

UCH-FC
Biotecnología
7919
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LA
 α -L-ARABINOFURANOSIDASA 2 DEL HONGO *Penicillium purpurogenum*.**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



Por

Macarena Patricia Fritz Kelly

Julio, 2007
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Jaime Eyzaguirre Philippi
Profesor Patrocinante: Dr. Octavio Monasterio Opazo



**“PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SECUENCIACIÓN
DE LA α -L-ARABINOFURANOSIDASA 2 DEL HONGO
Penicillium purpurogenum”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

MACARENA FRITZ KELLY

Dr. Jaime Eyzaguirre Philippi
Director de Seminario de Título

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título



Dra. Ana Preller Simmons
Presidente Comisión

Dr. Ricardo Cabrera Paucar

Santiago de Chile, 27/07 2007





A mis padres y hermanos

Agradecimientos

La realización de esta Tesis no podría haberse llevado a cabo de no ser por el apoyo de personas a quienes no puedo dejar de agradecer. En primer lugar al Dr Jaime Eyzaguirre, quien me abrió las puertas de su laboratorio, permitiéndome no sólo ampliar mis conocimientos y experiencias científicas, sino también por incentivar el desarrollo de iniciativas propias para el desarrollo de la ciencia. Deseo agradecerle además por enseñarme mucho más allá de lo académico y recordaré siempre nuestras distendidas conversaciones sobre la vida.

Quiero Agradecer además, a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Cristina y Mario, por su ayuda y por las risas del día a día. No puedo dejar de mencionar al Dr Rubén Polanco, por todo su apoyo y su disposición para enseñar y aclarar todas las dudas durante mi estadía en la UNAB. A Mercedes Mori, no sólo por su ayuda con los materiales de laboratorio, sino por admirable sentido del humor y su constante preocupación por los del grupo.

A mis amigos, por siempre estar ahí frente a cualquier duda o problema, y por llenarme la vida de alegría.

Finalmente debo agradecer a mi familia, por su constante preocupación, apoyo e interés en mi investigación, y a 'Matu' por su enorme ayuda en la realización de esta tesis, por su apoyo constante, por creer en mí y hacerme ver lo maravilloso que fue la realización de esta tesis.





Macarena Patricia Fritz Kelly nació un día 15 de abril de 1981 en Santiago. Creció junto a su numerosa familia, su vecino, amigo inseparable, y sus queridos compañeros del Trehwela's English School, donde desarrolló su amor por la música, el deporte y las ciencias naturales. Durante esos años, demostró un gran talento en el básquetbol, que la llevó a ingresar al Club Deportivo de la Universidad Católica lugar donde conoce a quien hasta hoy es una de sus grandes amigas, "la Happy". Al salir del colegio, Macarena fija su objetivo en desarrollar sus habilidades intelectuales entrando a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Es aquí donde junto a un nuevo grupo de amigos, comparte congresos, asados, partidos, cumpleaños, vacaciones, y por supuesto días de estudio. Es también en esta etapa donde conoce a quien sería su compañero en los turbulentos viajes por el mundo y por la vida, "Matu". Al egresar del pregrado, Macarena opta por realizar su memoria de título bajo la tutela del Dr. Jaime Eyzaguirre, primero realizando investigaciones en la PUC, y finalmente en la UNAB, donde su esfuerzo, constancia y gran capacidad, dieron como fruto un gran trabajo, el cual, suscitó una publicación internacional.

Macarena, con el trabajo plasmado en las siguientes páginas, da por terminada exitosamente su primera etapa por la Universidad. Ahora, su iniciativa, sinceridad, amor por la ciencia, entrega con sus amigos, además de otras muchas cualidades, abrirán múltiples nuevos caminos frente a ella, llenos de desafíos y emociones. Nos queda tan sólo desearle el mayor de los éxitos y que jamás olvide que sus amigos siempre estaremos aquí para ella.

Índice.



Índice.....	I
Índice de figuras.....	IV
Índice de tablas.....	VI
Lista de abreviaturas.....	VII
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
1. Introducción.....	1
1.1 Composición de las hemicelulosas.....	2
1.2 Distribución de la L-arabinosa en la pared celular.....	3
1.2.1 L-arabinano.....	4
1.2.2 Arabinoxilanos.....	4
1.3 Degradación enzimática de hemicelulosas.....	5
1.4 Aplicaciones biotecnológicas de las α -L-arabinofuranosidasas.....	8
1.4.1 α -L-arabinofuranosidasas y la industria del vino.....	8
1.4.2 α -L-arabinofuranosidasas y la calidad del pan.....	8
1.4.3 Producción de azúcares fermentables para la industria del bioetanol.....	9
1.4.4 Producción de L-arabinosa como agente antiglicémico.....	10
1.4.5 α -L-arabinofuranosidasas y alimento animal.....	10
1.5 Modelo de estudio: el hongo <i>Penicillium purpurogenum</i>	11
1.6 Hipótesis.....	11
1.7 Objetivos.....	12
1.7.1 Objetivos generales.....	12
1.7.2 Objetivos específicos.....	12
2. Materiales y Métodos.....	13
2.1 Materiales.....	13
2.1.1 Equipos.....	13
2.1.2 Reactivos químicos.....	13
2.1.3 Reactivos para biología molecular.....	14
2.1.4 Sistemas comerciales (kits).....	14
2.1.5 Material cromatográfico.....	14
2.1.6 Material biológico.....	15
2.1.6.1 Cepa del hongo.....	15
2.1.6.2 Cepas bacterianas.....	15
2.2 Métodos.....	15
2.2.1 Cultivos del hongo.....	15
2.2.1.1 Cultivos sólidos.....	15
2.2.1.2 Cultivos líquidos.....	15

2.2.1.3 Toma de muestras de cultivos líquidos. -----	16
2.2.2 Medios de cultivo bacterianos. -----	16
2.2.3 Purificación de Abf 2 de <i>Penicillium purpurogenum</i> . -----	17
2.2.3.1 Preparación del extracto crudo. -----	17
2.2.3.2 Precipitación con sulfato de amonio. -----	17
2.2.3.3 Cromatografía de intercambio aniónico. -----	17
2.2.3.4 Cromatografía de intercambio catiónico. -----	18
2.2.3.5 Cromatografía de interacción hidrofóbica. -----	18
2.2.4 Análisis de proteínas. -----	19
2.2.4.1 Cuantificación de proteínas. -----	19
2.2.4.2 Ensayos de actividad enzimática -----	19
2.2.4.2.1 Microensayo de actividad arabinofuranosidásica. -----	19
2.2.4.2.2 Macroensayo de actividad arabinofuranosidásica. -----	20
2.2.4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida. -----	20
2.2.4.3.1 Geles en condiciones desnaturantes. -----	20
2.2.4.3.2 Geles para isoelectroenfoque y zimograma. -----	20
2.2.5 Determinación de parámetros cinéticos. -----	21
2.2.5.1 Medición de K_M para pNP Ara. -----	21
2.2.5.2 pH óptimo y efecto de la temperatura. -----	21
2.2.6 Extracción de ácidos nucleicos. -----	21
2.2.6.1 Extracción de RNA. -----	21
2.2.6.2 Síntesis de cDNA. -----	22
2.2.6.3 Extracción de DNA genómico. -----	23
2.2.7 Técnicas de PCR. -----	23
2.2.7.1 Condiciones generales. -----	23
2.2.7.2 PCR de colonias bacterianas. -----	24
2.2.7.3 Diseño de partidores para PCR. -----	24
2.2.8 Amplificación de secuencias desconocidas de DNA genómico mediante Genome Walking. -----	25
2.2.8.1 Digestión y purificación del DNA genómico. -----	26
2.2.8.2 Ligación de adaptadores. -----	26
2.2.8.3 Primera reacción de PCR. -----	28
2.2.8.4 Segunda reacción de PCR (PCR anidado). -----	28
2.2.9 Electroforesis de DNA en geles de agarosa. -----	28
2.2.10 Recuperación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa. -----	29
2.2.11 Clonamiento de productos de PCR. -----	29
2.2.12 Transformación de <i>E. coli</i> . -----	30
2.2.12.1 Preparación de células electrocompetentes. -----	30
2.2.12.2 Transformación por electroporación. -----	30
2.2.13 Secuenciación nucleotídica. -----	31
2.2.14 Análisis de secuencias, diseño de partidores y alineamientos. -----	31
3. Resultados. -----	32
3.1 Efecto de la fuente de carbono en la producción de arabinofuranosidasas. -----	32
3.2 Purificación de Abf 2 de <i>Penicillium purpurogenum</i> . -----	33
3.2.1 Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE Sefadex A-25 -----	33
3.2.2 Cromatografía de intercambio catiónico en Sulfopropil Sefarosa. -----	34
3.2.3 Cromatografía de interacción hidrofóbica en Fenil Agarosa. -----	34
3.3 Determinación del punto isoelectrico. -----	37



3.4 Determinación de parámetros cinéticos de Abf 2. -----	38
3.4.1 pH óptimo. -----	38
3.4.2 Estudios de temperatura. -----	38
3.4.2.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. -----	38
3.4.2.2 Estabilidad a distintas temperaturas. -----	38
3.4.3 Determinación de K_M y V_{max} para Abf 2. -----	40
3.5 Inducción de la actividad arabinofuranosidásica. -----	41
3.6 Secuenciación de Abf 2. -----	44
3.6.1 Secuencias aminoacídicas de fragmentos de Abf 2. -----	44
3.6.2 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA. -----	47
3.6.3 Obtención de secuencia de cDNA de <i>abf2</i> por RT-PCR. -----	47
3.6.4 Obtención de la secuencia completa del gen <i>abf2</i> . -----	48
3.6.5 Análisis de la secuencia genómica y del cDNA de <i>abf2</i> . -----	52
3.6.6 Alineamiento de secuencias aminoacídicas similares a Abf 2. -----	53
3.6.7 Predicción de los residuos catalíticos de Abf 2. -----	55
3.6.8 Relaciones filogenéticas de las Abfs de la familia GH51. -----	57
3.7 Secuenciación y análisis de la región río arriba del gen <i>abf2</i> . -----	58
4. Discusión. -----	60
4.1 Efecto de la fuente de carbono en la producción de arabinofuranosidasas. -----	61
4.2 Purificación de Abf 2 de <i>P. purpurogenum</i> . -----	62
4.3 Caracterización de Abf 2. -----	63
4.4 Inducción de la actividad arabinofuranosidásica. -----	65
4.5 Secuenciación del cDNA de Abf 2. -----	66
4.6 Predicción de los residuos catalíticos de Abf 2. -----	67
4.7 Secuenciación y análisis del gen <i>abf2</i> . -----	69
4.8 Secuenciación y análisis de la región río arriba del gen <i>abf2</i> . -----	69
4.9 Arabinofuranosidasas de <i>P. purpurogenum</i> . -----	71
5. Conclusiones. -----	74
6. Referencias. -----	75
Anexo I -----	83



Índice de figuras.

Figura 1. Representación esquemática simplificada de la pared celular vegetal. -----	2
Figura 2: Estructura del arabinano. -----	4
Figura 3: Estructura del arabinoxilano. -----	5
Figura 4. Estructura simplificada del arabinoxilano y las enzimas involucradas en su degradación. -----	6
Figura 5. Esquema de la técnica de Genome Walking. -----	27
Fig 6. Cinética de producción de L-arabinofuranosidasa de <i>P. purpurogenum</i> en medios de cultivo líquidos con distintas fuentes de carbono. -----	32
Figura 7. Perfiles de elución de las columnas de intercambio iónico. (A) DEAE-Sefadex A-25 y (B) Sulfopropil Sefarose. -----	35
Figura 8. Electroforesis de las tres últimas etapas de purificación de Abf 2 y Abf 3 de <i>P. purpurogenum</i> en gel de poliacrilamida desnaturante al 12%.-----	36
Figura 9. Zimograma sobre isoelectroenfoco de las Abfs de <i>P. purpurogenum</i> .-----	37
Figura 10. Efectos del pH y temperatura sobre la actividad de Abf 2.-----	39
Figura 11. Curva de saturación de Abf 2 usando pNP Ara com sustrato. -----	40
Figura 22. Catabolismo de las pentosas en <i>Aspergillus niger</i> .-----	41
Figura 23. Inducción y represión de la actividad arabinofuranosidásica de <i>P. purpurogenum</i> en cultivos de 11 días con glucosa y con pentosas y polioles generados durante el catabolismo de la L-arabinosa. -----	42
Figura 24. Zimograma que muestra la actividad arabinofuranosidásica de sobrenadantes de cultivos de <i>P. purpurogenum</i> bajo la inducción de (A) L-arabitol y (B) L-arabinosa a distintos días de cultivo (2, 4, 7, 9 y 11 días). -----	43
Figura 12. Alineamiento entre la secuencia aminoacídica de la Abf A de <i>Aspergillus fumigatus</i> (negro) y las secuencias del amino terminal y los péptidos internos 2 y 3 de la Abf 2 de <i>Penicillium purpurogenum</i> (azul). -----	46
Figura 13. Amplificación de un fragmento de cDNA de <i>abf 2</i> por RT-PCR seguido de un PCR anidado. -----	49
Figura 14. Amplificación de fragmentos del gen <i>abf 2</i> . -----	50
Figura 15. Amplificación de la secuencia 5' del gen <i>abf 2</i> y de su región promotora mediante Genome Walker.-----	51



Figura 16. Representación esquemática de los principales partidores utilizados para la secuenciación del cDNA y del gen <i>abf2</i> , con sus respectivas orientaciones.-----	51
Figura 17. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de Abf 2. -----	53
Figura 18. Alineamiento múltiple de distintas arabinofuranosidasas de hongos. -----	55
Figura 19. Similitud local de arabinofuranosidasas de la familia GH51. -----	56
Figura 20: Árbol no enraizado de arabinofuranosidasas de la familia GH51. -----	57
Figura 21. Secuencia nucleotídica correspondiente a parte de la región río arriba del gen <i>abf2</i> . -----	58



Índice de tablas.

Tabla I. Partidores utilizados en este trabajo.-----	25
Tabla II. Tabla de purificación para la Abf2 de <i>P. purpurogenum</i> .-----	37
Tabla III: Posibles sitios de unión de factores de transcripción en los promotores de genes de arabinofuranosidasas de la familia GH51.-----	59
Tabla IV. Propiedades de las arabinofuranosidasas de la familia GH51.-----	64
Tabla V. Características de los genes codificantes para Abfs de <i>P. purpurogenum</i> .-----	71
Tabla VI. Propiedades de las Abfs de <i>P. purpurogenum</i> .-----	72
Tabla VII. Acción de las Abfs de <i>P. purpurogenum</i> sobre sustratos poliméricos.-----	72



Lista de abreviaturas.

Abf	: arabinofuranosidasa.
AUAP	: partidor de amplificación universal abreviado.
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool.
BSA	: seroalbúmina de bovino.
cDNA	: DNA complementario.
DEPC	: dietilpirocarbonato.
DNA	: ácido desoxirribonucléico.
dNTP	: desoxinucleótidos fosfato.
DOC	: ácido desoxicólico.
DP	: grado de polimerización.
DTT	: ditioneitol .
RNAsas	: ribonucleasas.
EDTA	: tetraacetato de etilendiamina.
IPTG	: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
IEF	: isoelectroenfoco.
KDa	: Kilo daltons.
LB	: medio Luria Bertani.
mRNA	: RNA mensajero.
MuAra	: metil umberiferil α -L-arabinofuranósido.
N-terminal	: amino terminal.
PAS	: ácido periódico-Schiff.
pb	: pares de bases.
PBS	: amortiguador fosfato salino.
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa.
Pfu	: DNA polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i> .
pNP	: p-nitrofenol.
pNP Ara	: p-nitrofenil- α -L-arabinofuranósido.
RNA	: ácido ribonucléico.
rpm	: revoluciones por minuto.
SDS	: dodecil sulfato de sodio.
TAE	: amortiguador Tris-acetato-EDTA.
Taq	: DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i> .
TCA	: ácido tricloro acético.
TE	: amortiguador Tris-HCl.
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletilen diamina
X-Gal	: 5-bromo-4-cloro-3indoil- β -D-galactopiranosido.

Resumen

La lignocelulosa es el componente mayoritario de las plantas y representa una gran fuente de materia orgánica renovable. Está compuesta de lignina, pectina, celulosa y hemicelulosas. Las hemicelulosas son el componente mayoritario luego de la celulosa. Están constituidas por una serie de polisacáridos, entre los que destacan los xilanos, galatanos, mananos y arabinanos, los cuales se definen en función del azúcar que contiene la cadena principal.

La degradación de las hemicelulosas es llevada a cabo por varios microorganismos, entre ellos bacterias y hongos, quienes producen una gran variedad de enzimas para degradar esos complejos sustratos poliméricos. Sin embargo, la degradación de estos polisacáridos se ve limitada por la presencia de cadenas laterales, entre otras, de residuos de arabinosa. Las arabinofuranosidasas (Abf) son las enzimas encargadas de catalizar la hidrólisis de estos residuos.

La enorme cantidad de desechos lignocelulósicos agroindustriales puede ser convertida a productos con valor agregado mediante la utilización de dichas enzimas, por lo que se requiere de un mejor entendimiento de ellas.

El hongo *Penicillium purpurogenum* produce una gran variedad de enzimas hemicelulolíticas. Se han purificado y caracterizado un importante número de enzimas de este organismo, entre ellas endoxilanasas, acetilxilano esterasas, β -xilosidasas y una arabinofuranosidasa.

Este trabajo se enfocó en el estudio de una segunda arabinofuranosidasa (Abf2). Se identificó al L-arabitol como el mejor inductor para la producción de Abfs. Sin embargo otras fuentes de carbono naturales, que presentaron altos niveles de esta actividad fueron: coseta de remolacha, coronta de maíz y xilano de avena.

Se purificó la Abf 2 en cinco pasos: ultrafiltración del sobrenadante de cultivo, fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrofóbica. El rendimiento de esta purificación fue de aproximadamente 3%. La enzima purificada posee una masa molecular de 70 KDa, determinada por SDS-PAGE y un pI de 5,3. Las características cinéticas mostraron que posee un pH óptimo de 5,0 y una temperatura óptima de 60°C. Además, es estable a temperaturas inferiores a 50 °C. Presenta una K_M de 0,1 mM para pNPAra.

El gen *abf 2* posee un marco de lectura abierto de 2.295 pb, incluyendo 7 intrones y codifica para una proteína de 635 aminoácidos con un péptido señal de 17 aminoácidos, y con una masa molecular calculada de 67.212 Da, la cual pertenece a la familia 51 de las glicosil hidrolasas (GH51). Posee seis posibles sitios de glicosilación y los residuos E357 y E434 constituyen los posibles residuos catalíticos de esta enzima.

La secuencia de 553 pb río arriba de dicho gen presentó posibles sitios de unión a factores de transcripción: dos posibles sitios de unión a CreA, un posible sitio de unión a AlcR, un posible sitio de unión a AceI, cuatro posibles sitios de unión a AreA y dos cajas CAAT.

Se observó inducción de las arabinofuranosidasas de *P. purpurogenum* con L-arabitol y L-arabinosa, un poliol y una pentosa respectivamente, no así con otros intermediarios metabólicos tales como xilitol ni D-xilosa. Esta inducción es suprimida por represión catabólica mediada por glucosa.

Abstract

Lignocellulose is the major component of plants and it represents a great source of renewable organic matter. It is composed of lignin, pectin, cellulose and hemicelluloses. Hemicelluloses are the major component, after cellulose. They are constituted by a set of polisaccharides: xylans, galactans, mannans and arabinans, which are named after the sugar that forms the main chain.

The degradation of hemicelluloses is performed by bacteria and fungi, which produce a variety of enzymes capable of degrading those complex polimeric substrates. However, this degradation is limited by the presence, among others, of arabinose residues side chains. Arabinofuranosidases (Abfs) are the enzymes in charge of catalyzing the hydrolysis of these residues.

The enormous amount of agroindustrial lignocellulosic wastes can be converted to value added products by the utilization of hemicellulolytic enzymes, thus a better understanding of them is required.

The fungus *Penicillium purpurogenum* produces a great variety of hemicellulolytic enzymes. Several of them have been purified and characterized, among them endoxylanases, acetylxylan esterases, β -xylosidases and one arabinofuranosidase.

This work focused on the study of a second arabinofuranosidase (Abf 2). L-arabitol was identified as the best inducer for the production of Abfs. However, other carbon sources such as sugar beet pulp, corn cob and oat spelt xylan, produced high levels of activity.

Abf 2 was purified in five steps: supernatant ultrafiltration, ammonium sulfate fractionation, cation exchange chromatography, anion exchange chromatography, and hydrophobic interaction chromatography. The yield of this purification was approximately 3%. The purified enzyme has a molecular mass of 70 KDa, determined by SDS-PAGE, and an isoelectric point of 5.3. The kinetic properties showed an optimum pH of 5.0 and an optimum temperature of 60 °C. Moreover, it is stable at temperatures below 50 °C. The K_M for pNPAra is 0.1 mM

The *abf 2* gene has an open reading frame of 2,295 bp, including 7 introns and it codes for a protein of 635 residues, with a signal peptide of 17 residues, and a calculated molecular mass of 67,212 Da.

Abf 2 is found to belong to the family 51 of the glycosyl hydrolases (GH51). It has six possible glycosylation sites and residues E357 and E434 have been predicted as the possible catalytic residues of this enzyme.

A 553 bp upstream sequence of the *abf 2* gene showed possible binding sites for transcription factors: two possible binding sites to CreA, one possible binding site for AlcR, one possible binding site for AceI, four possible binding sites for AreA and two CAAT boxes.

Induction of the production of arabinofuranosidases of *P. purpurogenum* was observed with L-arabitol and L-arabinose, a pentitol and a pentose respectively, but was not observed with xylitol or xylose. This induction is suppressed by carbon catabolite repression exerted by glucose.

1. Introducción.

Los carbohidratos juegan un rol clave en los organismos vivos. Las plantas, algas y algunas bacterias utilizan la fotosíntesis para convertir la energía solar en energía química, la que luego es almacenada en forma de carbohidratos. La hidrólisis de estos carbohidratos provee la energía necesaria para la vida.

Las células vegetales están rodeadas por una pared celular dinámica, compuesta de un complejo arreglo de carbohidratos, lignina y proteínas, llamada lignocelulosa, la que no sólo provee la flexibilidad necesaria que facilita el crecimiento y el desarrollo de la planta, sino que también le da la fuerza y rigidez que necesita para enfrentar los ataques físicos y microbianos. Esta envoltura determina eventualmente el tamaño final de la planta.

La lignocelulosa representa la mayor fuente de materia orgánica renovable de la biosfera, y las propiedades químicas de sus componentes la hacen un sustrato de enorme valor biotecnológico (Malherbe y Cloete, 2003). Grandes cantidades de “basura” lignocelulósica son generadas por las prácticas forestales y la agricultura, industrias papeleras, industrias de la madera y muchas agroindustrias, prácticas que provocan problemas de contaminación ambiental. Lamentablemente, la mayor parte de la basura lignocelulósica se desecha mediante quemas de biomasa, la cual no está restringida sólo a los países en vías de desarrollo, sino que es considerada un fenómeno global (Levine, 1996). Sin embargo, la gran cantidad de biomasa vegetal residual considerada como “desechos” puede ser potencialmente convertida en varios productos de valor agregado incluyendo biocombustibles, productos químicos, materias primas baratas para fermentación y alimentos animales mejorados, mediante la utilización de enzimas lignocelulolíticas.

El estudio de estas enzimas se hace por lo tanto muy necesario, ya que su utilización en la industria requiere de un conocimiento previo de sus características, su función, su especificidad, su eficiencia y las condiciones óptimas necesarias para llevar a cabo la catálisis. Por lo demás, es el conocimiento de estas características el que puede también facilitar el desarrollo de una tecnología ambientalmente más amigable.

1.1 Composición de las hemicelulosas

La lignocelulosa está compuesta principalmente de hemicelulosas, lignina, celulosa y pectinas. La celulosa y hemicelulosas son los polisacáridos mayoritarios de la pared celular vegetal, y dan cuenta de aproximadamente el 70% de toda la biomasa vegetal, siendo las hemicelulosas los polímeros más abundantes luego de la celulosa. Ellas representan cerca de 20-35% de la biomasa lignocelulósica (Ward y Moo-Young, 1989).

