loose, loosen), is capable of disrupting the ordered structure of cotton fibers. As a consequence of this change in the structure of cellulose fibers, treatment with loosenin is also capable of promoting the action of cellulases, allowing the release of glucose from cotton fibers.

Keywords: Amorphogenic, loosenins, cellulose, DPBB domain, bioethanol.

1.- Introducción

En la actualidad la generación de alternativas energéticas distintas a las ya convencionales obtenidas principalmente de la explotación del petróleo, ha conllevado al uso de materias primas naturales dando lugar a los llamados biocombustibles dentro de los cuales destaca el bioetanol. Ello ha surgido a raíz de la necesidad de proteger el medio ambiente, preservar los recursos tanto renovables como no renovables y maximizar el potencial de uso de productos agrícolas, y en especial de los subproductos que estos generan al someterlos a distintos procesos agroindustriales, cuya disposición final es un gran problema ambiental (Sánchez Riaño , Gutiérrez Morales, Muños Hernández, & Rivera Barrero , 2010)

Por tanto, la utilización de biocombustibles como el etanol constituye una fuente de energía muy atractiva debido a sus ventajas (Tabla 1). La Tabla 1 resume comparativamente los aspectos ambientales, económicos y de competitividad del uso del etanol como biocombustible alternativo, así como algunas de sus desventajas. Entre ellas se menciona el alto costo de su producción y las elevadas emisiones de dióxido de carbono como consecuencia de su destilación.

Debe resaltarse que el uso del bioetanol no es una idea nueva. El programa PROALCOOL, iniciado en 1975 por el Gobierno brasileño a raíz de la crisis del petróleo de la década de 1970, tuvo la finalidad de reducir la dependencia de Brasil de las importaciones de petróleo (Díaz Ch. & Herrera , 2011). Como consecuencia de este renovado interés, la producción mundial de etanol se elevó de algo más de 10 mil millones de litros en 1980, a cerca de 20 mil millones de litros en 1985. Este crecimiento en la producción ocurrió principalmente en Brasil y Estados Unidos (Díaz & Herrera, 2011). Sin embargo, debemos enfatizar que el costo ético y social de destinar alimentos como biocombustibles aún espera ser analizado a profundidad. Para México o cualquier país en vías de desarrollo esta no pudiera ser una opción bajo ninguna circunstancia.

La transformación de las materias primas para la obtención de bioetanol ocurre en las biorefinerías, las cuales se definen como complejos industriales sostenibles y

amigables con el medio ambiente y tienen la finalidad de obtener productos de alto valor agregado, entre ellos, los biocombustibles alternativos.

Tabla 1

Ventajas y desventajas del uso de los biocombustibles.

Ventajas de los biocombustibles	Desventajas de los biocombustibles
<ul style="list-style-type: none"> • Proporcionan una fuente de energía reciclable y, por lo tanto, inagotable. • Revitalizan las economías rurales, y generan empleo al favorecer la puesta en marcha de un nuevo sector en el ámbito agrícola. • Se podrían reducir los excedentes agrícolas que se han registrado en las últimas décadas. Se mejora el aprovechamiento de tierras con poco valor agrícola y que, en ocasiones, se abandonan por la escasa rentabilidad de los cultivos tradicionales. • Se mejora la competitividad al no tener que importar fuentes de energía tradicionales. 	<ul style="list-style-type: none"> • El costo de producción de los biocombustibles casi dobla al de la gasolina o gasóleo. Por ello, no son competitivos sin ayudas públicas. Se necesitan grandes espacios de cultivo, dado que del total de la plantación sólo se consigue un 7% de combustible. • Potenciación de monocultivos intensivos, con el consiguiente uso de pesticidas y herbicidas. • El combustible precisa de una transformación previa compleja.

1.1.- Biorefinerías

Las biorefinerías tienen como función principal la conversión de biomasa en diversos tipos de combustibles, productos químicos, etc. (Villar , 2013). Dicho proceso se lleva a cabo empleando métodos físicos, físico-químicos, químicos y/o biológicos para tener así una mayor gestión y aprovechamiento de los componentes de la biomasa.

El empleo de la lignocelulosa como biomasa impone tres pasos principales para llevar cabo procesos de sacarificación industrial (Cuervo, Folch Mallo, & Quiroz Castañeda, 2009):

- Pretratamiento: Etapa indispensable para el procesamiento de biomasa lignocelulósica que complementa la hidrólisis enzimática y posibilita la obtención de altos rendimientos. Se hace necesario principalmente porque la lignina en las paredes celulares de la planta forma unas barreras contra el ataque enzimático. Un pretratamiento ideal es reducir el contenido de lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa e incrementar el área superficial.
- Sacarificación enzimática: Uso de celulasas, hemicelulasas y otras enzimas para el tratamiento de la biomasa vegetal.
- Fermentación de los azúcares liberados: Se emplean cepas de levadura para fermentar las hexosas obtenidas de los procesos anteriores.

Los pasos antes mencionados se muestran de forma breve en el siguiente esquema (Figura 1) donde se busca explicar las etapas a las cuales se somete el material lignocelulósico para obtener etanol.

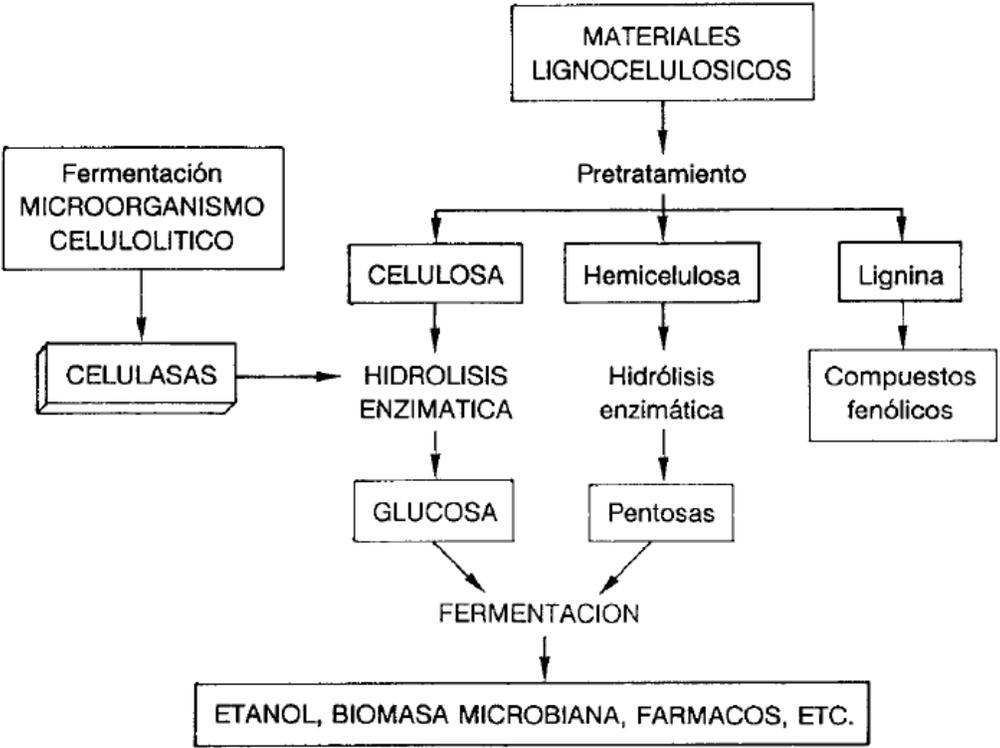


Figura 1

Esquema del proceso de sacarificación de residuos lignocelulósicos (Macarron Larrumbe , 1992).

Existen diversos procesos para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos, los cuales se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Tipos de pretratamientos industriales para facilitar la sacarificación a partir de biomasa vegetal.

Métodos físicos	Métodos físico-químicos	Métodos químicos	Métodos biológicos
<p>Fragmentación mecánica: El material lignocelulósico es fragmentado, triturado y molido para aumentar el área de contacto, facilitando el acceso de las celulasas a las fibras de celulosa y aumentando su conversión (Millet <i>et al.</i>, 1976)</p>	<p>Explosión por vapor: La biomasa es tratada con vapor saturado a una temperatura de 160 – 260 °C durante cierto tiempo causando reacciones de autohidrólisis, donde la hemicelulosa y lignina son convertidos en oligómeros solubles. La adición de H_2SO_4 mejora la posterior hidrólisis enzimática (Duff & Murray, 1996).</p>	<p>Ozonólisis: El ozono degrada la lignina y la hemicelulosa de sustratos como la paja de trigo y de algodón, el bagazo de caña y el aserrín de pino y álamo (Ben-Ghedalina & Miron, 1981). Se remueve alrededor de un 8% de lignina (Vidal & Molinier, 1988).</p>	<p>Algunas bacterias y hongos de podredumbre blanca y parda oxidan completamente la madera, por lo que tienen aplicaciones biotecnológicas en la conversión de la lignocelulosa a productos de valor industrial (Balan <i>et al.</i>, 2008; Martínez <i>et al.</i>, 1998)</p>
<p>Pirólisis: La lignocelulosa se descompone en diferentes productos gaseosos y carbón residual cuando es tratada con temperaturas altas de hasta 300 °C (Kilzer & Broido, 1965)</p>	<p>Explosión de fibra de amoníaco (AFEX): Mejora significativamente la tasa de sacarificación de diversos sustratos lignocelulósicos (Mes-Hartree <i>et al.</i>, 1988; Vlasenko <i>et al.</i>, 1997; Reshamwala <i>et al.</i>, 1995) los cuales son tratados con amoníaco a alta temperatura y presión.</p>	<p>Hidrólisis ácida: Los ácidos como el H_2SO_4 y HCL concentrados son poderosos agentes que hidrolizan la celulosa, pero son tóxicos, corrosivos y peligrosos por lo que requieren reactores que resistan su corrosión.</p>	
		<p>Hidrólisis alcalina: Es la adición de bases diluidas a la biomasa y su eficiencia depende del contenido de lignina de los materiales. El hidróxido de sodio diluido produce un hinchamiento, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos (Fan <i>et al.</i>, 1987)</p>	
		<p>Deslignificación oxidativa: Pretratamiento con peróxido de hidrógeno aumenta la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática al eliminar cerca del 50 % de la lignina y la mayoría de la hemicelulosa, las cuales son solubilizadas</p>	

		liberando la glucosa durante la sacarificación (Azzam, 1989).	
		Proceso organosolvente: Se utilizan solventes orgánicos como metanol, etanol y acetona, también ácidos inorgánicos como catalizadores (H_2SO_4 ó HCL) que rompen los enlaces de la lignina y la celulosa.	

Sin embargo, a pesar de someter los materiales lignocelulosicos a dichos pretratamientos existen desventajas las cuales se mencionan en la tabla 2.1.

Tabla 2.1

Desventajas que tienen los pretratamientos. (Díaz Ch. & Herrera , 2011)

PRETRATAMIENTO MECÁNICO	
Método	Desventaja
Trituración mecánico	La molienda es ideal tanto para el metano y la producción de etanol. Sin embargo, esta operación requiere de alto consumo energético y se encontró este pretratamiento económicamente no viable.
PRETRATAMIENTOS TÉRMICOS	
Explosión por vapor	Destrucción de una parte de xilanos de hemicelulosa. Incompleta rotura de la matriz lignina-carbohidratos. Debe combinarse con H_2SO_4 , SO_4 ó CO_2 para mejorar la eficiencia.
PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS	
Proceso de explosión de fibra con amoniaco (AFEX)	La composición del material sometido a este proceso prácticamente no cambia. Solo es aplicable y efectivo hasta un 90% en materiales con contenidos de lignina menores a 15%. Requiere recuperación del amoniaco.
PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS	
Hidrólisis ácida	Gran cantidad de ácido requerido; los efectos corrosivos de los ácidos concentrados que conllevan a altas inversiones en los equipamientos; es necesaria una costosa etapa de neutralización antes de la fermentación. Requiere altas temperaturas para alcanzar rendimientos aceptables de conversión de celulosa a glucosa; a pesar de las T° altas y tiempos de residencia cortos que generan máximos rendimientos en glucosa, tan solo se han logrado el 60% en torno al rendimiento teórico.
Tratamiento con ozono	Los altos costos por la cantidad de ozono requerido. No ha sido probado en cascarillo de arroz, sin embargo, si se ha llevado a cabo en paja de trigo.
Hidrolisis alcalina.	La efectividad de este pretratamiento depende del contenido de lignina del material a tratar, que debe ser máximo de 18%. Existe a menudo una pérdida de productos en la degradación de hemicelulosa y la solubilización de lignina, a menudo tiene un efecto inhibidor.
PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS	
Tratamiento con hongos	La tasa de hidrólisis es demasiado lenta.

Sin embargo, un aspecto importante para la utilización del etanol como biocombustible es su elevado costo de producción a partir de desechos lignocelulósicos, lo cual ha limitado en México extender su uso. Además no existen políticas nacionales que favorezcan la gestión integral de la biomasa vegetal y la implementación de biorefinerías con esquemas de producción sostenibles. Otro aspecto que limita a México para llevar a cabo la producción de biocombustibles, es destinar recursos alimenticios tales como: el maíz y caña de azúcar para su producción, por lo tanto los aspectos alimenticios, éticos y los elevados costos son las primeras barreras que limitan a nuestro país como productor de bioetanol. Sin embargo, una alternativa sería usar desechos lignocelulósicos provenientes de la agricultura, la industria maderera y la jardinería, los cuales hasta el momento no tienen valor agregado. Si bien, cabe resaltar que de acuerdo con la FAO el potencial para la producción comercial a gran escala de biocombustibles de celulosa provocara impactos sin precedentes en el sector forestal, debido a que en muchas regiones del mundo la madera aún abunda en los bosques. Para las empresas madereras, el etanol podría ser una oportunidad de negocios adicional, que les permitiera incrementar sus ganancias mediante la intensificación del madereo sin que se requiera ningún esfuerzo o costo para hacer crecer la madera. (WRN, 2008).

En resumen para que el etanol celulósico pueda jugar un papel positivo se requiere que cumpla con algunas condiciones simples, las principales de las cuales serían (WRN, 2008):

- Que se produzca y use localmente.
- Que se trate de operaciones a pequeña escala.
- Que se base en recursos disponibles a nivel local.
- Que la principal materia prima utilizada sean los desperdicios agrícolas, por ejemplo.
- Que no implique la manipulación genética de organismos vivos.

1.2.- Composición de la lignocelulosa

La lignocelulosa es el componente estructural de las paredes celulares de las plantas, aunque también se produce en algunos animales como los tunicados y microorganismos como las bacterias. La lignocelulosa se puede emplear como una alternativa prometedora con miras a la producción de biocombustibles debido a que está compuesta por azúcares fermentables. El problema principal es encontrar la manera de liberarlos, debido a que su estructura química y arquitectura molecular forman una matriz resistente a la degradación enzimática. Estas características impiden que los tratamientos enzimáticos de sacarificación sean rentables y eficientes a escala industrial, lo cual compromete la sustentabilidad de los bioprocesos con estos propósitos.

La lignocelulosa está constituida principalmente por tres biopolímeros principales: celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 1), en proporciones que varían de acuerdo con la edad, el estado fisiológico, la familia, género y la especie de planta de la que se trate (Quiroz Castañeda & Folch Malloí, 2011). Los componentes estructurales de estos polímeros, las interacciones y enlaces químicos que se establecen entre ellos, definen por una parte, la riqueza de la biomasa vegetal para su uso como materia prima para la obtención de combustibles alternativos y por otro lado muestran el principal impedimento para su utilización debido a la ausencia de una tecnología de bajo costo que permita degradar de manera eficiente cada componente de estos polímeros.

A continuación se describen brevemente los componentes estructurales de la lignocelulosa.

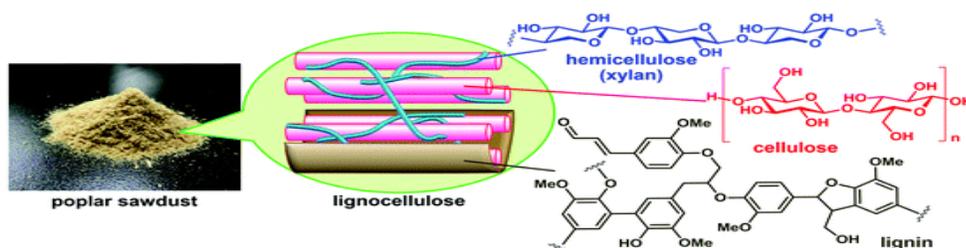


Figura 2

Estructura química de los componentes fundamentales de la lignocelulosa, comprendiendo la lignina, celulosa y hemicelulosa. (<http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2013/GC/c3gc00060e/c3gc00060e-f1.gif>)

1.2.1.- Celulosa

La celulosa es el polímero más abundante en la biomasa vegetal y es el componente principal de la pared celular vegetal (constituye el 50% del peso seco de la planta) y está compuesta por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos β -1,4 (Figura 2). También es constituyente estructural en algunas bacterias y tunicados. Entre sus características destacan su elevada estabilidad e insolubilidad en soluciones acuosas.

