

UCH-FC
DOC-B
C 845
C.L

REGULACION DE LA EXPRESION DE ENDOGLUCANASAS
PRODUCIDAS POR EL HONGO DE PUDRICION PARDA
Gloeophyllum trabeum

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Milena Nila Cotoras Tadic

Septiembre de 1994



Director de Tesis: Dr Eduardo Agosin Trumper

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

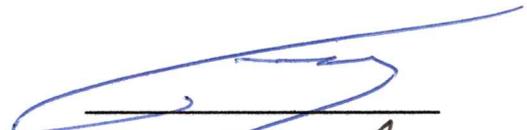
MILENA NILA COTORAS TADIC

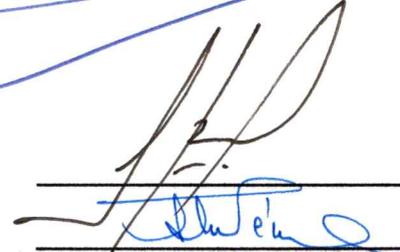
Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 12 de Septiembre de 1994.

Director de Tesis
Dr Eduardo Agosin

Comisión de Evaluación de la Tesis
Dr Eugenio Spencer
Dra Luz María Perez
Dr Tito Ureta
Dr Rafael Vicuña













N.

A Petre, Nila, Daniel y Milena



AGRADECIMIENTOS

El término de esta Tesis no hubiera sido posible sin la colaboración desinteresada de muchas personas a las cuales me gustaría agradecer:

A Eduardo Agosin, quien me mostró una visión totalmente distinta de la investigación.

A Dan Cullen por sus valiosos consejos, ayuda y la acogida que me brindó en su laboratorio.

A Eduardo Espejo por el apoyo que recibí de él a cada momento.

A Eduardo Rojas, Omar Orellana, Herman Silva y a todas aquellas personas que de alguna manera me ayudaron a superar momentos difíciles.

A todos mis amigos del laboratorio que me ayudaron de muchas maneras y en especial a Arturo, Lenka y Laura.

Y sobre a todo a mi familia, Petre, Nila, Davor, Ivo y Anita, que sin su apoyo no hubiera podido terminar mi doctorado.

Finalmente, quisiera agradecer en forma muy especial a mis hijos Daniel y Milena que con su inocente sabiduría comprendieron lo que significa hacer un doctorado

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABLAS	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xix
ABREVIATURAS.....	xxii
INTRODUCCION.....	1
1.- Estructura de la pared vegetal	2
1.1.- Degradación de la pared	2
2.- Estructura de la celulosa	5
2.1.- Degradación de la celulosa	7
2.1.1.- Sistema celulolítico de los hongos de pudrición blanda y blanca	7
2.1.2.- Sistema celulolítico de los hongos de pudrición parda.....	12
3.- Mecanismos de regulación de la expresión génica en microorganismos eucariontes	14
3.1.- Inducción de la expresión génica en hongos	15
3.1.1.- Levaduras.....	15

3.1.2.- Hongos filamentosos	17
3.2.- Represión catabólica de la expresión génica en hongos.....	20
3.2.1. Levaduras.....	20
3.2.2.- Hongos filamentosos	23
3.3.- Regulación de la expresión de las enzimas del sistema celulolítico fúngico	24
3.3.1.- Hongos de pudrición blanda y blanca	24
3.3.2.- Expresión de las enzimas del sistema celulolíticos en hongos de pudrición parda	29
MATERIALES Y METODOS	31
1.- Organismos.....	31
2.- Condiciones de cultivo	31
2.1.- Cultivos líquidos del hongo <i>G. trabeum</i>	31
2.1.1.- Medio mínimo de cultivo	31
2.1.2.- Obtención de micelio precrecido	32
2.1.3.- Producción de biomasa	33
2.1.4.- Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de endoglucanasas	33
2.1.5.- Inducción de la producción de endoglucanasas	34
2.1.6.- Represión de la producción de endoglucanasas	34
2.1.7.- Efecto de la cicloheximida	35
2.2.- Cultivo sobre soportes sólidos	35
2.2.1- Determinación de la cinética de crecimiento en cultivos sobre soportes sólidos y sustratos sólidos	37

2.3.- Medio de cultivo para bacterias	37
3.- Determinación de las actividades enzimáticas	37
3.1.- Ensayo de las endoglucanasas	38
3.2.- Ensayo de las celobiohidrolasas	39
4.- Análisis de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida	40
4.1.- Electroforesis en condiciones no desnaturalantes	40
4.2.- Electroforesis en condiciones desnaturalantes	40
5.- Caracterización de las endoglucanasas de <i>G. trabeum</i> ...	41
5.1.- Determinación de la secuencia aminoterminal de las endoglucanasas de <i>G. trabeum</i>	41
5.1.1.- Recuperación de las proteínas con actividad endoglucanasa de geles de poliacriamida en condiciones no desnaturalantes	41
5.1.2.- Identificación de las endoglucanasas por la técnica de Western	42
5.1.3.- Determinación de la secuencia aminoterminal ...	43
5.2.- Determinación de la masa molecular y del punto isoelectrico de las endoglucanasas de <i>G. trabeum</i> ...	43
6.- Purificación de ácidos nucleicos	46
6.1.- Purificación de DNA genómico de <i>G. trabeum</i>	46
6.2.- Purificación de RNA de <i>G. trabeum</i>	47
7.- Análisis de ácidos nucleicos	47
7.1.- DNA.....	47
7.2.- RNA.....	48

8.- Detección de mRNAs que codifican para las endoglucanasas.....	48
8.1. Obtención del partidor 3' amp	49
8.2.- Amplificación del gen de la endoglucanasa	49
8.2.1.- Síntesis de cDNA	49
8.2.2.- Amplificación del cDNA	51
8.2.3.- Amplificación de los productos de PCR y de los fragmentos clonados	51
8.3.- Clonamiento de los productos de PCR	52
8.4.- Análisis de las transformantes	54
9.- Hibridación de ácidos nucleicos	55
9.1.- Preparación de los filtros	55
9.2.- Obtención de las sondas marcadas con ³² p.....	55
10.- Otras determinaciones	56
RESULTADOS.....	57
1.- Producción de enzimas celulolíticas por <i>G. trabeum</i>	57
1.1.- Producción de endoglucanasas en medios de cultivo líquidos	57
1.1.1.- Producción de biomasa en diferentes fuentes de carbono	57
1.1.2.- Producción de endoglucanasas sobre diferentes fuentes de carbono	59
1.2.- Producción de endoglucanasas en cultivo sobre soporte sólido	61

1.2.1.- Producción de biomasa en distintas fuentes de carbono.....	61
1.2.2.- Producción de endoglucanasas	66
1.3.- Producción de celobiohidrolasas en cultivo líquido y sobre sustrato sólido	69
2.- Caracterización de las endoglucanasas	69
2.1.- Determinación de la secuencia aminoterminal de las endoglucanasas de <i>G. trabeum</i>	69
2.1.1.- Identificación de las endoglucanasas	70
2.1.2.- Secuencia aminoterminal de las endoglucanasas de <i>G. trabeum</i>	71
2.2.- Determinación de la masa molecular y el punto isoeléctrico.....	74
2.3.- Homología con enzimas celulolíticas de hongos de pudrición blanca y blanda	76
2.4.- Identificación de mRNAs que codifican para las endoglucanasas de <i>G. trabeum</i>	81
2.4.1.- Diseño del partidor, 3'amp, para la amplificación de los genes de las endoglucanasas	81
2.4.2.- Amplificación de los genes que codifican para las endoglucanasas de <i>G. trabeum</i>	82
2.4.3.- Análisis de los transformantes	83
3.- Regulación de la producción de endoglucanasas por <i>G. trabeum</i>	90
3.1.- Inducción de la producción de endoglucanasas	90

3.2.- Estudios de represión catabólica en la producción de endoglucanasas	92
3.3.- Síntesis de proteínas	98
DISCUSION.....	101
CONCLUSIONES.....	117
PROYECCIONES.....	119
BIBLIOGRAFIA.....	120

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de los tejidos leñosos	3
Figura 2: Degradación de lignina, celulosa y hemicelulosas por distintos tipos de hongos	4
Figura 3: Estructura primaria de la celulosa	6
Figura 4: Mecanismo propuesto para la acción sinérgica de las endoglucanasas y celobiohidrolasas durante la degradación de la celulosa cristalina	9
Figura 5: Representación esquemática de los genes que codifican para las enzimas celulolíticas de <i>T. reesei</i>	11
Figura 6: Regulación de la expresión del sistema celulolítico de <i>T. reesei</i>	26
Figura 7: Esquema de las columnas de Raimbault	36
Figura 8: Representación esquemática del protocolo del RACE.....	50
Figura 9: Representación esquemática y secuencia nucleotídica de una porción del vector pCR II	53

Figura 10: Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de endoglucanasas por <i>G. trabeum</i>	60
Figura 11: Endoglucanasas producidas por <i>G. trabeum</i> utilizando medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono	62
Figura 12: Cinética de crecimiento de <i>G. trabeum</i> sobre soportes sólidos	64
Figura 13: Cinética de consumo de las fuentes de carbono y nitrógeno por <i>G. trabeum</i> crecido sobre soporte inerte.....	65
Figura 14: Cinética de producción de endoglucanasas por <i>G. trabeum</i> en fermentación sobre soporte sólido ..	67
Figura 15: Cinética de producción de endoglucanasas por <i>G. trabeum</i> crecido sobre holocelulosa como soporte sólido.....	68
Figura 16: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes de sobrenadantes de medios de cultivo del hongo <i>G. trabeum</i>	72
Figura 17: Análisis mediante la técnica de Western de las proteínas presentes en los medios de cultivo concentrados de <i>G. trabeum</i>	73
Figura 18: Secuencia aminoacídica del aminoterminal de dos endoglucanasas principales secretadas por <i>G. trabeum</i>	75

Figura 19: Homología entre la endoglucanasas de <i>G. trabeum</i> y la endoglucanasa II de <i>T. reesei</i>	75
Figura 20: Isoelectroenfoque de las proteínas presentes en los medios de cultivo de <i>G. trabeum</i>	77
Figura 21: Separación por cromatoenfoque de las proteínas presentes en el medio de cultivo de <i>G. trabeum</i>	78
Figura 22: Análisis mediante la técnica de Southern del DNA genómico de <i>G. trabeum</i>	80
Figura 23: Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos del RACE	84
Figura 24: Análisis por electroforesis en geles de agarosa de los plasmidios de algunas células transformantes.....	86
Figura 25: Amplificación de los productos del RACE clonados.....	88
Figura 26: Comparación de la secuencia primaria de parte de la glutamina sintetasa de levadura con la de <i>G. trabeum</i>	89
Figura 27: Efecto de la celobiosa sobre la producción de endoglucanasas por <i>G. trabeum</i>	91
Figura 28: Producción de endoglucanasas por <i>G. trabeum</i> y <i>P. chrysosporium</i>	93

Figura 29: Efecto de la glucosa sobre la producción de endoglucanasas por <i>G. trabeum</i> en cultivos inducidos por celobiosa.....	96
Figura 30: Efecto de la celobiosa sobre la producción de endoglucanasas por <i>G. trabeum</i> en un medio con glucosa	97
Figura 31: Efecto de la cicloheximida en la síntesis de endoglucanasas por el hongo <i>G. trabeum</i>	100

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Crecimiento del hongo <i>G. trabeum</i> en diferentes fuentes de carbono	58
Tabla 2: Efecto de la glucosa y el glicerol sobre la actividad enzimática de las endoglucanasas de <i>G. trabeum</i>	94
Tabla 3: Efecto de la cicloheximida en el crecimiento del hongo <i>G. trabeum</i>	99

RESUMEN

La celulosa es degradada exclusivamente por microorganismos, dentro de los cuales se encuentran tanto hongos como bacterias. Estos tienen en común la propiedad de producir enzimas hidrolíticas extracelulares, las cuales catalizan la hidrólisis de la celulosa a celobiosa, la que finalmente es degradada a glucosa. Los hongos son los únicos microorganismos capaces de degradar la celulosa cuando ésta se encuentra en los tejidos lignocelulósicos. El sistema celulolítico de los hongos de pudrición blanca y blanda, dos tipos de hongos que degradan la madera, ha sido estudiado en profundidad. Este está formado por tres tipos de enzimas: las endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas. La celulosa cristalina es degradada por una acción sinérgica entre las endoglucanasas y celobiohidrolasas produciéndose celobiosa u oligosacáridos cortos. Estos oligómeros son hidrolizados a glucosa por acción de las β -glucosidasas. La expresión de las enzimas del sistema celulolítico de los hongos de pudrición blanca y blanda es inducible por la celulosa y reprimida por glucosa. La celulosa por sí misma no es el inductor, sino que disacáridos producidos por hidrólisis parcial de ésta.

Se ha identificado un tercer grupo de hongos, los hongos de pudrición parda, capaces de degradar la celulosa presente en los tejidos leñosos. Estos hongos presentan diferencias significativas con respecto a los hongos de pudrición blanca y blanda. En efecto, los hongos de pudrición parda degradan la celulosa en presencia de la barrera de lignina, modificando sólo parcialmente este último polímero.

El sistema celulolítico de estos hongos ha sido muy poco estudiado; éstos producirían solamente endoglucanasas, por lo tanto no necesitarían de la acción sinérgica entre las endoglucanasas y celobiohidrolasas. Por otra parte, la regulación de la expresión de las endoglucanasas de estos hongos difiere de la de los hongos de pudrición blanca y blanda, ya que se ha descrito que serían constitutivas.

Las características únicas que presenta el sistema celulolítico de los hongos de pudrición parda llevan a postular el objetivo general de esta tesis, que fue el estudio de la expresión y regulación de las enzimas del sistema celulolítico.

En primer lugar se estudió la producción de enzimas del sistema celulolítico del hongo de pudrición parda *Gloeophyllum trabeum* bajo distintas condiciones de cultivo. Para ello, se usó tanto sistemas de cultivo líquidos como cultivo sobre soportes inertes. En cultivos líquidos se encontró que *G. trabeum* produjo endoglucanasas en todos los medios de cultivos, los que contenían las diferentes fuentes de carbono analizadas; aunque el nivel de expresión fue distinto. El nivel mayor de expresión se obtuvo cuando

se usó celobiosa y celulosas como fuentes de carbono. Un nivel intermedio se logró con glucosa, manosa y lactosa. Finalmente, un nivel bajo de expresión se obtuvo con galactosa, xilosa, glicerol y fructosa. Esto sugirió que la expresión de endoglucanasas sería inducible por celobiosa y no estaría bajo represión catabólica. En cultivos sobre soportes inertes se obtuvieron resultados similares , en los cuales al utilizar celobiosa como fuente de carbono se obtuvo un nivel mayor de expresión de endoglucanasas que en glucosa.

El segundo objetivo específico de la tesis consistió en caracterizar las endoglucanasas producidas por el hongo de pudrición parda *G. trabeum*. En electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, se identificaron dos endoglucanasas las que presentaron idéntica secuencia aminoterminal. Al comparar esta secuencia aminoterminal con las secuencias aminoacídicas depositadas en un banco de datos se pudo comprobar que presentaba homología con una porción de la endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, un hongo de pudrición blanda. La endoglucanasa II de *T. reesei* presenta características distintas a las de las enzimas celulolíticas de este hongo y a las del hongo de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium*.

Las masas moleculares determinadas para estas enzimas fueron de 36000 y 32000 Dalton y el punto isoelectrico para ambas fue menor que 3,5. Por otra parte, estas proteínas no presentaron homología en la secuencia nucleotídica con la endoglucanasa I de *T. reesei* ni con la celobiohidrolasa I de *P. chrysosporium*. Esto sugiere

que estas enzimas serían diferentes a las descritas para otros sistemas.

El tercer objetivo consistió en estudiar la regulación de la expresión de las endoglucanasas. En primer lugar, se demostró que la expresión de las endoglucanasas era inducible por celobiosa. Con este fin, micelio pre-crecido fue transferido a medios de cultivo con lactosa y se adicionó celobiosa, observándose un claro efecto de inducción. Posteriormente, se demostró que la expresión de estas enzimas no está sujeta a represión catabólica. Para ello, se agregó glucosa en distintas concentraciones a cultivos inducidos con celobiosa, sin que ella afectara la inducción por celobiosa. Más aún, fue posible inducir la expresión de estas enzimas al agregar celobiosa a cultivos que contenían altas concentraciones de glucosa.

Finalmente, utilizando cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, se demostró que el efecto de la celobiosa sobre la expresión de las endoglucanasas se debía a un verdadero efecto de inducción y no a una activación de una enzima pre-existente

ABSTRACT

Cellulose degradation occurring in nature is brought about by microorganisms including fungi and bacteria. These microorganisms produce extracellular hydrolytic enzymes, which catalyze the hydrolysis of cellulose to cellobiose and the latter is finally metabolized into glucose. Cellulose of woody tissues can be degraded only by fungi. The cellulolytic system of white and soft-rot fungi, two classes of wood degrading fungi, has been thoroughly investigated. Three basic classes of enzymes are involved in these systems: endoglucanases, cellobiohydrolases and β -glucosidases. Endoglucanases and cellobiohydrolases cooperate to produce the hydrolysis of crystalline cellulose. These enzymes liberate cellobiose and short oligosaccharides. β -glucosidase hydrolyzes these latter compounds into glucose. The expression of white and soft-rot fungi cellulolytic system enzymes is induced by cellulose and repressed by glucose. Disaccharides produced by partial hydrolysis of cellulose have been identified as the true inducers.

A third type of wood degrading fungi, the brown-rot fungi, which has different characteristics than those mentioned above. Indeed, brown-rot fungi degrade cellulose in the presence of lignin. Moreover, lignin is only partially modified.

The brown-rot cellulolytic system has not been thoroughly studied until now. These fungi would produce only endoglucanases. Therefore, synergism between endoglucanases and cellobiohydrolases would not exist. The apparently constitutive endoglucanase expression is another important difference between brown and white and soft-rot fungi.

These unique features of brown-rot fungi allowed us to postulate the general objective of this thesis: the study of expression and regulation of the cellulolytic enzymes from brown-rot fungi.

First, the production of cellulolytic enzymes of the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum* under different culture conditions was studied. The culture conditions were: liquid culture and solid state fermentation. *G. trabeum* produced endoglucanases in liquid cultures containing different carbon sources, but the expression level was different. Highest expression was obtained on two different celluloses and cellobiose. A middle level was reached on glucose, mannose and lactose. Finally, galactose, xylose, glycerol and fructose produced the lowest expression. This result suggested that endoglucanase expression in brown-rot fungi is induced by cellobiose and is not under catabolite repression. Similar results were obtained in solid state fermentation, i.e. endoglucanase expression was higher on cellobiose than on glucose.

