



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE LA UNIÓN DE LA EXPANSINA PCEXL1 AL XILEMA DE
PLANTAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Autor

Jimmy Andrés Sampedro Guerrero

Año
2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE LA UNIÓN DE LA EXPANSINA PCEXL1 AL XILEMA DE
PLANTAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología.

Profesor Guía
Dra. Vivian Morera Córdova

Autor
Jimmy Andrés Sampedro Guerrero

Año
2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Vivian Morera Córdova
Doctora en Ciencias Biológicas
CI: 1756346811

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

Declaro haber corregido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Mayra Fernanda Chico Terán

Magíster en Biotecnología

CI: 1003327044

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

Declaro haber dirigido este trabajo a través de la validación de los resultados, los cuales son auténticos, originales y personales. La investigación realizada para este trabajo fue realizada en mi laboratorio. Finalmente, he aportado mis conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema de investigación.

Claudia Martínez Anaya

Doctora en Filosofía – Biología Molecular

CI: MAAC700627MDFRNL05

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Jimmy Andrés Sampedro Guerrero

CI: 1721227047

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con financiamiento de los donativos: CONACYT Ciencia Básica 166050 y DGAPA-PAPIIT IN-211116.

A la Dra. Claudia Martínez Anaya por brindarme su confianza y su tiempo, permitiéndome trabajar y mejorar como profesional desde el primer día. A la Dra. Mabel Rodríguez por todos los conocimientos brindados. Al Dr. Lorenzo Segovia por la oportunidad de integrar su grupo de trabajo. A la Dra. Vivian Morera por su preocupación y exhaustivo acompañamiento en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres Mirian y Jimmy por todo su amor y por enseñarme el valor del esfuerzo y del trabajo duro.

A mi hermana por enseñarme que no existen obstáculos para conseguir el éxito.

A mis abuelitos Aida y Julio por velar en mi bienestar y brindarme grandes consejos de vida.

A mi novia Vanessa por estar a mi lado y gracias a quien logré cumplir mis más grandes metas.

A mis mascotas Taiga y Goma que gracias a su compañía llenan mi mundo de alegría.

A todos mis amigos y familiares por acompañarme y motivarme en el transcurso de mi desempeño académico.

RESUMEN

Pectobacterium carotovorum es una bacteria patógena de plantas, que coloniza cultivos y vegetales con alto impacto agrícola y causa la podredumbre blanda. Mediante el mecanismo de autoinducción esta bacteria secreta proteínas como las expansinas, que pueden brindar una ventaja durante la infección a vegetales. Sin embargo, aunque la principal función de las expansinas es la de modificar la pared celular vegetal, se desconoce el rol que cumple la expansina PcExl1 en la infección a vegetales y el sitio específico de unión en el tejido vegetal. En este estudio, con el propósito de determinar el sitio específico de unión de PcExl1, se expresó heterológamente PcExl1 y se realizaron experimentos de unión de la expansina PcExl1, marcada con el fluoróforo Cy5, con los xilemas aislados de apio, kale, verdolaga, betabel, ruibarbo y acelga. En los ensayos de microscopía se identificaron dos tipos de fibras: unas fibras helicoidales y otras fibras lineales y se observó que la expansina se une a las estructuras helicoidales que conforman los haces vasculares del xilema de los vegetales. Al estudiar la preferencia de unión de PcExl1 por un determinado tipo de fibra, se determinó que las fibras helicoidales aunque presentan una baja diferencia de cristalinidad del 5% con respecto a las fibras lineales, presentan diferencias del 29,1 FWHM (FWHM, del inglés *full width at half maximum*) en cuanto a la textura. Además, durante los experimentos de composición química de azúcares de las fibras, se determinaron diferencias del 3% de xilosa y del 2% de arabinosa-galactosa entre las fibras helicoidales y las fibras lineales. Estas diferencias en la textura, así como en la relación de azúcares determinan la unión preferencial de la expansina a las fibras helicoidales.

Palabras clave: expansina PcExl1, microscopía, xilema de plantas, cristalinidad, textura.

ABSTRACT

Pectobacterium carotovorum is a pathogenic bacterium of plants, which colonizes crops and vegetables with high agricultural impact and causes soft rotting. By the mechanism of quorum sensing this bacteria secretes proteins, like the expansins, that can give an advantage during the infection to vegetables. Although, the main function of the expansins is to modify the plant cell wall, the role of the expansin PcExl1 in the infection to plants and the specific site of binding in plant tissue is unknown. In this study, for the purpose of determining the specific site of PcExl1 binding, PcExl1 was heterologously expressed and binding experiments of the PcExl1 expansin, labeled with the fluorophore CY5, were performed with the isolated xylems of celery, kale, purslane, beet, rhubarb and chard. In the microscopy tests two types of fibers were identified: helical fibers and other linear fibers and it was observed that the expansin is united to the helicoidal structures that conform the vascular bundles of the xylem of the vegetables. When studying the preference of PcExl1 binding to a certain type of fiber, it was determined that the helical fibers, although they have a low crystallinity difference of 5% with respect to linear fibers, show differences of 29.1 FWHM (FWHM, of english *full width at half maximum*) in terms of texture. In addition, during the chemical composition experiments of fiber sugars, differences of 3% of xylose and 2% of arabinose-galactose were determined between helical fibers and linear fibers. Differences in texture as well as in the ratio of sugars determine the preferential binding of the expansin to helical fibers.

Keywords: expansin PcExl1, microscopy, xylem of plants, crystallinity, texture.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Justificación	3
1.4 Objetivos.....	4
1.4.1 Objetivo general.....	4
1.4.2 Objetivos específicos	4
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Pared celular de las plantas.....	4
2.2 Enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular ...	7
2.3 Expansinas	9
2.3.1 Expansinas de plantas.....	9
2.3.2 Expansinas de bacterias.....	10
2.3.3 Estructura de las expansinas.....	12
2.3.4 Función de las expansinas	14
2.4. Técnicas utilizadas para la medición de la interacción de proteínas.....	14
3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	18
4. PROCEDIMIENTOS.....	20
4.1 Población y muestra	20
4.2 Materiales	20
4.3 Métodos para la obtención de los datos.....	21
4.3.1 Obtención de la proteína PcEx1 recombinante.....	21
4.3.2 Evaluación de la unión de la proteína PcEx1 recombinante	24
4.3.3 Marcaje de la proteína PcEx1 recombinante	25
4.3.4 Preparación del material vegetal.....	25

4.3.5 Determinación por microscopía de la unión de la proteína PcExl1 marcada con Cy5 al material vegetal.....	26
4.3.6 Ensayos de infección sobre el material vegetal utilizando el microorganismo patógeno	26
4.3.7 Evaluación de la unión de la proteína PcExl1 recombinante pura a fibras helicoidales y a fibras lineales.....	27
4.3.8 Evaluación de la cristalinidad de las fibras helicoidales y lineales	28
4.3.9 Evaluación de la composición química de las fibras helicoidales y lineales.....	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1 Obtención de la proteína PcExl1 recombinante	31
5.2 Cuantificación de la proteína PcExl1 recombinante	33
5.3 Interacción de la proteína PcExl1 recombinante con celulosa microcristalina.....	34
5.4 Marcaje de la proteína PcExl1 con el fluoróforo Cy5.....	36
5.5 Determinación del sitio de unión de PcExl1 en el xilema de los vegetales	36
5.6 Infección de los vegetales con las cepas de Pectobacterium BF45 y 108	39
5.7 Evaluación de la unión de la proteína PcExl1 recombinante a las fibras helicoidales y a las fibras lineales.....	41
5.8 Evaluación de la cristalinidad y textura de las fibras helicoidales y lineales	43
5.9 Evaluación de la composición química de las fibras helicoidales y lineales	48
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
6.1 Conclusiones	53
6.2 Recomendaciones	53
REFERENCIAS.....	55

ANEXOS	66
--------------	----

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las expansinas pertenecen a una familia de proteínas no hidrolíticas capaces de disminuir la fuerza de la pared celular vegetal, relajando la tensión de los polímeros que la conforman. Las expansinas pueden ser de origen vegetal, fúngico o bacteriano. Se cree que muchas de las expansinas bacterianas de los patógenos de las plantas cuentan con módulos que permiten a estos microorganismos colonizar las superficies vegetales y causar síntomas de marchitez (Sampedro y Cosgrove, 2005).

La expansina de *Bacillus subtilis* (BsEXLX1), fue la primera expansina de origen bacteriano estudiada y demostró tener actividad de extensión y relajación del tejido vegetal (Kim et al., 2013). Los análisis estructurales, además de otros bioquímicos y biofísicos, indican que la unión de la expansina BsEXLX1 a determinados componentes de la pared celular depende principalmente de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre la proteína y el sustrato (Nikolaidis et al., 2013).

Olarte et al. (2014), informaron la clonación y la caracterización de la expansina del patógeno de plantas *Pectobacterium carotovorum* (PcExl1). *Pectobacterium carotovorum* es una bacteria fitopatógena, que causa podredumbre blanda en un amplio rango de cultivos y vegetales (Choi y Kim, 2012). Su mecanismo de infección se basa en la producción de factores de virulencia generados y regulados por los sistemas de autoinducción. Este mecanismo permite la expresión de una amplia variedad de enzimas extracelulares que actúan sobre los tejidos vegetales infectados, tales como: pectinasas (poli-galacturonasas, pectato-liasas y pectin-metilesterasas), proteasas y celulasas (Polluman, Alamäe y Mäc, 2012).

Las estructuras tridimensionales de la expansina PcExl1 y la expansina BsEXLX1 son similares. En la sobreposición de un modelo tridimensional de

PcExl1 y de BsEXLX1, se observa que en las secuencias de las proteínas existen aminoácidos conservados en los surcos de la superficie de unión a polisacáridos (PBS, del inglés *polysaccharide binding surface*) (Mendoza, 2014).

Aún cuando la estructura tridimensional de ambas expansinas son similares, existe una diferencia con respecto al punto isoelectrónico (pI) para cada expansina. Esto debido a la cantidad de residuos con carga eléctrica presentes en la superficie posterior al PBS. PcExl1 es una expansina ácida con un pI teórico de 4.8. Por otro lado, BsEXLX1 es una expansina básica con un pI teórico de 9.2 (Olarte et al., 2014). Esta diferencia resulta en distintos patrones de unión de las expansinas a las paredes celulares de diferentes vegetales (Pastor et al., 2015).

Además, se conoce que la interacción de las expansinas bacterianas con la celulosa vegetal depende de las interacciones hidrofóbicas establecidas entre aminoácidos aromáticos conservados, localizados en el dominio 2 de estas proteínas (Martínez-Anaya, 2016).

La interacción de las expansinas con la pared celular también está determinada por la carga producida por los polisacáridos presentes en la pared. Debido a la naturaleza básica de BsEXLX1, ésta presenta mayor afinidad a paredes celulares totales ricas en pectina y hemicelulosa (ambas con mayor contenido de residuos negativos) (Hosmer y Mohnen, 2009). Sin embargo, cuando se eliminan los polisacáridos ácidos del material vegetal, es decir la pectina y la hemicelulosa, PcExl1 se une específicamente a la celulosa (Mendoza, 2014).

Se desconoce el rol que cumple PcExl1 en la infección o colonización de especies vegetales. Por lo cual se han realizado experimentos de localización de PcExl1 sobre el tejido vegetal de especies susceptibles a la infección por *P. carotovorum*. Al incubar PcExl1 previamente marcada con el fluoróforo Cy3 se observó que PcExl1 se une a las estructuras helicoidales correspondientes a

los haces vasculares de la planta, que son ricos en pared secundaria con alto contenido de celulosa cristalina y lignina, donde se estima que la proteína no es repelida por las cargas electrostáticas (Olarte, 2016).

1.2 Planteamiento del problema

Debido a que las expansinas no presentan actividad enzimática, no ha sido sencillo determinar el rol de las expansinas de microorganismos patógenos y su interacción con los diversos sustratos a los que se unen. Entre las limitantes para comprender el mecanismo de acción de las expansinas se encuentran: el desconocimiento de los sitios blancos de acción en la pared celular y la falta de productos liberados o modificados por acción de estas proteínas. También es incierto el papel que juegan estas proteínas en la infección de vegetales susceptibles a patógenos y como las mismas ayudan a la colonización del tejido vegetal (Pastor et al., 2015).

1.3 Justificación

La papa y el agave son cultivos mexicanos afectados por la podredumbre blanda producida por *Pectobacterium carotovorum*. *Pectobacterium carotovorum* se encuentra entre los 10 microorganismos patógenos más agresivos a nivel mundial y que causa pérdidas millonarias en cultivos de importancia agrícola (Mansfield et al., 2012). La presencia de expansinas en patógenos capaces de colonizar o desintegrar los tejidos vegetales, pueden conferir una ventaja en la acción infectiva de vegetales. Por lo tanto, este proyecto permitirá aumentar el conocimiento acerca de los sitios de unión de la expansina PcEx11 en el tejido vegetal y la importancia que esto pudiera tener en la infección de vegetales por *Pectobacterium carotovorum*. El conocimiento del sitio de unión específico de la expansina podría brindar herramientas para actuar en contra de microorganismos que atacan y colonizan cultivos vegetales de alto impacto económico.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar el sitio de unión de la expansina bacteriana PcExl1 recombinante al xilema vegetal.

1.4.2 Objetivos específicos

- Obtener la expansina PcExl1 recombinante a partir de la cepa de *E. coli* BL21.
- Analizar la interacción entre la expansina marcada con fluoróforo y la celulosa.
- Determinar las características del sustrato que permiten la unión de PcExl1.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Pared celular de las plantas

Las células vegetales se encuentran conformadas por una pared compleja de polisacáridos. La pared celular es secretada por cada célula en el cuerpo de la planta, formando una red de fibras delgadas con notable fuerza y flexibilidad (Cosgrove, 2000). Estas fibras están constituidas por polisacáridos que se unen entre sí para formar una sólida red fibrosa, regulando la expansión de la pared durante el crecimiento celular (Carpita y Gibeaut, 1993).

La pared celular de plantas se encuentra involucrada principalmente en la morfología, el crecimiento y el desarrollo de las células vegetales. La pared celular no sólo fortalece el cuerpo de la planta, también tiene un papel clave en el crecimiento de las plantas, la diferenciación celular, la comunicación

intercelular, el movimiento del agua y la defensa contra patógenos (Ochoa-Villarreal et al., 2012). La pared celular de las plantas se divide en una pared primaria que rodea a las células involucradas en el crecimiento de las plantas y una pared secundaria que contienen lignina y que rodea las células especializadas, tales como elementos de vaso o las células de fibras (Keegstra, 2010). La pared vegetal está constituida por: micro-fibrillas de celulosa, polisacáridos, hemicelulosa, heteropolisacáridos de pectina y lignina (*Figura 1*).

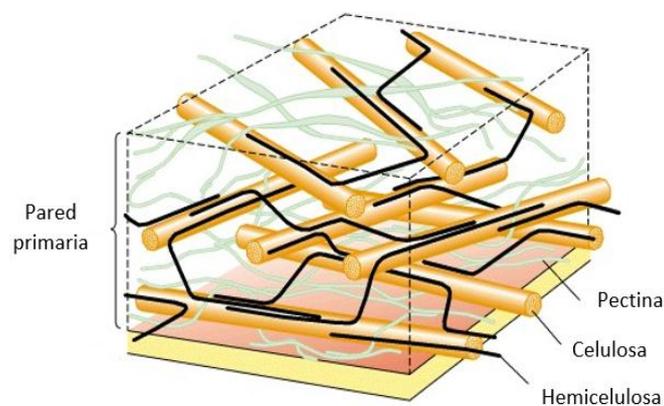


Figura 1. Modelo estructural de los componentes de la pared vegetal primaria.

Adaptado de Lodish et al., 2000.

Entre los polisacáridos que componen la pared celular primaria se encuentra la celulosa. La celulosa es un polisacárido presente en todas las paredes celulares de las plantas superiores. La estructura química de la celulosa consiste en un polímero generado por la repetición de moléculas de D-glucopiranososa, unidas covalentemente a través de enlaces β 1-4 entre el OH del carbono 4 y el carbono 1 (Klemm et al., 2005). Este homopolímero de unidades de glucosa, principalmente se presenta en forma de microfibrillas cristalinas y en forma de regiones amorfas (Pauly y Keegstra, 2008). Los tres grupos hidroxilo le confieren a la celulosa sus propiedades más importantes, a) estructura microfibrilada y b) organización jerárquica: parte cristalina intercalada por regiones amorfas (*Figura 2*) (Lavoine et al., 2012).

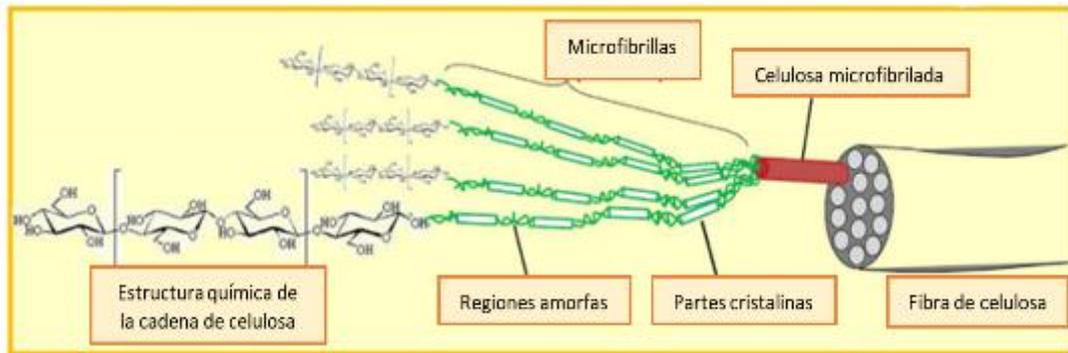


Figura 2. Representación gráfica de la conformación estructural de la celulosa.

Adaptado de Lavoine et al., 2012.

El segundo polisacárido que compone la pared celular primaria es la hemicelulosa. La hemicelulosa es un heteropolisacárido que consta de varios polímeros que difieren en la composición de monosacáridos y en sus enlaces glicosídicos (Yang et al., 2007) El papel biológico más destacado de la hemicelulosa es la de contribuir al fortalecimiento de la pared interactuando con la celulosa y con la lignina. La estructura de la hemicelulosa contiene enlaces β 1-4 en una configuración central (Scheller y Ulvskov, 2010). La hemicelulosa se clasifica dependiendo del residuo de azúcar en la cadena, entre los principales se encuentran: los glucanos, los xilanos, los mananos y los glucomananos. Además existen subclases dependiendo de la especie de planta, la etapa de desarrollo y la ubicación en el tipo de tejido, donde se incluyen: los glucuronoxilanos, los galactomananos, los arabinoxilanos, los galactoglucomananos y los xiloglucanos (Sorieul et al., 2016). Estos compuestos de hemicelulosa pueden variar en cuanto al patrón de sustitución y el grado de polimerización. Por lo cual la composición del polímero y sus características estructurales químicas son diferentes entre especies vegetales (Puls, 1997).

Además de la celulosa y la hemicelulosa, la pectina es un polisacárido que se localiza en la lámina media perteneciente a la pared celular primaria y está implicada en el crecimiento, la morfología, el desarrollo y la defensa de la planta (Atmodjo et al., 2013). Las pectinas son una familia de polisacáridos complejos que contienen residuos de ácido-D-galacturónico unidos entre sí por

enlaces α 1-4. También puede contener en su estructura xilosa, arabinosa, ramnosa y galactosa. Los tipos de pectina predominantes son: la homogalacturanona, la ramnogalacturanona I, la ramnogalacturonona II y los galacturonanos complejos (Edwards y Doran-Peterson, 2012).