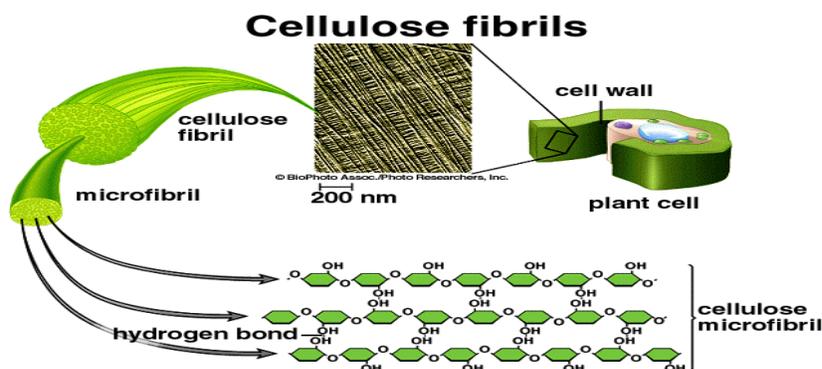


Figura 3

Fibras de celulosa, microfibrillas e interacciones por puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura y confieren cristalinidad al polímero. (http://desertbruchid.net/4_GB_Lecture_figs_f/4_GB_03c_OrgChem_Fig/3_8_mad7_Cellulose_Polys.GIF)

Las fibras de celulosa se componen por filamentos no ramificados. Desde su síntesis se ordena en filamentos que forman las microfibrillas, las cuales poseen un diámetro aproximado de 5 a 15 nm. Estas fibrillas pueden contener desde 36 hasta más de 1200 filamentos de celulosa (Quiroz Castañeda & Folch Mallo, 2011). Las interacciones no covalentes establecidas entre los átomos de hidrógeno permiten la unión entre las fibrillas de glucosa y originan zonas altamente cristalinas que son poco vulnerables a las enzimas hidrolíticas. Sin embargo, las zonas de menores interacciones electrostáticas mediadas por hidrógenos se definen como zonas amorfas, las cuales son más vulnerables a la digestión enzimática debido a que no poseen una estructura altamente organizada (Figura 3).

La estereoquímica de las unidades de glucosa en las cadenas de celulosa, con cada unidad de glucosa formando un ángulo de 180° con su vecino, permite la formación

de tres enlaces de hidrógeno por residuo entre cada cadena adyacente (Abril & Navarro , 2012).

Esta gran red de enlaces de hidrógeno, es la razón fundamental de la resistencia de la celulosa. Para romper o penetrar esta estructura, se requieren severos tratamientos y condiciones, que permitan incrementar la accesibilidad de la celulosa. (Abril & Navarro , 2012).

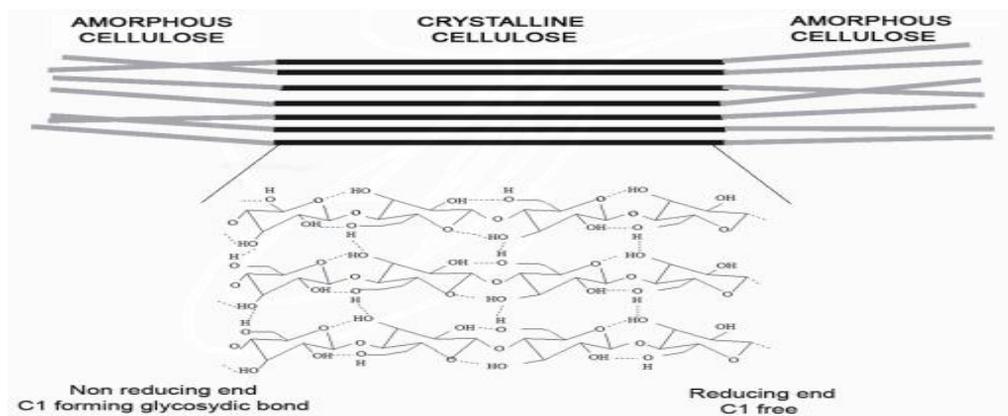


Figura 4

Regiones cristalinas altamente organizadas las cuales se encuentran separadas por celulosa no organizada o amorfa que se presenta en pequeños porcentajes (aproximadamente entre un 5 y 20%) (<http://www.intechopen.com/source/html/44414/media/image2.png>)

1.2.2.- Hemicelulosa

Constituye aproximadamente entre el 25 y el 30% del total del peso seco de la biomasa vegetal. Está constituida principalmente por heteropolisacáridos, como son pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) las cuales se encuentran usualmente acetiladas y forman cadenas ramificadas. Además, está constituida por azúcares ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, unidos por enlaces β -1,4 y en ocasiones por enlaces β -1,3 (Figura 4). La hemicelulosa posee ramificaciones laterales cortas (sustituciones), que están

formadas por diferentes azúcares. Dichas sustituciones se clasifican en xilanos, xiloglucanos, mananos, glucomananos y glucanos unidos por enlaces β -1,4 o β -1,3. El xilano es el componente estructural más abundante de la hemicelulosa (70 % aproximadamente) y está formado por la unión β -1,4 de unidades de D-xilosa (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011). Las posibles configuraciones del xilano son glucoarabinoxilanos, glucoronoxilano y glucomanano.

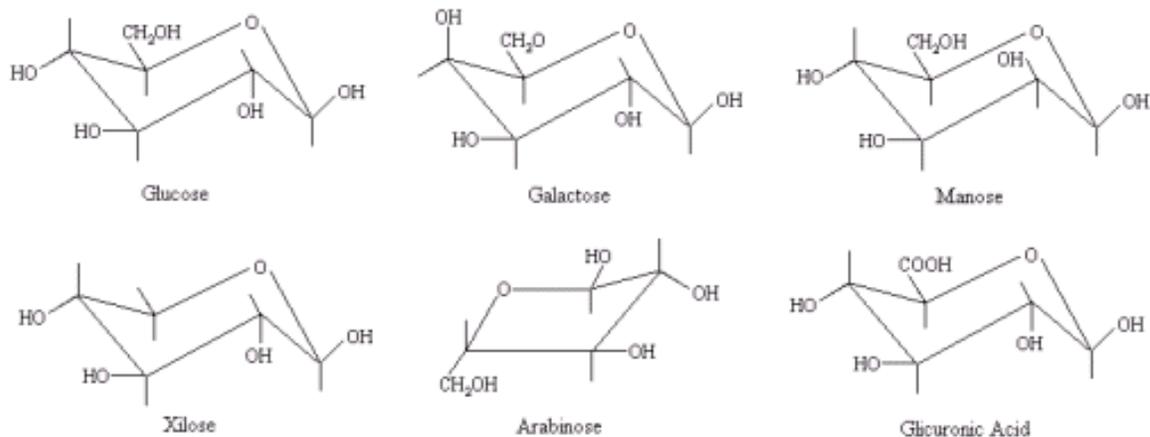


Figura 5

Polisacáridos que componen a la hemicelulosa, tanto pentosas como hexosas. (<http://www.chereseach.engin.umich.edu/savage/hemicelluloses.jpeg>)

1.2.3.- Lignina

La lignina es el componente más importante presente en la pared celular de la planta madura. Se considera que la lignina cumple dos funciones fundamentales en los vegetales: Dar resistencia y servir de pegamento a la pared celular y aportar resistencia al ataque de los microbios. La lignina comprende aproximadamente entre el 20 y 30% del total del peso seco de la biomasa vegetal (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011). Es un heteropolímero irregular, insoluble y ramificado, formado por la polimerización de tres alcoholes aromáticos del tipo fenilpropano: alcohol coumarílico, coniferílico y sinapílico, los cuales se mantienen unidos por enlaces C-C y enlaces del tipo éter entre los anillos aromáticos (Figura 5) (Quiroz Castañeda &

Folch Mallol, 2011). En conjunto con la hemicelulosa, forma una matriz amorfa donde las fibras de celulosa están embebidas y protegidas de la degradación.

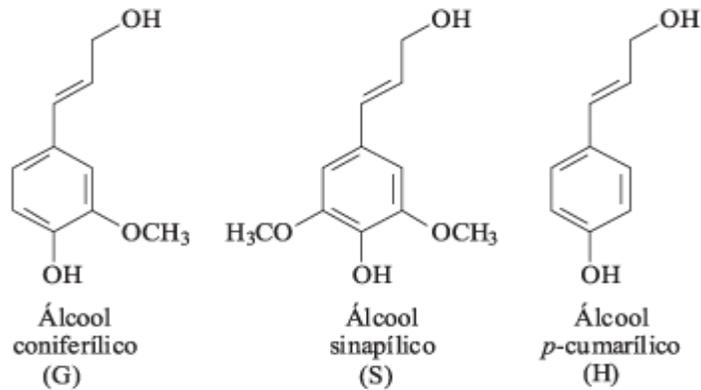


Figura 6

Estructura de la lignina, formada por la polimerización de tres alcoholes fenólicos (<http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v31n8/23f1.gif>)

Algunos hongos y bacterias pueden crecer sobre materiales lignocelulósicos como única fuente de carbono debido a que poseen la potencialidad de biodegradarla. Estos organismos se denominan lignocelulolíticos.

1.3.- Organismos capaces de degradar los componentes de la lignocelulosa

La degradación natural de la celulosa es llevada a cabo por numerosos microorganismos. Entre éstos hay bacterias y hongos, aerobios y anaerobios, mesófilos y termófilos.

Todos los organismos capaces de degradar celulosa cristalina secretan un conjunto de celulasas con diferentes especificidades y modo de acción, que actúan sinérgicamente para hidrolizar la celulosa.

Entre las bacterias ligninolíticas se destacan las bacterias aerobias del orden *Actinomycetales* (*Phylum Actinobacteria*) (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011). Asimismo se han estudiado a profundidad varios sistemas enzimáticos celulolíticos y xilanolíticos presentes en bacterias aerobias como *Pseudomonas fluorescens* subesp. *cellulosa*, *Streptomyces lividans* y *Cellulomonas fimi*, entre otras (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011). Por otra parte, en las bacterias anaerobias del orden *Clostridiales* (*Phylum firmicutes*) se han identificado complejos enzimáticos celulolíticos denominados celulosomas, los cuales resultan muy atractivos para la industria debido a su fuerte actividad celulolítica. Sin embargo, la caracterización de los componentes enzimáticos de los celulosomas son usualmente muy difíciles de estudiar. Se ha demostrado que los componentes proteínicos de los celulosomas no funcionan adecuadamente cuando son separados del complejo supramolecular donde están embebidos. Entre las bacterias anaerobias con propiedades celulolíticas y xilanolíticas podemos referir a *Butyrivibrio fibrisolvans*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Clostridium cellulovorans*, *C. cellulolyticum* y *C. thermocellum*, entre otros (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011)

Algunos hongos basidiomicetos son lignocelulolíticos, los cuales han sido estudiado ampliamente en los últimos cinco años, en particular los que pertenecen a los géneros *Trametes*, *Pycnoporous*, *Bjerkandera*, *Schyzophylum*, *Phanaerochaete* y *Bjerkandera*, entre otros. También existen ascomicetos muy estudiados como degradadores de biomasa, como son las especies de *Aspergillus* y *Trichoderma*.

Los hongos son productores por excelencia de enzimas lignocelulolíticas, además tienen la capacidad metabólica de colonizar diferentes sustratos lignocelulósicos

como única fuente de carbono y energía, incluso en condiciones de baja actividad de agua. Uno de los hongos extensamente estudiados ha sido el hongo aerobio y mesófilo *Trichoderma reesei*. Dicho hongo secreta el sistema enzimático celulasa en cantidades importantes, siendo capaz de hidrolizar totalmente celulosa cristalina; sus enzimas son estables durante varios días a 45 °C y pH 5. (Macarron Larrumbe , 1992)

La fermentación en estado sólido (crecimiento de microorganismos sobre soportes sólidos húmedos en ausencia de agua libre) con hongos es uno de los métodos más empleados para la producción de enzimas lignocelulolíticas con aplicaciones industriales (Botella, Ory, Webb, Cantero, & Blandino, 2002). Debemos mencionar que entre los hongos, los ascomicetos y basidiomicetos son probablemente los mejores productores de estas enzimas, y por ende los más estudiados. De forma resumida en la Tabla 3 se listan algunos hongos celulóliticos aerobios y anaerobios, así como las enzimas que producen cada uno de ellos. (Macarron Larrumbe , 1992)

Tabla 3

Hongos celulóliticos aerobios y anaerobios, enzimas que producen, y el sustrato que degradan. Recopilado de Dashtban M, Schraft H, Qin W (Dashtban, Schraft, & Qin, 2009) y Quiroz-Castañeda (Quiroz Castañeda , y otros, 2009)

	Grupo	Hongo	Enzimas que produce	Sustrato
Hongos aerobios (Enzimas lignocelulolíticas extracelulares)	Ascomicetos	<i>Trichoderma reesei</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL), hemicelulasas (xilanasas)	Paja de trigo
		<i>Trichoderma harzianum</i>	Celulasas (CMCasa, CBH)	Paja de trigo
		<i>Aspergillus niger</i>	Celulasas, xilanasas	Bagazo de caña de azúcar
	Basidiomicetos	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL, peroxidadas, hemicelulasas (xilanasas)	Aserrín de cedro, semillas de uva, cascarilla de centeno
		<i>Fomitopsis palustris</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL)	Celulosa microcristalina
		<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL), hemicelulasas (xilanasas)	Paja de trigo, aserrín de cedro, cascarilla de arroz, rastrojo de maíz, cascarilla de <i>Jatropha</i>
		<i>Bjerkandera adusta</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL), hemicelulasas (xilanasas)	Paja de trigo, aserrín de cedro, cascarilla de arroz, rastrojo de maíz, cascarilla de <i>Jatropha</i>
Hongos anaerobios (Celulosomas)	Anaeromyces	<i>Anaeromyces mucrunatus</i>	Celulasas (CMCasa), hemicelulasas	Heno
	Caecomyces	<i>Caecomyces comunis</i>	Celulasas y hemicelulasas	Olote de maíz
	Neocalimastix	<i>Neocalimastix frontalis</i>	Celulasas y hemicelulasas	Fibra de algodón, paja de trigo
	Piromyces	<i>Piromyces</i> sp.	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL), hemicelulasas (xilanasas y mananasas)	Olote de maíz
	Orpinomyces	<i>Orpinomyces</i> sp.	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL), hemicelulasas (xilanasas y mananasas)	Paja de trigo

1.4.- Enzimas que participan en la hidrólisis de la lignocelulosa

La presencia de enzimas con la capacidad de degradar los componentes de la lignocelulosa es primordial para poder disponer de los azúcares contenidos en su estructura, así como de otros componentes como ácidos y fenoles, entre otros. Entre las enzimas fundamentales para la degradación de cada uno de los componentes de la lignocelulosa encontramos: celulasas, xilanasas, esterases, lacasas y peroxidasas. A continuación se describen las generalidades de algunas de ellas (Tabla 4).

Tabla 4

Generalidades de las enzimas que participan en la hidrólisis de la lignocelulosa.

Celulasas	Xilanasas	Lacasas	Peroxidasas
<p>Exoglucanasas o celobiohidrolasas: Estas enzimas representan del 40 al 70% del componente total del sistema de celulasas y pueden hidrolizar la celulosa cristalina. Son enzimas monoméricas, con una masa molecular entre los 50 y los 65 kDa, aunque en algunos hongos como <i>Sclerotium rolfsii</i> son más pequeñas (41.5 kDa) (Sadana & Patil , 1988)</p>	<p>Son las principales enzimas que participan en la degradación de la hemicelulosa. En este grupo se encuentran las endoxilanasas que actúan sobre la cadena principal del polisacárido, rompen los enlaces entre las unidades de xilano, y liberan oligosacáridos. Las β-xilosidasas liberan xilosa a partir del rompimiento del enlace de los oligosacáridos de xilano (Aro, Pakula, & Penttila, 2005).</p>	<p>Estas enzimas oxidan la lignina y generan radicales aromáticos altamente inestables que favorecen su despolimerización, mediante el rompimiento del enlace éter C4, el rompimiento del anillo aromático y la demetoxilación. Se han identificado en hongos basidiomicetos como <i>P.chrysosporium</i>, <i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>T. versicolor</i> y <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Dantán-González, y otros, 2008)</p>	<p>Se han caracterizado dos grupos de peroxidasas: la lignino peroxidasa y la peroxidasa dependiente de manganeso, las cuales son oxidorreductoras que catalizan reacciones oxidativas de compuestos fenólicos y no fenólicos dependientes de peróxido de hidrógeno necesarias para la degradación de la lignina (Pérez, Muñoz-Dorado, De la Rubio , & Martínez , 2002)</p>
<p>Endoglucanasas: Escinden aleatoriamente en sitios amorfos internos de la cadena de celulosa, generando oligosacáridos de diferentes longitudes y nuevos extremos de la cadena, susceptibles de ser hidrolizados por exoglucanasas (Aro, Pakula, & Penttila, 2005)</p>			
<p>B-glucosidasas: Hidrolizan la celobiosa y liberan dos moléculas de glucosa, lo cual contribuye a proveer una fuente de carbono fácilmente metabolizable (Aro, Pakula, & Penttila, 2005).</p>			

Además, la relación estructura-función en celulasas en especial las que presenta *T. reesei* comparten una arquitectura común: el centro activo se localiza en un dominio o núcleo catalítico; uno de los extremos de la proteína consiste en un dominio de unión a celulosa; ambos dominios se unen mediante una bisagra glicosilada (Figura 7). Más de 60 celulasas y xilanasas de diverso origen han sido clonadas y secuenciadas. Muchas de estas β -glicanasas presentan una organización similar a la descrita para las celulasas de *T. reesei* (Macarron Larrumbe , 1992).

