

Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales

Rosa E Quiroz-Castañeda, ✉ Jorge L Folch-Mallol

Laboratorio de Biología Molecular de Hongos, Centro de Investigación en Biotecnología,
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Ave. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca 62209, Morelos, México
E-mail: jordi@uaem.mx

REVISIÓN

RESUMEN

El material lignocelulósico constituye una materia prima potencial para la obtención de azúcares fermentables y biocombustibles. Algunas bacterias y hongos con cualidades ligninolíticas, pueden utilizar los desechos lignocelulósicos de la naturaleza (forestales, agrícolas y de jardín) como fuente de carbono. Tal actividad de degradación podría complementarse con la actividad de las proteínas que remodelan la pared celular, como las expansinas, identificadas en plantas. Estas proteínas pueden relajar los componentes de la pared celular y promover el crecimiento. Participan en procesos de desarrollo como la organogénesis, la abscisión, la maduración de los frutos, el crecimiento del tubo polínico, entre otros, donde ocurren modificaciones de la pared celular. Se ha planteado que las proteínas del tipo expansinas rompen los puentes de hidrógeno que unen los filamentos de celulosa y la celulosa con otros polisacáridos, mediante un proceso no enzimático, que favorece la posterior degradación de la pared celular. En este trabajo se hace una revisión bibliográfica acerca de las características de la pared celular vegetal y su composición, así como de las enzimas ligninolíticas de bacterias y hongos que la degradan, las propiedades y el potencial que tienen las proteínas con actividad tipo expansina para hacer más eficiente la liberación de azúcares reductores del material lignocelulósico.

Palabras clave: lignocelulosa, celulasas, expansinas, hongos, biocombustibles

Biotecnología Aplicada 2011;28:194-204

ABSTRACT

Plant Cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. Lignocellulose constitutes a raw material with considerable potential for the production of fermentable sugars and the generation of biofuels. In nature, lignocellulosic waste from forestry, agriculture and gardening acts as the preferred carbon source of a number of bacteria and fungi endowed with the required ligninolytic machinery. These hydrolytic activities could potentially be complemented with those from other proteins that remodel the structure of cell walls, such as expansins, a group of proteins originally identified in plants that have the capacity of relaxing cell wall tension to allow cell growth. Expansins participate in processes where remodeling of the plant cell wall is required: organogenesis, fruit ripening, and growth of the pollen tube, among others. Expansins and expansin-like proteins have been proposed to act by disrupting the hydrogen bonds binding together cellulose fibrils and cellulose and other polysaccharides through a non-enzymatic process, enhancing subsequent degradation. In this manuscript, a review on plant cell wall composition and ligninolytic enzymes from cell wall-degrading bacteria and fungi is presented. Proteins with expansin-like activity, their properties and their potential application to enhance sugar release from lignocellulosic material are also reviewed.

Keywords: lignocellulose, cellulases, expansins, fungi, biofuels

Introducción

La lignocelulosa es el principal y más abundante componente de la biomasa renovable producida por la fotosíntesis; se estima que anualmente se forman 200 000 millones de toneladas en el mundo [1-2]. Consta de tres biopolímeros principales que forman la pared celular de las plantas: celulosa, hemicelulosa y lignina [1], además de pequeñas cantidades del polisacárido pectina, ceniza y proteínas [2]. La celulosa es el biopolímero más abundante en la Tierra. En la naturaleza se encuentra principalmente como componente estructural de la pared celular de las plantas y las algas marinas, aunque también se produce en algunos animales como los tunicados y microorganismos como las bacterias [3]. No se acumula en la tierra debido a los hongos y las bacterias que degradan algunos de los materiales de la pared celular. Pese a que es un proceso muy lento, estos organismos tienen una función fundamental en el reciclaje del carbono de regreso al ecosistema [4]. Una potencial aplicación de las grandes cantidades de lignocelulosa es en la obtención de

biocombustibles, como una fuente energética alternativa a los combustibles fósiles que actualmente se utilizan [5].

El principal impedimento para la utilización de la biomasa celulósica es la ausencia de una tecnología de bajo costo, por lo que una estrategia prometedora consiste en el uso de enzimas de organismos ligninolíticos que remodelen y degraden eficientemente la pared celular [3].

Estructura de la pared celular y composición del material lignocelulósico

La pared celular es una estructura altamente organizada, formada principalmente por celulosa, hemicelulosa y el polímero fenólico lignina (Figura 1) [6]. La composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso en una misma planta, de acuerdo con la edad, el tejido y la etapa de crecimiento [1]. La estructura de la pared celular está formada de manera que pueda desarrollar gran canti-

1. Zhang YH, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng.* 2004; 88(7):797-824.

2. Zhong R, Ye ZH. Regulation of cell wall biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol.* 2007; 10(6):564-72.

3. Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(3):506-77.

4. Aro N, Pakula T, Penttilä M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(4):719-39.

5. Gray KA, Zhao L, Emptage M. Bioethanol. *Curr Opin Chem Biol.* 2006;10(2): 141-6.

dad de funciones opuestas. Es responsable de la resistencia a la tensión, así como de dar forma a la célula y conferirle resistencia contra agentes patógenos; al tiempo que debe mantener una flexibilidad razonable contra las fuerzas de rompimiento y un grado mínimo de permeabilidad para que las moléculas señalizantes puedan entrar a la célula [7].

Celulosa

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza, altamente estable e insoluble en agua. Es el principal componente de la pared celular de las plantas: constituye el 50% del peso seco de la madera y en dependencia de su origen, puede tener un grado de polimerización de alrededor de 2000 a 25 000 unidades de glucosa [7-8]. Está compuesta por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos β -1,4, que forman moléculas de celobiosa (dímero de glucosa unido por un enlace β -1,4). Estas, a su vez, se estructuran en filamentos de celulosa no ramificados [9]. En la naturaleza, la celulosa no se encuentra como cadena sencilla; desde su síntesis se ordena en filamentos que forman las microfibrillas, con un diámetro de 5 a 15 nm. Estas fibrillas pueden contener desde 36 hasta más de 1200 filamentos de celulosa [7]. La configuración del enlace β glucosídico facilita que la celulosa forme cadenas largas y lineales unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, que forman una estructura cristalina y organizada resistente a la hidrólisis en ciertas áreas de la microfibrilla (Figura 2A) [9]. Las regiones cristalinas altamente organizadas están separadas por celulosa no organizada o amorfa que se presenta en pequeños porcentajes (de 5 a 20%). En esta última conformación, la celulosa es más susceptible a la degradación enzimática [10-11]. La celulosa es un sustrato muy resistente, que se encuentra entrelazado, a su vez, con la hemicelulosa y la lignina, formando una estructura altamente resistente a la degradación, por lo que solo algunos organismos celulolíticos pueden hidrolizarla [8].

Hemicelulosa

La hemicelulosa constituye entre el 25 y el 30% del total del peso seco de la madera. Es un polímero complejo de heteropolisacáridos, formado principalmente por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) usualmente acetiladas que forman cadenas ramificadas, además de los azúcares ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, unidos por enlaces glucosídicos β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 [9]. En contraste con la celulosa, la hemicelulosa posee ramificaciones laterales cortas formadas de distintos azúcares que la hacen menos recalcitrante (Figura 2B) [9, 12]. Se clasifica en xilanos, xiloglucanos, mananos, glucomanos y glucanos unidos por enlaces β -1,3 o β -1,4. El xilano es el componente más abundante en la hemicelulosa (constituye más del 70% de su composición) y está formado por la unión β -1,4 de unidades de D-xilosa. Puede tener diversas sustituciones, y originar los arabinoxilanos (si contiene arabinosa) presentes en los pastos, o los glucuronoxilanos y glucuronoarabinoxilanos (si contiene residuos glucosa y glucosa-arabinosa, respectivamente) que son los principales componentes de la pared secundaria de las plantas di-

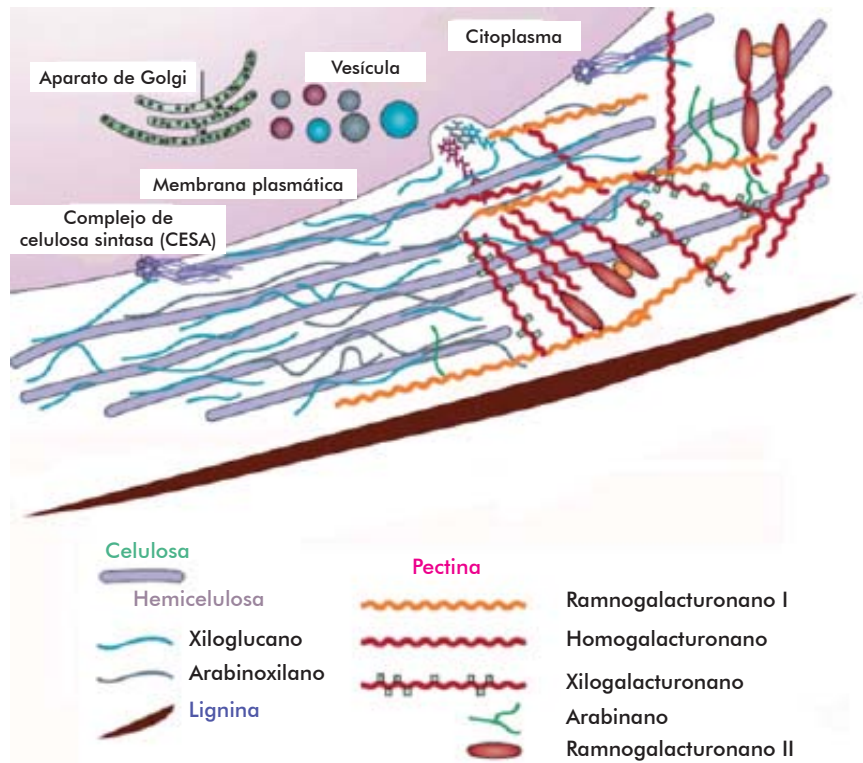


Figura 1. Composición de la pared celular vegetal. Formada básicamente por los polisacáridos de celulosa, hemicelulosa, pectina y el polímero fenólico de la lignina. Esta última forma una matriz que protege a los polisacáridos. Modificado de Cosgrove (Cosgrove DJ. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(11):850-61).