Por otro lado, la pared celular secundaria se encuentra compuesta principalmente de la lignina. La lignina es un polímero aromático cuyos precursores monoméricos tienen un anillo fenólico con tres carbonos en la cadena lateral (Ghaffar y Fan, 2013). La principal función de la lignina es brindar fuerza y rigidez al tejido vegetal, protegiendo a la planta de microorganismos e insectos. La lignina cumple funciones importantes dentro de la pared celular tales como: producir cambios en la permeabilidad y la estabilidad térmica (Chung y Washburn, 2016). Químicamente la lignina está compuesta de una red aleatoria de grupos fenilpropano. Estos grupos básicos son tres monómeros estructurales que pueden ser alcohol cumaril, alcohol coniferil y alcohol sinapil (Haghdan et al., 2016). Como resultado de la unión al azar de los monómeros de fenilpropano, la lignina adopta una estructura tridimensional compleja con enlaces entre carbono-oxígeno (β -O-4, α -O-4, y 4-O-5) y entre carbono-carbono (β -5, 5-5 y β -1) (Patil et al., 2016).

2.2 Enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular

Entre las enzimas capaces de degradar la pared celular vegetal se encuentran las celulasas. Las celulasas son un grupo de enzimas producidas por diversos hongos, protozoarios, bacterias, animales y plantas. Las celulasas son comúnmente utilizadas con propósitos industriales principalmente en las industrias textil, del papel, de la comida, como aditivos en detergentes y para mejorar la digestibilidad del alimento de los animales (Zhang y Zhang, 2013). Estas enzimas son capaces de hidrolizar el enlace glicosídico β 1-4 entre dos o más carbohidratos (Sadhu y Maiti, 2013). Los tipos de celulasas se dividen en: a) exoglucanasas o exo- β -1,4-D-glucanasas (E.C.3.2.1.91), también conocidas como celobiohidrolasas que cortan los extremos de la celulosa produciendo

glucosa o celobiosa; b) endoglucanasas o endo- β -1,4-D-glucanasas (E.C.3.2.1.4) que cortan la celulosa en diferentes sitios al azar produciendo cadenas de oligosacáridos de diferentes longitudes; y c) β -1,4-glucosidasas (E.C.3.2.1.21) que cortan principalmente la celobiosa y otros oligosacáridos para producir glucosa (Kuhad et al., 2011). Las celulasas contienen módulos de unión a carbohidratos no catalíticos llamados CBMs y otros módulos desconocidos que se localizan en el extremo N o C terminal de la proteína (Payne et al., 2015).

El mecanismo sugerido de hidrólisis de la celulosa es perpetrado mediante una disminución de la fuerza de la zona inaccesible de la celulosa, desordenando las redes fibrosas y exponiendo a las cadenas dentro de las microfibrillas. Una vez que la red de celulosa es accesible, la acción sinérgica de las enzimas endo- y exo-glucanasas fragmentan los polímeros de celulosa convirtiéndolos en celu-oligosacáridos solubles que se hidrolizan rápidamente (Arantes y Saddler, 2010).

Las xilanasas son otro grupo de enzimas capaces de degradar la pared celular. También llamadas O-glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.x) rompen de manera aleatoria los enlaces beta 1-4 del xilano (Álvarez-Cervantes et al., 2016). Son producidas por diversos organismos: bacterias, algas y hongos. Existen diversas formas de estas enzimas, debido a que presentan diferentes tipos de plegamientos, diferentes mecanismos de acción, afinidad por sustratos específicos, y diferentes características físico-químicas (Collins et al., 2005). Las potenciales aplicaciones biotecnológicas de las xilanasas son: la bioconversión de materiales lignocelulósicos, el uso como agro-residuos en productos de alimentación y en las industrias textiles y de los biocombustibles (Liao et al., 2015). Muchas de las xilanasas reportadas se encuentran clasificadas en familias glicosil hidrolasas (GH) basadas en similitudes entre aminoácidos (Paës et al., 2012).

Las pectinasas son enzimas que actúan sobre la pared celular vegetal descomponiendo grupos pectinos y son clasificadas en 3 grupos dependiendo del tipo de sustrato que degraden, estos son: la pectina, el ácido péctico y el oligo-D-galacturonato. Las pectinasas pueden actuar mediante trans-eliminación o hidrólisis, cortando de manera aleatoria dentro de la cadena (endo) o cortando en los extremos (exo) (Tapre y Jain, 2014). Los principales usos para las pectinasas son: la extracción de aceites de vegetales y la obtención de sabores y pigmentos de plantas (Garg et al., 2016).

2.3 Expansinas

Las expansinas son enzimas no hidrolíticas capaces de remodelar la pared celular vegetal. Las expansinas fueron identificadas por primera vez en 1992 por McQueen y colaboradores. Estas proteínas se inducen a un pH determinado provocando la relajación y la extensión de la pared celular (Cosgrove et al., 2002).

2.3.1 Expansinas de plantas

La superfamilia de expansinas de plantas se encuentra distribuida en 4 grupos: a) α -expansinas, b) β -expansinas, c) proteínas expansina tipo A y d) proteínas expansina tipo B.

Las α -expansinas fueron renombradas como expansinas tipo A (EXPA). Se conoce que las α -expansinas están implicadas en la expansión celular y otros eventos de modificaciones en la pared (Cosgrove, 2015). Este grupo se ha utilizado como prototipo en estudios bioquímicos y estructurales de los diferentes tipos de EXPA. Las EXPAs forman la familia más grande dentro de la súperfamilia de las expansinas en la mayoría de las plantas (Krishnamurthy et al., 2015). A diferencia de otras familias de expansinas, los tamaños de los genes de EXPA presentes en diferentes taxones son comparables entre sí, determinando un papel vital en la función de este grupo (Carey y Cosgrove, 2007).

Igual que la familia EXPA, las β -expansinas fueron renombradas como expansinas tipo B (EXPB). Se descubrió que este nuevo tipo de expansinas aumenta la capacidad de extensión de las paredes en monocotiledóneas, mientras que EXPA lo hace en dicotiledóneas (McQueen et al., 1992). La familia EXPB se compone de 19 genes presentes en el arroz, 6 genes en *Arabidopsis thaliana*, 3 genes en *Populus trichocarpa* y 7 en *Physcomitrella patens*. La familia EXPB se clasifica en: el grupo 1 de los alérgenos del polen que solubilizan los polisacáridos de la pared celular de gramíneas facilitando la entrada del tubo polínico al ovario y las EXPBs vegetativas (Cosgrove, 2016).

Las proteínas expansina tipo A, también denominadas EXLA, tienen una identidad muy alta de aminoácidos entre sí. Esta familia ha conservado residuos de cisteína y triptófano en las regiones N-terminal y C-terminal respectivamente. La familia EXLA se compone de 3 genes en *Arabidopsis thaliana*, 4 en el arroz, y 2 en *Populus trichocarpa*. Se cree que las proteínas EXLA no actúan en el alargamiento del tallo y que su función biológica en el tejido puede ser diferente a la de las proteínas EXPA y EXPB (Lee y Kende, 2002).

Las proteínas expansina tipo B, también denominadas EXLB, han conservado residuos de cisteína en el extremo N-terminal, pero sólo un residuo de triptófano conservado en el dominio 2. Se encontró 1 gen de EXLB en arroz y en *Arabidopsis* y 4 en *Populus* (Choi et al., 2008). La mayoría de los genes que codifican para EXLB se expresan fuertemente en los órganos y en los tejidos leñosos, lo que sugiere que cumplen un papel importante en la formación de las paredes celulares secundarias (Dal Santo et al., 2013).

2.3.2 Expansinas de bacterias

Las expansinas de plantas y las expansinas de bacterias presentan estructuras similares. La sobreposición y un plegamiento similar, confirman que las

expansinas de *B. subtilis* y varias extraídas de plantas, presentan similitud a nivel estructural (*Figura 3*).

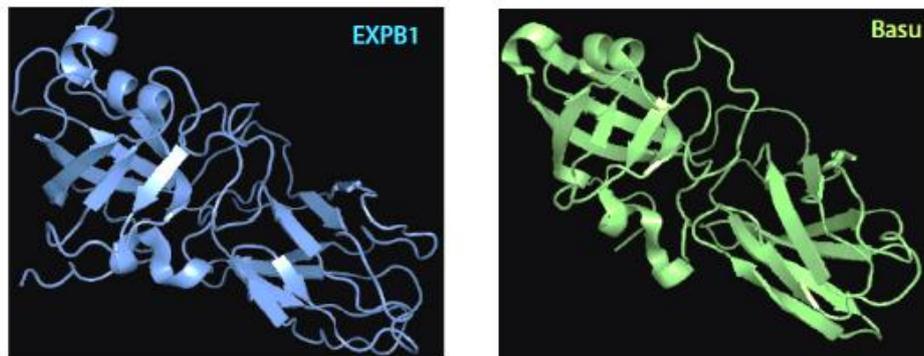


Figura 3. Comparación estructural entre una expansina vegetal y otra bacteriana.

Tomado de Nikolaidis et al., 2013.

a) En color azul está representada la expansina de *Zea mays* (EXPB1) y en color verde está representado la expansina de *B. subtilis* (Basu).

El modelamiento de las expansinas bacterianas, así como la existencia de una superficie conservada y poblada por residuos aminoacídicos que permiten la unión a diferentes cadenas de polisacáridos, sustentan la existencia de una homología estructural entre expansinas de plantas y de bacterias (*Figura 4*), demostrando que las estructuras de estas proteínas son parecidas (Georgelis et al., 2015).

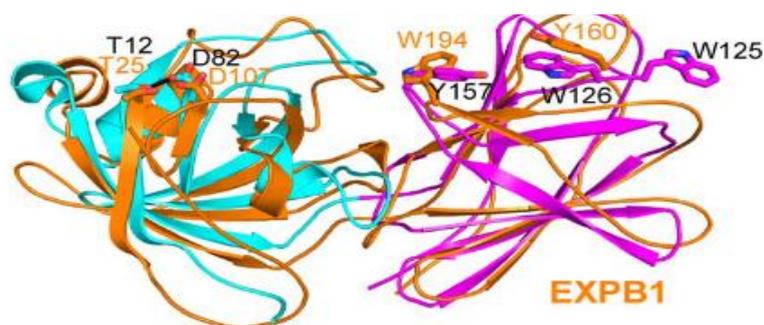


Figura 4. Comparación de la superficie de unión entre una expansina vegetal y otra bacteriana.

Tomado de Kerff et al., 2008.

a) Superposición de las estructuras tridimensionales y de los residuos que conforman la superficie de unión a polisacáridos de la expansina en color naranja de *Zea mays* (EXPB1) y la expansina en color celeste y color morado de *B. subtilis* (EXLX1).

Las expansinas microbianas están presentes en bacterias patógenas de plantas, incluidas especies como: *Streptomyces*, *Clavibacter*, *Xanthomonas* y *Xylella*. Estos 4 grupos mencionados son conocidos como marchitadores vasculares, debido a que atacan el xilema dentro de los sistemas vasculares. Sin embargo, no se encuentran expansinas en bacterias tales como: *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Pseudomonas*. Esta ausencia de expansinas en bacterias no fitopatógenicas, sugiere que las expansinas en bacterias confieren una ventaja única en cuanto a la infección y colonización vegetal (Georgelis et al., 2015).

2.3.3 Estructura de las expansinas

En el N-terminal de las expansinas se localiza un péptido señal encargado de la exportación extracelular de esta. Este péptido presenta aproximadamente 25 residuos de aminoácidos, al separarse el péptido señal se forma una proteína madura de alrededor de 225 aminoácidos y un peso de 23 a 25 kDa (Kerff et al., 2008).

Las expansinas se encuentran formadas por dos dominios estructurales llamados D1 y D2. El dominio D1, localizado en el N-terminal, presenta un peso aproximado de 15 kDa y exhibe un plegamiento tipo beta barril (Georgelis et al., 2014). El dominio D1 está conformado por tres α -hélices y seis hojas β (Figura 5). El dominio D1 posee un porcentaje de identidad muy similar al dominio catalítico de la familia 45 de las endoglucanasas (GH45), conservando incluso una gran parte del sitio catalítico de esta familia, pero carece de al menos un aspartato necesario para la catálisis (Yennawar et al., 2006).

El dominio D2 o C-terminal, tiene un peso aproximado de 10 kDa y se encuentra arreglado en dos hojas β de cuatro cadenas antiparalelas. Este arreglo proyecta una estructura β -sandwich muy similar a la de las inmunoglobulinas (Figura 5) (Georgelis et al., 2014). El plegamiento del dominio

D2 pertenece a los módulos de unión a carbohidratos (CBM, del inglés *carbohydrate binding module*), que permiten la unión específica a la celulosa cristalina, y se ha clasificado dentro de la familia 63 de los CBMs (Boraston et al., 2004).

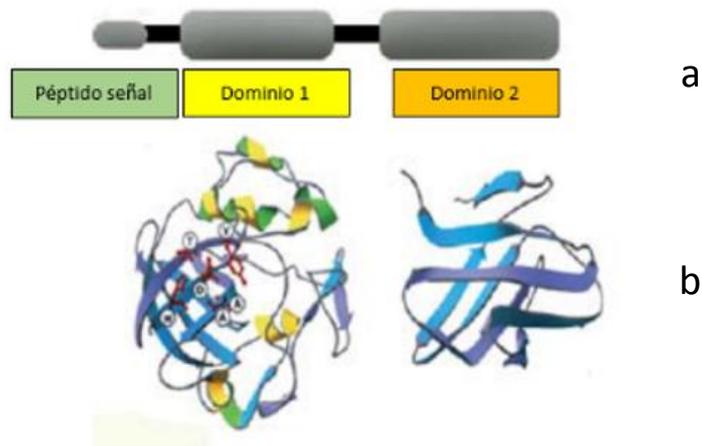


Figura 5. Representación gráfica de los dominios D1 y D2 de las expansinas.

Adaptado de Sampedro y Cosgrove, 2005.

- a) Esquema general de ambos dominios.
- b) Modelo estructural de ambos dominios.

Entre ambos dominios se ha identificado una superficie de unión a polisacáridos (PBS). Este PBS se encuentra en la cara superior de ambos dominios (*Figura 6*). Los residuos aminoacídicos que forman el PBS se encuentran conservados entre las expansinas de las plantas y las expansinas de las bacterias (Nikolaidis et al., 2013).

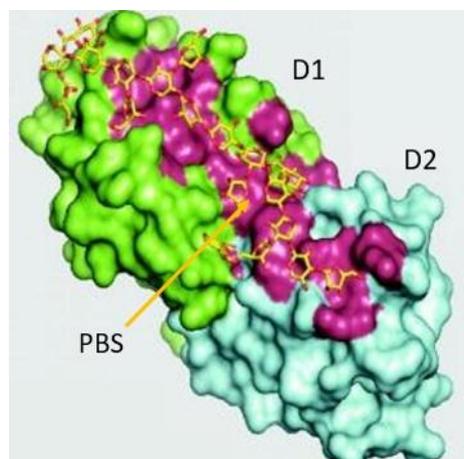


Figura 6. Modelo estructural de la superficie de unión a polisacáridos (PBS) de la expansina del maíz (EXPB1).

Adaptado de Yennawar et al., 2006.

2.3.4 Función de las expansinas

Las expansinas tienen la capacidad de unirse a las paredes celulares de las plantas (Kim et al., 2009). Estudios de mutagénesis dirigida en BsEXLX1, han demostrado que la superficie aromática del dominio D2 es indispensable para la unión a la celulosa, mientras que los residuos D71, Y73 y D82 localizados en el D1 están involucrados en el aflojamiento de la pared (Georgelis, et al., 2012). El D2 de las expansinas se une a la celulosa cristalina a través de residuos aromáticos conservados. Esta interacción D2-celulosa cristalina, se asemeja a la existente entre el CBM de tipo A y la celulosa (Kerff et al., 2008). La unión de las expansinas a la celulosa cristalina bacteriana o a la celulosa microcristalina (Avicel) no se afecta a bajas temperaturas, debido a que se lleva a cabo un proceso de entropía reversible (Georgelis et al., 2012). Los principales residuos involucrados en la interacción del D2 con la celulosa son W125 y W126 permitiendo que la expansina pueda deslizarse sobre la superficie hidrófoba de la celulosa cristalina a través de la superficie aromática formada por estos residuos (Silveira y Skaf, 2016). También se produce la formación de puentes de hidrógeno entre K119 y el residuo G5 de la molécula de celohexaosa, lo cual apunta a que la función principal de D2 es la de unirse al sustrato.

2.4. Técnicas utilizadas para la medición de la interacción de proteínas

La microscopía confocal es una técnica que proporciona una resolución óptica tridimensional de un determinado objeto. El microscopio confocal ilumina y detecta la luz fluorescente emitida luego de excitar una muestra debidamente marcada con moléculas que emiten fluorescencia como los fluoróforos o genes que codifican para proteínas fluorescentes como la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) o la proteína amarilla fluorescente (YFP, del inglés *yellow fluorescent protein*) (Mullineaux, 2007). La principal ventaja de un microscopio confocal es su alta capacidad óptica de obtener señal de una o varias secciones voluminosas de la muestra de estudio. La

microscopía confocal es el método óptimo empleado para visualizar la co-localización intracelular de proteínas en células o tejidos (Miyashita, 2004).

Las proteínas pueden marcarse con fluoróforos y con sondas específicas. La tecnología de etiqueta de proteínas (Halo-Tag) es una herramienta versátil para el estudio de la interacción molecular en las células. El principio de la técnica se basa en la conexión covalente directa de sondas orgánicas a una proteína específicamente diseñada que puede expresarse en células vivas (Daniels et al., 2014). El Halo-Tag es un haloalcano deshalogenasa modificada que está diseñada para unirse covalentemente a ligandos sintéticos (ligandos Halo-Tag). Los ligandos sintéticos comprenden un enlace cloroalcano que puede estar unido a fluoróforos o a superficies sólidas (Los et al., 2008). La formación de enlaces covalentes entre la etiqueta de proteína y el ligando es altamente específica, irreversible y se produce rápidamente en condiciones fisiológicas.

Por otra parte, existen técnicas que se basan en la emisión de fluorescencia cuando dos o más proteínas se unen específicamente a otras moléculas o a diferentes estructuras. La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, del inglés *förster resonance energy transfer*) se ha utilizado como técnica espectroscópica en: el análisis estructural de moléculas biológicas y sus interacciones, el análisis de ácidos nucleicos y la transducción de señales biológicas. FRET es una técnica principalmente empleada para detectar interacciones entre proteínas o la interacción de proteínas con estructuras celulares (Chen et al., 2013). Esta técnica se utiliza para determinar la distancia entre los dominios de una proteína y predecir la conformación de dicha proteína. Además, FRET es utilizada para detectar la ubicación y las interacciones de genes y diferentes estructuras celulares (Juette et al., 2014).

Los biosensores fluorescentes son empleados debido a que ofrecen propiedades ópticas superiores como: fluorescencia más brillante, facilidad de selección de longitudes de onda de excitación y emisión y la fotoestabilidad. Los biosensores de FRET se clasifican en dos categorías: del tipo

intermolecular y del tipo intramolecular. Los biosensores intermoleculares de FRET consisten en una proteína fusionada con una molécula donadora fluorescente y otra proteína fusionada con una molécula aceptora fluorescente. En el momento que ambas proteínas se asocian entre sí la molécula donadora entrega energía que es recibida por la molécula receptora y se genera señal fluorescente que se puede detectar. Por otro lado, los biosensores intramoleculares FRET consisten en construcciones moleculares capaces de expresarse en los genes de los sitios específicos donde se busca la interacción o aquellas biomoléculas que interaccionan con dicho sitio (Aoki et al., 2013).