Second, endoglucanases produced by the brown-rot fungus, *G. trabeum* were characterized. Two endoglucanases were identified by SDS-polyacrilamide electroforesis. These enzymes had identical aminoterminal sequences and showed homology with the

endoglucanase II of *T. reesei*, a soft-rot fungus. *T. reesei* endoglucanase II is different from other cellulolytic enzymes, as those of *T. reesei* and the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. The molecular weight of *G. trabeum* endoglucanases were 36000 and 32000. These proteins showed no homology with the nucleotide sequences of *T. reesei* endoglucanase I and *P. chrysosporium* cellobiohydrolase I. These results suggest that *G. trabeum* endoglucanases are different to those described for other systems.

Third, regulation of endoglucanase expression was studied. When cellobiose was added to lactose containing media a significant induction of endoglucanase production was observed. Expression of this enzyme was not repressed when different concentrations of glucose were added to cellobiose-induced cultures. Moreover, cellobiose was able to induce the endoglucanase expression in glucosa-containing media. These results clearly demonstrated that the endoglucanase expression by *G. trabeum* is not glucose-repressed. Finally, addition of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, to the cultures showed that cellobiose induces endoglucanase synthesis rather than to activate pre-existing endoglucanases.

ABREVIATURAS

AMPC:	Adenosin-mono fosfato cíclico
BCIP:	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BSA:	Albúmina de suero de bovino
pb:	Pares de bases
<i>cbh</i> :	gen que codifica para la CBH
CBH:	Celobiohidrolasa
cDNA:	DNA complementario
CMC:	Carboximetilcelulosa
DNA:	Acido desoxirribonucleico
dNTPs:	2'-desoxinucleosidos 5' trifosfatos
DP:	Grado de polimerización
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Acido etilendiaminotetraacético
EG:	Endoglucanasa
<i>egl</i> :	gen que codifica para la EG
IPTG:	Isopropiltio- β -galactosido
Membranas de PVDF:	Membranas de difluoruro de polivinilideno
M-MLV R T:	Transcriptasa inversa del virus Maloney de la leucemia murina

NBT:	Azul de nitrotetrazolio
PCR:	Reacción de polimerización en cadena
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RACE:	Amplificación rápida de los terminales de cDNA
RNA:	Acido ribonucleico
RNasa:	Ribonucleasa
SDS:	Dodecil Sulfato de Sodio
TBE:	Amortiguador (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM y 1 mM EDTA pH 8,0)
TBST:	Amortiguador (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 0,05%)
TCA:	Acido tricloroacético
U:	Unidades
UAS:	Secuencias activadoras ubicadas río arriba del promotor
URS:	Secuencias represoras ubicadas río arriba del promotor
X-GAL:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido

INTRODUCCION

Los componentes de la materia vegetal, celulosa, hemicelulosas y lignina, constituyen la principal porción del carbono fijado durante la fotosíntesis, siendo la celulosa el polímero más abundante. Debido a la estructura química de la celulosa, este polímero es insoluble y por lo tanto de difícil degradación.

Los microorganismos son los únicos seres vivos que tienen la propiedad de la celulosa. Entre éstos, se incluyen tanto hongos como bacterias, que pueden ser aerobios o anaerobios, mesofílicos o termofílicos y por lo tanto se pueden encontrar en una gran variedad de hábitat (Coughlan y col., 1988). En los materiales lignocelulósicos, la celulosa se encuentra asociada a la lignina, lo que hace aún más difícil la degradación de este polisacárido. Los hongos son los únicos microorganismos capaces de degradar eficientemente los materiales lignocelulósicos.

En los últimos años, se han logrado significativos avances en el conocimiento de las enzimas que participan en la degradación de celulosa, tanto de bacterias como de hongos. Estas enzimas han sido purificadas, caracterizadas y los genes que codifican para muchas de ellas han sido clonados (Puls y col., 1991., Gilkes y col., 1991; Goyal y col., 1991; Béguin, 1990).

Sin embargo, los mecanismos de regulación de la expresión de las enzimas del sistema celulolítico en hongos no han sido estudiados en profundidad (Kubicek y col., 1993).

1.- Estructura de la pared vegetal.

La madera está formada principalmente por celulosa, lignina y hemicelulosas. La pared celular de las plantas leñosas está compuesta por varias capas: lamela media y paredes primaria y secundarias. Estas capas difieren tanto en estructura como en composición química (Figura 1).

La lamela media tiene por función mantener las células unidas entre sí y se encuentra altamente lignificada. La pared primaria es una estructura delgada que se encuentra formada por celulosa, hemicelulosas, pectinas y proteínas las que se encuentran inmersas en lignina. La pared secundaria consta de tres capas: la pared secundaria externa, la media y la interna, siendo la pared secundaria media la principal porción de la pared celular. En la pared secundaria las microfibrillas de celulosa están ubicadas en forma paralela encontrándose entre ellas la lignina y hemicelulosas.

1.1.- Degradación de la pared

Dentro de los hongos que degradan la madera se pueden distinguir tres tipos (Figura 2). En primer lugar los hongos de pudrición blanca, los cuales se caracterizan por su propiedad de degradar los tres componentes de la madera, lignina, celulosa y hemicelulosas. El segundo tipo lo constituyen los hongos de

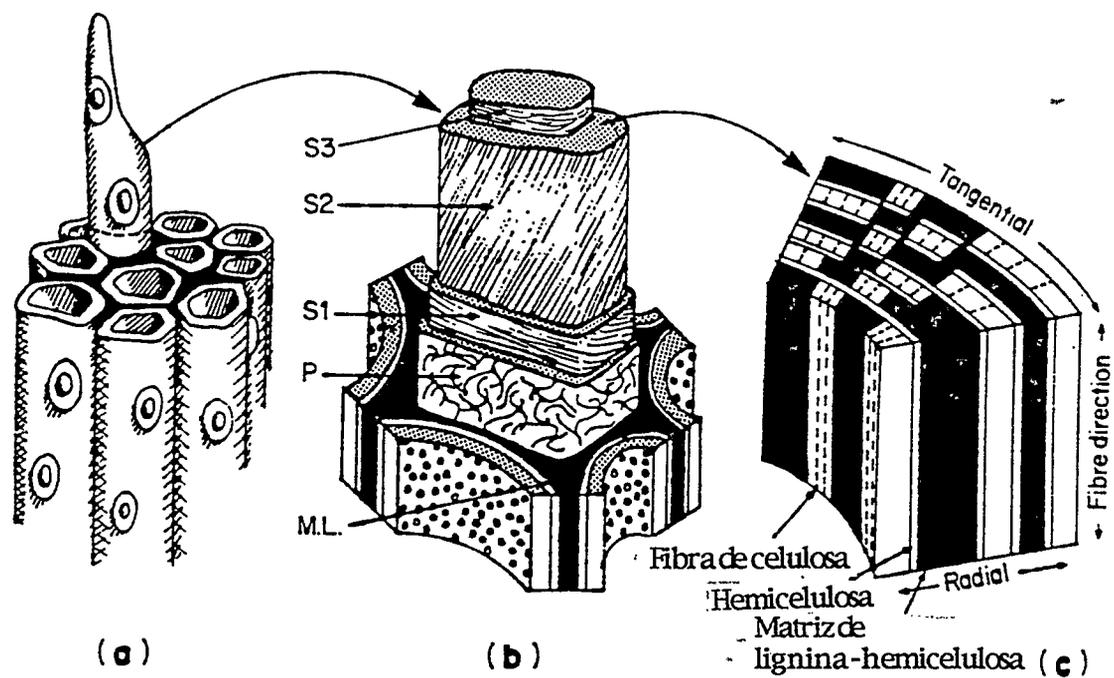


Figura 1: Estructura de los tejidos leñosos (a), Corte longitudinal que muestra la pared celular (b). Relación postulada entre la lignina, las hemicelulosas y las fibras de celulosa en la pared secundaria (c).

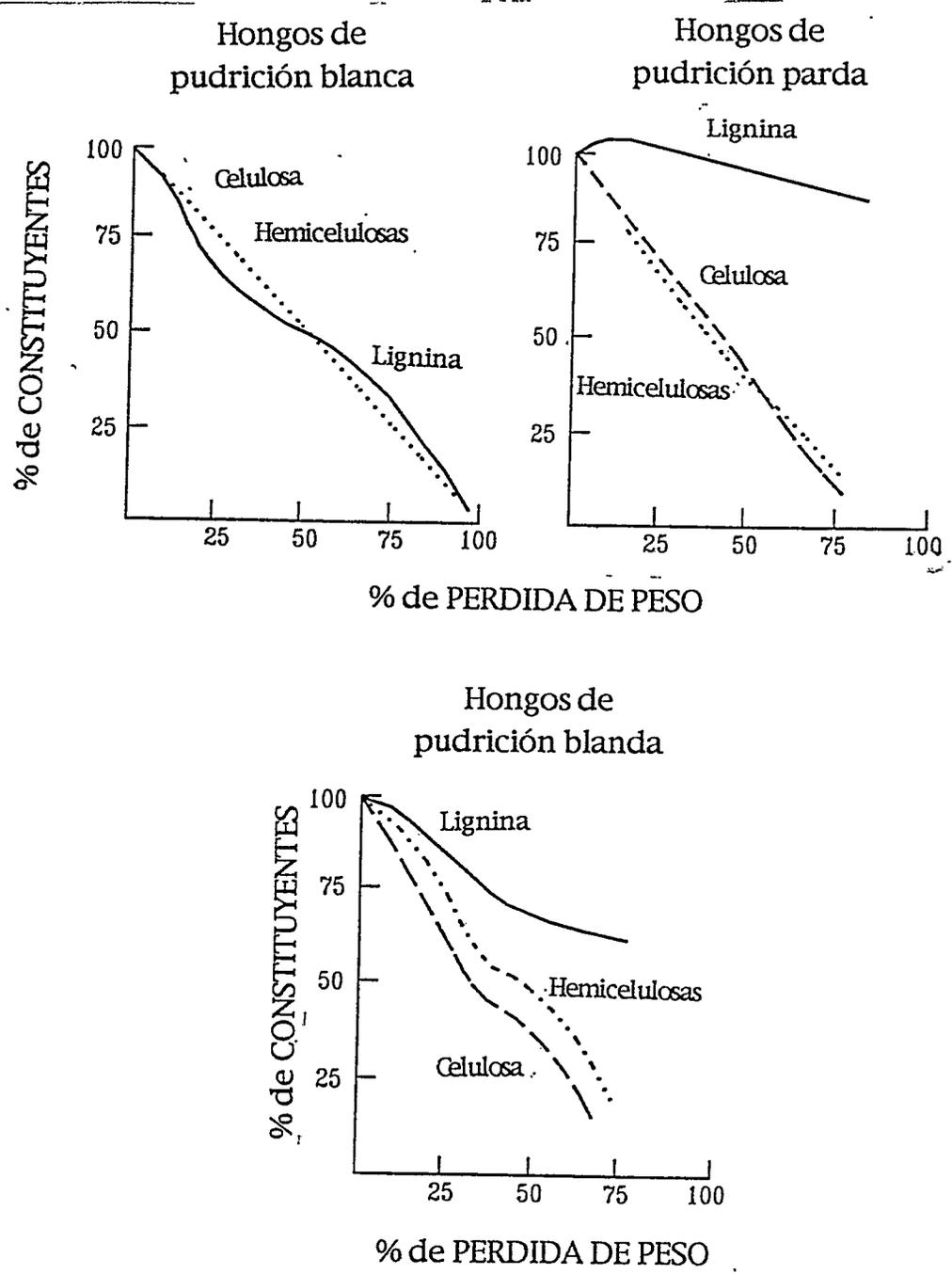


Figura 2: Degradación de lignina, celulosa y hemicelulosas por diferentes tipos de hongos

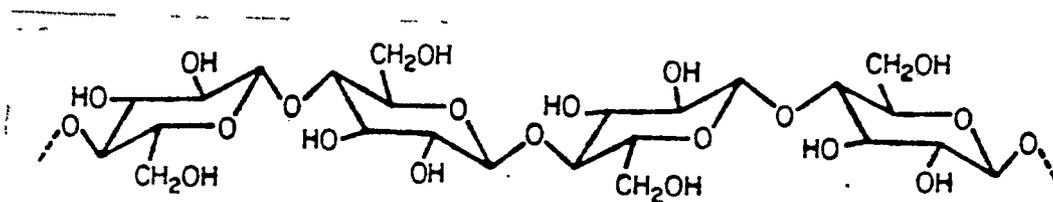
putrefacción parda, que degradan la celulosa y hemicelulosas sin alterar significativamente la barrera de lignina; y finalmente se encuentran los hongos de putrefacción blanda, los cuales degradan tanto los polisacáridos como la lignina, siendo esta última metabolizada en menor proporción (Eriksson y col., 1990).

2.- Estructura de la celulosa

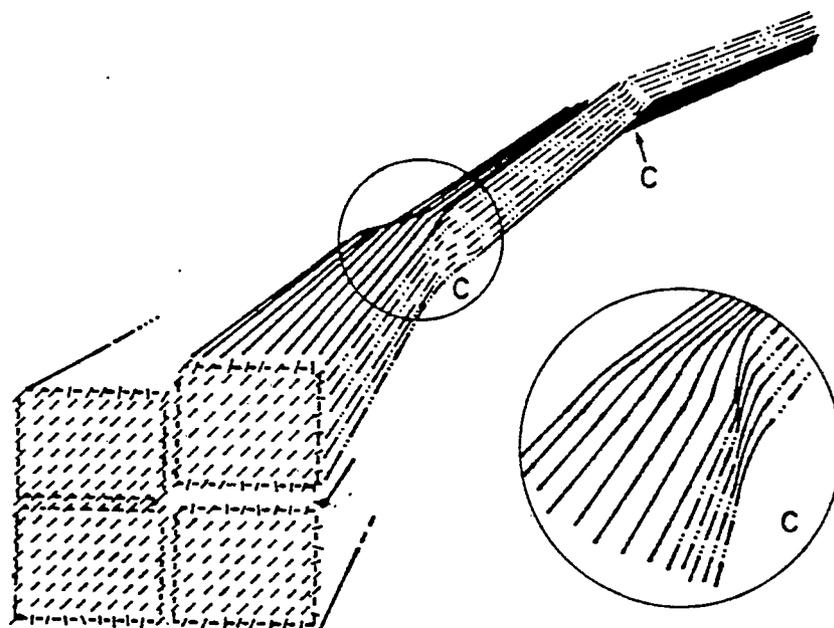
La celulosa es un homopolímero formado por unidades de D-glucopiranosas, las que se encuentran unidas por enlaces glicosídicos β ,1-4, formando una cadena de β -glucano lineal; cada molécula de glucosa se encuentra en un ángulo de 180° con respecto a sus vecinas (Figura 3). La molécula de β -glucano se encuentra estabilizada por enlaces de hidrógeno intramoleculares. La unidad básica repetitiva de la celulosa es la celobiosa, más que la glucosa. Varias cadenas de β -glucano se encuentran asociadas entre sí por puentes de hidrógeno, en forma paralela, constituyendo la microfibrilla de celulosa. Finalmente, varias microfibrillas constituyen la fibra de celulosa (Eriksson y col., 1990).

Como consecuencia de la estructura fibrosa y de la gran cantidad de enlaces de hidrógeno intra e inter moleculares, la celulosa es insoluble en la mayoría de los solventes.

La fibra de celulosa contiene regiones altamente ordenadas, cristalinas, alternadas con regiones menos ordenadas o amorfas. Las regiones cristalinas son más resistentes a la degradación microbiana o enzimática que las regiones amorfas (Walker y Wilson, 1991).



(a)



(b)

Figura 3: Estructura primaria de la celulosa (a). Representación esquemática de estructura de la fibra de celulosa (b). Zonas amorfas de la fibra de celulosa.

El tamaño de la molécula de celulosa se define en términos del grado de polimerización (DP), es decir, el número de residuos de glucosa por molécula de celulosa. Una molécula de celulosa de plantas superiores tiene un DP promedio de 14000, en cambio el DP de la celulosa producida por la bacteria *Acetobacter xylinum* es de 3500. El mayor DP reportado, 25000, pertenece a la celulosa producida por el alga *Valonia* (Eriksson y col., 1990).

2.1.- Degradación de la celulosa

Los microorganismos capaces de degradar la celulosa, tienen en común la propiedad de producir enzimas hidrolíticas extracelulares, llamadas genericamente celulasas, las cuales catalizan la hidrólisis de la celulosa a celobiosa; esta última es finalmente degradada a glucosa.

2.1.1.- Sistema celulolítico de los hongos de pudrición blanda y blanca.

Las celulasas producidas por los hongos de pudrición blanca y blanda son muy similares y han sido estudiadas en profundidad (Coughlan y Ljungdahl, 1988). Dentro de los hongos de pudrición blanca y blanda, los más estudiados son el basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium* y el deuteromicete *Trichoderma reesei*, respectivamente. El sistema celulolítico de estos hongos está formado por las siguientes enzimas:

- Las endoglucanasas (EC 3.2.1.4), que son enzimas que hidrolizan enlaces β -glucosídicos al azar, dentro de la molécula de glucano.
- Las exoglucanasas o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), que liberan unidades de celobiosa desde el extremo no reductor de la cadena de celulosa.
- Las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) completan el proceso hidrolítico convirtiendo la celobiosa en glucosa o hidrolizando residuos de glucosa del extremo no reductor de oligosacáridos cortos.

Para que ocurra degradación de la celulosa cristalina deben participar todas las enzimas de este complejo enzimático, las que actúan en forma sinérgica (Wood y col., 1979). Se ha observado que los componentes aislados de este complejo no hidrolizan la celulosa cristalina (Coughlan, 1985). La degradación de la celulosa cristalina se inicia por un ataque de las endoglucanasas sobre las regiones amorfas de la fibra de celulosa (Figura 4), seguido por una acción combinada entre las endoglucanasas y celobiohidrolasas, las que liberan oligosacáridos cortos y celobiosa, los que son hidrolizados finalmente a glucosa por la β -glucosidasa (Goyal y col., 1991).