Las hemicelulosas son polisacáridos encontrados en asociación con la celulosa mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, y con la lignina mediante enlaces covalentes tipo éter y éster (Figura 1).

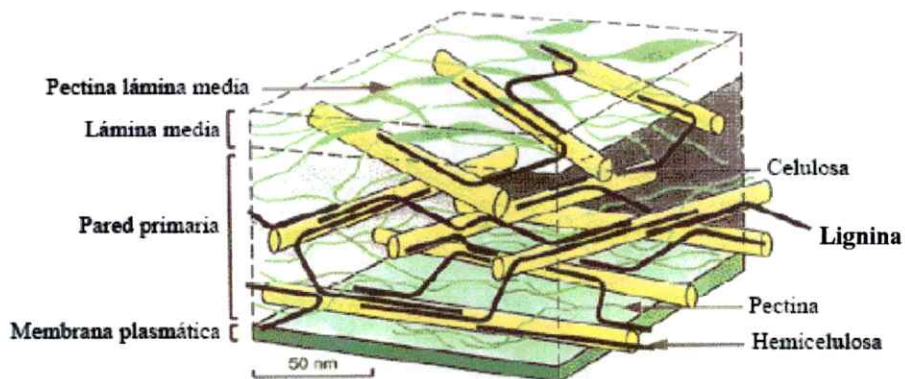


Figura 1. Representación esquemática simplificada de la pared celular vegetal. En ella se destaca la disposición de la celulosa y las hemicelulosas.

El término “hemicelulosa” fue introducido en 1891 por Schulze (Schulze, 1891) y se refiere al componente más fácilmente hidrolizable de la pared celular y que es extraíble por álcali. Este término inespecífico es frecuentemente usado para describir a un diverso grupo de polisacáridos de pared celular, que excluye a la celulosa y a las pectinas.

Las hemicelulosas tienen una composición heterogénea que depende del tipo de planta e incluso puede variar entre diferentes partes de la misma planta. Se clasifican de acuerdo al azúcar que forma la cadena principal del polímero en: arabinanos, galactanos, xilanos y mananos, si el azúcar es arabinosa, galactosa, xilosa o manosa respectivamente.

Sin embargo, en contraste con la celulosa, las hemicelulosas son heteropolímeros ramificados (mientras que la celulosa está compuesta exclusivamente por cadenas lineales de unidades de glucosa), y no forman estructuras cristalinas. Entre las ramificaciones destacan residuos de L-arabinosa, ácido D-O-metil glucorónico y grupos no glucídicos tales como acetato y ácidos cinámicos.

1.2 Distribución de la L-arabinosa en la pared celular

La mayoría de las hemicelulosas contienen L-arabinosa. Este azúcar se puede encontrar tanto como componente de la cadena principal (arabinanos) así como sustituyente de ella (arabinoxilanos, arabinogalactanos, etc.). A pesar de que el contenido de este azúcar en las plantas es relativamente bajo, su presencia como sustituyente de la cadena principal de las hemicelulosas restringe la hidrólisis por glicanasas. A continuación se describirán algunas características de aquellos polisacáridos que contienen L- arabinosa.

1.2.1 L-arabinano.

El L- arabinano es un polímero de residuos de α -L-arabinofuranosa unidos por enlaces α (1 \rightarrow 5) formando una cadena lineal, la cual se encuentra ramificada por los mismos residuos de α -L-arabinofuranosa en las posiciones 2 y 3 (Figura 2). Normalmente este polímero se encuentra unido a material pectínico. Se puede encontrar en maderas duras, granos de leguminosas, jugos de fruta y coseta de remolacha (Sun y Hughes, 1999).

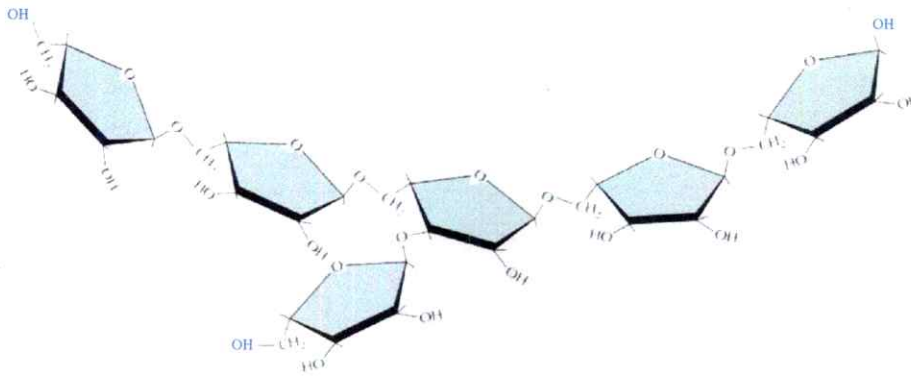


Figura 2: Estructura del arabinano. Los residuos de α -L-arabinofuranosa están unidos por enlaces α (1 \rightarrow 5) formando la cadena lineal y ramificaciones del mismo azúcar se muestran en la posición 3 (adaptado de Buchanan, 2002).

1.2.2 Arabinoxilanos

El xilano es el polisacárido hemicelulósico más común de la pared celular de las plantas terrestres, representando más del 30% del peso seco de las plantas. Está compuesto de una cadena principal de residuos de xilosa unidas entre sí por enlaces glicosídicos del tipo β (1 \rightarrow 4) con una variedad de sustituyentes en los carbonos de las posiciones 2 y 3.

Los grupos laterales que los sustituyen están unidos a la cadena principal mediante enlaces de tipo glicosídicos, en el caso que el sustituyente sea arabinosa o ácido metil glucurónico, o por enlaces tipo éster, en el caso del ácido acético. Los residuos de

arabinosa pueden estar a su vez sustituidos en el carbono 5 por ácidos cinámicos tales como ácido ferúlico o ácido *p*- cumárico, unidos por enlace éster (Figura 3).

La composición y grado de polimerización (DP) del xilano varía según su origen y tejido. Así, el xilano de maderas duras (abedul, álamo y alerce), se encuentra acetilado en un 70% de los residuos y presenta un DP de 150 a 200 unidades de xilosa, mientras que el xilano de maderas blandas (pino), no contiene acetilaciones y presenta un DP de 70 a 130 unidades de xilosa (Kulkarni y cols., 1999).

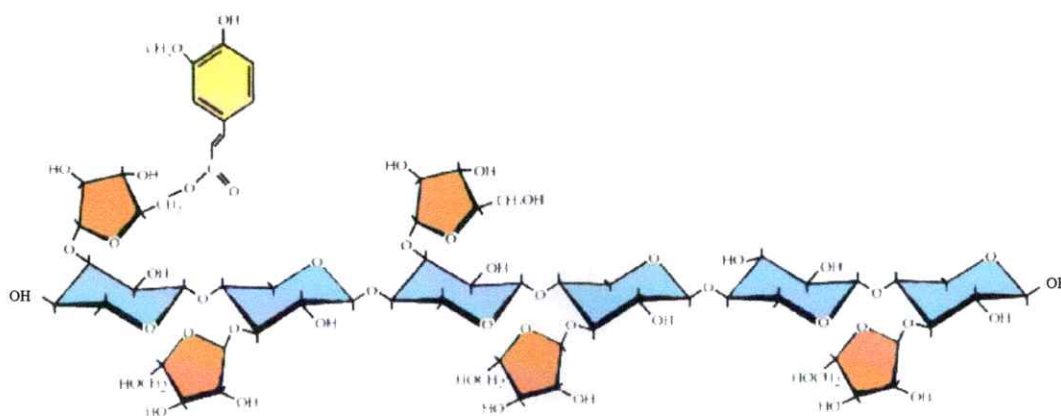


Figura 3: Estructura del arabinoxilano. La cadena principal está formada por residuos de xilosa (azul) unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Se observan ramificaciones de residuos de arabinosa (naranja), las cuales a su vez pueden estar sustituidos por ácido ferúlico (amarillo) (adaptado de Buchanan, 2002).

1.3 Degradación enzimática de hemicelulosas.

Muchos microorganismos degradan las hemicelulosas para utilizarlas como fuente de carbono. Para llevar a cabo esta degradación se requiere de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos y ésteres presentes en ellas. Pero la degradación de las hemicelulosas se ve limitada debido a su composición heterogénea, la gran complejidad de los xilanos y su cercana interacción con celulosa y otros polímeros de la pared celular, y requiere de la cooperación de una gran variedad de enzimas (Figura 4).

Como se mencionó anteriormente, los residuos de L-arabinosa están ampliamente distribuidos en los polímeros de la pared celular vegetal como cadenas laterales. (como en el caso del arabinano, arabinoxilano y el arabinogalactano (Brice y Morrison, 1982). La presencia de estas cadenas laterales restringe la degradación enzimática de las hemicelulosas. Más aún, representan una gran barrera tecnológica que retarda varios procesos industriales, como por ejemplo la sacarificación de residuos agrícolas y forestales a azúcares monoméricos para la fermentación a químicos y combustibles (Saha, 2000).

Desde un punto de vista biotecnológico, la conversión enzimática de celulosa y hemicelulosas en sus respectivos componentes azúcares es necesaria para la degradación económica y ambientalmente eficiente de desechos agrícolas y forestales en compuestos con valor agregado.

Las α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) o Abfs son enzimas que catalizan la hidrólisis de los residuos arabinofuranosilos presentes en los polisacáridos nombrados anteriormente (Figura 4).

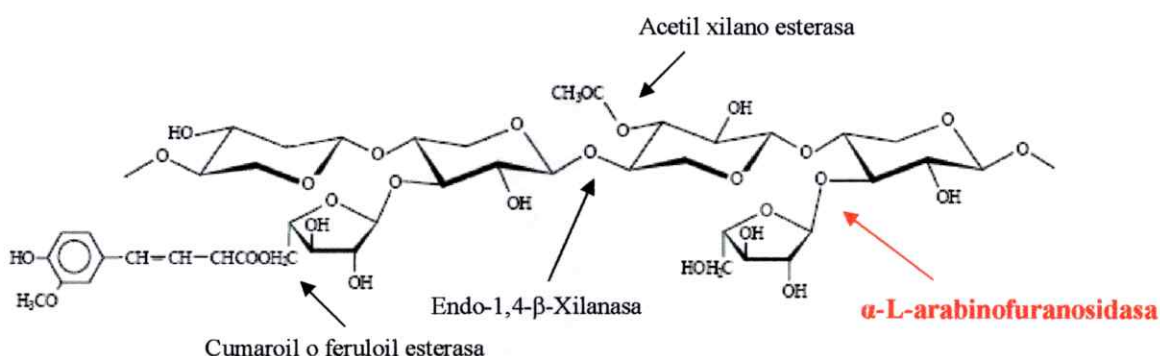


Figura 4. Estructura simplificada del arabinoxilano y las enzimas involucradas en su degradación. Este se compone de una cadena principal de residuos de xilosa unidos por enlaces β -1,4 y por sustituciones de arabinosa (unidas a las posiciones C-2 y/o C-3 de los residuos de xilosa de la cadena principal), ácido acético (unido a C-2 o 3), y ácido ferúlico o cumárico esterificado en la posición O-5 de las cadenas laterales de arabinosa.

La acción de estas enzimas acelera la hidrólisis de los enlaces glicosídicos en más de 10^{17} veces, convirtiéndolas en uno de los catalizadores conocidos más eficientes (Rye y Withers (2000), Shallom y col., 2002). Específicamente, las Abfs catalizan la hidrólisis de los residuos de arabinosa no reductores de diferentes oligo y polisacáridos. Estas enzimas forman parte del grupo de las glicosil hidrolasas (GHs), las cuales se han agrupado en familias, basándose en similitudes de estructura primaria [Carbohydrate-Active Enzymes Server at <http://afmb.cnrs-mrs.fr>], (Coutinho y Henrissat, 2000).

A la fecha se han descrito 106 familias de GHs, pero las α -L-arabinofuranosidasas sólo se han descrito en las GH3, GH43, GH51, GH54 y GH62. En general, las enzimas en GH43 y GH62 hidrolizan arabinano α -1,5 no sustituido y arabinooligosacáridos α -1,5 (Matuso y col., 2000), mientras que las Abfs de GH51 y GH54 poseen una especificidad de sustrato más relajada (Flipphi y col., 1994).

Las Abfs de hongos han sido aisladas de un amplio número de géneros y especies, pero las más estudiadas hasta el momento son aquellas pertenecientes a diferentes especies de *Aspergillus*, en especial de *A. niger*. Estas Abfs tienen masas moleculares entre 32 y 128 KDa y en su mayoría se caracterizan por tener un punto isoeléctrico ácido. Las condiciones óptimas para su acción también se encuentran en un rango de pH ácido (Luonteri, 1998).

A la fecha se conoce la estructura tridimensional de algunas arabinofuranosidasas de GH3, GH43 y GH51, aunque de GH62 existen cristales pero aún no se ha determinado su estructura tridimensional. El conocimiento de dichas estructuras tridimensionales ha permitido conocer con detalle el modo de acción y especificidad de ligandos de estas enzimas (Hövel y col., 2003; Miyanaga y col., 2004; Taylor y col., 2006).

1.4 Aplicaciones biotecnológicas de las α -L-arabinofuranosidasas.

La importancia de las enzimas que degradan la lignocelulosa está bien definida debido a su rol en muchos procesos biotecnológicos e industriales. Esto ha resultado en el establecimiento de una nueva era para la utilización eficiente de los residuos agrícolas baratos. Las Abfs, con la acción sinérgica de otras enzimas degradadoras de lignocelulosa, son herramientas prometedoras en varios procesos agro-industriales. A continuación se explican brevemente algunas aplicaciones de estas enzimas.

1.4.1 α -L-arabinofuranosidasas y la industria del vino.

Una de las características más importantes de la calidad del vino es su aroma. Se sabe que ciertos monoterpenos contribuyen significativamente al sabor del vino (Mateo y Jiménez, 2000). Una gran porción de estos monoterpenoles presentes en muchos brebajes, incluido el vino y los jugos de frutas, están unidos a disacáridos, en los que el azúcar no reductor es α -L-arabinosa. Esta arabinosa puede ser liberada por acción de las α -L-arabinofuranosidasas. Ahora se sabe que estos monoterpenoles pueden ser liberados por hidrólisis enzimática secuencial (Giinata y col.,1990). En el primer paso, el enlace glicosídico es hidrolizado por Abfs seguido por la acción de otras glicosidasas que liberan los monoterpenoles. Así, el tratamiento con Abfs puede ser usado para promover las propiedades organolépticas del vino. Actualmente las enzimas producidas a escala industrial provienen del hongo *Aspergillus niger* y son usadas en la aromatización de vinos y otras bebidas alcohólicas (Aryon y col., Biskup y col., 1993).

1.4.2 α -L-arabinofuranosidasas y la calidad del pan.

El endurecimiento del pan es probablemente el principal problema que ocurre durante su almacenamiento, lo que lleva a grandes pérdidas económicas en la industria panadera

(Gobbetti y col., 1999). Los pentosanos (nombre genérico que se les da a los arabinoxilanos) son ingredientes importantes en el pan y su rol en la textura y dureza es bien conocido. Los pentosanos pueden ser moderadamente hidrolizados por enzimas presentes en la harina de trigo, y especialmente por enzimas exógenas, como aquellas pertenecientes al sistema de degradación del xilano, entre ellas las xilanasas y arabinofuranosidasas (Fessas y Schiraldi, 1998; Jiménez y Martínez-Araya, 1999). Estas enzimas generan pentosas libres (principalmente xilosa y arabinosa) permitiendo su disponibilidad para ser fermentadas por la bacteria acidoláctica *Lactobacillus hilgardii* utilizada en la industria del pan, aumentando así las tasas de producción de ácido acético y CO₂, responsables del sabor y la porosidad del pan respectivamente (Gobbetti y col., 1999). Así, las Abfs, han sido consideradas como estimuladores naturales que mejoran la calidad del pan y retrasan su endurecimiento, otorgando beneficios económicos a la industria panadera (Martínez-Anaya y Devesa, 1999).

1.4.3 Producción de azúcares fermentables para la industria del bioetanol.

El proceso utilizado actualmente para la producción industrial de bioetanol es la conversión enzimática de los azúcares de la caña de azúcar, maíz, remolacha entre otros, llevada a cabo por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Sørensen y col., 2005). Sin embargo, estos sustratos requieren de un pretratamiento para poder ser utilizados para dicha producción (Zaldívar y col., 2001; Saha y col., 2003). La complejidad y heterogeneidad de los arabinoxilanos de las hemicelulosas, requiere de complejos sistemas enzimáticos que conviertan estos sustratos en azúcares fermentables. Tal complejo enzimático debe incluir enzimas despolimerizadoras y que hidrolicen grupos laterales para degradar las hemicelulosas a monosacáridos pentosas (Saha, 2003). La acción sinérgica de las Abfs con otras enzimas lignocelulolíticas las convierte en

agentes más adecuados para la sacarificación de varios residuos agrícolas para la producción de combustibles.

1.4.4 Producción de L-arabinosa como agente antiglicémico.

Recientemente, se ha desarrollado un creciente interés por la L-arabinosa como un posible aditivo en los alimentos debido a su sabor dulce y su baja absorción por el cuerpo humano. Más aún, se ha probado que la L-arabinosa inhibe selectivamente la sacarasa intestinal de manera competitiva y por lo tanto reduce la respuesta glicémica luego de la ingesta de sacarosa en animales (Seri y col., 1996), por lo que la L-arabinosa podría ser usada como un inhibidor de la digestión de sacarosa, lo que tendría un importante uso en la prevención de hiperglicemia en pacientes diabéticos (Sanai y col., 1997). Para lograr esta meta, es necesaria la producción de grandes cantidades de L-arabinosa, proceso en el cual sería de vital importancia el uso de Abfs.

1.4.5 α -L-arabinofuranosidasas y alimento animal.

En la digestión de los rumiantes participan ácidos y microorganismos presentes en el rumen. A pesar de que las hemicelulosas (principalmente xilanos) representan entre el 30 y el 40% de los carbohidratos totales del forraje, su contribución a la energía dietaria disponible para los animales está a menudo disminuida debido a la baja digestión general (40 a 60%) (Dehority y col., 1965). El incremento en la digestibilidad de los alimentos está correlacionado con la disminución del grado de sustitución de los polímeros de hemicelulosa. Por tanto, la presencia de residuos de L-arabinosa dificulta la hidrólisis total de los xilanos y además restringe la acción de otras glicanasas (Greve y col., 1984; Kormelink y col., 1993). Se ha visto que el uso comercial de preparaciones enzimáticas que contienen Abfs aumenta la efectividad de las endoxilanasas debido a

que estas últimas prefieren regiones no sustituidas del xilano como sustrato, lo que resulta en la disminución de la viscosidad de los alimentos (Mathlouthi y col., 2002). Esta estrategia ya está siendo utilizada en algunos países (Roche y col., 1995).

1.5 Modelo de estudio: el hongo *Penicillium purpurogenum*.

Los hongos del género *Penicillium* son comúnmente conocidos como moho verde o azul, y algunas especies han sido ampliamente explotadas para la producción de antibióticos como la penicilina. Generalmente se encuentran contaminando frutas o descomponiendo alimentos. Pero aparte de estas características, muchos *Penicillium* son productores de celulasas, hemicelulasas y pectinasas. El hongo de pudrición blanda *P. purpurogenum*, aislado de suelos del sur de Chile (Musalem y col., 1984) es utilizado como modelo de estudio en nuestro laboratorio y sus sistemas celulolíticos y xilanolíticos han sido descritos en detalle. Este hongo aeróbico produce una serie de enzimas extracelulares que degradan el xilano, varias de las cuales ya han sido purificadas y caracterizadas en nuestro laboratorio. Se han encontrado isoenzimas para la mayoría de estas enzimas, las que parecen ser codificadas por genes distintos (Aguirre, 1997). Específicamente este hongo produce 3 isoenzimas de α -L-arabinofuranosidasas, (llamadas Abf 1, 2 y 3), las cuales fueron separadas por isoelectroenfoque (De Ioannes y col., 2000). De ellas, Abf 1 y 3 han sido purificadas y caracterizadas, y Abf 1 ha sido además secuenciada (Carvallo y col., 2003).

1.6 Hipótesis.

La Abf 2 del hongo *Penicillium purpurogenum* posee características cinéticas, estructurales y regulatorias que la diferencian de las otras Abfs producidas por el mismo hongo.

1.7 Objetivos.

1.7.1 Objetivos generales.

1. Purificar y caracterizar la arabinofuranosidasa 2 de *P. purpurogenum*.
2. Secuenciar el gen *abf 2* y su cDNA.

1.7.2 Objetivos específicos.

1. Determinar la inducción de la actividad arabinofuranosidásica en cultivos de *P. purpurogenum* en distintas fuentes de carbono.
2. Realizar cultivos de *P. purpurogenum* y purificar la Abf 2 a partir de sobrenadantes de cultivo.
3. Determinar los parámetros cinéticos de Abf 2.
4. Extraer DNA genómico y RNA total de *P. purpurogenum*, y realizar síntesis de cDNA.
5. Amplificar y secuenciar el gen *abf 2* y su cDNA.
6. Amplificar y secuenciar el promotor del gen *abf 2*.
7. Realizar análisis de la secuencia aminoacídica de Abf 2.

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales.

2.1.1 Equipos.

Los equipos utilizados fueron los siguientes: Termociclador MiniCycler™ MJ Research, Transiluminador de luz UV Vilber Lourmat, Microcentrifugas Eppendorf 5415 C y Heraeus Biofuge 13, Equipo de electroporación BioRad, Espectrofotómetro con arreglo de diodos Hewlett Packard UV-visible HP8452A, Sistema fotográfico digital Kodak EDAS 290, Estufa de cultivo Memmert, Fuentes de poder EPS 250, C. B. S. Scientific y EC 500, E-C Apparatus, Baños termoregulados Memmert e IPROM, Bomba peristáltica Gilson Medical Electronics, Colector de fracciones Bio-Rad modelo 2110, Cámara de electroforesis Labnet, Centrifuga Sorvall RC2-B, Incubador con agitación New Brunswick, Vortex Maxi Mix II Thermolyne, Equipo de ultrafiltración Amicon modelo 52, Centrifuga "speed vac" Savant, Cámara de isoelectroenfoque Mini IEF Cell Model 111, Bio-Rad, Lector de microplacas Universal Microplate Reader EL_x800 BioTek Instruments Vinoski VT, homogenizador Potter.

2.1.2 Reactivos químicos.

De Merck: acetona, ácido acético, ácido clorhídrico, ácido tricloro acético, EDTA, etanol, metanol, SDS, NaCl, NaOH, KH₂PO₄, MgSO₄ x 7H₂O, CaCl₂, FeSO₄ x 7H₂O, MnSO₄ x H₂O, ZnSO₄ x 7H₂O, CoCl₂ x 6H₂O, (NH₄)₂SO₄, citrato de sodio, MgSO₄, MgCl₂, CaCl₂, NH₄Cl. De DIFCO: agar papa dextrosa, Neo-peptona, Triptona. De Sigma: Azul de bromofenol, DTT, D-glucosa, acrilamida, bis-acrilamida, bromuro de etidio, glicógeno, polietilenglicol, xilano de avena, L-arabitol, xilitol, D-arabinosa, L-arabinosa, PNPAra, pNP, urea, 4-metil umbeliferil α-L-arabinofuranósido, persulfato de

amonio , Tritón X-100, urea, TRIZMA^R base, ácido desoxicólico. De Winkler: fructosa, DEPC, cloroformo, isopropanol. De Arquimed: nitrato de plata. De Bio-Rad, anfolitos.

2.1.3 Reactivos para biología molecular.

De Invitrogen: agarosa (bajo punto de fusión), TRIzol^R, Transcriptasa reversa SuperScript II. De Fermentas: GeneRuler 1Kb DNA ladder, RNAsa A, RNAsa H, dNTP mix. De GeneCraft: Pfu polimerasa. De Bioaxis: Taq polimerasa. De Promega: MLV-RT transcriptasa reversa, X-gal, IPTG. De Sigma: Proteínasa K. De Winkler: fenol saturado ácido, fenol saturado básico. De Sigma: Ampicilina.