A diferencia de las técnicas descritas, la técnica de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS, del inglés *fluorescence correlation spectroscopy*) se ha desarrollado progresivamente como un método aplicado en el estudio de la cinética química, la difusión molecular y la dinámica conformacional. Las ventajas que presenta este método son: el alta resolución espacial y temporal, un corto tiempo de análisis de los resultados y la utilización de poca muestra de estudio (Elson, 2011) . El parámetro de medición en FCS es la fluctuación de la intensidad de la fluorescencia. Esta fluctuación se produce a partir de efectos físicos, químicos, biológicos y además efectos aleatorios como el ruido. Estas fluctuaciones son analizadas durante la medición de correlación para proporcionar datos relevantes sobre el entorno en el que reside el fluoróforo (Tian et al., 2011).

FCS se ha convertido en una herramienta fundamental para las mediciones de concentración y agregación, el análisis de difusión y la determinación de la interacción molecular. El análisis de autocorrelación de las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia proporciona información sobre el tiempo de difusión y el número de moléculas fluorescentes presentes. Finalmente, un histograma de recuento de fotones es utilizado para examinar la relación entre la intensidad de fluorescencia y el número de moléculas fluorescentes, estimando el brillo promedio de la muestra (Herrick-Davis y Mazurkiewicz, 2013).

La técnica de FCS se ha empleado para investigar el movimiento molecular y la interacción entre moléculas o de las moléculas en las células o tejidos (Laurence et al., 2014). Uno de los avances claves para la mejora de la aplicación de FCS ha sido la optimización del diseño del microscopio y la eficiencia del detector de fluorescencia, permitiendo que la sensibilidad de una sola molécula sea reconocida. Las mejoras en los detectores y en la óptica han permitido reducir las irradiaciones de excitación, reduciendo la fototoxicidad y el fotoblanqueo (Woll, 2014).

Finalmente, una de las técnicas aun poco explotadas en el estudio de la interacción de proteínas es la espectroscopía de correlación de imágenes ráster (RICS, de inglés *raster image correlation spectroscopy*). RICS es una técnica de análisis de imágenes que permite medir el coeficiente de difusión y la concentración de proteínas marcadas fluorescentemente. La técnica de RICS puede detectar de manera indirecta la unión de las proteínas midiendo los cambios en los coeficientes de difusión (Wiseman, 2015). Los microscopios de barrido láser generan imágenes midiendo la intensidad de fluorescencia que emite la proteína marcada a través del área de un píxel (un píxel se refiere a la medición de intensidad fluorescente localizada). El valor de cada píxel se obtiene iluminando una región en el campo visual de la muestra y midiendo la intensidad de respuesta de la fluorescencia emitida. El ráster en RICS hace referencia al orden en que los píxeles se recogen para generar una imagen, donde el píxel superior izquierdo se mide primero y se continúa midiendo la fila de píxeles de izquierda a derecha. Debido a que de cada píxel se recoge información en un momento diferente, existen datos en cada imagen individual (Laňková et al., 2016).

El coeficiente de difusión y la concentración se calculan a partir de las imágenes escaneadas ráster utilizando el análisis RICS. En el análisis de RICS se eliminan los objetos estacionarios y aquellos que se mueven lentamente en el fondo, de tal manera que la suma de dicho fondo resta el promedio de todas las imágenes de cada imagen. Sin embargo, ya que las células no se

mantienen inmóviles se puede despreciar el fondo de la imagen obteniendo valores reales para cada proteína (Rossow et al., 2010).

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la obtención de la expansina PcEx11 recombinante, se realizó la transformación de la cepa *E. coli* BL21 con el plásmido pET22b-PcEx11 que contenía el gen de la expansina. Luego de que se expresó la proteína y se extrajo de la membrana celular de la bacteria mediante osmosis, se cuantificó su concentración y se concentró hasta llegar a 10 µg/mL. Una vez obtenida la expansina se realizaron experimentos de unión a celulosa cristalina (Avicel) de la proteína congelada y no congelada para determinar la pérdida de la capacidad de unión por congelamiento. Una vez determinada la resistencia de la expansina, se marcó la PcEx11 con el fluoróforo Cy5 y se unió a los diferentes xilemas de los vegetales. Posterior, se realizaron ensayos de infección con *Pectobacterium carotovorum*, bacteria de donde se obtuvo el gen de la expansina, para verificar la infección sobre los vegetales donde se unió PcEx11. Se observó mediante microscopía confocal el sitio específico de unión, resultando en la unión preferente a las fibras helicoidales sobre las fibras lineales que conforman los haces vasculares del xilema. Se estudió la cristalinidad, la textura y la composición de azúcares de ambas fibras para determinar las diferencias estructurales y de azúcares por las cuales la expansina prefiere un tipo de fibra específica (*Figura 7*).

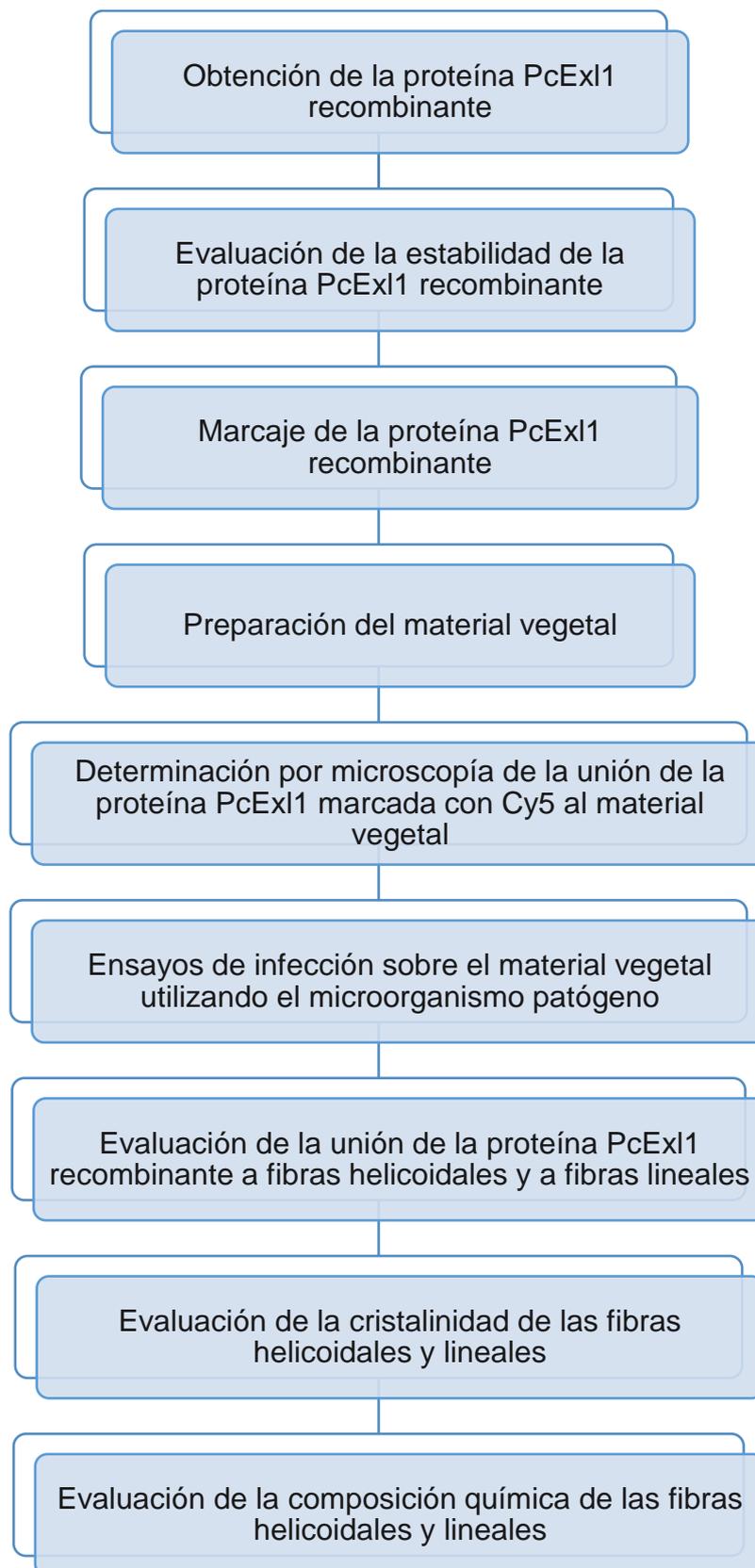


Figura 7. Esquema general de los contenidos de la metodología empleada en los experimentos.

4. PROCEDIMIENTOS

4.1 Población y muestra

Los vegetales empleados en el trabajo se compraron en el campo práctico del Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Morelos, México. El apio se seleccionó con un tallo de altura de aproximadamente 30 cm, de color blanco verdoso y sin signos de resequeidad. El kale fue seleccionado teniendo en cuenta el vigor del tallo y una altura de 10 cm, se escogieron aquellos más firmes, los tallos presentaban color morado oscuro y ningún signo de deterioro. La verdolaga fue seleccionada con tallos de aproximadamente 15 cm, de color verde claro y sin presentar ningún signo de blandura en la planta. El betabel fue seleccionado con tallos de aproximadamente 15 cm, de color violeta oscuro y sin signos de daños o manchas. Para el ruibarbo se tomaron plantas con tallos de aproximadamente 55 cm de largo, que presentaban vigor y un color café-violeta, sin ninguna herida o presencia de manchas. Para la acelga se seleccionaron plantas con tallos de color rosado de aproximadamente 20 cm de largo y que no presentaran rugosidad en la parte central del tallo (resequeidad). El laboratorio cuenta con dos cepas ambientales de *Pectobacterium carotovorum*, que son: la cepa BF45, aislada de *Nicotiana tabacum* infectada y la cepa 101, aislada de *Opuntia ficus-indica* donadas por el Dr. Oscar Mascorro de la Universidad Autónoma de Chapingo, México (García, 2010).

4.2 Materiales

Reactivos: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Thermofisher Scientific, EE.UU), marcador de peso (Thermofisher Scientific, EE.UU), solución amortiguadora de carga 4X (Thermofisher Scientific, EE.UU), reactivo de Bradford (BIO-RAD, EE.UU), celulosa microcristalina (Avicel) (Sigma-Aldrich, EE.UU), 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinaetanosulfónico (hepes) (Sigma-Aldrich, EE.UU), juego de reactivos de marcaje de proteínas (contiene:

carbonato sódico (Na_2CO_3), agua ultra pura y fluoróforo Cy5) (Jena Bioscience, Alemania), NaOH (Avantor, J.T.Baker®, EE.UU), hipoclorito de sodio (cloro comercial), ácido acético glacial al 100 % (Merck Millipore, EE.UU), solución amortiguadora salina de fosfatos (Sigma-Aldrich, EE.UU), ácido 3-5 dinitro salicílico (DNS) (Sigma-Aldrich, EE.UU), glucosa (Sigma-Aldrich, EE.UU) y ácido sulfúrico 99% (H_2SO_4) (Avantor, J.T.Baker®, EE.UU).

Enzimas: endo-1-4- β -celulasa de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich, EE.UU) y xilanasa de *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma-Aldrich, EE.UU).

Plásmidos: pET22b-S/N (Novagen, Merck Millipore, EE.UU).

Otros insumos: medio líquido LB (Sigma-Aldrich, EE.UU), medio sólido LB (Sigma-Aldrich, EE.UU), ampicilina (ThermoFisher Scientific, EE.UU), solución SET (sacarosa 1 mol/L, EDTA 0,040 mol/L y Tris-HCl 0,050 mol/L), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, EE.UU), membrana de transferencia Inmobilon-P (Merck Millipore, EE.UU), tris solución amortiguadora salina (TBS) (Bio-Rad, EE.UU), juego de reactivos cromogénico HRP (Abcam's, EE.UU), membrana de diálisis (Spectrum labs, Spectra/Por®, EE.UU), columna de polietersulfona Vivaspin 20 (GE Healthcare Life Sciences, EE.UU), solución amortiguadora de fosfatos (Avantor, J.T.Baker®, EE.UU), solución amortiguadora de acetato, membrana de 0,45 μm (Merck Millipore, EE.UU), carbonato de calcio (CaCO_3) (Medi-Lab, J.T.Baker®, México), celobiosa (Sigma-Aldrich, EE.UU), glucosa (Sigma-Aldrich, EE.UU), xilosa (Fisher Scientific, J.T.Baker®, EE.UU), galactosa (Sigma-Aldrich, EE.UU), arabinosa (Sigma-Aldrich, EE.UU) y manosa (Merck Millipore, EE.UU).

4.3 Métodos para la obtención de los datos

4.3.1 Obtención de la proteína PcExI1 recombinante

Expresión y extracción de la proteína PcExI1

Para la transformación de la cepa *E. coli* BL21, se utilizó el plásmido pET22b-PcExI1 que contenía el gen de la expansina construido por el Dr. Olarte en el

Laboratorio de síntesis de proteínas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México. Se añadió 2 μL del plásmido previamente descrito en un tubo que contenía 60 μL de la cepa *E. coli* BL21 y se dejó reposar por 30 min en hielo. Posteriormente, se provocó un choque térmico en las células utilizando un baño maría a 42 °C por 45 segundos, para luego rápidamente pasar a hielo. Se agregaron los 60 μL a un tubo con 1 mL de medio líquido LB y se incubó por una hora a 37 °C y 200 rpm. Se preparó una caja de medio sólido LB con ampicilina (100 mg/mL) y se sembraron 300 μL de las células transformadas. Se incubaron las células transformadas toda la noche a 37 °C sin agitación.

La expresión de la proteína se realizó en matraces de un litro que contenían: 500 mL de medio LB, 500 μL de ampicilina (100 mg/mL) y 500 μL de cultivo de las células de *E. coli* BL21 transformantes a 37 °C y 200 rpm, hasta alcanzar una DO de 0.8-0.9 ($\lambda=600$ nm). La inducción se realizó utilizando 10 μL de IPTG a una concentración final de 100 μM , y se continuó la incubación toda la noche a 16 °C y 200 rpm.

El plásmido pET22-PcEx11 contiene un péptido señal de exportación al periplasma, por lo cual se procedió a extraer la proteína mediante osmosis rompiendo la membrana empleando una solución llamada SET y una segunda de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,020 mol/L. Se colocaron en dos tubos falcón los cultivos inducidos y se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min, luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 5 mL de la solución SET, se mantuvo en frío por 20 min y se centrifugó a 7000 rpm por 30 min. Una vez terminada la centrifugación se recolectó el sobrenadante. Se resuspendió nuevamente el pellet con 5 mL de la solución de MgSO_4 , se mantuvo en frío por 20 min y se centrifugó nuevamente a 7000 rpm por 30 min, al finalizar se guardó el sobrenadante a 4 °C. Posterior a la extracción, se obtuvieron dos fracciones de la proteína: una fracción SET y otra fracción MgSO_4 . De cada fracción se tomaron 20 μL y se mezclaron con 5 μL de solución amortiguadora de carga 4X, la mezcla se calentó a 95 °C por 5 min y se realizó un gel de

electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12%, utilizando el marcador de peso (PageRuler™ Prestained Protein Lander) de las fracciones de la proteína extraídas por ósmosis. Finalmente se almacenó la fracción de MgSO₄ para su utilización en los experimentos posteriores, debido a la facilidad de remoción del magnesio comparado con la de sacarosa.

Para determinar que la proteína es la expansina de interés, se procedió a realizar un Western blot de la fracción de MgSO₄. Se cortó un fragmento de 5 cm de alto x 8 cm de largo de una membrana de transferencia Immobilon-P, misma que se sumergió en metanol durante dos minutos para activarla. Se cortaron 4 fragmentos con medidas similares de papel filtro grueso. Tanto la membrana como los papeles filtro fueron remojados en solución amortiguadora de transferencia que contenía tris, glicina, SDS y 20% metanol por un minuto. Posteriormente, se colocaron dos papeles filtros juntos, seguidos por la membrana y sobre esta el gel SDS-PAGE, finalmente dos papeles filtros en la parte superior del gel. Se transfirieron las bandas utilizando el equipo Amersham ECL Semi-Dry Blotters (Hoefer SemiPhor, GE Healthcare Life Sciences, EE.UU) a 32 mA. Una vez terminada la transferencia se bloqueó la membrana con leche en polvo (2,5 g en 50 mL de TBS 1X). Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 hora en agitación con el anticuerpo α -Exl1 de conejo a dilución 1:4000, para luego realizar 3 lavados cada uno de 5 min con TBS 1X. Posterior a los lavados, se incubó durante 1 hora la membrana con anticuerpo anticonejo α -HRP a dilución 1:3000. Se realizaron nuevamente 3 lavados con TBS 1X y se procedió a revelar la proteína con el juego de reactivos cromogénico HRP agregando 2 mL sobre la membrana.

Diálisis de la proteína PcEx11

Una vez identificada la expansina utilizando el Western blot, se procedió a dializar la fracción de MgSO₄ mediante una membrana de diálisis de 12-14 kDa contra solución amortiguadora de fosfatos 0,020 mol/L a pH 7,5 durante 12 horas para eliminar el MgSO₄. Posteriormente, se realizó un ensayo de

Bradford para cuantificar la concentración de la proteína extraída incubando con el reactivo de ensayo de proteína diluido 1:5, y lectura en el espectrofotómetro Du® 730 UV/VIS (Beckman Coulter, EE.UU) a $\lambda = 595$ nm. Después, se procedió a concentrar la proteína mediante una columna de polietersulfona Vivaspin 20, se midió la concentración de la proteína al inicio de los ciclos de centrifugado utilizando la curva de calibrado del reactivo Bradford (Anexo 1). Se realizaron varios ciclos de centrifugado de la columna a 7000 revoluciones por minuto (rpm) en intervalos de 30 min, una vez terminado cada ciclo se midió nuevamente la concentración de la proteína hasta obtener una concentración final de 10 mg/mL.

4.3.2 Evaluación de la unión de la proteína PcEx11 recombinante

Se realizaron ensayos de unión de la proteína PcEx11 al Avicel para comprobar que la proteína se uniera al sustrato. Para lo cual, se congelaron 10 μ L de la proteína obtenida en la extracción por $MgSO_4$, descongelándola luego de dos semanas para determinar si la proteína no perdía su capacidad de unión con el paso del tiempo. Para estos ensayos se pesó 1 mg de Avicel que reaccionó con 5 μ g de la expansina PcEx11 y 39 μ L solución amortiguadora hepes 0,020 mol/L a pH 7,5 durante una hora a 30 °C. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm en una minicentrífuga de mesa durante 10 min y se recogió el sobrenadante de la reacción y se lavó el pellet de la reacción 3 veces con la misma solución amortiguadora hepes. Al pellet se añadieron 20 μ L de solución amortiguadora de carga y se hirvió a 95 °C por 5 min. Del sobrenadante se tomaron 20 μ L y se añadió 5 μ L de solución amortiguadora de carga y se hirvió a 95 °C por 5 min. Ambas muestras se corrieron en un SDS-PAGE al 12 %. Los experimentos se realizaron por triplicado. Para calcular el porcentaje de proteína que se une al Avicel, se realizó una curva de calibrado de la cantidad expansina en diferentes cantidades: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 (μ g) corridos en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 12 % (Anexo 2). La intensidad de cada banda se calculó utilizando el programa Image Lab de BioRad (EE.UU) y se graficó contra la concentración de proteína.

