

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

**Expresión de la β -glucosidasa mutante de *Cellulomonas flavigena*
PN-120 en *Saccharomyces cerevisiae* para la utilización de
sacarificados de bagazo de caña**

Tesis que Presenta:

David José Mendoza Aguayo

Para obtener el grado

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de Tesis: Dra. María Teresa Ponce Noyola

México, D.F.

Octubre del 2014

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Proyecto: 104333). David José Mendoza Aguayo recibió la beca 204305 de CONACYT, México.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Bioetanol como alternativa a los combustibles fósiles.....	1
1.2 Celulosa como sustrato para la producción de bioetanol.....	4
1.2.1 Biodegradación de la celulosa.....	6
1.3 β -glucosidasas.....	9
1.4 Expresión heteróloga de celulasas.....	13
1.4.1 Expresión heteróloga en procariontes.....	14
1.4.2 Expresión heteróloga en eucariontes.....	15
II JUSTIFICACIÓN.....	20
III HIPÓTESIS.....	21
IV OBJETIVOS.....	22
V MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1 Microorganismos empleados.....	23
5.2 Procedimientos de biología molecular.....	24
5.2.1 Extracción de DNA genómico.....	24

5.2.2 Amplificación por PCR del gen <i>bglA</i>	24
5.2.3 Extracción del plásmido.....	25
5.2.4 Ligación.....	26
5.2.5 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	26
5.2.6 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	27
5.2.7 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	27
5.2.8 Confirmación del sentido de ligación.....	28
5.2.9 Electroforesis en gel de agarosa.....	28
5.3 Obtención de células diploides de <i>S. cerevisiae</i>	29
5.4 Producción de la β -glucosidasa por <i>S. cerevisiae</i> PM-15.....	29
5.5 Purificación de la β -glucosidasa.....	30
5.5.1. Cromatografía de intercambio iónico.....	30
5.5.2 Cromatografía de exclusión molecular.....	31
5.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	31
5.7 Caracterización enzimática de la unidad catalítica de la β -glucosidasa producida por <i>S. cerevisiae</i> PM-15.....	32
5.7.1 Especificidad.....	32
5.7.2 Inhibición.....	32
5.8 Estructura 3D de la fracción catalítica de la β -glucosidasa de <i>C.</i> <i>flavigena</i> PN-120.....	34
5.9 Obtención de hidrolizados de bagazo de caña.....	34
5.10 Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> PM-15.....	37
5.10.1 Hidrolizados de bagazo de caña.....	37

5.10.2 Medio sintético.....	37
5.10.3 Determinación de variables de respuesta.....	38
5.11 Análisis estadístico.....	39
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
6.1 Construcción de la cepa recombinante.....	40
6.1.1 Construcción del vector pS1-bglA.....	40
6.1.2 Obtención de células diploides de <i>S. cerevisiae</i> ...	45
6.1.3 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> cepa 2-24D.....	46
6.2 Caracterización de la β -glucosidasa extracelular producida por <i>S. cerevisiae</i> PM-15.....	51
6.2.1 Hidrólisis de celo-oligosacáridos por BGLA ¹⁵	53
6.2.2 Inhibición de BGLA ¹⁵	55
6.2.3 Estructura 3D de BGLA ¹⁵	62
6.3 Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> PM-15.....	66
6.3.1 Hidrolizados de bagazo de caña.....	66
6.3.2 Medio sintético.....	72
VII CONCLUSIÓN.....	77
VIII RECOMENDACIONES.....	78
IX BIBLIOGRAFÍA.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación esquemática de la estructura macromolecular de la celulosa.	5
Figura 2. Formas oligoméricas de las β -glucosidasas de origen microbiano.	8
Figura 3. Topología de los sitios activos de las glicosilhidrolasas.	11
Figura 4. Mecanismos enzimáticos de hidrólisis y síntesis de los enlaces β -glucosídicos.	12
Figura 5. Amplificación del gen <i>bglA</i> mediante la técnica “Hot-Start”.	40
Figura 6. Gen <i>bglA</i> y plásmido pYEX-S1 purificados, y desfosforilados.	41
Figura 7. Producto de la ligación del gen <i>bglA</i> y el plásmido pYEX-S1.	42
Figura 8. Digestión del plásmido de la colonia 17.	43
Figura 9. Esporulación de la cepa diploide <i>S. cerevisiae</i> 2-24D.	46
Figura 10. Transformantes de <i>S. cerevisiae</i> cepa 2-24D.	47
Figura 11. Electroforesis y zimogramas de la β -glucosidasa expresada extracelularmente por <i>S. cerevisiae</i> PM-15.	53
Figura 12. Hidrólisis de celo-oligosacáridos con BGLA ¹⁵	54
Figura 13. Efecto de la glucosa sobre la actividad β -glucosidasa.	56
Figura 14. Inhibición de BGLA ¹⁵ por glucosa.	58

Figura 15. Constante de inhibición de BGLA ¹⁵ por glucosa.	60
Figura 16. Efecto del etanol sobre la actividad β -glucosidasa.	61
Figura 17. Estructura de las β -glucosidasas KMBGLI, BGL3B y BGLA ¹⁵ .	65
Figura 18. Crecimiento aerobio de <i>S. cerevisiae</i> PM-15 en hidrolizados de bagazo de caña.	67
Figura 19. Formación de esporas por <i>S. cerevisiae</i> PM-15 en la fermentación aerobia de hidrolizados de bagazo de caña.	68
Figura 20. Crecimiento anaerobio de <i>S. cerevisiae</i> PM-15 en hidrolizados de bagazo de caña.	70
Figura 21. Efecto de los compuestos fenólicos sobre la actividad de BGLA ¹⁵ .	71
Figura 22. Crecimiento aerobio de <i>S. cerevisiae</i> PM-15 en medio sintético.	73
Figura 23. Crecimiento anaerobio de <i>S. cerevisiae</i> PM-15 en medio sintético.	74

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición de las distintas fuentes de lignocelulosa.	4
Tabla 2. Formas oligoméricas de las β -glucosidasas de origen microbiano.	10
Tabla 3. Celulasas recombinantes producidas en <i>S. cerevisiae</i> .	18
Tabla 4. Composición de los medios de cultivo empleados por <i>S. cerevisiae</i> PM-15 para la producción de etanol.	36
Tabla 5. Fragmentos obtenidos del proceso de secuenciación del plásmido de la colonia 17.	44
Tabla 6. Efecto del medio de cultivo en la distribución de la actividad β -glucosidasa de las recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> .	49
Tabla 7. β -glucosidasas expresadas en <i>S. cerevisiae</i> .	50
Tabla 8. Comparación de la constante de afinidad de la β -glucosidasa.	59
Tabla 9. Crecimiento en cultivo por lote de recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> en celobiosa.	76

RESUMEN

La unidad catalítica de la β -glucosidasa (BGLA) de *Cellulomonas flavigena* PN-120 se expresó en una cepa diploide de *Saccharomyces cerevisiae*. La enzima recombinante (BGLA¹⁵) se produjo intracelularmente y extracelularmente bajo condiciones limitadas de nutrientes. Cuando BGLA¹⁵ fue producida en un medio de cultivo rico, mostró una actividad de 5.82 IU/L y 0.99 IU/g de células, empleando p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido como sustrato. BGLA¹⁵ fue capaz de hidrolizar celooligosacáridos de 2 y hasta 5 monómeros de glucosa, mostrando que la forma oligomérica de la proteína no es esencial en la hidrólisis de los enlaces β -D-1,4. En las pruebas de inhibición *in vitro* BGLA¹⁵ conservó más del 50 % de su actividad a 200 mM de glucosa, mientras que la enzima oligomérica BGLA se vio completamente inhibida a 160 mM, además BGLA¹⁵ conservó más del 30 % de su actividad a la concentración más alta ensayada (500 mM). Con base en estas características, la recombinante de *S. cerevisiae* PM-15 fue capaz de crecer en celobiosa como única fuente de carbono.

ABSTRACT

The catalytic fraction of *Cellulomonas flavigena* PN-120 oligomeric β -glucosidase (BGLA) was expressed both intra- and extracellularly in a recombinant diploid of *Saccharomyces cerevisiae*, under limited nutrient conditions. The recombinant enzyme (BGLA¹⁵) expressed in the supernatant of a rich medium showed 5.82 IU/L and 0.99 IU/g dry cell, with p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside as substrate. BGLA¹⁵ displayed activity against cello-oligosaccharides with 2–5 glucose monomers, demonstrating that the protein is not specific for cellobiose and that the oligomeric structure is not essential for β -D-1,4-bond hydrolysis. Native β -glucosidase is inhibited almost completely at 160 mM glucose, thus limiting cellobiose hydrolysis. At 200 mM glucose concentration, BGLA¹⁵ retained more than 50 % of its maximal activity and even at 500 mM glucose concentration, more than 30 % of its activity was preserved. Due to these characteristics the recombinant *S. cerevisiae* PM-15 was able to growth on cellobiose as a sole carbon source.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Bioetanol como alternativa a los combustibles fósiles

En la actualidad los combustibles fósiles son utilizados como la principal fuente de energía, sin embargo y debido a la explotación indiscriminada de éstos se han derivado dos problemas fundamentales: el deterioro al medio ambiente y la escasez de energéticos a escala mundial (Bhatia *et al.*, 2012). El uso de combustibles de base biológica debe permitir reducir de manera importante la acumulación de gases de efecto invernadero y la dependencia a combustibles fósiles (von Blottnitz & Curran 2006). El bioetanol representa una importante ventaja como combustible renovable para los vehículos automotores. El uso del etanol como combustible se remonta a principios de 1800, siendo ampliamente utilizado por el sector del transporte hasta el descubrimiento de nuevos pozos petroleros (1980 y 1990), que proporcionaron gasolina como una alternativa barata y abundante. Recientemente, problemas ambientales y de salud, asociadas con el uso de gasolinas, han renovado el interés por el etanol como combustible (Ahmed, 2001). La combustión completa del etanol produce sólo dióxido de carbono (CO₂) y agua, por lo que es considerada una "combustión limpia" en comparación con la gasolina.

Los combustibles con base en etanol pueden ser usados ya sea como 100 % sustituto de la gasolina o en mezclas. El etanol anhidro, es el producto que se necesita para ser mezclado con la gasolina, sin embargo, se requiere una pureza del 99.5 % al 99.9 %. La mezcla de etanol/gasolina es conocida como gasohol. El gasohol está compuesto de un 5 a 25 % de etanol anhidro y puede ser introducido en los vehículos sin ninguna modificación en el motor. El combustible "E10" (que contiene 10 % de etanol y 90 % de gasolina) es la variante de gasohol más utilizada en todo el mundo (Von Blottnitz & Curran, 2006). Con las mezclas de gasolina/etanol se logra el mismo octanaje, sin embargo el contenido de energía del etanol representa sólo 97 % de lo que produce la gasolina, por lo tanto el 3 % de déficit, debe ser incluido en los cálculos de comparación de costos entre el etanol y la gasolina (Kim & Dale, 2003).

La materia prima utilizada actualmente para la producción de bioetanol se agrupa en 3 categorías: i) azúcares, ii) almidones y iii) la biomasa celulósica. Los azúcares a partir de frutas, remolacha, caña de azúcar y melazas pueden fermentarse directamente a etanol. Los almidones de maíz, mandioca, papa, etc, tienen que ser hidrolizados mediante enzimas como la α -amilasa y la glucoamilasa para producir azúcares fermentables y posteriormente etanol. La celulosa de la madera y residuos agrícolas, también debe ser hidrolizada a azúcares fermentables (química o enzimáticamente), antes de proceder a la producción de etanol (Lin & Tanaka, 2006).

Desde el punto de vista económico, hay varias razones por las que la biomasa celulósica se considera una materia prima atractiva en la producción de bioetanol:

- Bajos costos. La biomasa celulósica tiene un precio mucho menor y menos volátil que el de las materias primas a base de almidón.
- Plantas de producción cerca de la materia prima. Las plantas de producción pueden ser construidas cerca de los plantíos para reducir los costos de transporte.
- Las plantas de etanol celulósico pueden hacer una contribución significativa en la reducción de residuos, incluidos los desperdicios agrícolas y municipales.
- Beneficios ambientales. La combustión de etanol celulósico contribuirá a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (CO₂).
- La seguridad energética. La sustitución de la gasolina con etanol mejorará la seguridad energética mediante la reducción de las importaciones de petróleo.
- Seguridad alimentaria. El empleo de la celulosa como materia prima, sustituiría el uso de cultivos destinados a la alimentación.

A pesar de los puntos anteriores, el problema principal del uso de la celulosa en la producción de bioetanol se centra en la hidrólisis enzimática de la materia prima para obtener los azúcares a partir de los cuales se obtendrá el etanol (Lin & Tanaka, 2006).

1.2 Celulosa como sustrato para la producción de bioetanol.

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante sobre la tierra, es el componente principal de la pared celular de las plantas, en donde está asociada con lignina y hemicelulosas. Los porcentajes de estos tres compuestos dependen de la fuente (Tabla 1) (Sun & Cheng, 2002)

Tabla 1. Composición de las distintas fuentes de lignocelulosa

Fuente	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Bagazo de caña	54.9-58.25	29.5-30.9	25.3-26
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Olote de Maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-36
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-26	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	24-40	18-30
Desechos de industria del papel	60-75	10-20	5-10

Modificado de Sung & Chen, 2002

A nivel molecular la celulosa se compone de unidades lineales de D-glucosa unidas mediante enlaces 1,4 del tipo beta. El grado de polimerización (GP) de la celulosa en plantas se encuentra en un intervalo de 8,000 a 12,000 moléculas de glucosa (Fan *et al.*, 1980). Las microfibrillas se asocian mediante enlaces de Van der Waals y puentes de hidrógeno (Fig 1) para formar una estructura rígida,

conocida como regiones cristalinas, también existen regiones en donde las fibras no forman esta estructura rígida, denominadas regiones amorfas. La estructura cristalina de la celulosa es una característica importante y relativamente única en los polisacáridos. El grado de cristalinidad se encuentra en un intervalo de 40 a 60 %, dependiendo del origen de la muestra de celulosa (Schenzell *et al.*, 2005).

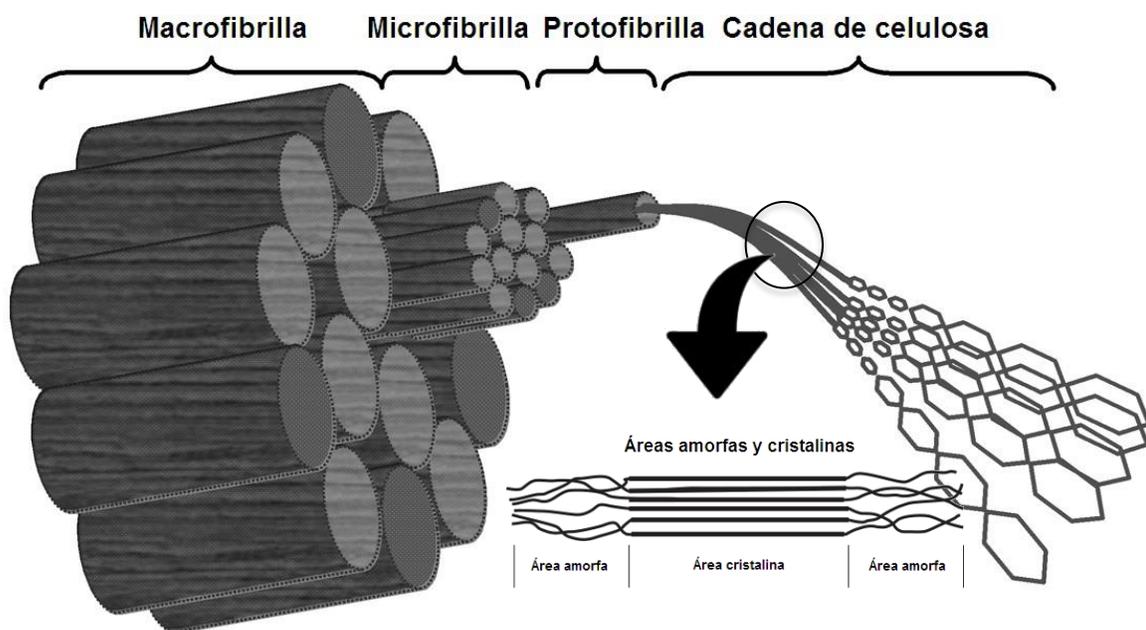


Figura 1. Representación esquemática de la estructura macromolecular de la celulosa (Modificado de Clarke, 1997).

1.2.1 Biodegradación de la celulosa

Microorganismos

La degradación de la celulosa por los microorganismos puede llevarse a cabo bajo condiciones aerobias o anaerobias. Los hongos, en especial los que pertenecen a los grupos *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Lynd *et al.*, 2002) y algunas bacterias de los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Bacillus*, *Cellulomonas* y *Cytophaga* (De Boer *et al.*, 2005) degradan la celulosa en condiciones aerobias. Estos microorganismos producen enzimas celulolíticas de manera extracelular, tales como endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas, aunque estas últimas permanecen intracelularmente en bacterias. Este complejo enzimático actúa de manera sinérgica (Mansfield & Meder, 2003).

Por otro lado la degradación de la celulosa en condiciones anaeróbicas es llevada a cabo por hongos pertenecientes al género *Chytridiomycota*, los cuales colonizan el tracto intestinal de los rumiantes y por bacterias de los géneros *Acetivibrio*, *Clostridium* y *Ruminococcus*. En estas bacterias las enzimas se agrupan en un estructura que es un complejo multienzimático llamado celulosoma, esta estructura permite la acción sinérgica de diferentes enzimas celulolíticas, favoreciendo la interacción célula-sustrato (Lynd *et al.*, 2002; Doi & Kosugi, 2004).

Sistema celulolítico

La hidrólisis completa de la celulosa involucra a un grupo de enzimas con diferente actividad y afinidad a sustrato; i) endoglucanasas o 1,4- β -D-glucosa-4-glucurohidrolasa (EC 3.2.1.4), ii) exoglucanasas, incluyendo 1,4- β -D-glucurohidrolasas, mejor conocidas como celodextrinasas (EC 3.2.1.7.4) y 1,4- β -D-glucanos o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y iii) β -glucosidasas o β -D-glucosilhidrolasas (EC 3.2.1.21) (Béguin, 1990; Leschine, 1995; Béguin & Lemaire, 1996).

Las celobiohidrolasas liberan unidades de celobiosa de una forma progresiva, desde un extremo reductor o no reductor de la cadena de celulosa. Las endoglucanasas actúan sobre la parte amorfa de la estructura de la celulosa, generando oligosacáridos de distintos tamaños, que son sustrato de las celobiohidrolasas (Teeri, 1997). Finalmente las β -glucosidasas hidrolizan celo-oligosacáridos y celobiosa, liberando glucosa (Fig 2) (Béguin, 1990).

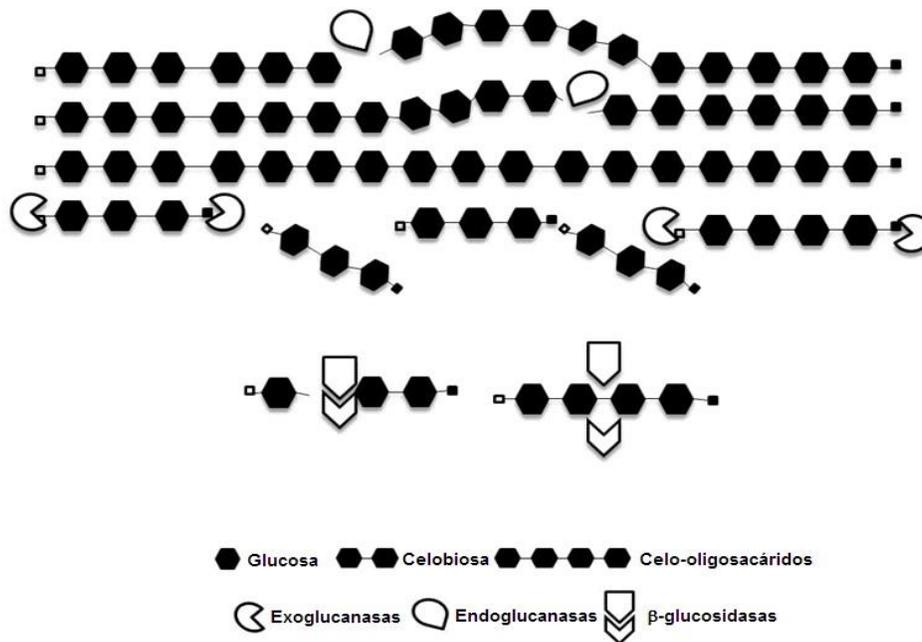


Figura 2. Degradación de la celulosa por la acción de diferentes enzimas celulolíticas (Modificado de Lynd *et al.*, 2002).