2.1.4 Sistemas comerciales (kits).

Para la purificación de DNA plasmidial se adquirió el sistema comercial QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen. Para la purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa, se utilizó el sistema QIAquick Gel Extraction Kit de Qiagen. Para los clonamientos de productos de PCR se usó el sistema pGEM-T Easy Vector System de Promega. Para la amplificación de secuencias genómicas desconocidas a partir de zonas de DNA desconocidas se adquirió el sistema Genome WalkerTM Universal kit de Clontech. Para la síntesis de cDNA se utilizó parte del kit 3'RACE, de Invitrogen.

2.1.5 Material cromatográfico.

De Bio-Rad: Bio Gel S200; De Pharmacia: DEAE- Sephadex A-25. De Sigma: SP Sepharose Fast Flow, fenil agarosa.

2.1.6 Material biológico.

2.1.6.1 Cepa del hongo.

La cepa del hongo utilizada fue *Penicillium purpurogenum*, aislada de muestras de suelo del sur de Chile por la profesora Jeannette Steiner, del Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, y registrado en ATCC N° MYA-38 (Musalem y cols., 1984).

2.1.6.2 Cepas bacterianas.

Para todas las transformaciones se utilizó la bacteria *Escherichia coli* DH5 α .

2.2 Métodos.

2.2.1 Cultivos del hongo.

2.2.1.1 Cultivos sólidos.

El hongo *P. purpurogenum* se creció en placas de agar papa dextrosa al 3,9% en una estufa a 28°C por 1 semana hasta observar abundante esporulación. Posteriormente se procedió a extraer las esporas, raspando la superficie del micelio con un asa estéril, para luego ser diluidas en un matraz que contenía una solución estéril de NaCl 0,9% junto con bolitas de vidrio, que al agitarse facilitan la separación de dichas esporas. El contenido del matraz fue filtrado en un embudo con gasa y algodón estéril. Dicho filtrado, que contenía las esporas, fue utilizado para inocular los cultivos líquidos, previo conteo en una cámara de Petroff-Hauser.

2.2.1.2 Cultivos líquidos.

Se preparó un medio líquido descrito por Mandels (Mandels y Weber, 1969), compuesto por:

a) Sales minerales: KH_2PO_4 2 g/L; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/L; CaCl_2 0,3 g/L; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/L; MnSO_4 1,56 mg/L; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 2,49 mg/L; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 3,66 mg/L.

b) Fuentes de nitrógeno: Neo-peptona 0,75 g/L; urea 0,3 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g/L.

Se inocularon aproximadamente 10^7 esporas en 100 mL de medio. La fuente de carbono utilizada dependió del objetivo del experimento. Así, para la producción de arabinofuranosidasas y la posterior purificación de la Abf 2 se utilizó xilano de avena al 1% p/v; para la extracción de RNA, se utilizó fructosa al 1% p/v por dos días, para luego filtrar el micelio e inocular un matraz con 100 mL de medio Mandels suplementado con L-arabitol al 0,1% p/v como fuente de carbono inductora.

Los cultivos se realizaron a 28°C y 200 rpm en un incubador con agitación.

2.2.1.3 Toma de muestras de cultivos líquidos.

Se retiró en forma estéril 1 mL del sobrenadante de cultivo, el cual fue centrifugado a 27.000 x g por 2 min para eliminar los restos de micelio, y luego fue congelado a -20°C hasta su utilización.

2.2.2 Medios de cultivo bacterianos.

Las bacterias se crecieron en medio Luria- Bertani (LB), compuesto por triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L. Para la selección de bacterias transformantes en medio sólido se adicionó 15 g/L de agar-agar, el cual fue suplementado con ampicilina, IPTG y X-gal a concentraciones finales de 1 mg/mL, 100 mM y 50 mg/mL respectivamente. Finalmente el crecimiento de bacterias transformantes se realizó en medio LB líquido suplementado con ampicilina a una concentración final de 1 mg/mL.

2.2.3 Purificación de Abf 2 de *Penicillium purpurogenum*.

2.2.3.1 Preparación del extracto crudo.

Se preparó un cultivo líquido del hongo *P. purpurogenum* en medio Mandels con xilano de avena como fuente de carbono, el cual fue incubado por 8 días a 28 °C en un agitador orbital. Una vez completado este tiempo, el cultivo completo fue filtrado a través de gasa y luego centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 20 min; el sobrenadante fue denominado "extracto crudo". A partir de este paso, todas las etapas siguientes fueron realizadas a 4°C.

2.2.3.2 Precipitación con sulfato de amonio.

El extracto crudo se concentró aproximadamente 43 veces mediante un sistema de ultrafiltración Amicon, utilizando una membrana de corte de 10 KDa. Posteriormente, al concentrado se le agregó lentamente, y con agitación suave, sulfato de amonio sólido, hasta llegar a un 40% de saturación, y fue luego centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 10 min. Al sobrenadante obtenido se le agregó sulfato de amonio hasta un 90% de saturación, y se dejó precipitar toda la noche, con agitación suave, para luego ser centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 10 min. El precipitado obtenido se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0.

2.2.3.3 Cromatografía de intercambio aniónico.

Una columna de DEAE-Sephadex A 25 (1,6 x 26 cm) de 20 ml de lecho fue equilibrada con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y la muestra antes precipitada (40,2 g de proteína) fue cargada en dicha columna. La columna fue lavada con tres volúmenes del mismo amortiguador a una velocidad de 7 ml/hora, colectándose muestras de 1,5 mL. Las fracciones que presentaban actividad arabinofuranosidásica

("pool" activo) fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 12%. Posteriormente fueron concentradas mediante ultrafiltración con una membrana de corte de 10 KDa y equilibradas con amortiguador acetato 50 mM pH 4,0.

2.2.3.4 Cromatografía de intercambio catiónico.

Una columna de Sulfopropil Sepharose (1,6 x 26 cm) de 15 mL de lecho fue equilibrada con amortiguador acetato 50 mM pH 4,0. En ella fue cargado el "pool" activo de la columna anterior. La columna fue lavada con tres volúmenes del mismo amortiguador a una velocidad de 6 mL/hora y eluida con 140 mL de una gradiente salina lineal de 0 a 0,5 M de NaCl en amortiguador acetato 50 mM pH 4,0. Las fracciones activas se juntaron y fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 12%. Posteriormente la mezcla fue concentrada por ultrafiltración y equilibrada en amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 y 1,2 M de sulfato de amonio.

2.2.3.5 Cromatografía de interacción hidrofóbica.

Una columna de fenil agarosa (1,6 x 26 cm) de 10 mL de lecho fue equilibrada en amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 y 1,2 M de sulfato de amonio. En ella se cargó el "pool" activo resultante de la columna de Sulfopropil Sepharose, y se lavó con 3 volúmenes de columna con el mismo amortiguador a una velocidad de 10 mL/h. Finalmente la columna fue eluida con una gradiente salina lineal descendente de 1,2 a 0 M de sulfato de amonio en amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,0. Las fracciones activas fueron analizadas en gel de poliacrilamida-SDS al 12%.

2.2.4 Análisis de proteínas.

2.2.4.1 Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó por los siguientes métodos: a) absorbancia a 280 nm, para el análisis de los eluidos cromatográficos y b) método de Bradford (Bradford, 1976), con una previa precipitación de proteínas con TCA en presencia de DOC, el que además elimina los interferentes presentes en los materiales lignocelulósicos.

2.2.4.2 Ensayos de actividad enzimática

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron utilizando el sustrato PNP Ara, el cual al ser hidrolizado por Abfs, libera como producto pNP. Este, a pH alcalino se disocia formando ion fenolato, que posee un intenso color amarillo y puede ser cuantificado espectrofotométricamente a 405 nm.

2.2.4.2.1 Microensayo de actividad arabinofuranosidásica.

Este ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos a la que se le agregó por pocillo 20 μ L de amortiguador citrato 50 mM pH 4,0, 25 μ L de sustrato (pNP Ara) 2mM disuelto en el mismo amortiguador) y 5 μ L de la dilución enzimática a ensayar. Las placas se incubaron por 15 min a 35°C y la reacción se reveló con 50 μ L de una solución de Na_2CO_3 0,2 M, para luego medir su absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas. Se determinó la cantidad de pNP formado mediante interpolación en una curva estándar de pNP. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de sustrato por minuto. Este ensayo se utilizó para medir la actividad enzimática de eluidos de columnas, ensayos de inducción de la actividad enzimática.

2.2.4.2.2 Macroensayo de actividad arabinofuranosidásica.

Se emplearon por duplicado tubos de ensayo de vidrio de 10 mL, a los que se agregaron 250 μ L de amortiguador citrato 50 mM pH 4,0, 250 μ L de sustrato (pNP Ara 10 mM disuelto en el mismo amortiguador. Los tubos fueron preincubados por 5 min a 35°C. Posteriormente se les agregó 50 μ L de la dilución enzimática a ensayar. Los tubos fueron incubados por 15 min a 35°C y la reacción fue detenida con 500 μ L de una solución de Na₂CO₃ 0,2 M, para luego determinar su absorbancia a 405 nm en el espectrofotómetro. La cantidad de pNP formado se determinó de la misma manera que en los microensayos. Estos ensayos fueron utilizados para la determinación de parámetros cinéticos.

2.2.4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida.

2.2.4.3.1 Geles en condiciones desnaturantes.

Se utilizó el método de Laemmli con geles desnaturantes al 12 % en acrilamida (Bollag y Edelstein, 1991). Los geles SDS para la determinación de proteínas fueron teñidos con una solución de nitrato de plata 10 mM (Blum y cols., 1987).

2.2.4.3.2 Geles para isoelectroenfoque y zimograma.

Los geles de isoelectroenfoque (IEF) se realizaron al 4% de acrilamida y 2% en anfolitos con un rango de pH de 3 a 10. Se cargaron 0,5 μ g de proteína en cada carril y 1 μ l de estándar de IEF. La corrida del gel se realizó por 15 min a 100 V, seguido de 15 min a 200 V y finalmente 60 min a 450 V. Una vez terminada la corrida, se realizaron zimogramas, para lo cual se aplicó una mezcla de 8 mL de agarosa de bajo punto de fusión al 1% conteniendo 0,5 mg de MuAra como sustrato (4-metil umbeliferil α -L-arabinofuranósido) disuelto en 2 mL de etanol 100%. Se incubaron estos geles por 1

minuto a temperatura ambiente, para posteriormente fotografiarlos sobre un transiluminador UV. La reacción consiste en que las Abfs son capaces de hidrolizar el sustrato MuAra, transformándolo en metilumebliferona, que se caracteriza por ser fluorescente al iluminarse con luz UV, lo que permite una fácil identificación.

2.2.5 Determinación de parámetros cinéticos.

2.2.5.1 Medición de K_M para pNPArA.

Se determinó la K_M para pNPArA, utilizando una curva de saturación en amortiguador citrato 50 mM pH 4,0, variando la concentración de pNPArA de 0,1 a 1 mM.

2.2.5.2 pH óptimo y efecto de la temperatura.

La determinación de pH óptimo se realizó utilizando como amortiguadores de reacción soluciones de citrato 50 mM a pHs 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0 y 7,0.

El estudio del efecto de la temperatura se realizó de la misma manera que el ensayo original de actividad, sólo que en éste se varió solamente la temperatura de reacción.

2.2.6 Extracción de ácidos nucleicos.

2.2.6.1 Extracción de RNA.

Todo el material utilizado para las extracciones fue previamente tratado con DEPC según los procedimientos seguidos por Schachter (2000). A las 4 horas de cultivo del hongo en medio Mandels con arabitol, se filtró el micelio, se lavó con PBS y se congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente se depositaron aproximadamente 2 g de micelio en un homogenizador Potter de vidrio, se le agregó 2 mL de TRIzol^R y se molió el micelio con un vástago de teflón. La mezcla obtenida se alicuotó en volúmenes de 1 mL en tubos Eppendorf y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 0,2

mL de cloroformo a cada tubo, se mezcló fuerte a mano y se incubó a temperatura ambiente por 2 mins. Los tubos posteriormente fueron centrifugados a 12.000 x g por 15 min. Se transfirió la fase acuosa de cada tubo a un tubo limpio y se le agregó 0,5 mL de isopropanol a cada tubo para luego ser incubados a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugaron a 12.000 x g por 10 min a 4°C, se removió el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol por tubo. Luego se mezcló por vórtex y se centrifugó a 7.500 x g por 5 min a 4°C. Finalmente se secó el precipitado al aire por 10 min y se lo disolvió en agua libre de RNAsas.

2.2.6.2 Síntesis de cDNA.

Para realizar la síntesis de cDNA se utilizó el kit 3'RACE de Invitrogen. Se tomaron alrededor de 5 µg de RNA total, y se enrasaron a 11 µL con agua DEPC. Posteriormente se agregó 1 µL del partidor adaptador AP (10 µM), la mezcla se calentó a 70°C durante 10 min, y luego se enfrió en hielo por 1 min. Se recolectó el contenido por centrifugación suave y se agregó 2 µL de amortiguador de PCR 10X (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno y 2 µL de DTT 0,1 M. Se calentó la muestra a 42°C por 5 min, se agregó 1 µL de transcriptasa reversa "SuperScript RT" 200 U/µL y se dejó polimerizar el cDNA a la misma temperatura durante 50 min. Se terminó la reacción calentando la muestra a 70°C por 15 min. Finalmente se enfrió la mezcla y se agregó 1 µL de RNAsa H 2 U/µL, y se dejó incubar la mezcla por 30 min a 37°C. El cDNA resultante se guardó a -20°C hasta su uso.

2.2.6.3 Extracción de DNA genómico.

Se extrajo DNA genómico de micelio congelado del hongo, según el método de Bainbridge y col. (1990) con la modificación de que el micelio congelado fue pulverizado con nitrógeno líquido en mortero. Aproximadamente 1 g del pulverizado fue resuspendido en 10 mL de una solución de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,25 M pH 8,0, Tritón X-100 0,5% v/v, proteinasa K 200 µg/mL, dejando la mezcla por 12 horas a 37 °C. Luego se agregó 1,5 mL de NaCl 1,5 M, 7 mL de fenol saturado básico y 3 mL de cloroformo. Se mezcló la solución por inversión por 5 min y se centrifugó a 12.000 x g por una hora a temperatura ambiente. El sobrenadante se trató con 0,05 volúmenes de RNasa A 10 mg/mL y se incubó por 30 min a 37 °C. Posteriormente se agregó un volumen de cloroformo y se mezcló por inversión por 5 min. Se centrifugó la mezcla a 5.000 x g por 10 min y el sobrenadante se depositó en un tubo Corex, donde se agregó 0,54 volúmenes de isopropanol por goteo. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 4.100 x g por 30 min. Finalmente se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 1 mL de amortiguador Tris-EDTA pH 7,9.

2.2.7 Técnicas de PCR.

2.2.7.1 Condiciones generales.

Las condiciones utilizadas para los ensayos de PCR fueron las siguientes: Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP 0,05 mM cada uno, MgCl₂ 2,5 mM, 0,3 U de DNA polimerasa Taq y los partidores correspondientes en cada caso, a una concentración de 15 µM. La cantidad de molde utilizado varió según su procedencia. El programa utilizado para la reacción consistió en 30 ciclos de: 1 min de desnaturación a 94°C, 1 min de hibridación a temperatura variable y 1 min de elongación a 72°C con una extensión final de 10 min a 72°C al término de los ciclos.

Los productos de estas reacciones se sometieron a análisis mediante electroforesis en geles de agarosa.

2.2.7.2 PCR de colonias bacterianas.

Para la identificación de clones que podrían contener el inserto esperado, se realizó un PCR directo de colonias bacterianas. Para ello, se picó la colonia a analizar con una punta estéril, y se aplicó directamente a la mezcla de reacción. Se realizó el mismo programa general, agregando en el primer ciclo, 1 minuto adicional a 94°C, con el objeto de lisar las células.

2.2.7.3 Diseño de partidores para PCR.

El diseño de partidores degenerados para la secuenciación del cDNA se realizó a partir de zonas conocidas de la secuencia aminoacídica de Abf 2, en las cuales los partidores presentaran el menor número de degeneraciones posibles. Estas zonas corresponden al extremo amino terminal de Abf 2 (obtenida por el método de Edman), de la cual se obtuvo el partidor JE-1A y de un péptido interno (obtenido por digestión enzimática con tripsina y secuenciado por espectrometría de masas), de la que se obtuvo el partidor JE-3A (Tabla I). La secuenciación peptídica fue realizada en el laboratorio del Dr. Josef Van Beeumen, Universidad de Gante, Bélgica. Además se diseñó una serie de partidores para la secuenciación del gen y del cDNA de Abf 2 a medida que se avanzaba en la secuencia (ver Tabla I). Los partidores fueron sintetizados por la empresa Bioaxis, excepto por los partidores AP (provistos por Invitrogen), AP1 y AP2 (provistos por el kit "Genome Walker").

Tabla I. Partidores utilizados en este trabajo.

Partidor	Secuencia 5' → 3'	Orientación
JE-1A	5' GT(C/T)CAGAT(C/T)TCTGT(C/T)GC 3'	→
JE-2A	5' CAGTACGG(C/T)GCTATGGA 3'	→
JE-3A	5' GTA (A/G)AC(A/G)AC(A/G)TGCCAGC 3'	←
JE-4A	5' AAAAGGCTTCCAGCTCC 3'	→
JE-6A	5' TCCTGGCTTCCACTATC 3'	→
JE-7A	5' CATCGAGGGCATCTTGG 3'	←
JE-8A	5' ATTTGCAAACTCTTTG 3'	←
JE-9A	5' GATCATGGTTGGCGACC 3'	←
JE-10A	5' GCATAGAGACCACCTTCACCAGCAGT 3'	←
JE-11A	5' AAGTTGGATGGGTAGGTGGTGCTTCCC 3'	←
JE-14A	5' GCGCCATTCGTTGATGAACCTGGACA 3'	→
JE-15A	5' GCTACGAGTGGTCGCCAACCATGATC 3'	→
JE-18A	5' CTAGTTAGTCGTGAGCA 3'	←
AP	5' GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'	←
API	5'GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'	
AP2	5' ACTATAGGGCACGCGTGGT 3'	

2.2.8 Amplificación de secuencias desconocidas de DNA genómico mediante

Genome Walking.

La técnica de Genome Walking permite la amplificación de secuencias de DNA genómico desconocidas adyacentes a secuencias conocidas. Esta técnica se utilizó para obtener parte de la secuencia del extremo 5' del gen *abf2* y para obtener secuencias río arriba del gen. Para esto se utilizó el sistema comercial "Genome Walker" de Clontech.

La técnica implica la construcción de una serie de “librerías” de fragmentos genómicos, obtenidos por enzimas de restricción, ligados a un adaptador, desde los cuales se puede amplificar la secuencia deseada usando partidores de la zona conocida del gen y partidores que aparean con regiones del adaptador (Figura 5). Los experimentos se hicieron siguiendo las insitrucciones del fabricante.

2.2.8.1 Digestión y purificación del DNA genómico.

En cuatro digestiones paralelas, 2,5 µg de DNA genómico de *P. purpurogenum* fueron digeridos con 8 U de las enzimas de restricción *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* o *StuI* por dos horas en un volumen final de 100 µL. Después de mezclar suavemente, los tubos se incubaron entre 16-18 horas a 37°C. Pasado ese lapso de tiempo, se agregaron 95 µL de fenol saturado básico a cada tubo. Los tubos se agitaron brevemente y se centrifugaron para separar las fases. Las fases acuosas se transfirieron a tubos limpios, y a cada tubo se agregaron 95 µL de cloroformo. Nuevamente se agitaron brevemente los tubos y se centrifugaron para separar las fases. Las fases acuosas se transfirieron a tubos limpios, y a cada tubo se agregaron 190 µL de etanol 95% frío, 9,5 µL de acetato de sodio 3 M (pH 4,5) y 20 µg de glicógeno. Se agitaron brevemente y se centrifugaron a 20.000 x g por 10 min. Los sobrenadantes se descartaron, los precipitados se lavaron con 100 µL de etanol 80% frío y los tubos se volvieron a centrifugar en idénticas condiciones. Los sobrenadantes se descartaron y los precipitados se secaron para ser disueltos en 20 µL de amortiguador TE modificado (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,5).

2.2.8.2 Ligación de adaptadores.

Se diseñaron cuatro reacciones paralelas en tubos Eppendorf conteniendo cada uno de ellos 1,9 µL de solución de adaptador 25 µM, 1,6 µL de amortiguador de ligación y 3

U de ligasa del fago T4. A cada tubo se le agregaron 4 μ L de uno de los cuatro productos de digestión explicados en el punto anterior, y se incubaron por 12 horas a 16°C. Las ligaciones se detuvieron incubando los tubos a 70°C por 5 min. Finalmente cada tubo se enrasó a 100 μ L con amortiguador TE pH 7,4.

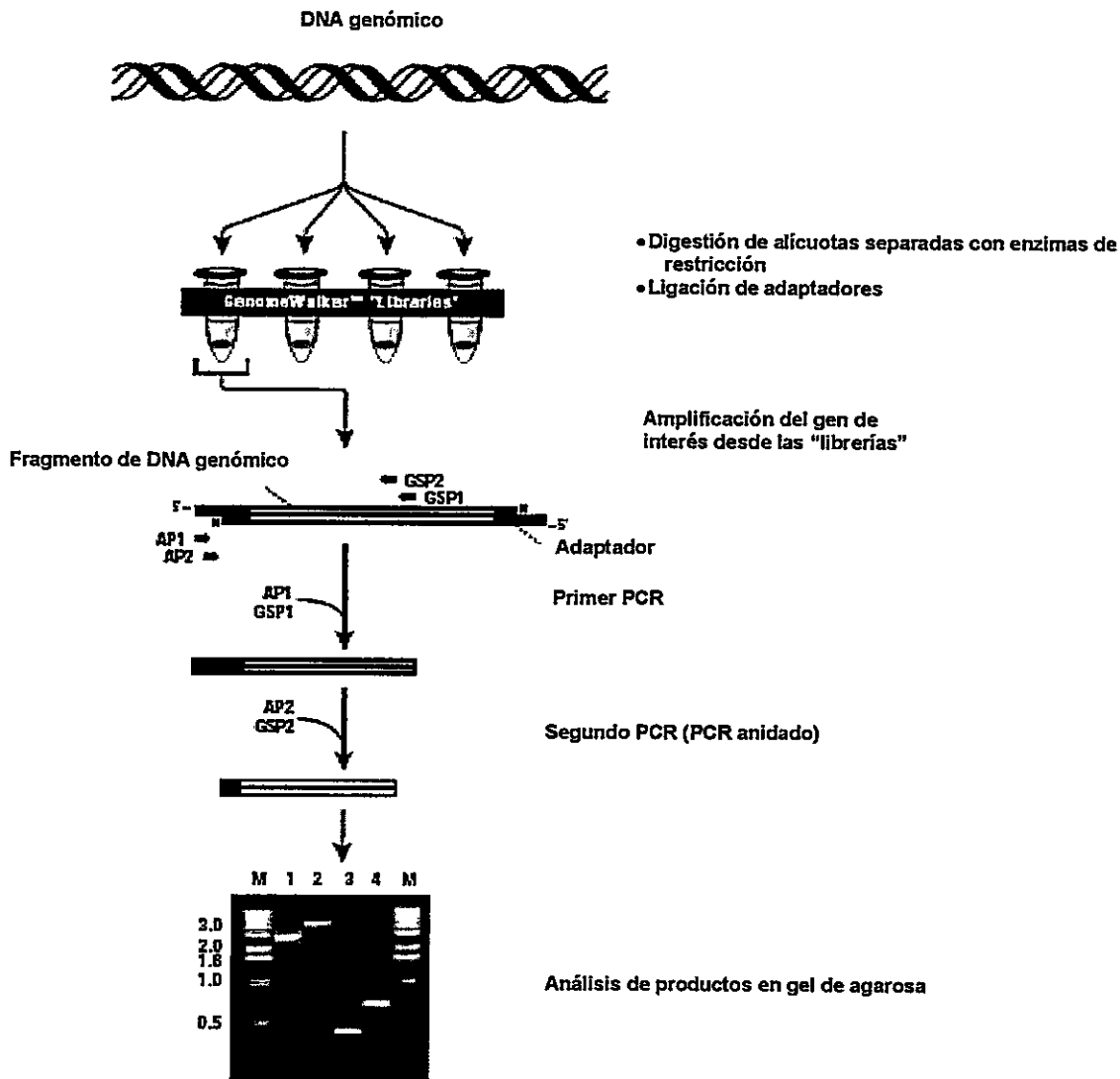


Figura 5. Esquema de la técnica de Genome Walking. GSP1 y GSP2 son partidores específicos de la zona conocida del gen. AP1 y AP2 son partidores que hibridan con los adaptadores. Luego del análisis de los productos de PCR, el más adecuado es elegido para ser clonado y secuenciado (Adaptado de "Manual del kit Genome Walker", Clontech).