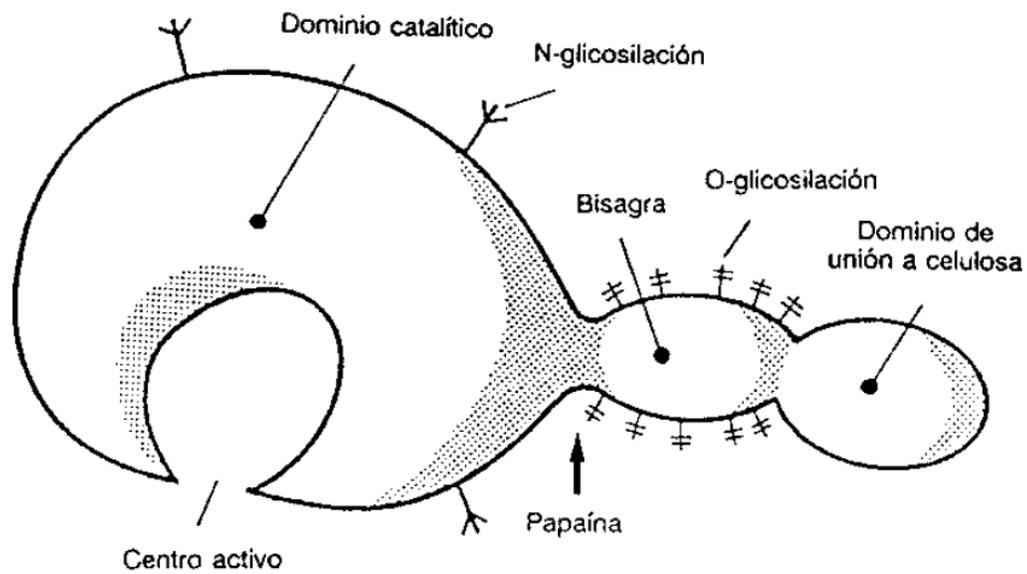


Figura 7

Modelo de estructura tridimensional de una enzima celulolítica de *T. reesei*. Se señala el punto de ataque proteolítico por papaína en CBH I y CBH II (Macarron Larrumbe , 1992).

1.4.1.- Mecanismo de la hidrólisis enzimática de celulosa

El primer modelo para explicar el mecanismo de la hidrólisis enzimática de celulosa fue propuesto por Reese en 1950; según este modelo, la celulosa sería activada por un factor de hinchamiento o activador, enzima no hidrolítica C_1 ; a continuación actuaría una enzima hidrolítica C_x ; la celobiosa sería hidrolizada hasta glucosa por β -glucosidasas (Figura 8) (Macarron Larrumbe , 1992).

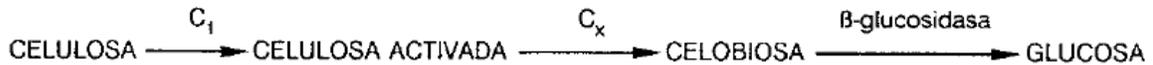


Figura 8

Mecanismo de la hidrólisis enzimática de celulosa según el modelo de Reese (Macarron Larrumbe , 1992)

Pocos años después, Gilligan y Reese describieron por primera vez el sinergismo entre las enzimas celulolíticas en la digestión de la celulosa; la hidrólisis de sustratos insolubles por una combinación de EGs y CBHs es mucho más efectiva que lo que cabría esperar de la suma de sus capacidades hidrolíticas individuales. Las bases moleculares del sinergismo no están aclaradas; el grado de sinergismo depende de la composición de las mezclas enzimáticas empleadas (Macarron Larrumbe , 1992). No obstante, el análisis de la adsorción de las celulasas a las fibras de celulosa es fundamental en el estudio cinético de la hidrólisis ya que es un prerrequisito para que tenga lugar la reacción. La capacidad de adsorción varía de una enzima a otra y también es distinta la afinidad de cada celulosa por las distintas regiones presentes en el sustrato. La adsorción debe jugar un papel importante en los fenómenos de sinergismo.

1.5.- Proteínas con la capacidad de remodelar la pared celular

1.5.1.- Generalidades

Anteriormente hemos analizado la estructura de la lignocelulosa, y también las actividades enzimáticas fundamentales necesarias para su degradación. Sin embargo, ¿las actividades enzimáticas serán suficientes para degradar con eficacia a la lignocelulosa? Esta es una interrogante muy interesante, y es por ello que debemos mencionar la existencia de proteínas denominadas amorfogénicas, las cuales se han visto involucradas en la relajación de la pared celular vegetal, atribuyéndoles asimismo un papel importante en la producción de un número mayor de azúcares fermentables. Es por ello que se han estudiado las proteínas amorfogénicas de tipo expansina que tienen un efecto positivo en la relajación de la pared celular, debido a que son proteínas que tienen la capacidad de provocar “doblez y/o torsiones” en la estructura de la pared celular, impidiendo así el arreglo ordenado de los enlaces no covalentes (interacciones entre átomos de hidrógeno), los cuales mantienen unidos los filamentos de celulosa, por ejemplo (Figura 9).

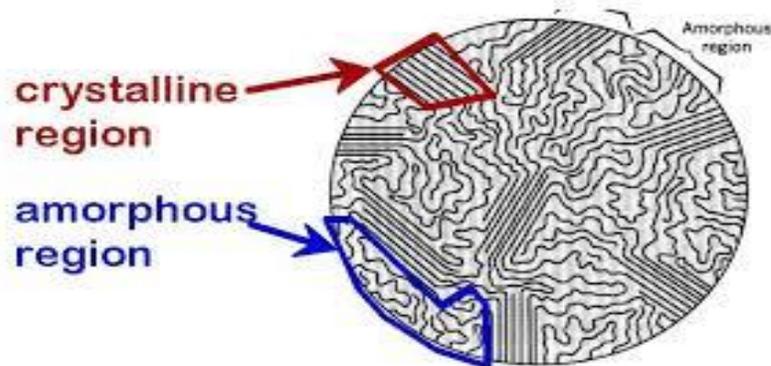


Figura 9

Se muestra la estructura de la fibra de celulosa en un corte transversal. Se indican las zonas altamente organizadas (regiones cristalinas) y las zonas amorfas (regiones con menos organización). De este modo se pretende mostrar de manera muy general el efecto que pueden tener las proteínas amorfogénicas para crear regiones puntuales desorganizadas (amorfas) aumentando así la susceptibilidad para ser degradadas por enzimas celulolíticas.

La formación de puentes de hidrógeno entre los filamentos de celulosa estabiliza su estructura y aumenta así su cristalinidad, lo cual confiere mayor resistencia a la degradación. Desde el punto de vista enzimático las interacciones que conforman la arquitectura estructural de la pared celular constituyen un verdadero impedimento que dificulta la actividad de las celulasas. Las interacciones mediadas por puentes de hidrógeno en la lignina y en la hemicelulosa provocan la aparición de zonas cristalinas o regiones muy ordenadas molecularmente, las cuales dificultan su degradación.

Lo anterior resulta en que las proteínas amorfogénicas comiencen a ser el centro de numerosas investigaciones científicas para describir su utilidad biotecnológica y mecanismos moleculares de acción. Entre estas proteínas podemos citar las expansinas, looseninas y swolleninas (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011). No obstante, existen aún muchas dudas en la industria respecto a la actividad de estas proteínas, y sobre el efecto que tienen en la estructura de la lignocelulosa, y por tanto sobre una eventual aplicación biotecnológica sostenible, sustentable y viable desde el punto de vista operativo en biorefinerías. También existen grandes incertidumbres entorno al mecanismo molecular de acción de las proteínas amorfogénicas.

En la Tabla 5 se enlistan organismos que presentan proteínas pertenecientes a miembros de la superfamilia expansina y otras proteínas tipo expansinas:

Tabla 5

Organismos que contienen proteínas miembros de la superfamilia expansina y otras proteínas tipo expansinas (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011).

Miembros de la superfamilia expansina				
Organismo	EXPA	EXPB	EXLA	EXLB
<i>Arabidopsis</i>	26	6	3	1
Arroz	33	18	4	1
Álamo ^a	27	3	2	4
Papaya ^a	15	3	1	0
<i>Physcomitrella patens</i>	27	7	0	0
<i>Globodera rostochiensis</i>	0	1	0	0
<i>Zea mays</i>	5	8	0	0
<i>Triticum aestivum</i> ^a	30	0	0	0
<i>Pinus taeda</i>	7	1	1	1

Proteínas con actividad tipo expansina		
Organismo	No.	Tipo de proteína
<i>Trichoderma reesei</i> ^a	3	Proteína tipo expansina
<i>Trichoderma reesei</i>	1	Swollenina
<i>Bjerkandera adusta</i>	1	Loosenina
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	Swollenina
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	Swollenina
<i>Trichoderma asperellum</i>	1	Swollenina
<i>Postia placenta</i> ^a	7	Proteína tipo expansina
<i>Dictyostelium discoideum</i> ^a	5	Proteína tipo expansina
<i>Bacillus subtilis</i>	1	EXLX
<i>Hahella chejuensis</i>	1	EXLX
Arroz ^a	80	Proteína tipo expansina
<i>Laccaria bicolor</i> ^a	11	Proteína tipo expansina
<i>Pleurotus ostreatus</i> ^a	1	Proteína tipo expansina
<i>Neurospora crassa</i> ^a	2	Proteína tipo expansina

1.5.2.- Expansinas

Reportes recientes involucran a las expansinas con la actividad de relajamiento de la pared celular. Se ha propuesto que lo hacen mediante la interrupción de interacciones no covalentes entre las microfibrillas de celulosa por medio de mecanismos no enzimáticos. Las expansinas han sido involucradas también en la organogénesis, iniciación de hojas, la maduración del fruto, la formación de micorrizas, el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas, el desarrollo de plantas parásitas, y la rehidratación de la planta de resurrección *Craterostigma plantagineum*, que se curva cuando se seca y se expande cuando se hidrata. Además, las expansinas se han visto involucradas en funciones relacionadas con la penetración del tubo polínico del estigma.

Dentro de sus características estructurales importantes podemos resaltar las siguientes: contienen entre 250 y 275 aminoácidos y tienen una masa molecular promedio de 25 a 28 kDa (Suzuki, y otros, 2014). De manera semejante a las celulasas, están organizadas en una estructura modular de dos dominios y un péptido señal de aproximadamente 20 aminoácidos ubicado en la región amino terminal (Quiroz Castañeda & Folch Mallo, 2011). El dominio 1 tiene un plegamiento denominado DPBB (*Double Psi Beta Barrel*) el cual se encuentra localizado en el extremo amino terminal y es homólogo al dominio catalítico de las proteínas glucosil hidrolasas de la familia 45 (GH45), que incluye principalmente a β -1,4 endoglucanasa de origen fúngico (Quiroz Castañeda & Folch Mallo, 2011). Este dominio es sumamente importante puesto que relaciona a las expansinas con la actividad de relajamiento sobre la estructura de la pared celular. En este dominio se encuentran los aminoácidos que interactúan con carbohidratos, y polímeros en general. Las expansinas presentan además un dominio 2, localizado en el extremo C-terminal. El dominio 2 es homólogo a las proteínas del grupo 2 de los alérgenos del polen (Quiroz Castañeda & Folch Mallo, 2011). Sin embargo, se ha planteado que este dominio podría también participar en la unión a polisacáridos debido a la presencia de aminoácidos aromáticos y polares en la superficie de la proteína, donde dos triptófanos y una tirosina forman una plataforma plana de residuos aromáticos que

podiera favorecer la unión a complejos de carbohidratos (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011)

La clasificación de las expansinas de plantas arroja cuatro familias: α -expansina (EXPA), β -expansina (EXPB), expansinas de tipo α (EXLA), las expansinas de tipo β (EXLB) (Quiroz Castañeda , Martínez Anaya , Cuervo Soto, Segovia , & Folch Mallol, 2011). Ambos grupos de proteínas tanto las α -expansinas y las β -expansinas “trabajan” de manera similar, pero en diferentes polímeros de la pared celular (Cosgrove *et al*, 2002). La familia EXPA incluye proteínas que participan en el relajamiento y extensión de la pared celular, por un mecanismo dependiente del pH. Estas proteínas participan en procesos del desarrollo como la organogénesis, la degradación de la pared celular durante la maduración de frutos y otros, donde la extensión de la pared es crucial (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011). La familia EXPB incluye a los alérgenos del polen del grupo I de pastos. Estas proteínas son secretadas por los granos de polen y se ha propuesto que entre sus funciones biológicas se listan suavizar el estigma y los tejidos del estilo, para facilitar la penetración del polen a través del tubo polínico. En contraste con las EXPA y EXPB, las EXLA y EXLB a pesar de poseer los dos dominios característicos de las expansinas, su secuencia de aminoácidos diverge de manera considerable. Como podemos ver en la Figura 10, se puede observar la presencia del motivo HFD que forma parte del sitio catalítico de las endoglucanasas, está presente únicamente en EXPA y EXPB, (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011).

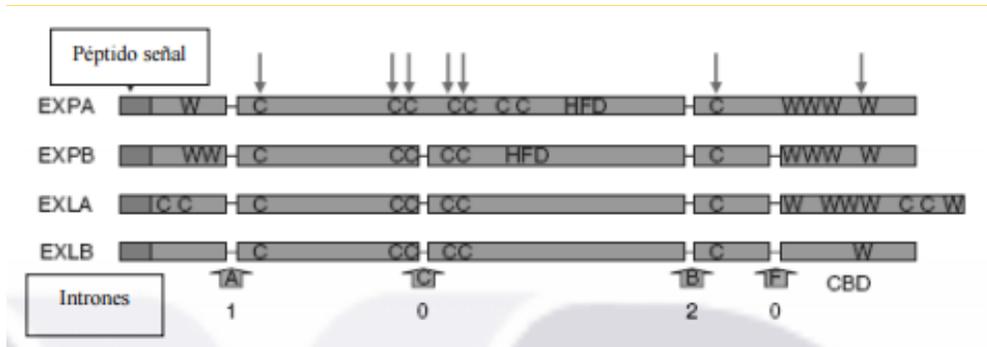


Figura 10

Se muestra la estructura de cada una de las familias de expansinas. Las regiones altamente conservadas, cisteína, el dominio HFD (presente únicamente en las EXPA y EXPB) y triptófano se pueden apreciar en el esquema. Las flechas superiores indican los residuos de aminoácidos así como el péptido señal. Las flechas inferiores indican el nombre y la posición de los intrones. El dominio hipotético de unión a polisacárido (CBD) (Choi et al., 2008).

La distribución de las expansinas en las plantas es muy amplia ya que mediante diversos estudios como inmunolocalización o análisis de expresión de genes de expansina, los cuales tienen como finalidad evaluar la función biológica de las expansinas se han podido localizar estas proteínas en frutos, fibras de algodón, fibras de celulosa, fibras de quitina y polen, y su expresión se ha comprobado en hojas y raíces (Cosgrove, 2005). Así mismo, su expresión es diferencial dependiendo de órganos, tejidos y células; y bajo condiciones hormonales específicas, factores ambientales y luz (Cosgrove et al., 2002). Un ejemplo de ello es el tomate donde la formación de primordios foliares de meristemo apical se observó una sobreexpresión de α -expansinas en el sitio de formación de hojas y ramas (Reinhardt et al., 1998). En maíz la expresión de algunas expansinas se comprobó en la región de crecimiento radical (Es un proceso que se lleva a cabo en el meristemo apical de la raíz, mediante el cual se da origen a la formación de células que se diferencian más tarde para dar lugar a este tejido) de α -expansinas y β -expansinas; y son reguladas por déficit hídrico (Wu, et al., 2001); en pastos las expansinas están involucradas con el crecimiento y diferenciación celular (Reidy et al., 2001). Para el caso del arroz, la expresión de expansinas se induce por giberelinas (son un tipo de regulador de crecimiento que afecta a una amplia variedad de fenómenos de desarrollo en las

plantas, incluidas la elongación celular y la germinación de las semillas) y controlan parcialmente el crecimiento internodal (Lee et al., 2001).