Ambos tipos de hongos producen diferentes isoenzimas para cada una de estas actividades. *T. reesei* secreta tres endoglucanasas y tres celobiohidrolasas (Coughlan y Ljungdahl, 1988). *P. chrysosporium* produce cinco endoglucanasas, dos β -glucosidasas y una celobiohidrolasa (Eriksson y Pettersson, 1975a; Eriksson y Pettersson, 1975b; Deshpande y col., 1978). Recientemente fue demostrado que este hongo posee al menos tres genes que codifican para celobiohidrolasas, los que se encuentran agrupados en un

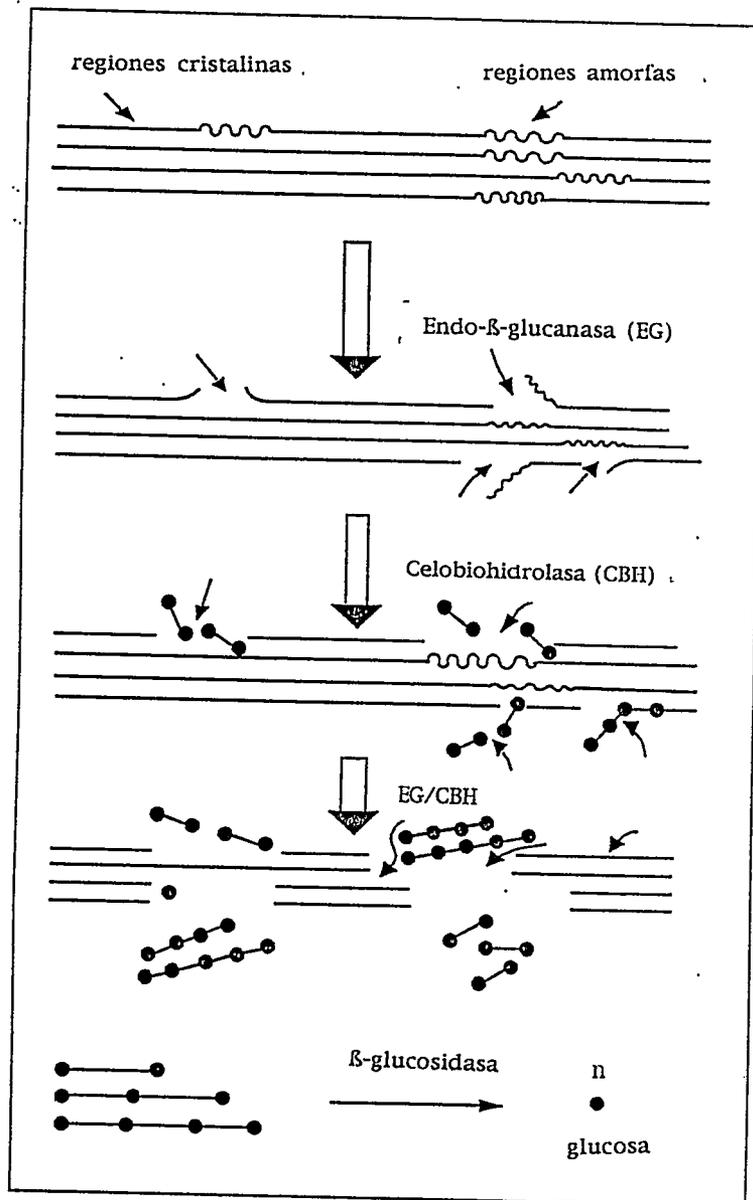


Figura 4: Mecanismo propuesto para la acción sinérgica de las endoglucanasas y celobiohidrolasas durante la degradación de la celulosa cristalina

cromosoma (Covert y col., 1992). En todo caso, la presencia de múltiples isoformas puede deberse a varias causas, entre las cuales se encuentran la existencia de varios genes que codifican para las distintas isoenzimas, diferentes grados de glicosilación y/o cortes proteolíticos (Penttilä y col., 1986; Saloheimo y col., 1988; Shoemaker y col., 1983; Teeri y col., 1983 y 1987; Fagerstam y col., 1984 y Stahlberg y col., 1988).

En la estructura proteica de las endoglucanasas y celobiohidrolasas de ambos tipos de hongos se pueden distinguir tres dominios:

- el dominio de unión a la celulosa
- el dominio catalítico; y finalmente,
- el dominio puente, que une al dominio catalítico con el de unión a la celulosa (Knowles y col., 1987).

La ubicación de estos dominios en la secuencia primaria de las proteínas varía de una enzima a otra. Es así como, el dominio de unión a la celulosa en algunos casos se encuentra en el extremo amino terminal y en otros en el extremo carboxilo terminal (Figura 5) (Knowles y col., 1987).

En las distintas enzimas celulolíticas hay bloques de homología los que se denominaron A y B (Figura 5). El bloque A corresponde al dominio de unión a la celulosa y presenta una homología de un 70% entre las distintas celulasas. Por otra parte, la homología entre los bloques B es de un 50% a 60%. El bloque B es rico en serinas y treoninas, las que se encontrarían altamente glicosiladas, este bloque corresponde al dominio puente (Eriksson y col., 1990).

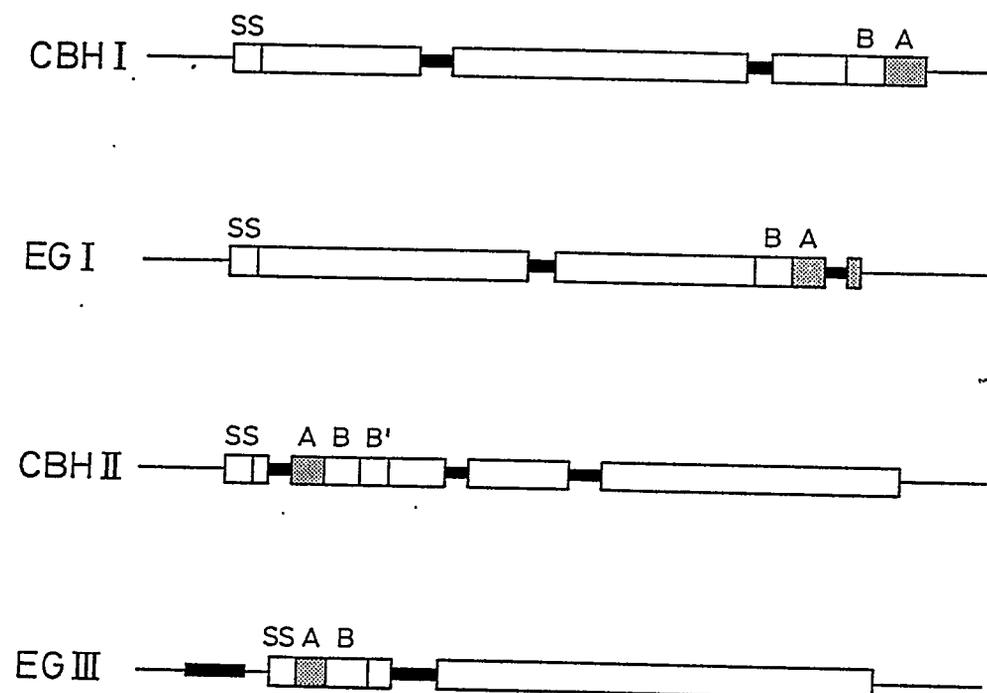


Figura 5: Representación esquemática de los genes que codifican para las enzimas celulolíticas de *T. reesei*, en que se compara la ubicación de los dominios de unión a la celulosa, puente y catalítico. Las regiones homólogas en estas enzimas son denominadas A, B y B'. Las secuencias señal para proteínas extracelulares son denominadas SS. CHB I y CBH II corresponden a las celobiohidrolasas I y II respectivamente. EG I y EG III corresponden a las endoglucanasa I y endoglucanasa II (denominación actual) respectivamente.

Dependiendo de la secuencia aminoacídica de los dominios catalíticos, las enzimas celulolíticas, bacterianas y fúngicas, se pueden agrupar en familias (Gilkes y col., 1991). Las enzimas fúngicas, celobiohidrolasa I y endoglucanasa I de *T. reesei*; celobiohidrolasa de *T. viride* y celobiohidrolasa I de *P. chrysosporium* se encuentran agrupadas en la familia C. La endoglucanasa II de *T. reesei* pertenece a la familia A a la cual pertenecen además enzimas bacterianas.

2.1.2.- Sistema celulolítico de los hongos de pudrición parda.

El sistema celulolítico de los hongos de pudrición parda es poco conocido a pesar de las características únicas que presentan estos hongos. A diferencia de los hongos de pudrición blanca y blanda, los hongos de pudrición parda causan una rápida despolimerización de tipo oxidativa de los polisacáridos estructurales, durante las primeras etapas de la degradación de la madera (Kleman-Leyer y col., 1992). Se ha sugerido que un compuesto extracelular de baja masa molecular, capaz de penetrar y difundir a través de la pared vegetal, sería responsable de la rápida reducción inicial del grado de polimerización de la celulosa (Flournoy y col., 1991). La estructura química de este compuesto no ha sido determinada, pero se propone que el mecanismo implicado sería similar al que utiliza la reacción de Fenton ($\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2$), en la que se generan radicales hidroxilo (Koenigs y col., 1974; Schmidt y col., 1981). Estos últimos han demostrado la capacidad de oxidar celulosa cristalina *in vitro*, despolimerizándola (Halliwell, 1965). Por otra parte, los hongos de

putridión parda secretan ácido oxálico (Espejo y Agosin, 1991), el cual reduciría el Fe^{+3} , normalmente presente en la madera, a Fe^{+2} (Schmidt y col., 1981).

El sistema celulolítico de estos hongos no ha sido estudiado en profundidad. En cultivos sumergidos sólo se ha detectado la presencia de endoglucanasas y β -glucosidasas (Highley, 1973). Bajo estas condiciones de cultivo, no se observó despolimerización ni degradación de la celulosa cristalina; por lo tanto, es probable que el hongo haya expresado el sistema celulolítico completo. Alternativamente, existe la posibilidad que los hongos de pudrición parda no requieran de la acción sinérgica entre las endoglucanasas y las celobiohidrolasas, y que la actividad de estas últimas sea desempeñada por el compuesto de baja masa molecular anteriormente mencionado, el cual fragmentaría las cadenas de celulosa modificando su ordenamiento lo que permitiría la acción hidrolítica de las endoglucanasas.

Una endoglucanasa producida por el hongo de pudrición parda *Lenzites trabea* (sinónimo de *Gloeophyllum trabeum*) fue purificada y parcialmente caracterizada (Herr, 1978). Esta enzima tiene una masa molecular de 29000 Dalton y es activa sobre celulosas solubles y xilano.

En conclusión, aún no se conoce el mecanismo que utilizan los hongos de pudrición parda para degradar los polisacáridos presentes en la madera. Al parecer este mecanismo es diferente al descrito para los hongos de pudrición blanca y blanda. Por lo tanto, los estudios de expresión y caracterización de cada uno de los

componentes de este sistema son fundamentales para entender este novedoso proceso degradativo.

3.- Mecanismos de regulación de la expresión génica en microorganismos eucariontes.

La gran diversidad de fuentes de carbono que utilizan los microorganismos eucariontes requiere que las enzimas involucradas en la captación y degradación de estos nutrientes se encuentren finamente reguladas. Los estudios de regulación de la expresión génica en hongos han contribuido a entender estos mecanismos en organismos eucariontes superiores, ya que las investigaciones realizadas en un amplio rango de sistemas han aportado fuertes evidencias que demuestran que el control transcripcional en eucariontes presentan mecanismos comunes (Guarente, 1988).

Dentro de los elementos comunes que participan en la regulación transcripcional de eucariontes se encuentran aquellos que actúan en cis, denominados UAS (secuencias que activan la transcripción ubicadas río arriba del promotor) en hongos y "amplificadores" en mamíferos; estos elementos son secuencias nucleotídicas que se encuentran adyacentes a un gen que responde a señales ambientales, metabólicas o del desarrollo (Guarente, 1988). Estas secuencias comparten las características de ubicarse a cientos de pares de bases de distancia del sitio de inicio de la transcripción y que pueden localizarse en diferentes posiciones relativas a otro sitio que actúa en cis, la caja TATA (Guarente, 1988).

A estas secuencias reguladoras se unen de manera específica proteínas activadoras transcripcionales, las que aumentan la transcripción del gen. Tanto las proteínas activadoras de hongos como de eucariontes superiores contienen un dominio de unión al DNA, el cual reconoce las secuencias reguladoras y un dominio de activación, el cual interactuaría directa o indirectamente con los factores de transcripción generales (Roeder, 1991; Flanagan y col., 1991; Lin y Green, 1991). El dominio de unión al DNA de los distintos activadores transcripcionales de eucariontes, contiene secuencias ricas en residuos cisteína, los que son capaces de quelar iones zinc, formando una estructura denominada dedo de zinc (Pavletich, 1991). El dominio de activación tiene la característica de ser independiente del dominio de unión al DNA y puede ser intercambiable con dominios de activación de otros organismos; es así como un dominio de activación de levadura es activo en células de mamíferos, plantas o insectos (Ptashne, 1988). Estos dominios se caracterizan por tener un exceso de residuos ácidos.

3.1- Inducción de la expresión génica en hongos.

3.1.1.- Levaduras

Dentro de los hongos, el organismo más estudiado es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en la cual los circuitos regulatorios de varios genes han sido bien caracterizados. Entre éstos, uno de los mejor entendidos es el sistema de utilización de galactosa (Johnston, 1987a).

En la utilización de galactosa por *S. cerevisiae* participan al menos seis enzimas de la vía de Leloir (Leloir, 1951). Estas enzimas están codificadas por los genes *GAL 1*, *7*, *10* y *5* y catalizan la conversión de galactosa en glucosa-6-fosfato. La galactosa entra a la célula a través de una permeasa específica codificada por el gen *GAL 2*. La expresión de los genes *GAL* está regulada por dos mecanismos diferentes: por una parte son inducibles por galactosa y por otra, están bajo represión catabólica.

La inducción de la expresión de los genes *GAL* está regulada por dos proteínas. La proteína GAL4 activa la transcripción de los genes *GAL*, uniéndose a los sitios UAS localizados río arriba de los promotores de los genes *GAL*. En la regulación de la expresión de estos genes también participa la proteína GAL80, proteína represora, que en ausencia del inductor, se une directamente a la proteína GAL4, evitando que ésta pueda activar la transcripción (Johnston, 1987a). Sin embargo, recientemente se ha propuesto otro mecanismo de represión de la transcripción en ausencia del inductor (Parthun y Jaehning, 1992). En este mecanismo no estaría involucrada la disociación de las proteínas GAL80 y GAL4, sino que GAL4 formaría un heterodímero con GAL80; así la capacidad de inducir la transcripción dependería del grado de fosforilación de la proteína GAL4 (Parthun y Jaehning, 1992), y por lo tanto, en ausencia del inductor, GAL4 estaría desfosforilada y sería inactiva.

La estructura química del inductor no se conoce, sólo se sabe que es una molécula de baja masa molecular sintetizada a partir de galactosa, en una reacción catalizada por el producto del gen *GAL3*

(Torchia y Hopper, 1986). A pesar que no hay evidencia directa, se supone que el inductor se uniría a la proteína GAL 80 e impediría que ésta actúe como represora (Johnston, 1987a). Otra alternativa podría ser que el inductor desplace el equilibrio de una forma inactiva de GAL3 a una forma activa; luego, la proteína GAL3 activa interactuaría con GAL80 o con el complejo GAL4-GAL80 (Bhat y Hopper, 1992).

Este mecanismo regulatorio de dos componentes no es una característica exclusiva de los genes *GAL*, ya que ha sido encontrado en otras vías metabólicas en levaduras, como por ejemplo en la regulación de la expresión de las enzimas que participan en la síntesis de algunos aminoácidos (Greenberg y col., 1986). En otros sistemas, en cambio, se ha descrito la participación de sólo una proteína reguladora. Es así como, en la regulación de la síntesis de maltasa participaría únicamente la proteína activadora, la que se une a las regiones UAS localizadas río arriba de los promotores de los genes que codifican para la maltasa y una permeasa específica (Needleman, 1991).

3.1.2.- Hongos filamentosos

El sistema regulatorio de dos componentes, similar al descrito en levaduras, ha sido descrito como un mecanismo funcional en hongos filamentosos. Un sistema bien caracterizado es el de la utilización de ácido quínico por los hongos *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* (Giles y col., 1985; Grant y col., 1988). En la utilización de esta fuente de carbono participan varias enzimas, las

que transforman el ácido quínico a ácido protocatéquico. En ambos hongos, los genes que codifican para estas enzimas se encuentran organizados en agrupaciones (Geever y col., 1989; Lamb y col., 1990). En la regulación de la expresión de estos genes participan dos mecanismos; por una parte existe inducción por ácido quínico y por otra parte hay represión por glucosa (Hawkins y col., 1984; Geever y col., 1989).

El control de la transcripción de los genes que participan en el metabolismo del ácido quínico está mediado por un regulador positivo y un regulador negativo (Giles y col., 1985; Grant y col., 1988). El regulador positivo posee características muy semejantes a la proteína GAL4 de levadura, esto es, en la región amino terminal se encuentra el dominio de unión al DNA el cual contiene una secuencia rica en residuos cisteína, característica de los reguladores transcripcionales de eucariontes (Baum y col., 1987; Beri y col., 1987). Además, esta proteína posee una región ácida en su extremo carboxilo terminal, similar al dominio de activación de la transcripción (Geever y col., 1989).

En hongos filamentosos también ha sido descrito que la inducción de la expresión puede estar mediada por una sola proteína. Un sistema muy bien caracterizado es el de la utilización de etanol por *A. nidulans* (Lockington y col., 1985). En la metabolización de etanol por este hongo participan dos enzimas, la alcohol deshidrogenasa I y la aldehído deshidrogenasa, codificadas por los genes *alca* y *alda*, respectivamente. La expresión de estos genes es inducida por etanol y reprimida por glucosa. El activador es

la proteína ALCR, que está codificada por el gen *alcR*. Además, este gen es autoinducible y también se encuentra sujeto a represión catabólica (Lockington y col., 1987).

El activador ALCR contiene la estructura característica, dedo de zinc, de unión al DNA (Kulmburg y col., 1991). Esta proteína se une a secuencias UAS, que se encuentran ubicadas río arriba de los genes *alca*, *aldA* y *alcR* (Gwynne y col., 1987; Kulmburg y col., 1992a y 1992b).

En conclusión, los eucariontes inferiores, en general, emplean un mecanismo positivo de control de la expresión de genes que codifican para enzimas catabólicas, a diferencia de bacterias en que es frecuente encontrar mecanismos de regulación negativos. Estos mecanismos en eucariontes tienen ciertas propiedades comunes:

- una proteína activadora que tiene la capacidad de reconocer, ya sea directamente, o a través de proteínas intermediarias, señales del medio ambiente; además, esta proteína es capaz de entrar y acumularse en el núcleo, de unirse a elementos que actúan en cis e interactuar ya sea directa o indirectamente con factores de transcripción generales, con el fin de inducir la expresión de un gen.
- la fuente de carbono de preferencia es la glucosa, ya que la mayoría de las vías catabólicas están sujetas a represión por carbono o represión catabólica.