2.2.8.3 Primera reacción de PCR.

Las mezclas de reacciones de PCR, de 50 μ L finales cada una, fueron las mismas descritas anteriormente (sección 2.2.7.1). El molde utilizado fue 1 μ L de DNA-adaptador proveniente del punto anterior. En cada caso, se usaron los partidores AP1 y un partidador específico del gen *abf 2*. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial de 1 min a 94°C, 9 ciclos de 25 seg a 94°C y 3 min a 70°C, 34 ciclos de 25 segundos a 94°C y 3 min a 65°C, y una extensión final de 7 min a 65°C. La polimerasa (5U) se agregó en la etapa de desnaturalización inicial (“hot start”).

2.2.8.4 Segunda reacción de PCR (PCR anidado).

Las mezclas de reacciones de PCR (cada reacción fue de 50 μ L volumen final) fueron las mismas descritas anteriormente (sección 2.2.8.3), excepto que como molde se usó 1 μ L de una dilución 1/50 de los productos de PCR obtenidos en el punto anterior. Para el PCR anidado se usaron los partidores AP2 y un partidador específico del gen, más interno (río arriba) que el usado en el primer PCR. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial de 1 min a 94°C, 5 ciclos de 25 seg a 94°C y 3 min a 72°C, 20 ciclos de 25 seg a 94°C y 3 min a 67°C, y un alargue final de 7 min a 67°C. La polimerasa (5U) se agregó en la etapa de desnaturalización inicial (“hot start”).

2.2.9 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

El DNA fue separado en geles horizontales de agarosa al 0,5-1,5% (p/v) según el tamaño a separar. Los geles se prepararon en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,002 M, pH 7,5). A las muestras se les agregó amortiguador de carga (glicerol 50% v/v, EDTA 50 mM, azul de bromofenol 1,5 mg/mL) y luego se cargaron en el gel. Las condiciones de electroforesis fueron entre 50 y 100 V en tampón TAE 1X.

Una vez terminada la electroforesis, el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) por 20 min, para posteriormente ser visualizado en un transiluminador UV y fotografiado.

2.2.10 Recuperación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa.

Los fragmentos de DNA a purificar, ya separados mediante electroforesis, fueron cortados desde el gel, y purificados mediante el kit comercial QIAquick Gel Extraction, de QIAGEN según instrucciones del fabricante.

2.2.11 Clonamiento de productos de PCR.

El clonamiento de los productos de PCR se realizó empleando el sistema comercial “pGEM-T Easy Vector System” de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este sistema proporciona el vector pGEM-T, el cual se prepara digiriendo el plásmido pGEM-5zf(+) con la enzima de restricción *EcoRV* y adicionando (mediante dTTP) una timina en ambos extremos 3' del vector, las que incrementan la eficacia de la ligación de productos de PCR obtenidos con polimerasas termoestables (ej. Taq) que adicionan adeninas en los extremos 3' de los amplificados.

La reacción de ligación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente o a 4°C durante toda la noche, con: 5 µL de amortiguador de ligación 2X (60 mM Tris-HCl pH 7,8, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2mM ATP, 10% polietilenglicol), 1 µL de vector pGEM-T Easy, 1 µL de DNA ligasa del fago T4 (3U/µL) y 25 ng de producto de PCR. Finalmente el volumen de reacción se llevó a 10 µL.

2.2.12 Transformación de *E. coli*.

2.2.12.1 Preparación de células electrocompetentes.

La preparación de células electrocompetentes consistió en inocular 3 mL de medio LB con 30 μ L de un cultivo fresco y saturado de *E. coli* DH5 α ($A_{600} > 1,0$) y esperar hasta que el cultivo alcanzara una A_{600} entre 0,5 y 0,6. Luego se centrifugó a 17.000 x g por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Las células se mantuvieron en hielo por 1 min y se resuspendieron en 1 mL de agua tridestilada estéril enfriada en hielo, para luego ser centrifugadas a 17.000 x g por 5 min. Este lavado se repitió 3 veces. Finalmente se resuspendieron las células en 40 μ L de glicerol 10% enfriado en hielo. Las células fueron utilizadas inmediatamente.

2.2.12.2 Transformación por electroporación.

Para transformar células por electroporación, los productos de ligación deben ser previamente desalados para prevenir la formación de un arco voltaico durante la aplicación del pulso eléctrico. Para ello en un tubo Eppendorf se gelificó agarosa 1% disuelta en agua destilada conteniendo 100 mM de glucosa, y se hizo un orificio en el centro del gel, en el cual se depositó la mezcla de ligación. Se dejó desalar la muestra por difusión durante 90 min, en hielo. Se agregaron entre 3 y 5 μ L de la ligación desalada a un tubo conteniendo 40 μ L de células preparadas de acuerdo a Métodos 2.2.12.1. El contenido fue transferido a una cubeta de electroporación estéril de 0,2 cm de distancia entre electrodos, la cual se dejó enfriar en hielo por 5 min para luego ser transferida a la cámara de electroporación para aplicar el pulso. Las condiciones fueron: voltaje 2.500 V, resistencia 200 Ω y capacitancia 24 μ F. Luego de aplicar el pulso, se retiró la cubeta de la cámara, colocándose inmediatamente en hielo, y la mezcla se diluyó en 960 μ L de medio LB, incubándose a 37°C con agitación durante 1 hora. La

selección de bacterias transformantes se realizó en placas con agar Luria suplementado con ampicilina, IPTG y X-gal.

2.2.13 Secuenciación nucleotídica.

Para las secuenciaciones realizadas en la Universidad Católica se utilizó un secuenciador automático DNA ABI PRISM310 (Perkin Elmer) adaptado con un sistema de detección de fluorescencia inducida por láser durante una corrida de electroforesis capilar. Para las secuenciaciones realizadas en Korea, por la empresa Macrogen se utilizó un secuenciador 3730xl DNA analyzer. Los espectros fluorescentes fueron luego traducidos a secuencia nucleotídica utilizando el programa computacional ABIVIEW.

2.2.14 Análisis de secuencias, diseño de partidores y alineamientos.

Para el análisis de secuencias nucleotídicas obtenidas por secuenciación automática y su ensamblaje se utilizó el paquete de programas DNASTar de Lasergene. Para el diseño de partidores se utilizó el programa FAST PCR, software disponible en la red. Se utilizó también el servidor BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul y col., 1990) para la comparación de secuencias y búsqueda de ellas en la base de datos. Para realizar alineamientos de secuencias conocidas se utilizó el programa ClustalW. Por último, para realizar alineamientos y generar árboles filogenéticos se usó el programa ClustalX, escogiendo las opciones de excluir posiciones con “gaps” y corregir para sustituciones múltiples. Estos últimos se visualizaron con el programa SplitsTree.

3. Resultados.

3.1 Efecto de la fuente de carbono en la producción de arabinofuranosidasas.

El efecto de las fuentes de carbono en la producción de arabinofuranosidasas en el tiempo se muestra en la Figura 6. El L-arabitol resultó ser el mejor inductor para la producción de la actividad Abf. En cuanto a las fuentes de carbono naturales utilizadas (coseta de remolacha, xilano de avena, y coronta de maíz), se observó una producción similar, siendo la coseta de remolacha levemente superior.

En general, la producción de Abfs aumentó bruscamente hasta el cuarto día de cultivo, a excepción del cultivo en L-arabitol, en el que la actividad aumentó hasta el décimo primer día. Se observa que luego de dicho día, la actividad arabinofuranosidásica total comienza a disminuir.

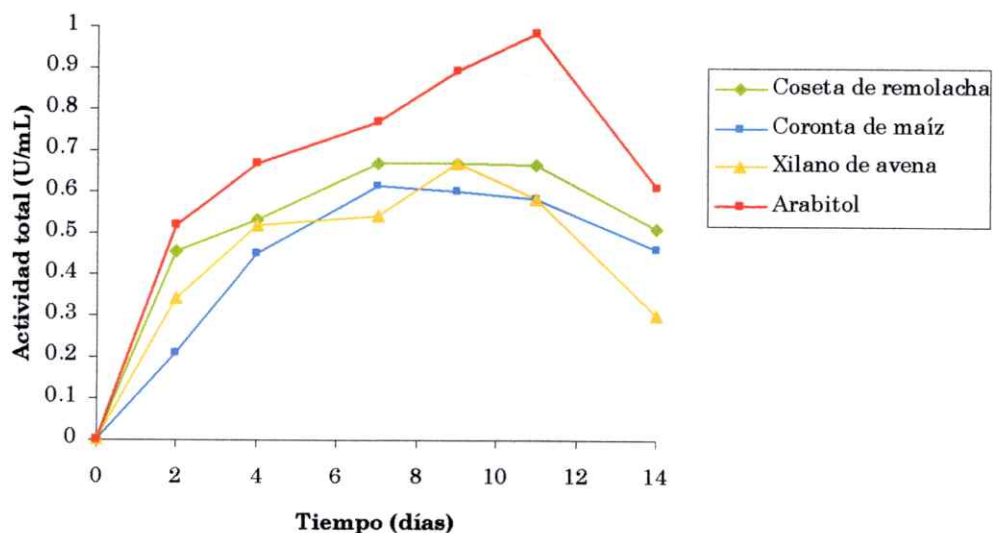


Fig 6. Cinética de producción de L-arabinofuranosidasa de *P. purpurogenum* en medios de cultivo líquidos con distintas fuentes de carbono.

3.2 Purificación de Abf 2 de *Penicillium purpurogenum*.

Siguiendo un protocolo de purificación ya establecido (Ravanal, MC, comunicación personal) se procedió a purificar la Abf 2. Para ello se utilizó como material de partida el filtrado de 890 mL de un cultivo líquido de 8 días del hongo en medio Mandels con xilano de avena al 1% como única fuente de carbono (ver discusión).

El filtrado se concentró por ultrafiltración de manera de obtener una concentración de proteínas suficiente para realizar una precipitación con sulfato de amonio. Producto de esta filtración la muestra se concentró aproximadamente 5 veces, obteniéndose una disminución de las proteínas totales de aproximadamente un 72%, con una recuperación de la actividad del 98%, como se muestra en la Tabla II.

El siguiente paso consistió en una precipitación con sulfato de amonio al 40% de saturación de manera de precipitar compuestos interferentes en la purificación, precipitado en el cual no se observa actividad arabinofuranosidásica (datos no mostrados). Posteriormente se realizó un corte de 90% de saturación. En este paso de la purificación el rendimiento llega al 83%, como se muestra en la Tabla II.

3.2.1 Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE Sefadex A-25

La fracción obtenida del paso anterior se cargó en una columna de DEAE Sefadex A-25, cuyo perfil de elución se muestra en la Figura 7A. Al analizar el perfil obtenido del lavado de dicha columna, se observa la aparición de un pico bien definido a 280 nm, el cual calza con un pico de actividad arabinofuranosidásica. Las fracciones activas fueron juntadas para continuar con la purificación.

3.2.2 Cromatografía de intercambio catiónico en Sulfopropil Sefarosa.

La fracción del paso anterior fue concentrada y equilibrada a pH 4,0, luego fue cargada en una columna de Sulfopropil Sefarosa, la cual fue eluída con un gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M. El perfil obtenido de la elusión de esa columna se muestra en la Figura 7B. Las fracciones activas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida para determinar su pureza. Así se pudo determinar que el pico formado por las fracciones 117 a 129 contenían a la Abf 3, la cual como se observa en la Figura 9B se encontraba pura en las últimas fracciones de este pico. El pico formado por las fracciones 131 a 139 contenían a la Abf 2, sin embargo, ésta no se encontraba completamente pura, como se puede observar en la Figura 8C (carril 1).

Se juntaron por separado las fracciones que contenían a las Abf 2 y 3. El "pool" Abf 2 fue concentrado y equilibrado a pH 7,0 y 1,2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, para continuar con su purificación.

3.2.3 Cromatografía de interacción hidrofóbica en Fenil Agarosa.

El "pool" Abf 2 fue cargado en una columna de fenil agarosa, la cual fue eluída con una gradiente salina descendiente de 1,2 M a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El perfil de elución no se muestra debido a que las absorbancias resultaron ser muy bajas, por lo que se siguió la presencia de Abf 2 mediante ensayos de actividad enzimática y SDS-PAGE. Como se observa en la Figura 8C, la enzima Abf 2, se logró obtener pura en este paso de purificación.

La Tabla II resume los resultados de la purificación.

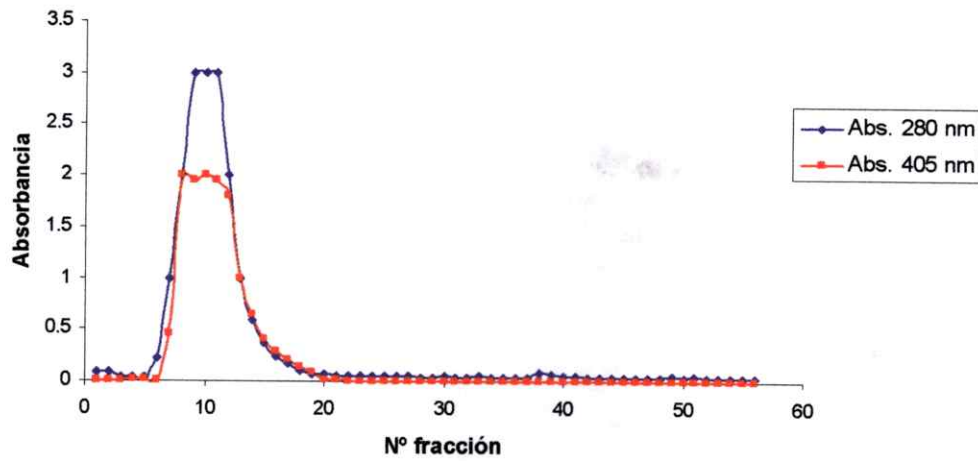
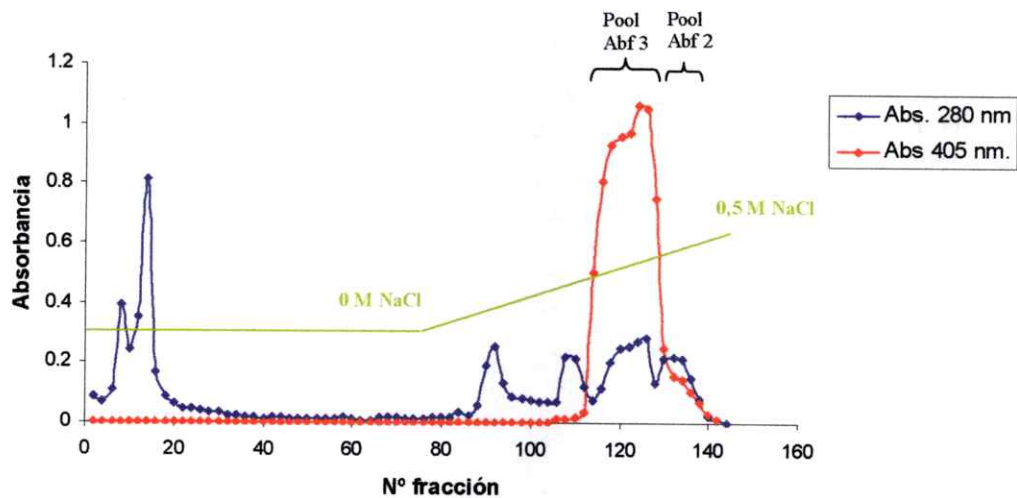
A**B**

Figura 7. Perfiles de elución de las columnas de intercambio iónico. (A) 40,2 mg de proteína, con una actividad de 12,59 U/mg se cargaron a una columna de DEAE-Sefadex A-25. **(B)** 12,6 mg de proteína con una actividad de 24,3 U/mg se cargaron en una columna de sulfopropil sefarosa. En azul se muestra la absorbancia a 280 nm. En rojo se muestra la absorbancia a 405 nm, luego de realizar el ensayo de actividad arabinofuranosidásica. En verde se muestra esquemáticamente la gradiente salina utilizada en la cromatografía.

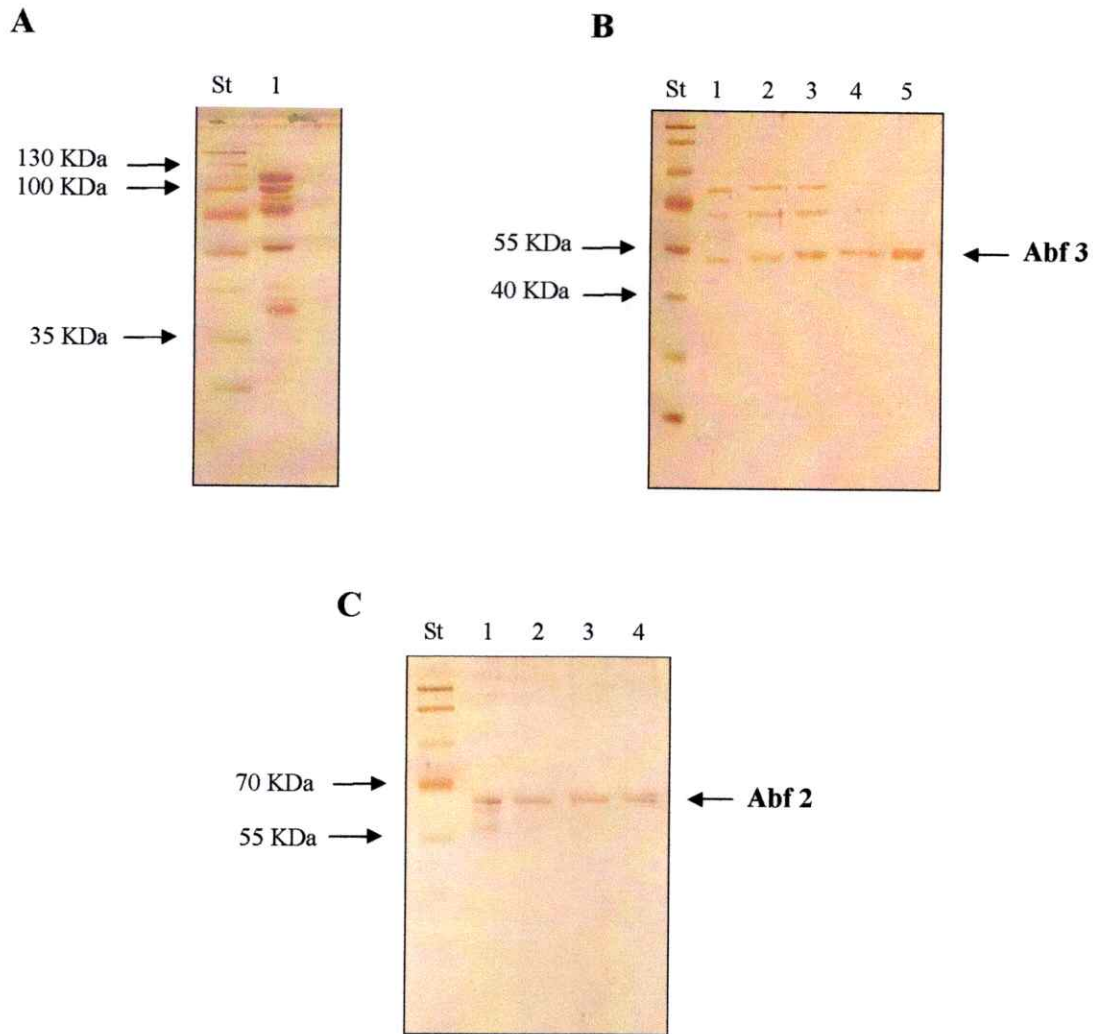


Figura 8. Electroforesis de las tres últimas etapas de purificación de Abf 2 y Abf 3 de *P. purpurogenum* en gel de poliacrilamida desnaturalante al 12%. Los geles fueron teñidos con una solución de nitrato de plata 10 mM. (A) St: estándar de peso molecular. Carril 1: pool activo del lavado de la columna DEAE Sefadex A-25 (B) St: estándar de peso molecular. Carriles 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a las fracciones 119, 121, 123, 125 y 127 respectivamente de la gradiente de la columna sulfopropil sefarosa. (C) St: estándar de peso molecular. Carril 1 corresponde al pool "Abf 2" de la gradiente de la columna Sulfopropil sepharose; Carriles 2, 3 y 4 corresponden al pico activo de la gradiente de la fenil agarosa, que muestran a la Abf 2 pura.

Tabla II. Tabla de purificación para la Abf 2 de *P. purpurogenum*.

Etapa	Volumen (mL)	Proteínas totales (mg)	Unidades totales (U)	Actividad (U/mL)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	895	313,25	608,6	0,68	1,94	100
Ultraconcentrado	173	88,23	596,85	3,45	6,76	98,07
40-90% (NH ₄) ₂ SO ₄	10	40,2	506	50,6	12,59	83,14
DEAE- Sefadex	12	12,6	306	25,5	24,29	50,28
SP-Sefarosa	7	1,26	66,5	9,5	52,78	10,93
Fenil agarosa	3	0,24	17,55	5,85	73,13	2,88

3.3 Determinación del punto isoelectrico.

Este experimento se realizó como se describe en la sección 2.2.4.3.2. El resultado se muestra en la Figura 9, en la cual se muestra la migración de las tres Abfs de *P. purpurogenum* puras a distintos pH, estableciéndose así un punto isoelectrico de 6,5 para Abf 1, 5,3 para Abf 2 y aproximadamente 5,8 para Abf 3. Además se demuestra que éstas son activas sobre MuAra.

Abf 3 se observa como un duplete.

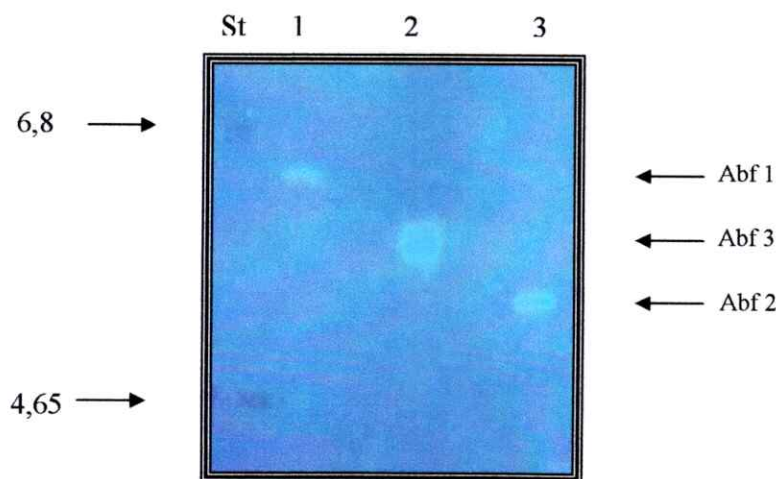


Figura 9. Zimograma sobre isoelectroenfoque de las Abfs de *P. purpurogenum*. En cada carril se cargó entre 2 y 4 μ g de proteína pura. En el primer carril, indicado por "St", se cargó

estándar de punto isoelectrico (pI). St: estándar de punto isoelectrico. Carril 1: Abf 1; Carril 2: Abf 3; Carril 3: Abf 2. El sustrato utilizado en el zimograma fue MuAra.

3.4 Determinación de parámetros cinéticos de Abf 2.

3.4.1 pH óptimo.