Trabajos realizados por Cho y Kende (1997) identificaron varios genes de expansinas en arroz, Rose et al., (1997) identificaron expansinas en tomate, mientras en fresa lo hizo Civello et al. (1999) y en soya Downes y Crowell (1998). También se han identificado algunas expansinas en el pasto *Festuca pratensis* (Reidy et al., 2001), en maíz (Wu, et al., 2001) y en *Arabidopsis thaliana* (Cho y Cosgrove, 2002). También se han identificado expansinas en grupos de plantas inferiores (son aquellas plantas que carecen de raíz y tejidos especializados para llevar a cabo el transporte interno de agua y savia) como lo son las plantas sin semilla, tales como en los helechos *Marsilea quadrifolia*, *Regnellidium diphyllum* (Kim et al., 2000) y la planta superior (Plantas que poseen raíz y tejidos especializados) *Craterostigma plantagineum* (Jones y McQueen-Mason, 2004), e incluso en el musgo *Physcomitrella patens*, donde fueron encontradas α -expansinas (Carey y Cosgrove, 2007). Mediante pruebas de inmunolocalización se ha determinado la localización de expansinas en los meristemas apicales los cuales son los responsables de la formación del cuerpo primario de la planta, en este caso en las zonas de crecimiento de la raíz y el tallo, así como en la formación del primordio de la hoja en los meristemas apicales y en las paredes de células de la epidermis durante la formación de raíces (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011).

En general las proteínas amorfogénicas y en particular las expansinas, han sido pobremente estudiadas en microorganismos. Sin embargo, existen reportes de expansinas bacterianas, dentro de los cuales se incluyen la expansina BsExl1 de *Bacillus subtilis*, PcExl1 de la bacteria patógena *Pectobacterium carotovorum*, HcExl2 de la bacteria marina *Hahella chejuensis* y la expansina (ScExl1) de *Schizophyllum commune* (Figura 11). BsExl1 es la expansina mejor caracterizada y su estructura se ha estudiado mediante cristalografía y sus características están depositadas en el Protein Data Base (Tovar, y otros, 2015) (Figura 8).

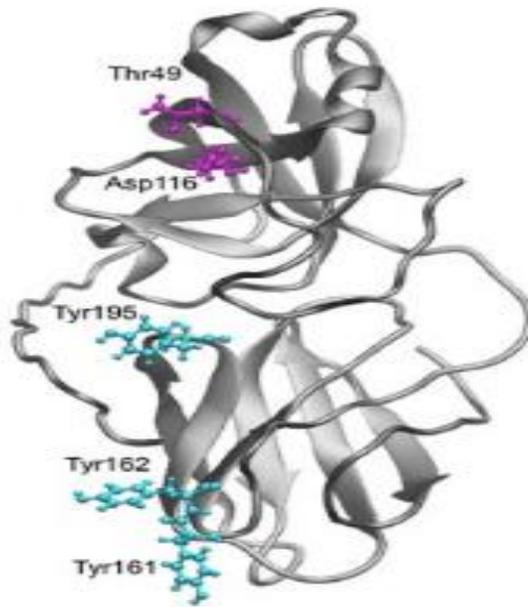


Figura 11

Estructura de ScExlx1 y la comparación con otras proteínas previamente cristalizadas. Modelo tridimensional propuesto para ScExlx1. Los aminoácidos conservados entre expansinas vegetales y expansinas microbianas en el Dominio 1 se representan con el color magenta (Thr-49 y Asp-116). Los residuos de unión a polisacárido en el dominio 2 están representados con el color cian (Tyr-160, Tyr-161 y Tyr-195).

Así mismo, se han obtenido reportes de otras expansinas, pero en hongos. La proteína Asper-Exp del hongo *Aspergillus niger* es un ejemplo de las expansinas estudiadas en hongos. Sin embargo, su actividad sobre fibras de celulosa no ha sido demostrada ni estudiada. Otra de las expansinas estudiadas y caracterizadas en hongos es el caso de la expansina ScExlx1 obtenida del hongo basidiomiceto de podredumbre blanca *Schizophyllum commune*. ScExlx1 demostró tener “actividad” sobre fibras de celulosa y también sobre quitina. Estas “actividades” se demostraron al incubar la expansina ScExlx1 con fibras de algodón y quitina. La incubación mencionada anteriormente permitió la interacción de la expansina sobre las fibras de algodón y quitina. Luego de la interacción (incubación) se adicionaron enzimas hidrolíticas específicas para celulosa y quitina, y se evidenció un aumento significativo en la liberación de azúcares vs las fibras no tratadas con expansina y expuestas del mismo modo a las enzimas hidrolíticas (Ver figura 12).

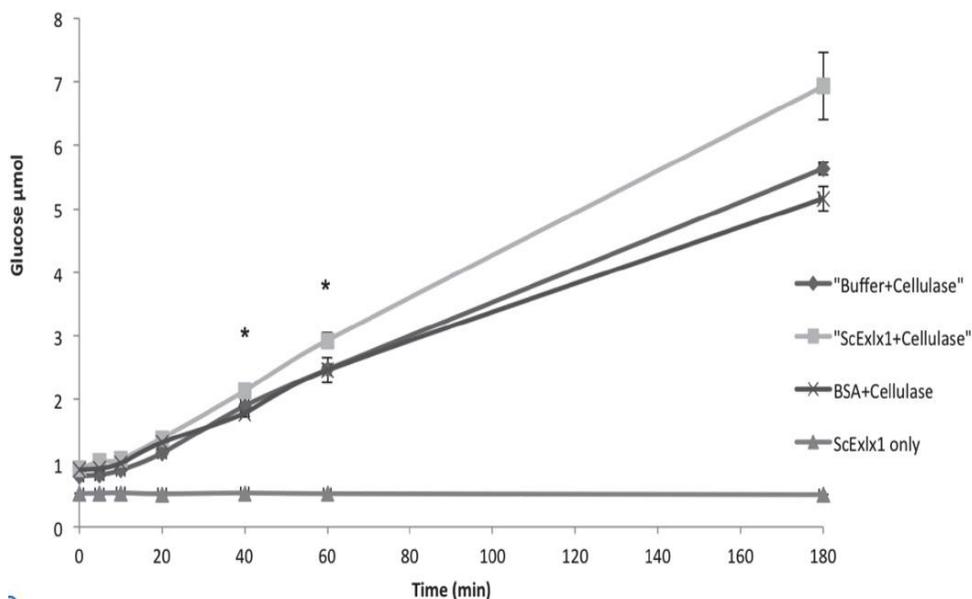


Figura 12

En esta gráfica se muestra la actividad de la expansina ScExlx1, asimismo se muestra la actividad utilizando celulasas o utilizando únicamente ScExlx1 sobre la celulosa. Se puede observar que hubo un número mayor de azúcares reductores liberados al utilizar celulosa pretratada con ScExlx1 y agregando posteriormente la celulasa. (Gráfica obtenida de "A novel expansin protein from the white-rot fungus *Schizophyllum commune*).

Por tanto, los resultados anteriores permiten sugerir que la expansina ScExlx1 de *Schizophyllum commune* probablemente "relaja" la estructura de las fibras de quitina o celulosa y permite mayor accesibilidad y difusión de las enzimas hidrolíticas en el entramado molecular. Posiblemente ScExlx1 impide las interacciones por puente de hidrógeno entre los filamentos de celulosa, por ejemplo, y desestabiliza la estructura cristalina en el polímero. Algo similar se hipotetiza para la quitina, debido a que se llevó a cabo un experimento donde se incubaron 5 mg de quitina con ScExlx1 (50 o 100 µg) en buffer de fosfato (100 mM), a un pH de 7.4 durante 24 horas a 25 °C. Después de la incubación, la quitinasa de *Streptomyces griseus* (0.25 U) fue añadida en 1 mL de reacción y se incubó por 2 horas a 37 °C. Las reacciones fueron centrifugadas a 13 000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y 500 µl del sobrenadante fueron mezclados con 500 µl de DNS y hervidos durante 5 minutos. La cantidad de azúcares reductores (Son mono y oligosacáridos que contienen un grupo aldehído o cetónico libre que presenta un efecto sobre ciertos agentes oxidantes)

liberados fue determinado por el método DNS usando N-acetil glucosamina (NAG). Este experimento dio como resultado la liberación de una cantidad de NAG dos veces más en contraste con el obtenido al utilizar únicamente la quitina con BSA (Tovar, y otros, 2015).

Como consecuencia de la interacción de ScExlx1 con las fibras de algodón se evidenció la formación de zonas ensanchadas, lo cual se denominó “efecto burbuja”, como se muestra en la Figura 13. El efecto anterior demuestra que ScExlx1 se unió a las fibras de algodón y los resultados anteriores demuestran que ScExlx1 actúa de manera sinérgica con algunas enzimas como son las celulasas y quitinasas (Tovar, y otros, 2015).

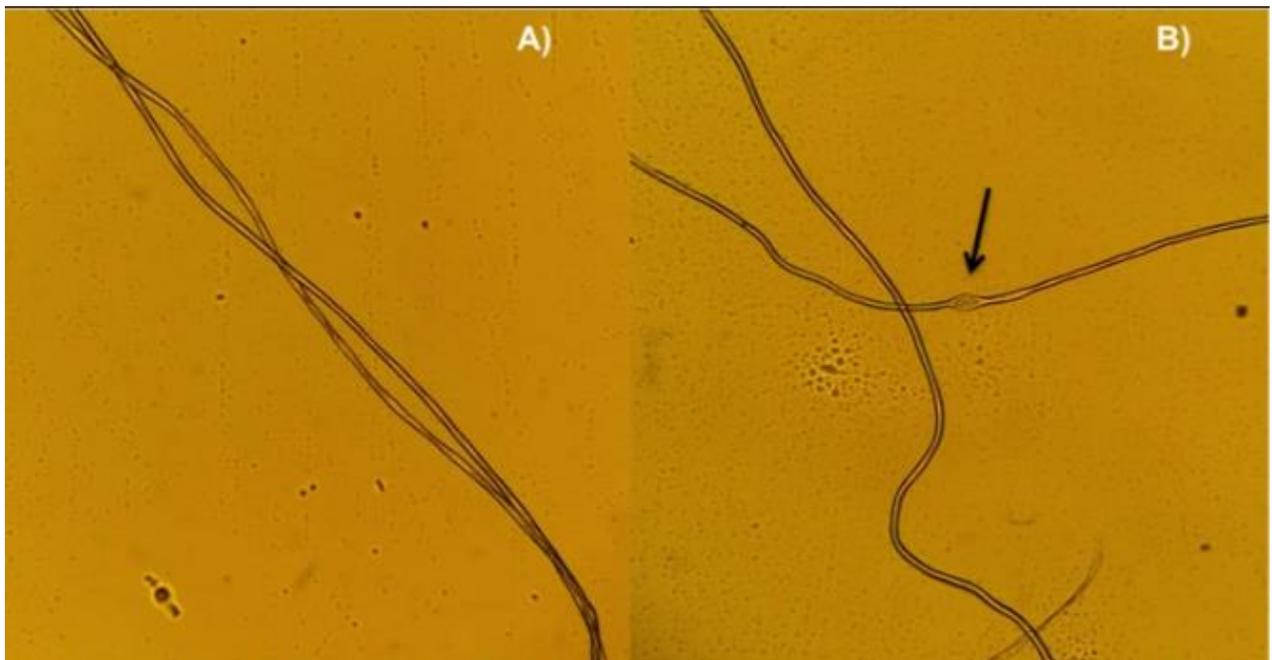


Figura 13

(A) Microscopia de luz (10x) de fibras de algodón y Avicel incubados con ScExlx1. (B) Efecto “burbuja” sobre las fibras de algodón generados por ScExlx1

1.5.3.- Looseninas

La existencia de expansinas originó la búsqueda de nuevas proteínas con actividad de relajamiento de la pared celular vegetal, lo cual ha llevado a realizar nuevos estudios de las diversas secuencias existentes en la bases de datos de hongos. El estudio de librerías genómicas de hongo ha posibilitado la anotación y estudio de nuevas proteínas con actividad tipo expansina.

Un análisis de 768 secuencias obtenidas de una librería genómica sustractiva de *Bjerkandera adusta*, arrojó la secuencia denominada LOOS1, cuya proteína fue nombrado como loosenina. LOOS1 fue seleccionada por presentar una gran identidad con las proteínas presentes en especies de hongos tales como *Laccaria bicolor* (64%), *Schizophyllum commune* (53%) y *Flammulina velutipes* (54%) las cuales se encuentran anotadas como proteínas de tipo expansina (Quiroz Castañeda , Martínez Anaya , Cuervo Soto, Segovia , & Folch Mallol, 2011). La superposición del modelo de la loosenina de *B. adusta* con la estructura cristalizada para la expansina de *B. subtilis* permitió identificar la presencia del dominio DPBB y no del dominio 2, así como aminoácidos altamente conservados en posiciones superficiales de la estructura. En la loosenina, T31 y D105 corresponden a los dos residuos estrictamente conservados y que tienen una función importante en el reconocimiento y unión a carbohidratos. Las posiciones anteriores son equivalentes a T12 y D82 en EXLX1 de plantas (Quiroz Castañeda , Martínez Anaya , Cuervo Soto, Segovia , & Folch Mallol, 2011). Por tanto, los resultados anteriores demostraban la existencia de proteínas tipo expansinas, pero más cortas, con un dominio menos. Esta observación abre un panorama muy interesante no solo para la búsqueda de nuevas looseninas, sino también para el estudio bioquímico y molecular de estas nuevas secuencias tipo expansinas.

Entonces, tomando en consideración que únicamente existe un solo reporte de loosenina, la cual se ha demostrado tener actividad tipo expansina podemos referirnos que la loosenina (ejemplo, LOOS1) conserva únicamente el dominio 1 o DPBB, y no tiene el dominio 2, por ello se plantea que es una proteína más pequeña (aproximadamente 100 aminoácidos); esta única loosenina descrita hasta el

momento presenta un péptido señal de aproximadamente 19 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 11,4 kDa. Para la proteína LOOS1 de *B. adusta* se pronosticaron tres sitios de O-glicosilación en las posiciones 3, 105 y 107, y no se encontraron sitios de N-glicosilación (Quiroz Castañeda , Martínez Anaya , Cuervo Soto, Segovia , & Folch MalloI, 2011). Al igual que la expansinas, las looseninas tienen en el dominio DPBB los aminoácidos que interactúan con polímeros, especialmente con carbohidratos. De este modo se hipotetiza que la actividad de relajamiento de la pared celular que confieren estas proteínas (expansinas y looseninas), se debe a la presencia del dominio DPBB y no del dominio 2. Así este dominio (DPBB) explica la acción no enzimática sobre los enlaces no covalentes que mantienen unidas las microfibrillas de la celulosa, dando como resultado la formación de zonas amorfas a lo largo de la estructura de la misma, lo que hace a estas regiones más susceptibles ante la hidrólisis enzimática (Figura 14B). La loosenina LOOS1 mostró una actividad óptima a pH similares (pH ácido: 3) que la mayoría de las enzimas celulolíticas. Por tanto el hallazgo anterior permitiría una aplicación escalonada de esta loosenina con posteriores adiciones de celulasas. LOOS1 no es una proteína termoestable, probablemente debido al origen del aislado estudiado de *Bjerkandera adusta*. Debemos destacar nuevamente que LOOS1 es la única loosenina caracterizada funcionalmente hasta la fecha.