4.3.3 Marcaje de la proteína PcEx11 recombinante

Para el marcaje de PcEx11 con el fluoróforo Cy5, se utilizó el juego de reactivos de marcaje de proteínas (Jena Bioscience, Alemania), donde se mezclaron 108 μL de la proteína (10 mg/mL) con 12 μL de una solución de Na_2CO_3 . En un tubo de agregaron 120 μL de la mezcla de PcEx11- Na_2CO_3 y se mezcló con 100 μL del fluoróforo en solución Cy5. La reacción de marcaje se llevó acabo a 4 °C en agitación por 24 horas sin exponer el tubo a la luz. Para separar el exceso de fluoróforo no incorporado, se pasó la proteína marcada con Cy5 por una resina Sephadex G-10 (GE Healthcare Life Sciences, EE.UU) a un caudal de 0,5 mL/min y se eluyó utilizando una solución amortiguadora de fosfatos 0,020 mol/L a pH 7,5. Se recogieron los primeros 20 mL eluidos en tubos (1 mL/tubo) y se almacenaron a 4 °C. Con el fin de determinar en cual de los tubos eluyó la proteína marcada, se realizó un ensayo de Bradford donde reaccionaron 25 μL de reactivo de ensayo de proteína, 25 μL de solución amortiguadora de fosfatos 0,020 mol/L a pH 7,5 y 75 μL de la solución recogida de los tubos. Una vez reconocidos los tubos donde eluyó la proteína marcada, se separaron los tubos que mostraron cambio de coloración y se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12%.

4.3.4 Preparación del material vegetal

Se procedió a aislar de manera manual los haces vasculares de distintos vegetales: apio, kale, verdolaga, betabel, ruibarbo y acelga. Una vez aislados los haces vasculares de cada vegetal, se hirvieron por 30 minutos. A continuación, se sumergieron en una solución de NaOH al 5 % durante una hora. Una vez culminada la hora, se lavó el material vegetal con abundante agua destilada. Posteriormente, se sumergieron en una solución que contenía 40 mL de hipoclorito de sodio, 7,5 mL de ácido acético glacial y 452,5 mL de agua destilada. En esta solución los haces se incubaron a 37 °C por una hora sin agitación. Una vez realizado el tratamiento se procedió a lavar el tejido vegetal con abundante agua destilada hasta que el pH no varió de 5 y se

guardó el material a 4 °C. Este tratamiento se realizó con el fin de decolorar el xilema de los vegetales y para que no presenten autofluorescencia en los ensayos de microscopía confocal.

4.3.5 Determinación por microscopía de la unión de la proteína PcExI1 marcada con Cy5 al material vegetal

Se cortaron fragmentos de aproximadamente 3 cm del xilema de cada vegetal. Posteriormente, se colocaron los fragmentos en frascos de vidrio pequeños y se añadieron 50 µL de la proteína marcada. Todas las muestras se incubaron en una plancha de agitación constante a 4 °C durante toda la noche. Se recogió cada fragmento de cada vegetal y se colocaron en un porta objeto. Sobre el material vegetal se añadió 1 mL de PBS 1X y se colocó sobre cada muestra un cubre objeto. Los portaobjetos de los diferentes vegetales se colocaron en el Microscopio Confocal FluoView™1000 (IX81 Invertido) (Olympus, Japón) con una apertura focal de 0,5 y con modelo de lente UPLFL 40X y se observó la fluorescencia. Los fluoróforos fueron excitados a una longitud de onda de 635nm con el láser rojo, ajustando el porcentaje de láser utilizado y las condiciones de visibilidad de la fluorescencia. Los resultados fueron recogidos a una emisión de 664 nm y las imágenes fueron procesadas por el programa de imágenes Fiji que facilita la visualización de imágenes. Como control negativo se utilizaron los fragmentos de 3 cm de todos los vegetales tratados de igual manera como se describió en el punto 4.3.4, pero sin marcarse con el fluoróforo Cy5.

4.3.6 Ensayos de infección sobre el material vegetal utilizando el microorganismo patógeno

Para comprobar si las cepas de *Pectobacterium carotovorum* BF45 y 108, eran capaces de infectar los vegetales, se realizaron 60 cortes de los tallos de apio, kale, verdolaga, betabel, ruibarbo y acelga y se desinfectaron utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 5%. Se realizaron 14 infecciones y un control negativo para la cepa de *Pectobacterium carotovorum* BF45 y para la cepa de

Pectobacterium carotovorum 108 y para cada tiempo de infección (24 y 48 horas). El procedimiento consistió en realizar un corte de aproximadamente 5 cm a cada tallo con ayuda de un cúter y colocar 10 μ L de 10^8 células para cada cepa. En el control negativo se añadieron 10 μ L de medio LB. Posteriormente, los tallos fueron envueltos en papel húmedo y se incubaron a 30 °C por 24 y 48 horas. Antes de realizar la infección se registró el peso inicial de cada tallo. Una vez transcurrido el tiempo de la infección, se sacaron los tallos infectados y se procedió a retirar el tejido blando raspando con una espátula la zona afectada. Se pesaron y registraron los pesos de los vegetales post-infección. Se realizó un diagrama de cajas del % de pérdida de peso por maceración para cada cepa tomando los datos de la infección a las 48 horas.

4.3.7 Evaluación de la unión de la proteína PcExI1 recombinante pura a fibras helicoidales y a fibras lineales

El tratamiento con hipoclorito de sodio y ácido acético glacial de los haces vasculares de los vegetales permitió observar fibras helicoidales y fibras lineales, que fueron separadas de manera manual bajo el microscopio óptico CX31 (Olympus, EE.UU), utilizando las agujas de jeringuillas de insulina. Se realizaron experimentos de unión de la expansina sin marcar a las diferentes fibras. Se pesaron 20 mg tanto de fibras helicoidales como de fibras lineales y como control positivo de la unión 20 mg de Avicel que reaccionaron en 50 μ L totales: con 10 μ g de la expansina PcExI1 y 39 μ L solución amortiguadora hepes 0,020 mol/L a pH 7,5 durante una hora a 30 °C. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm por 10 min en una minicentrífuga de mesa y se recogió el sobrenadante de las reacciones y se lavó el pellet para cada muestra 3 veces con la misma solución amortiguadora hepes. Al pellet se añadieron 20 μ L de solución amortiguadora de carga y se hirvió a 95 °C por 5 min. Para el sobrenadante se añadió 5 μ L de solución amortiguadora de carga y se hirvió a 95 °C por 5 min. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en un gel al 12%. La cantidad de proteína pegada en las fibras se calculó mediante el

programa Image Lab-Quantify tools y la curva de calibrado de PcExl1 (Anexo 3). Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.3.8 Evaluación de la cristalinidad de las fibras helicoidales y lineales

Actividad enzimática

Se pesaron 20 mg tanto de fibras helicoidales como de fibras lineales y se llevaron a cabo las reacciones con 1 unidad de la enzima endo-1-4- β -celulasa de *Trichoderma reesei* y con 1 unidad de la enzima xilanasa de *Trichoderma longibrachiatum*, por separado, para cada tipo de fibra como se describen a continuación: a) 12 μ L de la endo-celulasa (0.86 U/ μ L) y 488 μ L de la solución amortiguadora de acetato 0,050 mol/L pH 5, b) en vez de celulasa se colocó 12 μ L de agua destilada y 488 μ L de la solución amortiguadora de acetato 0,050 mol/L pH 5, c) 12 μ L de la endo-celulasa (0.86 U/ μ L), 10 μ L de la expansina PcExl1 (10 mg/mL), 478 μ L de la solución amortiguadora de acetato 0,050 mol/L pH 5, d) 12 μ L de agua destilada, 10 μ L de la expansina PcExl1 (10 mg/mL) y 478 μ L de la solución amortiguadora de acetato 0,050 mol/L pH 5, e) 10 μ L de la xilanasa (1 U/ μ L) y 490 μ L de la solución amortiguadora de acetato 0,050 mol/L pH 4,5, f) en vez de xilanasa se colocó 10 μ L de agua destilada y 490 μ L de la solución amortiguadora de acetato 0,050 mol/L pH 4,5, g) 10 μ L de la xilanasa (1 U/ μ L), 10 μ L de la expansina PcExl1 (10 mg/mL), 480 μ L de la solución amortiguadora de acetato 0,050 mol/L pH 4,5, h) 10 μ L de agua destilada, 10 μ L de la expansina PcExl1 (10 mg/mL) y 480 μ L de la solución amortiguadora de acetato 0,050 mol/L pH 4,5 .

Posteriormente, las muestras que contenían la endo-celulasa se incubaron a 50 °C y las que contenían la xilanasa se incubaron a 30 °C en un baño María y se tomaron 50 μ L de cada una a los tiempos de 30, 60, 90 y 120 min. Los 50 μ L de cada muestra se mezclaron con 50 μ L del reactivo DNS y se hirvieron por 5 min para luego dejarlos enfriar en hielo. A los 100 μ L de todas las muestras se añadieron 900 μ L de agua destilada y se midió el cambio de color de amarillo a café en el espectrofotómetro a 540 nm. El blanco de la medición

consistió de 50 μL de buffer acetato sin enzimas y 50 μL del reactivo DNS, hervido por 5 min y se añadió 900 μL de agua destilada. Para calcular la concentración de azúcares liberados (glucosa) de las reacciones enzimáticas, se realizó una curva de calibrado, graficando la concentración de glucosa 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 (mM) contra la intensidad del color desarrollado después de la reacción con el DNS: de cada concentración de glucosa se tomaron 100 μL y se mezclaron con 1 mL de reactivo DNS. Todas las muestras se hirvieron por 5 min y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a $\lambda = 540$ nm. Para calcular la concentración de azúcares liberados se realizó una curva de calibrado (Anexo 4), graficando la concentración de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 (mM) de glucosa contra la intensidad del color desarrollado después de la reacción con el DNS: de cada concentración de glucosa se tomaron 100 μL y se mezclaron con 1 mL de reactivo DNS. Todas las muestras se hirvieron por 5 min y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a $\lambda = 540$ nm.

Difracción de rayos X

El índice de cristalinidad y la textura de las fibras separadas (helicoidales y lineales) se determinaron por difracción de rayos X en la Universidad McMaster, Canadá.

4.3.9 Evaluación de la composición química de las fibras helicoidales y lineales

Hidrólisis ácida con H_2SO_4

Se separaron manualmente las fibras helicoidales y las fibras lineales, se pesaron y luego se secaron en un horno a 45 °C durante 30 minutos. Se utilizó un desecador para enfriar las muestras y nuevamente se tomó el peso de cada una. Posteriormente, en tubos de presión, se colocaron aproximadamente 30 mg de las fibras helicoidales que reaccionaron con 300 μL de H_2SO_4 al 72 % y 20 mg de las fibras lineales que reaccionaron con 200 μL de H_2SO_4 al 72 %

por separado. Ambas reacciones se mezclaron por un minuto y se incubaron a 30 °C durante una hora en el baño María, agitándolas cada 10 min para que el ácido actué sobre toda la muestra. Luego se agregaron 5,7 mL de agua destilada en la reacción de las fibras helicoidales y 4,8 mL de agua destilada en la reacción de las fibras lineales, para diluir el H₂SO₄. Se agitó cada tubo para evitar la separación de las fases y se autoclavaron por una hora a 121 °C con las condiciones para líquidos, después de lo cual, cada muestra se filtró por una membrana de 0,45 µm y se neutralizó el H₂SO₄ de la muestra agregando CaCO₃ puro hasta llegar a un pH de 5-6. Se decantó el sobrenadante de cada muestra y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min en una minicentrífuga de mesa. Se guardaron las muestras centrifugadas en frío a 4 °C hasta su posterior análisis.

Composición de azúcares

Inicialmente se pesaron 10 mg de los siguientes estándares de azúcares: celobiosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa. Cada uno se disolvió en 1 mL de agua destilada. El HPLC Ultimate Rs Pump 3000 (ThermoFisher Scientific, EE.UU) inyectó 10 µL de cada muestra en la columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, EE.UU), se analizaron las muestras a 247 psi a 85 °C y se identificaron los picos con el programa Chromeleon versión 6.9. Posterior, se realizaron curvas de calibrado tanto para la glucosa y xilosa (Anexo 5). Se inyectaron 1, 2, 3, 4 µL de glucosa (5 mg/L) y 1, 2, 3, 4 µL de xilosa (5 mg/mL) y con el programa Chromeleon versión 6.9 se calculó el área bajo la curva y dichos datos se graficaron contra cada cantidad de glucosa o xilosa inyectada. Finalmente se inyectaron 20 µL de cada muestra, se identificaron los picos con el programa Chromeleon versión 6.9 y los datos se graficaron contra cada cantidad de glucosa o xilosa inyectada.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Obtención de la proteína PcExl1 recombinante

Con el fin de obtener la expansina recombinante de PcExl1, se transformaron células de *E. coli* BL21. Estas células son utilizadas en estudios que requieren la obtención de altas cantidades de proteínas recombinantes (Jeong et al., 2015). El plásmido pET22-Exl1 que se insertó en las células de *E. coli* cuenta con un péptido señal de exportación al periplasma, evitando de esta manera que la expansina quede atrapada en forma de cuerpos de inclusión y facilitando el acceso de las soluciones que rompen la membrana para su extracción (Malik, 2016). El método más sencillo de extracción de proteínas en bacterias Gram-negativas consiste en un choque osmótico con una solución que contiene sacarosa en alta concentración para provocar la ruptura de la membrana, seguido de un segundo choque osmótico añadiendo una solución de magnesio para extraer el restante de la proteína retenida en el periplasma, evitando cualquier daño en la integridad de la proteína. En la *Figura 8* se observa que la proteína PcExl1 es obtenida en dos fracciones a partir del choque osmótico de las bacterias *E. coli* BL21. La fracción SET corresponde a la solución de sacarosa y la fracción MgSO₄ a la solución de magnesio utilizadas en la osmosis. Como control positivo se utilizó la proteína PcExl1 expresada anteriormente en el Laboratorio de Diseño y Síntesis de Proteínas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México y se observa que PcExl1 migra entre los 22 a 25 KDa al igual que el control. Debido a la facilidad de remoción del magnesio, se descartó la fracción SET y se utilizó la fracción MgSO₄ para los experimentos siguientes.

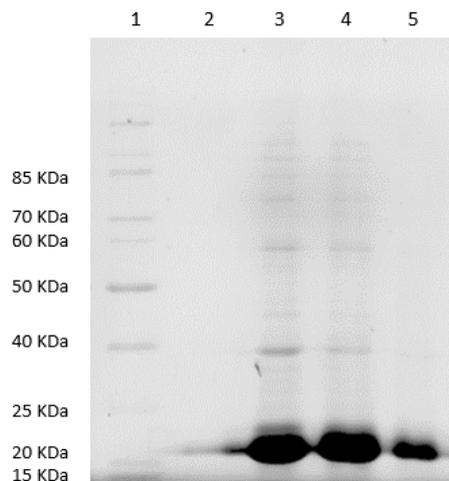


Figura 8. Gel de electroforesis SDS-PAGE de la extracción de la proteína PcEx11 del espacio periplasmático.

a) Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: vacío, carril 3: fracción SET, carril 4: fracción MgSO₄, carril 5: control positivo.

Aunque es muy posible que la banda observada se trate de la expansina PcEx11, tal como lo confirma el control positivo, la sola migración no permite identificar una proteína basándose en el peso molecular que ésta presenta. Existen diferentes factores que podrían alterar el nivel de corrida en gel; estos factores son: la concentración del gel de poliacrilamida, la estabilidad del gel y la naturaleza de la muestra.

Para confirmar la autenticidad de la expansina se realizó un Western blot con un anticuerpo específico para PcEx11. El anticuerpo no reconoce otras expansinas similares. Se observó que el anticuerpo anti-PcEx11 reconoce de manera específica a la expansina (*Figura 9*).



Figura 9. Western blot de la fracción MgSO₄ de PcEx11.

a) Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: fracción MgSO₄ de PcEx11.

5.2 Cuantificación de la proteína PcEx11 recombinante

Debido a la presencia de otras bandas inespecíficas y al magnesio de la solución, se realizó una diálisis a la fracción de MgSO₄ utilizando solución amortiguadora de fosfatos pH 7,5. El MgSO₄ es un compuesto que se encuentra en baja concentración en comparación con la sacarosa, que por su alta concentración presenta mayor dificultad de remoción por su viscosidad.

Una vez dializada la fracción de MgSO₄, la proteína fue concentrada en las columnas Vivaspin 20 por varios ciclos de centrifugación, hasta obtener una concentración final de 9,84 mg/mL, ya que la reacción de marcaje con fluoróforo requiere estos valores de concentración.

En la *Figura 10* se observa que la preparación de la proteína concentrada contiene pequeñas bandas inespecíficas de alto peso molecular que no fueron removidas con la diálisis. Sin embargo, la expansina PcEx11 es muy mayoritaria con relación a las bandas de alto peso molecular.

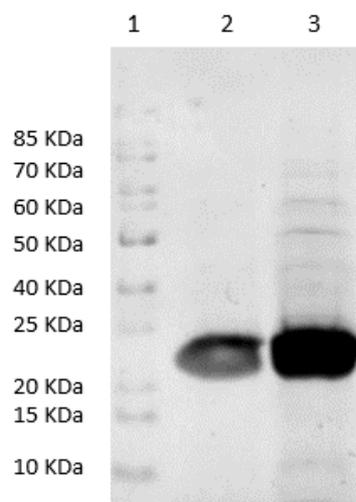


Figura 10. Gel de electroforesis SDS-PAGE de la proteína dializada y concentrada.

a) Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: fracción MgSO₄ dializada, carril 3: fracción MgSO₄ concentrada.

5.3 Interacción de la proteína PcEx11 recombinante con celulosa microcristalina

Una vez obtenida una preparación de la expansina concentrada, se determinó su capacidad de unión al sustrato Avicel. Debido a que los experimentos posteriores requieren que la proteína se almacene por largos periodos de tiempo, se determinó el efecto de la congelación sobre PcEx11 midiendo su capacidad de unirse al Avicel. El análisis se realizó descongelando la expansina dos semanas después de su preparación. La proteína congelada conservó su capacidad de unión al Avicel y también fue capaz de despegarse del sustrato (*Figura 11*). El sobrenadante fue la proteína tomada luego de la reacción que no se unió al Avicel y la sedimentación fue la proteína unida y despegada del Avicel.

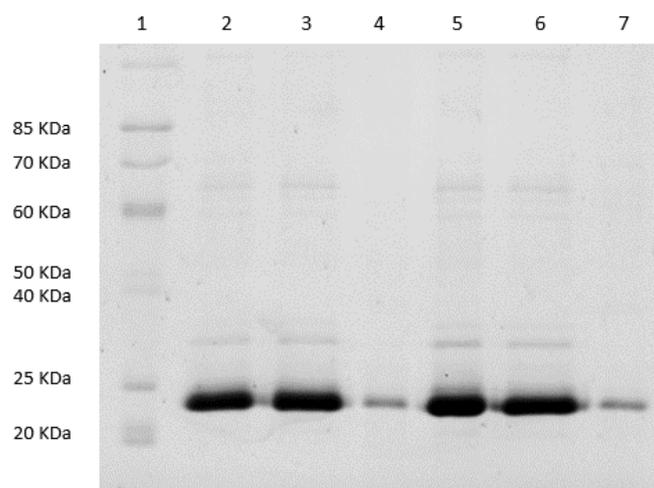


Figura 11. Gel de electroforesis SDS-PAGE de la comparación de las muestras de PcEx11 congelada y no congelada que reaccionaron con Avicel.

a) Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: 5 µg de PcEx11 sin congelar, carril 3: sobrenadante de PcEx11 sin congelar, carril 4: sedimentación de PcEx11 sin congelar, carril 5: 5 µg de PcEx11 congelada, carril 6: sobrenadante de PcEx11 congelada, carril 7: sedimentación de PcEx11 congelada.