3.2- Represión catabólica de la expresión génica en hongos

3.2.1.- Levaduras

La represión por glucosa es un mecanismo global que controla la expresión de un gran número de genes, incluyendo los genes *GAL*. El mecanismo de represión catabólica es complejo en levaduras, ya que participan varias proteínas (Trumbly, 1992 y Gancedo, 1992). Este mecanismo ha sido estudiado principalmente en la regulación de los genes *SUC*, debido a que la expresión de estos genes está controlada exclusivamente por glucosa, a diferencia de la regulación de las otras vías metabólicas en que la expresión está sujeta a inducción y a represión catabólica. Los genes *SUC* es una familia de genes que codifican para la enzima invertasa, la que cataliza la hidrólisis de sacarosa.

Dos tipos generales de mutantes que participan en represión por carbono de estos genes han sido aislados: mutantes de desrepresión, los cuales no expresan los genes *SUC*, aún en ausencia de glucosa, y mutantes constitutivas, que expresan estos genes en presencia y ausencia de glucosa. Por lo tanto, dos tipos generales de proteínas que participan en represión catabólica han sido identificadas:

i) aquellas requeridas para la expresión de los genes controlados por glucosa, cuando la célula se encuentra en ausencia de glucosa; entre las proteínas de desrepresión se encuentran los productos de los genes *CAT1*, *CAT3*, *SNF2*, *SNF5*, *SNF6* y *MSN1*. Algunas de estas proteínas serían factores transcripcionales que tienen la propiedad de unirse al DNA en regiones UAS, ubicadas río arriba del promotor,

activando la expresión de estos genes cuando la célula se encuentra en ausencia de glucosa. Estas regiones UAS, han sido identificadas en el caso de los genes *SUC* (Sarokin y Carlson, 1986).

ii) aquellas necesarias para reprimir la expresión de los genes regulados por glucosa, cuando la célula dispone de glucosa. Entre estas proteínas se encuentran entre otros, los productos de los genes *HXK2*, *HEX2*, *CAT80*, *TUP1*, *CYC8*, *MIG1* y *RGR1* (Gancedo, 1992).

El gen *MIG1* codifica para una proteína represora, que se uniría a sitios ubicados río arriba de los promotores de los genes reprimibles por glucosa (Nehlin y Ronne, 1990). En los promotores de los genes *SUC* se ha identificado dos secuencias que tienen la propiedad de unir la proteína *MIG1*. Una de estas secuencias se superpone con las secuencias UAS, que activan la transcripción. Por lo tanto, se supone que el efecto de represión de *MIG1* se debe a una competencia con los factores de transcripción por unirse a estos sitios en el DNA. El gen que codifica para la proteína *MIG1* ha sido clonado y secuenciado. La masa molecular deducida para la proteína *MIG1* a partir de la secuencia nucleotídica, es de 56000 Dalton. La secuencia aminoacídica presenta un dominio de unión al DNA, que tiene la estructura característica de dedo de zinc. (Nehlin y Ronne, 1990)

Aún no se conoce cual sería la señal intracelular, producida a partir de la glucosa, que ejerce represión catabólica. Se ha demostrado que el AMPc, no tendría efecto en represión por carbono en eucariontes, en contraste con lo que ocurre con

procariontes (Matsumoto y col., 1983). En este sentido, se ha encontrado que la enzima hexoquinasa isozima PII, codificada por el gen *HXK2* juega un rol importante en represión catabólica (Entian, 1980). Esta enzima cataliza la fosforilación de glucosa, primer paso en la glicólisis. Se ha demostrado que esta enzima tiene además una actividad quinasa, capaz de autofosforilar y de fosforilar otras proteínas, actividad que podría estar relacionada con su función regulatoria (Fernández y col., 1988; Herrero y col., 1989). Recientemente, se demostró que la hexoquinasa PI, también estaría asociada con la represión por glucosa, no así la glucoquinasa (Rose y col., 1991). En efecto, si se considera que la glucosa es el sustrato de las hexoquinasas, parece razonable que estas enzimas estén implicadas en la síntesis o traducción de la señal de la presencia de glucosa.

La glucosa reprime la expresión de los genes *GAL*, actuando a diferentes niveles (Trumbly, 1992):

- i) reducción de los niveles del inductor; la glucosa reprime la expresión de los genes *GAL2* y *GAL3*, que codifican para la galactosa permeasa y la enzima que participa en la síntesis del inductor, respectivamente (Tschopp y col., 1986; Bajwa y col., 1988). Esto hace que, en presencia de glucosa, la síntesis del inductor se encuentre disminuída.
- ii) la glucosa reprime la transcripción de los genes estructurales *GAL1*, *GAL7* y *GAL10*, aún en presencia de galactosa. *GAL1* contiene en su promotor regiones de unión de la proteína represora, MIG1, denominadas URS (Flick y Johnston, 1990).

iii) reducción de los niveles de GAL4; la glucosa también actúa disminuyendo levemente los niveles de la proteína inductora GAL4 (Griggs y Johnston, 1991), el promotor del gen que codifica para esta proteína contiene secuencias que son reconocidas por MIG1 (Nehlin y col., 1991).

En conclusión, MIG1 reprime en forma directa la expresión de los genes que participan en el metabolismo de la galactosa, uniéndose a las regiones reguladoras de estas proteínas, como también en forma indirecta, al disminuir en muy baja proporción, los niveles de la proteína activadora GAL4; esta modesta disminución de los niveles de GAL4 produce una respuesta amplificada a los cambios ambientales (Griggs y Johnston, 1991; Nehlin y col., 1991).

En la regulación por glucosa de la expresión de los genes *GAL*, junto con MIG1, también participan las otras proteínas descritas en la regulación de los genes *SUC* (Nehlin y col., 1991).

3.2.2.- Hongos filamentosos

La represión catabólica es un mecanismo regulatorio ampliamente distribuido en hongos filamentosos. En *A. nidulans* se encontró que una mutación en el gen *creA* causa la desrepresión de un gran número de actividades enzimáticas (Bailey y Arst, 1975). Este gen ha sido clonado y secuenciado (Dowzer y Kelly, 1989); codifica para una proteína de 415 aminoácidos que contiene un dominio dedo de zinc, de unión al DNA. Por otra parte, *Aspergillus niger* también posee un gen con las características de *cre A*

(Drysdale y col., 1993). Estas proteínas tienen un 84% de homología con la proteína represora MIG1 de levadura (Dowzer y Kelly, 1991).

La utilización de etanol por *A. nidulans* está sujeta a represión catabólica. La glucosa reprime la expresión del gen que codifica para la proteína activadora ALCR (Lockington y col., 1987). Recientemente se demostró que, de la misma manera que ocurre en la represión de los genes *GAL* de levadura, el producto del gen *creA* regula la expresión de los genes *alcA* y *aldA*, actuando a dos niveles. Por una parte, reprime la expresión de la proteína activadora, pero por otra reprime directamente la expresión de los genes estructurales, uniéndose a sitios que están ubicados río arriba de la región de los promotores de estos genes (Kulmburg y col., 1993)

3.3.- Regulación de la expresión de las enzimas del sistema celulolítico fúngico.

3.3.1- Hongos de pudrición blanda y blanca.

La expresión de las enzimas del sistema celulolítico en hongos de pudrición blanca y blanda está regulada por dos mecanismos. Por una parte se observa represión catabólica y por otra hay inducción por el sustrato, la celulosa (Merivuori y col., 1984).

El mecanismo molecular de inducción por celulosa de la expresión de enzimas del sistema celulolítico no se conoce. Sin embargo, fue demostrado recientemente que la regulación de la síntesis de celulasas ocurre a nivel transcripcional (El-Gogary y col., 1989; Messner y col., 1991).

En *T. reesei*, hay evidencia de la existencia de bajos niveles constitutivos de endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas, las que hidrolizarían parte de la celulosa produciendo pequeñas cantidades de compuestos de baja masa molecular; estos últimos, serían capaces de penetrar al interior de la célula, induciendo la transcripción de los genes que codifican para las celulasas (El-Gogary y col., 1989) (Figura 6). Consistente con este modelo son los resultados obtenidos por Covert y col. (1992), donde se demostró que *P. chrysosporium* expresa dos celobiohidrolasas en niveles constitutivos muy bajos. Los mRNAs que codifican para estas enzimas se detectaron en presencia de glucosa y no son inducibles por celulosa.

Los compuestos de baja masa molecular generados por la hidrólisis parcial de la celulosa utilizarían permeasas específicas para ingresar a la hifa; en efecto, se demostró que *T. reesei* posee una disacárido permeasa, involucrada en la captación del inductor (Kubicek y col., 1993). La síntesis de esta permeasa es inducible por soforosa.

En trabajos recientes se investigó la función que cumple la celobiohidrolasa II en la inducción de la expresión de las enzimas del sistema celulolítico de *T. reesei* (Seiboth y col., 1992). Mutantes que no expresan esta enzima mostraron una inducción retardada de la expresión de las celulasas. De esto se puede concluir que la celobiohidrolasa II no es esencial en la inducción de la formación de celulasas, pero contribuye de manera importante en la liberación del inductor en las etapas tempranas del crecimiento sobre celulosa.

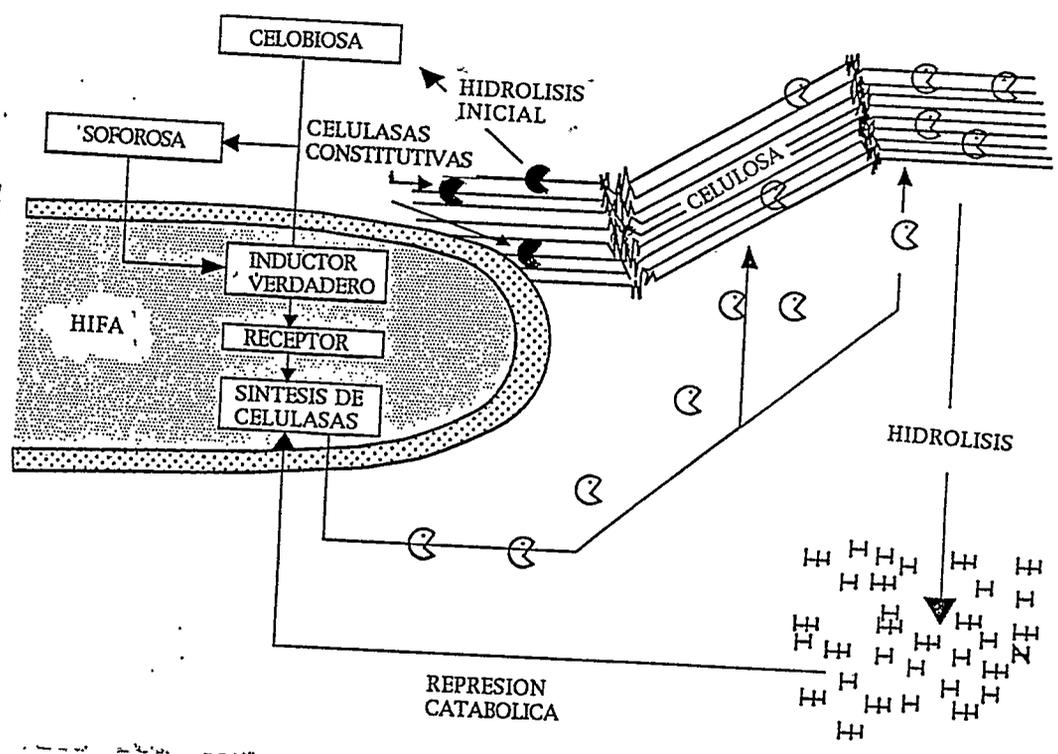


Figura 6: Regulación de la expresión del sistema celulolítico de *T. reesei*.

La naturaleza exacta del inductor del sistema celulolítico aún no ha sido determinada; en *P. chrysosporium* el sistema celulolítico es inducido por celobiosa y soforosa, siendo el primero más efectivo (Eriksson y Hamp, 1978). En *T. reesei*, el inductor de baja masa molecular más efectivo encontrado hasta el momento es el disacárido soforosa (Mandels y col., 1962). Este inductor sería sintetizado por una reacción de transglucosilación catalizada por la β -glucosidasa, utilizando celobiosa como sustrato (Vaehri y col., 1979). Mutantes de *T. reesei*, que no expresan la β -glucosidasa, mostraron una inducción retardada de la expresión del sistema celulolítico (Strauss y col., 1990; Fowler y col., 1992). Esto sugiere que otras actividades enzimáticas pueden sustituir la función de la β -glucosidasa durante la inducción. Estas actividades enzimáticas pueden deberse a otras β -glucosidasas presentes en el hongo, ya que hasta la fecha no está claro si hay más de una β -glucosidasa en *T. reesei* (Messner y Kubicek, 1990; Chen y col., 1992).

A pesar de ser la soforosa el inductor más efectivo, se ha encontrado que este disacárido sólo estimula la expresión de algunas de las isoenzimas del sistema celulolítico (Messner y col., 1988). En trabajos recientes, se ha encontrado otros inductores para *T. reesei*, como celobiono-1,5-lactona (Iyayi y col., 1989) o celulosa oxidada en diferentes grados (Kubicek-Pranz y col., 1990). Por otra parte, se ha descrito que la celobiosa no es un buen inductor de la expresión del sistema celulolítico en *T. reesei* (Fritscher y col., 1990). Sin embargo, este disacárido actúa como inductor cuando la β -glucosidasa es inhibida con nojirimicina (Fritscher y col., 1990). Posiblemente, la

soforosa sea un mejor inductor, debido a que es hidrolizada a glucosa a velocidades mucho menores que la celobiosa, existiendo una competencia entre la captación del disacárido para que pueda actuar como inductor, y su hidrólisis (Fritscher y col, 1990). A la misma conclusión llegaron otros autores cuando estudiaron la inducción del sistema celulolítico de *Penicillium purpurogenum*. En este hongo se encontró que otro disacárido, gentiobiosa, era capaz de inducir la expresión de celulasas, cuando la enzima β -glucosidasa se encontraba inhibida con nojirimicina (Kurasawa y col., 1992). Más aún, un derivado no metabolizable, tiogentiobiosa, resultó ser un excelente inductor del sistema celulolítico de este hongo.

Con respecto a elementos reguladores que actúan en cis en los promotores de los genes que codifican para las enzimas celulolíticas sólo recientemente se han hecho algunos progresos. A este respecto, el promotor del gen que codifica para la celobiohidrolasa II de *T. reesei* poseería ciertas regiones que unirían proteínas reguladoras (Stangl y col., 1993)

Sobre el control por carbono de la síntesis de celulasas se conoce muy poco. Sin embargo, recientemente se demostró que este control ocurre a nivel transcripcional (El-Gogary y col., 1989; Messner y col., 1991). En efecto, los mRNAs que codifican para la celobiohidrolasa I de *T. reesei* no se detectaron cuando el micelio del hongo fue incubado con celulosa y posteriormente con glucosa. Tampoco se detectaron los mRNAs que codifican para la celobiohidrolasas I y II, cuando el micelio de *T. reesei* fue incubado solamente con glucosa.

Al igual que la regulación por glucosa de la expresión de los genes *GAL* de levadura, en la represión catabólica de los genes que codifican para las enzimas celulolíticas, la glucosa ejercería su efecto a varios niveles. A este respecto, recientemente se identificó una región homóloga al sitio de unión de la proteína CRE A en el gen *cbh 1* de *T. reesei*. La delección de esta secuencia causó expresión de la celobiohidrolasa 1 en presencia de glucosa (Kubicek y col., 1993a). Por otra parte se demostró que en *T. reesei*, la glucosa inhibe a la permeasa específica para disacáridos, por lo tanto la captación del inductor se vería disminuída (Kubicek y col., 1993b).

3.3.2.- Expresión de las enzimas del sistema celulolítico en hongos de pudrición parda.

La regulación de la expresión de endoglucanasas en los hongos de pudrición parda, presenta al parecer características muy diferentes. Las enzimas del sistema celulolítico en estos hongos se expresan en todas las fuentes de carbono, incluso en aquellas que son fácilmente metabolizables, como glucosa (Highley, 1973). En experimentos de inducción con celobiosa en cultivos crecidos con carboximetilcelulosa no se observó mayor expresión de endoglucanasas, por lo que este autor concluyó que la expresión de estas enzimas en hongos de pudrición parda es constitutiva.

En conclusión, las características únicas que presenta la regulación de la expresión del sistema celulolítico de los hongos de pudrición parda sugiere un mecanismo regulatorio completamente distinto al descrito hasta ahora para otros microorganismos. Esto lleva a postular el objetivo general de este trabajo que es el estudio de la expresión y regulación de las enzimas del sistema celulolítico de los hongos de pudrición parda.

Para cumplir con este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Estudiar la producción de enzimas celulolíticas, en el hongo de pudrición parda *G. trabeum*, en distintas condiciones de cultivo.
- 2.- Caracterizar las endoglucanasas de este hongo.
- 3.- Analizar la regulación de la expresión de las endoglucanasas.

MATERIALES Y METODOS

1.- Organismos

La cepa utilizada a través de todo el estudio fue *G. trabeum* MAD 617-R, facilitada por el Center for Forest Mycology Research, CFMR (Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin). Como hongo de referencia se usó *P. chrysosporium* BKMF 1767. Estos fueron mantenidos en tubos extendidos con agar 1,5 %, extracto de malta 2% y extracto de levadura 0,2 %. *G. trabeum* fue siempre propagado como micelio molido; la preparación del inóculo se realizó como se describe en Agosin y Odier (1985). *P. chrysosporium* fue propagado a través de esporas.

La cepa bacteriana utilizada fue *Escherichia coli* DH5 α , donada gentilmente por el Dr Alejandro Venegas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Chile.

2.- Condiciones de cultivo

2.1.- Cultivos líquidos del hongo *G. trabeum*

2.1.1.- Medio mínimo de cultivo

El hongo fue cultivado en un medio mínimo que contenía tartrato de amonio 25mM, como fuente de nitrógeno. Se usó como amortiguador tartrato de sodio 50 mM, pH 4,5. Además, a este

medio de cultivo se le adicionó sales minerales como lo describe Kirk y col. (1986). La fuente de carbono fue utilizada a una concentración inicial de 55 mM, exceptuando galactomanano y carboximetilcelulosa (CMC), las que se agregaron en una concentración inicial de 10 g/l. Después de la inoculación los cultivos fueron incubados en un agitador orbital a 150 rpm y 28°C.