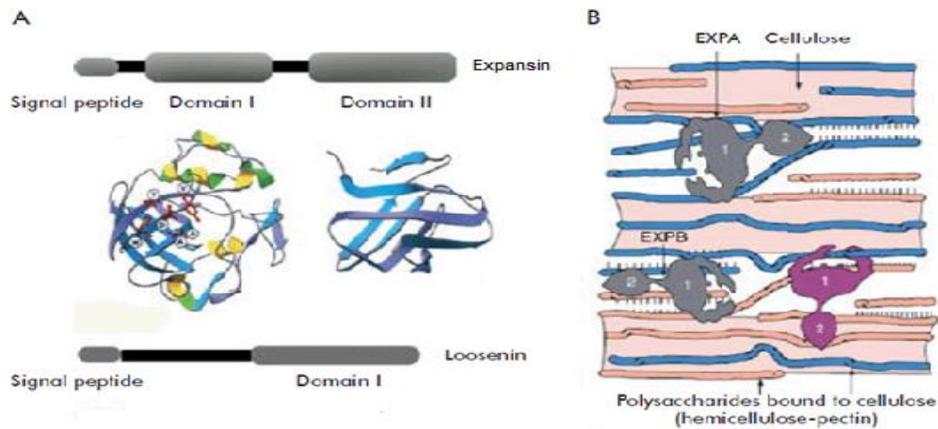


Figura 14

Estructura de la expansina, conformada por los dominios I y II, además de un péptido señal. Podemos observar además las estructuras en tercera dimensión de cada dominio, así como la estructura de una proteína similar a las expansinas denominada loosenina, la cual solo posee el Dominio I y el péptido señal (A). Se muestra así la actividad de relajamiento de la expansina a lo largo de la estructura de la celulosa, mediante la formación de burbujas lo que da como resultado las regiones amorfas (B).

Se plantea que los tratamientos con LOOS1 inducen interrupciones locales, favoreciendo la posterior acción de las enzimas hidrolíticas. Para LOOS1 se observó el mismo comportamiento evidenciado para la expansina ScExlx1. La incubación de fibras de algodón con LOOS1 y posterior tratamiento con celulasas, permitió una mayor liberación de azúcares fermentables en comparación con aquellos liberados por acción de las celulasas sobre fibras de algodón no tratadas con LOOS1. Por lo tanto, las looseninas pudieran también representar una alternativa de biotratamientos en la biomasa vegetal. Es probable que las looseninas puedan ser más atractivas que las expansinas para aplicaciones biotecnológicas debido a que al ser más pequeñas, no solo pueden mejorar significativamente sus propiedades bioquímicas como la difusión, sino también resulta más fácil su clonación, expresión heteróloga y purificación. También LOOS1 manifestó el efecto burbuja descrito para la expansina ScExlx1, lo cual se evidencia en la Figura 15.

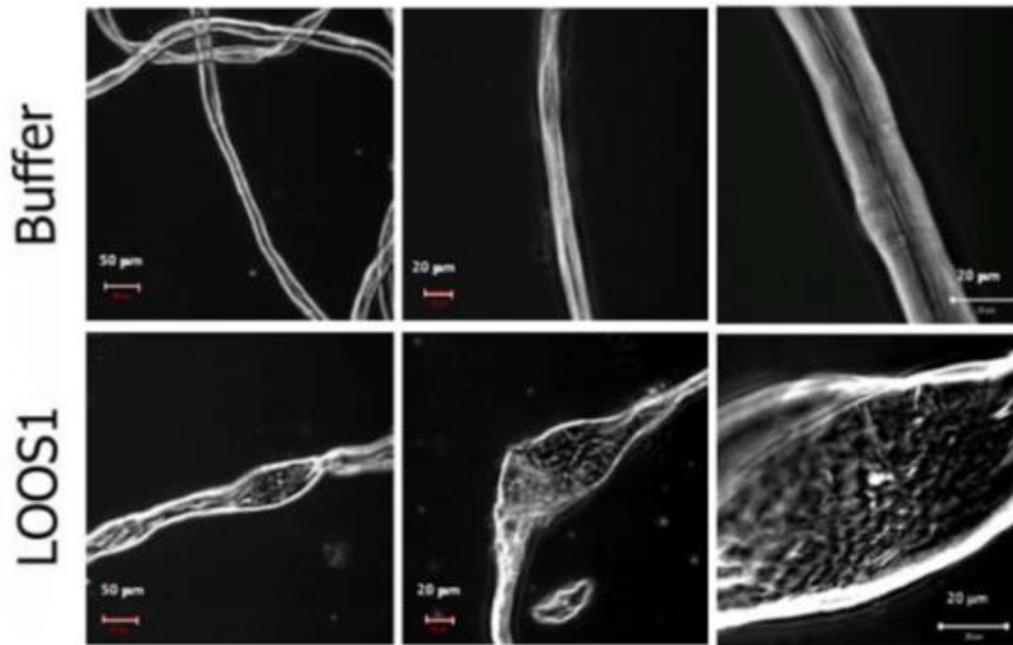


Figura 15

Se puede observar la actividad de las looseninas en cuanto a la formación de burbujas a lo largo de la celulosa. Lo cual se cree facilita la actividad enzimática y producir así mayor número de azúcares reductores (Quiroz Castañeda , Martínez Anaya , Cuervo Soto, Segovia , & Folch Mallol, 2011).

En resumen, las proteínas amorfogénicas tienen un papel muy importante en la relajación y disposición de los componentes de la pared celular, lo que nos hace suponer que favorecen un entorno con mayor grado de susceptibilidad ante la hidrólisis de las enzimas como son las celulasas. Originando así una mayor producción de azúcares reductores. Este resultado se muestra de manera gráfica a continuación (Figura 16 y 17).

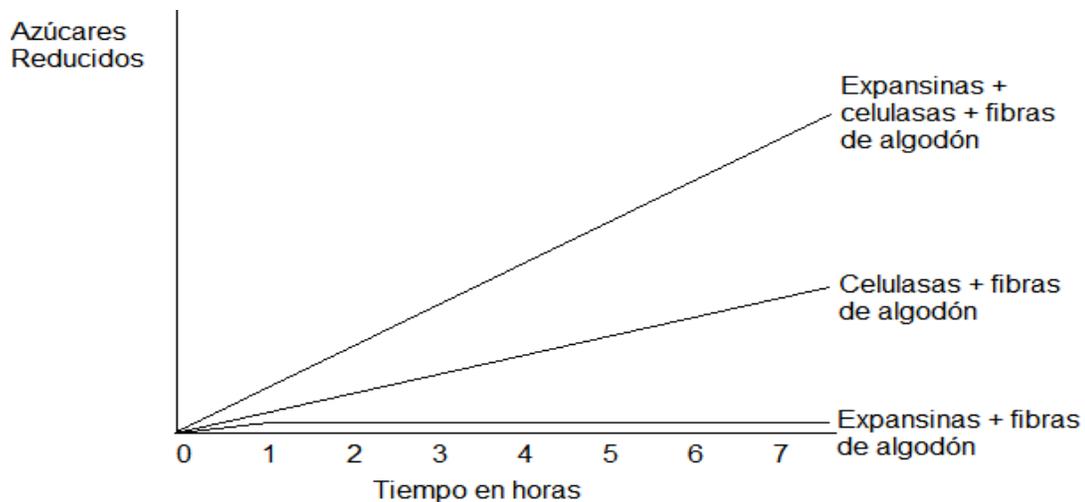


Figura 16

En esta grafica se muestra la cantidad de azúcares reductores producto de la degradación, como podemos ver la liberación de azúcares fue mayor cuando se utilizó la interacción de las expansinas, las fibras de algodón y posteriormente las celulasas, se puede notar que al colocar las celulasas y las fibras de algodón se obtuvo casi la mitad de azúcares, y se observa que la actividad de las expansinas por si solas no permite liberación de azúcares reductores, lo que concluye que las expansinas no poseen una actividad enzimática.

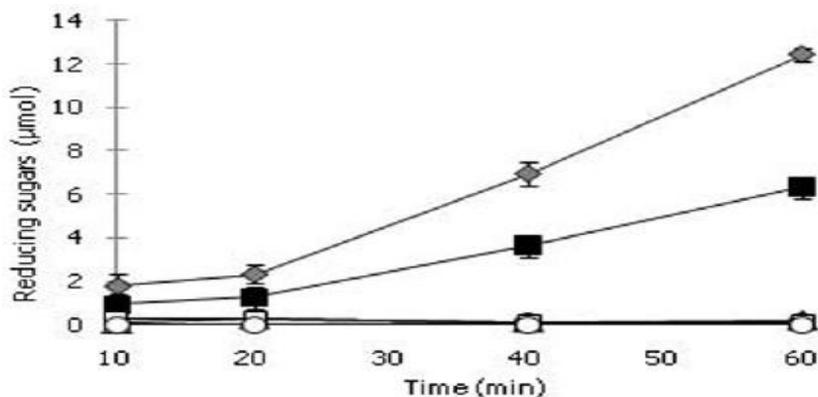


Figura 17

En esta gráfica se muestra la actividad de LOOS1 sobre fibras de algodón. El análisis se hizo a partir de dos concentraciones de LOOS1: la primera 20 µg indicado con el cuadro negro, la segunda concentración fue de 40 µg indicado con diamantes grises y por último el control utilizando únicamente LOOS1 ilustrado con el círculo blanco. Como podemos ver la liberación de azúcares reductores fue en relación a la concentración de LOOS1 utilizada, asimismo demostrando que por sí solo la LOOS1 carece de actividad enzimática (Grafica obtenida de "loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta*").

1.6.- Otras proteínas con actividad tipo expansina

1.6.1.- Swolleninas

Hablamos del papel tan importante en cuanto a la relajación de la pared celular, por parte de las expansinas y las loosenas. Sin embargo, debemos mencionar que existen otras proteínas que tienen una actividad similar. Es el caso de las swolleninas, las cuales se han identificado en hongos ascomicetos como *Trichoderma* y *Aspergillus* (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011). Saloheimo y cols. describieron la clonación y expresión en *S. cerevisiae* del gen de una swollenina, *swol* (regiones con hinchamientos, de ahí su nombre en inglés), de *T. reesei* que codifica para una proteína que modifica la estructura de la celulosa de las fibras de algodón, sin liberar azúcares reductores. Swol es una proteína con actividad tipo expansina de hongos con un tamaño mayor en comparación con el de las expansinas, comprendiendo aproximadamente 493 aminoácidos. Swol contiene un dominio de alérgeno de polen (extremo C-terminal) y un dominio de unión a celulosa (Extremo N-terminal) (Figura 18) (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011). En el extremo C-terminal de swol del dominio 2 presenta aproximadamente un 20% de identidad con expansinas vegetales. Varios de los residuos conservados y motivos característicos encontrados en expansinas se encuentran presentes también en la secuencia de swol, donde siete cisteínas conservadas sugieren ser funcionalmente importantes para las expansinas y ocho posiciones con aminoácidos aromáticos conservados sugieren la interacción con carbohidratos (Andberg, Penttilä, & Saloheimo, 2015).



Figura 18

Estructura de la swollenina: contiene un dominio de alérgeno del polen y un dominio de unión a celulosa (CBD).

Debemos resaltar que las proteínas con actividad tipo expansina también podrían mejorar los procesos de bioconversión de la celulosa, como en *Aspergillus fumigatus*, cuya swollenina purificada y en combinación con celulasas facilitaron la sacarificación de celulosa microcristalina (Avicel) (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011). Existen otros estudios que fundamentan la actividad de swollenina, entre ellos podemos mencionar a Chen que en el 2010 clonó y expresó heterológicamente la swollenina Afswo1 de *Aspergillus fumigatus* y demostró que esta proteína causaba disrupciones de celulosa a partículas más pequeñas sin detectar la generación de azúcares reductores. Kan en el 2013 hizo hallazgos similares con swollenina de *Penicillium oxalicum* y Jäger en el 2011 expresó la SWOI de *T. reesei* en *Kluyveromyces lactis*. Ellos mostraron mediante microscopia que se redujo la cristalinidad de la celulosa pretratada con SOWI (Andberg, Penttilä, & Saloheimo, 2015).

Sin embargo, existen otras swolleninas reportadas en hongos como *Trichoderma asperillum*, a las que se atribuye un papel importante en el proceso de colonización de las raíces de plantas de pepino, puesto que cuando se sobreexpresan en el hongo, se incrementa considerablemente la posibilidad de infección (Quiroz Castañeda & Folch Mallol, 2011).

1.6.2.- Cerato plataninas

Además de las swolleninas otras proteínas con actividad tipo expansinas son las cerato plataninas (CPs). Estas pequeñas proteínas de un tamaño aproximado de 120 aminoácidos (aproximadamente 12.4 kDa) fueron descritas por primera vez en el hongo patógeno *Ceratocystis platani*, el agente causal de tumores en la planta del plátano. Derivado del análisis del modelo tridimensional obtenido para la cerato platanina de *C. platani* se pudo observar la presencia del dominio DPBB, similar a lo que ocurre en endoglucanasas, expansinas y looseninas (Bacelli, Luti, Bernardi, Scala, & Pazzagli , 2013). Además de presentar el dominio DPBB en su estructura modular presenta un péptido señal (Ver figura 19). La actividad tipo expansina de las CPs se demostró bioquímicamente cuando se evidenció que estas proteínas se unen a carbohidratos y relajan también la pared celular.



Figura 19

Estructura de las proteínas cerato plataninas, constituidas por un péptido señal y un dominio DPBB. Son estructuralmente similares a LOOS1.

Para demostrar la actividad tipo expansina de la CPs de *C. platani* se llevaron a cabo ensayos con Avicel. La CP se incubó con 1 mg de Avicel en buffer de acetatos a pH 5.0. Las muestras se incubaron a 38°C por 24 horas, agitando a 320 rpm durante 24 horas. Al finalizar la incubación se observó la estructura del Avicel a través del microscopio de luz para notar el efecto que provocaron estas proteínas, dando como resultado la formación de regiones desarregladas en zonas específicas en la estructura del Avicel (Bacelli, Luti, Bernardi, Scala, & Pazzagli , 2013) (Figura 20).

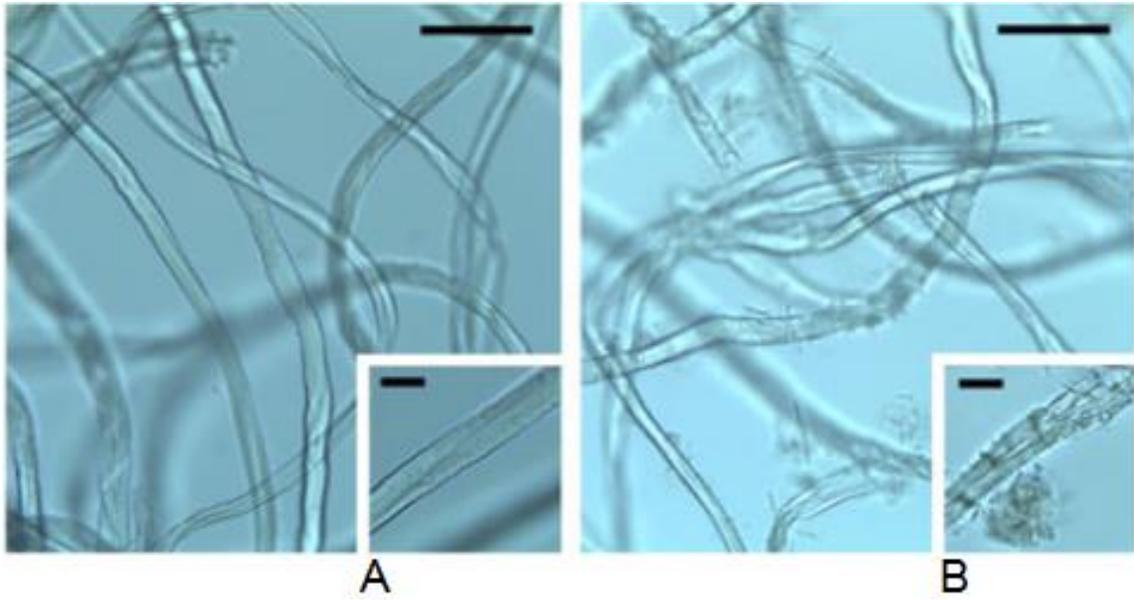


Figura 20

Se muestra la comparativa entre fibras de Avicel en ausencia (A) y presencia (B) de cerato platanina. Se puede observar alteraciones en la estructura en las fibras pretratadas con CPs.

En un ensayo similar al anterior, pero con quitina, se demostró que las CPs también interaccionan con este polímero. En este ensayo se utilizaron dos CPs, la de *C. platani* y Pop1 (*Ceratocystis populicola*), las cuales se incubaron con 1 mg de quitina obtenida a partir de cascara de cangrejo, se incubaron con buffer de acetato a pH 5 a 38 °C, y finalmente se observó al microscopio de luz una alteración estructural como el observado sobre las fibras de Avicel (Bacelli, Luti, Bernardi, Scala, & Pazzagli, 2013). Por tanto, los experimentos anteriores también demuestran que las CPs son proteínas con actividad tipo expansinas.

1.6.3.- Comparación estructural entre las proteínas con actividad tipo expansina

De forma resumida se muestra en la siguiente figura las proteínas con actividad tipo expansina y las diferencias estructurales que existen en cada una de ellas, tales como la presencia del dominio DPBB y módulo de unión a celulosa (Figura 21).