Las celulasas se caracterizan por su habilidad para hidrolizar los enlaces β -1,4, mediante un mecanismo de hidrólisis ácida, empleando un donador de protones y un nucleófilo o base. (Béguin, 1990; Leschine, 1995; Béguin & Lemaire, 1996). En los microorganismos celulolíticos los sistemas enzimáticos que hidrolizan a la celulosa pueden estar asociados o no asociados a membrana. En los microorganismos anaerobios el complejo celulasas está generalmente asociado a la membrana y algunas bacterias del género *Clostridium* existe el celulosoma. Los sistemas no asociados a membrana son representativos de bacterias y hongos aerobios, las enzimas celulolíticas son extracelulares y se encuentran solubles en el medio de cultivo (Hazlewood & Gilbert, 1993). Existen excepciones, ya que por

ejemplo bacterias anaerobias facultativas del género *Bacillus* producen celulasas extracelulares (Lo *et al.*, 1988) también se han reportado sistemas enzimáticos asociados a membranas en bacterias aerobias del género *Streptomyces* (Schlochtermeyer *et al.*, 1992).

1.3 β -glucosidasas

Las β -glucosidasas son producidas por plantas, animales y microorganismos. Estas enzimas juegan un papel muy importante en los procesos biológicos, además de tener un gran número de aplicaciones biotecnológicas. La función principal de las β -glucosidasas es hidrolizar celo-oligosacáridos y celobiosa en el proceso de degradación de la celulosa, generalmente la actividad tiende a disminuir conforme aumenta el GP del sustrato (Kubicek *et al.*, 1993; Parry *et al.*, 2001). Algunas β -glucosidasas producidas por hongos como *T. reesei*, funcionan también como transglicosiladoras, bajo ciertas condiciones. La transglicosilación es particularmente importante en la producción de moléculas de soforosa y gentiobiosa, que cabe señalar, inducen la expresión de ciertas celulasas (Gritzali & Brown, 1979; Fowler & Brown, 1992).

Las β -glucosidasas microbianas se localizan intracelular, intra-membranal o extracelularmente y la mayoría de los microorganismos celulolíticos producen más de una de estas enzimas como en el caso de *Trichoderma reesei* (Himmel *et al.*, 1986) y *Candida wickerhamii* (Freer, 1985; Skory *et al.*, 1996). Las β -glucosidasas se clasifican según los dominios que componen a la proteína y se dividen en las

familias: 1, 3 y 9 (Henrissat *et al.*, 1995). Esta clasificación está basada en su mecanismo catalítico, en vez de su especificidad por el sustrato, eliminando el error de clasificación en el caso de enzimas multifuncionales (Henrissat, 1991; Henrissat & Bairoch, 1993) y se encuentran en forma de mono, di, tri y tetrameros (Tabla 2).

Tabla 2. Formas oligoméricas de las β -glucosidasas de origen microbiano.

Enzima (origen)	Clasificación	Localización	Referencia
Manomérica			
BglA (<i>Bacillus polymyxa</i>)	Familia 1	Intracelular	Painbeni <i>et al.</i> , 1992
BglX (<i>Erwinia chrisanthemi</i>)	Familia 3	Periplasma	Vroemen <i>et al.</i> , 1995
BglA (<i>Clostridium thermocellum</i>)	Familia 1	Intracelular	Graebnitz <i>et al.</i> , 1991
Bgl (<i>Acremonium persicinum</i>)	Familia 3	Extracelular	Pitson <i>et al.</i> , 1997
Dimérica			
BglA (<i>Thermotoga maritima</i>)	Familia 1	Intracelular	Gabelsberger <i>et al.</i> , 1993
BGLI (<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>)	Familia 3	Extracelular	Machida <i>et al.</i> , 1988
BglB (<i>Clostridium thermocellum</i>)	Familia 3	Intracelular	Romaniec <i>et al.</i> , 1993
GI (<i>Penicillium decumbens</i>)	NR	Intracelular	Mamma <i>et al.</i> , 2004
Trimérica			
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Familia 3	Extracelular	Parry <i>et al.</i> , 2001
BglA (<i>Cellulomonas flavigena</i> PN-120)*	Familia 3	Intracelular	Barrera <i>et al.</i> , 2007
Tetramérica			
<i>Pyrococcus horikoshi</i>	Familia 1	Membrana	Matsui <i>et al.</i> , 2000
BGLII (<i>Pichia etchellsii</i>)	Familia 3	Pared celular	Wallecha & Mishra, 2003
Bgl I (<i>Kluyveromyces fragilis</i>)	Familia 3	Intracelular	Leclerc <i>et al.</i> , 1987
GII (<i>Penicillium decumbens</i>)	NR	Intracelular	Mamma <i>et al.</i> , 2004

*, Reportado con por lo menos tres unidades; NR, No reportado.

La estructura 3-D de las enzimas que componen a las familias de las glicosilhidrolasas se ha determinado con base en el mecanismo de hidrólisis de los enlaces glucosídicos. La topología del sitio activo ha permitido clasificarlas en tres categorías; i) de bolsillo, ii) de ranura y iii) de túnel (Fig 3) (Davies & Henrissat, 1995). La topología de bolsillo es la óptima para el reconocimiento del extremo no reductor de los azúcares, característico de enzimas como; β -glucosidasas, β -galactosidasas y glucoamilasa (Jenkins *et al.*, 1995). Estas enzimas están diseñadas para dar cabida en su sitio activo a sustratos con fácil acceso al extremo no reductor y por lo tanto, no incluyen sustratos fibrosos, tales como la celulosa que casi no cuenta con extremos no reductores libres.

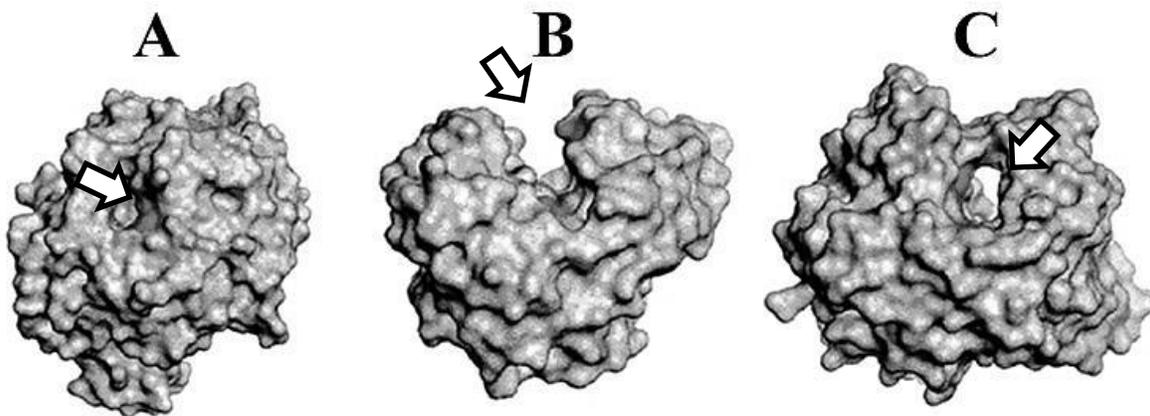


Figura 3. Topología de los sitios activos de las glicosilhidrolasas. A) Topología de bolsillo, representativo de glicosilhidrolasas como β -glucosidasas, β -galactosidasas y glucoamilasas. Topología de ranura (B) y de túnel (C), característico de las xilanasas y celobiohidrolasas, respectivamente. Flechas indican la ubicación del sitio activo (Modificado de Davies & Henrissat, 1995).

Las glicosilhidrolasas, incluyendo a las β -glucosidasas, hidrolizan enlaces glucosídicos a través del mecanismo de la catálisis ácida. En este mecanismo se involucran dos residuos, un donante de protones y un nucleófilo ácido/base (Sinnott, 1990). Los dos residuos de aminoácidos frecuentemente implicados son ácido glutámico y aspártico. La hidrólisis implica la ruptura de los enlaces por la adición de agua y en este caso se lleva a cabo mediante el mecanismo de retención o de inversión. (Fig 4).

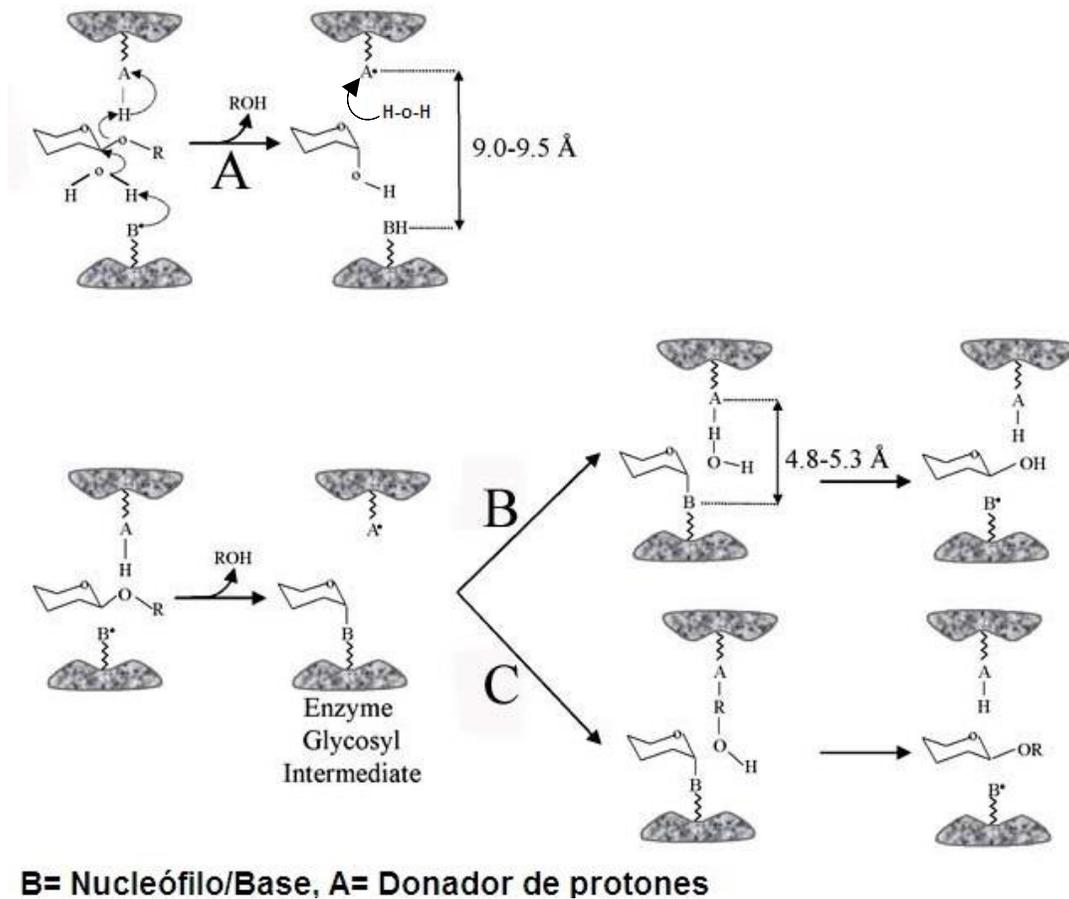


Figura 4. Mecanismos enzimáticos de hidrólisis y síntesis de los enlaces β -glucosídicos. Mecanismo de: A) inversión; B) retención y C) transglicosilación (Modificado de Mc Carter & Withers, 1994).

1.4 Expresión heteróloga de celulasas

La completa conversión biológica de la biomasa celulósica a combustibles implica cinco etapas sucesivas: i) la producción de celulasas, ii) pretratamiento de la biomasa vegetal, iii) hidrólisis de celulosa y polisacáridos insolubles, iv) fermentación de los productos de hidrólisis de la celulosa y v) la fermentación de productos de hidrólisis de la hemicelulosa (Lynd *et al.*, 2002). La relación costo-beneficio de esta tecnología está estrechamente relacionada con el grado en que alguno de los pasos anteriores pueda combinarse. Durante la sacarificación y fermentación simultánea (SFS), el proceso de conversión se lleva a cabo en un sólo paso, sin embargo, es necesario añadir una segunda etapa para fermentar los productos de hidrólisis de la hemicelulosa (Deshpande *et al.*, 1983). Por otro lado, existe la opción de hidrolizar y fermentar en forma conjunta la celulosa y hemicelulosa en un proceso denominado bioproceso consolidado (BPC) (Lynd *et al.*, 2002). El objetivo de un BPC es la construcción de un microorganismo recombinante capaz de realizar la conversión de celulosa y hemicelulosa a etanol de manera simultánea.

Debido a la importancia que han adquirido las celulasas en la producción de biocombustibles de segunda generación, se ha buscado mejorar los rendimientos de estas proteínas mediante mutagénesis y biología molecular. Ponce-Noyola & de la Torre, (2001) obtuvieron mediante mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), la mutante de *C. flavigena* PN-120, en la que la

producción de celulasas está desreprimida y cuyas enzimas son más resistentes a la inhibición por celobiosa que la cepa silvestre. Esta mutante hiperproduce una β -glucosidasa de la familia 3 con tres veces mayor afinidad a celobiosa que su forma nativa (Barrera *et al.*, 2007).

Por otro lado, un gran número de β -glucosidasas recombinantes han sido expresadas de manera heteróloga en procariontes y eucariontes. La estrategia general consiste en clonar el gen que codifica para la β -glucosidasa en vectores e integrarlos en células huésped para su expresión. Por ejemplo los genes *bgIA*, *B* y *C* de *Cellulomonas biazotea* fueron expresados en forma heteróloga en el espacio periplasmático y extracelularmente en *E. coli* y *S. cerevisiae*, respectivamente, las enzimas conservaron sus propiedades como pH y temperatura óptimos, masa molecular y especificidad por su sustrato (Rajoka *et al.*, 1998). Por otro lado, la producción heteróloga de β -glucosidasas se torna más complicada cuando el gen a clonar es susceptible a glicosilaciones y existen intrones en la estructura del gen.

1.4.1 Expresión heteróloga en procariontes

Bacterias como *E. coli* (Okamoto *et al.*, 1994; Zhou & Ingram, 1999), *Klebsiella oxytoca* (Wood & Ingram, 1992; Zhou & Ingram, 1999; 2001) y *Zymomonas mobilis* (Wood & Ingram, 1992; Okamoto *et al.*, 1994), han sido empleadas como hospederos, entre otros, de las endoglucanasas CelY y CelZ de *Erwinia chrysanthemi* y de la CMCasa de *Acetobacter xylinum*. De igual forma, CelZ, se ha expresado en *Z. mobilis* (Brestic-Goachet *et al.*, 1989). Por su parte, la expresión heteróloga de la CMCasa de *A. xylinum* en *Z. mobilis* también dio lugar a una

enzima funcional, alojada en el espacio periplásmico (Okamoto *et al.*, 1994). Zhou & Ingram, (2000) encontraron que las endoglucanasas (CelY y CelZ) de *E. chrysanthemi* actúan de manera sinérgica durante la hidrólisis de la carboximetilcelulosa (CMC) y celulosa pre-tratada con ácido. Por su parte la enzima CelY cataliza la hidrólisis inicial de la CMC liberando pequeños fragmentos de celo-oligosacáridos, mientras que CelZ convierte estos celo-oligosacáridos en celotriosa y celobiosa.

La co-expresión de los genes *celY* y *celZ* en una cepa de *K. oxytoca*, que tiene la capacidad de transportar y metabolizar la celobiosa, aumentó la producción de etanol en un 22 %. Esta cepa fue re-diseñada para mejorar la producción de etanol mediante la integración de la piruvato descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa (*adhB*) de *Z. mobilis* en el cromosoma (Zhou *et al.*, 2001). La cepa resultante, *K. oxytoca* SZ21, fue capaz de producir 20,000 U/L de endoglucanasa y fermentar la celobiosa a etanol, alcanzando entre 58 y 76 % del rendimiento teórico (Zhou & Ingram, 2001).

1.4.2 Expresión heteróloga en eucariontes

S. cerevisiae ha sido el foco de atención de varios grupos de investigación (Tabla 3). Se han construido cepas recombinantes de *S. cerevisiae* capaces de co-expresar en su superficie celular, la endoglucanasa II (EGII) de *T. reesei* y la β -glucosidasa 1 (BGL1) de *A. aculeatus* (Fujita *et al.*, 2002). Estas enzimas fueron ancladas a la célula huésped mediante la fusión de la secuencia nucleotídica de la α -aglutinina en cada una de las celulasas. Esta expresión permitió a la cepa

recombinante crecer y producir etanol en β -glucano como única fuente de carbono. Así mismo, al co-expresar la endoglucanasa I (EGI) y celobiohidrolasa II (CBHII) de *T. reesei*, así como la β -glucosidasa I (BGL1) de *A. aculeatus*, *S. cerevisiae* fue capaz de producir etanol empleando celobiosa como sustrato.

La expresión heteróloga de celulasas no asociadas a membrana, se ha llevado a cabo por más de 30 años. Penttilä *et al.*, (1988) observaron que a pesar del éxito obtenido en la expresión heteróloga de la celobiohidrolasa II (CBHII) de *T. reesei* en *S. cerevisiae*, la proteína tenía una actividad enzimática muy baja que apenas era detectable. Skory *et al.*, (1996), expresaron la β -glucosidasa (bgIB) de *Candida wickerhamii*, en *S. cerevisiae* donde la enzima se localizó de manera intramembranal, mientras que en *Pichia pastoris* fue extracelular. En ambos casos la actividad enzimática fue muy baja, probablemente debido a la glicosilación inadecuada de la proteína heteróloga.

Den Hann *et al.*, (2007) lograron expresar la celobiohidrolasa I (CBHI) de *T. reesei* en *S. cerevisiae*, sin ver mermada la actividad específica de la enzima recombinante en comparación con su forma nativa. También Rajoka *et al.*, (2003) construyeron una recombinante de *S. cerevisiae* capaz de expresar la β -glucosidasa (BglA) de *Cellulomonas biazotea* manteniendo una actividad similar a la de la cepa materna. Aún cuando la mayoría de las enzimas recombinantes expresadas en levaduras están hiperglicosiladas, no necesariamente se afecta de manera negativa su actividad enzimática. Es la secuencia de aminoácidos la que determina el efecto que tendrá la glicosilación en la actividad. Las levaduras llevan a cabo glicosilaciones tipo N-glicano que consisten en hasta más de 100 residuos

de manosa que interactúan sólo con residuos de asparagina (Wildt & Gerngross, 2005), por lo tanto, el efecto de la hiperglicosilación está sujeto a la cantidad de residuos de asparagina con los que cuenta la proteína que se desee expresar en una levadura. Por su parte las bacterias llevan a cabo glicosilaciones tipo O-glicano con interacciones en tirosina, treonina o serina, dejando no más de 50 residuos (hetero u homosacáridos), (Schäffer *et al*, 2001).

Por otro lado, también se ha registrado diferencia entre la actividad volumétrica de β -glucosidasas expresadas en la cepa nativa y en otro hospedero de diferente género (Skory *et al.*, 1996). En el caso de las levaduras, este fenómeno está relacionado con la eficiencia de la célula para exportar la proteína recombinante, por lo que es necesario fusionar con el gen una secuencia de exportación. No todas las secuencias de exportación obedecen los criterios de secreción de las levaduras, especial en el caso de *S. cerevisiae*. Sin embargo, secuencias como *xyn2* de *T. reesei* (Den Haan *et al.*, 2007) y secuencias de otras levaduras, como la secuencia de exportación de la proteína asesina SS de *Kluyveromyces lactis*, han sido muy eficientes para la secreción de proteínas en *S. cerevisiae* (Morawsky *et al.*, 2000).

Resumiendo, las investigaciones sobre glicosilación y exportación de proteínas, han permitido la expresión heteróloga de celulasas, conservando gran parte de la actividad de la proteína nativa y permitiendo su secreción, lo que hace factibles técnicamente los procesos de SFS y los BPC.