2.1.2.- Obtención de micelio pre-crecido

El micelio pre-crecido fue obtenido inoculando 1 ml de una suspensión fúngica que contiene micelio molido, correspondiente a 10 mg de peso seco, en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de un medio de cultivo similar al descrito anteriormente, pero utilizando galactomanano (1%) como fuente de carbono y 0,3 % de carbopol. Se empleó galactomanano, ya que con esta fuente de carbono se obtuvo mayores rendimientos de biomasa (Tabla 1). Por otra parte, se utilizó carbopol, que es un derivado de polimetacrilato, con el objeto de tener partículas fúngicas más pequeñas durante el cultivo, lo que permite tener un mayor intercambio de nutrientes con el medio de cultivo, lo que se traduce finalmente en un mayor rendimiento con respecto a la biomasa (Jones y col., 1988). Después de cinco días de cultivo, el micelio fue cosechado por centrifugación, lavado tres veces con agua estéril y resuspendido en un medio mínimo fresco, que no contenía fuentes de carbono ni nitrógeno. Luego se incubó toda la noche a 4°C. Después de este tiempo, el micelio fue resuspendido en un medio de cultivo similar que contenía la fuente de carbono apropiada, pero en ausencia de la

fuelle de nitrógeno. Los cultivos fueron incubados por los tiempos señalados en las leyendas de las figuras, en un agitador orbital a 120 rpm y 28°C.

2.1.3.- Producción de biomasa

La producción de biomasa fue determinada como sigue: 0,5 ml de una suspensión que contiene el micelio molido, equivalente a 5 mg de peso seco, fue inoculada en matraces Erlenmeyer de 100 ml que contienen 50 ml del medio del cultivo antes descrito. Después de siete días de incubación, los micelios fueron filtrados, utilizando papel filtro Whatman N° 1 previamente tarado, lavados con agua destilada y secados hasta peso constante a 105°C.

2.1.4.- Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de endoglucanasas.

Para estudiar el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de endoglucanasas por *G. trabeum*, se usó micelio precrecido, el que fue transferido a medios con distintas fuentes de carbono. Como fuentes de carbono se utilizó glicerol; monosacáridos como glucosa, manosa, galactosa, fructosa y xilosa; disacáridos, lactosa y celobiosa; o celulosas tales como carboximetilcelulosa, un derivado soluble, y una celulosa cristalina, avicel. Las celulosas fueron agregadas a una concentración inicial de 10 g/l; las demás fuentes de carbono estaban a una concentración inicial de 55 mM.

2.1.5.- Inducción de la producción de endoglucanasas.

Para los estudios de inducción, el micelio pre-crecido en galactomanano fue transferido a matraces que contenían medio mínimo con 1% CMC, 1% lactosa o 1% glucosa. El inductor fue agregado al tiempo y la concentración indicada en la leyenda de las figuras.

2.1.6.- Represión de la producción de endoglucanasas.

Para determinar el efecto de la glucosa o el glicerol sobre la formación de endoglucanasas, el micelio pre-crecido fue transferido a un medio de cultivo mínimo que contenía 1% CMC o 1% CMC suplementado con 5,5 mM glucosa o glicerol.

Como referencia se usó el hongo de pudrición blanca *P. chrysosporium* BKMF 1767. Este fue crecido en condiciones similares a las empleadas para el hongo *G. trabeum*, con la diferencia que la temperatura de incubación fue de 39°C

Por otra parte, se estudió el efecto de la glucosa sobre cultivos inducidos con celobiosa. Para ello, los micelios pre-crecidos se transfirieron a un medio de cultivo mínimo que contenía 1% lactosa; luego de tres horas de incubación se agregó el inductor, celobiosa, a una concentración de 5,5 mM. Posteriormente, a las cinco horas de incubación, se agregó glucosa en las siguientes concentraciones: 5, 20 o 40 mM.

2.1.7.- Efecto de cicloheximida

Micelio pre-crecido en galactomanano se traspasó a medios de cultivo que contenían 1% de lactosa o 1% de glucosa. La producción de endoglucanasas fue inducida con 5,5 mM de celobiosa, la que fue agregada luego de tres horas de cultivo. La cicloheximida fue suministrada en una concentración de 100 µg/ml y fue adicionada a las 0, 4 o 6 horas de incubación.

2.2.- Cultivo sobre soporte sólido

Columnas de Raimbault (Figura 7) de 20 cm de altura y 2 cm de diámetro fueron llenadas con 2 gr del soporte inerte vermiculita (tamizada con la malla número 16) y suplementadas con 3 ml del siguiente medio de cultivo : Fuente de carbono (glucosa o celobiosa) 100 g/l, tartrato de amonio 14 g/l, KH_2PO_4 10,5 g/l, MgSO_4 2.5 g/l, CaCl_2 0,2 g/l y sales de Kirk 50 ml/l preparadas según Kirk y col. (1986). Las columnas fueron inoculadas con 2 ml del hongo *G. trabeum* en la forma de micelio molido y posteriormente incubadas en una cámara termorregulada a 28° C con una humedad constante de 90%. Durante todo el cultivo las columnas fueron aireadas en forma continua.

Como comparación se realizó un cultivo sobre sustrato sólido. Para ello, las columnas de Raimbault fueron llenadas con 1 gr de holocelulosa de pino, la que fue embebida con 1,5 ml del siguiente medio de cultivo: glucosa 2 g/l, tartrato de amonio 14 g/l, KH_2PO_4 10,5 g/l, MgSO_4 2.5 g/l, CaCl_2 0,2 g/l y sales de Kirk 50 ml/l. Estas columnas fueron inoculadas con 1 ml de micelio molido.

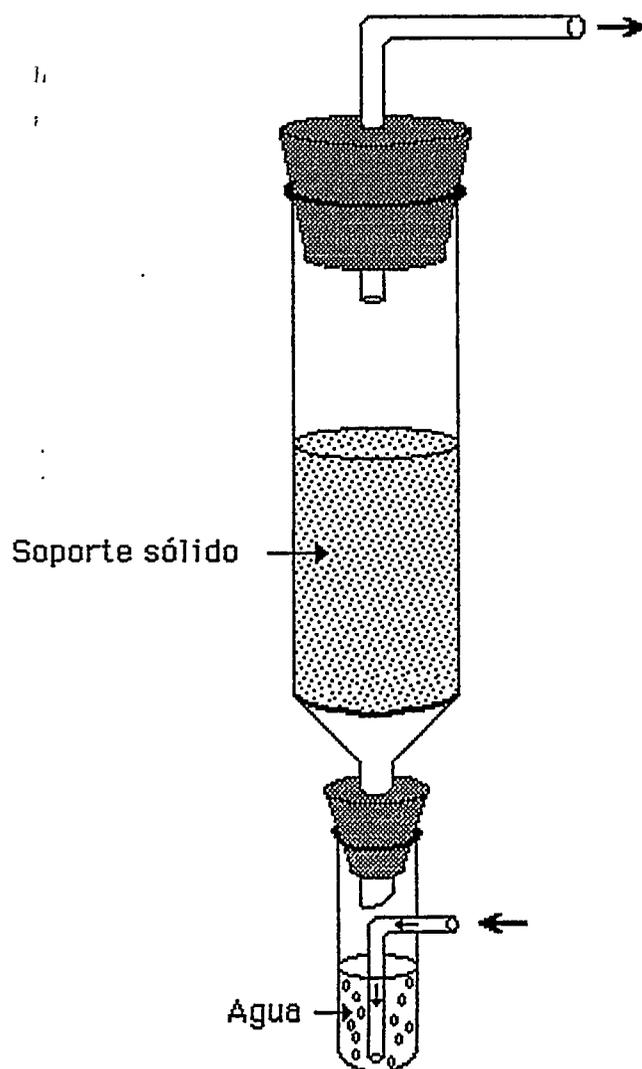


Figura 7: Esquema de las columnas de Raimbault. Las flechas indican la dirección del flujo de aire.

2.2.1.- Determinación de la cinética de crecimiento en cultivos sobre soportes y sustratos sólidos.

Como índice de crecimiento se utilizó la producción de CO₂. Para este fin, el aire de salida de la columna se atrapó en NaOH 1 N, el que posteriormente fue valorado con ácido clorhídrico para determinar su concentración. Como control se usó columnas de Raimbault con el soporte y el medio de cultivo, pero sin inocular. Los mmoles de CO₂ producidos fueron determinados de la siguiente manera:

$$\text{mmoles de CO}_2 \text{ prod./col.} = \frac{(\text{ml de HCl control} - \text{ml de HCl muestra}) \times 10 \times [\text{N}] \text{ ac.}}{\text{Vol de la muestra titulada} \times 2}$$

2.3.- Medio de cultivo para bacterias

La cepa de *E. coli* fue crecida en medio de cultivo Luria, el que contenía 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl y ajustado a pH 7,4. Las placas contenían medio Luria con 1,5 % de agar.

3.- Determinación de las actividades enzimáticas

Todas las mediciones de las actividades enzimáticas fueron determinadas en triplicado. Los resultados fueron expresados como el promedio de cultivos realizados en triplicado.

3.1.- Ensayo de las endoglucanasas

La actividad endoglucanasa en los medios de cultivo fue determinada por viscosimetría a 30°C, agregando 1 ml de una dilución adecuada de los medios de cultivo en amortiguador acetato de sodio 50 mM, pH 4,5 a 6 ml de carboximetilcelulosa (CMC Sigma de baja viscosidad) 0,5%, en amortiguador acetato de sodio 50 mM pH 4,5. La viscosidad fue medida en un viscosímetro Ostwald (tiempo de eflujo de agua: 179 seg. a 30°C) sumergido en un baño de agua a 30°C.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que disminuye la viscosidad relativa en 0,01 por minuto, en las condiciones definidas de temperatura y pH. La viscosidad relativa se define como la proporción entre el tiempo de eflujo de la solución con la enzima y el tiempo de eflujo del amortiguador.

La actividad endoglucanásica en las fracciones de las columnas se midió por el método de liberación de azúcares reductores, usando como sustrato carboximetilcelulosa en una concentración de 2% en amortiguador acetato de sodio 50 mM, pH 4,5. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 50° C por 2 h. Posteriormente la liberación de azúcares reductores fue determinada por el método de Somogy y Nelson (1944). Una unidad de endoglucanasa se definió en forma arbitraria como el aumento de la absorbancia a 520 nm en 0,1.

Por otra parte, las endoglucanasas producidas en cultivos sobre soportes sólidos fueron medidas en el medio extracelular. Este medio extracelular fue obtenido por prensado del soporte sólido. La actividad endoglucanásica fue determinada por viscosimetría.

3.2.- Ensayo de las celobiohidrolasas

La actividad celobiohidrolásica se midió por liberación de azúcares reductores, utilizando celulosa cristalina, Avicel, como sustrato. Para ello, 0,5 ml de una suspensión de celulosa cristalina al 1% en amortiguador acetato de sodio 50 mM, pH 4,5 fue incubada con 0,5 ml de los medios de cultivo tanto líquidos como sobre soportes sólidos. La reacción se hizo a 50°C por 1 h. Posteriormente la liberación de azúcares reductores fue cuantificada utilizando el método de Somogy y Nelson (1944).

Para las mediciones de las actividades endoglucanásicas y celobiohidrolásicas por liberación de azúcares reductores se hicieron los siguientes controles: se incubó por 1 h a 50°C el sustrato con el amortiguador en ausencia de la alícuota que contenía las enzimas, por otra parte se midió los azúcares reductores en muestras que contenían el sustrato, el amortiguador y las alícuotas con las enzimas, sin incubar 1 h a 50°C.

4.- Análisis de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida.

4.1.- Electroforesis en condiciones no desnaturalantes.

Los medios de cultivo obtenidos después de crecer el hongo en diferentes fuentes de carbono fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalantes. Se utilizaron minigeles en placas (10 x 10 x 0,05 cm). La solución que contenía las proteínas fue mezclada con un volumen igual del siguiente amortiguador: Tris-HCl 0,135 M pH 6,8; glicerol 20% y azul de bromofenol 0,01%. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10%, en ausencia de SDS, utilizando en primer lugar un gel concentrador al 4,5%. La electroforesis se realizó a 10mA durante 3 h a 4°C.

Con el objeto de revelar las bandas proteicas que tenían actividad endoglucanasa, el gel de poliacrilamida fue preincubado en amortiguador acetato de sodio 50 mM, pH 4,5, durante 10 minutos y puesto sobre un gel de agarosa al 0,4 % que contenía CMC al 0,3 % y amortiguador acetato de sodio 50 mM pH 4,5. Las endoglucanasas fueron visualizadas como lo describe Bertheau y col. (1984).

4.2.- Electroforesis en condiciones desnaturalantes.

La electroforesis en condiciones desnaturalantes se hizo de manera similar a la descrita en el punto 4.1. La única diferencia fue que los geles contenían SDS al 0,1 %. Las muestras que contenían las proteínas fueron mezcladas con un volumen igual de un

amortiguador que contenía Tris-HCl 0,135 M pH 6,8; SDS 6 %, β -mercaptoetanol 10 %, glicerol 20% y azul de bromofenol 0,01%. Las electroforesis se realizaron a 20 mA, corriente constante, y a temperatura ambiente.

Después de la electroforesis, las proteínas fueron fijadas por 15 min en isopropanol 50% y TCA 10%. Luego fueron teñidas por 1 h en isopropanol 25%, TCA 10% y 0,1% de azul brillante de Coomassie R-250. El gel fue desteñido durante toda la noche en ácido acético al 10%.

5.- Caracterización de las endoglucanasas de *G. trabeum*.

5.1.- Determinación de la secuencia aminoterminal de las endoglucanasas de *G. trabeum*.

5.1.1- Recuperación de las proteínas con actividad endoglucanasa de geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalantes.

Para identificar las bandas proteicas que corresponden a las endoglucanasas, los medios de cultivo concentrados por ultrafiltración en un AMICON empleando membranas de polisulfona de 3000 Dalton de exclusión molecular, fueron sometidos a una electroforesis en condiciones no desnaturalantes. Las bandas que mostraban actividad endoglucanasa, reveladas por el método descrito en 4.1, fueron cortadas. Las proteínas fueron eluidas del trozo de gel, incubando durante toda la noche el gel en amortiguador acetato de sodio 50mM pH 4,5. La solución que contenía las proteínas fue centrifugada, para separarla del resto del gel de poliacrilamida y las proteínas fueron precipitadas con TCA al 10%.

5.1.2.- Identificación de las endoglucanasas por la técnica de Western.

Medios de cultivo concentrados, según se describe en 5.1.1, fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5%, en condiciones desnaturantes.

Una vez que las proteínas fueron separadas en la electroforesis, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, utilizando el sistema Phast (Pharmacia). La membrana fue lavada por 30 min con BSA al 1% en amortiguador TBST (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 0,05%), con el objeto de evitar uniones inespecíficas a la membrana de nitrocelulosa. Para eliminar el exceso de BSA, la membrana fue lavada dos veces con amortiguador TBST.

Luego, anticuerpos policlonales contra la endoglucanasa I de *P. chrysosporium* (anticuerpo regalado por el Dr Daniel Cullen, IMBT, Forest Products Laboratory, Madison Wisconsin, EEUU.) fueron agregados en amortiguador TBST e incubados por 30 min a temperatura ambiente. La membrana fue lavada dos veces con amortiguador TBST y se agregó un segundo anticuerpo anti-IgG conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (Promega) en amortiguador TBST, fue incubado por 30 min y lavado dos veces con amortiguador TBST.

Las bandas proteicas que reaccionaron con los anticuerpos fueron reveladas con el método de desarrollo de color de Promega, el cual contenía NBT y BCIP en Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM.

5.1.3.- Determinación de la secuencia aminoterminal.

El micelio pre-crecido fue transferido a un medio de cultivo mínimo que contenía 55 mM de celobiosa como fuente de carbono. El hongo se incubó por 24 horas en un agitador orbital a 28°C y 120 rpm. Para separar el micelio del medio de cultivo se filtró el cultivo a través de una gasa estéril. Luego el medio de cultivo libre de micelio fue concentrado cien veces por ultrafiltración, según ha sido descrito en 5.1. Este concentrado fue sometido a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5% (10 x 10cm x 0,5mm) según Laemmli (1970). Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Matsudaira, 1987).

Las bandas correspondientes a las endoglucanasas fueron cortadas de la membrana de PVDF y la secuencia aminoterminal fue determinada directamente sobre estas membranas, según se describe en Matsudaira (1987), en el UW Biotechnology Center, Madison, Wisconsin.

5.2.- Determinación de la masa molecular y del punto isoeléctrico de las endoglucanasas de *G. trabeum*.

La determinación de las masas moleculares se hizo por comparación de la migración electroforética de las endoglucanasas de *G. trabeum* con proteínas de masa molecular conocida. Para ello, se creció el hongo, por tres días a 28°C, en un medio mínimo que contenía celobiosa 55 mM como fuente de carbono y tartrato de amonio 25 mM, como fuente de nitrógeno. Luego se obtuvo medio de cultivo libre de micelio por centrifugación. Este medio de cultivo fue

concentrado según se describe en el punto 5.1.1 y sometido a una electroforesis en condiciones desnaturalantes, en un gel de poliacrilamida al 12,5%. Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie y la masa molecular se calculó a partir de un gráfico de logaritmo de las masas moleculares de las proteínas con masa molecular conocida versus el Rf de cada una de estas proteínas. El Rf se definió como distancia del origen a la banda dividido por la distancia del origen a un punto de referencia.

El punto isoelectrico se determinó por isoelectroenfoque, utilizando un gradiente de pH de 3,0 a 6,0. Para este efecto se emplearon geles de poliacrilamida prehechos (Servalyt Precotes 3-6, Serva Fine Biochemicals).

Medios de cultivo, obtenidos después de crecer el hongo con celobiosa fueron concentrados por ultrafiltración, según fue descrito anteriormente, y aplicados a estos geles. Sobre los extremos del gel se pusieron bandas de papel filtro embebidas en amortiguador anódico y catódico, sobre los cuales se apoyaron los electrodos. El amortiguador anódico contenía ácido aspártico 25 mM y ácido glutámico 25 mM. El amortiguador catódico estaba compuesto por etilendiamina 2 M, lisina 25 mM y arginina 25 mM. Antes de aplicar la muestra los geles fueron sometidos a 4000 V por 5 min. Luego la muestra fue sembrada y los geles se sometieron a 4000 V por 5 min y a 8000 V por otros 5 min. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, del modo descrito para los geles de poliacrilamida SDS y por tinción específica para endoglucanasas (Ver punto 4.1).

El punto isoeléctrico se determinó también por cromatoenfoque. Para ello, micelio pre-crecido fue traspasado a un medio de cultivo mínimo que contenía celobiosa 55 mM, como fuente de carbono. Al cabo de doce horas de incubación, a 28°C en un agitador orbital (200 rpm), el micelio fue separado del medio de cultivo por filtración a través de un filtro de fibra de vidrio. Las proteínas presentes en este medio de cultivo fueron precipitadas con sulfato de amonio hasta un 90% de saturación. El precipitado fue resuspendido en amortiguador acetato de sodio 50 mM pH 4,5.

