



EXPRESIÓN EN LEVADURA DE UNA PROTEÍNA TIPO EXPANSINA DEL HONGO BASIDIOMICETO *Bjerkandera adusta* Y CUANTIFICACIÓN DE SU ACTIVIDAD

Rosa Estela Quiroz-Castañeda^{1,2}, Laura Cuervo-Soto², Jorge Luis Folch-Mallo²

¹Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional Autónoma de México; ²Centro de Investigación en Biotecnología-Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa 62210, Cuernavaca, Morelos, México. Fax: (777)3297030 Correo electrónico reqc@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Expansinas, basidiomicetos, lignocelulosa*

Introducción. Las Expansinas son proteínas que participan en la extensión de la pared celular permitiendo el crecimiento de las células vegetales, participan también en otros procesos en donde la relajación de la pared celular es crucial (1). Se desconoce el mecanismo molecular de acción de las expansinas pero se ha propuesto que romperían los puentes de hidrógeno entre los filamentos de celulosa o entre la celulosa y otros polisacáridos, a través de un mecanismo no enzimático (2). No se han identificado expansinas en hongos, pero sí proteínas con actividad expansina como la swollenina (SWO1) del hongo ascomiceto *Trichoderma reesei* (3).

En este trabajo se describe por primera vez la expresión de una proteína tipo expansina (EXPA1Ba) de un hongo basidiomiceto en levadura y se evalúa su actividad en ensayos cuantitativos y cualitativos así como su comparación con la actividad de la proteína SWO1.

Metodología. Se aisló una clona de una biblioteca de cDNA de *B. adusta* crecido en paja de trigo que codifica para una proteína tipo expansina, el gen se subclonó en el vector de expresión de levadura pSAL3; el gen *swo1* del hongo *T.reesei* se clonó por RT-PCR en el mismo vector y se expresaron por separado en *S. cerevisiae*. La actividad expansina se midió al cuantificar la liberación de azúcares reductores (AR) después de incubar fibras de algodón con la EXPA1Ba o SWO1 y adicionar 0.5U de endoglucanasa comercial de *Trichoderma viride*. Los ensayos cualitativos se realizaron en fibras de algodón incubadas por 8 horas con la EXPA1Ba o SWO1 y observadas al microscopio.

Resultados y discusión. Se logró la expresión de dos proteínas tipo expansina en levadura. En las fibras de algodón tratadas con buffer de acetato de sodio y el vector pSAL3 vacío no se observaron cambios en la estructura de las fibras. Por el contrario, en las fibras tratadas con el sobrenadante de levaduras que expresan EXPA1Ba y SWO1 se observaron regiones relajadas o de hinchamiento a lo largo de éstas. Las fibras de algodón tratadas con SWO1 tienen un menor hinchamiento. Se comparó la habilidad de la EXPA1Ba y SWO1 para relajar la estructura de la celulosa del algodón por la cuantificación de AR liberados después de la incubación con una endoglucanasa y se encontró que

la cantidad de AR liberados después de la incubación con 20 µg de EXPA1Ba es mayor a la liberada por la misma cantidad de proteína SWO1. Después de 1 hora de incubación se liberaron 2 µmol/ml de AR en las fibras tratadas con EXPA1Ba y 1.07 µmol/ml con las tratadas con SWO1, lo que representa el doble de AR liberados debido al relajamiento de las fibras de celulosa por EXPA1Ba. En las muestras control, la cantidad de AR liberados no excede los 0.22 µmol/ml. La identificación de nuevos genes de hongos basidiomicetos involucrados en la degradación de la lignocelulosa es de gran importancia debido a que estos hongos son expertos degradadores y sus enzimas tendrían características ventajosas sobre las de los hongos ascomicetos utilizados actualmente. Las expansinas podrían emplearse como aditivos para facilitar la sacarificación enzimática ya que al relajar la estructura cristalina de la celulosa favorecen el acceso de las celulasas y con ello la liberación de AR.

Conclusiones. La actividad expansina de EXPA1Ba es superior a la de SWO1 lo que permite una mayor liberación de AR. Esto indicaría que las enzimas de los hongos basidiomicetos, son mejores que las de ascomicetos para relajar la estructura de la celulosa como una etapa previa al proceso de degradación de material lignocelulósico utilizado en la producción de biocombustibles.

Agradecimientos. Este trabajo se realizó con apoyo de CONACYT al otorgar la beca de Doctorado No. 47895 y financiado parcialmente por el proyecto Ciencia Básica No. 48256.

Bibliografía.

- (1) Cosgrove, D.J. (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50:391-417.
- (2) McQueen-Mason, S, and Cosgrove, D.J.(1994) Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(14):6574-8.
- (3) Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, S., Swanson, B., Nyyssonen, E, Bhatia, A., Ward, M., Penttila, M. (2002) Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem* 269:4202-4211.