Tabla 3. Celulasas recombinantes producidas en *S. cerevisiae*

Enzima	Gen	Donador	Referencia
ENDOGLUCANASAS			
Endo- β -1,3-glucanasa	<i>bglH</i>	<i>Bacillus circulans</i>	Nakajima <i>et al.</i> , 1993
Endo- β -1,3-1,4-glucanasa	<i>end1</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Hinchliffe & Box, 1984; Skipper <i>et al.</i> , 1985; Cantwell <i>et al.</i> , 1986
Endo- β -1,4-glucanasa	<i>cenA</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Van Rensburg <i>et al.</i> , 1994; Van Rensburg <i>et al.</i> , 1996; Petersen <i>et al.</i> , 1998.
Endoglucanasa		<i>Cellulomonas fimi</i>	Skipper <i>et al.</i> , 1985
Endo- β -1,4-glucanasa		<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Pérez-González <i>et al.</i> , 1993; 1996
Endo- β -1,4-glucanasa		<i>Clostridium thermocellum</i>	Sacco <i>et al.</i> , 1984.
Endo- β -1,3-glucanasa	<i>BGL2</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Klebl & Tanner, 1989; Mrsa <i>et al.</i> , 1993.
Endo- β -1,3-1,4-glucanasa I	<i>egl1</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	Penttilä <i>et al.</i> , 1987a; Van Arsdell <i>et al.</i> , 1987; Aho & Paloheimo, 1990; Bailey <i>et al.</i> , 1993.
Endo- β -1,3-1,4-glucanasa III	<i>egl1</i> , 3-5	<i>Trichoderma reesei</i>	Penttilä <i>et al.</i> , 1987a; 1987b; Suihko <i>et al.</i> , 1991; Zurbriggen <i>et al.</i> , 1991; Saloheimo <i>et al.</i> , 1994; 1997.
FI-Carboximetilcelulasa		<i>Aspergillus aculeatus</i>	Ooi <i>et al.</i> , 1994; Ueda & Tanaka, 2000
Endo- β -1,3-glucanasa		<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Demolder <i>et al.</i> , 1993
EXOGLUCANASAS			
Exo- β -1,4-glucanasa	<i>cex</i>	<i>Cellulomonas fimi</i>	Curry <i>et al.</i> , 1988
Exo- β -1,3-glucanasa I + II	<i>EXG1/BGL1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nebreda <i>et al.</i> , 1986
Exo- β -1,3-glucanasa III	<i>EXG2</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Klebl & Tanner, 1989
CELOBIOHIDROLASAS			
Celobiohidrolasa	<i>CEL3</i>	<i>Agaricus bisporus</i>	Chow <i>et al.</i> , 1994.
Celobiohidrolasa	<i>cbh1</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Murai <i>et al.</i> , 1997; 1998; Takada <i>et al.</i> , 1998.
Celobiohidrolasa		<i>Clostridium thermocellum</i>	Saito <i>et al.</i> , 1990; Uozumi <i>et al.</i> , 1993
Celobiohidrolasa		<i>Penicillium janthinellum</i>	Koch <i>et al.</i> , 1993

Celobiohidrolasa	<i>CBH1</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Petersen <i>et al.</i> , 1998; Van Rensburg <i>et al.</i> , 1997; 1998
Celobiohidrolasa I	<i>cbh1</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	Aho & Paloheimo, 1990; Van Arsdell <i>et al.</i> , 1987; Penttilä <i>et al.</i> , 1988.
Celobiohidrolasa II	<i>cbh2</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	Aho & Paloheimo, 1990; Zurbriggen <i>et al.</i> , 1990; Bailey <i>et al.</i> , 1993; Penttilä <i>et al.</i> , 1987b.
ENDO/EXO-GLUCANASAS			
Endo/exoglucanasa	<i>cel</i>	<i>Bacillus</i> sp strain DO4	Han <i>et al.</i> , 1995; Cho <i>et al.</i> , 1999.
β-GLUCOSIDASAS			
β-Glucosidasa	<i>bgl1</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Takada <i>et al.</i> , 1998; Ueda & Tanaka, 2000.
β-Glucosidasa	<i>bglA</i>	<i>Aspergillus kawachii</i>	Van Rooyen <i>et al.</i> , 2005.
β-Glucosidasa		<i>Aspergillus niger</i>	Penttilä <i>et al.</i> , 1984
β-Glucosidasa	<i>bgl</i>	<i>Bacillus circulans</i>	Cho & Yoo, 1999; Cho <i>et al.</i> , 1999.
β-Glucosidasa	<i>bglA-C</i>	<i>Cellulomonas biazotea</i>	Rajoka <i>et al.</i> , 1992; Rajoka & Malik, 1997.
β-Glucosidasa	<i>BGLN</i>	<i>Candida molischiana</i>	Sánchez-Torrez <i>et al.</i> , 1998.
β-Glucosidasa		<i>Candida pelliculosa</i>	Kohchi & Toh-e, 1986.
β-Glucosidasa	<i>bglB</i>	<i>Candida wickerhamii</i>	Van Rooyen <i>et al.</i> , 2005.
β-Glucosidasa		<i>Kluyveromyces lactis</i>	Raynal & Guérineau, 1984.; Raynal <i>et al.</i> , 1987
Celobiasa	<i>BGL1</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Machida <i>et al.</i> , 1988; Van Rensburg <i>et al.</i> , 1998; Van Rooyen <i>et al.</i> , 2005.
β-Glucosidasa	<i>BGL2</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Machida <i>et al.</i> , 1988.
β-Glucosidasa	<i>Bgl</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	Van Rooyen <i>et al.</i> , 2005.

II JUSTIFICACIÓN

La β -glucosidasa ha mostrado ser una limitante en el proceso de sacarificación de la celulosa, debido a que la acumulación de celobiosa inhibe a las endo y exoglucanasas. *Cellulomonas flavigena* PN-120 es capaz de producir una β -glucosidasa oligomérica con alta actividad y resistencia a inhibición por glucosa. Sin embargo, la enzima permanece intracelularmente por lo que los extractos celulolíticos carecen de dicha actividad. Las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* tienen un sistema de secreción de proteínas bastante eficiente, por ello se pretende utilizar dicho mecanismo para la producción extracelular de la unidad catalítica de la β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120.

En este sentido, la clonación de sólo la unidad catalítica de la β -glucosidasa resistente a inhibición por glucosa de *C. flavigena* PN-120 podría facilitar su expresión de forma extracelular en *S. cerevisiae* permitiéndole a la recombinante crecer y producir etanol a partir de sacarificados ricos en celobiosa.

III HIPÓTESIS

H1. *Saccharomyces cerevisiae* tiene la capacidad para expresar y exportar la unidad catalítica de β -glucosidasa de *Cellulomonas flavigena* PN-120.

H2. La cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de crecer en celobiosa como única fuente de carbono.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Expresar extracelularmente y de manera funcional la unidad catalítica de la β -glucosidasa de *Cellulomonas flavigena* PN-120 en *Saccharomyces cerevisiae*, permitiéndole emplear la celobiosa como fuente de carbono.

4.2 Objetivos particulares

OP1. Amplificar e identificar el gen *bglA* que codifica la unidad catalítica de la β glucosidasa de *C. flavigena* PN-120.

OP2. Expresar el gen *bglA* en *S. cerevisiae*.

OP3. Evaluar la actividad extracelular de la β -glucosidasa de la cepa recombinante de *S. cerevisiae* y su potencial capacidad de producir etanol en un medio con celobiosa como fuente de carbono.

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismos empleados

Cellulomonas flavigena PN-120 se utilizó en el presente trabajo como fuente de DNA genómico. La bacteria se creció en medio mineral con 1 % bagazo de caña como fuente de carbono (Ponce Noyola & de la Torre, 1995). Los cultivos se incubaron a 37 °C, 150 rpm por 24 h. Para la replicación de los vectores se empleó *Escherichia coli* cepa DH5 α la cual se propagó en caldo Luria-Bertani (LB; Difco, Detroit, MI, USA) por 24 h a 37 °C, 150 rpm con 100 mg/mL de ampicilina como sistema de selección.

La cepa diploide de *S. cerevisiae* 2-24D (*MAT α* , *MATa*, *leu2d*, *ura3*) fue utilizada para construir la recombinante que expresa la β - glucosidasa de *C. flavigena* PN-120, a la cepa transformada se le llamó *S. cerevisiae* PM-15. La cepa diploide fue obtenida a partir de las cepas haploides de *S. cerevisiae* 2D (*MAT α* , *leu2d*, *ura3*) y 24D (*MATa*, *leu2d*, *ura3*) donadas por el Dr. Samuel Zinker del Departamento de Genética del CINVESTAV unidad Zacatenco. Las cepas de la levadura, tanto haploides como diploides, fueron propagadas en medio YPD (1 % de extracto de levadura, 2 % de bacto peptona, 2 % de glucosa y 40 mg/L de adenina hemisulfato) y conservadas en cajas Petri con el mismo medio de cultivo. Las levaduras transformadas fueron cultivadas en medio selectivo SD (1.7 g/L fuente de nitrógeno sin aminoácidos, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 20 g/L de glucosa), se empleó una

mezcla de aminoácidos sin uracilo como reactivo de selección. En todos los casos *S. cerevisiae* fue incubada a 30 °C por 36 h.

5.2 Procedimientos de biología molecular

5.2.1 Extracción de DNA genómico

Se prepararon 200 mL de cultivo de *C. flavigena* PN-120, la biomasa se separó por centrifugación a 5,000 rpm y se lavó 2 veces con amortiguador TE 1X. El paquete celular se resuspendió en 10 mL de TE, se agregaron 20 mg de proteinasa k (Research Organics, USA) y se incubó a 37 °C por 30 min. El lisado se limpió con 2 mL de fenol saturado (Tris-HCl pH 7.2), se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min y se recuperó la fase acuosa. Este paso se repitió hasta observar el sobrenadante claro. Se lavó de nuevo con fenol-cloroformo-isoamílico (25: 24:1) y posteriormente con cloroformo. La fase acuosa se precipitó con 3 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M por toda la noche. La pastilla se recuperó por centrifugación a 4 °C, 12,000 rpm, 15 min y se lavó con etanol al 70 %. Por último, se resuspendió en 50 µL de agua calidad MiliQ.

5.2.2 Amplificación por PCR del gen *bgIA*

Para este procedimiento se diseñaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores, para la secuencia en sentido KKS01 (CGCGTGG**AATTC**AAAAGGGCCACCATGACGCTCGCCGAGAAGG), la cual

cuenta con la secuencia Kozak (GCCACC) y para la antisentido ESA01 (CAGGCC**GAATTCT**CACGCGGTGATGGTGAACC). La reacción se llevó a cabo en tubos para PCR. Se añadieron 2 μL de DNA genómico (50 ng/ μL), 1 μL del iniciador en sentido (10 pM), 1 μL del oligonucleótido antisentido (10 pM), 1 μL de dNTP's (0.1 mM), 5 μL de DMSO, 5 μL de regulador DNA polimerasa 10X, 0.5 μL de *pfu* DNA polimerasa (2.5 U/ μL) y se ajustó a un volumen de 50 μL con agua calidad MiliQ. Para llevar a cabo la amplificación, se empleó la técnica "Hot-Start". La técnica constó de dos programas distintos de amplificación, pero complementarios. El primer programa consistió en 5 min a 94 °C y 8 ciclos de 94 °C por 1 min, 1.5 min a 61 °C y 72 °C durante 1.5 min. El segundo programa consistió en: 25 ciclos de 1 min a 94 °C y 2.5 min a 72 °C, acompañados de 7 min a 72 °C. Se guardó a 4 °C hasta la utilización del producto de amplificación.

5.2.3 Extracción de plásmido

Mediante la técnica de Miniprep se extrajeron los plásmidos empleados en este trabajo. Primero, se añadieron 3 mL de la cepa *E. coli* con el plásmido de interés (pYEX-S1 y pS1-bglA) en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y posteriormente se resuspendió la pastilla con 500 μL de STE 1X, se repitieron las condiciones de centrifugación y manejo del sobrenadante. Se añadieron 200 μL de la solución P1 (50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 400 $\mu\text{g/mL}$ ribonucleasa A) y se resuspendió la pastilla. Posteriormente, se añadieron 400 μL de la solución P2 (200 mM de NaOH y 10 %

de SDS), se invirtió el tubo suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Inmediatamente, se agregaron 300 µL de la solución P3 (255 mM de acetato de potasio pH 4.8), de nuevo se invirtió el tubo suavemente y se incubó en hielo durante 10 min. Por último, se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min. El sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadieron 0.6 volúmenes de etanol absoluto y se dejó toda la noche a -20 °C.

5.2.4 Ligación

La reacción de ligación se llevó a cabo con una relación 2:1 (inserto: vector). El inserto y el vector fueron previamente digeridos con *EcoRI*. Se añadieron 2 µL del regulador de ligación T4 DNA 10X, 1 µL T4 DNA ligasa (5U) y se ajustó con agua calidad MiliQ a 7.5 µL. La reacción de ligación se incubó a 7 °C durante toda la noche y posteriormente 1 h a temperatura ambiente.

5.2.5 Preparación de células competentes de *E. coli*

Escherichia coli DH5α (sin vector) se inoculó en diez mL de medio LB (sin ampicilina) y se incubó a 37 °C toda una noche. Al día siguiente, se inocularon 10 mL de medio SOB con 100 µL del cultivo anterior y se incubó a 37 °C por 3 h. El cultivo se incubó en hielo por 20 min, después se centrifugó a 2,300 rpm por 12 min y el paquete se resuspendió en 3.2 mL de solución TFB1. La resuspensión se puso en hielo por 15 min, se centrifugó a las condiciones anteriores. Las células se

resuspendieron en 800 μL de solución TFB2, se pusieron en hielo por 30 min y por último se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.6 Transformación de células competentes de *E. coli*

Se añadieron 10 μL de la reacción de ligación en 100 μL de células competentes y se incubaron en hielo por 30 min. La suspensión se puso en baño maría durante 90 s a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se colocaron en hielo por 3 min. Se agregaron 400 μL de SOC, se incubó de 3 a 4 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 150 rpm. En una placa con medio LB (con ampicilina) se agregaron 100 μL del cultivo anterior y se incubó toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.7 Transformación de *S. cerevisiae*

S. cerevisiae 2-24D fue transformada con la construcción pS1-bglA, mediante la técnica de acetato de litio (Gietz & Woods, 2006). La levadura hospedera se propagó en medio YPD a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche, posteriormente se inoculó en medio YPD fresco a las mismas condiciones hasta obtener 1×10^8 cel/mL. Se cosecharon las células a 3,000 rpm por 5 min y se lavaron en dos ocasiones con agua calidad MiliQ estéril. Las células se distribuyeron en tubos Eppendorf y se agregaron 360 μL de la “Mezcla T” (240 μL PEG 4000 [50% w/v], 36 μL de LiAc 1.0 M, 100 μg de DNA de cadena sencilla de espermatozoos de salmón, 100 ng de DNA plásmidico 1% de DMSO, la mezcla se ajustó a 360 μL con agua calidad MiliQ), se incubó durante

15 min a 42 °C, se centrifugó a las condiciones anteriores y se desechó el sobrenadante. Finalmente las células se resuspendieron en agua calidad MiliQ, se añadió 100 µL de la suspensión anterior en cajas Petri que contenían medio SD y se incubaron a 30 °C durante 3 a 5 días.

5.2.8 Confirmación del sentido de ligación.

La confirmación del sentido correcto de la ligación del gen *bglA* en el vector de exportación de proteínas se llevó a cabo de dos formas. Primero, mediante un mapa de restricción y segundo, por secuenciación. La secuenciación se fundamentó en la metodología de Sanger *et al.*, (1977) y se emplearon los oligonucleótidos pYEX-S01 (CCAAGGGGGTGGTTTAGT) y pYEX-SA01 (CCAAGAAGCACCACCACC), sentido y antisentido, respectivamente. La secuencia se llevó a cabo en el departamento de genética del CINVESTAV unidad Zacatenco.

5.2.9 Electroforesis en gel de agarosa

Para la identificación visual de los fragmentos de DNA, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0.5 y 0.8%. Seis microlitros de DNA se mezclaron con 5 µL de TAE 1X y 1 µL de colorante de carga. Con la mezcla anterior, se cargaron los pozos del gel de agarosa y se corrió a 100 V.

5.3 Obtención de células diploides de *S. cerevisiae*

Se propagaron por separado las cepas 2D y 24D de *S. cerevisiae* en medio YPD, posteriormente fueron mezcladas en una caja de Petri con el mismo medio de cultivo. La mezcla se realizó en un diámetro no mayor de 5 cm, la caja se incubó a 30 °C durante 4 días. La colonia resultante fue propagada en matraz con 50 mL de medio YPD, se incubó a 30 °C, 250 rpm, toda una noche. Se tomó 1 mL del cultivo anterior y se inocularon 5 mL de medio de esporulación, se incubó a 30 °C por 3 días. Las esporas se observaron al microscopio (40X).

El medio de esporulación está compuesto de 10 g/L de acetato de potasio, 1 g/L de extracto de levadura, 0.5 g/L de glucosa, 60 µg/mL de L-leucina y 20 µg/mL de uracilo. La colonia resultante fue denominada *S. cerevisiae* 2-24D.

5.4 Producción de la β-glucosidasa por *S.cerevisiae* PM-15

Las células transformantes fueron crecidas en medio YPD y medio SD a una concentración final de 5×10^5 cel/mL. Se incubó a 30 °C durante 36 h a 250 rpm y se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática de la β-glucosidasa.

La actividad de β-glucosidasa se determinó por dos métodos:

a) Las colonias de *S. cerevisiae* PM-15 crecidas durante 3 días en cajas Petri con medio SD fueron bañadas con una sobre capa de 4-metilumbeliferil-1,4-D-glucopiranosido (MUG) con 0.75 % de agarosa. La aparición de halos fluorescentes bajo luz UV indicó la presencia de la actividad de β -glucosidasa.

b) La actividad en el sobrenadante se determinó empleando p-nitrofenil β -D-glucopiranosido (pNPG) como sustrato. Un mL del extracto enzimático se concentró 10 veces (100 μ L) y se agregó 1 mL de sustrato 1 mM en regulador de fosfatos 50 mM pH 6.2. La mezcla se incubó durante 40 min a 40 °C. La reacción se detuvo añadiendo 1 mL de Na_2CO_3 1M. La liberación de p-nitrofenil (pNP) fue medida a 400 nm, la actividad enzimática se expresó en μmol de pNP liberado por $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ empleando el coeficiente de extinción (18.5 mM^{-1}) de pNP (Spiridonov *et al.*, 2001).

5.5 Purificación de la β -glucosidasa

5.5.1 Cromatografía de intercambio iónico

El sobrenadante de un cultivo de 200 mL de *S. cerevisiae* PM-15 fue recuperado por centrifugación, posteriormente se concentró en un ultrafiltro con una membrana de 30 kDa de tamaño de corte (Stierred ultrafiltration cell, Millipore®). El concentrado se sometió a cromatografía de intercambio aniónico empleando una columna de Q Sepharosa Fast flow (2 x 6 cm) equilibrada con 25 mL de Tris-HCl 25 mM pH 7.2, y se eluyó con 0.6 M de KCl. Se recolectaron fracciones de 1 mL. La purificación de la β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120 se llevó a cabo de

la misma manera, pero la enzima fue liberada previamente de las células usando lisozima de acuerdo a Barrera *et al.*, (2007).

5.5.2 Cromatografía de exclusión molecular

Tres mL de la fracción con actividad β -glucosidasa obtenidas de la columna de intercambio iónico, fueron añadidos a una columna de Sephacryl S-200HR (1.5 x 25 cm), pre-equilibrada con 25 mM de Tris-HCl pH 7.2 y se recolectaron aquellas fracciones que mostraron actividad de β -glucosidasa sobre pNPG.

5.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se corrieron geles de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE) y en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 8 y 10 %. Las proteínas fueron teñidas con Sypro Ruby (Molecular probes. S12000) y observadas bajo luz UV (360 nm). Una vez corridas las muestras, para hacer los zimogramas, los geles se sumergieron en 1mM de MUG con 50 mM de amortiguador de fosfato de sodio pH 6.2, se incubaron a 40 °C por 40 min y se expusieron bajo luz UV (360 nm) con el fin de observar los halos de hidrólisis producto de la liberación de la metilumbeliferona.

5.7 Caracterización enzimática de la unidad catalítica de la β -glucosidasa producida por *S. cerevisiae* PM-15

5.7.1 Especificidad

La especificidad de la enzima recombinante fue examinada en placas de cromatografía de capa fina (TLC por sus siglas en inglés). La reacción de hidrólisis consistió en; 6 μ g de celo-oligosacáridos aforados con 50 mM de amortiguador de fosfatos pH 6.5 a un volumen total de 100 μ L de reacción. La reacción se incubó a 40 °C durante 12 h. La cantidad de enzima y el tiempo de reacción fueron estandarizados para hidrolizar eficientemente a la celopentosa. Los productos de la reacción fueron concentrados y aplicados en la placa de TLC (Silica gel 60; Merck). Se empleó ácido acético: N-butano: H₂O (1:2:1) como fase móvil y los azúcares fueron visualizados una vez que se calentó la placa rociada con orcinol/H₂SO₄ (0.2 %/20 %).

5.7.2 Inhibición

Inhibición por glucosa.

Se ensayaron concentraciones entre 10 y 500 mM de glucosa. La reacción consistió en 500 μ L de pNPG 2 mM, 25 μ L de extracto enzimático y el volumen suficiente de glucosa para tener las concentraciones deseadas. El volumen total

de reacción se ajustó a 1.1 mL con amortiguador de fosfatos pH 6.2, se incubó a 40 °C durante 40 min y se añadió 1 mL de Na₂CO₃ 1 M para detener la reacción.

Determinación del tipo de inhibición

Se probaron concentraciones de 0, 160, 200, 500 mM de glucosa sobre concentraciones de sustrato (pNPG) que oscilaron de 2 a 7 mM, en intervalos de 1 mM. La constante de inhibición (K_i), se calculó graficando K_m/V_{max} vs [glucosa] por el método de Lineweaver y Burk.

Efecto del etanol

Para determinar el efecto del etanol sobre la actividad de la β -glucosidasa se utilizó el mismo procedimiento utilizado para determinar la inhibición por glucosa. Se usaron concentraciones de etanol de 0 a 100 g/L y el efecto se reportó como actividad relativa.

Efecto de compuestos fenólicos

El efecto de los compuestos fenólicos sobre la β -glucosidasa se determinó por el método de desactivación de Ximenes *et al.*, (2011). A la cantidad de enzima necesaria para obtener 2.0 UI/L se le añadió el volumen necesario de compuestos fenólicos (0.05 a 0.55 g/L) de un concentrado de 3 g/L. Se utilizó hidrolizado de

bagazo de caña como fuente de compuestos fenólicos (tabla 5) y se cambió la temperatura de incubación a 30 °C durante 24 h. Posteriormente se midió la actividad de la β -glucosidasa.

5.8 Estructura 3D de la fracción catalítica de la β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120

Para modelar la estructura de la fracción catalítica de la β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120 se llevó a cabo un alineamiento de la secuencia aminoacídica de la enzima en el programa del BLAST del NCBI. La secuencia se sometió a un análisis estructural manual en el SWISS-MODEL, SIB, 2011.