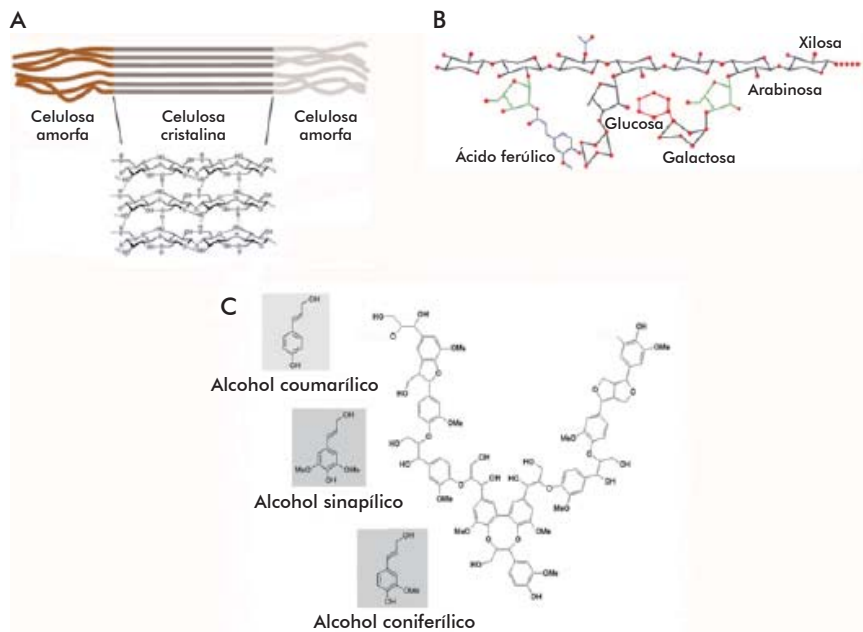


Figura 2. Estructura de los principales biopolímeros que forman la pared celular vegetal. A) Estructura del homopolisacárido de la celulosa cristalina y amorfa. El arreglo de la celulosa en las zonas cristalinas se mantiene por los puentes de hidrógeno que se forman entre los filamentos. En las zonas amorfas existen dobles y torsiones que impiden el arreglo ordenado. (<http://www.cottoninc.com/Cotton-Nonwoven-Technical-Guide>). B) Estructura del heteropolisacárido de la hemicelulosa, formada por pentosas (xilosa, arabinosa) y hexosas (glucosa, galactosa) y el ácido ferúlico. Esta composición varía de acuerdo con el origen y el tejido de la planta. C) Estructura de la lignina, formada por la polimerización de tres alcoholes fenólicos. Imagen modificada de Boerjan et al. [56].

cotiledóneas. Además de la xilosa, los xilanos pueden contener arabinosa, ácido glucurónico o 4-O-metil éter-ácido glucurónico, ácido acético, ferúlico o ácidos p-coumáricos. La composición y frecuencia de las ramificaciones dependen del origen de la hemicelulosa [13]. En las maderas duras (madera de árboles que cambian hojas: álamo, abedul, olmo), la hemicelulosa principal es el xilano, donde entre el 60 y el 70% de los residuos de xilosa están acetilados, en tanto que en las maderas suaves (madera de coníferas: pino, cedro), la hemicelulosa principal es el glucomanano [14].

En los mananos y galactomananos de la hemicelulosa el esqueleto principal lo forman residuos de manosa unidos por enlaces β -1,4, y en los glucomananos, el esqueleto de manosa está ramificado aleatoriamente con residuos de manosa y glucosa. Las hemicelulas tienen diferencias estructurales entre las especies y entre los tipos celulares de las plantas [14-15]. La función más importante de la hemicelulosa es que actúa como conexión entre la lignina y las fibras de celulosa, lo que otorga mayor rigidez a la red celulosa-hemicelulosa-lignina. La lignina y la hemicelulosa se mantienen unidas de manera predominante a través de enlaces del tipo éster entre la arabinosa de la hemicelulosa y los hidroxilos de la lignina, en tanto que la unión con la celulosa es a través de puentes de hidrógeno [16].

Lignina

La lignina es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, después de la celulosa y la hemicelulosa. Es altamente resistente a la degradación química y biológica. Forma parte de la pared celular, confiéndole soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque de microorganismos. La lignina y la hemicelulosa crean una matriz amorfa donde las fibras de celulosa están embebidas y protegidas de la degradación [17].

Estructuralmente, la lignina es un heteropolímero irregular, insoluble y ramificado, formado por la polimerización de tres alcoholes aromáticos del tipo fenilpropano: alcohol coumarílico, coniferílico y sinapílico, unidos por enlaces C-C y enlaces del tipo éster entre los anillos aromáticos. Este polímero da rigidez y protege a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa), además de que constituye del 20 al 30% de la madera de los árboles (Figura 2C) [4, 18-19]. El constituyente principal en las maderas suaves, es el alcohol coniferílico, y en las maderas duras: el alcohol coumarílico y el sinapílico [12]. La lignina es el componente más difícil de degradar del material lignocelulósico. Ello limita su uso y la hidrólisis de los polisacáridos que protege. Son pocos los organismos que pueden mineralizarla [18].

Organismos degradadores de la lignocelulosa

En la naturaleza hay organismos que pueden degradar los componentes de la lignocelulosa. Se han identificado bacterias aerobias con propiedades celulolíticas del orden Actinomycetales (*Phylum actinobacteria*), que se encuentran en los suelos, el agua, el humus, los desechos agrícolas como los de la caña de azúcar y las hojas en descomposición [20]. Se han descrito sistemas enzimáticos de celulasas y xilanasas en las bacterias aerobias como *Pseudomonas fluorescens*

subesp. *cellulosa*, *Streptomyces lividans* y *Cellulomonas fimi* que degradan los componentes de la pared celular [21-23]. En las bacterias anaerobias del orden Clostridiales (*Phylum firmicutes*), que generalmente se hallan en los suelos, sobre desechos vegetales en descomposición, el rumen de animales, el tracto de las termitas, las compostas, las aguas residuales y las plantas de procesamiento de madera, se han identificado complejos enzimáticos celulolíticos llamados celulosomas [20]. En algunas bacterias anaerobias con propiedades celulolíticas como *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Clostridium cellulovorans*, *C. cellulolyticum* y *C. thermocellum* se han caracterizado celulasas y xilanasas [24-26].

En ambientes extremos también se han identificado microorganismos celulolíticos, como la bacteria antártica *Pseudoalteromonas haloplanktis* [27].

Entre los hongos, los basidiomicetos son los más eficientes en el proceso de descomposición, por lo que están considerados los principales degradadores de la madera con todos sus componentes [3, 17, 28]. La utilización del material lignocelulósico está ampliamente distribuida en los hongos, desde los chitridiomycetos hasta los basidiomicetos. Se han descrito diversas especies celulolíticas entre los hongos anaerobios chitridiomycetos, que habitan en el tracto gastrointestinal de animales ruminantes [29]. Los cinco géneros de hongos anaerobios más estudiados son *Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* y *Piromyces* [30]. A diferencia de los hongos aerobios, los anaerobios producen grandes complejos multienzimáticos de celulasas y hemicelulasas similares a los celulosomas bacterianos [31-32] (Tabla 1). La propiedad celulolítica de los hongos aerobios que habitan en la hojarasca de los suelos y en los restos de madera, se manifiesta en los zigomicetos: solo los hongos del género *Mucor* muestran una actividad celulolítica importante. Por el contrario, en los ascomicetos y basidiomicetos hay varios géneros celulolíticos como *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Schizophyllum*, *Volvariella*, *Pycnoporus* y *Bjerkandera* [3, 33-35]. Dos de los hongos ascomicetos aerobios más estudiados por su importancia industrial son *Trichoderma reesei* y *Phanerochaete chrysosporium* [20].

Enzimas que participan en la hidrólisis de la lignocelulosa

Las celulasas son O-glucósido hidrolasas (GH) que hidrolizan el enlace β -1,4 de la celulosa. Se encuentran de manera predominante en organismos procariontes y en hongos [8]. Se ha descrito más de una decena de especies de hongos productores de celulasas, entre los que destacan las especies de *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. reesei*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *A. terreus*, y *P. chrysosporium*, conocidos por su propiedad celulolítica [18]. En la levadura marina *Aureobasidium pullulans* también se han identificado genes de celulasas [36]. Curiosamente en el nemátodo *Bursaphelenchus xylophilus* que infecta al pino, se ha identificado una familia de genes de celulasas (GH45), tal vez obtenidos por transferencia horizontal [37]. Actualmente, las GH están clasificadas de acuerdo con su secuencia de aminoácidos en