Con el objeto de intercambiar el amortiguador y de eliminar el sulfato de amonio remanente las muestras fueron filtradas por una columna Sephadex G-10 (8 cm x 0,5 cm), la que se encontraba equilibrada con amortiguador imidazol 25 mM pH 7,4. y se colectaron fracciones de 1 ml.

Las fracciones que presentaban actividad endoglucanasa fueron juntadas y sometidas a un cromatoenfoque entre pH 7,4 y 3,0. Para este fin, se utilizó una columna de Polybuffer exchanger 94, Sigma (30 cm x 1 cm) equilibrada con amortiguador imidazol 25 mM pH 7,4. Después de aplicar la muestra, la columna fue lavada con tres volúmenes del mismo amortiguador y las proteínas adsorbidas fueron eluidas con 8 volúmenes de Polybuffer 74 diluido 10 veces y equilibrado a pH 4,0. Una vez que las fracciones que eluían de la columna alcanzaron pH 5,0, ésta fue lavada con dos volúmenes de amortiguador dimetilsuccinato 25 mM pH 3,0. Finalmente la columna fue lavada con dos volúmenes de NaCl 1 M en amortiguador dimetilsuccinato a pH 3,0. Fueron colectadas fracciones

de 1,5 ml a las que se les midió pH, absorbancia a 280 nm y actividad endoglucanasa.

6.- Purificación de ácidos nucleicos

6.1.- Purificación de DNA genómico de *G. trabeum*.

Micelio molido de *G. trabeum* fue inoculado en un medio de cultivo que contenía 2% de extracto de malta y 0,2 % de extracto de levadura. Se incubó por cinco días en un agitador orbital a 28°C y 150 rpm. Al cabo de este tiempo el micelio fue cosechado por filtración sobre papel filtro Whatman N° 1 y lavado con agua destilada estéril. Posteriormente, el micelio lavado fue liofilizado.

La purificación del DNA genómico se hizo según Bainbridge y col. (1990), con algunas modificaciones. 500 mg del micelio seco y congelado a -20°C fueron molidos en un mortero a 4°C. La biomasa molida fue transferida a un tubo Corex de 30 ml y se le adicionaron seis perlas de vidrio; se continuó la molienda en un vortex a 4°C hasta que el micelio estuvo como un polvo fino. Luego, el micelio se resuspendió en solución de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8; 250 mM EDTA pH 8,0; proteinasa K (Sigma) 200 µg/ml y Triton X-100 al 0,5 % (v/v)). Esta suspensión se incubó toda la noche a 37°C, con agitación suave. Posteriormente, se hicieron extracciones con fenol-cloroformo y tratamiento con RNAsa (BRL). Finalmente el DNA se precipitó con 0.54 volúmenes (v/v) de isopropanol y se extrajo con una pipeta Pasteur estéril. Se lavó con etanol al 75%, se secó en un liofilizador y se resuspendió en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM pH 8,0) estéril, durante toda la noche.

6.2.- Purificación de RNA de *G. trabeum*.

Micelio pre-crecido en galactomanano fue traspasado a un medio de cultivo mínimo suplementado con 55 mM de lactosa como fuente de carbono y 5,5 mM de celobiosa como inductor. El hongo se incubó 18 h a 28°C en un agitador orbital a 120 rpm. El micelio fue cosechado por filtración, utilizando gasa estéril, y congelado con nitrógeno líquido.

El micelio congelado se molió en un mortero en presencia de nitrógeno líquido, para que se mantuviera congelado. Luego, se traspasó a un tubo Corex y se le agregó amortiguador de extracción (0.5 M NaCl; 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5; 0.01 M EDTA; 1% SDS y 0.1 mM DTT) en una relación de 10 ml de amortiguador por 1 g de micelio húmedo. Enseguida se extrajo con fenol:cloroformo (1:1) y se precipitó con 2.5 vol de etanol. Finalmente, el RNA total se resuspendió en H₂O tratada con dietilpirocarbonato.

7.- Análisis de los ácidos nucleicos

7.1.- DNA

Los ácidos nucleicos -tanto DNA genómico, como plasmidios, fragmentos de restricción y productos de PCR- fueron analizados en electroforesis en geles de agarosa, utilizando amortiguador TBE (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM y 1 mM EDTA pH 8,0), según los métodos estándares descritos en Maniatis y col. (1982). La visualización de los ácidos nucleicos fue realizada utilizando tinción con bromuro de etidio.

7.2.- RNA

El RNA se cuantificó por su absorbancia a 260 nm. Su pureza se determinó por la relación 260/280 nm (Maniatis y col., 1982). La integridad del RNA se evaluó en geles de agarosa con formaldehído, por la relación existente entre las bandas de RNA ribosomal 23S y 18S de 2:1. Los geles de agarosa-formaldehído fueron realizados como se describe en Maniatis y col. (1982). Los RNAs fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio.

8.- Detección de mRNAs que codifican para las endoglucanasas.

Para la detección de los mRNAs que codifican para las endoglucanasas se utilizó la técnica de RACE (amplificación rápida de los terminales de cDNA), descrita por Frohman (Frohman y col., 1988) La técnica de RACE amplifica cDNA, los que son obtenidos a partir de un mRNA (Figura 8). En esta técnica se emplean tres partidores. El primero es utilizado como sustrato para la transcriptasa reversa. Este partidor es el adaptador (dT), el cual contiene una cola de dT, lo que le permite hibridar con la cola de poli A de los mRNAs. La secuencia de este partidor es la siguiente:

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

El otro partidor es el adaptador 5', que es homólogo a la porción 5' del adaptador (dT). La secuencia de esta partidor es la siguiente:

5'-GACTCGAGTCGACATCG-3'

Finalmente, el tercer partidor, partidor 3' amp, es específico para el gen que se quiere amplificar.

8.1.- Obtención del partidor 3' amp.

El diseño del partidor 3' fue efectuado a partir de la secuencia amino terminal de la endoglucanasa de *G. trabeum*, basándose en la preferencia codogénica para los genes de lignina peroxidasa de *P. chrysosporium* y del gen *egl 1* de *T. reesei*. (Holzbaur y col., 1991 y Penttilä y col., 1986).

Los tres partidores fueron sintetizados por el Dr. Daniel Cullen del IMBT, Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin, EEUU.

8.2.- Amplificación del gen de la endoglucanasa.

8.2.1.- Síntesis de cDNA.

La reacción enzimática se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l. La mezcla de reacción contenía: 1 μ g de RNA total, amortiguador de PCR (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 y 50 mM KCl), 1 mM de cada uno de los dNTPs (BRL), MgCl₂ 5 mM, inhibidor de RNasa (BRL) 10 U, DTT 5 mM, partidor (adaptador dT) 71 pmoles y

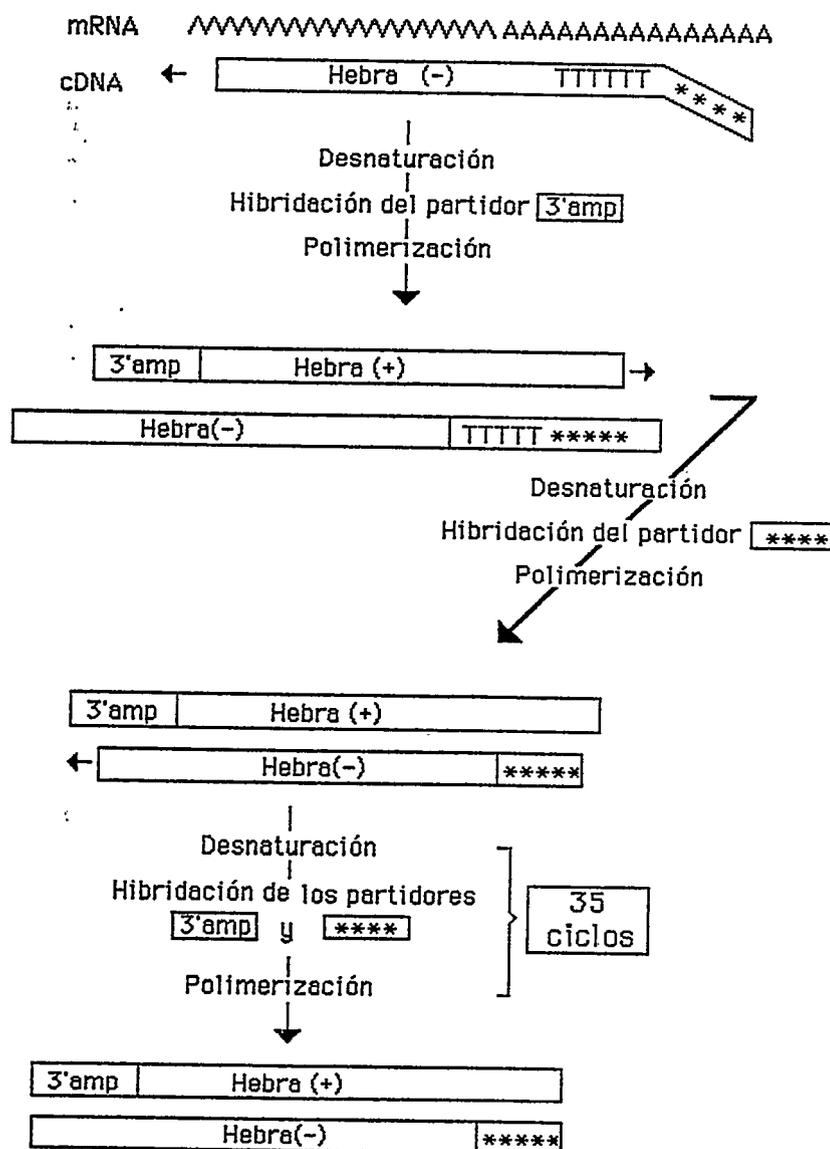


Figura 8: Representación esquemática del protocolo del RACE. ****TTTT, adaptador (dT). ***** , adaptador 5'. 3' amp es el partidor específico para el gen de la endoglucanasa.

transcriptasa inversa (M-MVL Reverse transcriptase, BRL) 40 U. La mezcla de reacción se cubrió con aceite mineral (Sigma) y se utilizaron las siguientes condiciones de reacción: 10 min a 23°C, 45 min a 42°C, 5 min a 95°C y luego fue enfriado a 5°C. La incubación se realizó en un termociclador M. J. Research Inc.

8.2.2- Amplificación del cDNA.

Para amplificar el cDNA, a los 20 μ l que contenían el cDNA se le agregaron 2 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 10 μ l de amortiguador PCR (200 mM Tris-HCl y 500 mM de KCl), 2 μ l de cada uno de los dNTPs, 72 pmoles de los partidores 3' amp y adaptador 5', respectivamente y 5 U de DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*. El volumen final de la reacción fue de 100 μ l. Se utilizaron las siguientes condiciones de reacción: un ciclo de 6 min a 94°C, 2 min a 54°C y 40 min a 72°C. 35 ciclos de: 1 min a 94°C, 2 min a 54°C y 5 min a 72°C. Se finalizó con 1 ciclo de 15 min a 72°C y se enfrió a 4°C. Las incubaciones se efectuaron en un termociclador M. J. Research Inc.

Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa en amortiguador TBE al 0,8%. Para ello se tomó una alícuota de 10 μ l.

8.2.3.- Amplificación de los productos de PCR y de los fragmentos clonados.

Los productos del PCR fueron reamplificados utilizando las mismas condiciones que las descritas en 8.2.2., con la diferencia que en vez de los cDNAs se agregó al medio de reacción los productos del PCR purificados. Estos productos se purificaron a partir de un gel de agarosa al 0,8%. Se usó agarosa (BRL) de bajo punto de fusión.

Después de la electroforesis, el gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio y se cortaron trozos de agarosa que contenían los fragmentos de interés. El DNA contenido en la agarosa fue purificado utilizando el sistema de purificación de DNA GlassMax de BRL, bajo las condiciones recomendadas por el fabricante.

Por otra parte, los fragmentos clonados fueron purificados y amplificados de la misma manera que la descrita en el párrafo anterior.

8.3.- Clonamiento de los productos de PCR.

Para el clonamiento fue utilizado el vector pCR II de Invitrogen (Figura 9). Este es un vector lineal el cual tiene dos residuos de dTMP en los extremos 3'. La estrategia de clonamiento se basa en el hecho que la DNA polimerasa de *T. aquaticus* cataliza la adición de un residuo dAMP, en extremo 3' de los terminales romos de una molécula de DNA (Mead y col., 1991), lo que permite la ligación directa de los productos de PCR al vector.

Otra de las características de este vector es que tiene el gen que codifica para la β -galactosidasa, por lo tanto las colonias transformantes que contengan el inserto serán de color blanco, en placas que tengan el marcador X-gal. En cambio, serán de color azul, las colonias que posean el vector sin inserto.

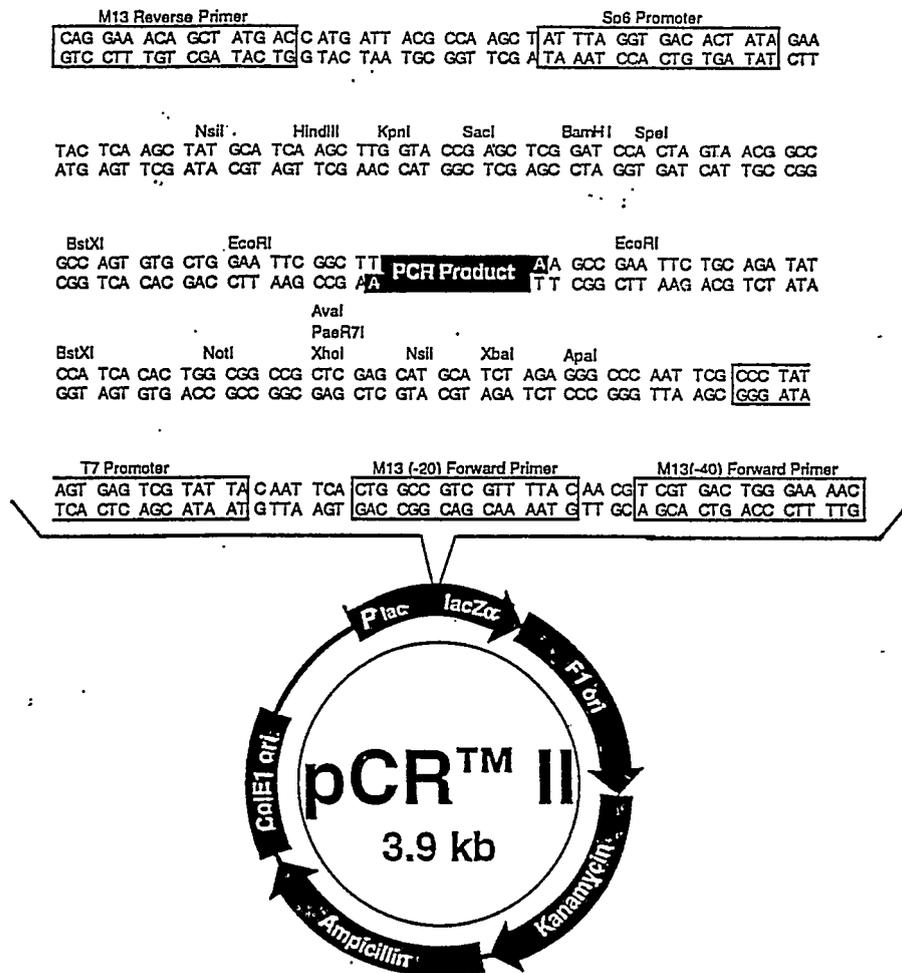


Figura 9: Representación esquemática y secuencia nucleotídica de una porción del vector pCR II.

Para la ligación se usó diferentes estrategias. En primer lugar, los productos obtenidos después del RACE fueron ligados directamente al vector. Por otra parte, estos productos fueron purificados utilizando el sistema de purificación de DNA GlassMax de BRL y ligados al vector; finalmente, una tercera mezcla de ligación fue hecha con los productos del RACE reamplificados y el vector.

La mezcla de ligación se hizo en 11 μ l, volumen final, utilizando las condiciones sugeridas por Invitrogen; se usó una proporción de 1:3 de vector con respecto al inserto. La reacción de ligación fue hecha a 12°C durante toda la noche.

Las células competentes fueron transformadas con 1 o 5 μ l de cada una de las mezclas de ligación. La preparación de las células competentes se hizo por el método del CaCl_2 , descrito en Maniatis (1982). La cepa bacteriana utilizada fue *E. coli* DH5 α . Las bacterias fueron transformadas según la técnica descrita en Maniatis (1982) y sembradas en placas que contenían medio Luria con agar, según está descrito en 2.3. Estas placas además tenían ampicilina (Sigma) 50 μ g/ml, IPTG (Sigma) 0,5 mM y X-gal (BRL) 40 μ g/ml.

8.4- Análisis de los transformantes.

Las colonias blancas fueron crecidas en 5 ml de medio de cultivo Luria, en presencia de 50 μ g/ml de ampicilina, durante toda la noche a 37°C y con agitación. Los plasmidios de estas transformantes fueron purificados según la técnica de lisis alcalina descrita en Maniatis (1982). Aquellos plasmidios que mostraron un patrón de migración diferente al purificado a partir de una colonia

azul, plasmidio circularizado sin inserto, fueron digeridos con Hind III o Eco RI (BRL), según las condiciones recomendadas por el fabricante. Los productos de digestión fueron analizados en geles de agarosa como se describe en 7.1.

9.- Hibridación de ácidos nucleicos

9.1.- Preparación de los filtros

Muestras de DNA genómico de *G. trabeum* digeridas con distintas enzimas de restricción fueron separadas en un gel de agarosa al 0,8%. Después de la electroforesis el gel fue sumergido en 20 volúmenes de HCl 0,25M, con el fin de despurinar parcialmente el DNA. Luego, el DNA fue desnaturado lavando el gel en 20 volúmenes de NaCl 1,5M y NaOH 0,5M por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente el gel fue neutralizado con 20 volúmenes de Tris-HCl 1,0M y NaCl 1,5M. El DNA fue transferido durante toda la noche, a una membrana de nylon (PhotoGene™, BRL). El DNA fue unido a la membrana en un horno al vacío a 80°C por dos horas.

9.2.- Obtención de las sondas marcadas con ³²P

Para las reacciones de hibridación se utilizó el gen que codifica para la endoglucanasa I de *T. reesei* y el gen que codifica para la celobiohidrolasa I de *P. chrysosporium*. Ambos genes fueron facilitados marcados con ³²P, por el Dr Daniel Cullen del IMBT, Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin, EEUU.