5.9 Obtención de hidrolizados de bagazo de caña

C. flavigena PR-22 se cultivó en un reactor con volumen nominal de 7 L (Applicon) con un volumen de operación de 5 L de medio mineral y 1 % de bagazo de caña previamente tratado con NaOH como sustrato. El reactor se operó a 37 °C, 0.5 vvm y 300 rpm durante 48 h. El cultivo fue filtrado con una malla de acero para eliminar el sustrato residual, posteriormente se centrifugó a 8,000 rpm por 20 min. Se recuperó el sobrenadante y se ultrafiltró con una membrana de 10 kDa de tamaño de corte hasta obtener un décimo del volumen total. Al concentrado se le llamó extracto enzimático crudo y se le determinó actividad de xilanasas de acuerdo a Rojas-Rejón *et al.*, (2011).

Para obtener el hidrolizado enzimático de bagazo de caña, en un reactor Applicon de 3.0 L de volumen nominal, se agregaron 3 % de bagazo de caña pretratado, 1000 U/L de enzimas celulolíticas (con base en actividad de xilanasas), 100 mg/L de ampicilina y se ajustó a un volumen final de 2.0 L con amortiguador citratos fosfatos 25 mM pH 7.0 (Rojas-Rejón *et al.*, 2011). Se dejó a 55 °C y 300 rpm, durante 3 días. Se recuperó el hidrolizado mediante centrifugación (20 min a 8,000 rpm), posteriormente el sobrenadante se pasó por un embudo con filtro de fibra de vidrio, poro M (MFS, Dublin, CA) para remover los sólidos finos y se refrigeró hasta su utilización.

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo empleados por *S. cerevisiae* PM-15 para la producción de etanol.

Condiciones	Composición	Concentración (g/L)	Distribución (%)	Az-Red totales (g/L)
Aerobias				
Hidrolizados de bagazo de caña	Celotriosa	0.224 ± 0.01	1.3	17.2 ± 0.018
	Celobiosa	15.8 ± 0.05	91.9	
	Glucosa	1.172 ± 0.01	6.8	
	Compuestos fenólicos	0.362 ± 0.013		
Anaerobias				
Hidrolizados de bagazo de caña	Celotriosa	0.138 ± 0.009	1.3	10.62 ± 0.056
	Celobiosa	10.11 ± 0.043	95.2	
	Glucosa	0.372 ± 0.015	3.5	
	Compuestos fenólicos	0.181 ± 0.006		
Aerobias y anaerobias				
Medio sintético	Celobiosa	20 ± 0.067	97.6	20.5 ± 0.067
	Glucosa	0.5 ± 0.01	2.4	

Az-Red totales = azúcares reductores totales

5.10 Crecimiento de *S. cerevisiae* PM-15

5.10.1 Hidrolizados de bagazo de caña

Reactores de 500 mL (Sixfors, Infors) con un volumen de operación de 350 mL, se inocularon para tener una concentración inicial de 5×10^5 cel/mL de la cepa recombinante *S. cerevisiae* PM-15. El medio de cultivo consistió de 1 % de extracto de levadura, 2 % de bacto-peptona y la cantidad necesaria de hidrolizados de bagazo de caña para alcanzar de 1 a 2 % de azúcares reductores. Se incubó a 30 °C, 1.0 vvm, 250 rpm, durante 96 h. Para los experimentos en condiciones anaerobias, se repitió el mismo procedimiento, salvo que no se inyectó aire y la cantidad de inóculo fue la necesaria para tener una concentración inicial de 5×10^6 cel/mL.

Los muestreos fueron hechos cada 3 h durante las primeras 12 h de fermentación y posteriormente cada 8 h.

5.10.2 Medio sintético

Se utilizó el mismo procedimiento y condiciones de operación que en los experimentos con hidrolizados de bagazo de caña, pero el medio de cultivo consistió en 1 % de extracto de levadura, 2 % de bacto-peptona y 2 % de celobiosa.

5.10.3 Determinación de variables de respuesta

En el proceso de crecimiento se evaluó glucosa, celobiosa, producción de etanol y la actividad volumétrica de la β -glucosidasa.

La biomasa celular se calculó con base en una curva estándar (biomasa g/L vs DO_{600nm}) y la glucosa se cuantificó con el analizador bioquímico YSI 2700. La concentración de celobiosa se determinó por HPLC (Varian 9002, IR PROSTAR detector), Los compuestos fueron separados en una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Richmond, CA), a 65 °C, se utilizó agua como fase móvil a un flujo de 0.4 mL/min.

El etanol se cuantificó con un cromatógrafo de gases con ionizador a la flama, utilizando una columna ZEBRON FFAP (Perkin Elmer Autosystem). Las temperaturas del detector, inyector y columna fueron de 220 °C, 200 °C and 60 °C respectivamente.

Los compuestos fenólicos se cuantificaron por el método de Folin Ciocalteu, utilizando vainillina como estándar. Para la curva se empleó una solución estándar de vainillina (20 $\mu\text{g/mL}$), se tomaron 2 mL de esta solución, 10 mL de agua destilada, 1 mL de Folin-Ciocalteu, y se ajustó a un volumen final de 25 mL con Na_2CO_3 al 10.75 %. De la mezcla anterior se obtuvo un segundo lote con una concentración de vainilla de 1.6 $\mu\text{g/mL}$, éste se diluyó con agua destilada a diferentes concentraciones, de tal manera que la absorbancia a 760 nm fuese menor a 1.0 (Blainski *et al.*, 2013).

5.11 Análisis estadístico

Para todos los experimentos se llevaron a cabo tres repeticiones con muestreos por triplicado. Para el análisis estadístico se empleó un análisis de varianza del tipo ANOVA con el programa NCSS, 2007 para Windows. Los valores reportados fueron considerados significativamente diferentes con un $\alpha = 0.05$

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Construcción de la cepa recombinante *S. cerevisiae* PM-15

6.1.1 Construcción del vector pS1-bglA.

Con el propósito de obtener el gen que sería clonado en el vector de exportación de proteínas pYEX-S1, se amplificó el gen *bglA* que codifica para la unidad catalítica de la β -glucosidasa oligomérica (BGLA) de *C. flavigena* PN-120 utilizando como molde la construcción pKS-bglA. Se utilizó la técnica de amplificación “Hot-start” buscando disminuir las amplificaciones inespecíficas. Mediante esta técnica se logró amplificar una banda de 2,220 pb aproximadamente, correspondiente al marco abierto de lectura de *bglA*. No se observaron amplificaciones inespecíficas (Fig. 5).

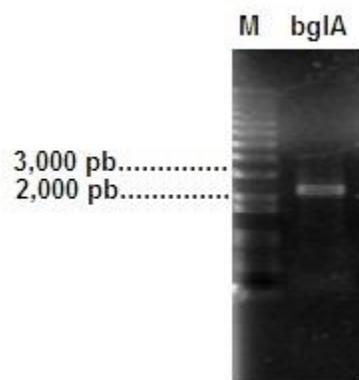


Figura 5. Amplificación del gen *bglA* mediante la técnica “Hot-Start”. M) marcador de tamaño molecular; bglA) gen que codifica para la β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120

El plásmido pYEX-S1 linealizado y el gen *bglA* fueron desfosforilados y purificados con “Pure Link PCR Purification Kit” de Invitrogen, previamente a su ligación. En la figura 6 se observa las bandas que corresponden al plásmido pYEX-S1 y al gen *bglA*

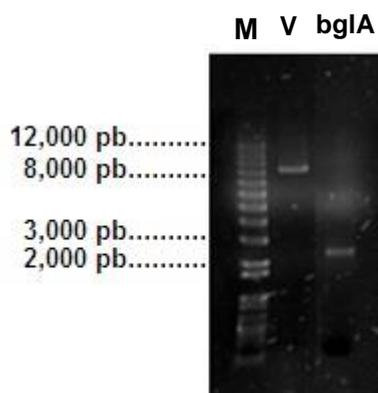


Figura 6. Gen *bglA* y plásmido pYEX-S1 purificados, y desfosforilados. M) marcador de tamaño molecular; V) plásmido pYEX-S1 linealizado; bglA) gen de la β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120.

Una vez realizada la ligación y la transformación en *E. coli* DH5 α , de las transformaciones obtenidas, los controles negativos no mostraron crecimiento; en los controles positivos se obtuvieron 61 colonias transformadas con el vector pYEX-S1. Mientras que en las células transformadas con la reacción de ligación, se obtuvieron 33 colonias candidatas que podrían estar replicando la construcción deseada. Se llevó a cabo la lisis de cada una de las colonias anteriores, eligiendo la colonia denominada 17 como la posible hospedera de nuestra construcción.

El plásmido contenido en la colonia 17 se corrió en un gel de agarosa mostrando una banda de alrededor de 10,500 pb, que corresponde al tamaño esperado de la construcción e incluso formó una isoforma de aproximadamente 6,000 pb (Fig. 7A). La banda anterior se digirió con la enzima *EcoRI* (GAATTC), ya que el gen *bgIA* y el plásmido pYEX-S1 fueron unidos por ambos extremos con la secuencia de corte de dicha enzima. En la figura 7B, se muestran dos bandas, una de ellas de alrededor de las 8,300 pb y la segunda de alrededor de 2,200 pb, estas bandas corresponderían al plásmido pYEX-S1 y al gen *bgIA*, respectivamente.

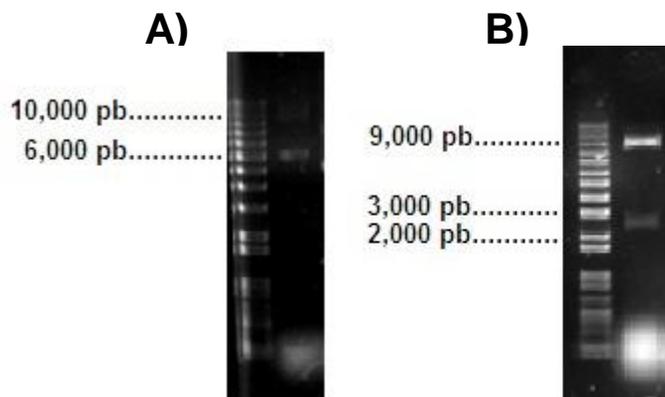


Figura 7. Producto de la ligación del gen *bgIA* y el plásmido pYEX-S1. A) plásmido obtenido de la colonia 17; B) plásmido de la colonia 17 digerido con *EcoRI*.

Para confirmar el sentido correcto de la ligación del gen *bgIA* en el plásmido de exportación, se realizó un mapa de restricción que consistió en una doble digestión con las enzimas *PvuII* y *SalI*. Según la simulación (programa NEBCutter V 2.0) la doble digestión debería arrojar tres bandas (6,691; 2,868 y 934 pb), para

suponer una correcta orientación de los fragmentos. El proceso de digestión liberó tres fragmentos, los cuales fueron de aproximadamente 7,000 pb, 3,000 pb y 900 pb (Fig 8). Dichos resultados indican que el gen fue insertado con la orientación correcta en el plásmido.

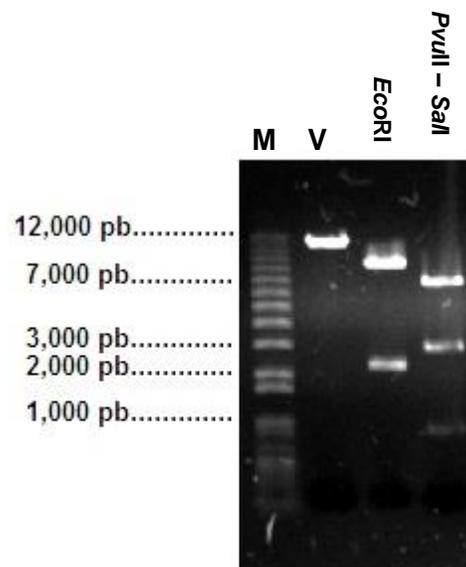


Figura 8. Digestión del plásmido de la colonia 17. M) marcador de tamaño molecular; V) plásmido de la colonia 17 linealizado con *Bam*HI; *Eco*RI) plásmido de la colonia 17 digerido con *Eco*RI; *Pvu*II- *Sal*I) doble digestión del plásmido de la colonia 17 con *Pvu*II y *Sal*I.

Con base en los resultados obtenidos en el punto anterior, se decidió secuenciar el fragmento de alrededor de 3,000 pb. Para dicha tarea, se emplearon los oligos pYEX-S01 y pYEX-SA01 (sentido y antisentido), con el objetivo de observar el codón de inicio y terminación del marco abierto de lectura del gen *bgl*A. Tomando como molde la construcción plasmídica de la colonia 17, se lograron obtener 409 b

y 364 b de la secuencia sentido y antisentido, respectivamente. Posteriormente y con la ayuda de los oligos KKS01 y ESA01 se logró ampliar en más del 35 % las secuencias sentido y antisentido (Tabla 5).

Tabla 5. Fragmentos obtenidos del proceso de secuenciación del plásmido de la colonia 17.

Secuencia sentido (629 bases)
<p><u>GAATTC</u>AAAAGGGCCACCATGACGCTCGCCGAGAAGGTCGGCCAGATGATGCAGCTCGACTCGCGCGG GGTCCGTGCGCGGCCTGATCGAGGAGACGCACGTGGCTCGATCCTGCACACGTCCCCCGCGCTCGTGC GCGAGGCGCACGAGGTCACGGCCGGCACGCGCCTGCGCATCCCGCTGCTCATCGCCGAGGACTGCATC CACGGCCACTCGTTCTTCGAGGGCGCGACGATCTTCCCCACGCAGCTCGGCATGGCCGCCTCGTGGGAC CCCCGGCCTCGTCGAGCGCGCCGCGCGCGTACGGCCGTCGAGGTCGCCGCGACCGGCATCCACTGGACC TTCTCCCCTGTGCTGTGCATCGCACGCGACCTGCGCTGGGGCCGGTCTCCGAGACGTTCCGGCGAGGA CCCCTTCCTCATCGGGGAGCTCGCGTCCGCGATGGTCAAGGGCTACCAGGGCGACGGTCTGACCGACC CGACGGCGATCCTCGCGACCGCAAGCACTTCGCCGGCTACTCCGAGACGCAGGGCGGGCGGGACGCC ACCGAGGCGGACATCTCGCGCCGCAAGCTCACCGCCTGGTTCTCGCCCGGTTCCGAGCGCGTCGCCCGC GAGGGCTGCGCGAC</p>
Secuencia antisentido (620 bases)
<p>TGATGGTGAACCCCGCGACGAGCTGCTGCTCGCGCACCGAGGACGGCCCGACGCGCAGCTCGAACGCA CCCGGCTCGACGACGCGGCGCGCCTGGGCGTCGACGATCGAGCACGCGGACGCCGGCAGCGTGAGCTC GACGACGACGCTCTGGCCGGGCGCGACCTCCACCTGGCGGTACGCCTTGAGCTCGCTCTCGGCCACAT CGTCGTGGTGACGAGGTCGGACACGTAGACCTGGACGGTCTCGAGCGCGGGGCGCGTGCCGGTGTTC GGAGGGTGACCCGCGCGCACCTCGTCAGCCGCCGTGACCGACGGCGTGAGCACCTCGAGGTCGGCG TACTCGAGCGTCGTGTAGCTCAGCCGGCGCCGAACGCGAACGCCGGACGCTGCGTGAGGTCGGCGTA CCGGGTGCCGTGCTGGCCGCGGAGCTGGTTGTAGAACGTCGGCTGCTGGCCGACGTGCCGCGGAACG TGATGGGCAGCCGCCCGACGGCTCGACCAGGCCGAGCAGGATCTCCGCGACCGCCTGCCCGCCGCGCA TGCCGGGGTTCGCGGCCACACGACGGCCGCGCGTTCGAGCGCCGAGTCCGGCAGCACGTGCGGCTTG GACGCC</p>

EcoRI, secuencia en negritas; Kex2, secuencia subrayada; Kozak, secuencia con doble subraya; Codón de inicio, secuencia puntuada.

Con las secuencias obtenidas, se logró apreciar que los sitios *EcoRI*, *Kex2*, *Kozak* y codón de inicio se encuentran corriente abajo de la secuencia de exportación de proteínas de pYEX-S1. Lo anterior confirma la correcta orientación del gen *bglA* en la construcción. Por otro lado, según el programa BLAST del NCBI, las secuencias obtenidas tienen una identidad de entre el 34 al 89 % con la familia 3 de las glicosilhidrolasas y 100 % de identidad con la unidad catalítica de la β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120 (Reséndiz, 2008). Una vez comprobada la identidad y orientación del gen, la construcción fue denominada pS1-*bglA*.

6.1.2 Obtención de células diploides de *S. cerevisiae*

Las células haploides muestran baja termoestabilidad y poca tolerancia a ácidos, etanol y otros compuestos producidos en la fermentación (Yamada *et al.*, 2010). Por tal motivo, se decidió aparear las cepas 2D y 24D de *S. cerevisiae* y así obtener una célula diploide. La cepa que se obtuvo en este procedimiento se denominó 2-24D (*MAT α* , *MAT α* , *leu2d*, *ura3*) y fue empleada como hospedero de la construcción pS1-*bglA*. En la figura 9 se puede observar la esporulación de *S. cerevisiae* como señal de éxito en la obtención de células diploides, ya que en condiciones desfavorables, como la falta de nutrientes, las células diploides llevan a cabo la meiosis, provocando la aparición de cuatro esporas haploides, dos del tipo sexual a y las otras dos del tipo α (Neiman, 2011).

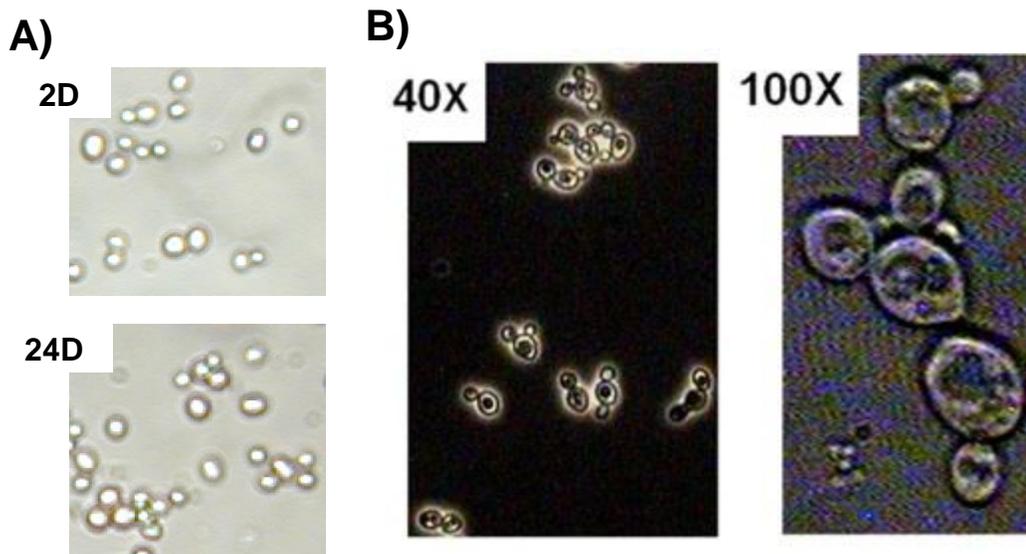


Figura 9. Esporulaci3n de la cepa diploide *S. cerevisiae* 2-24D. **A)** c3lulas haploides vistas en el objetivo 40X; 2D (*MAT α* , *leu2d*, *ura3*); 24D (*MAT α* , *leu2d*, *ura3*); **B)** c3lulas diploides vistas con los objetivos 40X y 100X.

6.1.3 Transformaci3n de *S. cerevisiae* cepa 2-24D

Una vez obtenida la construcci3n pS1-bglA se llev3 a cabo la transformaci3n de la cepa diploide de *S. cerevisiae* cepa 2-24D. Como resultado, se obtuvieron 15 posibles recombinantes capaces de expresar la unidad catal3tica de BGLA de *C. flavigena* PN-120, las cuales fueron evaluadas con base en su capacidad de hidrolizar el sustrato sint3tico MUG.

En la figura 10A se puede observar que todas las colonias transformadas con la construcci3n pS1-bglA fueron capaces de expresar extracelularmente la unidad catal3tica de BGLA de *C. flavigena* PN-120 ya que mostraron un halo de hidr3lisis

alrededor de ellas. Como se esperaba, las colonias transformadas con pYEX-S1 (control positivo) como también las colonias sin plásmido (control negativo), no fueron capaces de hidrolizar el MUG (Fig 10B). De las transformantes obtenidas con la construcción pS1-bglA se seleccionaron las colonias 4, 7 y 15, debido a que desarrollaron los halos de hidrólisis de mayor nitidez.