- Fry SC. Plant Cell Walls. In: Encyclopedia of Life Sciences [Internet]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2001 Apr [cited 2011 May 17]. Available in: <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refid-a0001682.html>
- Levy I, Shani Z, Shoseyov O. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-beta-glucanase and cellulose-binding domains. *Biomol Eng.* 2002;19(1):17-30.
- Hildén L, Johansson G. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnol Lett.* 2004;26(2):1683-93.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol.* 2002; 5(2):53-63.
- Atalla R. The Structures of Native Celluloses. 10th international symposium on wood and pulping chemistry. TAPPI Press. 1993;1:608-14.
- Béguin P, Aubert JP. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev.* 1994;13(1):25-58.
- Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol.* 2005;8(3):195-204.
- Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2003;30(5): 279-91.
- Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008;35(5): 377-91.
- Scheller H, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol.* 2010;61:263-89.
- Laureano-Perez L, Teymoury F, Alizadeh H, Dale BE. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. *Appl Biochem Biotechnol.* 2005;121-124: 1081-99.
- Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.* 2009;27(2):185-94.
- Cunningham RE, López GD. Etanol de lignocelulósicos: Tecnología y perspectivas. Santa Fe: Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico; 1994.
- Hammel KA. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. *New J Chem.* 1996;20:195-8.
- Doi RH. Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome and noncellulosome producers. *Ann New York Acad Sci.* 2008;1125:267-79.
- Khanna S, Gauri. Regulation, purification, and properties of xylanase from *Cellulomonas fimi*. *Enzyme Microbiol Technol.* 1993;15(11):990-5.
- Braithwaite KL, Black GW, Hazlewood GP, Ali BR, Gilbert HJ. A non-modular endo-beta-1,4-mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa*. *Biochem J.* 1995;305(Pt 3):1005-10.

familias de celulasas [38]. De las 122 familias, 14 que corresponden a celulasas. La mayoría de las celulasas y otras glucósido hidrolasas se caracterizan por su estructura modular que incluye tres módulos: el módulo catalítico, un péptido de unión (*linker*) altamente O-glicosilado y un módulo de unión a celulosa (CBM) [3]. Este último dominio facilitaría la hidrólisis de la celulosa al aproximar el módulo catalítico al sustrato [39]. Las celulasas se clasifican de acuerdo con su actividad enzimática en tres grupos: exoglucanasas, endoglucanasas y β -glucosidasas; algunas de ellas se han cristalizado, lo que ha posibilitado deducir su estructura tridimensional [40].

Las exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH) (EC 3.2.1.74; 1,4- β -D-glucano-glucanohidrolasa y EC 3.2.1.91; 1,4- β -D-glucano-celobiohidrolasa) actúan progresivamente sobre los extremos reductor y no reductor de las cadenas del polisacárido de celulosa, liberando celobiosa como principal producto [4]. Estas enzimas representan del 40 al 70% del componente total del sistema de celulasas, y pueden hidrolizar la celulosa cristalina (Figura 3A). Son enzimas monoméricas, con una masa molecular entre los 50 y los 65 kDa, aunque en algunos hongos como *Sclerotium rolfisii* son más pequeñas (41.5 kDa) [41]. La glicosilación en las exoglucanasas es muy baja (menor que el 12%) o nula, su pH óptimo de actividad catalítica es entre 4 y 5, y su temperatura óptima es de 37 a 60 °C, en dependencia de la enzima y el sustrato [42-43]. Las exoglucanasas se han identificado en hongos de podredumbre blanca y blanda, así como en el patógeno de plantas *S. rolfisii*, y solo en unos pocos basidiomicetos de podredumbre café como *Fomitopsis palustris* [44].

Las endoglucanasas (EG) (EC 3.2.1.4; 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasa) 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 [4]. Se considera que estas enzimas son las que inician el ataque azaroso en múltiples sitios internos de las regiones amorfas de la fibra de celulosa, y favorece la acción subsecuente de las celobiohidrolasas en los extremos reductor y no reductor recién creados [45]. Las endoglucanasas son enzimas monoméricas, cuya masa molecular oscila entre los 22 y la 45 kDa, aunque en algunos hongos como *S. rolfisii* y *Gloeophyllum sepiarium* se han identificado enzimas con el doble del tamaño [46]. En general, las endoglucanasas no están glicosiladas; sin embargo, sí llegan a contener una cantidad relativamente baja de carbohidratos (de 1 a 12%) [42]. El pH óptimo para la actividad endoglucanasa es entre 4 y 5, y solamente la endoglucanasa del basidiomiceto *Volvaria volvacea* expresada heterológicamente en levadura presenta un pH óptimo neutro [47]. La temperatura óptima de las endoglucanasas oscila entre 50 y 70 °C [48]. Las endoglucanasas se han aislado de hongos basidiomicetos de la podredumbre blanca y café, del patógeno *S. rolfisii*, la levadura *Rhodotorula glutinis* y del simbiote de termitas *Termitomyces* sp. [42].

Una hidrólisis exhaustiva de la celulosa también requiere de las β -glucosidasas (BGL) (EC 3.2.1.21), que hidrolizan la celobiosa y liberan dos moléculas de glucosa, lo cual contribuye a proveer una fuente

Tabla 1. Algunos hongos celulolíticos aerobios y anaerobios, las enzimas que producen, y los sustratos que degradan. Recopilado de Dashtban M, Schraft H, Qin W [28] y Quiroz-Castañeda RE, et al. [33]

	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, peroxidasas, 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>
Hongos anaerobios (Celulosomas)		<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>
	Anaeromyces	<i>Anaeromyces mucrunatus</i>	Celulasas (CMCasa), hemicelulasas	Heno
	Caecomyces	<i>Caecomyces communis</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

de carbono fácilmente metabolizable [4]. Los hongos de podredumbre blanca y café, y los que forman micorrizas, patógenos de plantas y levaduras, producen estas enzimas [42]. Las β -glucosidasas pesan entre 35 y 640 kDa, existen enzimas de aproximadamente 100 kDa que son monoméricas y también se han aislado enzimas homo-oligoméricas de la levadura *Rhodotorula minuta* [49]. La mayoría de las β -glucosidasas están glicosiladas; en algunos casos, como en la BGL de 300 kDa de *Trametes versicolor*, la glicosilación puede ser superior al 90%. Tienen un pH óptimo entre 3.5 y 5.5, y una temperatura óptima en un intervalo de 45 y 75 °C [28]. Los sistemas enzimáticos de celulasas presentan una actividad colectiva mucho mayor que la suma de las actividades individuales de las enzimas, fenómeno conocido como sinergia [3]. Los sistemas de celulasas no son solamente una acumulación de enzimas que representan los tres tipos, sino que actúan de manera coordinada para hidrolizar eficientemente la celulosa [3].

La hemicelulosa se biodegrada para formar azúcares monoméricos y ácido acético. El xilano es el principal carbohidrato de la hemicelulosa y su degradación completa requiere la acción cooperada de varias enzimas hidrolíticas como las xilanasas y otras accesorias [9]. La mayoría de las hemicelulasas son glicósido hidrolasas; aunque algunas hemicelulasas son carbohidrato esterasas que hidrolizan los enlaces éster que unen al acetato o al ácido ferúlico con los azúcares ramificados.

Las xilanasas son las principales enzimas que participan en la degradación de la hemicelulosa. En este

23. Arcand N, Kluepfel D, Paradis FW, Morosoli R, Shareck F. Beta-mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme. *Biochem J.* 1993;290(Pt 3):857-63.

24. Murty MV, Chandra TS. Purification and properties of an extra cellular xylanase enzyme of *Clostridium* strain SAIV. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1992;61(1):35-41.

25. Lin LL, Thomson JA. An analysis of the extracellular xylanases and cellulases of *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. *FEMS Microbiology Letters.* 1991;84(2):197-204.

26. Tomme P, Warren RA, Gilkes NR. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microb Physiol.* 1995;37:1-81.

27. Sonan GK, Receveur-Brechot V, Duez C, Aghajari N, Czik M, Haser R, et al. The linker region plays a key role in the adaptation to cold of the cellulase from an Antarctic bacterium. *Biochem J.* 2007; 407(2):293-302.

28. Dashtban M, Schraft H, Qin W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int J Biol Sci.* 2009;5(6):578-95.

29. Lee SS, Ha JK, Kang HS, Mcallister TA, Cheng KJ. Overview of energy metabolism, substrate utilization and fermentation characteristics of ruminal anaerobic fungi. *Korean J Anim Nutr Feedstuffs.* 1997; 21(4):295-314.

30. Nicholson MJ, Theodorou MK, Brookman JL. Molecular analysis of the anaerobic rumen fungus *Orpinomyces* - insights into an AT-rich genome. *Microbiology.* 2005;151(Pt 1):121-33.