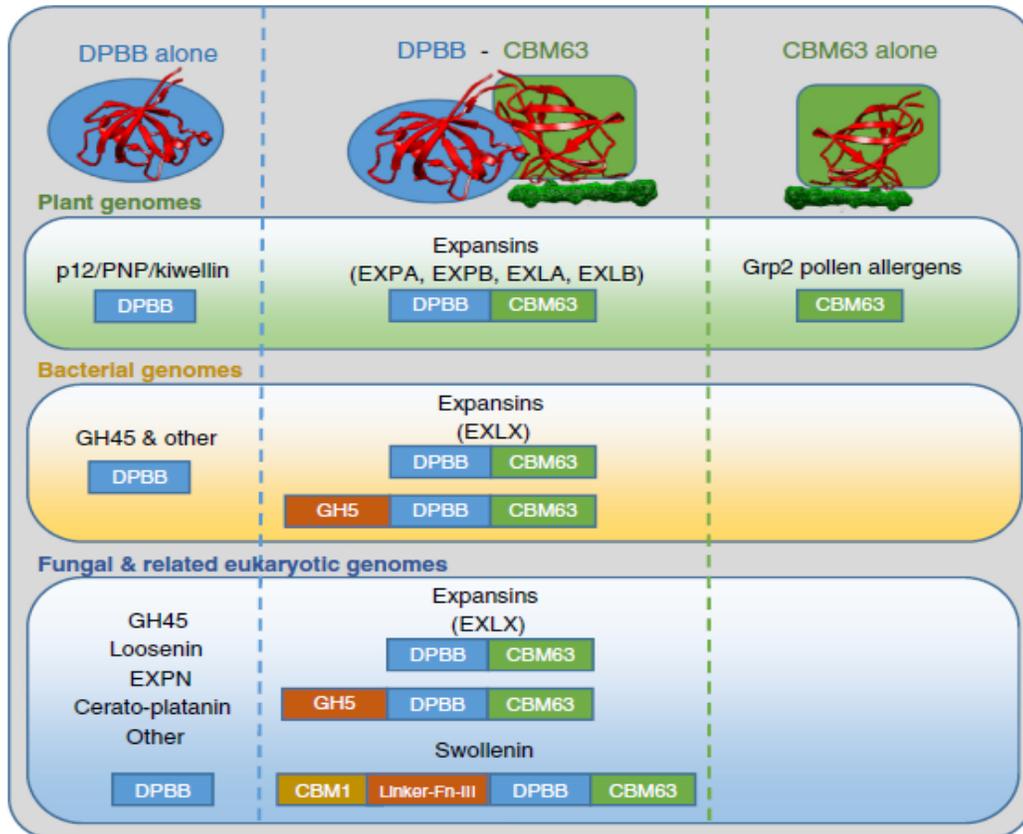


Figura 21

Se muestran las características estructurales que presentan cada una de las proteínas con actividad tipo expansina. Imagen obtenida de "Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls".

2.- Antecedentes

El antecedente directo de este proyecto es la caracterización de la loosenina de *Bjerkandera adusta* (LOOS1) y de una expansina de *Schizophyllum commune*. Estas proteínas tienen actividad “remodeladora” sobre fibras de algodón y favorecen la liberación de azúcares fermentables cuando actúan sobre estas fibras que son tratadas posteriormente con celulasas. De este modo se demuestra que, tanto la loosenina de *B. adusta* como la expansina de *S. commune*, son proteínas con potencialidades biotecnológicas para el tratamiento de polímeros como la lignocelulosa.

3.- Justificación

La búsqueda de fuentes de energías alternativas es un tema de gran relevancia hoy en día. Es por ello que el material lignocelulósico es una opción muy viable y atractiva para ser una fuente alterna que sustituya los combustibles fósiles utilizados actualmente. Sin embargo, la alta cristalinidad de la lignocelulosa impone la búsqueda de nuevas enzimas con propiedades lignocelulósicas. Pero no solo las actividades enzimáticas serían útiles, también las proteínas amorfogénicas resultarían de gran potencial para favorecer la actividad hidrolítica de las glicosil hidrolasas. En este sentido, la loosenina tendría un impacto muy importante debido a que la única reportada presenta un tamaño menor en comparación con el tamaño de las expansinas haciendo de esto una característica que la distingue como una proteína muy atractiva para estos fines, debido que al ser más pequeña, resulta más sencilla su expresión heteróloga, purificación y aplicación (Quiroz Castañeda , Martínez Anaya , Cuervo Soto, Segovia , & Folch Mallol, 2011). Como habíamos mencionado a la fecha solamente hay descrita una loosenina (loos1), y publicado un estudio preliminar en basidiomicetos sobre los perfiles de expresión de proteínas similares a looseninas en diferentes contextos fisiológicos. En los aproximadamente 1000 genomas de hongos que se prevé disponer para el 2025, tendremos un universo diverso de secuencias codificante para “posibles looseninas”. En la actualidad no existe una definición estructural para estas proteínas, tampoco una clasificación, ni características sistematizadas atendiendo a descriptores proteicos, modelos tridimensionales, entre otros aspectos. Este trabajo tendrá un impacto

notable en los aspectos anteriores, que luego contribuirán a la búsqueda de potenciales aplicaciones de las looseninas.

4.- Hipótesis

El análisis *in silico* de secuencia fúngicas (Secuencias obtenidas a partir de hongos) con dominio DBPP permitirá describir aspectos estructurales, así como definir familias de proteínas looseninas e identificar posibles candidatos atractivos para aplicaciones biotecnológicas.

5.- Objetivo

Analizar *in silico* las características estructurales del universo de secuencias de looseninas en hongos.

5.1.- Objetivos específicos

1. Colectar todas las secuencias con presencia de dominio DPBB a partir de los genomas publicados de hongos.
2. Obtener el perfil de secuencias tipo looseninas a partir de la distinción con otras proteínas como expansinas y swooleninas.
3. Analizar la presencia de motivos conservados.
4. Analizar el contexto genómico de las looseninas en un grupo de hongos con nicho ecológico lignocelulosico.
5. Seleccionar un grupo de hongos con nicho ecológico similar involucrados en la degradación de la lignocelulosa.

6.- Metodología

6.1.- Selección de proteínas con dominio DPBB

En la base de datos MycoCosm (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) se llevará a cabo la búsqueda de las secuencias con dominio DPBB en los diferentes phylum de hongos (Figura 22). Para la colección de las secuencias anotadas con dominio DPBB se revisarán todos los genomas de hongos secuenciados hasta la fecha. Los diferentes phylum de hongos que se analizarán se enlistan a continuación: Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina, Agaricomycotina, Pezizomycetes, Orbiliomycetes, Eurotiomycetes, Dothideomycetes, Lecanoromycetes, Leotiomycetes, Sordariomycetes, Xylonomycetes, Saccharomycotina, Taphrinomycotina, Glomeromycota, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, Zoopagomycotina, Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Cryptomycota (Figura 23).

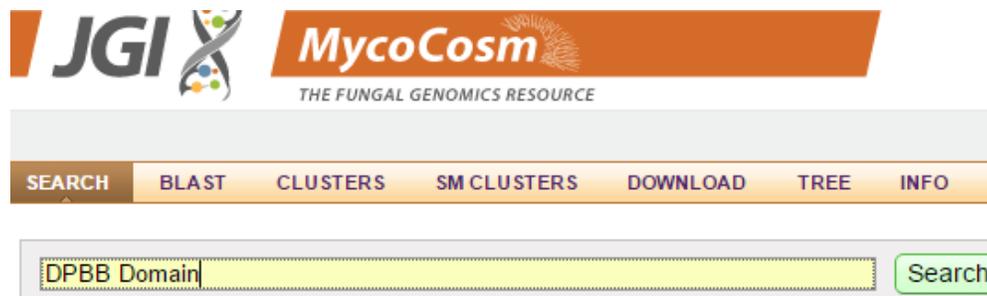


Figura 22

Búsqueda de las secuencias de los phylum de hongos con el dominio DPBB. Obtenidas de la base de datos de MycoCosm (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>).

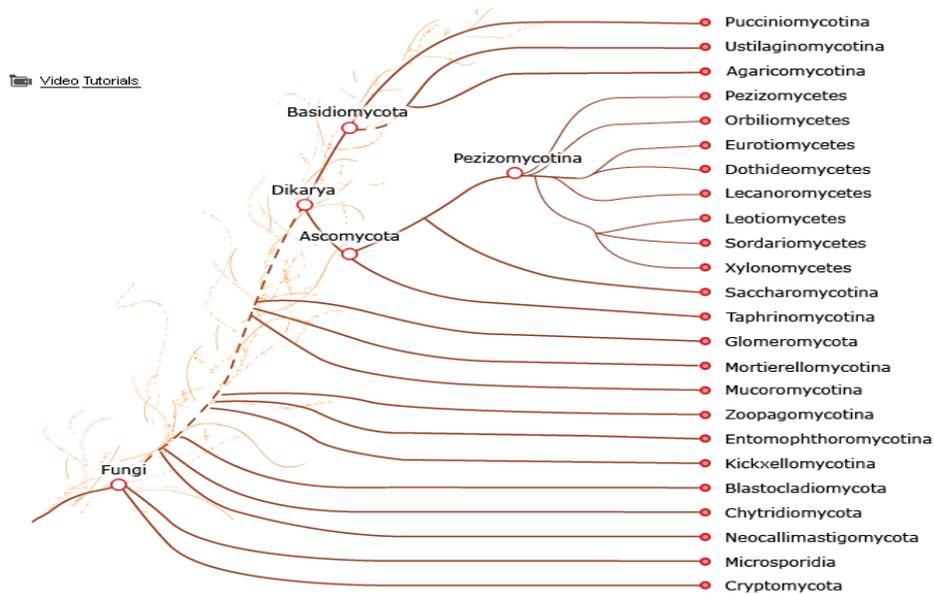


Figura 23

Se muestran algunos de los phylum de la base de datos MycoCosm (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>).

Una vez descargadas todas las secuencias anotadas para hongos y que contengan anotado el dominio DPBB, la información encontrada se guardará en formato *.fasta*, obteniendo un archivo por cada phylum, como muestra el siguiente ejemplo (Figura 24).

Agaricomycotina	01/05/2016 05:27
Blastocladiomycota	01/05/2016 06:16
Chytridiomycota	01/05/2016 06:18
Cryptomycota	01/05/2016 06:27
Dothideomycetes	01/05/2016 05:43
Entomophthoromycotina	01/05/2016 06:12
Eurotiomycetes	01/05/2016 05:40
Glomeromycota	01/05/2016 06:01
Kickxellomycotina	01/05/2016 06:14
Lecanoromycetes	01/05/2016 05:46

Figura 24

Se muestran los diferentes archivos en formato *.fasta* descargados de la base de datos MycoCosm, las cuales se organizaron en una sola carpeta de manera alfabética.

La base de datos creada a partir de las secuencias anteriores será utilizada para todos los análisis posteriores. En todos los análisis se utilizará a LOOS1 obtenida a partir de *B. adusta*, como proteína “*tipo*” o “*de referencia*”, debido a que es la única loosenina estudiada experimental, y por otro lado, a que no existen looseninas cristalizadas hasta el momento.

6.2 Depuración del set de secuencias de posibles looseninas

Debemos recordar que la loosenina reportada no es la única proteína que posee el dominio DPBB, sino que además podemos encontrar otras proteínas como expansinas, swolleninas y cerato-plataninas que poseen dicho dominio. Sin embargo, este tipo de proteínas tienen un tamaño mayor en contraste con el de la loosenina. Es por ello que haremos una caracterización preliminar para obtener en nuestro set de secuencias de posibles looseninas, grupos poblacionales de proteínas atendiendo al tamaño de todas las secuencias en estudio. Para ello se llevara a cabo la obtención de histogramas de frecuencia para determinar el tamaño de las secuencias en estudio, así como las distribuciones de tamaño. Para continuar con el trabajo seleccionaremos aquella población de proteínas, cuyo tamaño corresponda con el reportado para loos1. Entiéndase por tamaño, el número de residuos de aminoácidos. Igualmente, recordemos que loos1 ha sido previamente definida como proteína “*tipo*” o “*de referencia*” para este estudio. El objetivo del análisis anterior es obtener una población de proteínas enriquecida en posibles looseninas, y depuradas de expansinas, swolleninas u otras con presencia del dominio DPBB (pero que son más grandes) considerando las firmas moleculares descritas anteriormente para estas proteínas.

El análisis anterior nos permitirá elegir un set de secuencias más concreto considerando el tamaño de LOOS1 debido a que solamente presentan el dominio DPBB, y por tanto deben ser más pequeñas que aquellas proteínas que contienen adicionalmente otros dominios. Se eliminarán del análisis aquellas proteínas que no alcancen el tamaño mínimo que permita modelar el dominio DPBB (85 aa). El

tamaño de 85 aa necesario para modelar el dominio DPBB se determinó en estudios anteriores a esta tesis.

6.3.- Búsqueda de consensos

Las secuencias resultantes de la depuración serán analizadas en la plataforma MEME (Figura 25), con el fin de determinar posibles consensos. Este ejercicio permitirá establecer secuencias firmas generales, aminoácidos conservados que resulten imprescindibles para la definición estructural de las looseninas, así como motivos distintivos presentes en un phylum específico.

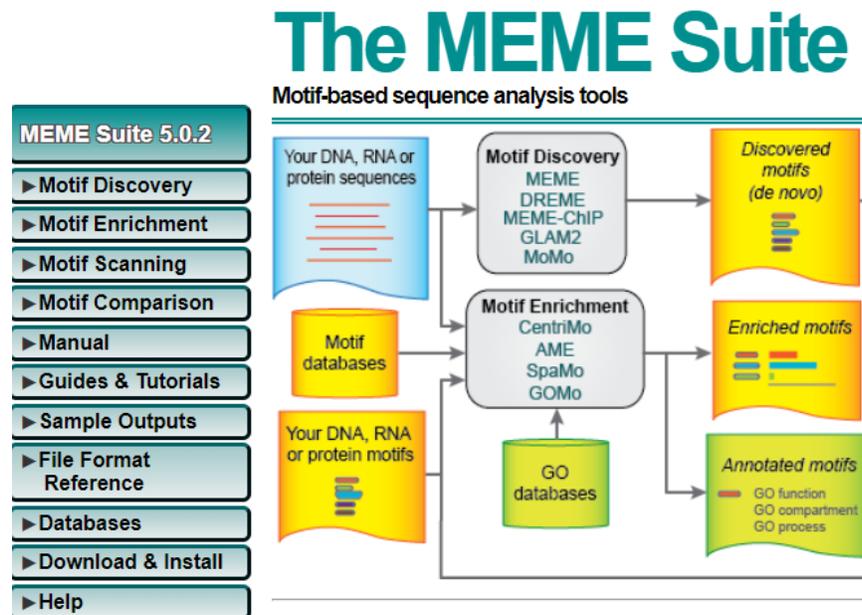


Figura 25

Se muestra la plataforma MEME en la cual hay distintas herramientas para la búsqueda de motivos (<http://meme-suite.org/>).

Lo anterior permitirá crear el set de secuencias y lograr un set de looseninas candidatas.

6.4.- Contexto genético

Las secuencias finales resultantes serán sometidas a un BLAST en la base de datos de NCBI, esto con la finalidad de obtener una visión más amplia de las posibles funciones en las que se puedan ver involucradas nuestras secuencias candidatas. Además nos apoyaremos de un segundo sitio denominado KEGG BLAST para reforzar los resultados obtenidos en NCBI.

7.- Resultados parciales

Después de realizar la búsqueda de las secuencias con el dominio DPBB en cada uno de los phylum de hongos, se registró el número de secuencias en cada uno de ellos, como se indica a continuación (Tabla 6).

Tabla 6

Se muestran los filos de hongos con el número de secuencias relacionadas con el dominio DPBB en cada una de ellas.

Clasificación			Phylum	No. genomas	No. secuencias c/ DPBB	Frec.	
Fungi (563)			Cryptomycota	1	3	3	
			Microsporidia	8	0	0	
			Neocallimastigomycota	2	102	51	
			Chytridiomycota	3	30	10	
			Blastocladiomycota	1	5	5	
			Kickxellomycotina	4	22	5.5	
			Entomophthoromycotina	3	45	15	
			Zoopagomycotina	No se tuvo acceso			
			Mucoromycotina	11	320	29.1	
			Mortierellomycotina	1	15	15	
			Glomeromycota	1	5	5	
		Dikarya (528)	Ascomycota (326)	Pezizomycotina (277)	Taphrinomycotina	7	8
	Saccharomycotina				42	38	0.9
	Xylonomycetes			3	6	2	
	Sordariomycetes			83	614	7.4	
	Leotiomycetes			20	160	8	
	Lecanoromycetes			2	21	10.5	
	Basidio-mycota (202)			Dothideomycetes	96	663	6.9
				Eurotiomycetes	60	266	4.43
				Orbitiomycetes	2	15	7.5
				Pezizomycetes	11	76	6.9
				Agaricomycotina	159	3197	20.1
		Ustilaginomycotina	16	227	14.2		
	Pucciniomycotina	27	469	17.4			
	Totales	TOTAL	563	6307	11.2		

Se descargaron los archivos en formato *.fasta* correspondientes a cada phylum. Se generaron 23 archivos, uno por cada phylum que contienen un total de 6307 secuencias encontradas con DPBB anotado. Es importante mencionar que se omitió el phylum Zoopagomycotina debido a que el sistema no permite acceso a este.