Para cuantificar la unión, se realizó una curva de calibrado de intensidad de las bandas en gel vs cantidad de proteína, con ecuación: $y=394494x-170965$ (Anexo 3), donde y: intensidad y x: cantidad de proteína (µg). La intensidad obtenida con el programa Image Lab/Quantify tolos se extrapola de la curva de calibrado. Los valores de la unión se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1.

Cálculos del porcentaje de PcEx11 y PcEx11 congelada que se une al Avicel.

Muestras	Intensidad de banda	Cantidad de proteína (µg)	%
PcEx11	1795337,67	4,98	100
Sobrenadante	1102077,33	3,22	64,74
Sedimentación	382418	1,40	28,14
PcEx11 congelada	1721063	4,79	100
Sobrenadante	1316450,33	3,77	78,61
Sedimentación	191741	0,92	19,17

El porcentaje de proteína que se unió al Avicel correspondió al 28,14%, mientras que para la proteína congelada el valor obtenido fue de 19,17%. Existe una diferencia en la capacidad de la proteína congelada y la descongelada de unirse al Avicel, lo cual pudiera estar relacionado con la

formación de hielo en la muestra y cambios en su conformación, es decir desnaturalización por congelación, lo cual afecta la estabilidad de la proteína y disminuye su actividad (Cao et al., 2003). Sin embargo, la pérdida de capacidad de unión de la proteína es aproximadamente del 10%, lo que indica que la capacidad de unión de la proteína congelada no se afecta de manera relevante.

5.4 Marcaje de la proteína PcExl1 con el fluoróforo Cy5

Se utilizó la expansina marcada con el fluoróforo Cy5 para observar la interacción entre PcExl1 y el xilema de distintos vegetales. Para ello luego de la reacción de marcaje con Cy5 de los grupos amino de lisinas, se separó la proteína del fluoróforo no incorporado utilizando una resina Sephadex G-10. En esta cromatografía los fluoróforos son retenidos al pasar a través de los poros y la expansina al ser una molécula de mayor tamaño migra a mayor velocidad evitando los poros de la matriz, eluyendo en primer lugar (Kaseda et al., 2001). Como control positivo se utilizó la proteína PcExl1 expresada y purificada en los epígrafes 5.1 y 5.2. La proteína se recuperó a una concentración final de 7,2 mg/mL, lista para los ensayos de unión con el material vegetal (*Figura 12*).

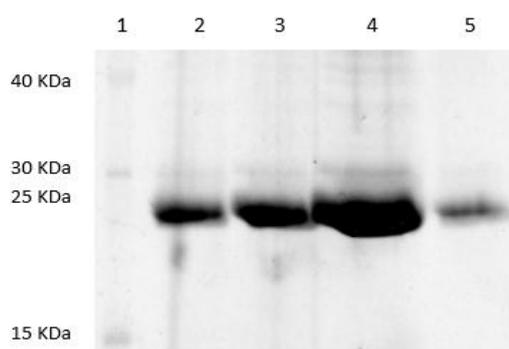


Figura 12. Gel de electroforesis SDS-PAGE de las 3 fracciones de la proteína PcExl1 recolectadas luego de eluir de la resina Sephadex G-10.

a) Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: primera fracción recolectada, carril 3: segunda fracción recolectada, carril 4: tercera fracción recolectada, carril 5: control positivo.

5.5 Determinación del sitio de unión de PcExl1 en el xilema de los vegetales

Después de incubar la proteína marcada con las fibras del xilema obtenidas de diferentes vegetales, las muestras se colocaron en el microscopio confocal invertido. Se requirió el 1% de la potencia total del láser para excitar a los fluoróforos y observar la fluorescencia de color rojo. El tratamiento químico explicado para aislar el xilema de los vegetales eliminó la pectina y la hemicelulosa contenida en el xilema, sin embargo la celulosa no se vio afectada, misma que se observó compuesta de dos tipos de fibras: fibras helicoidales y otras lineales. Se observó con claridad que la proteína PcExl1 se unió en todos los vegetales analizados, específicamente a estructuras de forma helicoidal distribuidas en toda la fibra (*Figuras 13 y 14*). Estos resultados coinciden con lo reportado por Olarte et al. (2016).

Estos autores informaron que la expansina PcExl1 marcada con el fluoróforo Cy3 en el tejido completo se dirige exclusivamente a los haces vasculares, marcando exactamente las mismas fibras helicoidales, debido a que estas zonas no poseen cargas electrostáticas que podrían repeler a PcExl1. De tal manera que la expansina PcExl1 se une preferentemente a la celulosa de la pared celular secundaria que conforma el xilema de las plantas. La zona que emite fluorescencia roja mostró a la proteína unida y al fluoróforo excitado con el láser rojo, la parte de campo claro mostró la zona del vegetal vista con luz blanca y la combinación mostró la zona vegetal que se marca con fluorescencia.

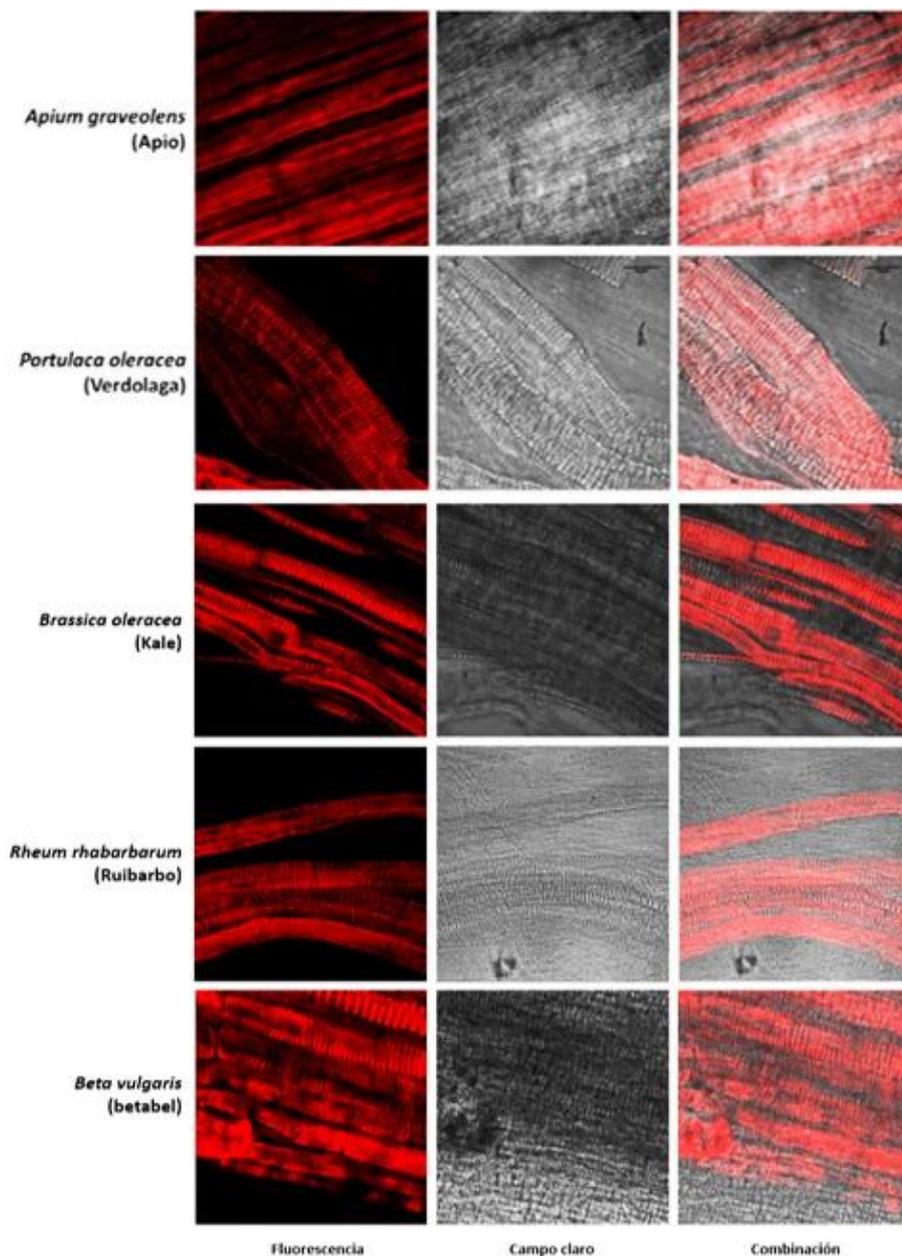


Figura 13. Microscopía de la localización de PcEx11 en xilema aislado de apio, verdolaga, kale, ruibarbo y betabel.

La unión de PcEx11 a las fibras helicoidales se repitió en el apio, la verdolaga, el kale, el ruibarbo, el betabel y de la misma manera en la acelga.

Sin embargo, cuando en la muestra de acelga se aumentó la potencia del láser hasta un 30% de su capacidad total, se observó que además de estas fibras helicoidales, se encontraban otras fibras con estructura lineal que también emitían fluorescencia (*Figura 14*). La proteína PcEx11 tuvo mayor afinidad por

las fibras helicoidales que por las fibras lineales, a pesar de que ambas parecen estar constituidas por pared celular secundaria resistente al tratamiento químico con el que se aislaron. En todos los vegetales al aumentar la potencia del láser al 30% se observó estas fibras lineales.

Beta vulgaris (Acelga)

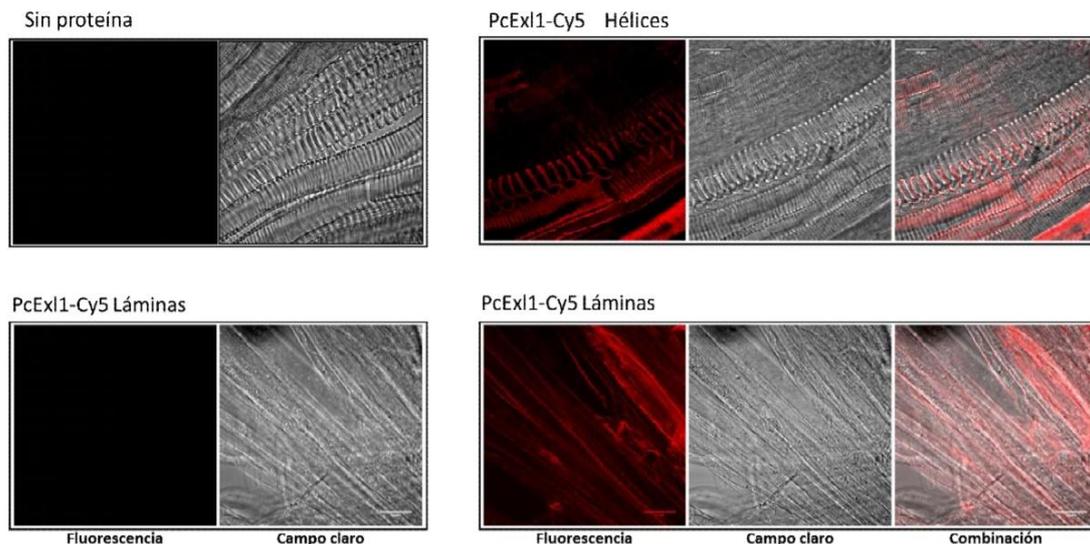


Figura 14. Microscopía de la localización de PcExl1 en xilema aislado de acelga.

5.6 Infección de los vegetales con las cepas *Pectobacterium* BF45 y 108

El análisis de unión de PcExl1 al xilema de diferentes especies no es indicativo de que estos vegetales sean susceptibles a la infección de *Pectobacterium carotovorum* (Waleron et al., 2015). Para determinar que vegetales eran susceptibles a la infección se analizó la infección mediante la pérdida de peso de los tallos de cada planta, inoculados con *P. carotovorum* en una herida en la parte frontal del tallo, ya que la infección causa la maceración del tejido. La cepa BF45 causó una pérdida de peso significativamente mayor que la cepa 101 en los casos en los que sí se estableció la infección, que fueron: apio, kale y verdolaga (*Figura 15*).

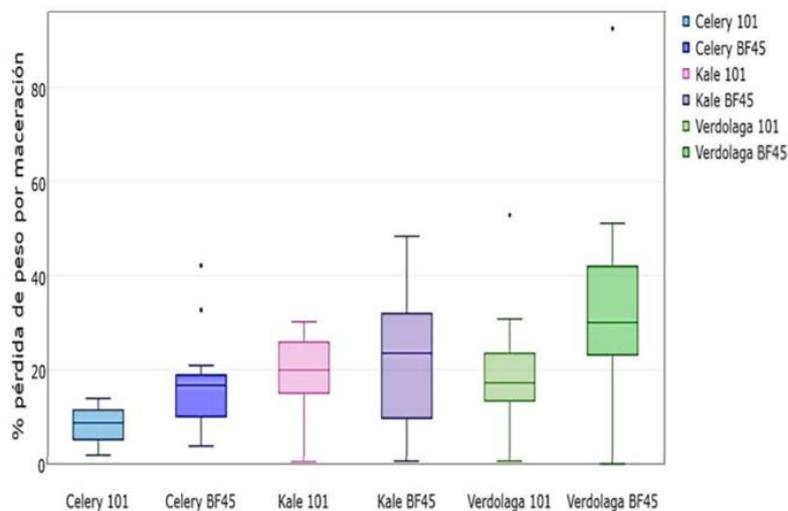


Figura 15. Porcentaje de pérdida de peso después de la infección del apio, kale y verdolaga con las cepas BF45 y 101 de *P. carotovorum* a las 48 horas de infección.

a) En el gráfico se muestra la media y la desviación estándar de las infecciones en apio, kale y verdolaga. La estadística se analizó con la prueba de Fisher $p < 0,05$.

Por otro lado, en el caso del betabel (remolacha) tanto el control negativo como los tallos infectados presentaron maceración y daño a nivel de tejido, por lo cual es difícil afirmar que *P. carotovorum* infectó esta especie vegetal o por el contrario el exceso de humedad afectó los tallos, incluso se desconoce si existió contaminación cruzada de un tallo a otro o si los vegetales al momento de ser comprados contenían alguna bacteria ajena que también cause maceración y que hubiera resistido la desinfección inicial.

En el caso de la acelga, no se observó infección ni daño del tejido; esto puede deberse a que el vegetal no brindó las condiciones ideales de humedad para que la bacteria pueda desarrollarse y multiplicarse de manera idónea, ya que se deshidrató a las condiciones de incubación. Finalmente, el ruibarbo tampoco se infectó, y en este caso podría deberse a que es un vegetal que produce metabolitos con actividad antimicrobiana (Brasileiro et al., 2006). En la Tabla 2 se muestra la recopilación de los experimentos de microscopía y de infección, donde se observó que la expansina PcEx11 es capaz de unirse a las fibras helicoidales del xilema de todos los vegetales, pero las cepas de *Pectobacterium* solo infectaron apio, kale y verdolaga.

Tabla 2.

Resumen de los experimentos de unión de PcEx11 al xilema de los vegetales e infección por P. carotovorum.

Vegetal	Hélices	Láminas	Infección
<i>Apium graveolens</i> (apio)	si	no	si
<i>Brassica oleracea</i> (kale)	si	no	si
<i>Portulaca oleracea</i> (verdolaga)	si	no	si
<i>Beta vulgaris</i> (betabel)	si	no	no*
<i>Rheum rhabarbarum</i> (ruibarbo)	si	no	no
<i>Beta vulgaris</i> (acelga)	si	no	no*

5.7 Evaluación de la unión de la proteína PcEx11 recombinante a las fibras helicoidales y a las fibras lineales

Como se mencionó anteriormente los dos tipos de fibras parecen estar compuestos de pared celular secundaria, que es rica en celulosa cristalina y lignina, pero se desconoce la razón que permiten que PcEx11 tenga una mayor afinidad por las fibras helicoidales en los experimentos de microscopía. Por esta razón se llevó a cabo la caracterización a diferentes niveles de cada fibra, requiriendo la separación física de cada una. Se separaron las fibras del xilema de la acelga ya que fueron más fáciles de manipular, permitiendo la obtención de fibras más íntegras.

Para determinar la diferencia de unión de la expansina por el haz vascular íntegro a cuando se separan las fibras lineales de las helicoidales que lo conforman, se realizaron experimentos donde la expansina es precipitada por su unión a los dos tipos de fibras y analizada en geles de poliacrilamida. Cada tipo de fibra reaccionó con la expansina PcEx11. En el carril 2 se colocaron los 10 µg de PcEx11 que reaccionaron con 1 mg de Avicel, 20 mg de fibras lineales y 20 mg de fibras helicoidales, el sobrenadante fue la proteína tomada luego de la reacción, y correspondió a la proteína que no se unió a los sustratos y la sedimentación fue la proteína unida y despegada del Avicel. La unión a Avicel se utilizó como control positivo, observándose que todas las muestras se

comportaron de manera similar en todos los experimentos, por lo cual se puede afirmar que el experimento se realizó de manera correcta (*Figura 16*).

Se observó que al comparar los sobrenadantes obtenidos, se observó que existe una menor cantidad de proteína después de la incubación con las fibras helicoidales en comparación con el sobrenadante de la incubación con las lineales. Esto sugiere que una menor cantidad de proteína se unió a las fibras lineales. Este resultado coincidió con lo observado por microscopía, donde la afinidad por las fibras helicoidales es mayor a la de las fibras lineales. La diferencia en los experimentos de precipitación podría deberse a que una sola molécula de proteína puede estar marcada en más de un residuo con fluoróforo (Pretzer y Wiktorowicz, 2008), dando la impresión de una afinidad mucho mayor de lo que realmente ocurre. Un resultado interesante es que la proteína no pudo ser despegada de las sedimentaciones como ocurre cuando se usa Avicel, por lo que no se observó ninguna banda en los carriles correspondientes, y esto sugiere que la unión de PcEx11 a las fibras en ambos casos es extremadamente fuerte, y que el tratamiento para desnaturalizar la proteína utilizando SDS y calor, no es lo suficientemente fuerte para romper la interacción de la expansina con el sustrato (Hernández y Ortega, 1988).

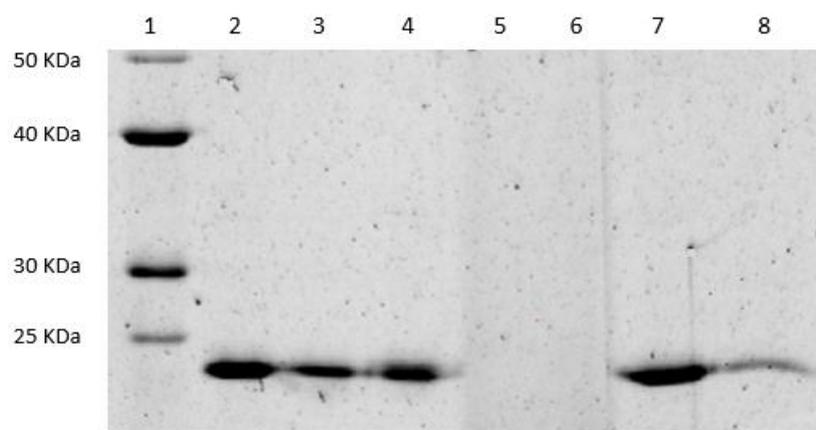


Figura 16. Gel de electroforesis SDS-PAGE de la unión de PcEx11 a las fibras helicoidales, a las fibras lineales y al Avicel.

a) Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: 10 μ g de PcEx11, carril 3: sobrenadante fibras helicoidales, carril 4: sobrenadante fibras lineales, carril 5: sedimentación fibras helicoidales, carril 6: sedimentación fibras lineales, carril 7: sobrenadante Avicel, carril 8: sedimentación Avicel.