Para determinar el pH óptimo de Abf 2 se realizaron ensayos enzimáticos como los descritos en 2.2.5.2, variando el pH del amortiguador citrato 50 mM de 3,0 a 7,0, cada una unidad de pH. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10A, en la cual se puede observar claramente que la enzima presenta un pH óptimo ácido de 5,0. Cabe destacar que la enzima es activa en el rango de pH ensayado.

3.4.2 Estudios de temperatura.

3.4.2.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

Para determinar la temperatura a la cual la enzima presenta la mayor actividad (temperatura óptima), se realizaron ensayos enzimáticos, en los cuales se varió la temperatura de incubación entre 20 y 90 °C, como se describe en la sección 2.2.5.2. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10B, indican que la temperatura óptima para esta enzima es de 60°C en las condiciones de ensayo utilizadas.

3.4.2.2 Estabilidad a distintas temperaturas.

La determinación de la estabilidad térmica de la Abf 2 se realizó preincubando la enzima a distintas temperaturas, durante distintos tiempos, para luego determinar su actividad mediante un ensayo de actividad tradicional. El rango de temperatura utilizado para este experimento abarcó de 30 a 60 °C. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Figura 10 C, y muestran que Abf 2 es estable hasta los 50 °C, pero sobre esta temperatura presenta inestabilidad térmica.

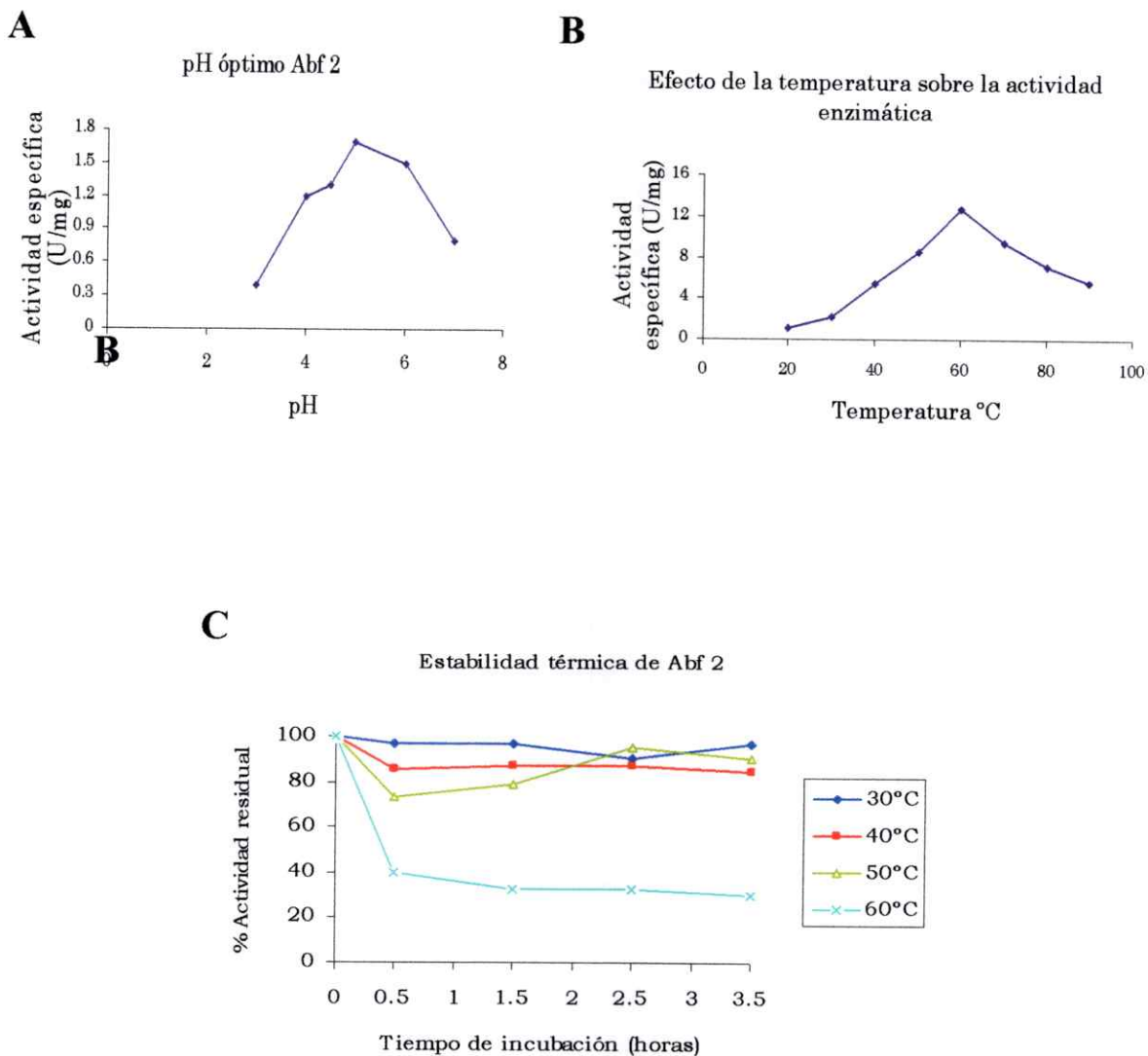


Figura 10. Efectos del pH y temperatura sobre la actividad de Abf 2. (A) pH óptimo de Abf 2. La actividad Abf fue determinada por el método cuantitativo en amortiguador citrato 50 mM a distintos pHs, como se describe en la sección 2.2.5.2. **(B) Temperatura óptima de Abf 2.** Las actividades fueron medidas por el método cuantitativo en amortiguador citrato 50 mM pH 4,0, variando la temperatura de reacción del ensayo, como se describe en la sección 2.2.5.2. **(C) Estabilidad a distintas temperaturas.** Las diluciones enzimáticas fueron incubadas a distintas temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C), por los tiempos indicados en el gráfico, para luego determinar su actividad mediante un ensayo cuantitativo a 35 °C.

3.4.3 Determinación de K_M y V_{max} para Abf 2.

La determinación de los parámetros cinéticos K_M y V_{max} se realizó mediante ensayos de velocidades iniciales en presencia de distintas concentraciones de pNPArA, como se explica en la sección 2.2.5.1. La curva de saturación obtenida para estos experimentos (Figura 11) muestra que la enzima presenta una cinética michaeliana. Mediante el software "Origin", se pudo obtener de manera preliminar (ver discusión) que los valores de K_M y V_{max} fueron de aproximadamente $100 \mu\text{M}$ y 2 U/mg .

Cabe destacar que estos son resultados experimentales que requieren de la realización de más experimentos de manera de obtener más puntos en el inicio de la curva mostrada en la Figura 11.

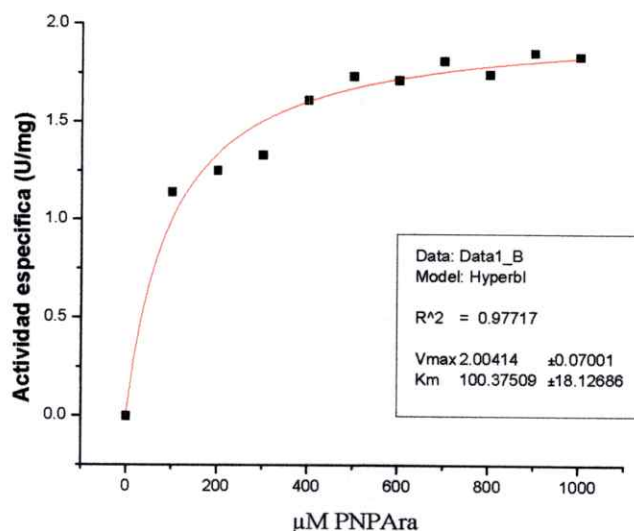


Figura 11. Curva de saturación de Abf 2 usando pNPArA como sustrato. En rojo se observa el ajuste a una función hiperbólica, la cual demuestra el comportamiento Michaeliano de Abf 2. En el recuadro a la derecha se muestran los parámetros K_M y V_{max} , determinados sobre esta curva por el software "Origin".

3.5 Inducción de la actividad arabinofuranosidásica.

Como se explicó anteriormente en la sección 1.3, las arabinofuranosidasas liberan L-arabinosa monomérica desde sustratos poliméricos que contienen este monosacárido. La L-arabinosa es captada por la célula y convertida en D-xilulosa-5-fosfato, la cual entra a la vía de las pentosas fosfato (Witteveen y col., 1989) (Figura 22).

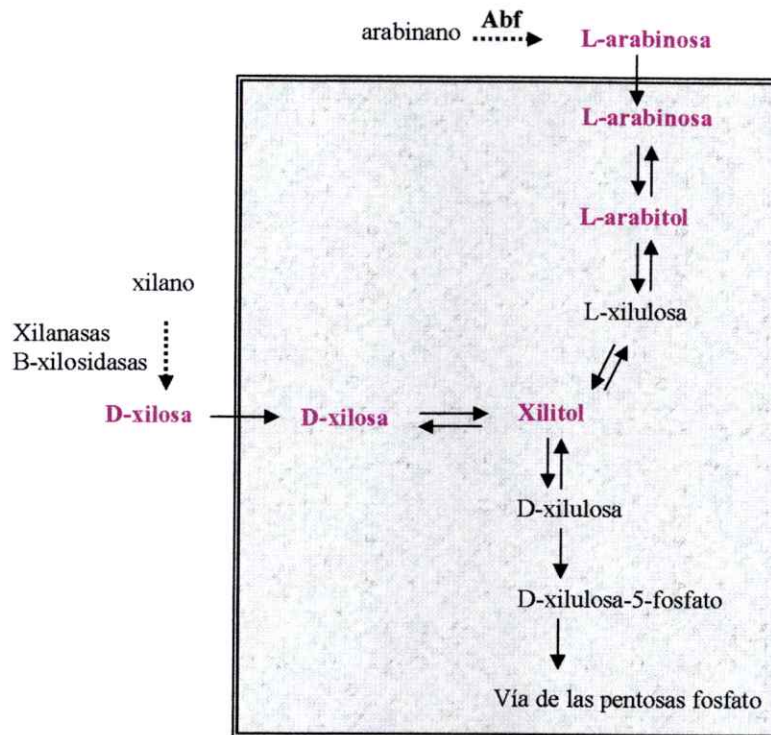


Figura 22. Catabolismo de las pentosas en *Aspergillus niger*. El cuadro celeste encierra los pasos intracelulares. Las flechas punteadas indican la degradación de polisacáridos. En color morado se indican las pentosas y polioles utilizados en los experimentos de inducción de la actividad Abf.

Para determinar si existe inducción de las Abfs de *P. purpurogenum* y ayudar a establecer cuáles son sus sistemas regulatorios, se creció al hongo en medio Mandels suplementado con las distintas pentosas y polioles generados en el catabolismo de la L-arabinosa y la D-xilosa, durante 11 días. La actividad abinofuranosidásica total fue medida a distintos tiempos (Figura 23).

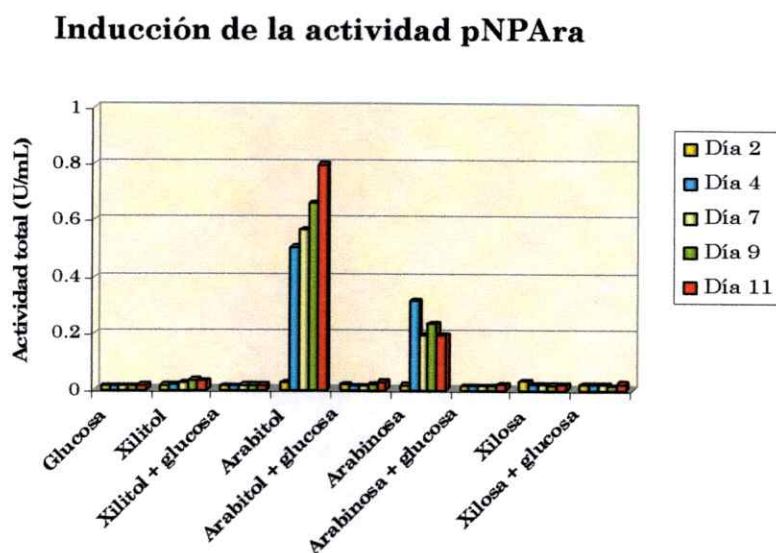


Figura 23. Inducción y represión de la actividad arabinofuranosidásica de *P. purpurogenum* en cultivos de 11 días con glucosa y con pentosas y polioles generados durante el catabolismo de la L-arabinosa. Las distintas fuentes de carbono fueron utilizadas a una concentración de 67 mM. Los resultados corresponden al promedio de 2 experimentos independientes.

Los resultados demuestran que existe inducción de las actividades de hidrólisis de pNPAra en los cultivos con L-arabitól y en menor grado, con L-arabinosa, mientras que D-xilosa y xilitol muestran una inducción prácticamente nula en la actividad Abf. Al agregar glucosa a estos cultivos inducidos se observó que la actividad prácticamente desaparece, lo que demuestra una fuerte represión catabólica por glucosa.

Para determinar la posible existencia de un patrón diferencial en la expresión de las distintas arabinofuranosidasas de *P. purpurogenum* bajo la inducción con L-arabitol y L-arabinosa, los sobrenadantes de los cultivos inducidos se sometieron a un isoelectroenfoque seguido de un zimograma (Figura 24). Se observó que la Abf 1 (pI 6,5) y Abf 3 (pI 5,8) son inducidas con L-arabitol y L-arabinosa, Abf 2 (pI 5,3) sólo es inducida significativamente por L-arabitol.

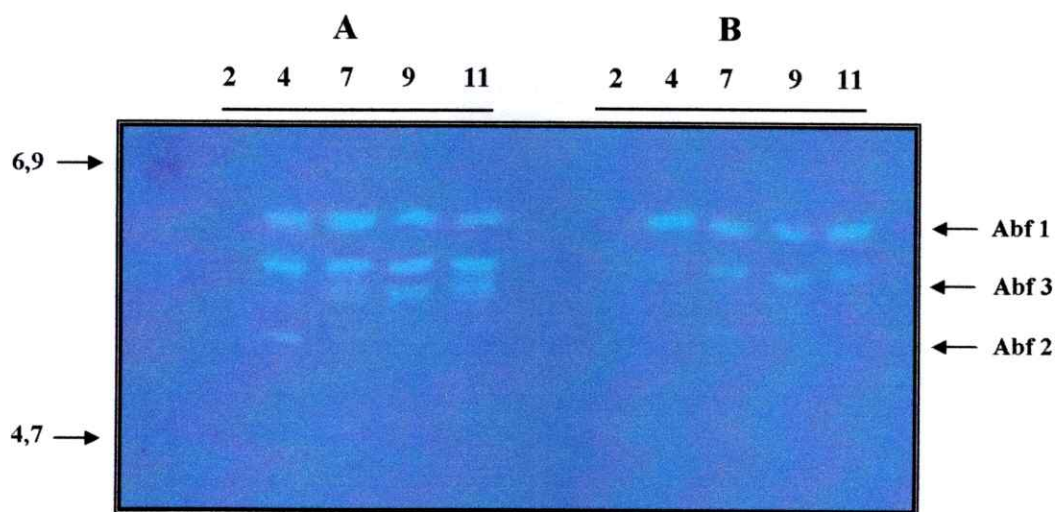


Figura 24. Zimograma que muestra la actividad arabinofuranosidásica de sobrenadantes de cultivos de *P. purpurogenum* bajo la inducción de (A) L-arabitol y (B) L-arabinosa a distintos días de cultivo (2, 4, 7, 9 y 11 días). 2 μ g de proteína fueron cargados en cada carril. El sustrato utilizado para el zimograma fue MuAra.

3.6 Secuenciación de Abf 2.

3.6.1 Secuencias aminoacídicas de fragmentos de Abf 2.

Se determinó previamente la secuencia del amino terminal y de péptidos internos a partir de la enzima pura. Dichas secuenciaciones se llevaron a cabo por la Dra. Isabel Vandenberghe en el Laboratorio de Ingeniería y Bioquímica de Proteínas de la Universidad de Gante, Bélgica (Prof. Van Beeumen). La secuencia amino terminal fue obtenida mediante la técnica de Edman, mientras que las secuencias de péptidos internos fueron obtenidas por digestión enzimática con tripsina y posterior análisis por espectrometría de masas.

Las secuencias obtenidas resultaron ser las siguientes:

1. VQISVAKSGG(A)VTTGLQYGAMEE?INH?GESGLYA
2. SWHVY
3. NTFVI/LTFD
4. WANDWVQQ

La secuencia 1 corresponde al amino terminal y las secuencias 2 a 4 corresponden a péptidos internos. Cabe destacar que existen ciertas incertezas en la identificación de algunos aminoácidos. Por ejemplo, la técnica de espectrometría de masas, no es capaz de discernir entre isoleucina y leucina, debido a que poseen la misma masa residual, y es por esto que dicha anotación es I/L. Por otra parte, la aparición de símbolos “?” en la secuencia, es debida a que no apareció señal de aminoácido en el cromatograma, lo que puede deberse a la existencia de cisteínas en dichas posiciones de la secuencia. Por último, la presencia de un aminoácido escrito entre paréntesis indica que ocurrió una pérdida parcial del cromatograma para dicho aminoácido. En este caso se indica el aminoácido más probable en dicha posición.

Los resultados de una búsqueda en el servidor BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) revelaron similitudes de secuencia entre la secuencia amino terminal y varias arabinofuranosidasas de la familia 51 (GH51), en especial con la arabinofuranosidasa A de *Aspergillus fumigatus*, presentando un 76% de identidad de secuencia con ésta. Para realizar esta búsqueda, se utilizó la secuencia más probable del amino terminal, es decir, tomando en cuenta todos los aspectos explicados anteriormente y asignando el aminoácido más probable en las posiciones inciertas. Posteriormente se procedió a realizar un alineamiento entre la secuencia de la Abf A de *A. fumigatus* y los péptidos internos de *P. purpurogenum*, utilizando el servidor ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), y se encontró que sólo dos de estos (los péptidos número 2 y 3 alineaban parcialmente (Figura 12), por lo que el péptido 4 no fue utilizado para el diseño de partidores. Gracias al alineamiento realizado, se escogieron las secuencias moldes para el diseño de partidores degenerados que permitieran la secuenciación del cDNA. La secuencia amino terminal dio origen a los partidores JE-1A y JE-2A, y el péptido interno 3, el cual alineaba más abajo en la secuencia de Abf A, al partidor JE-3A. Dicho diseño utilizó una tabla de uso de codones específica para *P. purpurogenum* (Anexo I).

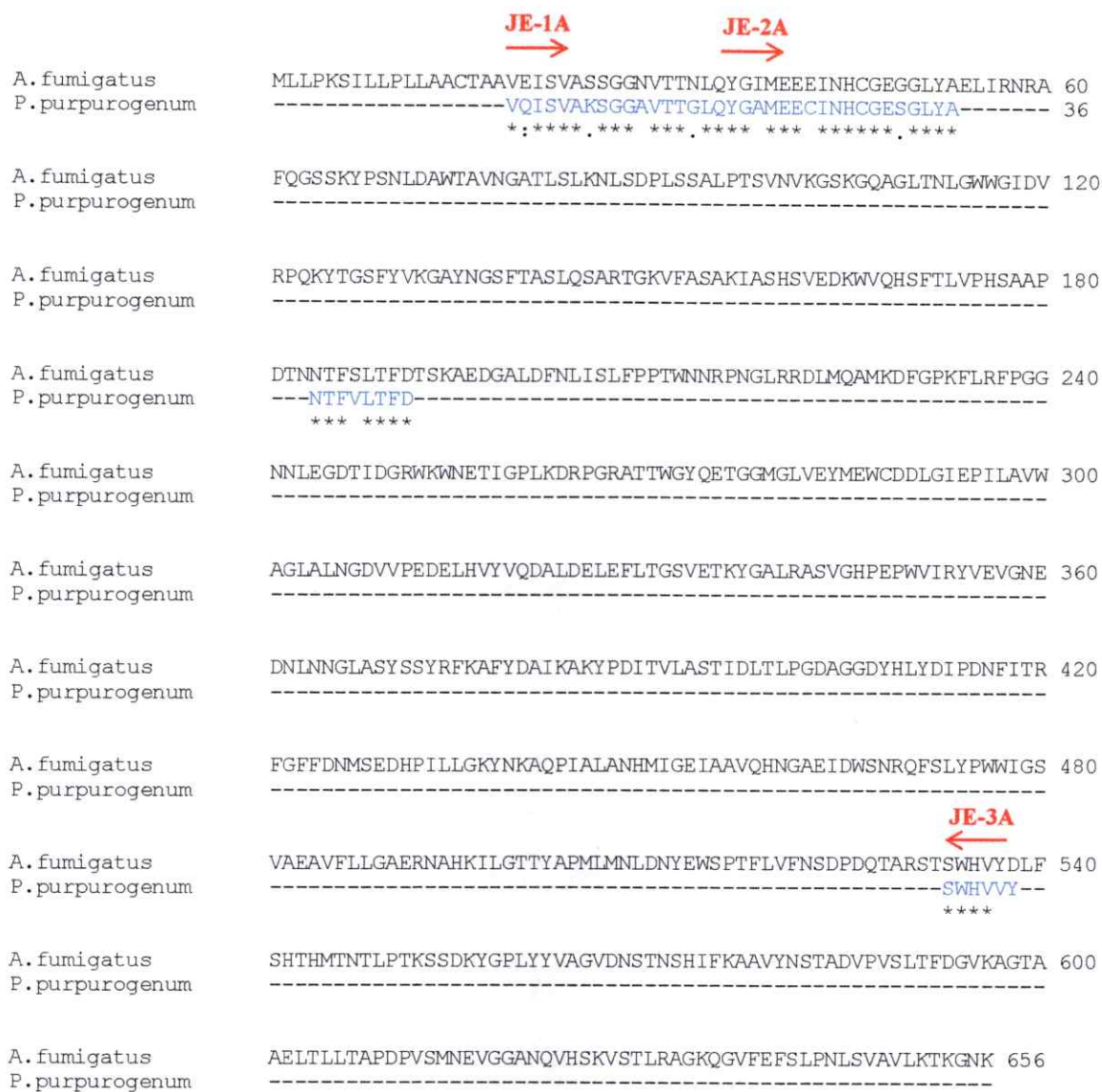


Figura 12. Alineamiento entre la secuencia aminoacídica de la Abf A de *Aspergillus fumigatus* (negro) y las secuencias del amino terminal y los péptidos internos 2 y 3 de la Abf 2 de *Penicillium purpurogenum* (azul). En rojo se muestran la ubicación y la dirección de los partidores degenerados diseñados a partir de las secuencias aminoacídicas en azul.

3.6.2 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA.

Se extrajo RNA total de una muestra de micelio del hongo *P. purpurogenum* de acuerdo a lo descrito en Métodos 2.2.6.1. Se sintetizó cDNA a partir de RNA mediante transcriptasa reversa, y la mezcla de cDNA obtenidos fue utilizada como molde para las reacciones de PCR siguientes.

3.6.3 Obtención de secuencia de cDNA de *abf 2* por RT-PCR.

Al realizar un RT-PCR con la mezcla de cDNAs como molde, y utilizando los partidores degenerados JE-1A y JE-3A, seguido de un PCR anidado con los partidores JE-2A y JE-3A (Tabla I), se obtuvo un producto esperado de aproximadamente 1400 pb, a una temperatura de hibridación de los partidores de 48°C y con concentraciones relativamente altas de MgCl₂ (Figura 13). Dicho fragmento fue clonado y secuenciado parcialmente.

Para continuar en su secuenciación se fueron diseñando partidores internos a medida que se fue avanzando en la secuencia (Tabla I).

Para obtener las secuencias faltantes del cDNA, es decir, las secuencias codificantes para los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína, se decidió conocer primeramente la secuencia del gen *abf 2*, con el fin de diseñar partidores no degenerados para la amplificación de los extremos del cDNA. Para ello, se utilizó la estrategia de "Genome Walking", (ver sección 2.2.8). Una vez conocida la secuencia completa del gen *abf 2*, se pudo completar la secuencia del cDNA. Finalmente, utilizando el código genético, se tradujo la secuencia del cDNA de manera de obtener la secuencia de la proteína Abf 2, la cual se muestra en la Figura 17.