Después se realizó el primer filtro de las secuencias con base a su tamaño. Para ello se realizó un histograma de frecuencias para conocer cuántas poblaciones moleculares en base a tamaño teníamos en nuestro set de secuencias originales con

presencia del dominio DPBB, dando como resultado dos poblaciones moleculares bien definidas: la primera con proteínas de entre 53 y 185 aminoácidos, y la segunda con proteínas que comprenden un tamaño aproximado de entre 186 y 330 aa (Figura 28).

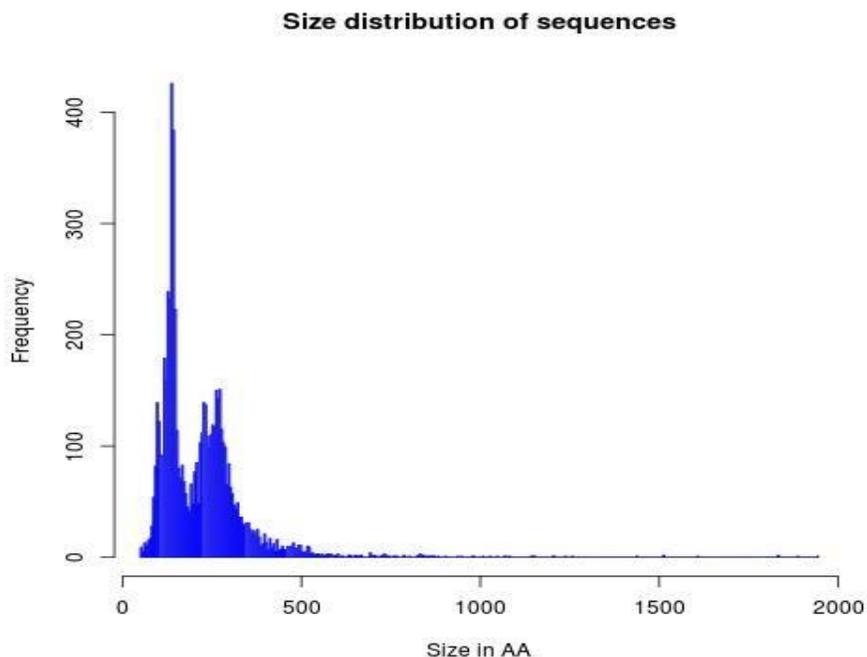


Figura 26

En esta figura se muestran las dos poblaciones de secuencias analizadas, la primera población corresponde a las secuencias que poseen el dominio I exclusivamente. La segunda población comprende posiblemente las secuencias que poseen el dominio I y adicionalmente el dominio II u otros dominios.

Considerando la distribución anterior, y el tamaño de LOOS1, nuestra proteína de referencia, decidimos trabajar con la primera población de proteínas y eliminar la segunda población, de este modo de las 6307 secuencias iniciales para este estudio, al utilizar únicamente las secuencias de la primera población de entre 53 a 185 aminoácidos, el número de secuencias se redujo a 3036 (Figura 29).

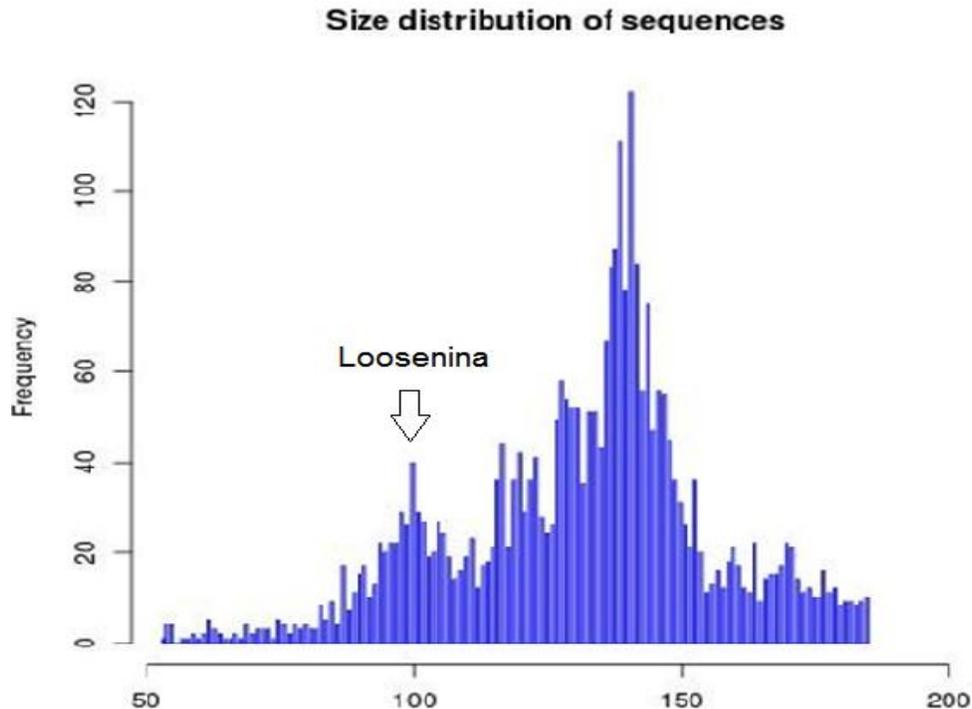


Figura 27

En esta figura se muestra únicamente la población 1, la cual comprende un tamaño de entre 53 y 185 aminoácidos, asimismo se indica el tamaño aproximado de la loosenina reportada (100 aminoácidos aproximadamente).

Por tanto de las 3036 secuencias, se llevaron a cabo filtros para eliminar todas las secuencias con un tamaño menor a 85 aminoácidos, debido a que este tamaño es necesario para modelar el dominio DPBB, esto se determinó en estudios anteriores a esta tesis. Además, se descartaron posibles swolleninas en base a una comparación estructural de ambas proteínas, que como podemos recordar la loosenina contiene un péptido señal y el dominio I o DPBB, mientras las swolleninas contiene un dominio de unión a celulosa (CBD) y el dominio II, permitiendo estas características descartar posibles swolleninas en base a su estructura.

Se eliminaron también posibles cerato plataninas de las secuencias restantes. En este caso el criterio en base a la estructura de loosenina y cerato plataninas (CPs) no es suficiente puesto que como podemos recordar ambas proteínas contienen en su estructura un péptido señal y un dominio I. Sin embargo, se tomaron en cuenta otros criterios para descartar CPs, basándonos en motivos conservados (CSD o CSN en

la región cercana al N-terminal, que en su mayoría dicho motivo viene seguido de una Glicina). A las secuencias con motivos típicos de CP se les realizó un blastp para confirmar su similitud con CPs y confirmar que fueran descartadas del estudio.

Todo lo anterior redujo la población de secuencias a 2413 secuencias como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 7).

Tabla 7

Se muestran los filos de hongos con el número de secuencias relacionadas con el dominio DPBB, después de llevar a cabo los distintos filtros para descartar secuencias menores a 85 aminoácidos, posibles swolleninas y cerato plataninas.

Clasificación			Phylum	No. genomas	No. secuencias "loosenin"	Frec.	
Fungi (563)			Cryptomycota	1	1	1.0	
			Microsporidia	8	0	0	
			Neocallimastigomycota	2	9	4.5	
			Chytridiomycota	3	8	2.7	
			Blastocladiomycota	1	1	1.0	
			Kickxellomycotina	4	17	4.25	
			Entomophthoromycotina	3	24	8.0	
			Zoopagomycotina	No se tuvo acceso			
			Mucoromycotina	11	216	19.6	
			Mortierellomycotina	1	10	10.0	
	Glomeromycota	1	3	3.0			
	Dikarya (528)	Ascomycota (326)	Peizomycotina (277)	Taphrinomycotina	7	3	0.4
				Saccharomycotina	42	14	0.3
				Xylonomycetes	3	5	1.7
Sordariomycetes				83	184	2.2	
			Leotiomycetes	20	49	2.4	
			Lecanoromycetes	2	8	4.0	

			Dothideomycetes	96	138	1.4
			Eurotiomycetes	60	43	0.7
			Orbitiomycetes	2	0	0
			Pezizomycetes	11	26	2.4
	Basidiomycota (202)	Agaricomycotina	159	1430	9.0	
		Ustilaginomycotina	16	94	5.9	
		Pucciniomycotina	27	130	4.8	
	Totales	TOTAL	563	2413	4.3	

Por tanto, de las 6307 secuencias iniciales para este trabajo, después de los distintos filtros para descartar secuencias que no fueran looseninas nos quedamos con un total de 2413 secuencias. A partir de estas secuencias se continuará con el trabajo para cumplir con los objetivos restantes en esta tesis.

Obtención de secuencias consenso

Con las secuencias resultantes de los pasos anteriores se lleva a cabo un arreglo al azar de las mismas, dando lugar a un archivo único en formato fasta. Este archivo se introduce en la entrada del servidor MEME, modificando los parámetros que el programa tiene como predeterminados se realizan dos búsquedas, la primera consiste en la obtención de dos motivos con un número de entre 2 a 10 aminoácidos y la segunda búsqueda son dos motivos pero modificando el número de aminoácidos de entre 2 a 12 aminoácidos.

Los resultados obtenidos se indican en una tabla y una gráfica que el mismo programa genera, las cuales se muestran a continuación (Figura 30):

MOTIVOS DESCUBIERTOS

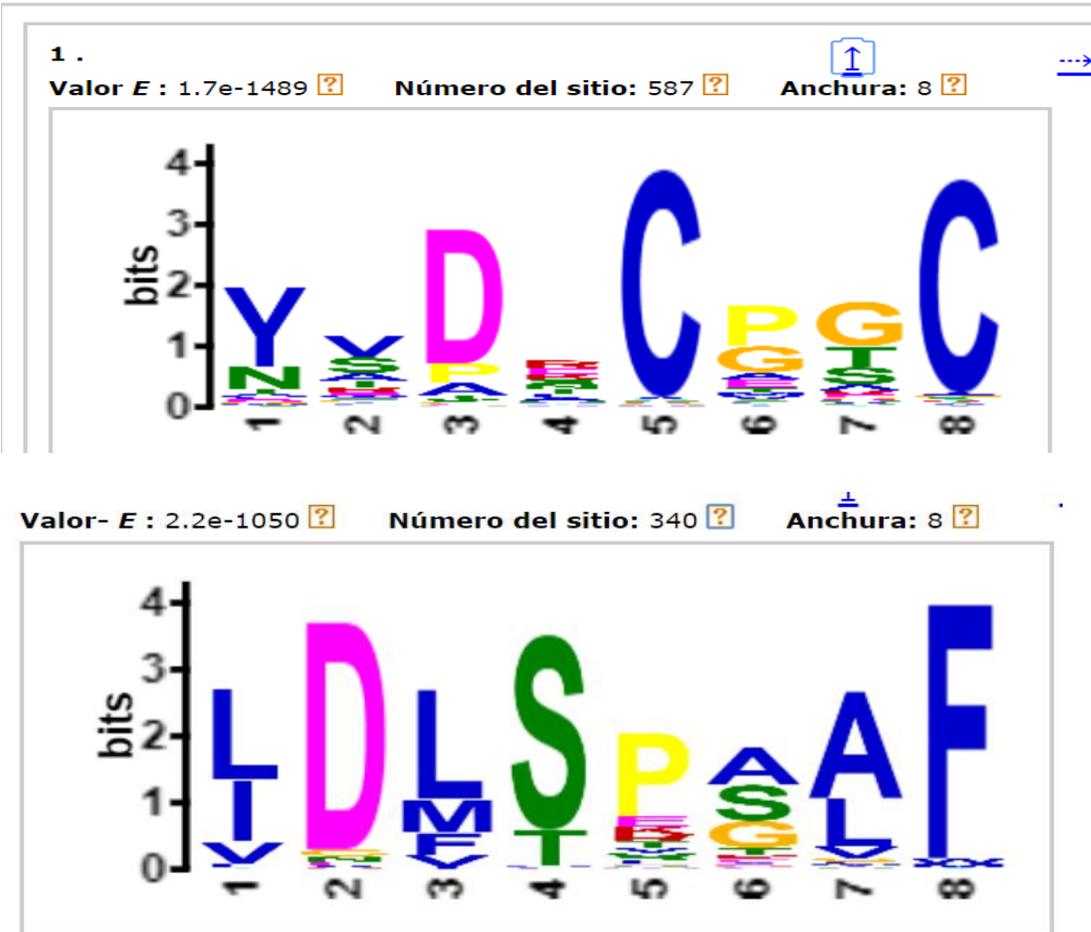


Figura 30

En esta figura se muestran los dos motivos resultantes en el servidor de MEME indicando un tamaño de entre 2 a 10 aminoácidos

Se modificó un poco las condiciones de búsqueda, buscando de nueva cuenta dos motivos pero aumentando la búsqueda de entre 2 a 12 a.a (Figura 31):

DISCOVERED MOTIFS



2.

E-value: 4.8e-1254 ?

Site Count: 334 ?

Width: 10 ?



Figura 31

En esta figura se muestran los dos motivos resultantes del servidor MEME indicando un tamaño de entre 2 a 12 aminoácidos.

La plataforma de MEME se basa en puntajes que se indican con la letra e (significancia) en cada uno de los motivos resultantes, basándose en el número de secuencias, el tamaño y las repeticiones de aminoácidos en cada posición. Es decir un número E elevado indica una secuencia con poca significancia estadística.

Sin embargo, se llevó a cabo un análisis con las secuencias sin hacer un arreglo al azar y los resultados se mostraron en bloques de entre 450 a 500 secuencias y estos fueron los resultados:

Bloque	Consenso	Cambio de aminoácidos
Bloque 1	NSDQCGGC--IDLSPAAF	VVDQCPGC—LDLSPAAF
BLOQUE 2	VVDTCPGC--LDLSPAAF	VVDTCPGC—LDLSPAAF
AGA 1 A 400	VVDECPGC--LDLSPGLF	VVDECPGC—LDLSPAAF
AGA 400 A 800	VVDECPGC—LDLSPSAF	VVDECPGC—LDLSPAAF
AGA 800 A 1200	VSDECPGC—LDLSPSAF	VVDECPGC—LDLSPAAF
AGA 1200 A 1600	VVDRCPGC—LDLSPSAF	VVDECPGC—LDLSPAAF
1 Y 3	VVDRCPGC—YCGKTITI	VVDRCPGC—YCGKTITI
2 Y 4	VVDECPGC--LDLSPGAF	VVDECPGC—LDLSPAAF

Búsqueda de secuencias candidatas por hongo

Al llevar a cabo la depuración de las secuencias se observó que en la división *Basidiomycota* se encuentran el mayor de numero de secuencias candidatas de posibles looseninas sumando un total de 1645 secuencias (Agaricomycotina, Ustilaginomycotina y Pucciniomycotina). Tomando en cuenta esto, se realizó una nueva búsqueda de hongos basidiomicetos que son degradadores por excelencia de lignocelulosa, estos se buscan en la base de datos de Mycocosm usando como palabra clave: DPBB; al realizar esto el sitio le asigna una clave a cada hongo, con esta clave se busca en el archivo fasta que se originó al depurar el total de secuencias iniciales, se hizo un conteo de las secuencias encontradas tanto en Mycocosm como en el archivo fasta, dicho conteo se muestra a continuación (Tabla 8):

Tabla 8

En esta tabla se muestran las secuencias encontradas en Mycocosm y en el archivo fasta generado al finalizar la depuración de secuencias. Indicando el nombre del hongo y las secuencias respectivas

Hongo	Número de genes encontradas en JGI	Número de secuencias encontradas en archivo dropbox
<i>Agrocybe pediades</i> (Agaricomycotina)	2 (Agrped1)	2
<i>Armillaria gallica</i> (Agaricomycotina)	4 (Armga 1)	1
<i>Armillaria solidipes</i> (Agaricomycotina)	4 (Armost1)	1
<i>Auricularia subglabra</i> (Agaricomycotina)	2 (Aurde3_1)	1
<i>Bjerkandera adusta</i> (Agaricomycotina)	2 (Bjead1_1)	1
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> (Agaricomycotina)	4 (Cersu1)	2
<i>Clavicornia pyxidata</i> (Agaricomycotina)	2 (Clapy1)	2
<i>Coniophora puteana</i> (Agaricomycotina)	3 (Conpu1)	1
<i>Crucibulum laeve</i> (Agaricomycotina)	2 (Crula1)	1
<i>Daedalea quercina</i>	2 (Daequ1)	2