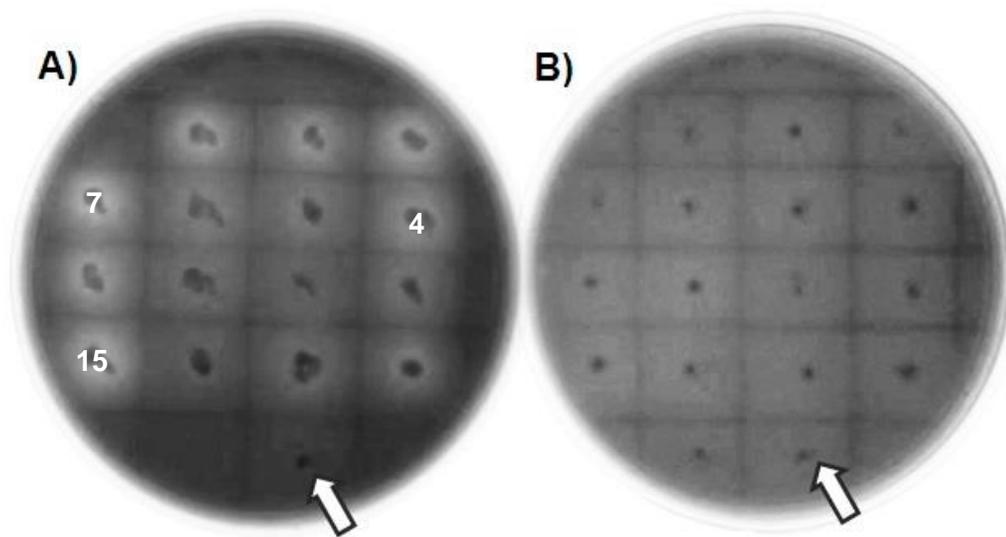


Figura 10. Transformantes de *S. cerevisiae* cepa 2-24D. A) colonias transformadas con la construcción pS1-bglA; B) colonias transformadas con el plásmido pYEX-S1. Las flechas representan las colonias de la cepa 2-24D sin plásmido.

Con el propósito de cuantificar y localizar la actividad de la β -glucosidasa de las tres recombinantes elegidas, las colonias 4, 7 y 15 fueron cultivadas en dos medios líquidos. El medio YPD (medio de cultivo rico) y el medio SD (medio de cultivo mínimo). La actividad enzimática se evaluó tanto en el sobrenadante, como en el paquete celular. Como se puede observar en la Tabla 6, se detectó actividad

de β -glucosidasa tanto en el sobrenadante (expresión extracelular) como en el paquete celular en los medios de cultivo usados.

Sin embargo, la producción total de la β -glucosidasa recombinante en el medio YPD fue 2 veces mayor que en el medio SD y la actividad enzimática se distribuyó de manera equitativa entre el paquete celular y el sobrenadante. Mientras que en las células cultivadas en medio SD el 80 % de la actividad de β -glucosidasa se concentró en el paquete celular. Estos resultados señalan que la composición del medio de cultivo tiene una influencia importante en la exportación de la proteína. Hahn-Hägerdal *et al.*, (2005) observaron que la presencia de amino ácidos en los medios de cultivo tiene una influencia significativa en la expresión de algunas proteínas heterólogas, afectando de manera positiva la traducción y glicosilación. Un fenómeno similar al observado con nuestra *S. cerevisiae* recombinante fue encontrado por Rajoka *et al.*, (2003), al emplear medio YPD en recombinantes de *S. cerevisiae* que expresaban la β -glucosidasa de *C. biazotea*.

Las colonias 4, 7 y 15 tuvieron la misma actividad de β -glucosidasa en los medios líquidos y se escogió la colonia 15 para futuros ensayos, debido a que mostró el halo de hidrólisis más brillante, lo que refleja un mayor número de copias de la construcción pS1-bglA. Esta colonia fue denominada *S. cerevisiae* PM-15 y a la unidad catalítica de BGLA producida por esta cepa se le llamó BGLA¹⁵.

Tabla 6. Efecto del medio de cultivo en la distribución de la actividad β -glucosidasa de las recombinantes de *S. cerevisiae*

Cepa	Medio YPD					Medio SD				
	Sobrenadante		Paquete celular		Total	Sobrenadante		Paquete celular		Total
	UI/L	%	UI/L	%	UI/L	UI/L	%	UI/L	%	UI/L
4	6.3 \pm 1.3	48.1	6.8 \pm 0.6	51.9	13.1 \pm 1.5	1.0 \pm 0.13	16.4	5.1 \pm 0.8	83.6	6.1 \pm 0.8
7	6.2 \pm 0.6	45.3	7.5 \pm 1.6	54.7	13.7 \pm 1.2	0.9 \pm 0.1	14.5	5.3 \pm 0.5	85.5	6.2 \pm 0.7
15	5.8 \pm 0.3	42.6	7.8 \pm 1.1	57.4	13.6 \pm 0.9	0.8 \pm 0.04	13.0	5.4 \pm 0.6	87.0	6.2 \pm 0.6

Posteriormente se evaluó la actividad enzimática extracelular producida por *S. cerevisiae* PM-15. La levadura recombinante produjo la enzima BGLA¹⁵ con una actividad de 5.82 UI/L y 0.99 UI/g de células. Estos valores fueron muy bajos comparados con los obtenidos en otros trabajos (Tabla 7), pero 19.5 y 22.5 veces mayores que la actividad de la β -glucosidasa de *C. wickerhamii* expresada en *S. cerevisiae* cepas pVBG-A y pVBG-C, respectivamente (Skory *et al.*, 1996).

Tabla 7. β -glucosidasas expresadas en *S. cerevisiae*.

Organismo fuente	Actividad volumétrica (UI/L)	Actividad específica (UI/g de células)	Referencia
<i>Cellulomonas flavigena</i> PN-120	5.82	0.99	Este trabajo
<i>Candida wickerhamii</i>	pVBG-A= 0.298 pVBG-B= 0.051 pVBG-C= 0.259	NR	Skory & Freer, 1996
<i>Candida molishiana</i>	48	NR	Sánchez-Torres <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus circulans</i>	450	50	Cho <i>et al.</i> , 1999
NR= No reportado <i>Aspergillus aculeatus</i>	NR	21	Fujita <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus circulans</i>	NR	64	Pack <i>et al.</i> , 2002

6.2 Caracterización de la β -glucosidasa extracelular producida por *S. cerevisiae* PM-15

Con el propósito de identificar a la β -glucosidasa producida de manera extracelular por la levadura recombinante y comparar su patrón proteico con el de la levadura sin plásmido; *S. cerevisiae* PM-15 y *S. cerevisiae* 2-24D se cultivaron en medio líquido YPD. El sobrenadante parcialmente purificado de ambas cepas se corrió en geles de poliacrilamida en condiciones nativas para comparar los patrones proteicos. En el sobrenadante de *S. cerevisiae* PM-15 se observó una banda la cual no se observó en el patrón de la cepa 2-24D (Fig 11A).

Para confirmar que la banda proteica presente en la cepa PM-15 fuera la proteína recombinante BGLA¹⁵, se llevaron a cabo electroforesis en condiciones nativas (PAGE) del sobrenadante de la cepa PM15 y del extracto libre de células de *C. flavigena* PN-120 como control positivo que contiene la proteína nativa respectiva, y se hicieron los zimogramas correspondientes. Se observó un halo de hidrólisis tanto en el perfil proteico de PM-15, como en el de PN-120 y como se esperaba, el patrón de migración de las proteínas en PAGE fue diferente entre ambas cepas (Fig 11B).

La β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120 es una proteína multimérica, donde sólo una fracción es capaz de llevar a cabo la función catalítica (Barrera *et al.*, 2007). El gen que codifica para dicha fracción es el que fue clonado en *S. cerevisiae*. Con la finalidad de separar las unidades de la β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120 y

comparar la unidad catalítica con la proteína expresada en *S. cerevisiae* PM-15, se llevaron a cabo electroforesis en condiciones desnaturalizantes y posteriormente el zimograma respectivo. En ambos perfiles proteicos en condiciones desnaturalizantes, se observó una banda de alrededor de 50 kDa con actividad enzimática que señala la presencia de la proteína activa (Fig 11C). La fluorescencia en los zimogramas fue muy tenue en comparación con el zimograma correspondiente a la electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, debido a que las proteínas desnaturalizadas pierden una buena parte de su actividad.

La β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120 está formada por tres unidades que componen a la proteína, al ser desnaturalizada la forma oligomérica, se libera la unidad catalítica y la banda de ésta y la de BGLA¹⁵ producida por *S. cerevisiae* PM-15 se encontraron a la misma altura. Estos resultados corroboran que BGLA¹⁵ corresponde a la unidad catalítica de BGLA.

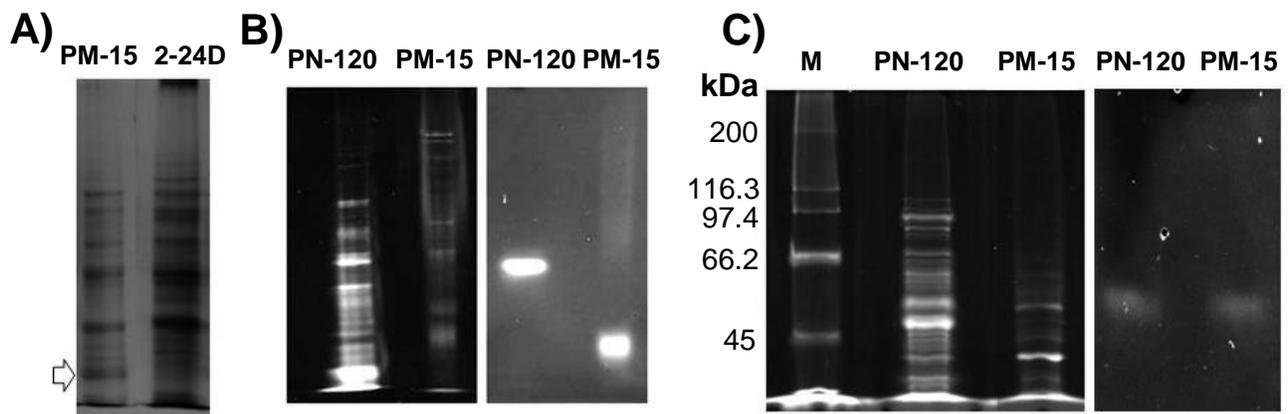


Figura 11. Electroforesis y zimogramas de la β -glucosidasa expresada extracelularmente por *S. cerevisiae* PM-15. A) Sobrenadante de la levadura recombinante y silvestre corrida en PAGE al 8% y teñida con Coomassie; B) Gel en PAGE al 10% teñido con Sypro ruby y zimograma usando MUG como sustrato; C) SDS-PAGE al 10% teñido con Sypro ruby y zimograma usando MUG como sustrato. M) marcador de masa molecular; PN-120) *C. flavigena* PN-120 BGLA; PM-15) cepa recombinante *S. cerevisiae* PM-15 BGLA¹⁵; 2-24D) cepa diploide *S. cerevisiae* 2-24D. La flecha señala la banda proteica recombinante.

6.2.1 Hidrólisis de celo-oligosacáridos por BGLA¹⁵

Se ha reportado que algunas β -glucosidasas tienen afinidad por sustratos de no más de 3 moléculas de glucosa (Yoshida *et al.*, 2010; Pozzo *et al.*, 2010), por tal motivo se evaluó la capacidad de BGLA¹⁵ para hidrolizar celo-oligosacáridos de 2 a 5 GP. Mediante TLC se observó que la enzima recombinante fue capaz de liberar glucosa de los cuatro sustratos ensayados (Fig 12). Sin embargo, la cantidad de unidades de enzima necesaria y el tiempo de reacción fueron diferentes según la longitud de la molécula. Así la hidrólisis de la celopentaosa y de la celotetraosa requirió 3 veces más unidades de enzima y 18 veces más tiempo que la de la celobiosa y la celotriosa. Puesto que BGLA¹⁵ es sólo la unidad

catalítica de la β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120 (Barrera *et al.*, 2007), estos resultados demuestran que la organización oligomérica de BGLA no es esencial para la hidrólisis de celo-oligosacáridos. Un comportamiento similar fue observado con la unidad catalítica de la β -glucosidasa tetramérica (KMBGLI) de *Kluyveromyces marxianus*, la cual liberó moléculas de glucosa en la hidrólisis de celobiosa y celotriosa (Yoshida *et al.*, 2010).

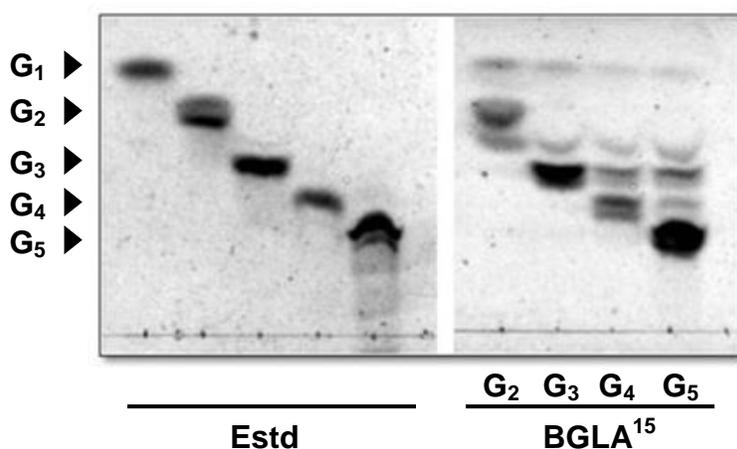


Figura 12. Hidrólisis de celo-oligosacáridos con BGLA¹⁵. G₁, glucosa; G₂, celobiosa; G₃, celotriosa; G₄, celotetraosa; G₅, celopentaosa.

En la unidad catalítica de la β -glucosidasa tetramérica de *Kluyveromyces marxianus* existe un lazo que obstruye el sitio catalítico de la proteína y corresponde a los residuos de amino ácidos 503 al 512 (Yoshida *et al.*, 2010), este es un impedimento estérico que limita la interacción de la enzima con sustratos de mayor tamaño molecular. Por lo tanto, es posible que el sitio activo de BGLA¹⁵,

sea obstruido de manera similar, pero en un menor grado, permitiéndole hidrolizar sustratos de 2 hasta 5 GP

6.2.2 Inhibición de BGLA¹⁵

La glucosa ha sido reportada como un inhibidor de la β -glucosidasa, por lo que se llevaron a cabo ensayos de inhibición *in vitro* con la proteína recombinante BGLA¹⁵ y como control se empleó la proteína oligomérica BGLA de *C. flavigena* PN-120, ambas parcialmente purificadas. Se ensayaron concentraciones hasta de 500 mM de glucosa. BGLA perdió un poco más del 67 % de su actividad a 10 mM de glucosa, (Fig 13) lo que equivale a 3.0 veces menos actividad que la mostrada por BGLA¹⁵. Cuando BGLA fue sometida a 180 mM de glucosa conservó sólo el 1 % de su actividad, mientras que la β -glucosidasa recombinante retuvo 65 %. Incluso a la concentración de glucosa más alta ensayada (500 mM), BGLA¹⁵ conservó el 35 % de su actividad, mientras que BGLA no mostró actividad alguna. El efecto inhibitorio de la glucosa observado en este trabajo sobre BGLA es similar al reportado por Acosta-Quijano (1993), sobre la misma enzima oligomérica de *C. flavigena* PN-120.

Un comportamiento similar al observado al comparar la resistencia a inhibición por glucosa de la β -glucosidasa nativa (BGLA) con su recombinante (BGLA¹⁵) a 10 mM se reportó con la β -glucosidasa de *Humicola grisea* (BGL4) expresada de forma heteróloga en *S. cerevisiae*, la cual denominaron BGL4^{sc}. BGL4^{sc} conservó prácticamente la totalidad de su actividad a 5 mM de glucosa, mientras que BGL4,

su forma nativa, redujo su actividad en un 50 % en las mismas condiciones (Benoliel *et al.*, 2010). Por otro lado, la proteína BGLA¹⁵ fue 2.4 veces más tolerante a 100 mM de glucosa que la β -glucosidasa de *Candida molishiana* expresada por *S. cerevisiae* YCB3s (Sánchez-Torres *et al.*, 1998). Además BGLA¹⁵ conservó 30 % de su actividad a 100 mM de glucosa al igual que la β -glucosidasa de la recombinante de *S. cerevisiae* que expresaba la proteína BGLII de *Saccharomycopsis fibuligera*, misma que se ha reportado como la recombinante con mayor resistencia a inhibición por glucosa (Van Rooyen *et al.*, 2005).

A pesar que BGLA¹⁵ presentó menor actividad comparada con otras β -glucosidasas también expresadas por recombinantes de *S. cerevisiae*, su alta resistencia a inhibición por glucosa es una de sus características más importantes.

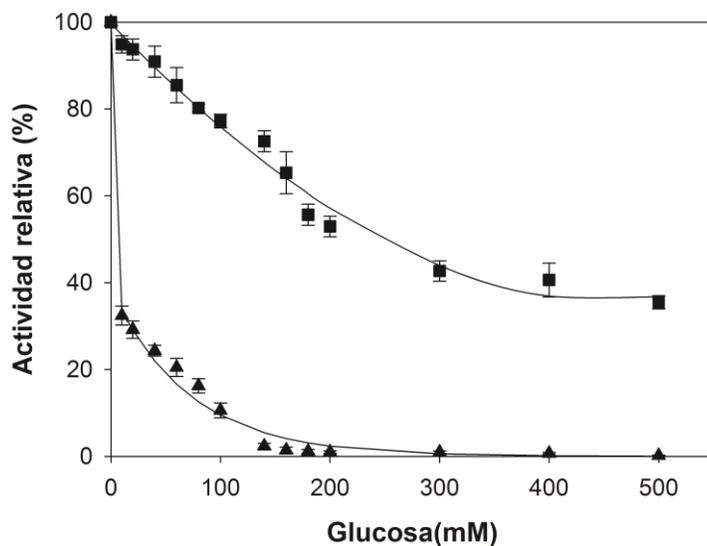


Figura 13. Efecto de la glucosa sobre la actividad β -glucosidasa. BGLA¹⁵ (■); BGLA (▲). La línea sólida representa un ajuste polinomial de segundo grado.

La resistencia a inhibición por glucosa de la recombinante BGLA¹⁵, podría estar relacionado a un lazo proteico, ampliamente estudiado en las β -glucosidasas KMBGLI, BGL3B y EXO de *Kluyveromyces marxianus* (Yoshida *et al.*, 2010), *Thermotoga neapolitana* (Pozzo *et al.*, 2010) y *Hordeum vulgare* (Hrmova *et al.*, 2005; Hrmova & Fincher, 2007), respectivamente. Este lazo proteico de tipo hélice, actúa como una bisagra que permite que el sitio activo, formado por los dominios N-terminal $[(\beta/\alpha)_6]$ y C-terminal $[(\alpha/\beta)_8\text{-sandwich}]$, puedan moverse uno sobre otro durante eventos catalíticos sucesivos.

Yoshida *et al.*, (2010) observaron que en KMBGLI el movimiento del sitio activo, provocado por la bisagra proteica antes mencionada se veía mermado cuando la enzima se encontraba en su forma tetrámerica. Es decir, las subunidades de la estructura oligomérica comprimen a la unidad catalítica, por lo tanto, el movimiento de los dominios que conforman el sitio activo se ve comprometido. Esta situación empeora cuando en altas concentraciones de glucosa, el sitio de unión a carbohidrato de las subunidades es ocupado, comprimiendo aún más la unidad catalítica.

Lo anterior podría explicar porque BGLA¹⁵ resiste concentraciones de glucosa mayores que su forma oligomérica (BGLA). Adicionalmente se evaluó el tipo de inhibición ejercido por la glucosa en BGLA¹⁵, para ésto se ensayaron concentraciones de 160, 200 y 500 mM de glucosa a diferentes concentraciones de sustrato. Mediante el gráfico de linewaver-Burke (Fig 14), se observó que la glucosa ejerce una inhibición del tipo competitivo, característico en las β -glucosidasas (Lynd *et al.*, 2002).

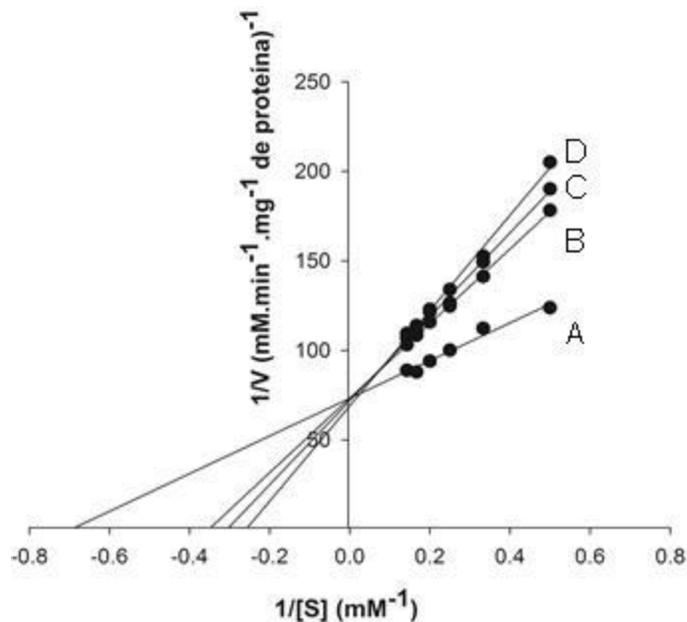


Figura 14. Inhibición de BGLA¹⁵ por glucosa. A) Control; B) 160 mM; C) 200 mM; D) 500 mM

Por otro lado, la proteína recombinante BGLA¹⁵, tuvo la misma afinidad por pNPG que BGLA en condiciones no inhibitorias. Incluso, a 160 mM de glucosa, la proteína recombinante mantuvo la misma afinidad que la β -glucosidasa de *C. flavigena* silvestre (CDBB 531). La cepa CDBB 531 fue tratada con NTG para obtener la cepa de *C. flavigena* PN-120 (Ponce-Noyola & de la Torre, 2001), producto de está mutacion, *C. flavigena* PN-120 produce una β -glucosidasa (BGLA) con mayor afinidad a sustrato (Barrera *et al.*, 2007). Lo anterior se debe a que producto de la mutación, BGLA cuenta con dos aminoácidos extra del tipo aspártico en el dominio N-terminal de la unidad catalítica, es por ello que BGLA¹⁵ comparte la misma afinidad por pNPG que BGLA aun cuando sólo sea la unidad catalítica (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación de la constante de afinidad de la β -glucosidasa.