3.6.4 Obtención de la secuencia completa del gen *abf 2*.

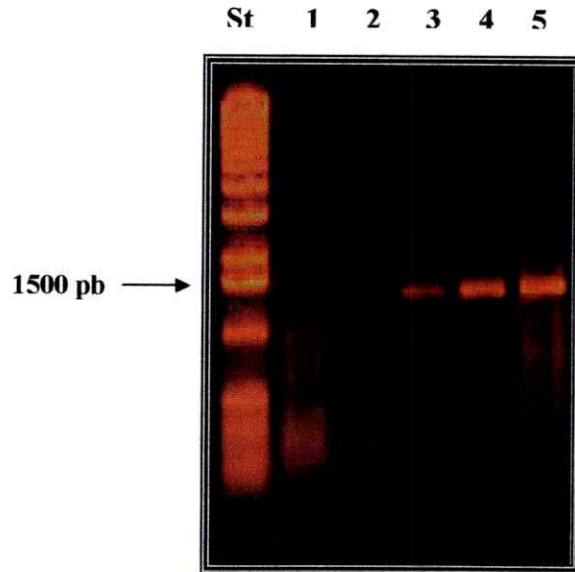
Una vez conocida parte de la secuencia del cDNA de *abf 2*, obtenida por RT-PCR, fue posible diseñar partidores no degenerados, los cuales no sólo fueron utilizados para avanzar en la secuencia del cDNA sino también del gen *abf 2*.

Utilizando la pareja de partidores JE-4A y JE-9A, se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 1300 pb, utilizando DNA genómico como molde (Figura 14A), el cual abarcaba gran parte del gen. Dicho fragmento fue clonado y secuenciado. A partir de dicha secuencia fue posible diseñar un par de partidores no degenerados, JE-14A y JE-15A, los cuales se emplearon en la técnica de "Genome Walking", descrita previamente en la sección 2.2.8, para avanzar río abajo en la secuencia del gen. Se obtuvieron amplificadas en tres de las cuatro "librerías" de DNA genómico (Figura 14B). El producto de mayor tamaño obtenido, de aproximadamente 900 pb, fue clonado y secuenciado, obteniéndose así el extremo 3' del gen y un trozo de secuencia río abajo del mismo.

Para completar la secuencia del gen *abf 2* se utilizó nuevamente el kit Genome Walker. Se diseñaron los partidores JE-10A y JE-11A, con el fin de conocer el extremo 5' del gen y avanzar río arriba en la secuencia de manera de poder analizar además su promotor. Se obtuvieron amplificadas con dos de las cuatro librerías, específicamente aquellas obtenidas por digestión con *Stu I* y *Pvu II* (Figura 15). Estos fragmentos fueron purificados, clonados y secuenciados.

Una representación esquemática de los principales partidores utilizados en la secuenciación se muestra en la Figura 16.

A



B

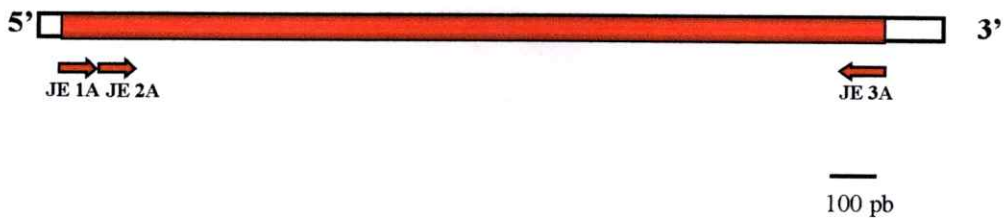


Figura 13. Amplificación de un fragmento de cDNA de *abf 2* por RT-PCR seguido de un PCR anidado. (A) Gel de agarosa al 1% de los productos del PCR anidado a concentraciones crecientes de $MgCl_2$, usando como molde el producto de PCR obtenido con los partidores JE-1A y JE-3A y utilizando los partidores JE-2A y JE-3A. Carril 1: amplificado a 1,5 mM $MgCl_2$. Carril 2: amplificado a 2 mM $MgCl_2$. Carril 3: amplificado a 3 mM $MgCl_2$. Carril 4: amplificado a 4 mM $MgCl_2$. Carril 5: amplificado a 5 mM $MgCl_2$. (B) Esquema del fragmento de cDNA de *abf 2* amplificado por PCR. Las flechas rojas indican la orientación de los partidores utilizados.

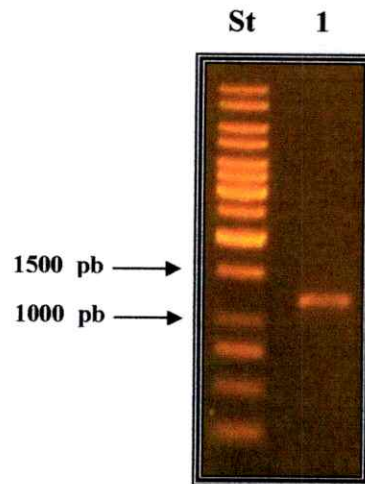
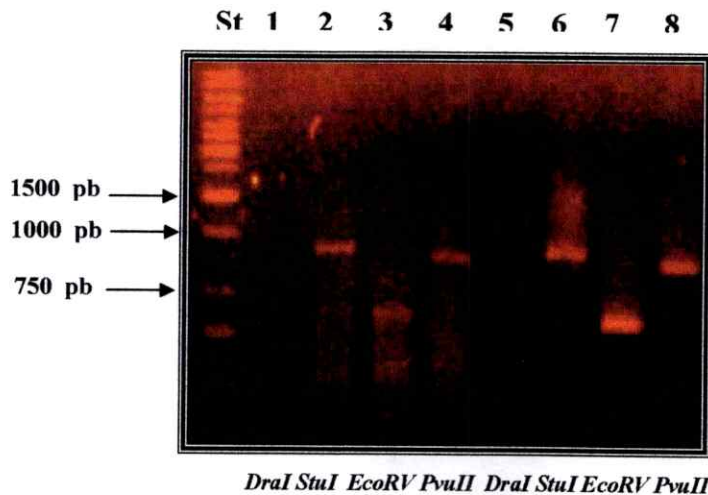
A**B**

Figura 14. Amplificación de fragmentos del gen *abf 2*. (A) Amplificación de un fragmento del gen *abf 2* por PCR. Gel de agarosa al 1% del producto de reacción de PCR utilizando DNA genómico de *P. purpurogenum* como molde. Carril 1: Amplificado utilizando los partidores JE-4A y JE-9A. (B) Amplificación de la región 3' del gen *abf 2* mediante Genome Walking. Gel de agarosa al 1,5%. Carril 1 a 4: productos de PCR utilizando los partidores JE-14 y AP1, utilizando como molde las librerías obtenidas por digestión con *DraI*, *StuI*, *EcoRV* y *Pvu II* respectivamente. Carril 5 a 8: productos de PCR anidado, utilizando los partidores JE-15A y AP2, utilizando como molde las librerías obtenidas por digestión con *DraI*, *StuI*, *EcoRV* y *Pvu II* respectivamente.

3.6.5 Análisis de la secuencia genómica y del cDNA de *abf2*.

El cDNA que codifica para Abf2 posee un marco de lectura abierto de 1908 pb que codifican para una proteína de 635 aminoácidos, con una masa molecular calculada de 69.032 Da. Una vez procesado el péptido señal, la proteína de 618 aminoácidos presenta una masa calculada de 67.212 Da.

La secuencia del cDNA es idéntica a la genómica, excepto por 7 regiones de 60, 52, 50, 55, 55, 52 y 63 pb respectivamente, flanqueadas por las secuencias consenso para intrones: GT....AG (Ballance, 1986) (Figura 17).

```
M L A E Y L L L P L L A S Y A S A V Q I S V A K 24
ATGTTAGCGGAATATCTTCTTCCGTCATGTTGGCATCCTATGCCTCGGCCGTGCAGATTTCTGTTGCTAA 71
  S G G N V T T G L Q Y G A M E E 40
GTCCGGTGGTAATGTCACACTGGATTGCAGTATGGTGAATGGAAGAGGTATGTCCTGGAATCATTCTTA 142
                                     E I N H C G E G G L Y 51
TAATGCGAGATTGATATTTACCAATGTTGTTCTCTAGGAAATCAACCACTGTGGTGAAGGTGGTCTCTAT 213
  A E L I R N R A F Q G S T T Y P S N L D A W S A 75
GCCGAGTTGATCCGCAATCGGGCCTTCCAGGGAAGCACCACCTACCCATCCAACCTGGATGCTTGGTCTGC 284
  V G G S T L S L Q N L T D P L S S A L P T S V 98
CGTCGGTGGTTTCGACACTGTCTCTTCAAGCCTCACTGACCCCTCTCCTCTGCTCTCCCAACTTCCGTTTC 355
  R I T G K G T S G I S N T G F W G I D V R P Q K 122
GGATCACGGGTAAAGGTACCTCGGGTATCTCCAACACTGGCTTTTGGGGCATTGATGTCCGCCCTCAGAAG 426
  Y S G S F Y V K G S Y K G S F T A S L Q A S N G 146
TACTCTGGGTCTTTCTACGTGAAGGGCTCTTACAAAGGCTCGTTCACTGCCTCTCTTCAAGGCTAGCAACGG 497
  E V F A S A Q V S S K S V A N D W V Q H E F T 169
CGAAGTCTTTGCTTCCGCTCAGGTCTCTTCAAGAGTGTGCAAATGACTGGGTGCAGCATGAATTCACCC 568
  L T P K K K A S S N N T F V L T F D A S 190
TCACCCCAAGAAGAAGGCTTCCAGCTCCAACAACCTTTGTGCTGACCTTCGATGCCTCTGTAAGTTAA 639
                                     K T S G G S L D F 199
TCAAGAACTAACGCTTTGAATGCTCTGCACTAACTTCAAAACAGAAAGACATCTGGTGGCTCCCTCGACTTCA 710
  N L I S L F P P T W N N R P N G M R R D L M Q A 223
ACTTGATCAGCTTGTCCCTCCCACCTGGAACAACCGTCCCAATGGCATGCGCCGAGATCTGATGCAAGCT 781
  L Q D L G P K 230
TTGCAAGACTTGGGTCTCTGTAAGTCTCGCCATGATAGCAGATGGTATTCCAACATGCTGACTTGATAGAAA 852
  F L R F P G G N N L E G Q T I E G R W K W N E T 254
TTCCTTCGTTTCCCTGGAGGCAACAACCTCGAGGGTCAGACCATTGAGGGTCGATGGAATGGAACGAGAC 923
  I G P L T Q R P G R A T T W G Y E E T S G M G 277
TATTGGACCATTGACTCAGCGTCTGGCCGTGCTACCACCTGGGGCTATGAGGAGACCAGTGGTATGGGTC 994
  L V E Y M E W C D D L G M E P 292
TGGTCGAGTACATGGAGTGGTGTGATGACCTCGGCATGGAGCCTAGGTAAGTCTATTATGATAGAATATACT 1065
                                     I L A V W A G L A L N G N V 306
TCACCTGACTTGACTGACAAACATCCAGTCCTCGCCGTTTGGGCTGGTCTCGCTCTGAACGGAACGTTG 1136
  V P E A E L D V Y V Q D A L D E L E F L T G S V 330
TCCCCGAAGCCGAGCTTGACGTTTACGTCCAAGATGCCCTCGATGAGCTCGAGTCTTACTGGCTCTGTT 1207
  D T K Y G A L R A K Y G H F V K P W T I R Y V E 353
GACACCAAGTACGGTGTCTACGAGCCAAGTACGGCCACCCCAAGCCCTGGACTATCCGTTATGTCGAGGT 1278
  V G N E D N L S S G L S S Y K S Y R F Q A F Y D 377
TGGCAATGAGGACAACTGAGCAGTGGCCTCAGCTCGTACAAGTCTACCGCTTCCAAGCATTCTATGATG 1349
```



```

A I T K K Y P N I Q V L A S T I D M T L P G N A 401
CGATCACCAAGAAATATCCCAACATTCAAGTCTGGCTTCCACTATCGACATGACCCTTCCCGGCAATGCG 1420
  G G D Y H L Y D I P D N F I T K F G M F D S Y S 425
GGTGGTGATTACCATCTGTACGATATCCCGACAACCTTCATCACCAGTTCGGCATGTTTCGACAGCTACAG 1491
  D A H P I L L 432
TGACGGCACCCAATCTTCTTGGTATGTGTCATGCATAACATCAAATGAGCTAGAACTAATAGAGGTAAC 1562
  G E I A A T E Y N N G V G I D W S N T H F S 454
ACCACAGGTGAAATCGCGCTACTGAGTACAACAACGGTGTGGCATTGACTGGAGTAATACTCATTTTTC 1633
  L Y P W W L G S V A E A V F L L G A E R N A D 477
CTTGTACCCCTGGTGGCTGGGCTCAGTCGCGGAGGCTGTCTTCTCTTGGGAGCTGAGCGTAACGCTGACA 1704
  K I I G T T Y 484
AGATTATTGGAACACTACCTATGTGAGTTTAGTATCCGATCATGTCCAAGCCAAAACACTAACGACATGACA 1775
  A P F L M N L D S Y E W S P T M I S F N S N P 507
GGGCCATTCTTGATGAACCTGGACAGCTACGAGTGGTCGCCAACCATGATCTCTTCAACTCCAACCCCG 1846
  D D T A K S T S W H V Y N 520
ACGACACCGCAAAGTCCACTAGCTGGCACGTGTACAACGTGAGTCTATCTAACCCATAAAATCATCAAAGAAT 1917
  L F N K N H M T N T L P A T 534
CCAGTCAACTATAACAGACCCCTCAAAAATAGCTCTTCAACAAGAACCACATGACCAACACTCTCCCTGCAAC 1988
  S N D T F G P L Y Y A T G V N S K T N S H I F 557
CTCCAACGACACCTTCGGCCCCCTATACTACGCCACCGGTGTGAACAGCAAGACCAACTCCACATCTTCA 2059
  K A A V Y N S T A D V P V S L T F E G V G R G T 581
AAGCCCGGTGTACAACAGCACCGCCGATGTCCCCGTTTCTCTGACCTTTGAGGGTGTGGACGCGGCACA 2130
  T A D L T I L T A P S D V S M N A V G G A N V V 605
ACCGCCGATCTCACTATTTTGTGCCCCAGCGATGTCCATGAATGCAGTCGGTGGCGCCAACGTCGT 2201
  Q S Q T T K I K A G K Q G V F S F N L P N L S 628
GCAGAGCCAGACTACCAAGATCAAGGCTGGCAAGCAGGGTGTTTTCAGCTTCAACCTGCCAAACCTGAGTG 2272
  V A V L T T N 635
TTGCTGTGCTCACGACTAACTAG 2295

```

Figura 17. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de Abf 2. En negro se muestra la secuencia nucleotídica codificante y en rojo los intrones; en negrita se muestran los codones de inicio y término. Sobre la secuencia nucleotídica se muestra en negro y mayúscula la secuencia peptídica deducida; en azul la secuencia correspondiente al péptido señal; subrayados se muestran los posibles sitios de N-glicosilación; en negrita cursiva, los residuos catalíticos propuestos.

3.6.6 Alineamiento de secuencias aminoacídicas similares a Abf 2.

Utilizando el servidor BLAST se encontraron varias arabinofuranosidasas con alto porcentaje de identidad de secuencia con respecto a la Abf 2. Estas secuencias se alinearon mediante el programa ClustalW (Figura 18).

La Abf 2 de *P. purpurogenum* mostró un porcentaje de identidad de 75%, 73%, 71% y 69% con respecto a arabinofuranosidasas de *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus oryzae* respectivamente.

	β4 →				←	β7 →
araf51a_cth	HNIKVWCI	GNE	MDGP	- 105	-	KKDIYLSFDE
abfa_gst	HKIKTWCI	GNE	MDGP	- 105	-	KKTIHLSFDE
arfb_cst	YRLKYFCI	GNE	NWGC	- 108	-	DNRIGLVVDE
abf2_bsu	WKLKYFGV	GNE	NWGC	- 109	-	EQRVGLIIDE
asdII_bov	WKLKYLGV	GNE	SWG	- 108	-	DKKIALLLDE
abfa_sli	FGIRLWCI	GNE	MDGP	- 105	-	KKKINLSFDE
abfa_ani	WNLTMVEI	GNE	DMLG	- 67	-	NRSVPYFIDGE
abf51_aka	WNLTMVEI	GNE	DMLG	- 67	-	DRSVPYFIDGE
abf2_ppu	WTIRYVEV	GNE	DNLS	- 63	-	SDAHPILLGE
	+ +	GNE				+ + E

Figura 19. Similitud local de arabinofuranosidasas de la familia GH51. Para simplificar, sólo se muestran algunos ejemplos de dichas enzimas. Los residuos estrictamente conservados se enmarcan en rectángulos sombreados; Con un símbolo (+) se indican aminoácidos con carácter hidrofóbico conservado. El glutamato que continúa luego de una asparragina invariante es el catalizador ácido/base propuesto, mientras que el otro glutamato altamente conservado es el nucleófilo propuesto. Se indican con flechas las hebras β4 y β7 pertenientes al barril (β/α)₈ de enzimas con estructura tridimensional conocida (araf51A_cte y abfa_gst). Las abreviaturas utilizadas son: araf51a_cth, arabinofuranosidasa 51A de *Clostridium thermocellum* (CP000568); abfa_gst, arabinofuranosidasa A de *Geobacillus stearothermophilus* (AF159625); arfb_cst, arabinofuranosidasa B de *Clostridium stercorarium* (AF002664); abf2_bsu, arabinofuranosidasa 2 de *Bacillus subtilis* (Z75208); asdII_bov, arabinofuranosidasa 2 de *Bacteroides ovatus* (AP006841); abfa_sli, arabinofuranosidasa A de *Streptomyces lividans* (U04630); abfa_ani, arabinofuranosidasa A de *Aspergillus niger* (L29005); abf51_aka, arabinofuranosidasa A de *Aspergillus kawachii* (AB085903); abf2_ppu, arabinofuranosidasa 2 de *Penicillium purpurogenum* (ABO93602).

El alineamiento mostrado en la Figura 19, muestra la existencia de similitud local de secuencia entre las Abfs de la familia GH51. Además, se pueden observar claramente dos glutamatos conservados y con un espaciamiento similar entre ellos, dependiendo del organismo al cual pertenecen dichas enzimas.

El primer glutamato, está precedido por una asparragina y una glicina invariantes, y al igual que el segundo glutamato, se encuentra precedido por dos residuos hidrofóbicos tal como se muestra en la Figura 19.

Se propone entonces, a los residuos Glu³⁵⁷ y Glu⁴³⁴ como los posibles residuos catalíticos de la Abf 2 de *P. purpurogenum*.

3.6.8 Relaciones filogenéticas de las Abfs de la familia GH51.

Como se mencionó antes, al realizar un análisis de la secuencia de la Abf 2 de *P. purpurogenum*, se encontró que esta pertenecía a la familia 51 de las glicosil hidrolasas (GH51). Se realizó, por lo tanto, un alineamiento con varias Abfs, pertenecientes a dicha familia y se construyó un árbol filogenético no enraizado a partir de dicho alineamiento.

Se puede observar claramente que las Abfs pertenecientes al reino de los hongos, entre las que se encuentra la Abf 2 de *P. purpurogenum*, se encuentran agrupadas en una rama común. Lo mismo ocurre con las Abfs pertenecientes a los reinos protista y planta, los cuales se observan agrupados en ramas distintas (Figura 20).

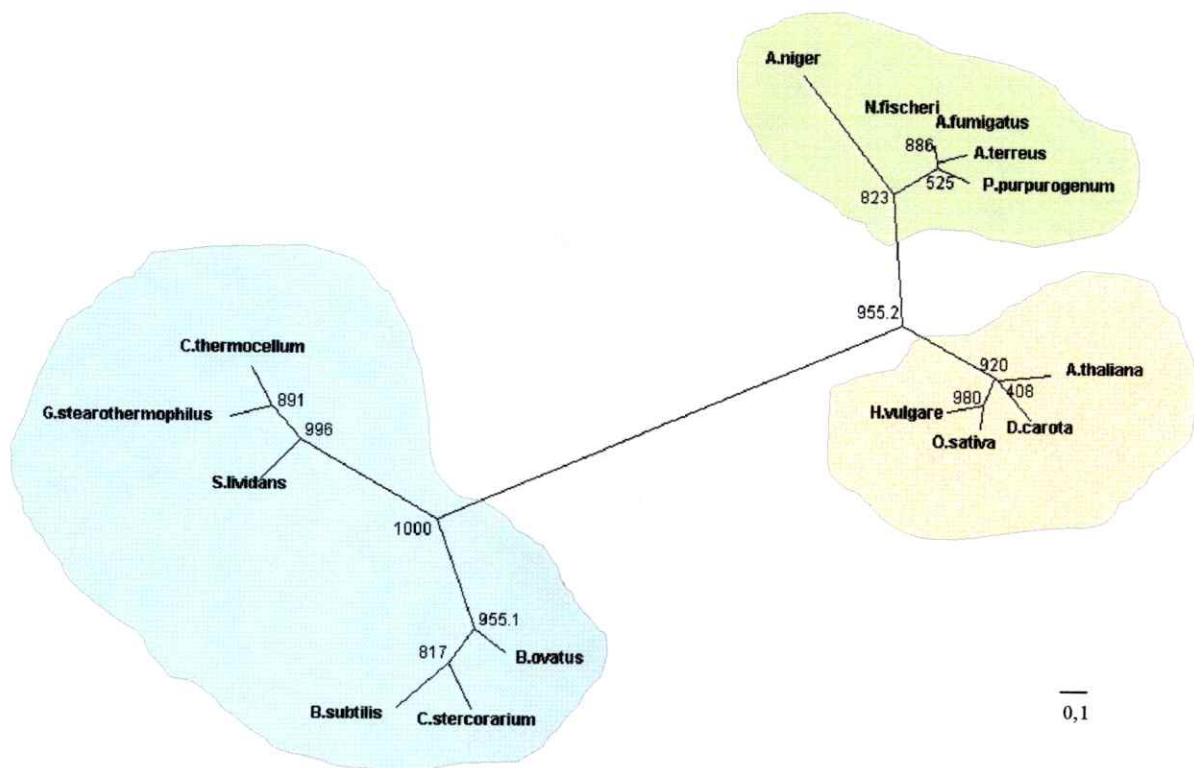


Figura 20: Árbol no enraizado de arabinofuranosidasas de la familia GH51. Las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal X y el árbol fue construido con el mismo programa y visualizado con el programa SplitsTree. En colores se encierran los organismos de acuerdo al reino al que pertenecen: celeste, Protistas; verde, Hongos; naranja, Plantas. Los números indican el valor de bootstrap para cada nodo luego de aplicar 1000 iteraciones.

3.7 Secuenciación y análisis de la región río arriba del gen *abf 2*.

Como fue explicado anteriormente en la sección 3.5.4, utilizando el kit “Genome Walker” se pudo conocer parte de la secuencia río arriba del gen *abf 2*. Dicha secuencia contenía parte de la secuencia codificante para el péptido señal (Figura 17) y una secuencia de 553 pb río arriba del codón de inicio.