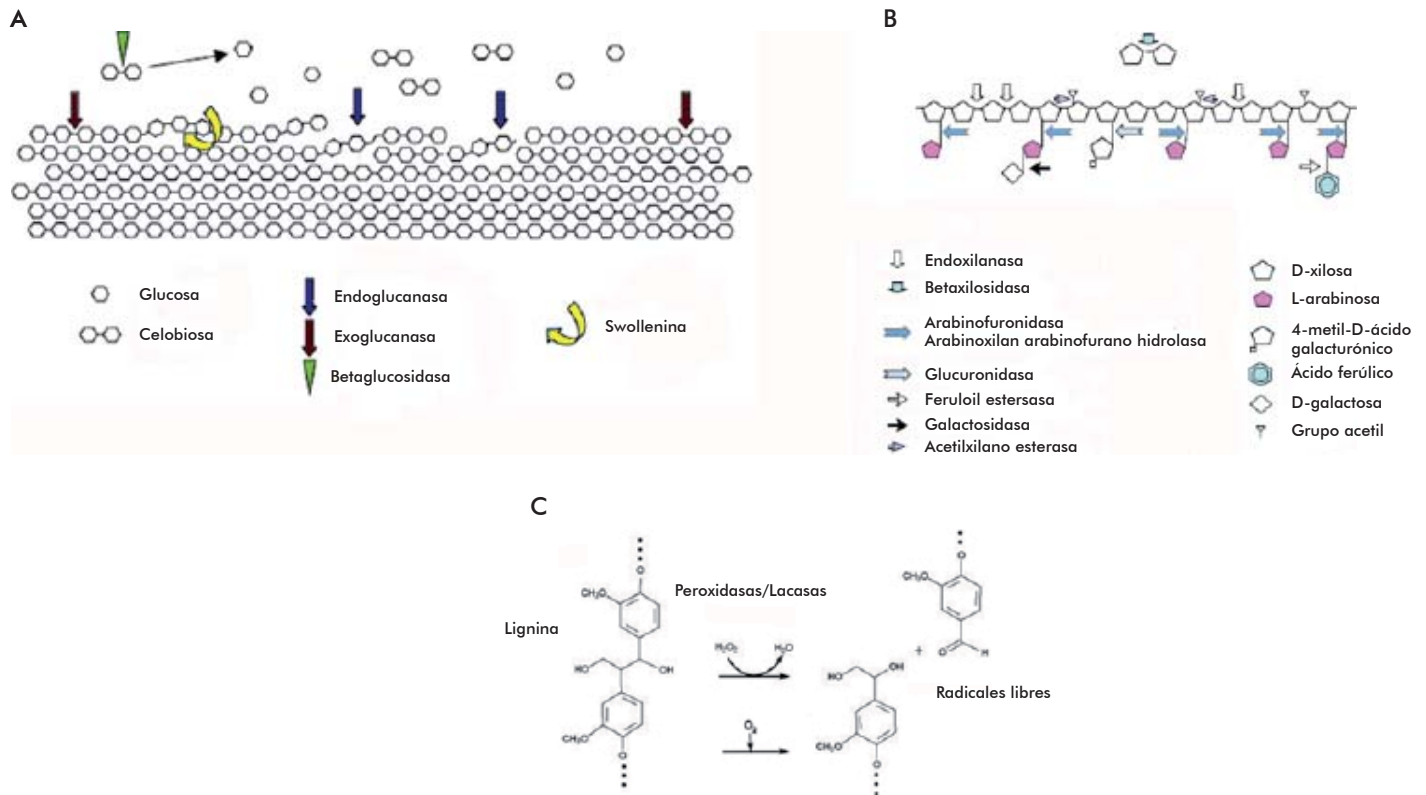


Figura 3. Enzimas que participan en la degradación de los componentes de la pared celular. A) Degradación de la celulosa. Tres tipos de actividades celulolíticas actúan de manera sinérgica para una degradación eficiente. La actividad swollenina podría hacer más eficiente este proceso al relajar la estructura de la celulosa de manera no hidrolítica. B) Degradación de la hemicelulosa. Las endoxilanasas y xilosidasas son las principales enzimas. Se requieren otras enzimas accesorias para degradar las cadenas laterales del heteropolisacárido. C) Degradación de la lignina. Participan las enzimas lacasas y peroxidasas que catalizan reacciones de oxidación, y originan radicales libres altamente inestables que favorecen la despolimerización. Imágenes tomadas de Aro *et al.* [4].

grupo se encuentran las endoxilanasas (EC 3.2.1.8; endo-1,4- β -D-xilanasas) que actúan sobre la cadena principal del polisacárido, rompen los enlaces entre las unidades de xilano, y liberan oligosacáridos.

Las β -xilosidasas (EC 3.2.1.37; xilano 1,4- β -xilosidasas) liberan xilosa a partir del rompimiento del enlace de los oligosacáridos de xilano [4, 9]. La degradación de la hemicelulosa requiere también enzimas accesorias como las xilano esterases, ferúlico y coumárico esterases, α -arabinofuranosidasas y α -4-metil glucuronosidasas, entre otras, que actúan de manera sinérgica para hidrolizar eficientemente la hemicelulosa (Figura 3B) [17]. Las xilanasas, como las enzimas celulolíticas, poseen una estructura a base de dominios catalíticos y de unión. El primero determina la especificidad y reactividad sobre el sustrato, mientras que el segundo favorece la unión de la enzima con el sustrato [9]. En diversas especies de *Aspergillus* se han clonado genes que codifican para endoxilanasas y β -xilosidasas; también se han clonado genes de xilanasas de hongos como *Penicillium*, *Agaricus bisporus* y *Magnaporthe grisea* [50-51].

Entre las hidrolasas también se agrupan unas proteínas llamadas carbohidrato esterases, que catalizan O y N deacetilaciones de sustratos como el xilano, la quitina y algunos peptidoglicanos. Se ha reportado una carbohidrato esterase en *Aspergillus* sp., llamada feruloyl esterase que incrementa la liberación de azúcares a partir de lignocelulosa, ya que remueve los ácidos

ferúlicos que entrecruzan las fibras de hemicelulosa, desestabiliza la estructura y la hace más accesible a las enzimas hidrolíticas [52-53]. También se ha visto que los niveles de la proteína acetilxilano esterase del hongo *Volvariella volvacea* se incrementan cuando el hongo crece en presencia de xilano de avena, quitina, celulosa, celobiosa, lactosa y galactosa, como fuentes de carbono [54]. Selig y cols. [55], mostraron que la actividad de enzimas como las esterases y las xilanasas, mejora el rendimiento de una celobiohidrolasa, y actúa sinérgicamente para degradar el material lignocelulósico.

La despolimerización de la lignina involucra enzimas oxidativas extracelulares que liberan productos altamente inestables y que posteriormente sufren reacciones de oxidación [56]. Los hongos de podredumbre blanca son los organismos degradadores de la lignina más eficientes. Estos poseen enzimas que participan en la ligninólisis: peroxidasas y lacasas [9]. Se han caracterizado dos grupos de peroxidasas: la lignino peroxidasa (LiP; EC 1.11.1.14) y la peroxidasa dependiente de manganeso (MnP; EC 1.11.1.13), las cuales son oxidorreductasas que catalizan reacciones oxidativas de compuestos fenólicos y no fenólicos dependientes de peróxido de hidrógeno necesarias para la degradación de la lignina [9].

La lignino peroxidasa es una glicoproteína con un grupo hemo en su centro activo. Es la peroxidasa más efectiva y puede oxidar los compuestos fenólicos y no

31. Eberhardt RY, Gilbert HJ, Hazlewood GP. Primary sequence and enzymic properties of two modular endoglucanases, Cel5A and Cel45A, from the anaerobic fungus *Pyromyces* equi. *Microbiology*. 2000;146(Pt 8):1999-2008.

32. Steenbakkers PJM, Li XL, Ximenes EA, Arts JG, Chen H, Ljungdahl LG, *et al.* Noncatalytic docking Domains of cellulosomes of anaerobic fungi. *J Bacteriol*. 2001 Sep;183(18):5325-33.

33. Quiroz-Castañeda RE, Balcázar-López E, Dantán-González E, Martínez A, Folch-Mallol 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.ejbiotechnology.cl/content/vol12/issue4/full/3/index.html>

34. Ding S, Ge W, Buswell JA. Cloning of multiple cellulase cDNAs from *Volvariella volvacea* and their differential expression during substrate colonization and fruiting. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;263(2):207-13.

35. Koseki T, Mese Y, Fushinobu S, Masaki K, Fujii T, Ito K, *et al.* Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;77(6):1279-85.

fenólicos de la lignina, las aminas, los éteres aromáticos y los aromáticos policíclicos [17].

La peroxidasa dependiente de manganeso es también una glicoproteína que utiliza el manganeso como sustrato y lo oxida de Mn^{2+} a Mn^{3+} . Este último es un fuerte oxidante de los compuestos fenólicos de la lignina [57]. Mediante estudios bioquímicos y moleculares se encontró un tercer tipo de peroxidasa descrita originalmente en el basidiomiceto *Pleurotus eryngii* [58]. Esta enzima recibe el nombre de peroxidasa versátil (PV), ya que combina las actividades de manganeso peroxidasa y de lignina peroxidasa. En el hongo *Bjerkandera adusta cepa UAMH 8258* se encontró una PV cuya síntesis se estimula por la adición exógena de varios ácidos orgánicos como glicolato, glioxalato y oxalato [59]. Esta enzima es eficiente en la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} , puede oxidar varios sustratos en ausencia de Mn, tales como 2,6-dimetoxifenol, guayacol, ABTS, ácido 3-hidroxiantranílico, o-anisina y p-anisidina. La afinidad por el alcohol veratrílico es comparable con las LiP de otros hongos [60].

Las lacasas (EC 1.10.3.1; p-difenol dioxigeno oxidoreductasa) son polifenoloxidasas que tienen cuatro iones de cobre en su centro activo y catalizan la oxidación de muchos compuestos fenólicos y no fenólicos en presencia de mediadores, y acoplan la reducción del oxígeno molecular a agua [4]. 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 [17] (Figura 3C). Se han identificado en hongos basidiomicetos como *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *T. versicolor* y *Pycnoporus sanguineus* [61].

Expansinas: proteínas que remodelan la pared celular vegetal

Además de las enzimas que degradan la lignocelulosa, es preciso resaltar la participación de otras que remodelan la estructura de la pared celular y favorecen su posterior degradación. Las expansinas son proteínas que están involucradas en la remodelación de la pared celular vegetal. Ellas inducen la extensibilidad y el relajamiento de la tensión en las paredes celulares de las plantas. Mediante estudios del mecanismo de extensión de la pared celular vegetal dependiente del pH ('crecimiento ácido'), se identificaron estas proteínas [62]. El pH de la pared celular de las plantas normalmente está determinado por la actividad de una ATPasa de H^+ , localizada en la membrana plasmática que bombea protones a la pared celular. El pH puede ser de 5.5 y disminuir hasta 4.5. Un pH extracelular bajo (menor que 5.5) causa el relajamiento de la pared celular, en gran parte por las proteínas expansinas que se encuentran en ella y tienen un pH ácido óptimo [63]. McQueen-Mason y cols. [62] aislaron dos proteínas de las paredes celulares de hipocotilos de pepino que inducían la extensión en las paredes celulares previamente inactivadas por calor. Después de que los genes que codifican para expansinas se clonaron y secuenciaron [64], las búsquedas en bases de datos genómicas y de marcadores de secuencia expresada (EST) mostraron que las expansinas están codificadas por familias multigénicas muy grandes, identificadas desde las briofitas hasta las angiospermas [65]. Las

expansinas se han encontrado en monocotiledóneas (arroz, maíz), dicotiledóneas (*Arabidopsis*), helechos y musgos [66].