Las soluciones de prehibridación e hibridación contenían 35% de formamida, SDS al 7%, Na_2HPO_4 0,25 M y EDTA 1 mM. La hibridación se hizo en condiciones poco estrictas, esto es, a 37°C. El lavado del filtro fue hecho a temperatura ambiente con una solución que contenía SDS al 2%, Na_2HPO_4 0,25 M y EDTA 1 mM. Posteriormente el filtro fue expuesto durante toda la noche, a -70° C, con un film Kodak XAR, utilizando pantalla intensificadora.

10.- Otras determinaciones

La concentración de amonio en los medio extracelulares de los soportes sólidos fue determinada por el método de Muftic (1964). Los azúcares reductores fueron determinados por el método de Somogy y Nelson (1944). Estas determinaciones se realizaron en triplicado.

RESULTADOS

1.- Producción de enzimas celulolíticas por *G. trabeum*

1.1.- Producción de endoglucanasas en medios de cultivo líquidos

1.1.1- Producción de biomasa en diferentes fuentes de carbono

El efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de biomasa del hongo *G. trabeum* se muestra en la tabla 1. Con glicerol, xilosa, celobiosa, maltosa, lactosa y CMC se obtuvieron bajos rendimientos de producción de biomasa. Rendimientos mayores se lograron con glucosa y manosa. Sin embargo, se obtuvo cuatro veces más biomasa cuando se utilizó galactomanano como fuente de carbono. Debido a esto, en los experimentos posteriores donde se empleó micelio precrecido se utilizó galactomanano como fuente de carbono para obtener la biomasa.

Por otra parte, galactosa y fructosa no fueron empleadas como fuentes de carbono por el microorganismo, debido a que no se obtuvo crecimiento cuando se utilizaron estos compuestos.

Tabla 1: Crecimiento del hongo *G. trabeum* en diferentes fuentes de carbono

Fuente de carbono	Biomasa Peso seco del micelio (mg)
Glicerol	13,0
Fructosa	4,3
Galactosa	4,7
Xilosa	18,9
Glucosa	42,4
Manosa	45,6
Celobiosa	18,8
Maltosa	25,8
Lactosa	22,7
Carboximetilcelulosa	24,3
Galactomanano	164,6

^aLa concentración a la cual las fuentes de carbono fueron agregadas fue de 55 mM, excepto en el caso de carboximetilcelulosa y galactomanano, las cuales estaban en una concentración inicial de 1% (p/v). En todos los casos el micelio fue colectado a los siete días de cultivo.

1.1.2.- Producción de endoglucanasas sobre diferentes fuentes de carbono

Para estudiar el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de endoglucanasas por el hongo *G. trabeum*, se utilizó micelio precrecido, el que fue transferido a medios que contenían diferentes fuentes de carbono. A estos medios no se les agregó fuente de nitrógeno, para evitar un crecimiento adicional y de esta manera tener la misma biomasa en todos los ensayos.

Las endoglucanasas fueron producidas en todas las fuentes de carbono analizadas (Figura 10). Sin embargo, fue posible observar tres niveles de producción enzimática. El nivel mayor se obtuvo cuando se utilizó celobiosa, CMC o avicel (entre 20 y 48 U/ml). Con glucosa, manosa o lactosa se logró un nivel intermedio (alrededor de 7 U/ml). Finalmente, el nivel más bajo de rendimiento en la producción de endoglucanasas se obtuvo cuando se utilizó fructosa, galactosa, xilosa o glicerol (1 U/ml).

Es importante destacar, que a pesar que la mayor actividad se obtuvo con el disacárido celobiosa (48,1 U/ml), con glucosa, manosa o lactosa también el hongo produjo endoglucanasas, siendo la actividad de éstas alrededor de cinco a seis veces menor que la obtenida sobre celobiosa. Estos resultados sugieren que la producción de endoglucanasas por el hongo de pudrición parda *G. trabeum* no sería constitutiva, sino que inducible y que no se produciría el efecto de represión catabólica.

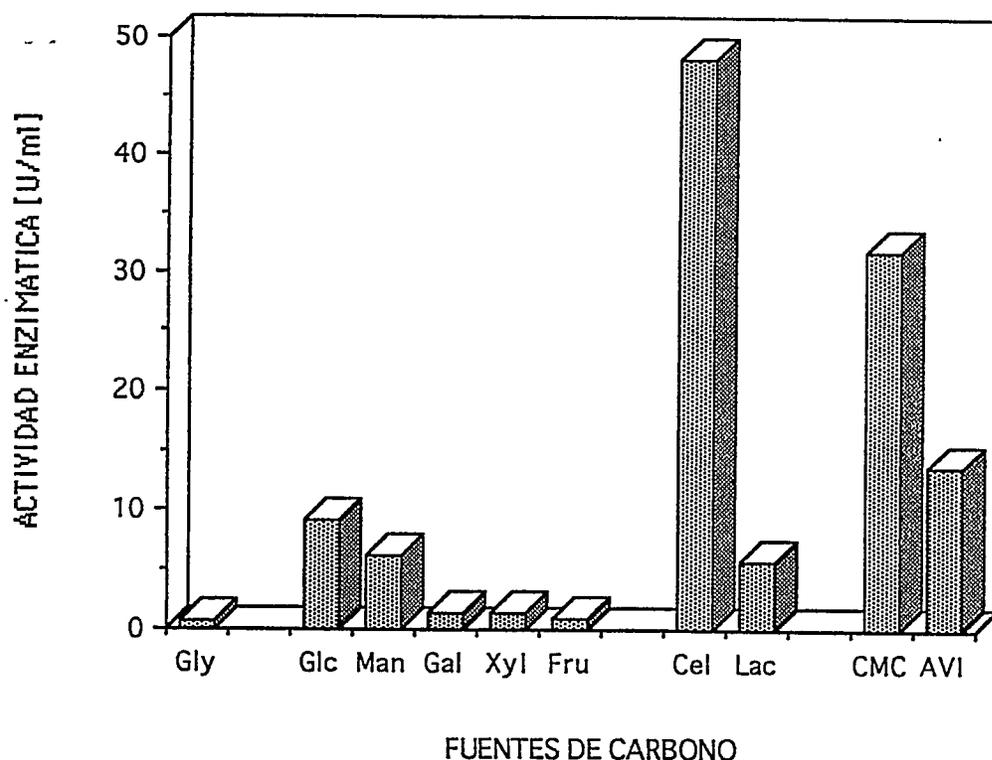


Figura 10: Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de endoglucanasas por *G. trabeum*.

Micelio precrecido (25 ml de biomasa correspondiente a 170 mg en peso seco) fue transferido a medios de cultivo sin nitrógeno y con diferentes fuentes de carbono. Las fuentes de carbono usadas fueron: glicerol (Gly), glucosa (Glu), manosa (Man), fructosa (Fru), galactosa (Gal), xilosa (Xyl), celobiosa (Cel), lactosa (Lac), carboximetilcelulosa (CMC) y avicel (AVI). Estas fueron agregadas en una concentración inicial de 55 mM, exceptuando las celulosas, CMC y avicel las cuales fueron agregadas al 1% (p/v). La actividad endoglucanasa fue medida a las 18 horas de incubación, ya que a este tiempo se alcanzó el máximo de producción enzimática

Las endoglucanasas producidas en las distintas fuentes de carbono fueron analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturantes (Figura 11). Alicuotas de los medios de cultivo (10 μ l) del hongo crecido en CMC, glucosa, fructosa, lactosa, celobiosa y Avicel por 18 h fueron cargados en estos geles, luego se revelaron por tinción específica para endoglucanasas. Se observa que en todas estas fuentes de carbono se produjeron al menos cinco enzimas con actividad endoglucanasa. La migración de estas proteínas fue mucho más rápida que la de las endoglucanasas del hongo *P. chrysosporium* (Figura 11, carril 7).

1.2.- Producción de endoglucanasas en cultivo sobre soportes sólidos

1.2.1.- Producción de biomasa en distintas fuentes de carbono

El objetivo de esta parte del trabajo fue estudiar si la expresión de endoglucanasas sobre soportes sólidos se asemeja a la observada en cultivos líquidos y por otra parte determinar si bajo estas condiciones de cultivo el hongo expresa celobiohidrolasas; ya que se ha descrito que la degradación de celulosa cristalina ocurre exclusivamente en cultivos sobre soportes sólidos (Espejo y Agosin, 1991). Para ello, se diseñó un medio de cultivo que permitió el crecimiento del hongo sobre soportes inertes. La ventaja del uso de este tipo de soportes es que en éstos se puede utilizar un medio de cultivo conocido similar al utilizado en cultivos líquidos, lo que permite comparar los resultados obtenidos en fermentación sobre soporte sólido con los obtenidos en medios líquidos.

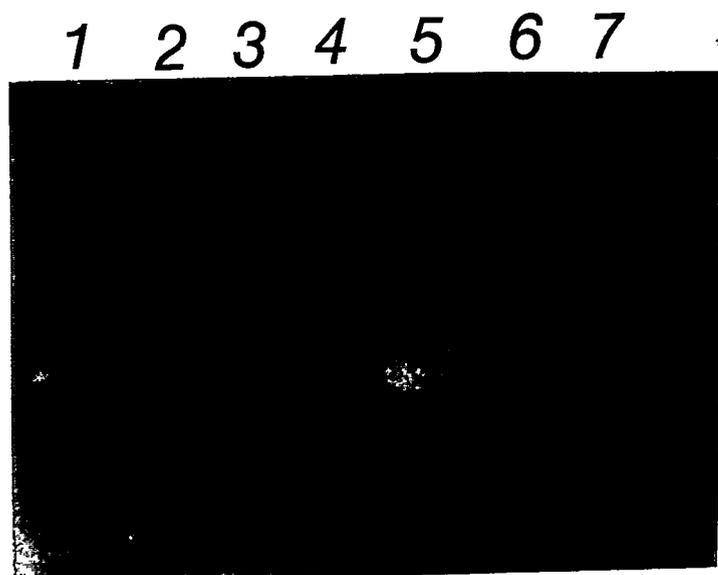


Figura 11: Endoglucanasas producidas por *G. trabeum* utilizando medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono.

Alicuotas de los medios de cultivo (10 μ l) fueron aplicados en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalantes. Carriles 1-6 corresponden al hongo *G. trabeum* incubado por 18 h en un medio de cultivo con CMC (1), glucosa (2), fructosa (3), lactosa (4), celobiosa (5) y avicel (6). El carril 7 corresponde a una alicuota de un medio de cultivo del hongo *P. chrysosporium* crecido en avicel como fuente de carbono.

En la figura 12 se muestra el crecimiento sobre soportes inertes, usando como fuentes de carbono celobiosa o glucosa y se compara con el crecimiento sobre un soporte orgánico, holocelulosa de pino. Bajo las condiciones de cultivo empleadas se observó que el hongo fue capaz de crecer sobre el soporte inerte vermiculita, utilizando ambas fuentes de carbono. La velocidad de producción de CO_2 durante los primeros días de crecimiento fue muy similar a la obtenida sobre holocelulosa, pero se observa que en presencia de glucosa como fuente de carbono el crecimiento fue un poco mayor que el obtenido sobre celobiosa. Al sexto día de cultivo comenzó la fase estacionaria de crecimiento en cultivos sobre glucosa. En cambio, sobre celobiosa la fase de crecimiento estacionaria se alcanzó al octavo día de cultivo. En ambos casos, esto se correlacionó con el agotamiento de las fuentes de carbono (Figura 13 a y b). No ocurrió lo mismo sobre holocelulosa, porque la fuente de carbono estaba en exceso, ya que en este caso el soporte es al mismo tiempo la fuente de carbono. Pero se observa que después de 10 días de crecimiento hay un cambio leve en la pendiente de la producción de CO_2 , lo que está correlacionado con el agotamiento de la fuente de nitrógeno (Figura 15)

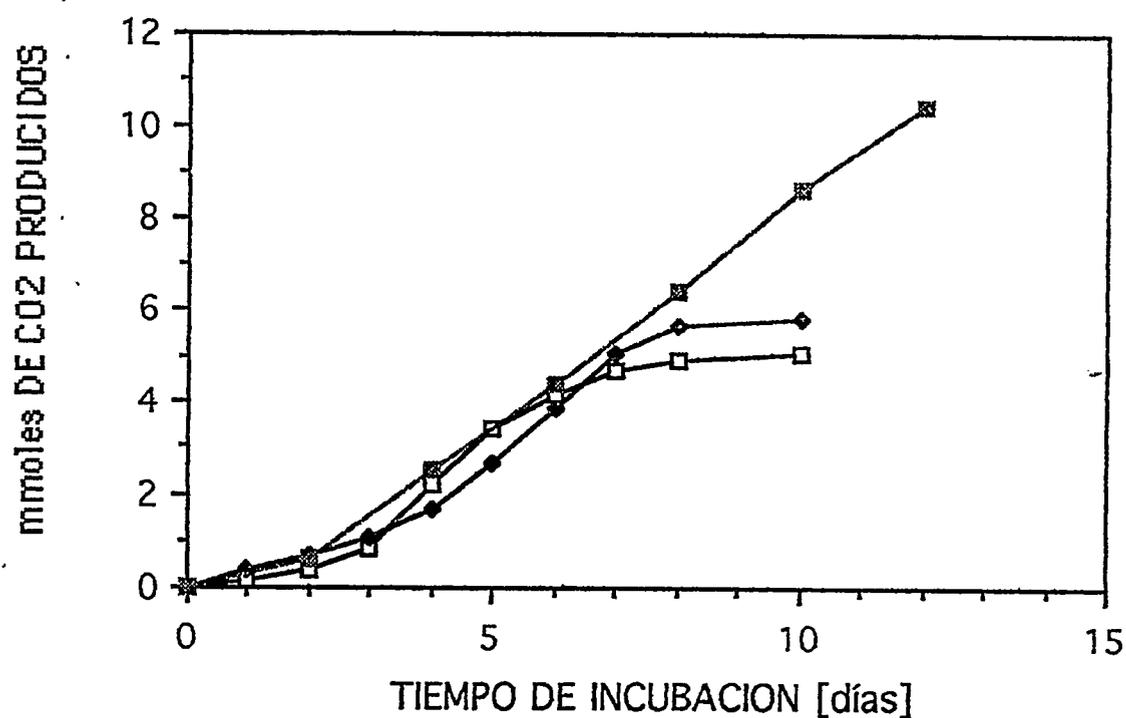


Figura 12: Cinética de crecimiento de *G. trabeum* sobre soportes sólidos. Como índice de crecimiento se usó la producción de CO₂.

Como soporte sólidos se usó vermiculita, la que fue suplementada con medios de cultivo que contenían glucosa (□) o celobiosa (◆) como fuente de carbono. Como referencia se determinó la cinética de crecimiento sobre el soporte orgánico holocelulosa (■).

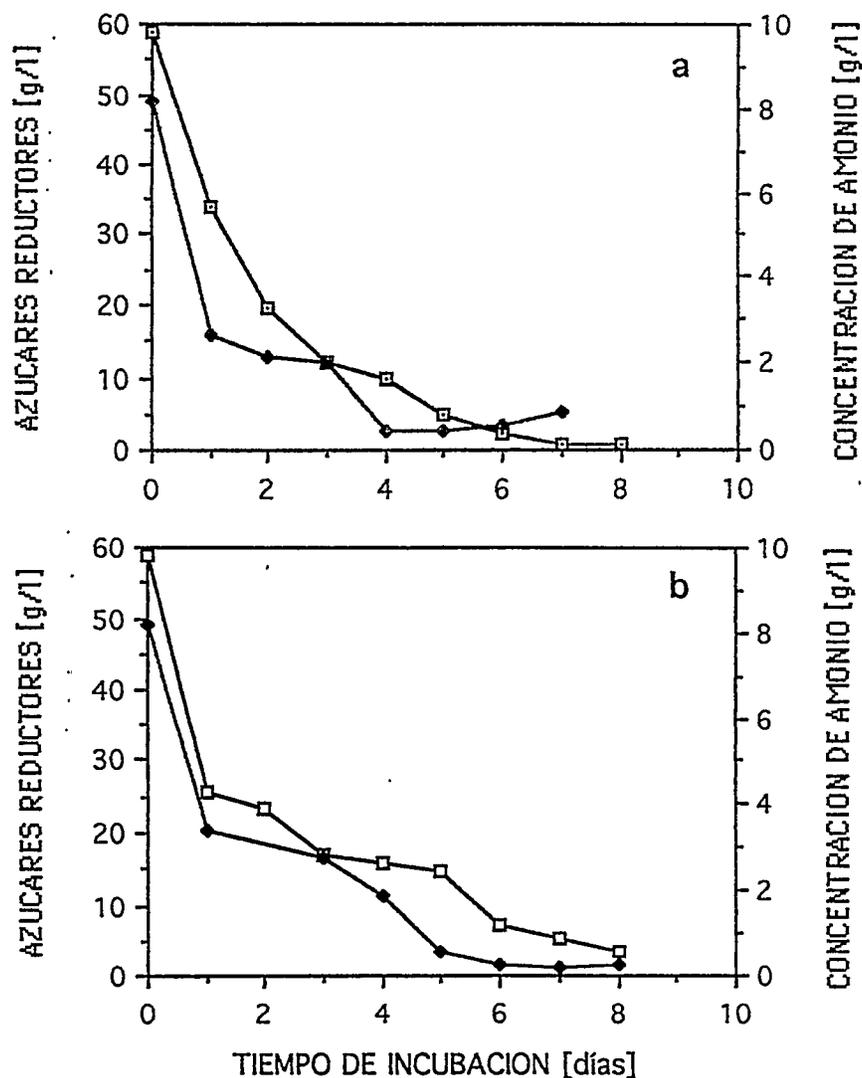


Figura 13: Cinética de consumo de las fuentes de carbono y nitrógeno por *G. trabeum* crecido sobre soporte inerte, utilizando como fuente de carbono glucosa (a) o celobiosa (b). La concentración de azúcares reductores (□) y amonio (◆) fue medida en los extractos obtenidos por prensado de la vermiculita.

1.2.2.- Producción de endoglucanasas

En la figura 14 se muestra la cinética de producción de endoglucanasas en fermentación sobre el soporte inerte vermiculita, utilizando glucosa o celobiosa como fuentes de carbono. En ambas fuentes de carbono se observó un pico de producción enzimática, el cual tenía un máximo de actividad al tercer y quinto día cuando se utilizó glucosa o celobiosa, respectivamente. La producción enzimática fue mayor (53 U/ml) cuando se utilizó celobiosa como fuente de carbono, pero al igual que lo observado para cultivos líquidos *G. trabeum* expresó endoglucanasas en presencia de glucosa.

La disminución de la actividad enzimática después del tercer y quinto día, cuando se utilizó glucosa o celobiosa se correlaciona con el agotamiento de las fuentes de nitrógeno y carbono en el medio de cultivo.