Con la finalidad de cuantificar la unión de PcEx11 a las fibras helicoidales y a las fibras lineales, se utilizó nuevamente la curva de calibrado de intensidad vs cantidad de proteína (Anexo 3). Se extrapola la concentración de proteína remanente en el sobrenadante después de incubar con los dos tipos de fibras a partir de la curva de calibración de intensidad vs concentración, y se restó al valor originalmente agregado a la reacción para determinar el porcentaje de proteína unida y no unida por diferencia. El porcentaje de proteína no unida a las fibras lineales fue de 54,16%, mientras que en las fibras helicoidales fue de 41,83%, una diferencia de aproximadamente el 10% que indica que existe una diferencia de mayor afinidad de PcEx11 hacia las fibras helicoidales (Tabla 3).

Tabla 3.

Porcentaje de PcEx11 que no se unió a las fibras helicoidales, a las fibras lineales y al Avicel.

Muestras	Intensidad de banda	Cantidad de proteína (µg)	%
PcEx11	3669229	9,73	100
Sobrenadante helicoidales	1437609	4,07	41,83
Sobrenadante lineales	1906408	5,27	54,16
Sedimentación helicoidales	-	-	-
Sedimentación lineales	-	-	-
Sobrenadante Avicel	1885041	5,21	53,54
Sedimentación Avicel	566990	1,87	19,22

5.8 Evaluación de la cristalinidad y textura de las fibras helicoidales y lineales

Es clara la afinidad de PcEx11 hacia las fibras helicoidales. Sin embargo, es incierta la razón por lo cual las proteínas prefieren las fibras helicoidales en comparación sobre las fibras lineales. Una razón puede deberse a la diferencia de cristalinidad entre ambos tejidos. Por tal motivo se realizó un ensayo utilizando una endo-celulasa, que es una enzima capaz de actuar en zonas amorfas internas de la celulosa cortando los enlaces glucosídicos: mientras más celulosa amorfa exista más azúcares reductores son liberados al medio y se pueden cuantificar con una reacción colorimétrica con el reactivo DNS (Kostylev y Wilson, 2012).

Los resultados demostraron que al tratar las fibras helicoidales con la endo-celulasa se obtuvo un mayor desprendimiento de azúcares reductores (*Figura 17A*) en comparación con el caso de las fibras lineales tratadas con la misma enzima (*Figura 17B*); la diferencia fue de 3 veces más azúcares reductores liberados a partir de las fibras helicoidales, lo que indica que las fibras lineales presentan mayor cristalinidad, o a su vez que la celulosa se encuentra más expuesta a la acción enzimática. Szijártó et al. (2008), realizaron ensayos de liberación de azúcares reductores a partir de celulosa cristalina (Avicel) y de celulosa amorfa (PASC) utilizando una endo-celulasa heteróloga. Ellos observaron que el Avicel resiste al ataque de la enzima liberando menor cantidad de azúcares. También el trabajo realizado por Reyes-Ortiz et al. (2013), evidenció que al reaccionar dos endo-celulasas: a) Cel9A de *A. acidocaldarius* y Cel5A de *T. maritima* con la celulosa microcristalina (Avicel) y celulosa microcristalina tratada (IL-Avicel), existe una mínima liberación de azúcares reductores en ambas reacciones.

Para conocer si la expansina pudiera ayudar a la celulasa en la degradación de la celulosa, se repitieron las reacciones con ambas fibras por separado, pero agregando juntas las dos proteínas en la reacción (expansina y celulasa). En este experimento se observó una clara disminución de los azúcares liberados en ambas reacciones (*Figuras 17A y 17B*). Esto puede deberse a que la expansina se une al sitio de acción de la celulasa, influyendo en su actividad enzimática, resultado comparable con el trabajo realizado por Mendoza (2014), donde no se observó diferencia en la liberación de azúcares cuando la celulasa proveniente del hongo *Trichoderma reesei* actuó sobre el bagazo de maíz y el papel filtro, a cuando la celulasa reacciona junto a la expansina PcExl1. En el trabajo de Georgelis et al. (2014), no se observa sinergismo entre las expansinas: Asper-EXP, Ralstonia-EXP y Xantho-EXP y enzimas celulasas.

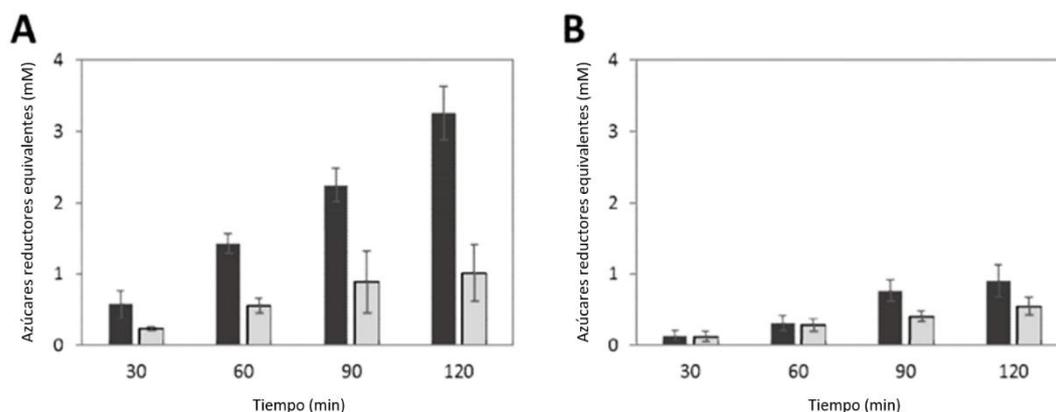


Figura 17. Gráfica de la actividad enzimática de una endo-celulasa sobre las fibras helicoidales y lineales de la acelga.

a) A: representa la cuantificación de azúcares reductores liberados de las fibras helicoidales a diferentes tiempos de reacción. B: representa la cuantificación de los azúcares reductores liberados a partir de fibras lineales a diferentes tiempos de reacción. Las barras en color negro son reacciones utilizando celulasa únicamente, y las barras en color gris son reacciones en las que se adicionó también expansina. En el gráfico se muestra la media y la desviación estándar de las reacciones de celulasa y celulasa con expansina. La estadística se analizó con la prueba de Fisher $p < 0,05$.

Con el fin de determinar el índice de cristalinidad de las fibras helicoidales y lineales por separado, se realizaron experimentos de difracción de rayos X, técnica utilizada principalmente para la identificación y caracterización de la cristalinidad de un determinado material basada en su patrón de difracción (de Oliveira et al., 2011). Se observó que el índice de cristalinidad para celulosa bacteriana cristalina (BMCC, del inglés *bacterial microcrystalline cellulose*) fue del 93% y este valor se utilizó como control positivo del índice de cristalinidad (Figura 18). Las fibras helicoidales tuvieron un índice de cristalinidad de 35%, mientras que el índice de cristalinidad de las fibras lineales fue del 40%, lo que pudiera explicar el resultado observado con la digestión enzimática. Aunque no existen estudios previos de cristalinidad acerca de ambas fibras, en el trabajo realizado por Cheng et al. (2009), se estudió la cristalinidad de BMCC de *Acetobacter xylinum*de, dándole un valor del 92%, muy similar al valor obtenido en el control de celulosa cristalina incluido en este experimento, también el trabajo de Kulkarni et al. (2012), mostró que el porcentaje de cristalinidad de una muestra BMCC de *Acetobacter xylinum*de es del 93%, valor similar al de los resultados obtenidos.

Aunque existió una diferencia del 5% en el índice de cristalinidad entre ambas fibras, la desviación estándar no muestra diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, como se observó en los experimentos de accesibilidad enzimática, esa diferencia podría ser relevante, y tener un efecto importante para la unión preferente de la proteína PcEx11 por las fibras helicoidales.

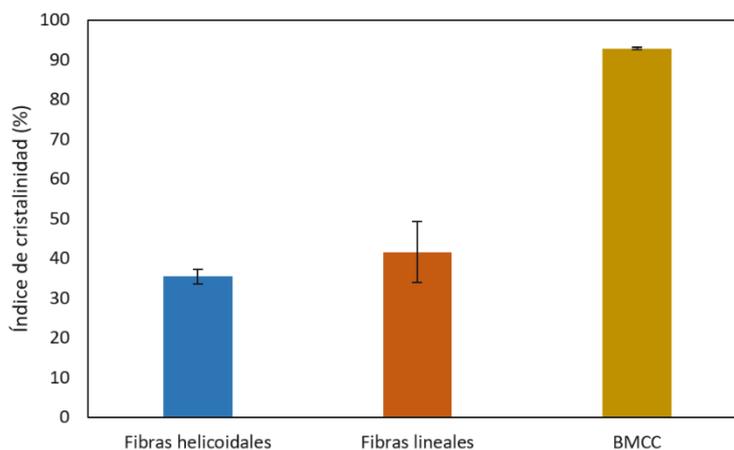


Figura 18. Gráfica de la comparación del índice de cristalinidad de las fibras helicoidales y lineales.

a) En el gráfico se muestra la media y la desviación estándar del índice de cristalinidad de las fibras helicoidales, de las fibras lineales y de la BMCC. La estadística se analizó con la prueba de Fisher $p < 0,05$.

Por otro lado, del análisis de difracción de rayos X se obtuvieron datos sobre la textura de las fibras. La textura se calculó midiendo la anchura a media altura (FWHM, del inglés *full width at half maximum*) de cada curva presente en los difractogramas de las fibras helicoidales, de las fibras lineales y nuevamente usando BMCC como control. La orientación del cristal o textura, se define como la condición a la cual la distribución de la orientación del cristal presenta una clara tendencia de ordenamiento (Dwi et al., 2012). La orientación del cristal puede evidenciarse por la intensidad del pico de difracción a un ángulo teta (2θ) específico (Dwi et al., 2013). Existió una clara diferencia en el FWHM, donde las fibras helicoidales presentaron un valor superior de 83,1 FWHM, comparado con 54,0 FWHM de las fibras lineales y 46,4 FWHM de la BMCC (*Figura 19*). La difracción de rayos X es muy sensible a cambios en el arreglo de un amplio rango de materiales cristalinos, debido a que las fibras lineales están

parcialmente ordenadas, apuntando todas en una misma dirección, su valor se asimila al valor de BMCC, tal como se evidencia en el trabajo realizado por (Ahvenainen et al., 2016), donde se muestra la imagen en 2D de la BMCC, ordenado de manera similar como en la imagen de la *Figura 20A*. La imagen de las fibras lineales (*Figura 20B*) presentó una apariencia intermedia entre el patrón de la BMCC y las fibras helicoidales (*Figura 20A y 20C*), indicando que las fibras helicoidales presentan diferentes arreglos geométricos (posiblemente debido a su misma forma helicoidal) (Gray, 2014). De tal manera podemos concluir que las fibras helicoidales presentan mayor grado de desorden, observándose menos alineadas que las otras dos muestras (*Figura 20C*).

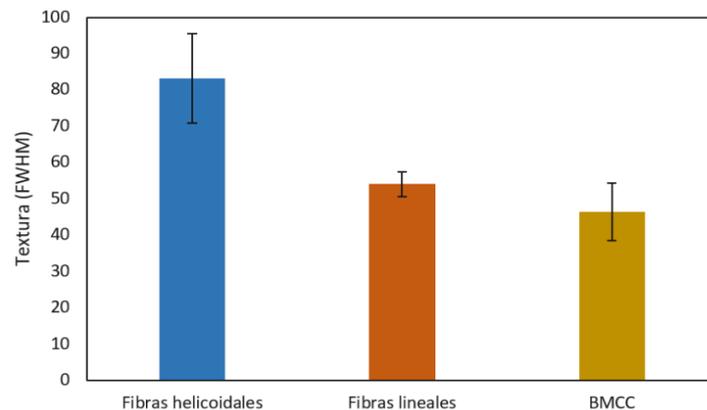


Figura 19. Gráfica de la textura de BMCC, de las fibras helicoidales y de las fibras lineales.

a) Existe mayor desorden de las fibras helicoidales comparada con las fibras lineales y la BMCC. En el gráfico se muestra la media y la desviación estándar de la textura de las fibras helicoidales, de las fibras lineales y de la BMCC. La estadística se analizó con la prueba de Fisher $p < 0,05$.

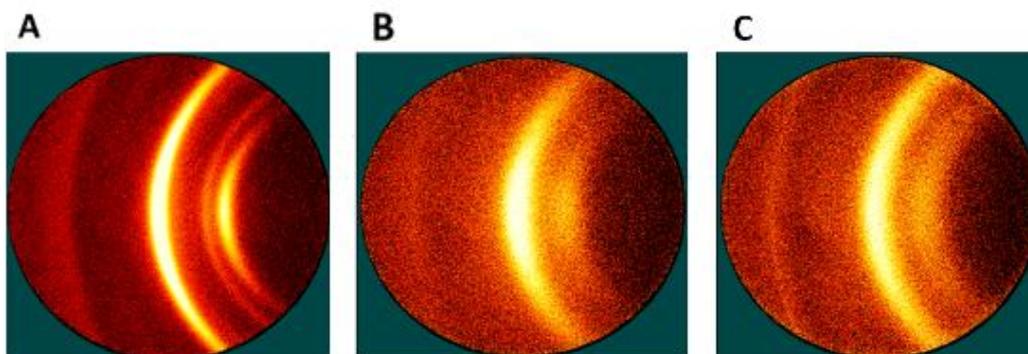


Figura 20. Análisis en 2D de los patrones de difracción de rayos X.

a) A: representa la imagen de la BMCC, B: representa la imagen de las fibras lineales y C: representa la imagen de las fibras helicoidales.

Este desorden en las fibras helicoidales, puede influenciar de manera notable en la preferencia de unión de PcExl1 por las fibras helicoidales, debido a que la proteína puede acceder con mayor facilidad en las hélices por los espacios libres existentes entre fibras, comparada con las fibras lineales que se encuentran ordenadas de manera mucho más sistemática.

5.9 Evaluación de la composición química de las fibras helicoidales y lineales

Se ha reportado que la composición de azúcares estructurales de los dos tipos de fibras aisladas a partir de apio, incluye a la glucosa como componente principal (75%), pero también se ha identificado xilosa en segundo lugar (entre el 16% para las hélices y 7% para las fibras lineales), mientras que arabinosa, galactosa y manosa se detectan en menor cantidad (entre 8% para las hélices y 15% para las fibras) (Gray, 2014). Sin embargo, no se ha caracterizado la composición de estos azúcares y su contenido en las muestras de los dos tipos de fibras de la acelga, por lo que a partir de dichas fibras por separado se llevó a cabo la hidrólisis total de la muestra usando ácido sulfúrico diluido y la posterior cuantificación de los azúcares mediante HPLC, usando estándares de: celobiosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa (Bernal et al., 1996).

Como se observa en las *Figuras 21A* y *21B*, los cromatogramas de ambas fibras presentaron picos para la glucosa, la xilosa, la galactosa y la arabinosa. No se observaron picos para celobiosa debido a que la hidrólisis fue completa, y para la manosa debido a un pico inherente a la columna del HPLC que afectó la determinación de este azúcar, por lo cual este no fue considerado en el análisis (Hooker y Van Heukelem, 2011).

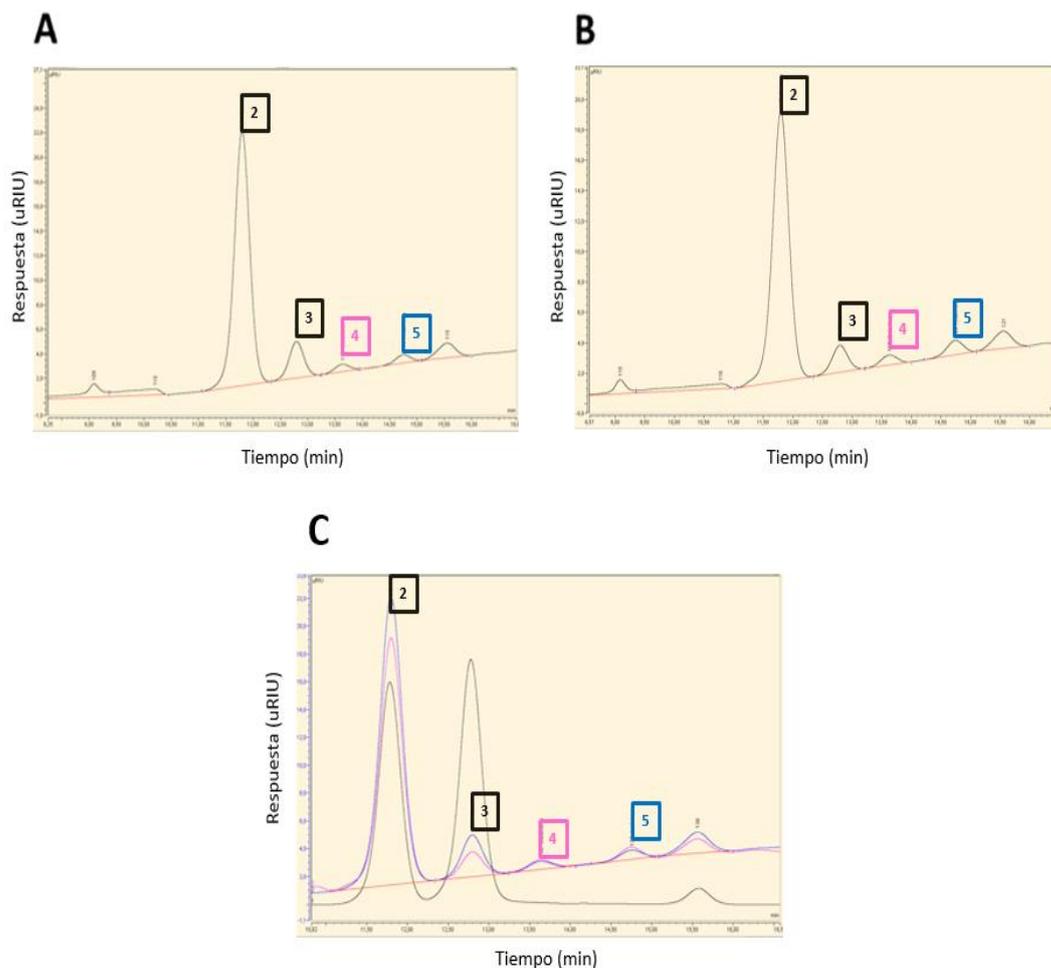


Figura 21. Cromatogramas de los azúcares detectados en las fibras helicoidales y en las fibras lineales.

a) A: representa el cromatograma de las fibras helicoidales, B: representa el cromatograma de las fibras lineales y C: representa el cromatograma de sobreposición de las fibras helicoidales (azul), las fibras lineales (rosado) y los estándares (negro). El número 2 enfatiza el pico de la glucosa, el número 3 al pico de la xilosa, el número 4 al pico de la galactosa y el número 5 al pico de la arabinosa.

Como se observa en la Tabla 4, el experimento se inició con 28 mg totales de fibras helicoidales y 18 mg totales de fibras lineales (peso seco de las muestras). Sin embargo, el cálculo de la extrapolación de las curvas de calibración indica la obtención de 9,17 mg al sumar los azúcares determinados (glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa) en las hélices, mientras que se calcularon 6,55 mg para las fibras lineales, lo que resulta en 32% y 36% de rendimiento del total original con el que se inició el experimento. Pueden existir varias razones para estos resultados: la principal razón es que existan otros componentes que no son determinados en una columna para análisis de

azúcares y que pudieran ser parte de la muestra inicial, como por ejemplo lignina, residuos ácidos, proteínas estructurales, metales y ceniza (Cowen y Ellison, 2007). Además podría haber ocurrido la pérdida de muestra debido a una degradación excesiva de cada fibra durante la hidrólisis, o por el contrario, que la hidrólisis no hubiera sido suficiente homogénea, por lo que parte de las fibras se hubieran quedado fuera de la determinación del peso final al filtrarlas (Kobayashi et al., 1960). Finalmente, otra posibilidad es que la muestra todavía se encontrara humedad en su interior antes de ser degradada, interfiriendo con la lectura real del peso seco (Gunal, 2013). Sin embargo, las relaciones de azúcares determinados con estos experimentos coinciden con lo que Gray (2014) determinó para el mismo tipo de fibras en apio: en la relación hélices/lineales se encontró a la glucosa en relación $\sim 1:1$; xilosa $\sim 1.5:1$; galactosa y arabinosa $\sim 0.7:1$, lo que se compara adecuadamente con lo reportado en este trabajo: glucosa 0.96:1; xilosa 2.3:1; y arabinosa, galactosa y manosa 0.6:1, a pesar de tratarse de especies vegetales distintas (apio y acelga, respectivamente).