Posterior al descubrimiento de las expansinas, Cosgrove y cols. [67] encontraron que el grupo I de alérgenos de polen de pastos tienen regiones de similitud significativa con la secuencia de aminoácidos de las expansinas. Demostraron que el extracto del polen de maíz aplicado a paredes celulares *in vitro* tiene actividad expansina. Algo similar se encontró en alérgenos de polen del grupo I de otras especies de pastos que también presentaron esta actividad. Se ha propuesto que las proteínas con actividad expansina secretadas por el polen suavizarían el estigma y los tejidos del estilo para facilitar la penetración del polen a través del tubo polínico [68]. Las expansinas no tienen actividad hidrolítica (glucosidasa), por lo que es probable que los enlaces que rompen sean no covalentes [69]. De hecho, se ha sugerido que las expansinas rompen los puentes de hidrógeno que se encuentran entre los filamentos de celulosa o entre la celulosa y otros polisacáridos (xiloglucanos), mediante un mecanismo no enzimático [70-71] (Figura 4B). Tienen una masa molecular promedio de 25 a 28 kDa, y de manera semejante a las celulasas, están organizadas en una estructura modular de dos dominios y un péptido señal de aproximadamente 20 aminoácidos en la región amino terminal [63]. Entre los miembros de las distintas familias de expansinas solamente existe de 20 a 40% de identidad; aunque se ha visto que el grado de conservación es mayor en el dominio I [71].

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

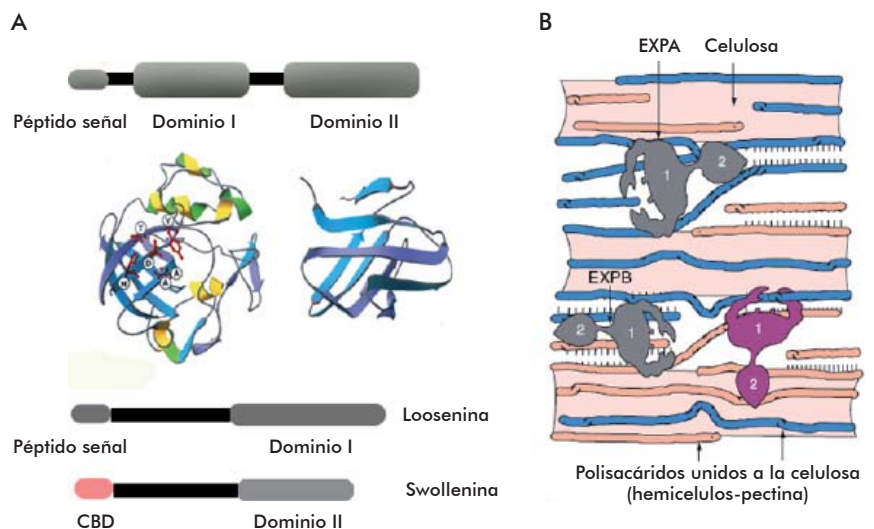


Figura 4. Dominios de las expansinas y posible función de estas proteínas. A) Estructura de las expansinas de plantas que tienen un péptido señal y los dominios I y II con su estructura tridimensional. Otras proteínas con actividad expansina (loosenina y swollenina), solamente poseen el dominio I o II. La swollenina tiene un dominio de unión a celulosa (CBD). B) Función posible de las expansinas y proteínas con actividad expansina. Se ha descrito que las expansinas rompen los puentes de hidrógeno que unen los filamentos de celulosa y de la celulosa con otros polisacáridos. Estructuras en A y B tomadas de Sampedro y Cosgrove [72].

36. Chi Z, Chi Z, Zhang T, Liu G, Li J, Wang X. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnol Adv.* 2009;27(3):236-55.

37. Kikuchi T, Jones JT, Aikawa T, Kosaka H, Ogura N. A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *FEBS Lett.* 2004;572(1-3):201-5.

38. CAZY. Carbohydrate-Active Enzymes. Glycoside Hydrolase family classification [Internet]. Marseille: AFMB - CNRS - Universités Aix-Marseille I & II. c1998-2011 - [updated 2011 Nov 18, cited 2011 Nov 21]. Available from: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>

39. Divne C, Ståhlberg J, Teeri TT, Jones TA. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J Mol Biol.* 1998; 275(2):309-25.

40. Stone B. Cellulose: Biogenesis and Biodegradation. In: *Encyclopedia of Life Sciences* [Internet]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2005 Sep [cited 2011 May 17]. [cited 2011 May 17]. Available in: <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refid-a0003297.html>

41. Sadana JC, Patil RV. 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase from *Sclerotium rolfsii*. *Methods Enzymol.* 1988;160:307-14.

42. Baldrian P, Valásková V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(3):501-21.

43. Hamada N, Ishikawa K, Fuse N, Kodaira R, Shimozaka M, Amano Y, et al. Purification, characterization and gene analysis of exo-cellulase II (Ex-2) from the white rot basidiomycete *Irpex lacteus*. *J Biosci Bioeng.* 1999;87(4):442-51.

hebras, que forma un surco para la unión al sustrato [72]. En este dominio se identifica una serie de cisteínas conservadas en los miembros de la familia GH45, que forman puentes disulfuro en las enzimas de hongos. A pesar de la presencia del dominio catalítico GH45 en las expansinas, no se ha detectado ningún tipo de actividad hidrolítica en estas proteínas [72]. El dominio II, en el extremo carboxilo terminal, es homólogo a los alérgenos de polen de pastos del grupo II. Se ha especulado que este dominio podría ser de unión a polisacáridos debido a la presencia de aminoácidos aromáticos y polares presentes en la superficie de la proteína, donde dos triptófanos y una tirosina forman una plataforma plana de residuos aromáticos que favorece la unión [63, 73]. El dominio II posee un plegamiento de β -sándwich formado por dos cubiertas de 4 láminas β antiparalelas cada una (Figura 4A). De hecho, un β -sándwich formado por 3 a 6 láminas β por cubierta es el plegamiento más común en los módulos de unión a carbohidratos que generalmente se unen a sustratos como la celulosa cristalina o la quitina [74]. Whitney y cols. [75] incubaron un compuesto de celulosa y xiloglucanos de origen bacteriano con una expansina de pepino, y observaron un rápido relajamiento en la estructura del compuesto. Este resultado utilizando 'paredes celulares artificiales' sugiere que las expansinas afectan la unión de los filamentos de celulosa y los xiloglucanos, al relajar los enlaces que los mantienen unidos. Recientemente, Wei y cols. [71] reportaron que una α expansina de pepino participa de manera sinérgica con una pectino liasa, para favorecer la actividad de la enzima, mediante el rompimiento de los puentes de hidrógeno que existen entre la pectina y el xiloglucano.

La superfamilia expansina está formada por 4 familias: α expansinas (EXPA), β expansinas (EXPB), proteínas tipo expansina α (EXLA) y proteínas tipo expansina β (EXLB) [72]. 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 [76], la degradación de la pared celular durante la maduración de frutos [77-79] y otros, donde la extensión de la pared celular es crucial [66, 80-81]. La familia EXPB incluye a los alérgenos de polen del grupo I de pastos. Estas proteínas son secretadas por los granos de polen y se ha propuesto que sus funciones biológicas serían suavizar el estigma y los tejidos del estilo, para facilitar la penetración del polen a través del tubo polínico [67]. Las EXPB relajan principalmente la pared celular de los pastos, contrario a las EXPA. Esta selectividad podría ser reflejo de las diferencias que existen en la composición de la pared celular de los pastos y las dicotiledóneas [67]. En el dominio I de las familias EXPA y EXPB se ha identificado el motivo HFD que forma parte del sitio catalítico de las endoglucanasas. Los miembros de las familias EXLA y EXLB no poseen este motivo, lo que sugiere que posiblemente su modo de acción difiera con el resto de las expansinas [72].

En las familias EXLA y EXLB se incluyen proteínas identificadas por análisis de secuencias. A pesar de poseer los dos dominios característicos de las expansinas, su secuencia de aminoácidos diverge de la de las familias EXPA y EXPB [82]. Los miembros

de la familia EXLA tienen el motivo conservado CDRC en el extremo amino terminal del dominio I, y en su dominio II tienen una extensión de aproximadamente 17 aminoácidos que no está presente en el resto de las familias de expansinas [72]. Recientemente, Dermatev y cols. [83] reportaron que una proteína EXLB de tomate podría tener una función importante en la planta durante las etapas tempranas de la interacción con el hongo formador de micorriza *Glomus intraradices*, pues se observó que un silenciamiento transcripcional parcial de la EXLB causa una reducción en la formación de esporas del hongo y la expansión arbuscular. Otro grupo de la superfamilia, es la familia expansinas tipo X (EXLX), que abarca proteínas con una homología distante con los dominios de las EXPA y EXP, y están en organismos distintos de plantas [82], como las identificadas en el hongo mucilaginoso *Dictyostelium* [84] y en las bacterias *Bacillus subtilis*, *Clavibacter michiganensis* y *Hahella chejuensis* [85-87].

El nombre de expansina o tipo expansina se reserva para las proteínas que poseen ambos dominios (I y II). Las proteínas que solo tienen uno de estos no podrán ser clasificadas como expansinas [82].

Función biológica de las expansinas

Diversos estudios han tenido la finalidad de evaluar la función biológica de las expansinas: inmunolocalización, análisis de la expresión de genes de expansinas, expresión ectópica de genes de expansinas y reducción de la expresión de expansinas utilizando secuencias antisentido y plantas transgénicas.