En esta región se detectó una posible caja TATA a -105 pb del codón ATG. Además se encontraron los siguientes posibles sitios de unión a factores de transcripción: dos posibles sitios de unión a CreA, ubicados a -179, -416; un posible sitio de unión a AlcR ubicado a -243; un posible sitio de unión a AceI a -252 pb; cuatro posibles sitios de unión a AreA a -49, -285, -430 y -504 pb; dos cajas CAAT ubicada a -299 y -456 pb (Figura 21).

```

- 533  GAAAACAATCGNTAGGGACAATGACAGCCAATTAAGTATGNTATGGCGCATATCTTACTGCAACCACC
      GTTAATCCCCTGGATCTCGACGCATGTACCGTTGTCCCTGCAGACTACTATACATATATCAACTGCTT
      CCCCGBGCAGGGATCGTGACATTAGCGTCTGCATGAATTGTCCCACATTTCTCCCGTCCATGCGTGT
      AGAGGGGTTTACCTTTGGCCAGTGCACCTCCTCATGGAATTTTACCCATTGGGACGAGCAATATCGCAA
      TTGTGCAGACTAGTTGGCTTTGTTTGCCTTGGATGCGGAAATGATCTACTTCAACATCGTGAATCGAATT
      CATCAATCAAGCAGGGTGAGGGGTGACCGGAGAGAGAGCGAGGGGCTTTTGTCCGGTCAATTGAGCGC
      ACTCAACGGGGACTGATGCGATGTACAGACAATAAGCTGATGCGACCTCCCGGTTGCAGTTGCAGGAA
      ATCCAAGATTAGATCTGGATAGGATCAGCGAGTTGCATCTGCTAGCTGTACTGCATAGCAGCCAAAATG
  
```

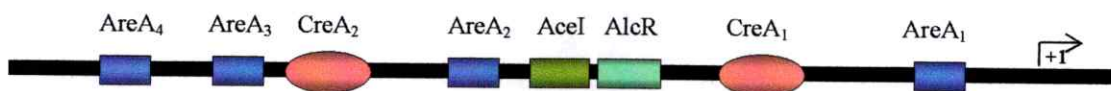


Figura 21. Secuencia nucleotídica correspondiente a parte de la región río arriba del gen *abf 2*. Los posibles sitios de unión a factores de transcripción se enmarcan en rectángulos y elipses. En rojo, sitios CreA; en azul, sitios AreA; en verde, sitios AceI; en celeste, sitios AlcR. Más abajo se muestra una representación esquemática de la misma región.

La Tabla III resume los datos obtenidos en la secuencia promotora del gen *abf2* junto con datos de otros posibles sitios de unión de factores de transcripción encontrados en otros promotores de arabinofuranosidasas de la familia GH51 disponibles en GenBank.

Tabla III: Posibles sitios de unión de factores de transcripción en los promotores de genes de arabinofuranosidasas de la familia GH51.

Organismo	bp *	AreA	PacC	CreA	AceI	XlnR	AlcR	Numero de acceso a GenBank
<i>Aspergillus Niger</i>	553	1	2	11	1	2	2	L29005
<i>Aspergillus awamori</i>	553	1	1	12	1	1	3	AB046702
<i>Aspergillus oryzae</i>	553	7	2	3	1	-	1	AP007165
<i>Neurospora crassa</i>	553	3	1	1	1	1	5	AABX01000383
<i>Pencillium purpurogenum</i>	553	4	-	2	1	-	1	EF490448

* Para comparar dichos sitios con los presentes en el promotor de *abf2* de *P. purpurogenum*, se decidió tomar la misma cantidad de nucleótidos para los promotores de las Abfs de todos los organismos, numero que corresponde a la cantidad de nucleótidos conocidos para el promotor de *abf2*.

4. Discusión.

La degradación microbiana de los polisacáridos estructurales de la pared celular vegetal, incluyendo celulosa, hemicelulosas y pectinas es un proceso importante en la naturaleza. En ella están involucradas una amplia variedad de enzimas, principalmente producidas por hongos y bacterias saprófitas. La línea de investigación de nuestro laboratorio está enfocada en el estudio del sistema hemicelulolítico del hongo *Penicillium purpurogenum*. A la fecha ya se han caracterizado un gran número de enzimas, entre ellas xilanasas, glucosidasas, esterasas y arabinofuranosidasas (Abfs). Cabe destacar que se ha encontrado que todas estas enzimas poseen isoenzimas y es más, se han llegado encontrar hasta cinco isoenzimas para catalizar una misma reacción, como es el caso de las feruloil esterasas.

En el caso de las Abfs de *P. purpurogenum*, se han encontrado al menos tres isoenzimas, lo que nos ha llevado a preguntarnos el por qué de la existencia de tal cantidad de enzimas para catalizar una misma reacción química: ¿existen diferencias en la catálisis que llevan a cabo estas enzimas? En caso de ser así, ¿se deberá a diferencias estructurales entre ellas? ¿Estará su expresión y su actividad reguladas por los mismos mecanismos? ¿Qué características bioquímicas diferencian a unas de otras?, etc.

La determinación de la estructura primaria de estas proteínas, junto con un acabado análisis bioquímico, nos darían las bases necesarias para poder comprender las razones de dicho fenómeno, y por ende para responder nuestras preguntas.

De las tres Abfs encontradas al inicio de esta tesis, se había secuenciado completamente y caracterizado bioquímicamente sólo una, llamada Abf 1. Por esto, se planteó como objetivo principal de esta tesis la secuenciación de una segunda isoenzima (Abf 2) junto con una caracterización bioquímica general de esta.

4.1 Efecto de la fuente de carbono en la producción de arabinofuranosidasas.

Debido a su utilidad en aplicaciones industriales, se han llevado a cabo varios estudios en relación con las fuentes de carbono utilizables para la producción de enzimas involucradas en la degradación de polisacáridos de la pared celular vegetal.

Así, el primer tema tratado en esta tesis consistió en evaluar la actividad arabinofuranosidásica total de *P. purpurogenum* al utilizar distintos desechos agroindustriales como fuentes de carbono. Además se evaluó una fuente de carbono artificial, el L-arabitol, por conocerse su efecto inductor en la expresión de arabinofuranosidasas (Van der Veen y col., 1993; van Kuyk y col., 2001).

Se confirmó por una parte que el L-arabitol es un fuerte inductor de la expresión de Abfs, observándose valores de actividad enzimática superiores al resto de las fuentes de carbono utilizadas. Se observó un valor de 0,5 U/mL ya al segundo día de incubación, el cual continuó en aumento hasta el décimo primer día alcanzando valores cercanos a 1 U/mL. Por otra parte, al utilizar fuentes de carbono naturales, más bien desechos agroindustriales, se pudo observar que la coseta de remolacha (un subproducto del proceso de extracción del azúcar) produce altos niveles de actividad arabinofuranosidásica, tal como ocurre en *A. niger* (Kaji y Tagawa, 1970; Van der Veen y col., 1991), a los que le siguieron en orden decreciente el xilano de avena y la coronta de maíz.

En general se observó una disminución de la actividad Abf total luego del décimo primer día de incubación, lo que puede deberse a la disminución en la producción de Abf así como a la acción de proteasas en el medio de cultivo. La presencia de proteasas en los medios de cultivo de *P. purpurogenum* ha sido demostrada previamente en nuestro laboratorio (Belancic, A., Seminario de Investigación, 1990).

4.2 Purificación de Abf 2 de *P. purpurogenum*.

Como material de partida para esta purificación se utilizó el sobrenadante de cultivo de *P. purpurogenum* utilizando xilano de avena como fuente de carbono. De las fuentes de carbono ensayadas, esta presentó el tercer lugar de mayor actividad Abf, pero se prefirió debido a que la mejor fuente inductora, el L-arabitol, es un producto químico artificial de muy elevado costo. Por otra parte, la coseta de remolacha, que mostró ser el segundo mejor inductor, producía una cantidad de proteínas muy superior a las otras fuentes de carbono, lo que haría más complicada la purificación.

El perfil cromatográfico de la primera columna muestra solamente un pico de actividad arabinofuranosidásica, correspondiente a un único pico de proteínas en el lavado de la columna. Cabe destacar, que la Abf 1 es inactivada luego del paso por esta columna, lo cual fue determinado mediante zimogramas, mientras que las otras dos permanecen activas. En la segunda columna se puede observar la presencia de dos picos de proteína que poseían actividad Abf, en los cuales se pudo comprobar la separación de las Abf 2 y 3. El último paso de purificación, tuvo por objeto eliminar los últimos contaminantes proteicos de la Abf 2 de manera de obtenerla pura. El rendimiento obtenido en esta purificación, de aproximadamente 2,9%, se encuentra en el límite inferior del rango encontrado para otras purificaciones de Abfs obtenidas de microorganismos no hiperproductores, el cual fluctúa entre 2,8 a 58% (Luonteri y col., 1995; Filho y col., 1996). El bajo rendimiento obtenido no debe ser subestimado, ya que debemos recordar que hay otras Abfs en el extracto crudo inicial, las cuales, como ha sido comprobado en nuestro laboratorio, han sido purificadas con rendimientos que van entre el 3 y el 6%.

4.3 Caracterización de Abf 2.

La Abf 2 purificada en esta tesis presentó una masa de aproximadamente 70 kDa determinada por SDS-PAGE, mientras que la masa molecular de la proteína madura, calculada por su secuencia aminoacídica, es de aproximadamente 67 kDa. La causa más probable de esta diferencia puede deberse a modificaciones post- traduccionales, entre ellas las glicosilaciones. Se comprobó previamente en el laboratorio (Ravanal, MC, datos no publicados), mediante la tinción de PAS (tinción utilizada para la detección de polisacáridos), que la Abf 2 de *P. purpurogenum* se encuentra glicosilada. Además, al buscar posibles sitios de N-glicosilaciones, conocidos por la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr (Gavel y Von Heijne, 1990), donde X no es Prolina (Bause, 1983), se encontraron 6 posibles sitios.

El punto isoelectrico determinado para Abf 2 fue de 5,3, que, al igual que el resto de las Abfs de la familia GH51 se encuentra en un rango ácido (Tabla IV). El pH óptimo observado para la Abf 2 utilizando amortiguador citrato fue de 5,0 y se encuentra dentro del rango de pH observado para otras Abfs de GH51, el cual se extiende entre 3,8 y 6,5 (Tabla IV). El amortiguador citrato fue utilizado ya que éste es capaz de amortiguar en un rango de pH de entre 2,5 y 7,0, pero se ha discutido su capacidad amortiguadora a pHs mayores que 6,2 (Nozawa, 1995). Sin embargo, experimentos realizados en nuestro laboratorio (Ravanal, comunicación personal), en los que se utilizó amortiguador McIlvaine (amortiguador citrato-fosfato), mostraron valores muy cercanos de actividad a distintos pHs comparados con los obtenidos en este trabajo. Más aún, arrojaron un valor de pH óptimo de 5,0 para Abf 2.

Debido a la gran aplicación industrial que han adquirido estas enzimas, ha existido gran interés en la determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad enzimática. La Abf 2 se mantiene estable hasta los 50 °C, pero ya a los 60°C,

la inestabilidad de Abf 2 se hace claramente visible, al disminuir su actividad en la primera media hora de incubación en un 60%.

La determinación de K_M de Abf2 para pNP Ara arrojó un valor de 0,1 mM. A pesar de que este valor es preliminar, coincide con valores obtenidos a partir de otras determinaciones realizadas en nuestro laboratorio (Ravanal, comunicación personal) en las cuales el ajuste se realizó con una mejor distribución de datos. Es importante notar que la K_M para pNP Ara de Abf 2 es cinco a ocho veces menor que los valores obtenidos para Abfs miembros de GH51 (Tabla IV). Además, al comparar los valores de K_M de las Abfs de *P. purpurogenum* (Tabla VI), se aprecia que el de Abf 3 y Abf 1 es entre 6 y 10 veces mayor que el de Abf 2, respectivamente. El bajo valor de K_M de Abf 2 sugiere una gran afinidad de Abf 2 por pNP Ara, y podría estar dando cuenta de una mayor afinidad de esta enzima por sustratos pequeños.

Tabla IV. Propiedades de las arabinofuranosidasas de la familia GH51.

Microorganismo	Masa molecular (KDa)	pI	pH óptimo	T° óptima (°C)	K_M (mM)	Referencias
Hongos						
<i>P. purpurogenum</i>	70	5,3	5,0	60	0,1	Este trabajo
<i>A. niger</i>	128	6-6,5	4,1	50	0,6	Rombouts y cols (1988)
<i>A. awamori</i>	81	3,3	4,0	60		Kaneko y cols. (1998)
<i>P. chrysogenum</i>	79		4-6,5	50	0,8	Sakamoto y cols. (2003)
<i>H. insolens</i>	94		6,0	40		Sørensen y cols. (2006)
<i>M. giganteus</i>	69		3,8	48		Idem.
Bacterias						
<i>C. stercorarium</i>	56		5,0	70		Schwarz y cols. (1995)
<i>S. chatreusis</i>	80	6,6	5,5	55		Matsuo y cols. (2000)
<i>T. xylanolytica</i>	56		5,6-6,2	75	0,72	Debeche y cols.(2000)
<i>C. xylanolytica</i>	56	6,1	5,8	45	0,5	Renner y Breznack (1998)
<i>S. lividans</i>	69	4,6	6,0	60	0,6	Manin y cols. (1994)
Plantas						
<i>H. vulgare</i>	65	4,8	4,3		0,77	Lee y cols. (2001)

*La masa molecular corresponde a la de la subunidad. La K_M es para el sustrato pNP Ara

4.4 Inducción de la actividad arabinofuranosidásica.

Existen diversos motivos para estudiar y comprender el fenómeno de inducción de la producción de enzimas de interés. Por una parte, conocer la fisiología del organismo productor y sus vías metabólicas y por otra, conocer las condiciones óptimas para lograr la máxima producción de dicha enzima. Esto último cobra una importancia aún mayor cuando se trata de enzimas de interés industrial.

Así, se estudió la inducción de arabinofuranosidasas de *P. purpurogenum* mediada por azúcares pentosas y polioles generados en la vía metabólica del catabolismo de la L-arabinosa y la D-xilosa.

Se pudo demostrar que la inducción de las Abfs de este hongo están bajo el control de dos sistemas regulatorios: inducción y represión catabólica por glucosa.

La primera fue demostrada al observarse inducción con L-arabitol y con L-arabinosa, (que como se mencionó anteriormente son compuestos asociados a la vía metabólica de la L-arabinosa y la D-xilosa), siendo el L-arabitol el mejor inductor. Sin embargo, no se observó inducción con xilosa ni xilitol.

La inducción pudo observarse mediante zimogramas, en los cuales se observó el patrón diferencial de actividad de las distintas Abfs a distintos tiempos de incubación. Las Abf 1 y Abf 3 se expresan bajo ambos inductores. Estas isoenzimas no se observan antes del cuarto día de inducción. Sin embargo, sólo se observa actividad de Abf 2 bajo L-arabitol en el cuarto día, la cual posteriormente desaparece.

La represión catabólica por glucosa se demostró, por una parte, al hacer cultivos utilizando D-glucosa como única fuente de carbono, en los cuales no se observó actividad Abf, como se muestra en la Figura 23. Más aún, al utilizar las fuentes inductoras de dicha actividad (L-arabitol y L-arabinosa) en conjunto con D-glucosa, se observó una drástica disminución de ésta. Estos resultados demuestran que la presencia

de glucosa reprime la actividad arabinofuranosidasa tal como ha sido previamente descrito para arabinofuranosidasas y otras arabinanasas de hongos (Gielkens y col., 1999; Van der Veen y col., 1993, 1994). Este efecto podría deberse a la represión catabólica mediada por CreA, ya que se encontraron posibles sitios de unión a CreA en el promotor de los genes que codifican para las Abfs 1 y 2 de *P. purpurogenum*. Sin embargo, se ha descrito previamente que existen genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de la L-arabinosa que están sujetas a represión catabólica no mediada por CreA (VanKuyk, 2001). Este efecto podría deberse alternativamente a una exclusión del inductor, donde la presencia de D-glucosa previene la captación de L-arabinosa o de L-arabitol.

4.5 Secuenciación del cDNA de Abf 2.

Para comenzar la secuenciación del cDNA se utilizaron partidores diseñados a partir de las secuencias del amino terminal de la Abf 2 y de un péptido interno, secuencias obtenidas por el método de Edman y por espectrometría de masas, respectivamente. El producto de PCR esperado no se logró obtener a las concentraciones estándar de MgCl₂ usadas para las reacciones de PCR (1,5 mM), por lo que fue necesario determinar la concentración de magnesio óptima para dicha reacción. Así, se obtuvo un producto de aproximadamente 1400 pb, a concentraciones altas de MgCl₂ (desde 3 a 5 mM) y a una temperatura de hibridación baja (48°C). Es importante, por lo tanto, determinar la concentración óptima de magnesio, ya que ésta afecta la acción de la Taq polimerasa.

La continuación de la secuenciación se realizó utilizando partidores no degenerados diseñados a medida en que se avanzaba en la secuencia.

El marco de lectura abierto obtenido codifica para una proteína de 635 aminoácidos, con un péptido señal de 17 aminoácidos seguido de un polipéptido maduro de 618

aminoácidos. La masa molecular calculada para este polipéptido maduro fue de 67.212 Da. La secuencia aminoacídica deducida de Abf 2 fue comparada con otras secuencias realizando una búsqueda por BLAST (utilizando los parámetros por defecto, y realizando la búsqueda contra la base de datos de secuencias no redundantes). Los resultados mostraron alta similitud de secuencia entre la Abf 2 de *P. purpurogenum* y varias Abfs pertenecientes a la familia 51 de las glicosil hidrolasas (GH51). Más aún, se encontró una región cercana al N- terminal, denominada "X10", que abarca desde los residuos Val¹⁸ a Val¹⁵⁹, presente en un gran número de GH de la familia 51 de bacterias, hongos y plantas. Esta secuencia podría tratarse de un módulo de unión a carbohidratos, sin embargo esto no ha sido comprobado (Coutinho, comunicación personal).

En cuanto a las relaciones filogenéticas de Abf 2 cabe destacar que al alinear las secuencias aminoacídicas de Abfs representantes de la familia GH51, y luego hacer un árbol no enraizado, se pudo observar un claro patrón de diferenciación entre las Abfs provenientes de organismos de distintos reinos, las cuales se separaron en tres ramas: hongos, bacterias y planta. Además, según los porcentajes de identidad de secuencia, y como era de esperarse, la Abf 2 de *P. purpurogenum* se encuentra más cercana a las Abfs de hongos, con las que posee un porcentaje de identidad de secuencia de 38 a 76%, mientras que con las Abfs de plantas posee un porcentaje de identidad de secuencia de 30 a 32% y con bacterias de un 26 a 29%.

4.6 Predicción de los residuos catalíticos de Abf 2.

En estudios previos se estableció que varias familias de las GHs que actúan reteniendo la configuración anomérica (entre ellas las Abfs de la familia GH51) comparten similitud local de secuencia aminoacídica, particularmente en segmentos cortos que contienen residuos catalíticamente importantes, y que las enzimas de estas familias

poseen una estructura tridimensional básica común (Liebl y col., 1994). Esta observación fue ganando validez a medida que las estructuras tridimensionales se fueron haciendo disponibles para representantes de algunas de estas familias, y su topología común fue identificada como un barril $(\beta/\alpha)_8$, también conocido como "TIM Barrel" (Liebl y col., 1994; Henrissat y col., 1995). Hasta la fecha, 28 familias de las GHs pertenecen a esta amplia "superfamilia" de las GHs.

Con respecto a la maquinaria catalítica, los intentos por identificar los residuos catalíticos de las arabinofuranosidasas estuvieron limitados inicialmente a alineamientos de secuencia, llevados a cabo por Zverlov y colaboradores (Zverlov y col., 1998). Estos autores mostraron que las enzimas de la familia GH51 contienen dos regiones conservadas que también están presentes en otras familias de enzimas que actúan con retención de la configuración anomérica que pertenecen a la superfamilia con topología $(\beta/\alpha)_8$ (Jenkins y col., 1995). Más aún, todas las enzimas en esta superfamilia comparten el hecho de que las dos regiones conservadas mencionadas anteriormente, contienen los glutamatos catalíticos esenciales y que están localizados en los extremos terminales de las hebras β_4 y β_7 (Figura 19).

Estos estudios han servido de guía para realizar predicciones de los residuos catalíticos de arabinofuranosidasas, entre ellas la Abf 2 de *P. purpurogenum*, como se observa en la Figura 19. Además, esta predicción ha sido útil para escoger residuos a mutar en experimentos de mutaciones sitio-dirigidas, y así determinar experimentalmente los residuos catalíticos de algunas Abfs (Debeche y col., 2002; Shallom y col., 2002; Beylot y col., 2001; Lee y col., 2001).

4.7 Secuenciación y análisis del gen *abf2*.

Como se observa en la Figura 17, el gen *abf2* posee un marco de lectura abierto de 2295 pb, que a diferencia del gen *abf1* de *P. purpurogenum*, posee intrones. Los 7 intrones presentes en el gen *abf2* son de tamaños variables entre 50 y 63 pb, lo cual concuerda con los tamaños de los intrones de hongos, que en general van desde los 50 a los 70 nucleótidos (Kupfer, 2004). Los 7 intrones encontrados están flanqueados por las secuencias 5' GT... AG 3', al igual que la mayoría de los intrones de hongos. Dichos intrones pertenecen a la llamada zona de corte y empalme canónica. En estudios previos, en los cuales se analizaron diversos grupos de hongos, se encontró que más del 98% de ellos poseían intrones cortos y pertenecientes a la clase canónica de corte y empalme (Kupfer, 2004).

4.8 Secuenciación y análisis de la región río arriba del gen *abf2*.

Mediante la técnica de "Genome Walking", fue posible conocer la secuencia de 553 pb río arriba del codón de inicio y 795 pb río abajo del codón de término. Al realizar un análisis de la región río arriba, se encontró una posible caja TATA a -105 pb (Figura 21). Esta caja está presente en promotores de hongos filamentosos entre -100 y -200 pb río arriba del codón de inicio (O'Connell y Kelly, 1989). Además se encontraron posibles sitios de unión a factores de transcripción como CreA, AceI, AlcR, AreA y cajas CCAAT.

Como es sabido, el mecanismo de control para el uso preferencial de sustratos como glucosa (o fructosa) sobre fuentes de carbono alternativas se conoce como represión por glucosa o represión catabólica por carbono (Aro y col., 2005). En muchos hongos ascomicetes, esta represión está mediada por el factor de transcripción CreA. Se ha demostrado experimentalmente que los genes de muchas celulasas, hemicelulasas y

pectinasas están reguladas por proteínas Cre en *Trichoderma reesei* y especies de *Aspergillus* (Margolles-Clark y col., 1997; Bussink y col., 1991; Ruijter y col., 1997), por lo que la presencia de los sitios CreA en el promotor del gen *abf 2* de *P. purpurogenum* podría tener una función similar a los de otros hongos.

Las cajas CCAAT se encuentran en las regiones 5' de aproximadamente el 30% de los genes eucarióticos (Aro y col., 2005) y están presentes en los promotores de muchos genes de celulasas y hemicelulasas, así como también en genes ligninolíticos (Mach y Zeilinger, 2003; Soden y Dobson, 2003; Karahanian y col., 1998). Se ha visto que mutaciones en la secuencia CCAAT de promotores, generalmente reducen la expresión del gen que preceden, ya sea a nivel basal o en respuesta a una señal estimuladora específica (Aro y col., 2005).

Por otra parte, es sabido que la regulación de las enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno en hongos filamentosos, durante el uso de fuentes de nitrógeno secundarias como nitrato, nitrito y purinas, involucra factores GATA, entre ellos AreA, que son una clase de reguladores transcripcionales eucarióticos. Dichos factores se unen a elementos del DNA que poseen la secuencia 5' GATA. Se ha visto en *Aspergillus nidulans* que AreA juega un rol en la activación de la expresión de celulasas, lo que sugiere una comunicación cruzada entre las vías de utilización de nitrógeno y de carbono en estos hongos (Lockington y col., 2002). La presencia de cuatro posibles sitios de unión a AreA en el promotor de *abf2*, podría estar dando cuenta también del mismo efecto.

AceI es un factor de transcripción que se une a las secuencias 5' AGGCA, (Saloheimo y col., 2000) y que en *Trichoderma reesei* funciona como un represor de la expresión de celulasas y xilanasas (Aro y col., 2003) Por último, AlcR, es un factor de transcripción

de la vía de utilización del etanol en *Aspergillus nidulans* (Pateman y col., 1983; Lockington y col., 1987).

Cabe destacar que todos los sitios de unión a factores de transcripción encontrados en el promotor de *abf2* son supuestos; la sola presencia de dichas secuencias no es suficiente para establecer que dichos factores se unan a ellas; para ello se requeriría de una comprobación experimental.

4.9 Arabinofuranosidasas de *P. purpurogenum*.

Como se ha mencionado previamente, *P. purpurogenum* secreta al medio tres Abfs distintas, las cuales son codificadas por genes distintos (Tabla V). Se conoce la secuencia génica completa de los genes *abf1* y *abf2*, y datos preliminares indican que la Abf 3, es codificada por un gen distinto a *abf1* y *abf2* (Ravanal, MC., comunicación personal). En la Tabla V se resumen las características de los genes *abf1* y *abf2*.