Comparando los datos normalizados en ambas fibras, se observa claramente que la diferencia en cuanto a composición de azúcares no varía, 85 % de glucosa en ambas fibras, entre el 10 % de xilosa en las fibras helicoidales y 7 % de xilosa en las fibras lineales y 7% de arabinosa-galactosa para las fibras lineales con respecto al 5 % de arabinosa-galactosa para las fibras helicoidales (Tabla 4). Comparando los valores con el estudio de Gray (2014), donde se cuantificaron los azúcares componentes del apio, la relación hélices/lineales se encontró a la glucosa 0.96:1; xilosa 2.3:1; y arabinosa, galactosa y manosa 0.6:1, mientras que la relación obtenida en acelga fue de glucosa $\sim 1:1$; xilosa $\sim 1.5:1$; galactosa y arabinosa $\sim 0.7:1$. Aunque son de dos especies vegetales diferentes los valores son muy similares en cuanto a composición. La mayor diferencia se encontró en la cantidad de xilosa que existe en mayor concentración en las hélices, lo que podría ser un determinante para la preferencia de unión de PcEx11 hacia estas las fibras helicoidales sobre las lineales.

Tabla 4.

Análisis de azúcares de las fibras helicoidales y de las fibras lineales separadas.

Muestras	Hélices	Normalizado	Láminas	Normalizado
Peso original de la muestra (mg)	28,2		17,7	
Glucosa (%)	7,8	85	5,6	85,6
Xilosa (%)	0,95	10,5	0,5	7,3
Arabinosa y galactosa suma (%)	0,42	4,6	0,45	7,1
Recuperación	32,4	100	36,6	100

Tomando en cuenta la diferencia en cantidad de xilosa en cada tipo de fibra, se realizaron reacciones de digestión con una endo-xilanasas que hidroliza los enlaces β -1,4 internos del xilano (Saha, 2003). En coincidencia con el resultado de hidrólisis observamos que de las fibras helicoidales se libera el doble de azúcares reductores por la acción de la enzima (Figura 22A) en comparación con las fibras lineales (Figura 22B); similar al trabajo realizado por Hong et al. (2014), donde ensayos enzimáticos utilizando una enzima xilanasas recombinante Rex8A en 4 tipos de sustratos: xilotriosa, xilotetraosa, xilopentosa y xilohexosa, liberaron xilosa a partir de xilopentosa y xilohexosa, debido a que estos sustratos poseen cadenas más largas y de fácil acceso para la enzima. Este experimento indica que la xilosa existente se encuentra en forma de hemicelulosa en ambos tipos de fibras, y confirma lo obtenido mediante análisis de la composición de azúcares siendo más abundante en las hélices (Li et al., 2015).

Para conocer si la expansina pudiera influir en la actividad de la enzima xilanasas, se colocaron juntas en la reacción. Sin embargo, nuevamente lo que se observó fue una disminución clara de la actividad de la xilanasas (Figuras 22A y 22B), lo que puede deberse a que la expansina se une al sitio de acción de la xilanasas, interviniendo en su actividad enzimática, tal como se observa en el trabajo de (Mendoza, 2014), donde al reaccionar una endo-xilanasas proveniente del hongo *Trichoderma longibrachiatum*, junto a la expansina

PcExl1 sobre papel filtro y bagazo de maíz, no se observó diferencia en la liberación de azúcares reductores en comparación a cuando se utilizaba la xilanasa sola. Los datos obtenidos apoyan la idea de que el papel biológico de la expansina PcExl1 no es el de actuar en forma sinérgica con enzimas, aunque sí parecen unirse al mismo sitio.

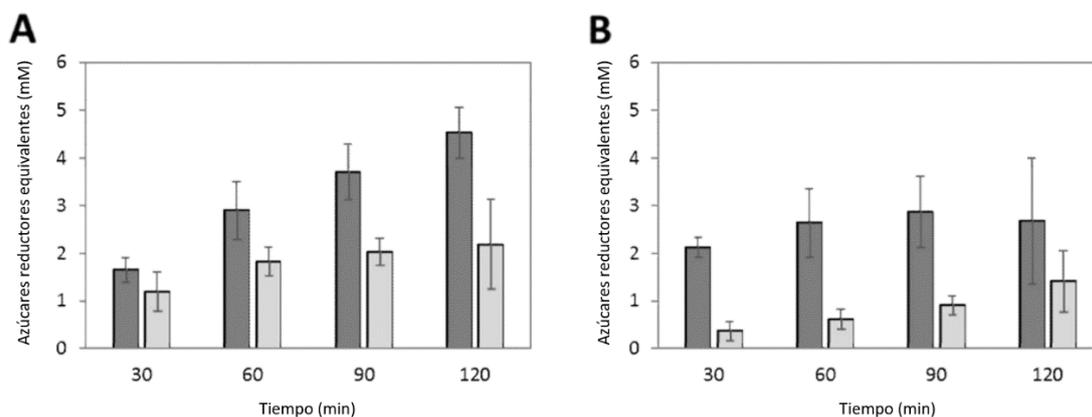


Figura 22. Gráfica de la actividad enzimática de una endo-xilanasa sobre las fibras helicoidales y lineales.

a) A: representa la reacción sobre las fibras helicoidales y B: representa la reacción sobre las fibras lineales. Las barras en color gris oscuro son reacciones utilizando xilanasa y las barras en color gris claro son reacciones utilizando xilanasa más expansina. En el gráfico se muestra la media y la desviación estándar de las reacciones de xilanasa y xilanasa con expansina. La estadística se analizó con la prueba de Fisher $p < 0,05$.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

La proteína PcExl1 es expresada en células *E. coli* BL21 con alto grado de concentración.

La proteína PcExl1 puede congelarse por 2 semanas disminuyendo su capacidad de unión a la celulosa en un 10%.

La proteína PcExl1 presenta preferencia de unión por las fibras helicoidales que por las fibras lineales que conforman los xilemas de los vegetales (apio, kale, verdolaga, betabel, ruibarbo y acelga).

La preferencia de unión de la proteína PcExl1 a las fibras helicoidales se debe a que las hélices son menos cristalinas y/o presentan mayor textura que las fibras lineales.

No existe una diferencia de concentración significativa de glucosa estructural entre las fibras helicoidales y las fibras lineales, pero si se encontró más xilosa en las fibras helicoidales, y menos galactosa y arabinosa en comparación con las fibras lineales.

La proteína PcExl1 no presenta efecto sinérgico alguno con enzimas hidrolíticas (xilanasas o celulasas) en la producción de azúcares reductores a partir de las fibras helicoidales o lineales.

6.2 Recomendaciones

Realizar los ensayos de microscopía confocal empleando la expansina PcExI1 y la expansina BsEXLX1 que solo se une a la hemicelulosa y a la pectina, para determinar las diferencias en la interacción con el xilema de los distintos vegetales.

Realizar los ensayos de microscopía confocal empleando la expansina silvestre PcExI1 y una triple mutante PcExI1-Y125A/W126A/Y157A que presenta pérdida de la capacidad de unión a celulosa, para determinar si la unión de la proteína se lleva a cabo gracias al accionar de la misma y no algún tipo de atracción de la celulosa.

Obtener la expansina secretada por el microorganismo *Pectobacterium carotovorum* durante la infección de los vegetales y realizar los experimentos de unión a celulosa y microscopía comparándolos con la proteína recombinante,

REFERENCIAS

- Ahvenainen, P., Kontro, I. y Svedstrom, K. (2016). Comparison of sample crystallinity determination methods by X-ray diffraction for challenging cellulose I materials. *Cellulose*. 23, 1073–1086. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0881-6>.
- Álvarez-Cervantes, J., Domínguez-Hernández, E.M., Mercado-Flores, Y., O'Donovan, A. y Diaz-Godinez, G. (2016). Mycosphere Essay 10: Properties and characteristics of microbial xylanases. *MYCOSPHERE*. 7, 1600–1619. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/3b/12>.
- Aoki, K., Kamioka, Y. y Matsuda, M. (2013). Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from in vitro to in vivo: Basis of biosensor construction, live imaging, and image processing. *Dev. Growth Differ.* 55, 515–522. <https://doi.org/10.1111/dgd.12039>.
- Atmodjo, M., Hao, Z. y Mohnen, D. (2013). Evolving Views of Pectin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 747–779. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105534>.
- Bernal, J.L., Del Nozal, M.J., Toribio, L. y Del Alamo, M. (1996). HPLC Analysis of Carbohydrates in Wines and Instant Coffees Using Anion Exchange Chromatography Coupled to Pulsed Amperometric Detection. *J. Agric. Food Chem.* 44, 507–511. <https://doi.org/10.1021/jf9406065>.
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J. y Davies, G.J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* 382, 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>.
- Brasileiro, B., Pizziolo, V., Raslan, D., Jamal, C., Silveira, A. y Damaris, D. (2006). Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Rev. Bras. Ciencias Farm.* <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000200004>.

- Cao, E., Chen, Y., Cui, Z. y Foster, P. R. (2003), Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 684–690. <https://doi.org/10.1002/bit.10612>.
- Carey, R. E. y Cosgrove, D. J. (2007). Portrait of the Expansin Superfamily in *Physcomitrella patens*: Comparisons with Angiosperm Expansins. *Annals of Botany.* 99(6), 1131–1141. <http://doi.org/10.1093/aob/mcm044>.
- Carpita, N. y Gibeaut, D. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1–30. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>.
- Cheng, K.C., Catchmark, J.M. y Demirci, A. (2009). Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *J. Biol. Eng.* 3, 12–12. <http://doi.org/10.1186/1754-1611-3-12>.
- Chen, G., Song, F., Xiong, X. y Peng, X. (2013). Fluorescent Nanosensors Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). *Ind. Eng. Chem. Res.* 52, 11228–11245. <http://doi.org/10.1021/ie303485n>.
- Choi, D., Kim, J. y Lee, Y. (2008). Expansins in Plant Development. In *Advances in Botanical Research*, (Academic Press), pp. 47–97.
- Choi, O y Kim, J. (2012). *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense* Causing Soft Rot on *Paprika* in Korea. *J Phytopathol.* 161(2), 1439-0434. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00002-5).
- Chung, H. y Washburn, N.R. (2016). 2 - Extraction and Types of Lignin. In *Lignin in Polymer Composites*, (William Andrew Publishing), pp. 13–25.
- Collins, T., Gerday, C. y Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29(3). <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>.
- Cosgrove, D.J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature.* 407, 321–326. <https://doi.org/10.1038/35030000>.
- Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>.

- Cosgrove, D.J., Li, L.C., Cho, H.-T., Hoffmann-Benning, S., Moore, R.C. y Blecker, D. (2002). The Growing World of Expansins. *Plant Cell Physiol.* 43, 1436–1444. <https://doi.org/10.1034/35CA3064>.
- Cosgrove, D.J. (2015). Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. *Plant Biology.* 25, 162-172. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.014>.
- Cosgrove, D.J. (2016). Catalysts of plant cell wall loosening. *Faculty Rev.* 1, 119. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7180.1>.
- Cowen, S. y Ellison, S.L.R. (2007). Handling undetected and low-level components in purity determination. *Accreditation Qual. Assur.* 12, 323–328. <https://doi.org/10.1007/s00769-006-0250-5>.
- Dal Santo, S., Vannozzi, A., Tornielli, G., Fasoli, M. y Venturini, L. (2013). Genome-Wide Analysis of the Expansin Gene Superfamily Reveals Grapevine-Specific Structural and Functional Characteristics. *PLOS ONE.* 8(4): e62206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062206>.
- Daniels, D.L., Méndez, J., Benink, H., Niles, A., Murphy, N., Ford, M., Jones, R., Amunugama, R., Allen, D. y Urh, M. (2014). Discovering Protein Interactions and Characterizing Protein Function Using HaloTag. *J Vis Exp.* 12, 89. <https://doi.org/10.3791/51553>.
- de Oliveira, R.L., da Silva Barud, H., de Assunção, R.M.N., da Silva Meireles, C., Carvalho, G.O., Filho, G.R., Messaddeq, Y. y Ribeiro, S.J.L. (2011). Synthesis and characterization of microcrystalline cellulose produced from bacterial cellulose. *J. Therm. Anal. Calorim.* 106, 703–709. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.068>.
- Dwi,S., Bambang, W. y Retno, S. (2013). Study on crystallinity and compactibility of binary mixture of analgesic substances with microcrystalline cellulose. *Int.J of Pharmacy and Pharm Sci.* 5(3), 784-789. <https://doi.org/10.1012/ACF253012-4343-C>.
- Dwi, S., Yeyet, C.S., Sundani, N.S. y Daryono H.T. (2012). Characterization of Physical Properties and Dissolution Rate of Binary System Erythromycin Stearat–Microcrystalline Cellulose and Spray Dried Lactose due to

- Compression Force. *Int.J of Pharmacy and Pharm Sci.* 4(1), 652-657.
<https://doi.org/10.1032/cellulose.2023.1.068>.
- Edwards, M.C. y Doran-Peterson, J. (2012). Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 565–575.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4173-2>.
- Elson, E.L. (2011). Fluorescence Correlation Spectroscopy: Past, Present, Future. *Biophys. J.* 101, 2855–2870. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.012>.
- García, F. (2010). Efecto de la aplicación de la cepa bacteriana CAE-01 y fumigación al suelo sobre la pudrición blanda (*Pectobacterium carotovorum*) en el cultivo de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* (L) K. Spreng) en la perla, Veracruz. Departamento de Fitotecnia. Instituto de Horticultura. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J. y Mahajan, R. (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *Biotech* 6, 47.
<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0371-4>.
- Georgelis, N., Nikolaidis, N. y Cosgrove, D.J. (2014). Biochemical analysis of expansin-like proteins from microbes. *Biopolym. Life.* 100, 17–23.
- Georgelis, N., Nikolaidis, N. y Cosgrove, D.J. (2015). Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3807–3823. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.094>.
- Ghaffar, S.H. y Fan, M. (2013). Structural analysis for lignin characteristics in biomass. *Biomass Bioenergy.* 57.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.07.015>.
- Gray, D. (2014). Isolation and handedness of helical coiled cellulosic thickenings from plant petiole tracheary elements. *Cellulose.* 21(5), 3181-3191.
<https://doi.org/10.1007/s10570-014-0382-4>.
- Gunal, A.I. (2013). How to determine “dry weight”? *Kidney Int. Suppl.* 3, 377–379.
<https://doi.org/10.1038/kisup.2013.81>.
- Haghdan, S., Renneckar, S. y Smith, G. (2016). 1 - Sources of Lignin. In *Lignin in Polymer Composites*, (William Andrew Publishing), pp. 1–11.
- Herrick-Davis, K. y Mazurkiewicz, J.E. (2013). Chapter 10 - Fluorescence Correlation Spectroscopy and Photon-Counting Histogram Analysis of

- Receptor–Receptor Interactions. In *Methods in Cell Biology*, P. Michael Conn, ed. (Academic Press), pp. 181–196.
- Hernández-Unzón, H.Y. y Ortega-Delgado, M.L. (1988). Denaturation by heat, sodium dodecyl sulphate and dithiothreitol of globulins and phaseolin from dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Foods Hum. Nutr.* **38**, 211–223. [https://doi.org/10.1016/\(01\)CA60732](https://doi.org/10.1016/(01)CA60732).
- Hooker, S.B. y Van Heukelem, L. (2011). *A symbology and vocabulary for an HPLC lexicon*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 243-256.
- Hong, P., Iakiviak, M., Dodd, D., Zhang, M., Mackie, R.I. y Cann, I. (2014). Two New Xylanases with Different Substrate Specificities from the Human Gut Bacterium *Bacteroides intestinalis* DSM 17393. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**(7), 2084-2093. <https://doi.org/10.1128/AEM.03176-13>.
- Hosmer, K. y Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research.* **344**, 1879–1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>.
- Jeong, H., Kim, H. y Lee, S. (2015). Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain BL21. *Genome Announc.* **3**, 134-135. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00134-15>.
- Juette, M.F., Terry, D.S., Wasserman, M.R., Zhou, Z., Altman, R.B., Zheng, Q. y Blanchard, S.C. (2014). The bright future of single-molecule fluorescence imaging. *Mol. Imaging.* **20**, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.010>.
- Kaseda, K., Kodama, T., Fukui, K. y Hirose, K. (2001). A novel approach for purification of recombinant proteins using the dextran-binding domain. *FEBS Lett.* **500**, 141–144. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02607-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02607-2).
- Keegstra, K. (2010). Plant Cell Walls. *Plant Physiol.* **154**, 483–486. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161240>.
- Kerff, F., Amoroso, A., Herman, R., Sauvage, E., Petrella, S., Filée, P., Charlier, P., Joris, B., Tabuchi, A. y Nikolaidis, N. (2008). Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that

- promotes root colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 16876–16881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809382105>.
- Kim, E.S., Lee, H.J., Bang, W.G., Choi, I.G. y Kim, K.H. (2009). Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol Bioeng.* *102*(5):1342–1353. <https://doi.org/10.1002/bit.22193>.
- Kim, I.J., Ko, H.-J., Kim, T.-W., Choi, I.-G. y Kim, K.H. (2013). Characteristics of the binding of a bacterial expansin (BsEXLX1) to microcrystalline cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* *110*, 401–407. <https://doi.org/10.1002/bit.24719>.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P. y Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew. Chem. Int. Ed.* *44*, 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>.
- Kobayashi, T., Sakai, Y. y Iizuka, K. (1960). Hydrolysis of Cellulose in a Small Amount of Concentrated Sulfuric Acid. *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.* *24*, 443–449. <https://doi.org/10.1023/SCOC634507>.
- Kostylev, M. y Wilson, D. (2012). Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. *Biofuels* *3*, 61–70. <http://dx.doi.org/10.4155/bfs.11.150>.
- Krishnamurthy, P., Hong, J.K., Kim, J.A., Jeong, M.-J., Lee, Y.-H. y Lee, S.I. (2015). Genome-wide analysis of the expansin gene superfamily reveals *Brassica rapa*-specific evolutionary dynamics upon whole genome triplication. *Mol. Genet. Genomics.* *290*, 521–530. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0935-0>.
- Kuhad, R., Gupta, R. y Singh, A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Res.* *10*. <https://doi.org/10.4061/2011/280696>.
- Kulkarni, P.K., Dixit, S.A. y Singh, U.B. (2012). Evaluation of bacterial cellulose produced from *Acetobacter xylinum* as pharmaceutical excipient. *Am. J. Drug Discovery Dev.* *2*, 72-86. <https://doi.org/10.3923/aidd.2012.72.86>.
- Laňková, M., Humpolíčková, J., Vosolsobě, S., Cit, Z., Lacek, J., Čovan, M., Čovanová, M., Hof, M. y Petrášek, J. (2016). Determination of Dynamics of Plant Plasma Membrane Proteins with Fluorescence Recovery and Raster Image Correlation Spectroscopy. *Microsc. Microanal.* *22*, 290–299. <https://doi.org/10.1017/S1431927616000568>.