Inmunolocalización de las expansinas

Las expansinas se han localizado en los meristemos y en las zonas de crecimiento de la raíz y del tallo de las plantas, así como en la formación del primordio de la hoja en los meristemos apicales y en las paredes de las células de la epidermis durante la formación de las raíces [76, 88]. En estudios de inmunolocalización, se han encontrado distribuidas de manera dispersa en la pared celular, sin estar restringidas a sitios específicos o en la interfase de la membrana plasmática-pared celular. También se ha observado que las vesículas de Golgi en algunas ocasiones son marcadas con el anticuerpo, lo que indicaría que las expansinas son transportadas a la pared celular por la vía de secreción de proteínas [72].

Un estudio de inmunofluorescencia utilizando pelos radicales de maíz, mostró que las expansinas se acumulan en el citoplasma y en la pared celular del primordio emergente [89]. Las expansinas de la familia EXPB son muy abundantes en los granos de polen de los pastos y se han localizado tanto en la superficie del polen como intracelularmente [90].

Análisis de la expresión de genes

Estudios de la expresión de genes de expansinas por *northern blot* e hibridación *in situ* han mostrado que estos genes se expresan diferencialmente en distintos órganos, tejidos y tipos celulares, y que además responden de distinta manera a los tratamientos con hormonas vegetales, luz y polinización. Estos estudios indican que las expansinas estarían participando en distintos eventos que van desde la germinación hasta

44. Yoon JJ, Kim YK. Degradation of crystalline cellulose by the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *J Microbiol.* 2005;43(6):487-92.
45. Lynd LR, Cushman JH, Nichols RJ, Wyman CE. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science.* 1991;251(4999):1318-23.
46. Sadana JC, Lachke AH, Patil RV. Endo-(1-4)-beta-D-glucanases from *Sclerotium rolfsii* -purification, substrate specificity, and mode of action. *Carbohydr Res.* 1984; 133:297-312.
47. Ding SJ, Ge W, Buswell J. Secretion, purification and characterisation of a recombinant *Volvariella volvacea* endoglucanase expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme Microbiol Technol.* 2002; 31:621-6.
48. Valásková V, Baldrian P. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* - production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology.* 2006;152:3613-22.
49. Onishi N, Tanaka T. Purification and properties of a galacto- and gluco-oligosaccharide-producing betaglycosidase from *Rhodotorula minuta* IFO879. *J Ferment Bioeng.* 1996;82(5):439-43.
50. Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 67(5):577-91.
51. Kimura I, Sasahara H, Tajima S. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. *J Ferment Bioeng.* 1995;80(4):334-9.
52. Hermosa JA, Sanz-Aparicio J, Molina R, Juge N, González R, Faulds CB. The crystal structure of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* suggests evolutionary functional convergence in feruloyl esterase family. *J Mol Biol.* 2004;338(3):495-506.
53. Ramírez L, Arrizon J, Sandoval G, Cardador A, Bello-Mendoza R, Lappe P, et al. A new microplate screening method for the simultaneous activity quantification of feruloyl esterases, tannases, and chlorogenate esterases. *Appl Biochem Biotechnol.* 2008;151(2-3):711-23.
54. Liu X, Ding S. Molecular characterization of a new acetyl xylan esterase (AXEII) from edible straw mushroom *Volvariella volvacea* with both de-O-acetylation and de-N-acetylation activity. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;295(1):50-6.
55. Selig MJ, Knoshaug EP, Adney WS, Himmel ME, Decker SR. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. *Bioresour Technol.* 2008;99(11):4997-5005.
56. Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol.* 2003; 54:519-46.
57. Ikehata K, Buchanan I, Smith D. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *J Environ Eng Science.* 2004;3(19):1-19.

la maduración de frutos, así como en la polinización y la respuesta de crecimiento en condiciones de inundación. Por ejemplo, Reinhardt y cols. (88) encontraron que el gen *LeExp18* de una α expansina de tomate se expresaba durante la formación del primordio visible de la hoja en el meristemo apical de las plantas de tomate [88]. Durante el crecimiento y maduración de los frutos de esa planta y de fresa se ha evidenciado un incremento diferencial en el contenido de un gen de una α expansina [78-79]. De manera semejante, en la germinación de plantas de tomate se ha observado que el transcrito de una α expansina se acumula en el endospermo, posiblemente con la finalidad de remodelar la estructura de la pared celular y facilitar la aparición de la radícula [91]. En maíz, cinco genes de α y β expansinas mostraron una expresión diferencial en las etapas de plantas jóvenes y adultas, en diferentes órganos. En el internodo de la planta de arroz, la hormona vegetal giberelina (GA) induce la expresión de cinco genes de β expansinas que correlaciona con un rápido crecimiento [92-93].

Expresión ectópica de genes de expansinas

Pien y cols. [94] indujeron la expresión local del gen de expansina *CsEx29* de pepino en el primordio incipiente de la hoja en el meristemo apical de plantas de tabaco. Los resultados mostraron que la expresión de la expansina es capaz de inducir el crecimiento precoz del primordio de la hoja con un cambio en la filotaxis (disposición que presentan las hojas en el tallo) del meristemo apical.

La aplicación de expansinas en los primordios de la hoja de plantas de tomate forzó su crecimiento, y se obtuvieron hojas deformes, tal como observaron Fleming y cols. [95]. La aplicación exógena de expansinas en hipocotilos de *Arabidopsis* puede estimular una elongación comparable con la aplicación de $1 \mu\text{M}$ de la hormona vegetal auxina [81].

Uso de secuencias antisentido y plantas transgénicas de expansinas

Debido a que las expansinas forman familias multigénicas, ha sido un reto determinar la función biológica de los genes individuales; sin embargo, se han logrado algunos avances. Por ejemplo, Cho y Cosgrove [96] utilizaron la secuencia antisentido de una α expansina y observaron una reducción en su expresión y una disminución significativa en el crecimiento de plantas de *Arabidopsis*. Por otro lado, la supresión del gen *LeEXPA1* de tomate durante la maduración causa una mayor firmeza en el fruto, y mejora su tiempo de almacenamiento [97]. En la mayoría de los casos, el silenciamiento de los genes de expansinas lleva a la inhibición del crecimiento mientras que una expresión ectópica excesiva conduce a un crecimiento anormal.

Las expansinas se han relacionado con procesos de desarrollo en los que ocurre un relajamiento de la pared celular, como la maduración de frutos [77, 97], la formación del xilema [98], la abscisión del desarrollo de plantas parásitas [99], la germinación de semillas [91], la penetración del tubo polínico a través del estigma [67, 100], la formación de asociaciones tipo micorriza con hongos simbioses en raíces [83], el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas [101], el desarrollo de plantas parásitas

[102], y la rehidratación de la planta de resurrección *Craterostigma plantagineum*, que se curva cuando se seca y se expande cuando se hidrata [103].

Algunas plantas que están adaptadas a ambientes acuáticos responden ante la condición de inundación con una elongación pronunciada, la cual activa la expresión de genes de expansina [69, 104]. Se ha observado que en el arroz en condiciones de hipoxia e inundación, aumenta el nivel de expresión de una α expansina y el crecimiento del coleóptilo. Una relación similar se encontró entre el crecimiento de la fibra de algodón y una alta expresión de genes de α expansinas durante la fase temprana de la elongación [105-106].

También se ha observado la expresión de genes de expansinas en condiciones de sequía; por ejemplo, en los brotes de las hojas del pasto tolerante a la temperatura *Agrostis scabra*, se indujo el gen *AsEXPI* de una proteína tipo expansina después de exponerlos una hora a un estrés por calor [107]. En la planta de resurrección, *C. plantagineum*, se encontró una correlación entre la extensión de las hojas durante la deshidratación y el incremento en los niveles de transcritos de α expansinas en las paredes celulares de las hojas, lo que sugiere que estas proteínas tienen una función en la regulación del crecimiento de la hoja durante la deshidratación. La función de las expansinas tanto en sequía como en deshidratación aún debe ser investigado [103].

Diversidad taxonómica de las expansinas

En *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays* y *Triticum aestivum* se han identificado proteínas expansinas y tipo expansinas [65, 93, 108-109]. De manera similar, en plantas como los helechos *Regnellidium diphyllum* y *Marsilea quadrifolia*, en gimnospermas como el pino y el álamo, y en el musgo *Physcomitrella patens*, así como en el nemátodo *Globodera rostochiensis* que infecta la papa, se han encontrado algunos miembros de la superfamilia expansina, que favorecerían el proceso de infección [108, 110-112] (Tabla 2). Se ha analizado la actividad de las EXLX identificadas en *Dictyostelium discoideum* y en las bacterias *B. subtilis*, *Xylella fastidiosa* y *C. michiganensis*, así como en la bacteria marina *H. chejuensis* [84-87, 108].

Otras proteínas con actividad tipo expansina

Las proteínas tipo expansinas identificadas en hongos como *T. reesei*, que es un degradador del material vegetal, podrían favorecer la degradación de la celulosa. De esta forma, las expansinas y las proteínas tipo expansinas de hongos podrían estar involucradas en la patogénesis de plantas o en la degradación de la pared celular para utilizar sus componentes como fuente de carbono [108]. En hongos ascomicetos como *Trichoderma* y *Aspergillus* se han identificado proteínas con actividad tipo expansina llamadas swolleninas [113-115] (Tabla 2). Saloheimo y cols. [114] describieron la clonación y expresión en *S. cerevisiae* del gen de una swollenina, *swol1*, de *T. reesei* que codifica para una proteína que modifica la estructura de la celulosa de las fibras de algodón (regiones con hinchamiento

58. Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J Biol Chem.* 1999;274(15):10324-30.

59. Wang Y, Vazquez-Duhalt R, Pickard MA. Manganese-lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. *Can J Microbiol.* 2003;49(11):675-82.

