



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## SOBREEXPRESIÓN DEL GEN *Loos1* DE *Bjerkandera adusta* EN *Trichoderma reesei* CON MIRAS A LA MEJORA DE CÓCTELES ENZIMÁTICOS PARA LA BIOCONVERSIÓN DE BIOMASA.

Balcázar-López E.<sup>1</sup>, Esquivel-Naranjo E.U.<sup>2</sup>, Quiroz-Castañeda R.E.<sup>1</sup>, Herrera-Estrella A.<sup>2</sup>, y Folch-Mallol J.L.<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa 62210 Cuernavaca, Morelos, México. <sup>2</sup>Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Cinvestav, Campus Guanajuato, Km 9.6 Libramiento Norte, carretera Irapuato-León. 36821, Irapuato, Gto. México.

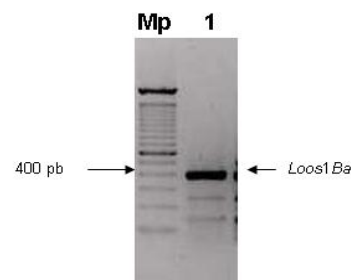
*Palabras clave:* *T. reesei*, *Loosenina* y *biomasa*.

**Introducción.** La creciente necesidad de generar combustibles a partir de fuentes de energía renovables ha llevado al estudio de organismos que tienen la capacidad de degradar la biomasa vegetal dado que es el compuesto renovable más abundante en el planeta (1, 2). *T. reesei* es uno de los hongos más estudiados para este fin, produce una serie de enzimas extracelulares (celobiohidrolasas, endoglucanasas y xilanasas) que hidrolizan los componentes de la biomasa vegetal a azúcares más sencillos. Como es un potente productor de estas enzimas, las investigaciones en este hongo se han enfocado principalmente en aumentar la eficiencia de los cócteles enzimáticos para disminuir los costos de producción de bioetanol a partir de desechos celulósicos (3). En el laboratorio se demostró que la Loosenina del hongo basidiomiceto *B. adusta* tiene la capacidad para remodelar (aflojar) la estructura de las fibras de algodón permitiendo un considerable aumento en la liberación de azúcares reductores cuando estas fibras son tratadas con una endoglucanasa comercial (4). Con este antecedente proponemos que la expresión de la Loosenina en *T. reesei* enriquecerá sus cócteles enzimáticos permitiendo un aumento en la eficiencia de degradación de desechos celulósicos y un mayor rendimiento en la producción de azúcares fermentables.

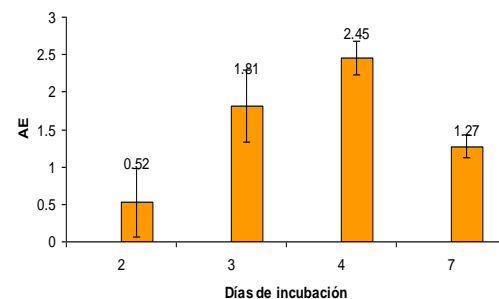
**Metodología.** El gen *Loos1* fue clonado en el vector pUE08 bajo un promotor constitutivo *pki-1*, con el cual se transformó a *T. reesei* mediante la técnica de protoplastos. La cepa silvestre se creció en Medio Mínimo con 2% de paja para analizar el punto máximo de producción de actividad celulolítica. La cuantificación de azúcares reductores se realizó utilizando la técnica de DNS.

**Resultados.** El gen *Loos1* fue amplificado por PCR con los oligos Exp-F y Exp-R y mediante digestión con *Bam*HI y *Eco*RI fue subclonado en el vector pUE08 para obtener la construcción pTRL01. Posteriormente se transformó la cepa de *Trichoderma reesei* QM94/4 con la construcción pTRL01 mediante la técnica de protoplastos. La integración de la construcción se comprobó amplificando por PCR el gen *Loos1* a partir de DNA genómico de la cepa transformante (figura 1). El análisis preliminar sobre la actividad celulolítica de la cepa silvestre de *T.*

*reesei* en paja de trigo al 2% nos indica que hay un máximo de actividad específica en el cuarto día de crecimiento. Figura 2.



**Fig. 1.** Amplificación por PCR del gen *Loos1* en una de las cepas transformante de *T. reesei*. MP) Marcador de 100pb. 1) amplificación del gen *Loos1*.



**Fig. 2.** Cuantificación de la actividad celulolítica de *T. reesei* en Medio Mínimo con 2% de paja de trigo.

**Conclusiones.** Se obtuvo una transformante de *T. reesei* con la construcción pTRL01 que ha sido comprobada mediante PCR. Se están realizando pruebas moleculares para corroborar su expresión. Se observó que en cuarto día *T. reesei* produce mayor actividad celulolítica, lo que nos permitirá poder comparar a este día la eficiencia de los cócteles enzimáticos tanto de la silvestre como de la transformante sobre diferentes sustratos celulósicos.

### Bibliografía.

1. Somerville C. 2007. Biofuels. *Curr Biol* 17:R115–R119.
2. Rubin EM. 2008. *Nature* 454:841–845
3. Sanchez C. 2009. *Biotechnol Adv.* 27:185-194.
4. Quiroz, R., Martínez, C., Cuervo, L., Segovia, L. and Folch-Mallol, J. 2011. *Microbial cell factories*. 10:8.