Microorganismo	Glucosa (mM)	K_m (mM)	Fuente
<i>C. flavigena</i> CDBB 531	0	2.6	Acosta-Quijano, 1993
<i>C. flavigena</i> PN-120	0	1.3	Acosta-Quijano, 1993
<i>S. cerevisiae</i> PM-15	0	1.44	Este trabajo
	160	2.84	
	200	3.26	
	500	3.85	

Posteriormente se calculó la constante de inhibición (K_i) de la β -glucosidasa por glucosa en las condiciones mencionadas anteriormente (Fig 15). BGLA¹⁵ mostró una K_i de 163 mM, 2.3 veces mayor que los 70 mM de la β -glucosidasa recombinante de *Humicola grisea* (Benoliel *et al.*, 2010). En este aspecto, se tiene registrado que las K_i de β -glucosidasas de microorganismos recombinantes o no, oscilan de entre 0.3 mM hasta 100 mM (Karnchanatat *et al.*, 2007; Benoliel *et al.*, 2010), inclusive algunas β -glucosidasas de hongos y bacterias con alta tolerancia a glucosa mantienen valores de K_i por arriba de los 200 mM (Pei *et al.*, 2012). Entre mayor es K_i , más débil será la interacción enzima-inhibidor.

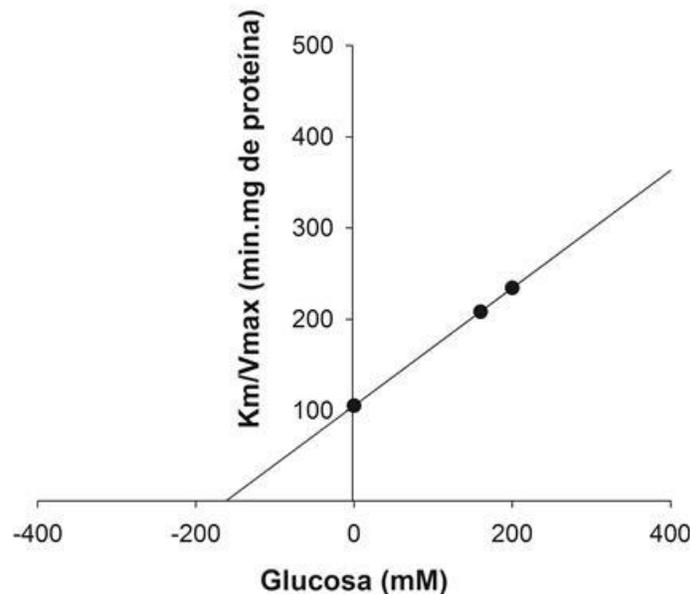


Figura 15. Constante de inhibición de BGLA¹⁵ por glucosa.

Uno de los propósitos de obtener una cepa recombinante de *S. cerevisiae*, fue poder producir etanol en sustratos ricos en celobiosa y otros celo-oligosacáridos. Para lograrlo, era necesario que la proteína BGLA¹⁵, fuera capaz de conservar su capacidad catalítica a altas concentraciones de etanol. Para evaluar el efecto del etanol sobre la enzima recombinante, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de actividad de β -glucosidasa tanto de la proteína recombinante como la proteína BGLA de *C. flavigena* PN-120, a concentraciones de 0 a 100 g/L de etanol.

La enzima oligomérica BGLA, conservó alrededor del 50 % de su actividad a 70 g/L de etanol, mientras BGLA¹⁵ mantuvo más del 80 % (Fig 16). La enzima BGLA¹⁵ conservó el 72 % de su actividad en 100 g/L de etanol, mientras que BGLA, sólo alrededor del 30 %. Por otro lado, dentro de los intervalos de

concentracion ensayadas, la actividad β -glucosidasa disminuyó de forma lineal conforme aumentaba la concentración de etanol. Esto se explica, porque entre mayor es la concentración del solvente mayor el desplazamiento de agua en el escudo de hidratación de la proteína, modificando la interacción molecular que mantiene la conformación nativa de la enzima disminuyendo de forma lineal la actividad enzimática. (Yamane *et al.*, 1988; Halling, 1990; Jana & Bandyopadhyay, 2012). Zacks & Klibanov, (1988), encontraron que la actividad catalítica de diferentes tipos de enzimas, suspendidas en varios solventes orgánicos, fue influenciada sólo por la cantidad de agua retenida por la enzima y no por la naturaleza del solvente.

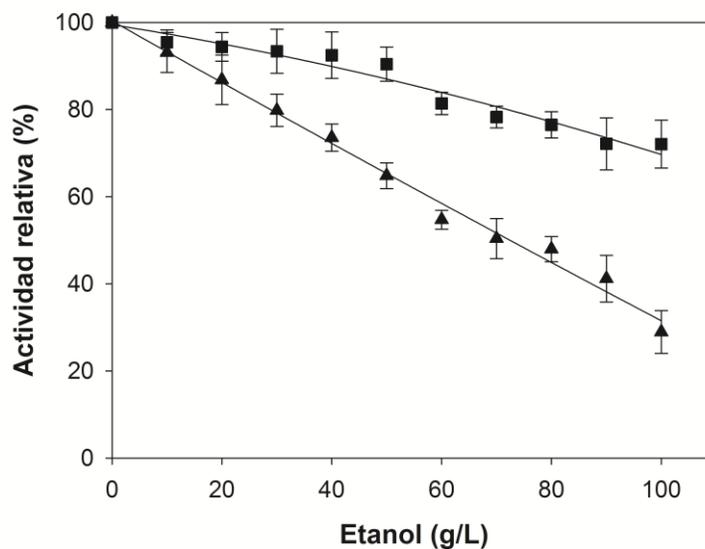


Figura 16. Efecto del etanol sobre la actividad β -glucosidasa. BGLA¹⁵ (■); BGLA (▲). La línea sólida representa un ajuste polinomial de segundo grado.

6.2.3 Estructura 3D de BGLA¹⁵

Para comprobar que la flexibilidad de BGLA¹⁵ por sustratos de 3 a 5 GP pueda deberse a la existencia de un sitio catalítico más profundo que aquellas β -glucosidasas con afinidad a sustratos pequeños, se procedió a modelar la estructura 3D de BGLA¹⁵ y compararla con otras similares. La estructura 3D de BGLA¹⁵ se alineó con la estructura completa de BGL3B, reportada como una β -glucosidasa flexible capaz de hidrolizar por lo menos sustratos de 3 GP (Pozzo *et al.*, 2010) y la de KMBGLI, una β -glucosidasa poco flexible, capaz de hidrolizar sólo celobiosa (Yoshida *et al.*, 2010). Los residuos catalíticos de BGLA¹⁵ (Asp²⁴¹ y Glu⁴⁹⁹) se alinearon perfectamente con los de BGL3B (Asp²⁴³ y Glu⁴⁵⁸) y los de KMBGLI (Asp²²⁵ y Glu⁵⁹⁰). En la figura 17D-F, se puede observar un lazo proteico que actúa como impedimento estérico en el acomodamiento del sustrato con el sitio activo (D1-F1). Este lazo proteico se encuentra en las secuencias de aminoácidos (421-499) de BGLA¹⁵, (548-579) de BGL3B y (500-515) de KMBGLI. En BGLA¹⁵ el lazo proteico se encuentra a 18.0 Å y 12.3 Å del nucleófilo (Asp) y el donador de protones (Glu), respectivamente ($1\text{Å} = 1 \times 10^{-10} \text{ m} = 0.1 \text{ nm}$). En la enzima KMBGLI, las distancias están más reducidas, 12.8 Å y 6.9 Å, en el mismo orden, denotando la cercanía del lazo proteico con el sitio activo y en BGL3B se encuentra a 23.7 Å y 11.9 Å con respecto al nucleófilo y el donador de protones, respectivamente.

Por medio de esta simulación en 3D, se puede observar que al igual que BGL3B, BGLA¹⁵ presenta un sitio activo lo suficientemente profundo para hidrolizar celobiosa y celotriosa con facilidad. Lo anterior se sustenta en que la profundidad del sitio activo puede estimarse midiendo la distancia del lazo proteico con los residuos del sitio activo. Entre más cercano el lazo proteico de los residuos catalíticos, menor profundidad del sitio activo (Kawabata & Go, 2007).

Yoshida *et al.*, (2010) crearon la mutante KMBGLI Δ (503-512) de KMBGLI, de la cual cortaron parte del lazo proteico que actúa como impedimento estérico, secuencia de aminoácidos (503-512). La mutante KMBGLI Δ (503-512) fue capaz de hidrolizar sustratos de hasta 4 GP. En ese mismo trabajo, al alinear la estructura de BGL3B y KMBGLI, se concluyó que estas β -glucosidasas son filogenéticamente muy similares, afirmación en la que se puede incluir a BGLA¹⁵.

Con base en lo anterior, KMBGLI además de contar con los dominios amino terminal, carboxilo terminal y fibronectina del tipo III, como en el caso de BGLA3B y BGLA¹⁵, cuenta con un dominio adicional, el dominio PA14 (Fig 17 A, B y C). En el caso de KMBGLI, el lazo proteico que actúa como impedimento estérico en el acomodamiento de sustratos mayores a 2 GP, se encuentra en el dominio PA14. Por otro lado, en la figura 17 D, E y F, se puede observar la bisagra proteica (D2, E2 y F2) involucrada en la resistencia a inhibición por glucosa, responsable del movimiento de los dominios que componen el sitio catalítico.

Se sabe que la hidrólisis de retención, característica de las glicosilhidrolasas de la familia 3 (GH3), se basa en la distancia que existe entre los residuos del sitio

activo, ésta oscila entre 4.8 Å a 6.5 Å (McCarter & Withers, 1994). En la figura 171 se observa que la distancia estimada entre el nucleófilo y el donador de protones de BGLA¹⁵ es de 5.8 Å, confirmando ser una GH3 al igual que BGL3B y KMBGLI.

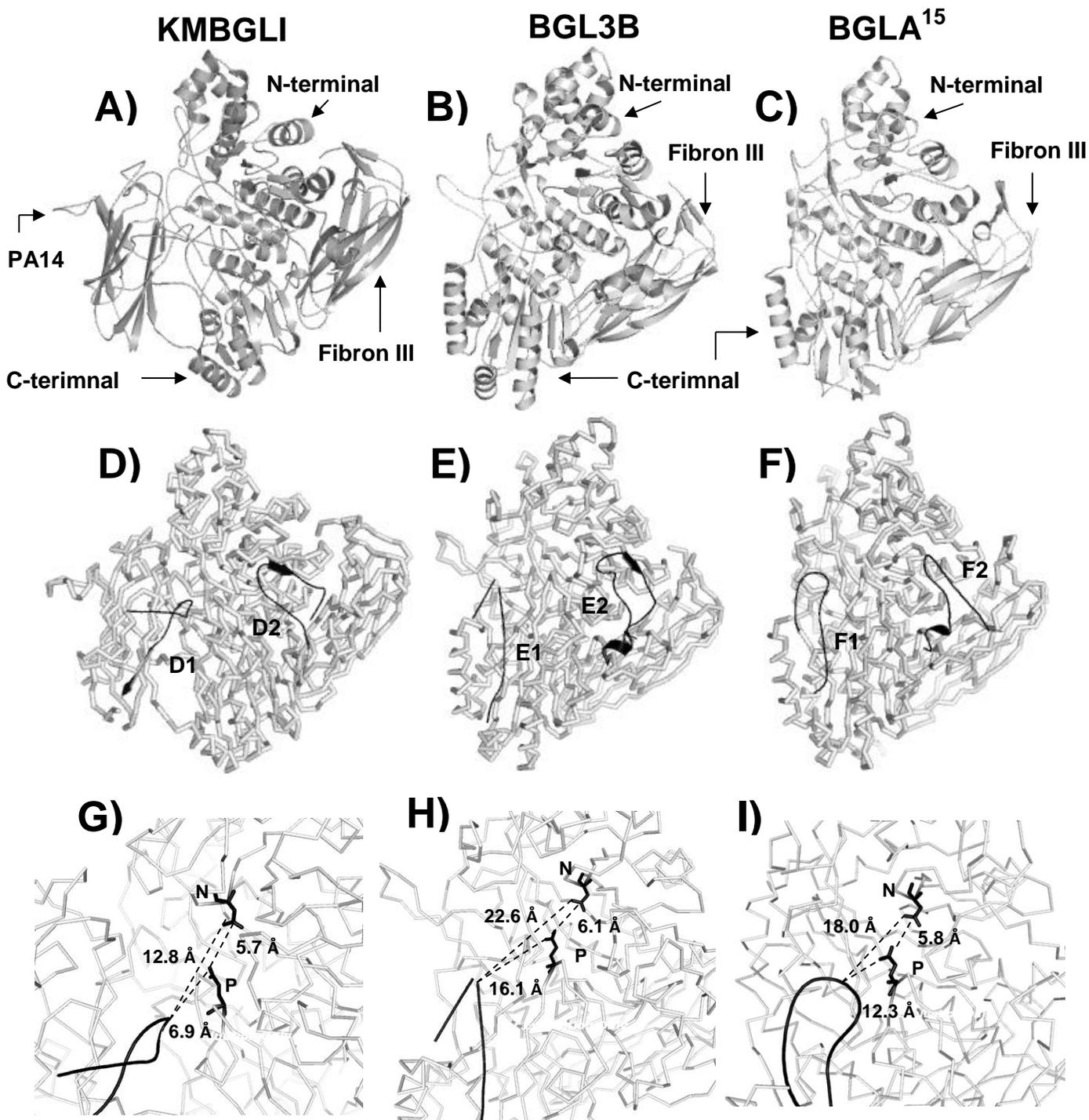


Figura 17. Estructura de las β -glucosidasas KMBGLI, BGL3B y BGLA¹⁵. (A, D, G) KMBGLI. (B, E, H) BGL3B. (C, F, I) BGLA¹⁵. (D1, E1, F1) lazo proteico que obstruye el sitio activo. (D2, E2, F2) lazo proteico que actúa como bisagra. N) Nucleófilo, ácido aspártico; P) Donador de protones, ácido glutámico; Fibron III) fibronectina tipo III. Líneas punteadas representan la distancia entre los residuos del sitio activo y el lazo proteico de obstrucción, dado en Angstroms.

6.3 Crecimiento de *S. cerevisiae* PM-15

6.3.1 Hidrolizados de bagazo de caña

Con el propósito de evaluar la capacidad de *S. cerevisiae* PM-15 de crecer en hidrolizados de bagazo de caña ricos en celobiosa y celo-oligosacáridos (equivalente a 17.2 g/L de azúcares reductores totales), se cultivó a la levadura en un medio a base de extracto de levadura, bacto-peptona e hidrolizado de bagazo de caña (Tabla 4).

En condiciones aerobias la levadura recombinante después de 12 h consumió la glucosa inicial (1.17 g/L) y se produjeron 0.216 g/L de biomasa. Posteriormente los azúcares reductores totales permanecieron constantes (Fig 18), pero la biomasa siguió incrementándose hasta alcanzar 0.724 g/L. Es probable que la levadura creciera a expensas de los aminoácidos presentes en la peptona suplementada en el medio de cultivo, ya que la celobiosa y la celotriosa no fueron consumidas, sin embargo no se monitoreó el consumo de aminoácidos. Se ha reportado que en ausencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables, los aminoácidos son una fuente alterna de energía. Heyland y Blank, (2009) y Hosthersall y Ahmed, (2013) demostraron que el transporte y oxidación de aminoácidos, vía el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), juega un papel importante en la supervivencia y crecimiento de las levaduras en ausencia de glucosa como fuente de carbono. A través del TCA los aminoácidos se transforman a oxaloacetato, posteriormente el

oxaloacetato es transformado a glucosa por medio de la gluconeogénesis (Hicks, 2001; Soontorngun *et al.*, 2007). Finalmente la levadura esporuló (Fig 19).

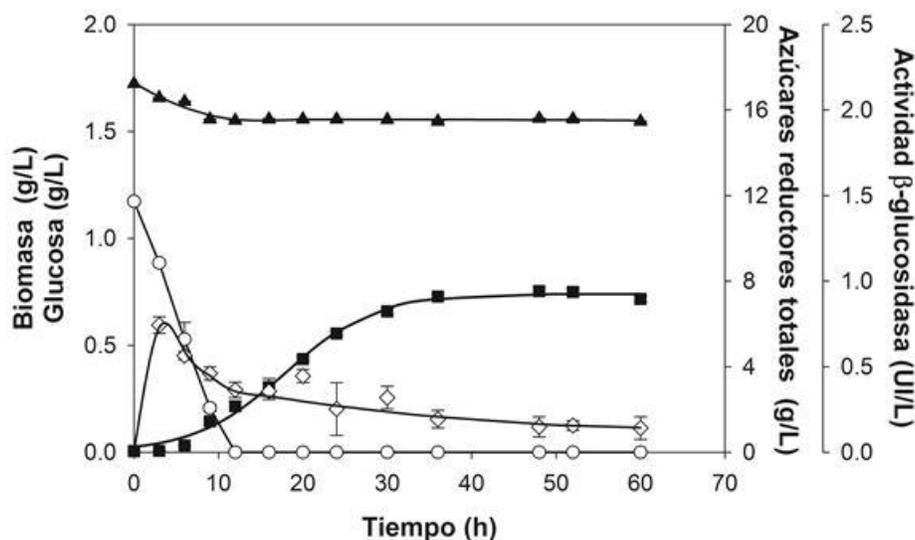


Figura 18. Crecimiento aerobio de *S. cerevisiae* PM-15 en hidrolizados de bagazo de caña. Biomasa (■); Azúcares reductores totales (▲); Glucosa (○); Actividad β-glucosidasa (◇). La actividad enzimática fue evaluada empleando pNPG como sustrato.

La máxima actividad de la β-glucosidasa de *S. cerevisiae* PM-15 se alcanzó a las 3 h de cultivo (0.74 UI/L), y disminuyó a un 80 % a las 36 h, sin que la celobiosa y la celotriosa fueran hidrolizadas. Cabe señalar que la temperatura y pH óptimos de BGLA¹⁵ es 40 °C y 6.2 respectivamente, por lo que los ensayos de actividad enzimática se hicieron bajo estas condiciones *in vitro*, aun cuando la fermentación se realizó a 30 °C y pH entre 5 y 5.5. En el caso de BGLA, que tiene el mismo pH y temperatura óptima que BGLA¹⁵, Barrera *et al.*, (2007) observaron que a 30 °C la actividad sobre celobiosa disminuyó 62 %. Además, en el presente trabajo la

actividad de BGLA¹⁵ se midió utilizando pNPG como sustrato y de acuerdo con Barrera *et al.*, (2007), la β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120 muestra 10 veces mayor actividad en pNPG como sustrato, comparada con la actividad en celobiosa bajo condiciones óptimas de temperatura. Esta diferencia en la actividad se puede deber a que en el caso de la celobiosa, la segunda molécula de glucosa cambia la conformación del sitio activo de la β -glucosidasa y ésto no pasa con el residuo de para-nitrofenol del pNPG (Singhania *et al.*, 2013). Por lo tanto, la actividad de la enzima fue sobreevaluada y además es probable que en el hidrolizado existan compuestos que la inhiben.

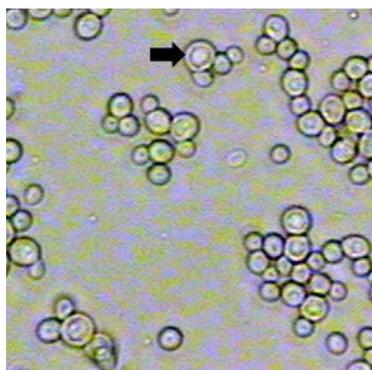


Figura 19. Formación de esporas por *S. cerevisiae* PM-15 en la fermentación aerobia de hidrolizados de bagazo de caña. La flecha señala la espora.

Con base en la poca capacidad de BGLA¹⁵ para hidrolizar la celobiosa y celotriosa presentes en los hidrolizados de bagazo de caña en condiciones aerobias, se decidió reducir los azúcares reductores totales a 10 g/L (Tabla 4). Bajo estas

condiciones de cultivo *S. cerevisiae* PM-15 produjo 0.23 g/L de biomasa, además los 0.37 g/L de glucosa presentes en el medio de cultivo se consumieron en las primeras 12 h. Cuando el metabolismo de *S. cerevisiae* es fermentativo, el ATP es consumido a la misma velocidad que es producido en la glucólisis (Guimarães & Londesborough, 2007). Por lo tanto, al aumentar el estrés celular por falta de nutrientes, se estaría reduciendo la actividad de todos los ciclos metabólicos, limitando la producción de ATP, provocando que se utilice eficientemente para la producción de las macromoléculas involucradas en la formación de esporas (Ray & Ye, 2013).