60. Mester T, Field JA. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *J Biol Chem.* 1998;273(25):15412-7.

61. Dantán-González E, Vite-Vallejo O, Martínez-Anaya C, Méndez-Sánchez 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 Microbiol.* 2008 Sep;11(3):163-9.

62. McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell.* 1992;4(11):1425-33.

63. Cosgrove DJ. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature.* 2000; 407(6802):321-6.

64. Shcherban TY, Shi J, Durachko DM, Gultinan MJ, McQueen-Mason SJ, Shieh M, et al. Molecular cloning and sequence analysis of expansins—a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(20):9245-9.

65. Li Y, Jones L, McQueen-Mason S. Expansins and cell growth. *Curr Opin Plant Biol.* 2003;6(6):603-10.

66. Lee Y, Choi D, Kende H. Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Curr Opin Plant Biol.* 2001;4(6):527-32.

67. Cosgrove DJ, Bedinger P, Durachko DM. Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(12):6559-64.

68. Li LC, Cosgrove DJ. Grass group I pollen allergens (b-expansins) lack proteinase activity and do not cause wall loosening via proteolysis. *Eur J Biochem.* 1999; 263(1):33-40.

69. Cho HT, Kende H. Expression of Expansin Genes Is Correlated with Growth in Deepwater Rice. *Plant Cell.* 1997;9(9): 1661-71.

70. McQueen-Mason S, Cosgrove DJ. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(14):6574-8.

71. Wei W, Yang C, Luo J, Lu C, Wu Y, Yuan S. Synergism between cucumber alpha-expansin, fungal endoglucanase and pectin lyase. *J Plant Physiol.* 2010; 167(14):1204-10.

72. Sampedro J, Cosgrove DJ. The expansin superfamily. *Genome Biol.* 2005; 6(12):242.

73. Cosgrove DJ. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell.* 1997;9(7):1031-41.

tos, de ahí su nombre en inglés), sin liberar azúcares reductores. Swol1 es una proteína con actividad tipo expansina de hongos, que contiene un dominio de alérgeno de polen y un dominio de unión a celulosa.

Existen otras swolleninas reportadas en hongos como *Trichoderma asperellum* [115], 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.

Las proteínas con actividad 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) [113]. Kim y cols. [85], reportaron también el efecto sinérgico de una EXLX de *B. subtilis* en la hidrólisis enzimática de la celulosa. Recientemente, Quiroz-Castañeda y cols., [116], lograron la clonación y caracterización de una nueva proteína con actividad expansina del hongo basidiomiceto *Bjerkandera adusta*, llamada loosening (LOOS1), la cual solamente posee el dominio DPBB, y es capaz de relajar la estructura del algodón y favorecer hasta 7.5 veces más la liberación de azúcares reductores de la fibra de agave (*Agave tequilana*). Por las características óptimas de pH (pH 5) de LOOS1, podría utilizarse en los procesos de sacarificación, donde se conjuntarían las actividades de celulasas y proteínas con actividad tipo expansina, para favorecer una mayor liberación de azúcares reductores a partir de sustratos naturales. Así, LOOS1 podría actuar como un aditivo para la obtención de azúcares fermentables a partir de la lignocelulosa. La idea de usar las expansinas vegetales como aditivos en procesos de sacarificación se ha patentado [117].

Potencial biotecnológico de la lignocelulosa

El principal objetivo para el uso del material lignocelulósico es tener acceso a la celulosa y hemicelulosa que se encuentran protegidas por la matriz de lignina. Los desechos lignocelulósicos se producen en grandes cantidades por la industria maderera, forestal y de jardines, así como en las actividades agrícolas [28]. Estos desechos poseen un gran valor por su potencial aplicación en la elaboración de alimentos animales y para la obtención de biocombustibles. En 2008, aproximadamente el 90% (de un total de 12 335.2 millones de galones) de la producción global de etanol se concentró en dos países, Estados Unidos y Brasil. En este último, el etanol se produjo a partir del jugo de la caña de azúcar en 344 plantas de producción, mientras que en Estados Unidos se obtuvo del almidón de maíz en 217 plantas [17].

Sin embargo, la utilización tanto del azúcar de caña como del almidón de maíz para la producción de etanol crea mucha controversia debido a que compite con la producción de alimentos y es un proceso caro, lo que ha hecho difícil que el etanol sea competitivo en costos con los combustibles fósiles.

Ello ha forzado la búsqueda de nuevas alternativas de materia prima para la elaboración de biocombustibles, por lo que los desechos lignocelulósicos son una posibilidad. Un ejemplo del uso de estos desechos lo muestra la corporación Iogen, en Canadá, que opera

Tabla 2. Organismos que contienen proteínas miembros de la superfamilia expansina y otras proteínas tipo expansinas

Miembros de la superfamilia expansina					
Organismo	EXPA	EXPB	EXLA	EXLB	Fuente
<i>Arabidopsis</i>	26	6	3	1	[63]
Arroz	33	18	4	1	[85]
Álamo ^a	27	3	2	4	[87]
Papaya ^a	15	3	1	0	[96]
<i>Physcomitrella patens</i>	27	7	0	0	[84]
<i>Globodera rostochiensis</i>	0	1	0	0	[86]
<i>Zea mays</i>	5	8	0	0	[82]
<i>Triticum aestivum</i> ^a	30	0	0	0	[97]
<i>Pinus taeda</i>	7	1	1	1	[85]

Proteínas con actividad tipo expansina			
Organismo	No.	Tipo de proteína	Fuente
<i>Trichoderma reesei</i> ^a	3	Proteína tipo expansina	[98]
<i>Trichoderma reesei</i>	1	Swollenina	[88]
<i>Bjerkandera adusta</i>	1	Loosenina	[90]
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	Swollenina	[99]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	Swollenina	[87]
<i>Trichoderma asperellum</i>	1	Swollenina	[89]
<i>Postia placenta</i> ^a	7	Proteína tipo expansina	[100]
<i>Dictyostelium discoideum</i> ^a	5	Proteína tipo expansina	[81]
<i>Bacillus subtilis</i>	1	EXLX	[78]
<i>Hahella chejuensis</i>	1	EXLX	[80]
Arroz ^a	80	Proteína tipo expansina	[57]
<i>Laccaria bicolor</i> ^a	11	Proteína tipo expansina	http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html
<i>Pleurotus ostreatus</i> ^a	1	Proteína tipo expansina	http://genome.jgi-psf.org/PleosPC15_2/PleosPC15_2.home.html
<i>Neurospora crassa</i> ^a	2	Proteína tipo expansina	http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html

^a Secuencias identificadas en el genoma del organismo. No se ha evaluado su actividad.

la planta más grande del mundo, de producción de etanol a partir de desechos de paja de trigo, avena y centeno, donde se utilizan 30 toneladas de estos materiales lignocelulósicos para producir más de 3 millones de litros de etanol diariamente [118, 119]. La degradación de la biomasa lignocelulósica involucra la disponibilidad de la celulosa y la hemicelulosa, así como la subsecuente hidrólisis de estos polisacáridos en azúcares de 5 y 6 carbonos, que se convierten en etanol por procesos de fermentación. La compañía danesa Inbicon ha construido una planta de demostración para la obtención de etanol a partir de la biomasa vegetal con una capacidad de producción de 1.4 millones de galones anualmente, en tanto la compañía japonesa Nippon Oil, posee plantas de producción de biocombustible a partir de celulosa en la que se producirán 67 millones de galones para el año 2014 [118]. En Europa, la producción de bioetanol a partir de desechos lignocelulósicos se ha incrementado con la participación de industrias finlandesas como SEKAB, que utiliza bagazo de caña y aserrín de madera como materias primas. Recientemente, en la India, la industria Praj ha construido dos plantas que procesan hasta 2 toneladas por día de rastrojo de maíz, olote y bagazo de maíz, desechos agrícolas y aserrines, para producir etanol a partir de procesos basados en pretratamientos, que remueven la lignina y la separa eficientemente de los azúcares [118].

En América Latina, la opción actual para la producción de biocombustibles es a partir de compuestos

74. Kerff F, Amoroso A, Herman R, Sauvage E, Petrella S, Filée P, et al. Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(44):16876-81.

75. Whitney SE, Gidley MJ, McQueen-Mason SJ. Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *Plant J*. 2000;22(4):327-34.

76. Cho HT, Cosgrove DJ. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2002;14(12):3237-53.

77. Rose JKC, Lee HH, Bennett AB. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(11):5955-60.

78. Rose JK, Cosgrove DJ, Albersheim P, Darvill AG, Bennett AB. Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. *Plant Physiol*. 2000;123(4):1583-92.

79. Civello PM, Powell AL, Sabehat A, Bennett AB. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol*. 1999;121(4):1273-80.

80. Li LC, Bedinger PA, Volk C, Jones AD, Cosgrove DJ. Purification and characterization of four beta-expansins (*Zea m1* isoforms) from maize pollen. *Plant Physiol*. 2003;132(4):2073-85.

81. Cosgrove DJ, Li LC, Cho HT, Hoffmann-Benning S, Moore RC, Blecker D. The growing world of expansins. *Plant Cell Physiol*. 2002;43(12):1436-44.

no celulósicos. Esta producción se ha incrementado en los últimos años, y países como Brasil, Colombia, Paraguay y Costa Rica, lo producen a partir de caña de azúcar y granos de trigo. En México, la producción de etanol como combustible está limitada a 2 plantas que producen alrededor de 2 millones de litros de biocombustible a partir de caña de azúcar. En Argentina, el etanol se produce utilizando la melaza y el sorgo. En los países centroamericanos como El Salvador, Nicaragua y Guatemala, la producción de bioetanol es escasa y la infraestructura necesaria se encuentra en sus primeras etapas; sin embargo, hay apoyos gubernamentales dirigidos al desarrollo de esta industria [120]. El principal reto de la conversión de la biomasa en etanol es alcanzar los rendimientos que permitan hacerla competitiva, en cuanto a costos, con los combustibles usados actualmente [28]. Para esto debe considerarse que los desechos lignocelulósicos poseen una matriz de lignina que protege a la celulosa y a la hemicelulosa de la degradación. Además, la celulosa posee regiones cristalinas que dificultan su hidrólisis. Es por esto que se emplean pretratamientos químicos y físicos como prerrequisito para la degradación. Las condiciones que se requieren son altas temperaturas y soluciones ácidas o básicas, lo que resulta costoso y en muchas ocasiones ineficiente. Además, durante los pretratamientos se producen compuestos inhibidores de la fermentación como furanos y compuesto fenólicos [121].