(Agaricomycotina)		
<i>Exidia glandulosa</i> (Agaricomycotina)	3 (Exigl1)	1
<i>Exobasidium vaccinii</i> (Ustilaginomycotina)	4 (Exova1)	1
<i>Fibulorhizoctonia sp</i> (Agaricomycotina)	6 (Fibsp1)	6
<i>Fomitiporia mediterranea</i> (Agaricomycotina)	2 (Fomme1)	2
<i>Fomitopsis pinicola</i> (Agaricomycotina)	2 (Fompi3)	2
<i>Gymnopus androsaceus</i> (Agaricomycotina)	6 (Gyman1)	2
<i>Gymnopus luxurians</i> (Agaricomycotina)	3 (Gymlu1)	1
<i>Heterobasidion annosum</i> v2.0 (Agaricomycotina)	3 (Hetan2)	1
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Agaricomycotina)	2 (Laesu1)	2
<i>Leucogyrophana mollusca</i> (Agaricomycotina)	3 (Leumo1)	1
<i>Obba rivulosa</i> (Agaricomycotina)	3 (Obbri1)	2
<i>Panus rudis</i> (Agaricomycotina)	2 (Panru1)	1
<i>Phlebia berevispora</i> (Agaricomycotina)	3 (Phlbr1)	2
<i>Polyporus arcularius</i> (Agaricomycotina)	3 (Polar1)	1
<i>Polyporus brumalis</i> (Agaricomycotina)	3 (Polbr1)	2
<i>Puccinia graminis</i> (Pucciniomycotina)	3 (Pucgr2)	2
<i>Punctularia strigosozonata</i> (Agaricomycotina)	2 (Punst1)	1
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (Agaricomycotina)	3 (Pycsa1)	2
<i>Schizophyllum commune</i> (Agaricomycotina)	Se encontraron dos en JGI - 1 gen (Schco3) en H4-8 v3.0 - 1 gen (Schco_TatD_1) en Tattone)	1 1

<i>Serpula lacrymans</i> (Agaricomycotina)	1 (SerlaS7_3_2)	1
<i>Stereum hirsutum</i> (Agaricomycotina)	2 (Stehi1)	1
<i>Vararia minispora</i> (Agaricomycotina)	4 (Varmin1)	2
30 hongos	92 genes	52 secuencias

Contexto genómico

Con las secuencias obtenidas del archivo fasta final se realizaron BLAST en la base de datos de NCBI para cada una de ellas, esto con la finalidad de obtener una idea más clara sobre las posibles funciones en las cuales se puedan ver involucradas las secuencias candidatas. Los resultados obtenidos son mostrados en un PDF en el cual se muestra la secuencia en estudio y a su alrededor las secuencias más cercanas, estas son importantes porque nos pueden dar la pauta para conocer si pudieran existir secuencias que tengan una función relacionada o muy parecida a la que buscamos en este trabajo. Los resultados por lo regular son proteínas hipotéticas como se muestra a continuación (Figura 32):

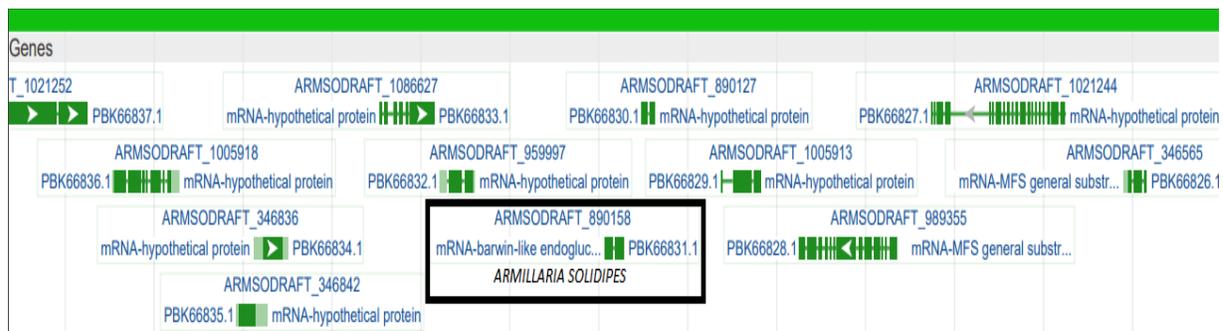


Figura 32

Resultados obtenido en NCBI del hongo *Armillaria solidipes* (ARMSODRAFT_890158)

Sin embargo, con el apoyo del sitio KEGG BLAST se pudieron obtener otros resultados como el que se muestra a continuación (Figura 33):

BLASTP Search Result

Database: genes

Protein sequence database entries related to PBK66833.1 - 11 hits

Show alignment

Entry	K number	bits	E-val
<input checked="" type="checkbox"/> ngi:103749299 Zfyve26; zinc finger FYVE-type containing 26	K19027	42.7	0.17
<input checked="" type="checkbox"/> ags:114126223 LOW QUALITY PROTEIN: probable chitinase 10		40.4	0.81
<input checked="" type="checkbox"/> cpv:cgd6_1930 hypothetical protein		39.7	1.4
<input checked="" type="checkbox"/> cho:Chro.60228 hypothetical protein		39.3	1.5
<input checked="" type="checkbox"/> api:100169480 probable chitinase 3	K01183	39.7	1.5
<input checked="" type="checkbox"/> rbar:AWN76_015665 hypothetical protein		38.9	1.8
<input checked="" type="checkbox"/> apla:101803079 LOW QUALITY PROTEIN: unconventional myosin-Vb	K10357	38.9	2.3
<input checked="" type="checkbox"/> clv:102094589 LOW QUALITY PROTEIN: unconventional myosin-Vb-...	K10357	38.9	2.6
<input checked="" type="checkbox"/> bpec:110157110 crtacl; cartilage acidic protein 1		38.1	3.7
<input checked="" type="checkbox"/> psco:LY89DRAFT_632091 hypothetical protein	K14861	38.1	4.0
<input type="checkbox"/> bta:514402 ZFYVE26; zinc finger FYVE domain-containing prote...	K19027	37.4	7.2

Figura 33

Resultado obtenido en KEGG BLAST

Conclusiones

- No todas las secuencias con presencia de dominio DPBB son looseninas, debido a que existen otras proteínas que lo poseen. Sin embargo, fueron descartadas mediante procesos de depuración.
- Al realizar la búsqueda de motivos conservados se pueden observar aminoácidos conservados en dichos motivos tales como Aspartato (D), dos cisteínas (C) y una Fenilalanina (F), los cuales son importantes para llevar a cabo la actividad de la proteína amorfogénica.
- El contexto genómico en el que se encuentran las secuencias candidatas nos arroja resultados muy escasos, sin embargo, algunos resultados obtenidos como posibles quitinasas o endoglucanasas son importantes debido a que podemos partir de esos aspectos para profundizar el estudio de dichas secuencias y obtener un resultado más fundamentado.

8.- Bibliografía

- i. Álvarez, A., García, E., Domínguez, MM., Granados, JM., Aguirre, A., Carmona, R., Morales, A., Herrera, PJ., Licea, A., Mendoza, AM. (Septiembre 2012). Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulosicos. *Rev. Ibero. Pol.* 13 (4). Pp-140-150.
- ii. Aro, N., Pakula, T & Penttila, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbial Rev.* 2005; 29 (4): 719-39
- iii. Azzam, AM. (1989). Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *J. Environ. Sci. Health.* 24: 421-433
- iv. Balan, V., da Costa Sousa L., Chundawat, SP., Vismeh, R., Jones, AD & Dale, BE. (2008). Mushroom spent straw: a potential substrate for an ethanol-based biorefinery. *J. Ind. Microbial. Biotechnol.* 35: 293-301.
- v. Ben, D & Miron, J. (1981). The effect of combined chemical and enzyme treatment on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.* 23:823-831.
- vi. Cuervo, L., Folch, JL., Quiroz, RE. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, 13 (3). 11-25.
- vii. Dántan, E., Vite, O., Martínez, C., Méndez, M., González, MC., Palomares, LA. Et al. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil polluted tropical habitat. *Int Microbial.* 2008. Sep; 11(3):163-9.
- viii. Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int J Biol Sci.* 2009; 5(6):578-95
- ix. Duff, SJB & Murray, WD. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* 55: 1-33.
- x. Fan, LT., Gharapuray, MM & Lee, YH. (1987). In: *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*. Editor (ed). Springer, Berlín, p.57.

- xi.** Folch, J.L., Quiroz, R.E., Martínez, A. (16 de Enero de 2012). Bagazo de agave y “looseninas”; Alternativas para la producción de bioetanol. *Academia de Ciencias de Morelos, A.C.* pp. 32-33.
- xii.** Georgelis, N., Nikolaidis, N., Cosgrove, D.J. (2015). Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. *Springer*, 99 (9). 23.
- xiii.** Martínez, A., Speranza, M., Ruiz, F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M., Gübitz, G.M., Mansfield, S.D., Böhm, D & Saddler, J.N. (1998). Effect of endoglucanases and floatation deinking of xerographic and laser-printed papers. *J. Biotechnol.* 65: 209-219.
- xiv.** Mes, M., Dale, B.E. & Craig, W.K. (1988). Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:462-468.
- xv.** Millet, M.A., Baker, A.J. & Scatter, L.D. (1976) Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification, *Biotech, Bioeng, Symp.* 6:125-153.
- xvi.** Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2009). Estructura tridimensional de las proteínas. En *Principios de Bioquímica* (1287). Barcelona. España: Omega.
- xvii.** Pérez, J., Muñoz, J., de la Rubio, T., Martínez, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol.* 2002; 5(2):53-63.
- xviii.** Quiñones, C. (2009). Identificación de genes que codifican para expansinas o proteínas similares en varios organismos simbiotes y patógenos de plantas. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes.
- xix.** Quiroz, R.E., Balcázar, E., Dántan, E., Martínez, A., Folch, J., Martínez, C. Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electr J Biotechnol.* 2009 Oct 15. [cited 2011 May 17]; 12(4) [about 13 p.] Available from: <http://www.Eibiotechnology.cl/content/vol12/issue4/full/3/index.html>

- xx.** Quiroz, RE., Folch, JL. (2011). Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Biotecnología Aplicada*, 28 (4). 194-204.
- xxi.** Quiroz, RE., Martínez, C., Cuervo, LI., Segovia, L., Folch-Mallol, JL. (2011). Loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. *Microbial Cell Factories*, 10 (8). 9.
- xxii.** Reshamwala, S., Shawky, BT. & Dale, BE. (1995) Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52: 43-55.
- xxiii.** Rincón, JM. & Silva, EE. (2014). Potencial de la biomasa y perspectivas en diferentes países. Bioenergía. En J. Islas (Ed). Bioenergía: Fuentes, conversión y sustentabilidad (pp. 17-56) Bogotá Colombia. Editorial CYTED.
- xxiv.** Sadana, JC & Patil, RV. 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase from *Sclerotium rolfsii*. *Methods Enzymol.* 1988; 160:307-14
- xxv.** Suzuki H., Vuong TV., Gong Y., Chan K., Ho C., Master ER., Kondo A. (2014). Sequence diversity and gene expression analyses of expansin-related proteins in the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete carnososa*. *Elsevier*, 72. 115-123
- xxvi.** Vidal, PF & Molinier, J. (1988). Ozonolysis of lignin, improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass* 16: 1-17.
- xxvii.** Viñals, M., Bell, A., Michelena, G., Ramil, M. (2012). Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. *Redalyc*, 46 (1). 7-16. Recuperado desde <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223123848002.pdf>
- xxviii.** Vlasenki, EY., Ding, H., Labavitch, JM & Shoemaker, SP. (1997). Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Bioresour. Technology.* 59: 109-119.
- xxix.** Tovar, OE., Batista, RA., Sánchez, M., Iracheta, MM., Arévalo, K., Folch, JL. (2015). A novel expansin protein from the White-Rot fungus *Schizophyllum commune*. *PLoS ONE.* 10 (3). 17.
- xxx.** Andberg, M., Penttilä, M., Saloheimo, M. (2015). Swollenin from *Trichoderma reesei* exhibits hydrolytic activity against cellulosic substrates with features of both endoglucanases and cellobiohydrolases. *Bioresurce Technology.* 181: 105-113.

- xxxi.** Bacelli, I., Luti, S., Bernardi, R., Scala, A., Pazzagli, L. (2013). Cerato.platanin shows expansin-like activity on cellulosic materials. *Springer*. 10.
- xxxii.** Díaz, J., Herrera, F. (2011). Producción de etanol combustible a partir de lignocelulosas. Universidad del Cauca, Popayán, Colombia. 24.



Cuernavaca, Morelos a 8 de marzo de 2021.

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **José Alberto Mena Neri**. Con el título del trabajo: **Análisis estructural *in silico* de proteínas amorfogénicas tipo looseninas**.

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por **Tesis**, como lo marca el artículo 4º del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR	FIRMA
PRESIDENTE: DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL	_____
SECRETARIO: DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE	_____
VOCAL: DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA	_____
SUPLENTE: DR. MAIKEL GILBERTO FERNÁNDEZ LÓPEZ.	_____
SUPLENTE: M. EN C. YORDANIS PÉREZ LLANO	_____



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MAIKEL GILBERTO FERNÁNDEZ LÓPEZ | Fecha: 2021-03-18 00:20:32 | Firmante
 uYUR2LcL22KwJLLPaJU7SdlaCBuUWqVQzA5tSDj4LjvFTFtDDoudLmzhW50pcwq+IHU3glU7qEu148883YEBExnggVsh8UMUhsqPFLid0GPaZVcu7AQOEnA3z8789gCRD8wYZN85m+1zGj3kV7T15JujYZUjEwVp8PzH+TQOZ4hImXAz9O2Z8vU7mY4toCondX76JmFYXTzzyE9dSg9OX9CyoX+AD6ahpYReX1YW3y0zP8ZP83O8k2e6B2EKYAxzGLpJY+bbKAhg2KQzL7Kh46IunT2k1cHCeB7KDBWmOVRHO5o5wqph4m4e==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha: 2021-03-18 10:02:02 | Firmante
 mV5eSeW0A1HFFPzwLdJT0odbxK5YR6ZC79CMLqQLBLZ6dggqNRcJhE+2v9aE091u4VY16AzFKE8lu9elgoHR0Xlu0E9ahYGAjTpaKUA8F5y1dR0EYX03Pe8Xy70MxOpl0ZNEF8eqHjAV1rh0sp6Z8FpIq5yLzJ8nr9YK6HM8JncGe5nCCQ5Cz8UWpL8R5YH4eKaZ28Y7GK1Gw0AcaqAbPURPtaWcAmbe1UzVpuuAlImNPWqgFC0GwkGz8WFM0z8UNq9RF5aUrnSx4p+d8z2qg79Hm0ARlyZwYm6T9209wTbCand8d8tqj0wZgHGA==

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha: 2021-03-18 11:53:42 | Firmante
 rW0M91rW3On8LyeNtpj+1faX93Z7UL3E9/a2Xca9UwX2Q3Q3Dh+u0TvyqC0oHRBjTz+pyYBvgC08a0q/cak1kgC0eA/B21XAaC5eLBHxudFAzQuLSHWTK7SAnbWQv8FUSd44ARER1hQy60zGcLsGd9X2+MgFKWd5FY08kaDPXBWYz8q9tkaCGF23W0dFieK0Z2WVfCwDEluCW0RmtyMB04jEx1508mR8Mqz8n+R6wWAGG79vxy0JLtyX0mYUW42EO0aY+LAWB2naRpe0PouYZW8KH77G6MRST05qXCJXE+URUH5v9NZw==

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha: 2021-03-18 18:21:40 | Firmante
 edICzN188P8H0WANDdyZPw0a0+T5e8a17E4g8Ce0gLU7zuToB0xT76FV8ClyLRC6aD+8F7dJru7p+CqM8P0E/WmCv6+FCwNHW09oac0hdhu5CqghhFC4GRCB0x08SpV0XWuCh2YE2Qan0ryyVNVaanUj8HPUnw0yuyAggydarvZQIS8ZabHNZa8jyG3rF590f8aOnzoCv++9Tba8LE0rxCLBSZvge8N0Q8G0h8uHaGgUPXqj8byEF2P18hV838eCovLnd2038o8Dg8g3n8e3ma2AnYe8tPQZ7d6dXoYGP+ENwCv00jg==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

pfdsCX

<https://firma.uaem.mx/noReputo/lymu3j6pYWRwaZwLhRfCITXgMoam>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023