Por otro lado, a las 12 h de cultivo, la actividad de β -glucosidasa fue 0.96 UI/L y después de 24 h disminuyó un 60 %. Al igual que en condiciones aerobias, la actividad enzimática se vio inhibida, aunque no en el mismo porcentaje. Este resultado sugiere que en el hidrolizado pueden existir inhibidores de la enzima, ya que al utilizar menor concentración de hidrolizado, la inhibición disminuyó. Al igual que en condiciones aerobias, la celobiosa y la celotriosa no fueron utilizadas (Fig 20), por lo tanto la levadura esporuló.

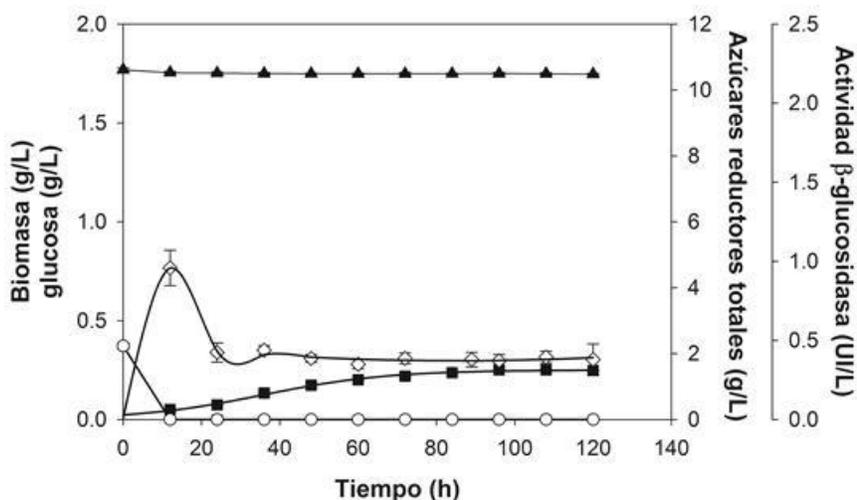


Figura 20. Crecimiento anaerobio de *S. cerevisiae* PM-15 en hidrolizados de bagazo de caña. Biomasa (■); Azúcares reductores totales (▲); Glucosa (○); Actividad β-glucosidasa (◇). La actividad enzimática fue evaluada empleando pNPG como sustrato.

Se sabe que un gran número de compuestos fenólicos se forman durante la hidrólisis y el pretratamiento de la lignocelulosa (Martín *et al.*, 2002; Chandel *et al.*, 2007). Ximenes *et al.*, (2011) ensayaron el efecto *in vitro* de 0.26 g/L de distintos compuestos fenólicos en la β-glucosidasa de *T. reesei* y observaron que el ácido gálico, tánico, ferúlico y cumárico de manera individual redujeron la actividad en 90, 75, 40 y 85 %, respectivamente, después de 24 h de incubación. Por lo que era factible que BGLA¹⁵ fuera inhibida por los compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado de bagazo de caña. Para contestar esta pregunta la enzima BGLA¹⁵ se incubó durante 24 h con diferentes concentraciones de compuestos fenólicos (0.05 a 0.55 g/L) provenientes del hidrolizado enzimático del bagazo de caña. Se observó que conforme aumentó la concentración de los compuestos fenólicos la

actividad de BGLA¹⁵ disminuyó. A 0.05 g/L se redujo la actividad enzimática de BGLA¹⁵ en 49 %. Cuando la concentración de compuestos fenólicos *in vitro* fue igual a la determinada en los reactores anaerobios (0.18 g/L), la actividad *in vitro* de BGLA¹⁵ se vio reducida en 60 % (Fig 21) y con 0.35 g/L, la actividad se redujo en 78 %, similar al 80 % observado en los cultivos aerobios a 0.36 g/L de compuestos fenolicos.

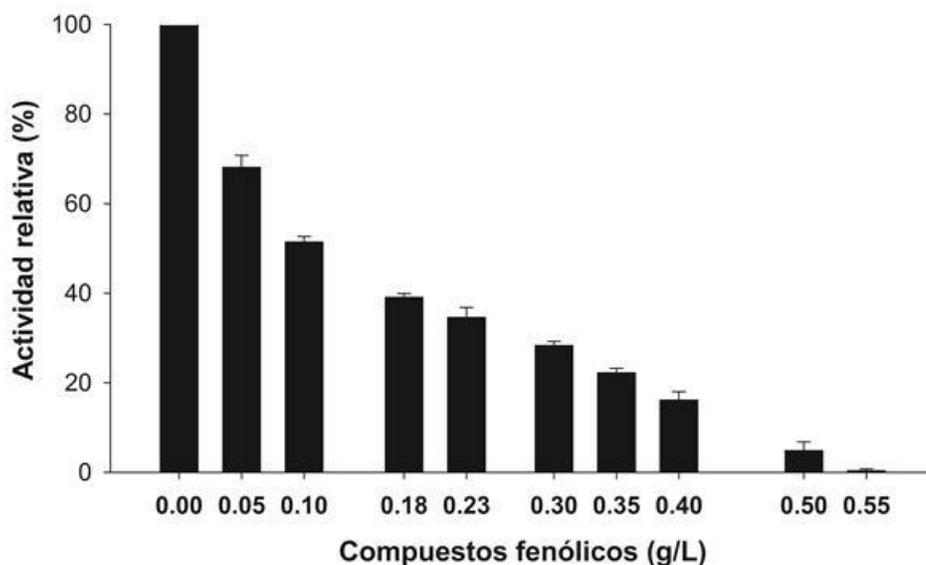


Figura 21. Efecto de los compuestos fenólicos sobre la actividad de BGLA¹⁵. El 100 % de actividad corresponde a 2.0 UI/L, sobre pNPG.

Los resultados anteriores demuestran que existen compuestos en el hidrolizado de bagazo de caña que disminuyen la actividad de la enzima BGLA¹⁵.

6.3.2 Medios sintéticos

Para comprobar si *S. cerevisiae* PM-15 podía crecer en cultivos ricos en celobiosa, se cultivó en un medio sintético, que contenía 20 g/L de celobiosa como fuente principal de carbono y 0.5 g/L de glucosa como inductor de BGLA¹⁵. La cinética de crecimiento se muestra en la Fig. 22, en donde se observa que PM-15 fue capaz de asimilar la celobiosa, alcanzando una μ_{\max} de 0.14 h⁻¹. Además, la actividad extracelular de BGLA¹⁵ que fue de 1.9 UI/L estuvo asociada al crecimiento, tal y como se esperaba porque su expresión está regulada por el promotor constitutivo PGK1, el cual controla la expresión de la proteína fosfoglicerato quinasa que es requerida en altos niveles por las levaduras con el fin de utilizar la glucosa como fuente de energía (Graham & Chambers, 1997).

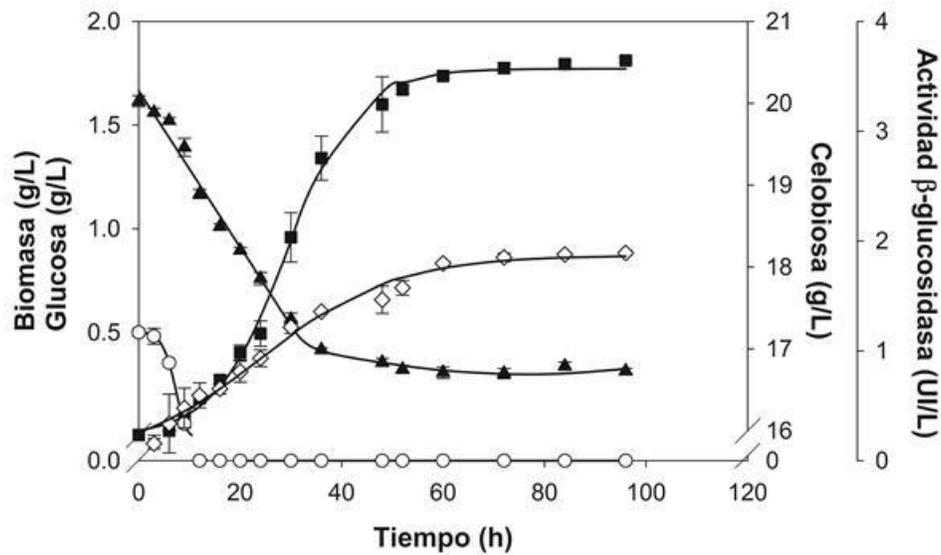


Figura 22. Crecimiento aerobio de *S. cerevisiae* PM-15 en medio sintético. Biomasa (■); Celobiosita (▲); Glucosa (○); Actividad β-glucosidasa (◇). La actividad enzimática fue evaluada empleando pNPG como sustrato.

Por otra parte, se logró detectar por medio de HPLC la presencia de etanol, sin embargo, debido a la incertidumbre de los resultados, no fue posible determinar con exactitud la concentración. En condiciones aerobias, las levaduras pueden producir etanol, a este fenómeno se le demonima efecto Crabtree (Barnett & Entian, 2005). La concentración mínima de glucosa para que se presente este metabolismo respiro-fermentativo depende de la especie, en *S. cerevisiae* se a reportado que se presenta a concentraciones de glucosa mayores a 0.8 mM (Verduyn *et al.*, 1984; Otterstedt *et al.*, 2004). En estos experimentos se utilizó 2.7 mM de glucosa como inductor, por lo que efecto Crabtree se presentó.

Al igual que en los cultivos donde se emplearon hidrolizados de bagazo de caña, *S. cerevisiae* PM-15 formó esporas. Sin embargo, en este caso no se observó una disminución en la actividad β -glucosidasa de BGLA¹⁵.

La cinética de la fermentación, en el mismo medio de cultivo (Fig. 23), muestra que al igual que en las condiciones aerobias, la levadura tuvo la capacidad de hidrolizar la celobiosa alcanzando una $\mu_{\max} = 0.10 \text{ h}^{-1}$ con un total de 0.81 g/L de biomasa, sin embargo después de 36 h la levadura esporuló, asimismo la actividad de la enzima BGLA¹⁵ estuvo asociada al crecimiento, alcanzando un máximo de 1.3 UI/L, también se detectó etanol, con la misma salvedad indicada en las condiciones aerobias.

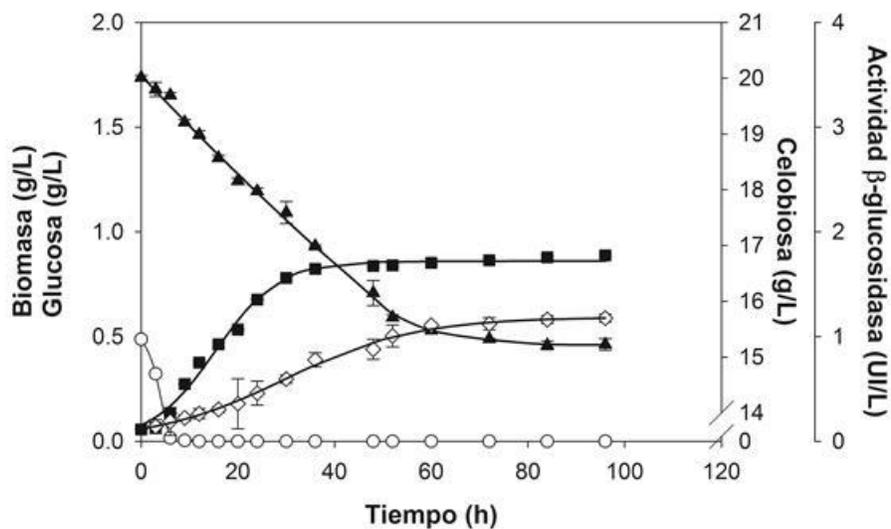


Figura 23. Crecimiento anaerobio de *S. cerevisiae* PM-15 en medio sintético. Biomasa (■); Celobiosa (▲); Glucosa (○); Actividad β -glucosidasa (◇). La actividad enzimática fue evaluada empleando pNPG como sustrato.

Por otro lado, la biomasa producida por *S. cerevisiae* PM-15 en condiciones aerobias es similar a los obtenidos por Van Rooyen *et al.*, (2005) con las cepa recombinante de *S. cerevisiae* Y294 [SFI], la cual expresa extracelularmente la β -glucosidasa dimérica de *S. fibuligera*. Inclusive aun cuando PM-15 sólo expresa extracelularmente la unidad catalítica de la β -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120 es capaz de competir con las cepas Y294 [SFI(A)] y Y294 [SFI(C)] que expresan de manera intermembranal, la misma β -glucosidasa de la cepa Y294 [SFI] (Tabla 9). No obstante, los resultados obtenidos demuestran que *S. cerevisiae* PM-15 es capaz de crecer en celobiosa. Es importante optimizar tanto el medio como las condiciones de cultivo para evitar incertidumbres en la producción de etanol así como realizar investigaciones para lograr que la cepa produzca etanol en los hidrolizados de bagazo de caña.

Tabla 9. Crecimiento en cultivo por lote de recombinantes de *S. cerevisiae* en celobiosa

Recombinantes	μ_{\max} (h ⁻¹)	Biomasa (g/L)	Etanol (g/L)
Aerobio			
Y294-[SFI]	0.23	1.83	1.14
Y294-[SFI(A)]	0.20	2.75	0.41
Y294-[SFI(C)]	0.20	2.83	0.56
EB1	0.04	NE	ND
PM-15	0.14	1.79	NE
Anaerobio			
Y294-[SFI]	0.18	0.62	2.12
Y294-[SFI(A)]	0.10	0.67	2.17
Y294-[SFI(C)]	0.11	0.73	2.02
EB1	0.03	NE	1.5
PM-15	0.10	0.81	NE
Recombinantes	Genotipo	Referencia	
Y294-[SFI]	URA3 PGK1 _p -xyn2s-BGLI-PGK1 _T	(van Rooyen et al., 2005)	
Y294-[SFI(A)]	URA3 PGK1 _p -xyn2s-BGLI-AG α 1-PGK1 _T	(van Rooyen et al., 2005)	
Y294-[SFI(C)]	URA3 PGK1 _p -xyn2s-BGLI-cwp2-PGK1 _T	(van Rooyen et al., 2005)	
EB1	PGK1 _p - α fBGLI-PGK1 _T	(Zhong-Peng et al., 2011)	
PM-15	URA3 PGK1 _p -ss-bglA-PGK1 _T	Este trabajo	

NE= no estimable; ND = No detectado

VII CONCLUSIONES

Se obtuvo una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*, que secreta tanto en el periplasma como al medio de cultivo y de manera funcional, la unidad catalítica de la β -glucosidasa de *Cellulomonas flavigena* PN-120. Esta recombinante fue denominada *S. cerevisiae* PM-15.

La enzima recombinante BGLA¹⁵ expresada por la cepa *S. cerevisiae* PM-15 tiene la capacidad de hidrolizar sustratos de 2 hasta 5 unidades de glucosa.

La enzima recombinante BGLA¹⁵ es inhibida competitivamente a concentraciones de entre 10 y 500 mM de glucosa, mientras que el etanol inactiva a la enzima, siendo la inactivación una función lineal de la concentración de etanol.

S. cerevisiae PM-15 crece e hidroliza a la celobiosa.

En los hidrolizados de bagazo de caña se encuentran compuestos fenólicos que inhiben la actividad de la enzima BGLA¹⁵, impidiendo el desarrollo de *S. cerevisiae* PM-15

VIII RECOMENDACIONES

Es necesario detoxificar los hidrolizados de bagazo de caña para evaluar el verdadero potencial de *S. cerevisiae* PM-15 de crecer y producir etanol de segunda generación a partir de éstos.

IX BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Quijano, M. 1993. Purificación y caracterización parcial de la β -glucosidasa de *Cellulomonas flavigena*, cepa silvestre y PN-120. Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F

Ahmed, FE. 2001. Toxicology and human health effects following exposure to oxygenated or reformulated gasoline. *Toxicol Lett* 123: 89-113.

Aho, S and Paloheimo, M. 1990. The conserved terminal region of *Trichoderma reesei* cellulases forms a strong antigenic epitope for polyclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1087:137-141.

Bailey, MJ, Siika-aho M, Valkeajärvi A, Penttilä ME. 1993. Hydrolytic properties of two cellulases of *Trichoderma reesei* expressed in yeast. *Biotechnol Appl. Biochem* 17:65-76.

Barnett JA and Entian KD. 2005. A history of research on yeast 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast* 22: 835-894

Barrera-Islas GA, Ramos AC, Salgado ML, Ponce-Noyola T. 2007. Characterization of a β -glucosidase produced by a high-specific growth-rate mutant of *Cellulomonas flavigena*. *Curr Microbiol* 54: 266-270

Barros S and Fay M. 2013. Brazil: Biofuels annual report. USDA report number: BR13005

Béguin, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu Rev Microbiol* 44: 219–248.

Béguin, P and Lemaire M. 1996. The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31: 201–236.

Benoliel B, Poças-Fonseca MJ, Gonçalves Torres FA, Pepe de Moraes LM. 2010. Expression of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol* 160: 2036–2044

Bhatia L, Johri S, Ahmad R. 2012. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: *AMB Express* 2: 65-84

Blainski A, Lopes GC, Palazzo de Mello JC. 2013. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 18: 6852-6865.

- Brestic-Goachet, N, Gunasekaran P, Cami B, Baratti JC. 1989. Transfer and expression of an *Erwinia chrysanthemi* cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. J Gen Microbiol 135: 893-902.
- Cantwell, B, Brazil G, Murphy N, McConnell DJ. 1986. Comparison of expression of the endo- β -1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus subtilis* in *Saccharomyces cerevisiae* from the *CYC1* and *ADH1* promoters. Curr Genet 11: 65-70.
- Chandel, AK, Kapoor, RK, Singh, A, Kuhad, RC. 2007. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technol* 98: 1947–1950
- Cho, KM and Yoo YJ. 1999. Novel SSF process for ethanol production from microcrystalline cellulose using the Δ -integrated recombinant yeast, *Saccharomyces cerevisiae* L2612 Δ GC. J Microbiol Biotechnol 9: 340-345.
- Cho, KM, Yoo YJ, Kang HS. 1999. Δ -Integration of endo/exo-glucanase and β -glucosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol. Enz Microb Technol 25: 23-30.
- Chow, CM, Yague E, Raguz S, Wood DA, Thurston CF. 1994. The *cel3* gene of *Agaricus bisporus* codes for a modular cellulase and is transcriptionally regulated by the carbon source. Appl Environ Microbiol 60: 2779–2785.
- Clarke, AJ. 1997. Families of β -glycosidases: classification of cellulolytic and xylanolytic enzymes. In: Biodegradation of cellulose: Enzymology and biotechnology (Clarke, A.J. Ed.), pp 191-199. Technomic Publishing Company, Inc., Basel.
- Curry, C, Gilkes N, O'Neill G, Miller RC Jr, Skipper N. 1988. Expression and secretion of a *Cellulomonas fimi* exoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol 54: 476-484.
- Davies GJ and Henrissat B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Structure 3: 853-859.
- De Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L. 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. FEMS Microbiol Rev 29: 795-811.
- Den Hann R, McBride JE, La Grange DC, Lynd LR, Van Zyl W. 2007. Functional expression of cellobiohydrolases in *Saccharomyces cerevisiae* towards one-step conversion of cellulose to ethanol. Enzyme Microb Tech 40: 1291-1299.
- Demolder J, de Backer M, Fiers W, Contreras R. 1993. Phenotypic effects in *Saccharomyces cerevisiae* after regulated expression of β -(1,3)-glucanase from *Nicotiana plumbaginifolia*. J Biotechnol 27: 295-305.
- Deshpande V, Raman HS, Rao M. 1983. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol using *Penicillium funiculosum* cellulase and free or immobilized *Saccharomyces uvarum* cells. Biotechnol Bioeng 25: 1679-1684.

Doi RH and Kosugi A. 2004. Cellulosomes: Plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nat Rev* 2: 541-551.

Fan LT, Lee YH, Beardmore DH. 1980. Major chemical and physical features of cellulose materials as substrates for enzymatic hydrolysis. *Adv Biochem Eng* 14: 101–117.

Fowler T and Brown RD Jr. 1992. The *bgl1* gene encoding extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex. *Mol Microbiol* 6: 3225–3235.

Freer SN. 1985. Purification and characterization of the extracellular β -glucosidase produced by *Candida wickerhamii*. *Arch Biochem Biophys* 243: 515-22.

Fujita Y, Takahashi S, Ueda M, Tanaka A, Okada H, Morikawa H, Kawaguchi T, Arai M, Fukuda H, Kondo A. 2002. Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol* 68: 5136-5141.

Gabelsberger J, Liebl W, Schleifer KH. 1993. Cloning and characterization of galactoside and-glucoside hydrolyzing enzymes of *Thermotoga maritime* FEMS *Microbiol Lett* 109: 131–137.

Gietz D and Woods RA. 2006 *Methods in molecular biology*. in: Wei Xiao, *Yeast protocols*, second edition, edited Human press Inc. Totowa, New Jersey, pp 107-120.

Graebnitz F, Seiss M, Ruecknagel KP, Staudenbauer WL. 1991. Structure of the beta-glucosidase gene *bglA* of *Clostridium thermocellum*: sequence analysis reveals a superfamily of cellulases and beta-glycosidases including human lactase/phlorizin hydrolase. *Eur J Biochem* 200: 301–309.