En la utilización de la biomasa con fines biotecnológicos, las expansinas (o proteínas con actividad expansina) son potencialmente útiles, pues permitirían optimizar el proceso de degradación del material celu-

lósico, por su característica de relajar la pared celular en condiciones ligeramente ácidas ($\text{pH} \leq 5.0$), de manera semejante a las condiciones en las que funcionan las celulasas. Actualmente se utilizan pH ácidos (entre 4.8 y 5) en procesos simultáneos de sacarificación y fermentación para la obtención de biocombustibles, por lo que las proteínas con actividad de expansinas podrían ser utilizados como aditivos para facilitar la sacarificación enzimática [122].

Conclusiones

El material lignocelulósico tiene ventajas sobre el uso del azúcar (de caña de azúcar o almidón) como materia prima para la producción de bioetanol. Se ha considerado como una de las principales fuentes. Una de las limitaciones fundamentales es el proceso de degradación de la lignocelulosa, pues debido a su composición, son pocos los organismos que la utilizan como fuente de carbono. Mediante el uso de enzimas celulolíticas y xilanolíticas se logra la liberación de azúcares fermentables a partir de la biomasa vegetal. Recientemente se describió el uso de proteínas con actividad expansina de hongos, bacterias y plantas para remodelar la estructura de la pared celular y hacerla más accesible a las enzimas degradadoras, con lo cual, se incrementa considerablemente la eficiencia en la liberación de estos azúcares. Es importante destacar que la utilización de nuevas proteínas que hagan más eficiente este proceso permitiría la obtención de una mayor cantidad de azúcares a partir de los desechos lignocelulósicos, una materia prima con un elevado potencial en la producción de biocombustibles.

82. Kende H, Bradford K, Brummell D, Cho HT, Cosgrove D, Fleming A, et al. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol Biol.* 2004; 55(3):311-4.
83. Dermatev V, Weingarten-Baror C, Resnick N, Gadkar V, Winingar S, Kolotilin I, et al. Microarray analysis and functional tests suggest the involvement of expansins in the early stages of symbiosis of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on tomato (*Solanum lycopersicum*). *Mol Plant Pathol.* 2010; 11(1):121-35.
84. Darley CP, Li Y, Schaap P, McQueen-Mason SJ. Expression of a family of expansin-like proteins during the development of *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 2003; 546(2-3):416-8.
85. Kim ES, Lee HJ, Bang WG, Choi IG, Kim KH. Functional characterization of a bacterial expansion from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol Bioeng.* 2009; 102(5):1342-53.
86. Laine MJ, Haapalainen M, Wahlroos T, Kankare K, Nissinen R, Kassuwi S, et al. The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* plays a role in virulence and contains an expansin-like domain. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2000; 57(5):221-33.
87. Lee HJ, Lee S, Ko HJ, Kim KH, Choi IG. An expansin-like protein from *Hahella chejuensis* binds cellulose and enhances cellulase activity. *Mol Cells.* 2010; 29(4):379-85.
88. Reinhardt D, Wittwer F, Mandel T, Kuhlmeier C. Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. *Plant Cell.* 1998; 10(9):1427-37.
89. Baluska F, Salaj J, Mathur J, Braun M, Jasper F, Samaj J, et al. Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Dev Biol.* 2000; 227(2):618-32.
90. Staff IA, Taylor PE, Smith P, Singh MB, Knox RB. Cellular localization of water soluble, allergenic proteins in rye-grass (*Lolium perenne*) pollen using monoclonal and specific IgE antibodies with immunogold probes. *Histochem J.* 1990; 22(5):276-90.
91. Chen F, Bradford KJ. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiol.* 2000; 124(3):1265-74.
92. Lee Y, Kende H. Expression of β -expansins is correlated with elongation of internodes in deepwater rice. *Plant Physiol.* 2001; 127(2):985-97.
93. Wu Y, Meeley RB, Cosgrove DJ. Analysis and expression of the α -expansin and β -expansin gene families in maize. *Plant Physiol.* 2001; 126(1):222-32.
94. Pien S, Wyrzykowska J, McQueen-Mason S, Smart C, Fleming A. Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Sep 25; 98(20):11812-7.
95. Fleming AJ, McQueen-Mason S, Mandel T, Kuhlmeier C. Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin. *Science.* 1997; 276(5317):1415-8.
96. Cho HT, Cosgrove DJ. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(17):9783-8.
97. Brummell DA, Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB, Dunsmuir P. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell.* 1999; 11(11):2203-16.
98. Gray-Mitsumune M, Mellerowicz EJ, Abe H, Schrader J, Winzell A, Sterky F, et al. Expansins abundant in secondary xylem belong to subgroup A of the alpha-expansin gene family. *Plant Physiol.* 2004; 135(3):1552-64.
99. Belfield EJ, Ruperti B, Roberts JA, McQueen-Mason S. Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. *J Exp Bot.* 2005; 56(413):817-23.
100. Pezzotti M, Feron R, Mariani C. Pollination modulates expression of the PPAL gene, a pistil-specific beta-expansin. *Plant Mol Biol.* 2002; 49(2):187-97.
101. Giordano W, Hirsch AM. The expression of MaEXP1, a *Melilotus alba* expansin gene, is upregulated during the sweetclover-*Sinorhizobium meliloti* interaction. *Mol Plant Microbe Interact.* 2004; 17(6):613-22.
102. O'Malley RC, Lynn DG. Expansin message regulation in parasitic angiosperms: marking time in development. *Plant Cell.* 2000; 12(8):1455-65.
103. Jones L, McQueen-Mason S. A role for expansins in dehydration and rehydration of

- the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. FEBS Lett. 2004;559(1-3):61-5.
104. Colmer TD, Peeters AJ, Wagemaker CA, Vriezen WH, Ammerlaan A, Voeseek LA. Expression of alpha-expansin genes during root acclimations to O₂ deficiency in *Rumex palustris*. Plant Mol Biol. 2004;56(3):423-37.
105. Huang J, Takano T, Akita S. Expression of alpha-expansin genes in young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.). Planta. 2000;211(4):467-73.
106. Ruan YL, Llewellyn DJ, Furbank RT. The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K⁺ transporters and expansin. Plant Cell. 2001;13(1):47-60.
107. Xu J, Tian J, Belanger FC, Huang B. Identification and characterization of an expansin gene AsEXP1 associated with heat tolerance in C3 *Agrostis* grass species. J Exp Bot. 2007;58(13):3789-96.
108. Li Y, Darley CP, Ongaro V, Fleming A, Schipper O, Baldauf SL, et al. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. Plant Physiol. 2002;128(3):854-64.
109. Lin Z, Ni Z, Zhang Y, Yao Y, Wu H, Sun Q. Isolation and characterization of 18 genes encoding alpha- and beta-expansins in wheat (*Triticum aestivum* L.). Mol Genet Genomics. 2005;274(5):548-56.
110. Carey RE, Cosgrove DJ. Portrait of the expansin superfamily in *Physcomitrella patens*: comparisons with angiosperm expansins. Ann Bot. 2007;99(6):1131-41.
111. Sampedro J, Carey R, Cosgrove D. Genome histories clarify evolution of the expansin superfamily: new insights from the poplar genome and pine ESTs. J Plant Res. 2006;119(1):11-21.
112. Kudla U, Qin L, Milac A, Kielak A, Maisen C, Overmars H, et al. Origin, distribution and 3D-modeling of Gr-EXPB1, an expansin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. FEBS Lett. 2005;579(11):2451-7.
113. Chen XA, Ishida N, Todaka N, Nakamura R, Maruyama J, Takahashi H, et al. Promotion of efficient Saccharification of crystalline cellulose by *Aspergillus fumigatus* Sw01. Appl Environ Microbiol. 2010;76(8):2556-61.
114. Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, Pere J, Swanson B, Nyyssönen E, et al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. Eur J Biochem. 2002;269(17):4202-11.
115. Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. Plant Physiol. 2008;147(2):779-89.
116. Quiroz-Castañeda RE, Martínez-Anaya C, Cuervo-Soto LI, Segovia L, Folch-Mallol JL. Loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. Microb Cell Fact. 2011;10:8.
117. Cosgrove DJ, inventor; The Penn State Research Foundation, assignee. Enhancement of accessibility of cellulose by expansions. United States Patent US 6326470. 2001 Dec 4.
118. Banerjee S, Mudliar S, Sen R, Giri B, Satpute D, Chakrabarti T, et al. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. Biofuel Bioprod Biol. 2010;4(1):77-93.
119. Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G. Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends Biotechnol. 2006;24(12):549-56.
120. Ballesteros M, Manzanares P. Overview of existing biomass conversion technologies in Latin America [internet]. Madrid: Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas; 2009 [cited 2011 May 17]. Available in: http://www.top-biofuel.org/images/stories/pr-reports-website/ANNEX-1-5_WP2_D2-2_Existing-conv-tech.pdf
121. Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. Nature. 2008;454(7206):841-5.
122. Baker JO, King MR, Adney WS, Decker SR, Vinzant TB, Lantz SE, et al. Investigation of the cell-wall loosening protein expansin as a possible additive in the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Appl Biochem Biotechnol. 2000;84-86:217-23.

Recibido en junio de 2011. Aprobado en septiembre de 2011.