- Laurence, T.A., Ly, S., Bourguet, F., Fischer, N.O. y Coleman, M.A. (2014). Fluorescence Correlation Spectroscopy at Micromolar Concentrations without Optical Nanoconfinement. *J. Phys. Chem.* *118*, 9662–9667. <https://doi.org/10.1021/jp505881z>.
- Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A. y Bras, J. (2012). Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydr. Polym.* *90*, 735–764. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.026>.
- Lee, Y. y Kende, H. (2002). Expression of α -Expansin and Expansin-Like Genes in Deepwater Rice. *Plant Physiology.* *130*(3), 1396–1405. <https://doi.org/10.1104/pp.008888>.
- Li, X., Yu, V.Y., Lin, Y., Chomvong, K., Estrela, R., Park, A., Liang, J.M., Znameroski, E.A., Feehan, J. y Kim, S.R. (2015). Expanding xylose metabolism in yeast for plant cell wall conversion to biofuels. *ELife.* *4*, e05896. <https://doi.org/10.7554/eLife.05896.001>.
- Liao, H., Zheng, H., Li, S., Wei, Z., Mei, X., Ma, H., Shen, Q. y Xu, Y. (2015). Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Sci. Rep.* *5*, 12631. <https://doi.org/10.1038/srep12631>.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000.
- Los, G.V., Encell, L.P., McDougall, M.G., Hartzell, D.D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M.G., Learish, R., Ohana, R.F. y Urh, M. (2008). HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chem. Biol.* *3*, 373–382. <https://doi.org/10.1021/cb800025k>.
- Malik, A. (2016). Protein fusion tags for efficient expression and purification of recombinant proteins in the periplasmic space of *E. coli*. *3 Biotech* *6*, 44. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0397-7>.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G. y Foster, G. D. (2012), Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant

- pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13, 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>.
- Martinez-Anaya, C. (2016). Understanding the structure and function of bacterial expansins: A prerequisite towards practical applications for the bioenergy and agricultural industries. *J Microbial Biotechnol*. 9, 727–736. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12377>.
- Mendoza, M. (2014). Caracterización de una expansina de *Pectobacterium carotovorum* PcEXL1. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D. M. y Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*. 4(11), 1425–1433. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.11.1425>.
- Miyashita, T. (2004). Confocal Microscopy for Intracellular Co-Localization of Proteins. In *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications*, H. Fu, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 399–409.
- Mullineaux, C.W. (2007). Localization and mobility of bacterial proteins by confocal microscopy and fluorescence recovery after photobleaching. *Methods in Molecular Biology*. 390, 3-15. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-466-7_1.
- Nikolaidis, N., Doran, N. y Cosgrove, D.J. (2013). Plant Expansins in Bacteria and Fungi: Evolution by Horizontal Gene Transfer and Independent Domain Fusion. *Mol. Biol. Evol.* 31, 376–386. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst206>.
- Ochoa-Villarreal, M., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I. y Martínez-Téllez, M.Á. (2012). Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In *Polymerization*, A.D.S. Gomes, ed. (Rijeka: InTech), p. Ch. 04.
- Olarte, M. Mendoza, M. Pastor, N. Segovia, L. Folch, J y Martínez, C. (2014). PcExl1 a novel acid expansin-like protein from the plant pathogen *Pectobacterium carotovorum*, binds cell walls differently to BsEXLX1. *PLoS ONE*. 9(4), e95638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095638>.

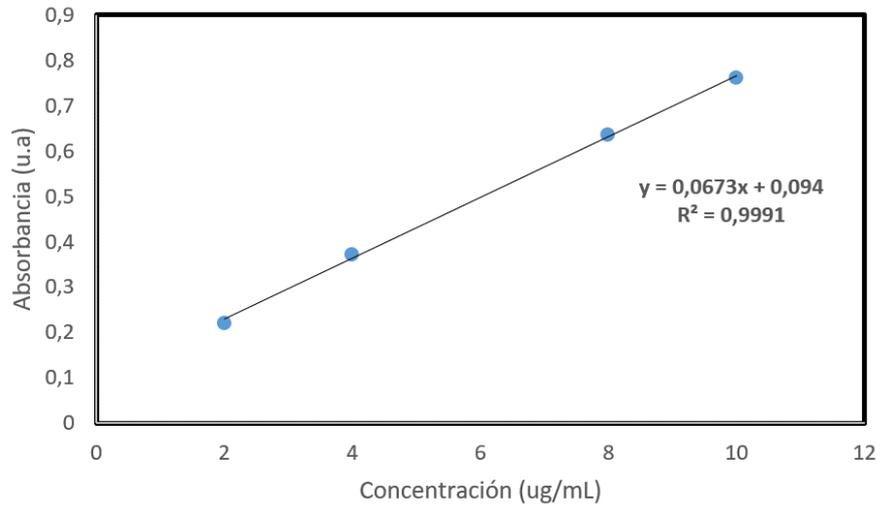
- Olarte, M. (2016). Efecto de la diferencia de potencial electrostático y de dominios estructurales en la actividad y unión de expansinas bacterianas. Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Paës, G., Berrin, J.-G. y Beaugrand, J. (2012). GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnol. Adv.* 30, 564–592. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.003>.
- Pastor, N., Dávila, S., Pérez-Rueda, E., Segovia, L y Martínez-Anaya, C. (2015). Electrostatic analysis of bacterial expansins. *Proteins.* 83, 215–223. <https://doi.org/10.1002/prot.24718>.
- Patil, N., Tanguy, N. y Yan, N. (2016). 3 - Lignin Interunit Linkages and Model Compounds. In *Lignin in Polymer Composites*, (William Andrew Publishing), pp. 27–47.
- Pauly, M. y Keegstra, K. (2008). Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J.* 54, 559–568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x>.
- Payne, C.M., Knott, B.C., Mayes, H.B., Hansson, H., Himmel, M.E., Sandgren, M., Ståhlberg, J. y Beckham, G.T. (2015). Fungal Cellulases. *Chem. Rev.* 115, 1308–1448. <https://doi.org/10.1021/cr500351c>.
- Pretzer, E. y Wiktorowicz, J. (2008). Saturation Fluorescence Labeling of Proteins for Proteomic Analyses. *Anal. Biochem.* 374, 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.12.014>.
- Polluman, L. Alamäe, I y Mäc, A. (2012). Quorum Sensing and Expression of Virulence in Pectobacteria. *Sensors.* 12, 3327-3349. <https://doi.org/10.3390/s120303327>.
- Puls, J. (1997). Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromol. Symp.* 120, 183–196. <https://doi.org/10.1002/masy.19971200119>.
- Reyes-Ortiz, V., Heins, R.A., Cheng, G., Kim, E.Y., Vernon, B.C., Elandt, R.B., Adams, P.D., Sale, K.L., Hadi, M.Z. y Simmons, B.A. (2013). Addition of a carbohydrate-binding module enhances cellulase penetration into

- cellulose substrates. *Biotechnol. Biofuels* 6, 93.
<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-93>.
- Rossow, M.J., Sasaki, J.M., Digman, M.A. y Gratton, E. (2010). Raster image correlation spectroscopy in live cells. *Nat. Protoc.* 5, 1761–1774.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2010.122>.
- Sadhu, S. y Maiti, T. (2013). A review: cellulase production by bacteria. *British Microbiology Research Journal.* 3(3), 235-258.
<https://doi.org/10.10428/200.143>.
- Saha, B.C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>.
- Sampedro, J. y Cosgrove, D. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biol.* 6, 242–242. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-12-242>.
- Scheller, H.V. y Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>.
- Silveira, R.L. y Skaf, M.S. (2016). Molecular dynamics of the *Bacillus subtilis* expansin EXLX1: interaction with substrates and structural basis of the lack of activity of mutants. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 3510–3521.
<https://doi.org/10.1039/c5cp06674c>.
- Sorieul, M., Dickson, A., Hill, J.S. y Pearson, H. (2016). Plant Fibre: Molecular Structure and Biomechanical Properties, of a Complex Living Material, Influencing Its Deconstruction towards a Biobased Composite. *Materials.* 9, 618. <https://doi.org/10.3390/ma9080618>.
- Szijártó, N., Siika-aho, M., Tenkanen, M., Alapuranen, M., Vehmaanperä, J., Réczey, K. y Viikari, L. (2008). Hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose by heterologously produced cellulases of *Melanocarpus albomyces*. *J. Biotechnol.* 136, 140–147.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.05.010>.
- Tapre, A.R. y Jain, R.K. (2014). Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal.* 21(2), 447–453.
<https://doi.org/10.3039/423908B>.

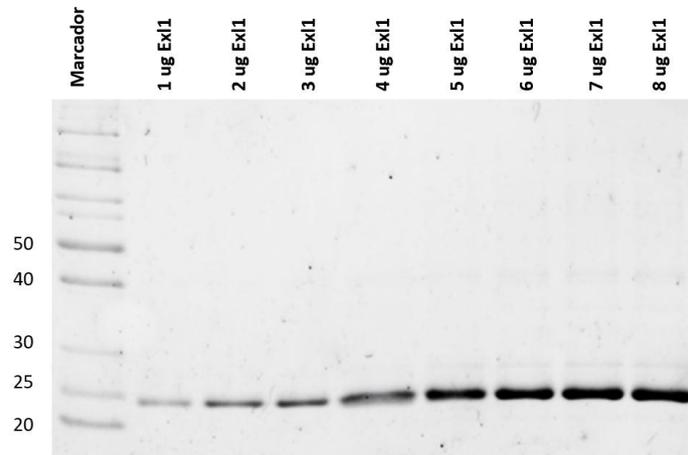
- Tian, Y., Martinez, M. y Pappas, D. (2011). Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Review of Biochemical and Microfluidic Applications. *Appl. Spectrosc.* 65, 115–124. <https://doi.org/10.1366/10-06224>.
- Waleron, M., Waleron, K. y Lojkowska, E. (2015). First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Soft Rot on Potato and Other Vegetables in Poland. *Plant Dis.* 99, 1271–1271. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0180-PDN>.
- Wiseman, P.W. (2015). Image Correlation Spectroscopy: Principles and Applications. *Cold Spring Harb. Protoc.* 4, 336-348. <https://doi.org/10.1101/pdb.top086124>.
- Woll, D. (2014). Fluorescence correlation spectroscopy in polymer science. *RSC Adv.* 4, 2447–2465. <https://doi.org/10.1039/C3RA44909B>.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Ho Lee, D. y Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel.* 86(12),1781-1788. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.12.013>.
- Yennawar, N.H., Li, L.-C., Dudzinski, D.M., Tabuchi, A. y Cosgrove, D.J. (2006). Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a β -expansin and group-1 pollen allergen from maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 14664–14671. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605979103>.
- Zhang, X.-Z. y Zhang, Y.-H.P. (2013). Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. In *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 131–146.

ANEXOS

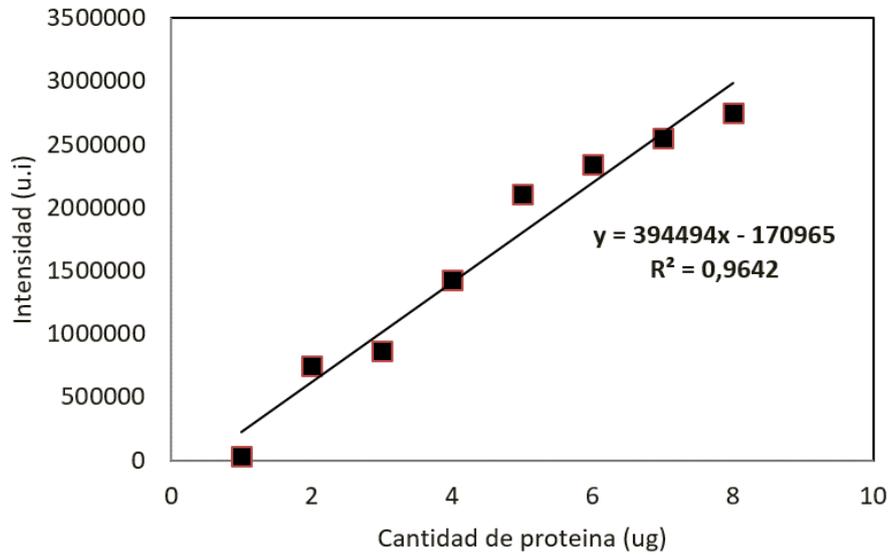
Anexo 1. Curva de calibrado del reactivo de Bradford



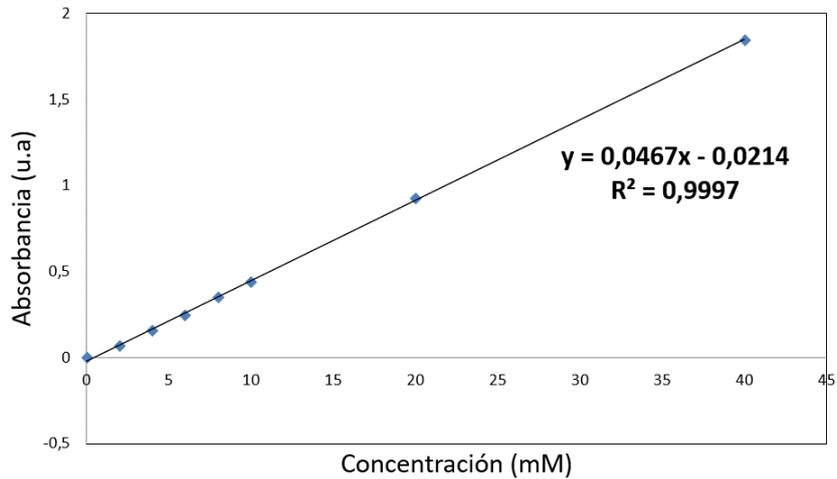
Anexo 2. Gel de electroforesis SDS-PAGE de las diferentes cantidades de PcEx11



Anexo 3. Curva de calibrado de la proteína PcEx11

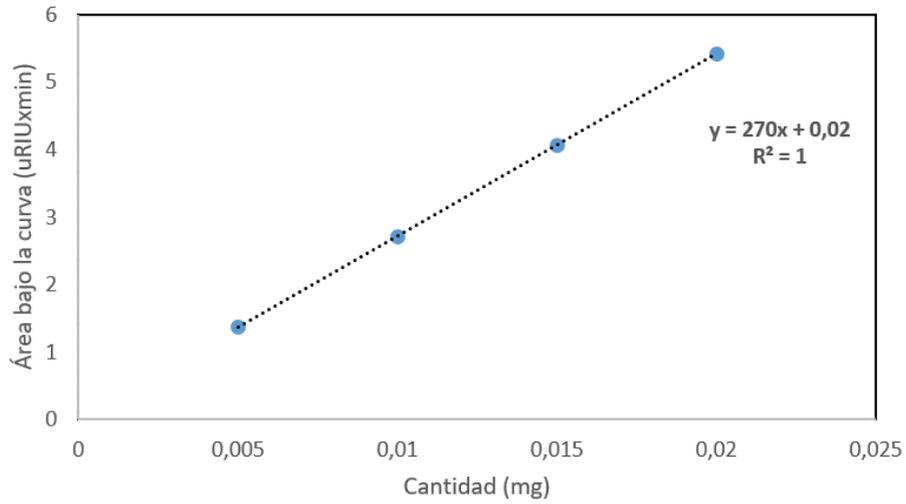


Anexo 4. Curva de calibrado del reactivo DNS

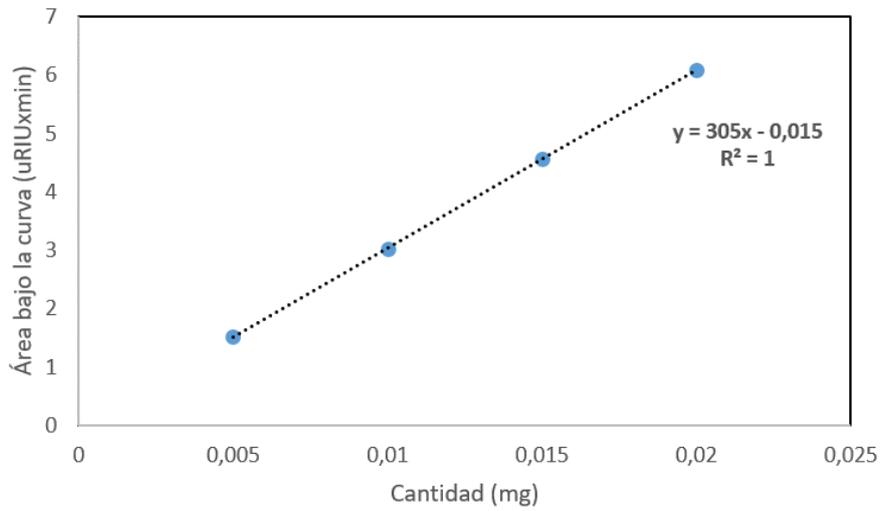


Anexo 5. Curvas de calibrado de los estándares de HPLC

Curva de calibrado de la glucosa

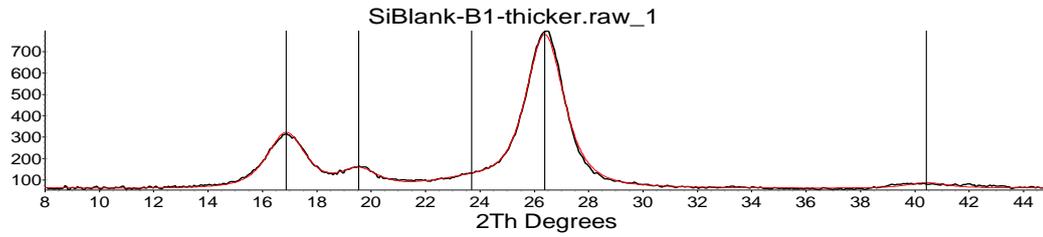


Curva de calibrado de la xilosa

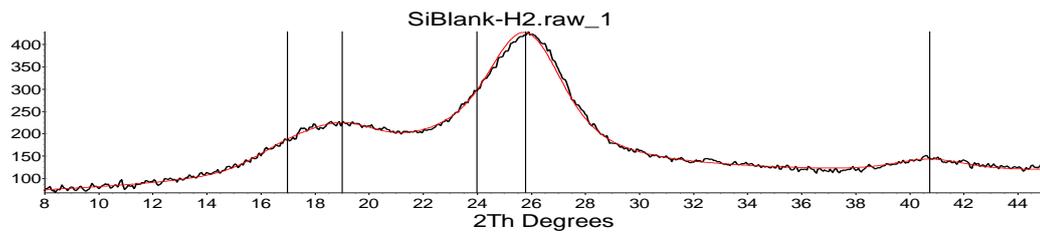


Anexo 6. Difractogramas de las muestras analizadas

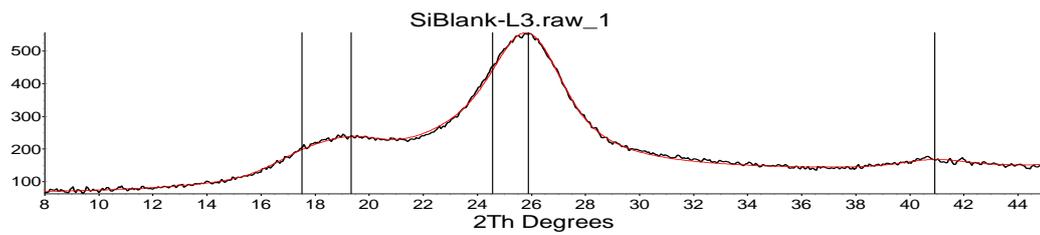
Difractograma de la BMCC



Difractograma de las fibras helicoidales



Difractograma de las fibras lineales



Anexo 8. Perfil cromatográfico de las concentraciones de A: glucosa y B: xilosa.