Graham I and Chamber A. 1997. *Methods in molecular biology*. Vol 62. Recombinant gene expression protocols. Edited by Tuan R. Humana Press Inc. Totowa NJ

Gritzali M and Brown RDJ. 1979. The cellulase system of *Trichoderma*: relationship between purified extracellular enzymes from induced or cellulose-grown cells. *Adv Chem Ser* 181: 237–260.

Guimarães PMR and Londesborough J. 2007. The adenylate energy charge and specific fermentation rate of brewer's yeast fermenting high-and very high-gravity worts. *Yeast* 25: 47-58

Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Larsson CU, Gorwa-Grauslund M, Görgens J, van Zyl W. 2005. Role of cultivation media in the development of yeast strain for large scale industrial use. *Microb Cell Fact* 4: 1-16.

Halling PJ. 1990. High affinity binding of water by proteins is similar in air and organic solvents. *Biochim Biophys Acta* 1040: 225-228

Han SJ, Yoo YJ, Kang HS. 1995. Characterization of bifunctional cellulase and its structural gene. *J Biol Chem* 270: 26012-26019.

Hazlewood GP and Gilbert HJ. 1993. Xylan and cellulose utilization by the clostridia. *Biotechnol* 25: 311-341.

Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280: 309–316.

Henrissat B. and Bairoch A. 1993. New classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 293: 781-788.

Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, Lehn P, Mornon JP, Davies G. 1995. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7090–7094.

Heyland J, Fu J, Blank LM. 2009. Correlation between TCA cycle flux and glucose uptake rate during respire-fermentative growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol* 155: 3827-3837

Hicks JJ. 2001. Gluconeogénesis. *Bioquímica*, primera edición, McGraw Hill. México, D.F., pp 276-288

Himmel ME, Tucher MP, Lastick SM, Oh KK, Fox JW, Spindler DD, Grohmann K. 1986. Isolation and characterization of a 1,4-beta-D-glucan glucohydrolases from the yeast *Torulopsis wickerhamii*. *J Biol Chem* 261: 12948-12955

Hinchliffe E and Box WG. 1984. Expression of the cloned endo-1,3-1,4- β -glucanase gene of *Bacillus subtilis* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 8: 471-475.

Hosthersall JS and Ahmed A. 2013. Metabolic fate of the increased yeast amino acids uptake subsequent to catabolite derepression. *J Amino Acids*. doi: 10.1155/2013/461901

Howard RL, Abotsi E, Jansen EL, van Rensburg, Howard S. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African J Biotechnol* 12: 602-619.

Hrmova M and Fichner BG. 2007. Dissecting the catalytic mechanism of a plant β -D-glucan glucohydrolase through structural biology using inhibitors and substrate analogues. *Carbohydr Res* 342: 1613-1623.

Hrmova M, Streltson AV, Smith JB, Vasella A, Varghese NJ, Fincher BG. 2005. Structural rationale for low-nanomolar binding of transition state mimics to a family GH3 β -D-glucan glucohydrolase from barley. *Biochem* 44: 16529-16539.

Jana M and Bandyopadhyay S. 2012. Restricted dynamics of water around a protein-carbohydrate complex. *J Chem Phys*: 137 1-14

Jenkins J, Leggio LL, Harris G, Pickersgill R. 1995. β -Glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases for a superfamily with 8-fold/architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of strands four and seven. *FEBS Lett* 362: 281-285.

Jönsson L, Alriksson B, Nilvebrant N. 2013. Bioconversion of lignocellulose inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels* 6: 16. doi: 10.1186/1754-6834-6-16

Karnchanatat A; Petsom A; Sangvanich P; Piaphukiew J; Whalley A J; Reynolds C D, Sihanonth P. 2007. Purification and biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* Rehm. *FEMS Microbiol Lett* 270: 162–170.

Kawabata T and Go N. 2007. Detection of pockets on protein surface using small and large probe sphere to find putative ligand binding sites. *Proteins* 68: 516-529.

Kim S and Dale BE. 2003. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenerg* 26: 361-375.

Klebl F and Tanner W. 1989. Molecular cloning of a cell wall exo- β -1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 171: 6259-6264.

Koch A, Weigel CTO, Schulz G. 1993. Cloning, sequencing, and heterologous expression of a cellulose encoding cDNA (*cbh1*) from *Penicillium janthinellum*. *Gene* 124: 57-65.

Kohchi C and Toh-e A. 1986. Cloning of *Candida pelliculosa* β -glucosidase gene and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 203: 89-94.

Kubicek CP, Messner R, Gruber F, Mandels M, Kubicek-Pranz EM. 1993. Triggering of cellulose biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. Involvement of a constitutive, sophorose-inducible, glucoseinhibited β -diglucoside permease. *J Biol Chem* 268: 19364-19368.

Kuntz I D and Kauzmann W. 1974. Hydration of proteins and polypeptides. *Adv Protein Chem* 28: 239–345.

Leclerc M, Chemardin P, Arnaud A, Ratomahenina R, Gerbaud C, Raynal A, Guerineau M. 1987. Comparison of the properties of the purified beta-glucosidase from the transformed strain of *Saccharomyces cerevisiae* TYKF2 with that of the donor strain *Kluyveromyces fragilis* Y610. *Biotechnol Appl Biochem* 9: 410-422.

Leschine SB. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu Rev Microbiol* 49: 399–426.

Lin Y and Tanaka S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 627-642.

Lo AC, MacKay RM, Seligy VL, Willick GE. 1988. *Bacillus subtilis* β -1-4-endoglucanase products from intact and truncated genes are secreted into the extracellular medium by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 54: 2287-2292.

Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 506–577.

Machida M, Ohtsuki I, Fukui S, Yamashita I. 1988. Nucleotide sequence of the

Saccharomycopsis fibuligera genes for extracellular β -glucosidase as expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 54: 3147-3155.

Mamma D, Hatzinikolaou DG, Christakopoulos P. 2004. Biochemical and catalytic properties of two intracellular β -glucosidases from the fungus *Penicillium decumbens* active on flavonoid glucosides. *J Mol Cat* 27: 183–190.

Mansfield SD and Meder R. 2003. Cellulose hydrolysis – the role of the monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. *Cellulose* 10: 159–169.

Martín, C, Galbe, M, Wahlbom, CF, Hahn-Hagerdal, B, Johnsson, LJ. 2002. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Tech* 31: 274–282.

Matsui I, Sakai Y, Matsui E, Kikuchi H, Kawarabayasi Y, Honda K. 2000. Novel substrate specificity of a membrane-bound β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *FEBS Lett* 467: 195-200

McCarter JD and Withers SG. 1994. Mechanism of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* 4: 885-892.

Morawski B, Lin Z, Cirino P, Joo H, Bandara G, Arnold FH. 2000. Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Protein Engine* 13: 377-384.

Mrsa V, Klebl F, Tanner W. 1993. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *BGL2* gene product, a cell wall endo- β -1,3-glucanase. *J Bacteriol* 175: 2102-2106.

Murai T, Ueda M, Atomi H, Shibasaki Y, Kamasawa N, Osumi M, Kawaguchi T, Arai M, Tanaka A. 1997. Genetic immobilization of cellulase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 499-503.

Murai T, Ueda M, Kawaguchi T, Arai M, Tanaka A. 1998. Assimilation of cellooligosaccharides by a cell surface-engineered yeast expressing β -glucosidase and carboxymethylcellulase from *Aspergillus aculeatus*. *Appl Environ Microbiol* 64: 4857-4861.

Nakajima H, Noguchi K, Yamamoto M, Aono R, Horikoshi K. 1993. Expression of an 87-kD- β -1,3-glucanase of *Bacillus circulans* IAM1165 in *Saccharomyces cerevisiae* by low-temperature incubation. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 2039-2042.

Nebreda AR, Villa TG, Villanueva JR, Del Rey F. 1986. Cloning of genes related to exo- β -glucanase production in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an exo- β -glucanase structural gene. *Gene* 47: 245-259.

Neiman NA. 2011. Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 189: 737-765

Okamoto T, Yamano S, Ikeaga H, Nakamura K. 1994. Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 42: 563-568.

- Ooi T, Minamiguchi K, Kawaguchi T, Okada H, Murao S, Arai M. 1994. Expression of the cellulose (FI-CMCase) gene of *Aspergillus aculeatus* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 954-956.
- Otterstedt K, Larsson C, Bill RM, Stahlberg A, Boles E, Hohmann S. 2004. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO reports* 5: 532-537
- Pack SP, Park K, Yoo YJ. 2002. Enhancement of β -glucosidase stability and cellobiose-usage using surfaceengineered recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol production. *Biotechnol Lett* 24: 1919-1925.
- Painbeni E, Valles S, Polaina J, Flors A. 1992. Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* beta-glucosidase expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174: 3087-3091
- Parry NJ, Beaver DE, Owen E, Vandenberghe I, van Beeumen J, Bhat MK. 2001. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus urantiacus*. *Biochem J* 353: 117-127.
- Pei J, Pang Q, Zhao L, Fan S, Shi H. 2012. Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum β -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. *Biotechnol Biofuels* 5: 31-41
- Penttilä ME, André L, Lehtovaara P, Bailey M, Teeri TT, Knowles JKC. 1988. Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 63: 103-112.
- Penttilä ME, André L, Saloheimo M, Lehtovaara P, Knowles JKC. 1987a. Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 3: 175-185.
- Penttilä ME, Suihko ML, Lehtinen U, Knowles J. 1987b. Construction of brewer's yeasts secreting fungal endo- β -glucanase. *Curr Genet* 12: 413-420.
- Penttilä ME, Nevalainen KMH, Raynal A, Knowles JKC. 1984. Cloning of *Aspergillus niger* genes in yeast. Expression of the gene encoding *Aspergillus* β -glucosidase. *Mol Gen Genet* 194: 494-499.
- Pérez-González JA, De Graaff LH, Visser J, Ramon D. 1996. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes. *Appl Environ Microbiol* 62: 2179-2182.
- Pérez-González JA, González R, Querol A, Sendra J, Ramon D. 1993. Construction of a recombinant wine yeast strain expressing β -(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl Environ Microbiol* 59: 2801-2806.
- Petersen SH, Van Zyl WH, Pretorius IS. 1998. Development of a polysaccharide degrading strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Techn* 12: 615-619.

- Pitson SM, Seviour RJ, McDougall BM. 1997. Purification and characterization of an extracellular betaglucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in beta-glucan degradation. *Enzyme Microb Tech* 21: 182-190.
- Ponce-Noyola T and de la Torre M. 2001. Regulation of cellulases and xylanases from a derepressed mutant of *Cellulomonas flavigena* growing on sugar-cane bagasse in continuous culture. *Bioresour Technol* 78: 285–291.
- Ponce-Noyola T. and de la Torre M. 1995. Isolation of a high specific growth rate mutant of *cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. *App Microbiol Biotechnol* 42: 709-712.
- Pozzo T, Pasten LJ, Karlsson NE, Logan DT. 2010. Structural and functional analyses of β -glucosidase 3B *Thermotoga neapolitana*: A thermostable three-domain representative of glycoside hydrolase 3. *J Mol Biol* 397: 724-739.
- Rajoka MI, Bashir A, Hussein SRA, Gauri MT, Parvez S, Malik KA. 1998. Cloning and expression of β -glucosidase genes in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* using shuttle vector pYES 2.0. *Folia Microbiol* 43: 129-135.
- Rajoka MI, Farhana Shaukat MT, Ghauri M T, Shahid R. 2003. Kinetics of β -glucosidase production by *Saccharomyces cerevisiae* recombinants harboring heterologous *bgl* genes. *Biotechnol Lett* 25: 945–948, 2003.
- Rajoka MI and Malik KA. 1997. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. *Bioresour Technol* 59: 21-27.
- Rajoka MI, Parvez S, Malik KA. 1992. Cloning of structural genes for β -glucosidase from *Cellulomonas biazotea* into *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae* using shuttle vector pBLU-D. *Biotechnol Lett* 14: 1001-1006.
- Ray D and Ye P. 2013. Characterization of the metabolic requirements in yeast meiosis. *PLoS ONE* 8: e63707. doi: 10.1371/journal.pone.0063707
- Raynal A, Gerbaud C, Francingues MC, Guérineau M. 1987. Sequence and transcription of the β -glucosidase gene of *Kluyveromyces fragilis* cloned in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 12: 175-184.
- Raynal A and Guérineau M. 1984. Cloning and expression of the structural gene for β -glucosidase of *Kluyvermyces fragilis* in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 195: 108-115.
- Reséndiz Cardiel G. 2008. Identificación de los cambios ocurridos en la β -glucosidasa de *Cellulomonas flavigena*. Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Rojas-Rejón OA, Poggi-Varaldo HM, Ramos-Valdivia AC, Martínez-Jiménez A, Cristiani-Urbina E, de la Torre-Martínez M, Ponce-Noyola T. 2011 Production of cellulases and xylanases under catabolic repression conditions from mutant PR-22 of *Cellulomonas flavigena*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38: 257–264

- Romaniec MP, Huskinsson N, Barker P, Demain AL. 1993. Purification and properties of the *Clostridium thermocellum* BglB gene product expressed in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Tech* 15: 393-400
- Sacco M, Millet J, Aubert JP. 1984. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a cellulose gene from *Clostridium thermocellum*. *Ann Microbiol* 135A: 485-488.
- Saito T, Suzuki T, Hayashi A, Honda H, Taya M, Lijima S, Kobayashi T. 1990. Expression of a thermostable cellulase gene from a thermophilic anaerobe in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng* 69: 282-286.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467
- Saloheimo A, Henrissat B, Hoffrén AM, Teleman O, Penttilä M. 1994. A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. *Mol Microbiol* 13: 219-228.
- Saloheimo M, Nakari-Setälä T, Tenkanen M Penttilä M. 1997. cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in Yeast. *Eur J Biochem* 249: 584-591.
- Sánchez-Torres P, González-Candelas L, Ramón D. 1998. Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin- β -glucosidase in a wine yeast strain. *J Agric Food Chem* 46: 354-360.
- Schäffer C, Graninger M, Messner P. 2001. Prokaryotic glycosylation. *Proteomics* 1: 248-261
- Schenzell K, Fischer S, Brendler E. 2005. New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy. *Cellulose* 12: 223–231.
- Schlochtermeier A, Walter S, Schroder J, Moorman M, Schrempf H. 1992. The gene encoding the cellulase (Avicelase) Cel1 from *Streptomyces reticuli* and analysis of protein domains. *Mol Microbiol* 23: 3611-21.
- Singhania RR, Patel AK, Sukumaran RK, Larroche C, Pandey A. 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresour Technol* 127; 500-507.
- Sinnott ML. 1990. Catalytic mechanism of enzymatic glycosyl transfer. *Chem Rev* 90: 1171-1202.
- Skipper N, Sutherland M, Davies RW, Kilburn D, Miller RC, Warren A, Wong R. 1985. Secretion of a bacterial cellulase by yeast. *Science* 230: 958-961.
- Skory CD and Freer SN. 1996. Cloning and characterization of a gene encoding a cell-bound, extracellular β -glucosidase in the yeast *Candida wickerhamii*. *Appl Environ Microbiol* 61: 518-25.

- Skory CD, Freer SN, Bothast RJ. 1996. Expression and secretion of the *Candida wickerhamii* extracellular β -glucosidase gene, *bglB*, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 30: 417-22.
- Soontornngun N, Laroche M, Drouin S, Robert F, Turcotte B. 2007. Regulation of gluconeogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by activator and repressor functions of Rd2. *Mol Cell Biol* 27: 7895-7905
- Spiridonov NA and Wilson DB. 2001. Cloning and biochemical characterization of BGLC, a β -glucosidase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. *Curr Microbiol* 42: 295-301.
- Suihko ML, Lehtinen U, Zurbriggen B, Vilpola A, Knowles J, Pentillä M. 1991. Construction and analysis of recombinant glucanolytic brewer's yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 35: 781-787.
- Sun Y and Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*. 83: 1-11.
- Takada G, Kawaguchi T, Sumitani J, Arai M. 1998. Expression of *Aspergillus aculeatus* No. F-50 cellobiohydrolase I (*cbh1*) and β -glucosidase 1 (*bgl1*) genes by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 1615-1618.
- Teeri TT. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol* 15: 160–167.
- Ueda M and Tanaka A. 2000. Cell surface engineering of yeast: construction of arming yeast with biocatalyst. *J Biosci Bioeng* 90: 125-136.
- Uozumi N, Hayashi A, Ito T, Patthra A, Yamashita I, Lijima S, Kobayashi T. 1993. Secretion of thermophilic bacterial cellobiohydrolase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng* 75: 399-404.
- Van Arsdell JN, Kwok S, Schweickart VL, Ladner MB, Gelfand DH, Innis MA. 1987. Cloning, characterization and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei*. *Nat Biotechnol* 5: 60-64.
- Van Rensburg P, van Zyl WH, Pretorius IS. 1998. Engineering yeast for efficient cellulose degradation. *Yeast* 14: 67-76.
- Van Rensburg P, van Zyl WH, Pretorius IS. 1997. Over-expression of the *Saccharomyces cerevisiae* exo- β -1,3-glucanase gene together with the *Bacillus subtilis* endo- β -1,3-1,4-glucanase gene and the *Butyrivibrio fibrisolvens* endo- β -1,4-glucanase gene in yeast. *J Biotechnol* 55: 43-53.
- Van Rensburg P, van Zyl WH, Pretorius IS. 1996. Co-expression of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase gene and a *Butyrivibrio fibrisolvens* Endo- β -1,4-glucanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 30: 246-250.

- Van Rensburg P, van Zyl WH, Pretorius IS. 1994. Expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* endo- β -1,4-glucanase gene together with the *Erwinia* pectate lyase and polygalacturonase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 27: 17-22.
- Van Rooyen R, Hahn-Hägerdal B, La Grange DC, van Zyl WH. 2005. Construction of cellobiose growing and fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Biotechnol* 120: 284-295.
- Van Zyl WH, Lynd LR, den Haan R, McBride J. 2007. Consolidate bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Biochem Engin Biotechnol* 108: 205-235
- Verduyn C, Zomerdijk TPL, Van Dijken JP, Scheffers WA. 1984 Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspension with an enzyme electrode. *Appl Microbiol Biotechnol* 19: 181–185
- Von Blottnitz H and Curran MA. 2006. A review of assessments conducted on bio-ethanol as a transportation fuel from a net energy, greenhouse gas, and environmental life cycle perspective. *J. Cleaner Production*. In Press
- Vroemen S, Heldens J, Boyd C, Henrissat B, Keen NT. 1995. Cloning and characterization of the *bgra4* gene from *Erwinia crhysanthemi* D1 wich encodes a β -glucosidase/xilosidase enzyme. *Mol Gen Genet* 246: 465-477
- Wallecha A and Mishra, S. 2003. Purification and characterization of two β -glucosidases from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. *Biochim Biophys Acta* 1649, 74–84.
- Wildt S and Gerngross TU. 2005. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat Rev Microbiol* 3: 119-127.
- Wood BE and Ingram LO. 1992. Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol* 58: 2103-2110.
- Ximenes E, Kim Y, Moisiere N, Dien B, Ladisch M. 2011. Deactivation of celulasas by phenols. *Enzyme Microb Tech* 48: 54-60
- Yamada R, Tanaka T, Ogino C. 2010. Gene copy number and polyploidy on products formation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:849–857
- Yamane T, Kojima Y, Ichiryu T and Shimizu S. 1988. Biocatalysis in a microaquos organic solvent. *Ann NY Acad Sci* 542: 282-293
- Yoshida E, Hidaka M, Foshinobu S, Koyanagi T, Minami H, Tamakis H, Kitaoka M, Katayama T, Kumagi H. 2010. Role of a PA14 domain in determing substrate specificity of a glucoside hydrolase family 3 β -glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem J* 431: 39-49.

Zacks A and Klibanov AM. 1988. Enzymatic catalysis in non-aqueous solvents J Biol Chem 263: 3194–3201.

Zhong-Peng G, Zhang L, Zhong-Yang D, Zhen-Hua G, Gui-Yang S. 2011. Development of an industrial ethanol-producing yeast strain for efficient utilization of cellobiose. Enzyme Microb Tech 49: 105-112

Zhou S, Davis FC, Ingram LO. 2001. Gene integration and expression and extracellular secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase CelY (*celY*) and CelZ (*celZ*) in ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2. Appl Environ Microbiol 67: 6-14.

Zhou S and Ingram LO. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of amorphous cellulose to ethanol by recombinant *Klebsiella oxytoca* SZ21 without supplemental cellulase. Biotechnol Lett 23:1455-1462.

Zhou S and Ingram LO. 1999. Engineering endoglucanase-secreting strains of ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2. J. Ind Microbiol Biotechnol 22: 600-607.

Zurbriggen BD, Bailey MJ, Penttilä ME, Poutanen K, Linko M. 1990. Pilot scale production of a heterologous *Trichoderma reesei* cellulase by *Saccharomyces cerevisiae*. J Biotechnol 13: 267-278.

Zurbriggen BD, Penttilä ME, Viikari L, Bailey MJ. 1991. Pilot scale production of a *Trichoderma reesei* endo- β -glucanase by brewer's yeast. J Biotechnol 17: 133-146.