Tabla V. Características de los genes codificantes para Abfs de *P. purpurogenum*.

Gen	Tamaño gen (pb)	Tamaño cDNA (pb)	Nº intrones	pb conocidos río arriba	Sitios de unión a factores de transcripción encontrados
<i>abf1</i>	1518	1518	0	989	CreA : 4 XlnR : 1 PacC : 1 CCAAT : 3 AreA : 1
<i>abf2</i>	2295	1908	7	553	CreA : 2 XlnR : 0 PacC : 0 CCAAT : 2 AreA : 4 AlcR : 1 AceI : 1

Además, las características propias de cada una de estas Abfs difieren en ciertos aspectos, mientras que en otros son similares, como se puede apreciar en la Tabla VI.

Tabla VI. Propiedades de las Abfs de *P. purpurogenum*.

Proteína	Masa molecular (KDa)	pI	K _M (mM)	pH óptimo	T° óptima (°C)	N-glicosilaciones	Familia GH
Abf 1	55	6,5	1,23	4,0	50	Sí	54
Abf 2	70	5,3	0,1	5,0	60	Sí	51
Abf 3	47,5	5,8	0,65	5,0	50	Sí	n.d. *

* Datos preliminares indicarían que Abf 3 pertenecería a la familia GH43 (Ravanal, MC. datos no publicados).

A partir de estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio (Ravanal, MC., datos no publicados), se ha podido determinar que estas enzimas difieren considerablemente en la especificidad de sustrato y por lo tanto, cumplen roles distintos en la degradación de polisacáridos que contienen arabinosa, tal como se puede apreciar en la Tabla VII.

Tabla VII. Acción de las Abfs de *P. purpurogenum* sobre sustratos poliméricos.

Enzima	% liberación de arabinosa		
	Arabinano	Arabinano desramificado	Arabinoxilano
Abf 1	25,6	2,87	32,8
Abf 2	1,35	0,58	5,86
Abf 3	0,82	1,35	15,9

La Abf 2 muestra muy baja actividad sobre sustratos poliméricos, como arabinano, arabinano desramificado y arabinoxilano. La Abf 1 y Abf 3, por el contrario, sí pueden hidrolizar sustratos poliméricos, aunque Abf 3 sólo actúa sobre arabinoxilano. Más aún, se ha encontrado que al igual que muchas Abfs de la familia GH43, la Abf3 posee doble actividad: arabinofuranosidasa y β -xilosidasa.

Se ha intentado establecer una correlación entre la familia a la que pertenecen estas enzimas y su especificidad de sustrato (Beldman y col., 1997, Kaneko y col., 1998). Se ha propuesto que las enzimas de la familia GH51, muestran muy poca o nula actividad sobre polisacáridos que contienen arabinosa, y actúan preferentemente sobre arabino-oligosacáridos (Beylot y col., 2001), mientras que las enzimas pertenecientes a GH54 liberan los residuos de arabinosa que se presentan como cadenas laterales desde los polímeros. La Abf 2 de *P. purpurogenum* sigue este patrón (Tabla VII) al igual que otras enzimas pertenecientes a la familia GH51, como la Abf A de *Aspergillus niger* (Rombouts y col., 1988). Sin embargo, otras Abfs de esta familia si son capaces de hidrolizar poliscáridos que contienen arabinosa, como el caso de la Abf I de *Aspergillus awamori* (Kaneko y col., 1998) y una Abf de cebada (Lee y col., 2001). Por lo tanto no existe una correlación clara entre la especificidad de sustrato y la familia de las glicosil hidrolasas.

5. Conclusiones.

1. De las fuentes de carbono ensayadas en los medios de cultivo, el L-arabitol resultó ser el mejor inductor para la producción de Abfs. A este le siguen la coseta de remolacha, el xilano de avena y finalmente la coronta de maíz.
2. La Abf 2 se logró purificar mediante 5 pasos de purificación, con un rendimiento de cerca del 3% y un incremento de la actividad específica de alrededor de 38 veces.
3. Abf2 posee una masa molecular de 70 kDa, calculada por SDS-PAGE.
4. El punto isoelectrico para la enzima purificada, determinado por isoelectroenfoque es de 5.3.
5. Abf2 es activa sobre pNP Ara.
6. La enzima presenta un pH óptimo de 5,0 y una temperatura óptima de 60 °C en las condiciones de ensayo utilizadas. Presenta inestabilidad térmica sobre los 50 °C.
7. La K_M de Abf 2, utilizando pNP Ara como sustrato es de 0,1 mM.
8. La expresión de Abfs es inducida por L-arabitol y en menor cantidad por L-arabinosa, y no así por D-xilosa ni xilitol.
9. La inducción de Abfs por L-arabitol está influenciada por represión por glucosa.
10. El gen *abf2* consta de 2295 pb, y posee 7 intrones.
11. El cDNA de *abf2* posee un marco de lectura abierto de 1908 pb, que codifica para una proteína de aproximadamente 69 kDa con un péptido señal de 37 residuos. La masa molecular calculada de la proteína madura es de aproximadamente 67 kDa.
12. Abf2 pertenece a la familia 51 de las glicosil hidrolasas.

6. Referencias.

- Aguirre, C. Estudio del sistema hemicelulolítico de *Penicillium purpurogenum*. 1997. Tesis para obtener el Título de Bioquímico, Universidad Austral de Chile.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3): 403-410.
- Aro, N., Ilmén, M., Saloheimo, A., Penttilä, M. 2003. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1): 56-65.
- Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microb. Rev.* 29: 719-739.
- Aryon, A, Wilson, B., Strauss, C., Williams, P. 1987. The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their α -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible applications in enology. *Am. J. of Enol. Vit.* 38: 182-188.
- Ballance, D. 1986. Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* 2: 229-236.
- Bause, E. 1983. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem. J.* 209: 331-336.
- Belancic, A., Scarpa, J., Peirano, A., Díaz, R., Steiner, J., Eyzaguirre, J. 1995. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: Purification and properties of two of the enzymes. *J. Biotech.* 41: 71-79.
- Beldman, G., Schols, H., Pitson, S., Searl-van, M., Voragen, A. 1997. Arabinans and arabinan degrading enzymes. *Adv. Macromol. Carbohydr. Res.* 1: 1-64.
- Beylot, M., McKie, V., Voragen, A., Doeswijk-Voragen, C., Gilbert, H. 2001. The *Pseudomonas cellulosa* glycoside hydrolase family 51 arabinofuranosidase exhibits wide substrate specificity. *Biochem J.* 358: 607-614.
- Biskup, S., Inert, F., Holthnuzen, J., Stengele, M., Schultz, G. 1993. Glycosically bound volatiles- A review 1986-1991. *Flav. Frag. J.* 8: 61-80.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophor.* 8 (2): 93-99.
- Bolag, D., y Edelstein, S. 1991. *Protein Methods*. Editado por Wilet-Liss: 95-160.
- Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Brice, R., Morrison, L. 1982. The degradation of isolated cell-free rumen hemicellulases. *Carboh. Res.* 101: 93-100.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 1a ed, John Wiley & Sons, Rockville M. pp. 1250-1318.
- Bussink, H., Buxton, F., Visser, J. 1991. Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigenensis* genes encoding polygalacturonase II. *Curr. Genet.* 19: 467-474.
- Carvalho, M., De Ioannes, O., Navarro, C., Chavez, R., Peirano, A., Bull, P., Eyzaguirre, J. 2003. Characterization of an α -L-arabinofuranosidase gene (*abf1*) from *Penicillium purpurogenum* and its expression. *Myc. Res.* 107: 388-394.
- Coutinho, P., Henrissat, B. 1999. Carbohydrate-Active Enzymes server at http://afmb.cnrs-mrs.fr/_cazy/CAZY/index.html.
- De Ioannes, P., Peirano, A., Steiner, J., Eyzaguirre, J. 2000. An α -L-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: production, purification and properties. *J. of Biotech.* 7:253-258.
- Debeche, T., Bliard, C., Debeire, P., O'Donohue, J. 2002. Probing the essential residues of the α -arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*. *Prot. Engineer.* 15(1): 21-28.
- Dehorty, B. 1965. Degradation and utilization of isolated hemicellulose by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. *J. Bacteriol.* 89: 1515-1520.
- Fessas, D., Schiraldi, A. 1998. Texture and staling of wheat bread crumb: effects of water extractable proteins and pentosans. *Therm. Acta.* 323: 17-26.
- Filho, E., Puls, J., Coughlan, M. 1996. Purification and characterization of two arabinofuranosidases from solid-state cultures of the fungus *Penicillium capsulatum*. *App. Enviro. Microbiol.* 62 (1): 168-173.
- Flippi, M., Visser, J., Veen, P., Graaf, L. 1994. Arabinase gene expression in *Aspergillus niger*: indications for coordinated regulation. *Microbiol.* 140: 2673-2682.
- Gavel, Y. y Von Heijne, G. 1990. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* 3: 433-442.
- Giinata, Z., Dugelay, I., Sapis, J., Baumes, R., Baya-nove, C. 1990. Action des glycosidases exogenes au tours de la vinification: liberation de l'arome a partir de precurseurs glycosidiques. *J. Sci. Vigne. Vin.* 24 : 133-144.
- Gielkens, M., González-Candelas, L., Sánchez-Torres, P., van de Vondervoort, P., de Graav, L., Visser, J., Ramón, D. 1999. The *abfB* gene encoding the major α -L-arabinofuranosidase of *Aspergillus nidulans*: nucleotide sequence, regulation and construction of a disrupted strain. *Microbiol.* 145: 735-741.

- Gobbetti, M., De Angelis, M., Arnaut, P., Tossut, P., Corsetti, A., Lavermicocca, P. 1999. Added pentosans in breadmaking: fermentations of derived pentoses by sourdough lactic bacteria. *F. Microbiol.* 16: 409-418.
- Gobbetti, M., Lavermicocca, P., Minervini, F., De Angelis, M., Corsetti, A. 2000. Arabinose fermentation by *Lactobacillus plantarum* in sourdough with added pentosans and α -L-arabinofuranosidase: a tool to increase the production of acetic acid. *J. Appl. Microbiol.* 88:317-324.
- Greve, L., Labavitch, J., Hungate, R. 1984. α -L-Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus*: purification and possible roles in hydrolysis of alfalfa cell wall. *App. Envir. Microbiol.* 47: 1135-1140.
- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280:309-316
- Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J., Davies, G. 1995. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7090-7094.
- Howard, R., Abotsi, E., Cansen van Rensburg, E., Howard, S. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afric. J. Biotech.* 2: 602-619.
- Hövel, K., Shallom, D., Niefind, K., Belakhov, V., Shoham, G., Baasov, T., Shoham, Y., Schomurg D. 2003. Crystal structure and snapshots along the reaction pathway of a family 51 α -L-arabinofuranosidase. *EMBO J.* 22: 4922-4932.
- Ilmén, M., Saloheimo, A., Onnela, M., Penttilä, M. 1997. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1298-1306.
- Jiménez, T., Martínez-Anaya, M. 1999. Enzymes, a key to improve bread and dough quality: degradation by products and relationship with quality. In Abstracts of the 17th ICC Conference of the Cereal Across the Continents, 6-9 June. ed. Instituto de Agroquímica Tecnología de Alimentos. Valencia. p.168.
- Jenkins, J., Lo Leggio, L., Harris, G., Pickersgill, R. 1995. β -glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with $(\beta/\alpha)_8$ architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. *FEBS Lett.* 362: 281-285.
- Kaji, A., Tagawa, K. 1970. Purification, crystallization and amino acid composition of α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. *Biochim Biophys Acta.* 207:456-464
- Kaneko, S., Arimoto, M., Ohba, M., Kobayashi, H., Ishii, T., Kusakabe, I. 1998. Purification and substrate specificities of two α -L-arabinofuranosidases from *Aspergillus awamori* IFO 4033. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4021-4027.

- Karahanian, E., Corsini, G., Lobos, S., Vicuña, R. 1998. Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochim. Biophys. Acta* 1443, 65-74.
- Kormelink F., Voragen A. 1993. Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by combination of purified xylan degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotech.* 38: 688-695.
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 411-456.
- Kupfer, D., Drabenstot, S., Buchanan, K., Lai, H., Zhu, H., Dyer, D., Roe, B., Murphy, J. 2004. Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryot. Cell* 3:1088-1100.
- Lee, R., Burton, R., Hrmova, M., Ficher, G. 2001. Barley arabinoxylan arabinofuranohydrolases: purification, characterization and determination of primary structures from cDNA clones. *Biochem. J.* 356: 181-189.
- Levine, J. 1996. Biomass burning and global change. Levine J. eds. Vol. 1. Remote sensing and inventory development and biomass burning in Africa. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA, pp 35.
- Liebl, W., Gabelsberger, J., Schleifer, K. 1994. Comparative amino acid sequence analysis of *Thermotoga maritima* L-glucosidase (BglA) deduced from the nucleotide sequence of the gene indicates distant relationship between L-glucosidases of the BGA family and other families of L-1,4-glycosyl hydrolases. *Mol. Gen. Genet.* 242, 111-115.
- Lockington, R., Scazzocchio, C., Sequeval, D., Mathieu, M., Felenbok, B. 1987. Regulation of *alcR*, the positive regulatory gene of the ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 1: 275-281.
- Lockington, R., Rodbourn, L., Barnett, S., Carter, C., Kelly, J. 2002. Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal. Genet. Biol.* 37: 190-196.
- Luonteri, E. 1998. Fungal α -arabinofuranosidases and α -galactosidases acting on polysaccharides. Technical Research Centre of Finland. Disertación para el grado de Doctor en Tecnología.
- Mach, R., Zeilinger, S. 2003. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 60: 515-522.
- Malherbe, S., Cloete, T. 2003. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications: A review. *Env. Sc. Biotech.* 1: 105-114.
- Mandels, M., Weber, J. 1969. The production of cellulases. *Adv. Chem. Series.* 95: 391-414.

- Manin, C., Shareek, F., Morosoli, R., Kluepfel, D. 1994. Purification and characterization of an α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* and DNA sequence of the gene (abfA). *Biochem. J.* 302: 443-449.
- Margolles-Clark, M., Ilmén, M., Penttilä, M. 1997. Expression patterns of 10 hemicellulase genes from filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *J. Biotech.* 57: 167-179.
- Martinez-Anaya, M., Devesa, A. 1999. Enzymes and sourdough starters govern bread and dough quality: influence on dough-bread pentosans. En Abstracts of the 17th ICC Conference of the Cereal Across the continents, 6-9 June. ed. Insituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Valencia. pp 168.
- Mateo, J., Jiménez, M. 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chrom. A.* 881:557-567.
- Mathlouthi, N., Saulnier, L., Quemener, B., Araier, L. 2002. Xylanase and α -glucanase and other side enzymatic activities have greater effects on the viscosity of several feedstuffs than xylanase and α -glucanase used alone or in combination. *J. Agric. F. Chem.* 50: 5121-5127.
- Matuso, N., Kaneko, S., Kuno, A., Kobayashi, H., Kusakabes, I. 2000. Purification, characterization and gene cloning of two c-L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreuses* GS901. *Biochem. J.* 346: 9-15.
- Miyanga, A., Koseki, T., Matsuzawa, H., Wakagi, T., Shoun, H., Fushinobu, S. 2004. Crystal structure of a family 54 α -L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate binding module that can bind arabinose. *J. Biol. Chem.* 279: 44907- 44914.
- Musalem, S., Steiner, J., Contreras, O. 1984. Producción de celulasas por hongos aislados de madera y suelos del sur de Chile. *Boletín Micológico.* 2: 17-25.
- Nozawa, S., Rigoli, I., Thedei, G., Rossi, A. 1995. Mind the buffering capacity of citric acid. *Fung. Genet. Newslett.* 42: 56.
- O'Connell, M., Kelly, J. 1989. Physical characterization of the aldehyde-dehydrogenase-encoding gene of *Aspergillus niger*. *Gene:* 84: 173-180.
- Pateman, J., Doy, C., Olson, J., Norris, U., Creaser, E., Hynes, M. 1983. Regulation of alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (AldDH) in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Roy. Soc. Lond.* B217: 243-264.
- Renner, M., Breznak, J. 1998. Purification and properties of ArfI, an α -L-arabinofuranosidase from *Cytophaga xylanolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:43-52.
- Roche, N., Berna, P., Desgranges, C., Durand, A. 1995. Substrate use and production of α -L-arabinofuranosidase during solid-state culture of *Trichoderma reesei* on sugar beet pulp. *Enz. Microb. Tech.* 17: 935-941.

- Rombouts, F., Voragen, A., Searle-van Leeuwen, M., Geraeds, C., Schols, H., Pilnik, W. 1988. The arabinases of *Aspergillus niger*: purification and characterization of two α -L-arabinofuranosidases and an endo-1,5- α -L-arabinase. *Carbohydr. Polym.* 9: 25-47.
- Ruijter, G., Vanhanen, S., Gielkens, M., van de Vondervoort, P., Visser, J. 1997. Isolation of *Aspergillus niger* creA mutants and effects of the mutations on expression of arabinases and L-arabinose catabolic enzymes. *Microbiol.* 143: 2991-2998.
- Rye, C., Withers, S. 2000. Glycosidase mechanisms. *Curr. Op. Chem. Biol.* 4: 573-580.
- Saha, B. 2000. α -L-arabinofuranosidase: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotech. Adv.* 18: 403-423.
- Saha, B. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 30: 279-291.
- Sakamoto, T., Kawasaki, H. 2003. Purification and properties of two type B α -L-arabinofuranosidases produced by *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1621: 204-210.
- Saloheimo, A., Aro, N., Ilmén, M., Penttilä, M. 2000. Isolation of the *acel1* gene encoding a Cys(2)-His(2) transcription factor involved in regulation of activity of the cellulose promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* 275: 5817-5825.
- Sanai, K., Seri, K., Inoue, S. 1997. Inhibition of sucrose digestion and absorption by L-arabinose in rats. *Nihon Eiyou Sykuryougaku Kaishi (en Japonés)*. 50: 133-137.
- Schachter, K. 2000. Expresión de genes de enzimas xilanolíticas y unión de potenciales factores de transcripción al promotor del gen de la endoxilanas A de *Penicillium purpurogenum*. Memoria de investigación.
- Schwarz, W., Bronnenmeier, K., Krause, B., Lottspeich, F., Staudenbauer, W. 1995. Debranching of arabinoxylan: properties of the thermoactive recombinant α -L-arabinofuranosidase from *Clostridium stercorarium* (ArfB). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 856-860.
- Schulze, E. 1891. Zur Kenntniss der chemischen Zusammensetzung der Pflanzenzellmembranen. *Berichte der Chemischen Gesellschaft* 24: 2277-2287
- Seri, K., Sanai, K., Matsuo, N., Kawakubo, K., Xue, C., Inosue, S. 1996. L-arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in uncompetitive manner and reduces glycemic response after sucrose ingestion in animals. *Metab.* 45: 1368-1374.
- Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Shoham, G., Baasov, T., Shoham, Y. 2002. Detailed kinetic analysis and identification of the nucleophile in α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. *J. of Biol. Chem.* 277 (46): 43667-43673.
- Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Gilead-Gropper, S., Baasov, T., Shoham, G., Shohama, Y. 2002. The identification of the acid-base catalyst of α -L-

arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. FEBS Lett. 514: 163-167.

Soden, D., Dobson, A. 2003. The use of amplified flanking region-PCR in the isolation of laccase promoter sequences from the edible fungus *Pleurotus sajor-caju*. J. App. Microbiol. 95 (3): 553-562.

Sørensen, H., Pedersen, S., Viksø-Nielsen, A., Meyer, A. 2005. Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. Enz. Microb. Tech. 36: 773-784.

Sørensen, H., Jørgensen, C., Hansen, C., Jørgensen, C., Pedersen, S., Meyer, A. 2006. A novel GH43 α -L-arabinofuranosidase from *Humicola insolens*: mode of action and synergy with GH51 α -L-arabinofuranosidases on wheat arabinoxylan. Appl. Microbiol. Biotech. 73: 850-861.

Sun, R., Hughes, S. 1999. Fractional isolation and physico-chemical characterization of alkali-soluble polysaccharides from sugar beet pulp. Carbohydr. Polim., 38: 273-281.

Taylor, E. 2006. Structural insight into ligand specificity of a thermostable family 51 arabinofuranosidase, Ara51, from *Clostridium thermocellum*. Biochem. J. 395: 31-37.

Van der Veen, P., Flipphi, M., Voragen, A., Visser, J. 1991. Induction, purification and characterization of arabinases produced by *Aspergillus niger*. Arch. Microb. 157: 23-28.

Van der Veen, P., Flipphi, M., Voragen, A., Visser, J. 1993. Induction of extracellular arabinases on monomeric substrates in *Aspergillus niger*. Arch. Microbiol. 159: 66-71.

Van der Veen, P., Arst, Jr H., Flipphi, M., Visser, J. 1994. Extracellular arabinases in *Aspergillus nidulans*: the effect of different *cre* mutations on enzyme levels. Arch. Microbiol. 162: 433-440.

Van Kuyk, P., de Groot, M., Ruijter, G., de Vries, R., Visser, J. 2001. The *Aspergillus niger* D-xylulose kinase gene is co-expressed with genes encoding arabinan degrading enzymes, and is essential for growth on D-xylose and L-arabinose. Euro. J. Biochem. 268: 5414-5423.

Ward, O., Moo-Young, M. 1989. Degradation of cell wall and related plant polysaccharides. Crit. Rev. Biotech. 8: 237-274.

Witteveen, C., Busink, R., van de Vondervoort, P., Dijkema Swart, K., Visser, J. 1989. L-arabinose and D-xylose catabolism in *Aspergillus niger*. J. Gen. Microbiol. 135:2163-2171.

Zaldívar, J., Nielsen, J., Olsson, L. 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. App. Microbiol. Biotech. 56: 17-34.

Zverlov, V., Liebl, W., Bachleitner, M., Schwarz, W. 1998. Nucleotide sequence of *arfB* of *Clostridium stercorarium*, and prediction of catalytic residues of α -L-arabinofuranosidases based on local similarity with several families of glycosyl hydrolases. FEMS Microbiol. Lett. 164: 337-343.

Anexo I

Tabla de uso de codones para *P. purpurogenum*.

campos: [tripleto] [frecuencia: por miles] ([numero])			
UUU 11.1 (44)	UCU 24.9 (99)	UAU 18.4 (73)	UGU 5.5 (22)
UUC 27.4 (109)	UCC 21.4 (85)	UAC 27.4 (109)	UGC 11.6 (46)
UUA 8.3 (33)	UCA 14.1 (56)	UAA 0.5 (2)	UGA 1.0 (4)
UUG 11.6 (46)	UCG 14.8 (59)	UAG 1.0 (4)	UGG 22.6 (90)
CUU 14.8 (59)	CCU 13.3 (53)	CAU 9.8 (39)	CGU 4.0 (16)
CUC 13.1 (52)	CCC 8.8 (35)	CAC 6.5 (26)	CGC 5.8 (23)
CUA 6.0 (24)	CCA 15.3 (61)	CAA 13.6 (54)	CGA 4.8 (19)
CUG 15.3 (61)	CCG 8.0 (32)	CAG 20.1 (80)	CGG 3.0 (12)
AUU 16.9 (67)	ACU 20.9 (83)	AAU 21.4 (85)	AGU 11.3 (45)
AUC 23.1 (92)	ACC 31.4 (125)	AAC 36.7 (146)	AGC 25.4 (101)
AUA 4.8 (19)	ACA 19.6 (78)	AAA 9.8 (39)	AGA 2.5 (10)
AUG 15.6 (62)	ACG 17.4 (69)	AAG 15.1 (60)	AGG 2.5 (10)
GUU 14.3 (57)	GCU 32.9 (131)	GAU 27.4 (109)	GGU 28.4 (113)
GUC 28.7 (114)	GCC 30.4 (121)	GAC 24.1 (96)	GGC 40.2 (160)
GUA 5.5 (22)	GCA 20.1 (80)	GAA 11.8 (47)	GGA 21.9 (87)
GUG 15.1 (60)	GCG 13.3 (53)	GAG 18.6 (74)	GGG 8.6 (34)