La producción de endoglucanasas en el soporte orgánico holocelulosa alcanzó un máximo al octavo, manteniéndose la actividad en el tiempo (Figura 15), en este caso no se observó un pico de producción de endoglucanasas como el producido sobre el soporte inerte, a pesar que al octavo día de cultivo se consumió totalmente la fuente de nitrógeno.

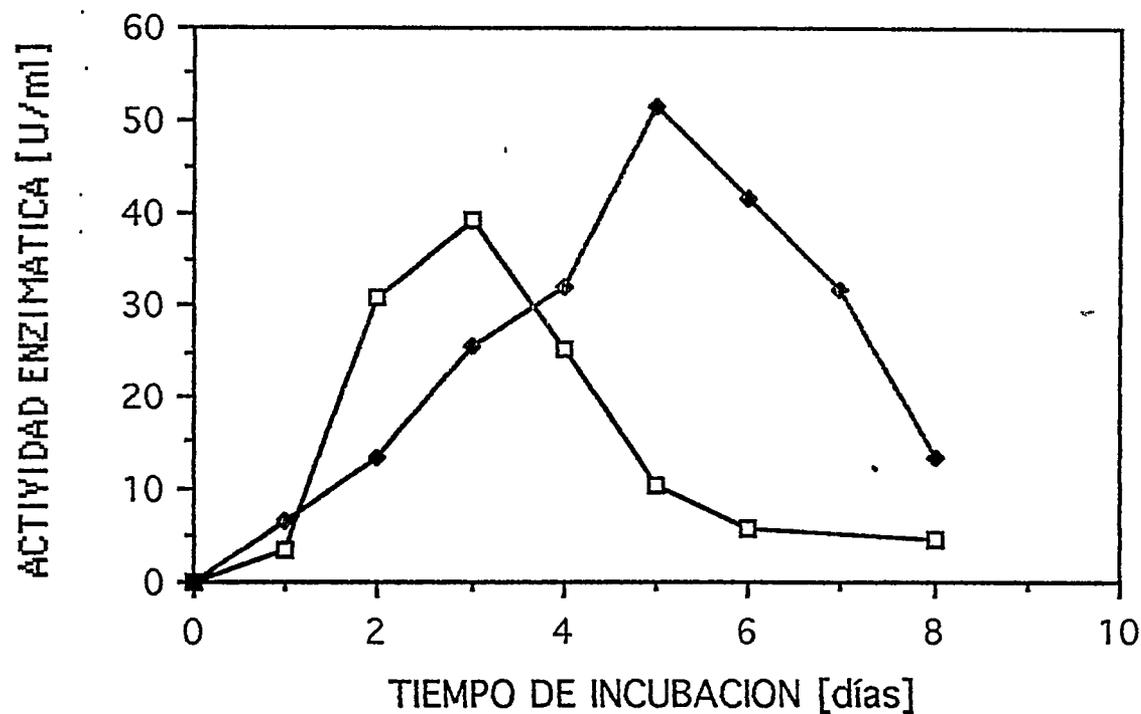


Figura 14: Cinética de producción de endoglucanasas por *G. trabeum* en fermentación sobre soporte sólido, utilizando como fuente de carbono glucosa (□) o celobiosa (◆). La actividad enzimática se midió en los extractos obtenidos por prensado de la vermiculita.

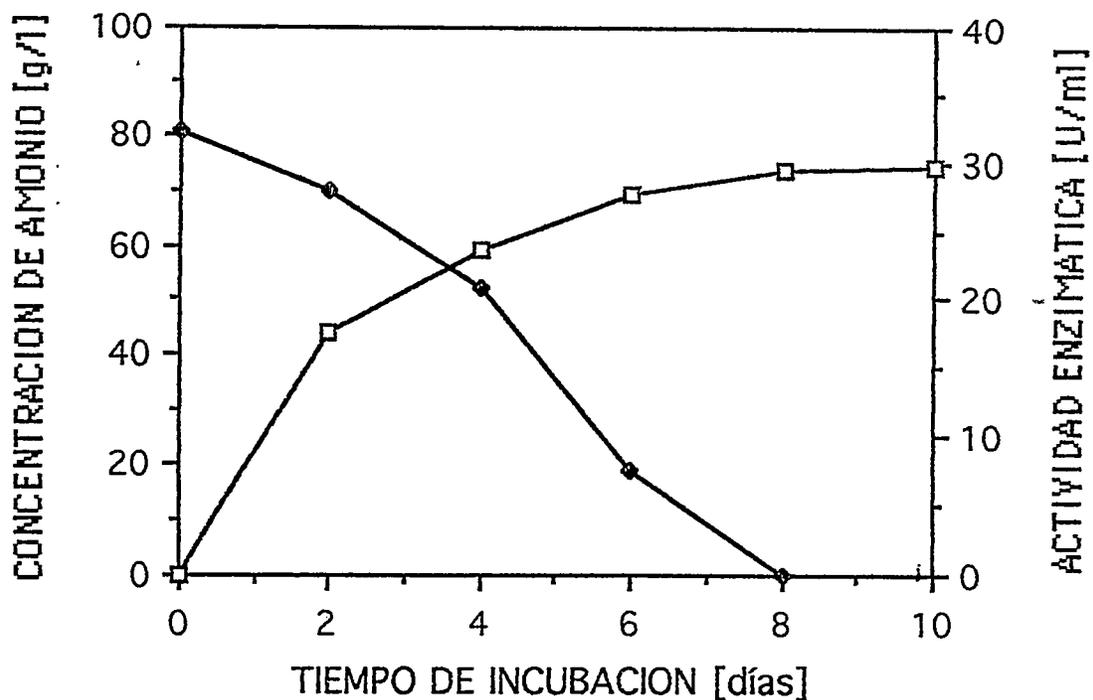


Figura 15: Cinética de producción de endoglucanasas por *G. trabeum* crecido sobre holocelulosa como soporte sólido. La actividad endoglucanasa (\square) y la concentración de amonio (\blacklozenge) fueron medidas en los extractos extracelulares obtenidos por prensado de la holocelulosa.

1.3.- Producción de celobiohidrolasas en cultivos líquidos y en fermentación sobre soportes sólidos.

La producción de celobiohidrolasas se buscó en forma indirecta utilizando una celulosa cristalina como sustrato. Bajo estas condiciones de ensayo no se detectó la presencia de celobiohidrolasas ni en medios líquidos ni sobre soportes sólidos; tampoco se pudo determinar esta enzima en aquellos medios de cultivo que tenían distintas celulosas (CMC, avicel y holocelulosa) como fuente de carbono.

2.- Caracterización de las endoglucanasas

Debido a que solamente se detectó la presencia de endoglucanasas, tanto en cultivos líquidos como sólidos, se caracterizaron parcialmente estas enzimas con el objeto de determinar si presentaban características semejantes a otras endoglucanasas de otros sistemas fúngicos anteriormente descritas.

2.1- Determinación de la secuencia aminoterminal de las endoglucanasas de *G. trabeum*.

La secuencia aminoterminal de las endoglucanasas de *G. trabeum* fue determinada sin necesidad de purificar las proteínas a homogeneidad. Esta fue obtenida a partir del medio de cultivo de *G. trabeum* incubado con celobiosa. Este medio de cultivo fue posteriormente concentrado por ultrafiltración y sometido a una electroforesis en condiciones desnaturantes.

2.1.1- Identificación de las endoglucanasas.

Las bandas proteicas de una alicuota del medio de cultivo concentrado sometido a una electroforesis en condiciones desnaturantes y que corresponden a endoglucanasas, fueron identificadas utilizando diferentes estrategias.

La primera consistió en comparar el patrón electroforético de las proteínas presentes en medios de cultivo al incubar *G. trabeum* con celobiosa o galactosa por 12 h (Figura 16, carriles 4 y 5 respectivamente). Se utilizó estas fuentes de carbono debido a que en celobiosa se produce una cantidad importante de endoglucanasas, en cambio en galactosa la producción de esta enzima es muy baja (Figura 10). El medio de cultivo del hongo incubado con celobiosa presentó dos bandas proteicas importantes, indicadas como banda 1 y 2 en la figura, las cuales no estaban presentes en el medio de cultivo incubado con galactosa por 12 h. Posiblemente estas bandas corresponden a endoglucanasas, las que fueron llamadas EGI y EGII, correspondientes a las bandas 1 y 2 respectivamente.

Para confirmar esta hipótesis, medio de cultivo del hongo crecido en celobiosa fue concentrado y sometido a una electroforesis en condiciones no desnaturantes. Las endoglucanasas fueron visualizadas por una tinción específica con rojo Congo. Las proteínas que presentaban actividad endoglucanasa fueron cortadas y eluidas del gel. Luego, estas proteínas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes (Figura 16, carril 7). Se observa una banda proteica que corresponde a la endoglucanasa

denominada EG I. Utilizando este procedimiento no fue posible visualizar la endoglucanasa EG II.

Por otra parte, los carriles 1 y 2 de la figura 16 muestran endoglucanasas producidas por *G. trabeum* crecido en un medio de cultivo con celobiosa por 3 d. En estos carriles se puede apreciar la presencia de tres bandas proteicas predominantes, las denominadas 1 y 2, correspondientes a las endoglucanasas I y II, y una banda que tiene una masa molecular de alrededor de 28000 Dalton, esta última banda no se detecta en los medios de cultivo en los cuales el hongo fue incubado con celobiosa por menos tiempo (Carril 4, figura 16).

Una tercera aproximación para identificar las endoglucanasas presentes en un medio de cultivo de *G. trabeum* consistió en utilizar anticuerpos policlonales contra la endoglucanasa I de *P. chrysosporium*. Para ello, se utilizó la técnica de Western, donde se observó que este anticuerpo reaccionó principalmente con la proteína EG II (Figura 17). De esto podemos concluir que las bandas 1 y 2 corresponden a endoglucanasas del hongo *G. trabeum*.

2.1.2.- Secuencia aminoterminal de las endoglucanasas de *G. trabeum*

Para determinar la secuencia aminoterminal de las endoglucanasas, éstas fueron sometidas a una electroforesis en condiciones desnaturalantes. Luego las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVSF y las bandas correspondientes a las endoglucanasas fueron cortadas y secuenciadas. La secuencia

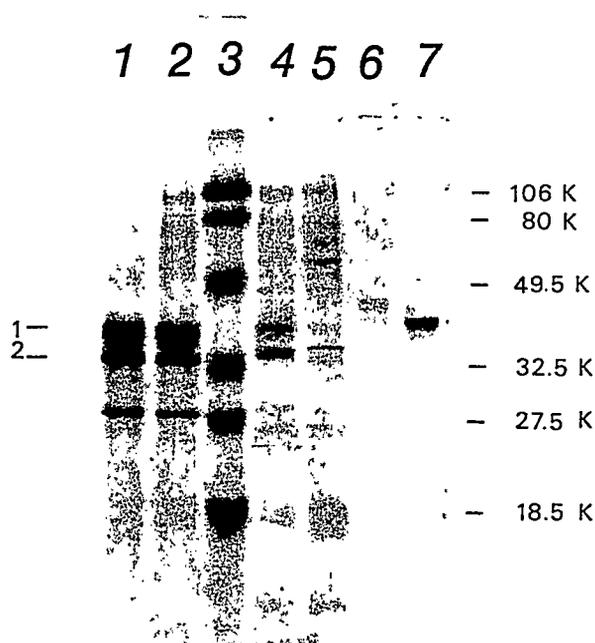


Figura 16: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes de proteínas presentes en los medios de cultivo del hongo *G. trabeum*.

Medios de cultivo concentrados por ultrafiltración (exclusión molecular 3000 Dalton) obtenidos al incubar micelio pre-crecido de *G. trabeum* con celobiosa (carril 4) o galactosa (carril 5) por 12 h. Endoglucanasa eluída de un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalantes (carril 7). El carril 3 muestra estándares de masa molecular, expresados en KDa, cuyas masas se indican en la figura. Los carriles 1 y 2 corresponden a medios de cultivo concentrados por ultrafiltración (3000 Dalton de exclusión molecular) de *G. trabeum* crecido con celobiosa como fuente de carbono por 3 d.

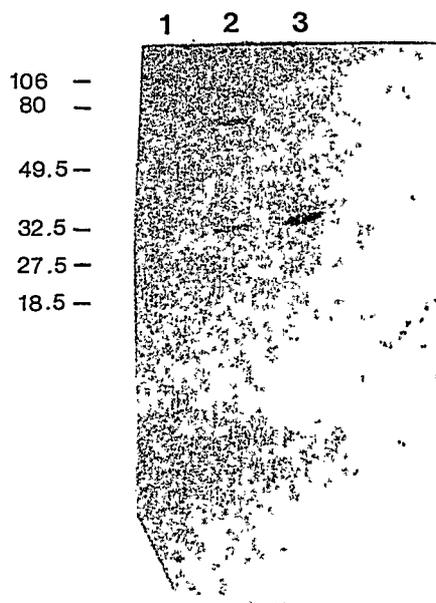


Figura 17: Análisis mediante la técnica de Western de las proteínas presentes en los medios de cultivo concentrados de *G. trabeum*.

El medio de cultivo de *G. trabeum* crecido en celobiosa como fuente de carbono fue concentrado y sometido a una electroforesis en condiciones denaturantes; luego se hizo reaccionar con anticuerpos policlonales contra la enzima endoglucanasa 1 de *P. chrysosporium*. Carril 1, estándares de masa molecular; carriles 2 y 3, alicuotas de medios de cultivo concentrados. En la figura están indicados las masas (en KDa) de los estándares.

aminoterminal de ambas proteínas se muestra en la figura 18, donde se observa que las dos son idénticas.

Al analizar esta secuencia en el banco de datos Genbank se pudo comprobar que la endoglucanasa presenta cierta homología con una porción de la endoglucanasa II de *T. reesei* (Figura 19). Una región de 10 aminoácidos consecutivos del aminoterminal de las endoglucanasas de *G. trabeum* es idéntica a una porción de la proteína EG II de *T. reesei*. Esta región se encuentra en el dominio catalítico de EG II de *T. reesei*, próxima al dominio de glicosilación y no corresponde a los dominios altamente conservados de las enzimas celulolíticas de *T. reesei*, los bloques A y B, es decir, dominio de unión a la celulosa y dominio de glicosilación, respectivamente (Figura 5) (Saloheimo y col., 1988).

2.2.- Determinación de la masa molecular y el punto isoelectrico.

Con el objeto de caracterizar las endoglucanasas se determinó su masa molecular. Esta fue obtenida a partir de geles de poliacrilamida, en los cuales se comparó la migración de las endoglucanasas con proteínas de masa molecular conocida. Las masas moleculares aproximadas de las endoglucanasas EGI y EGII fueron 36000 y 32000 Dalton, respectivamente.

Por otra parte, se determinó el punto isoelectrico. Para ello un medio de cultivo de *G. trabeum* con celobiosa, como fuente de carbono, fue concentrado y sometido a isoelectroenfoque. El gel fue dividido en dos partes iguales. Una mitad fue teñida con azul de

coomassie (Figura 20) y la otra por tinción específica para endoglucanasas. El punto isoeléctrico se determinó por comparación de la migración con estándares de punto isoeléctrico conocido. La proteína con un punto isoeléctrico bajo 3,6 presentaba actividad endoglucanasa; por lo tanto, es posible concluir que las endoglucanasas de *G. trabeum* tendrían un punto isoeléctrico menor que 3,6.

Para confirmar este resultado, el medio de cultivo de *G. trabeum* con celobiosa como fuente de carbono, obtenido como se indica en Materiales y Métodos, fue sometido a un cromatoforo entre pH 7,4 y 3,0 (Figura 21). Se observa un pico importante de proteína, medido por absorbancia a 280 nm, que eluyó alrededor de pH 3,5; este pico proteico presentó actividad endoglucanasa. Otro pico de proteína que también presentó actividad endoglucanásica eluyó con NaCl 1 M. Por lo tanto, con esta técnica pudimos separar dos formas de endoglucanasas, presentando la primera un punto isoeléctrico cercano a 3,5 lo que concuerda con los resultados obtenidos por la técnica de isoelectroenfoque.

2.3.- Homología con enzimas celulolíticas de hongos de pudrición blanca y blanda

El objetivo de este punto fue analizar si las endoglucanasas de *G. trabeum* presentaban homología en la secuencia nucleotídica con otras enzimas celulolíticas. Con este fin, se utilizó el gen que codifica para la endoglucanasa 1 (*egl1*) de *T. reesei* y el gen que codifica para la celobiohidrolasa 1 (*cbh1*) de *P. chrysosporium*. El empleo de

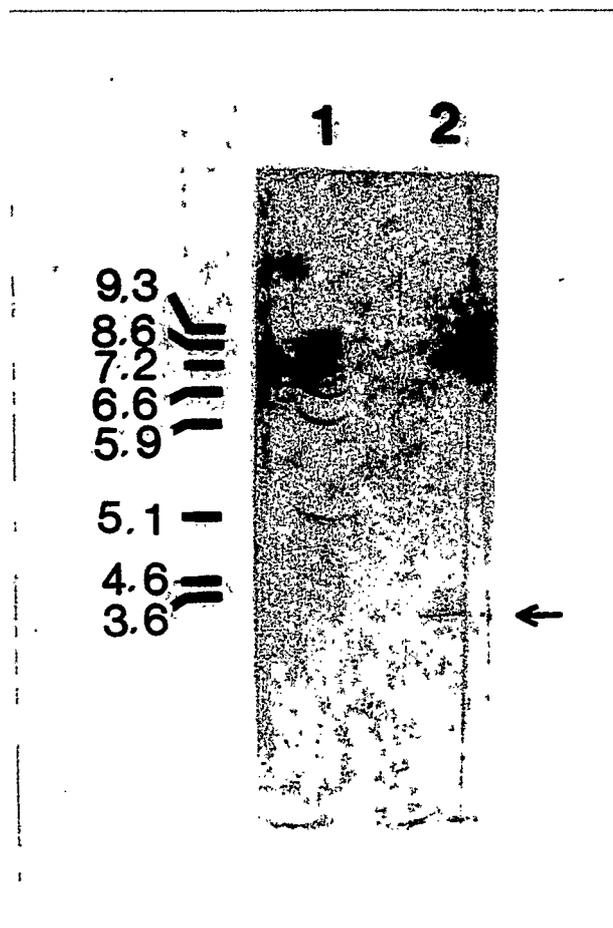


Figura 20: Isoelectroenfoque de las proteínas presentes en los medios de cultivo de *G. trabeum*.

Carril 1: muestra los estándares de pI, los cuales se indican en la figura. Carril 2: medio de cultivo con celobiosa concentrado por ultrafiltración. El gel fue teñido con azul de coomassie. La flecha indica la proteína que presentaba actividad endoglucanásica

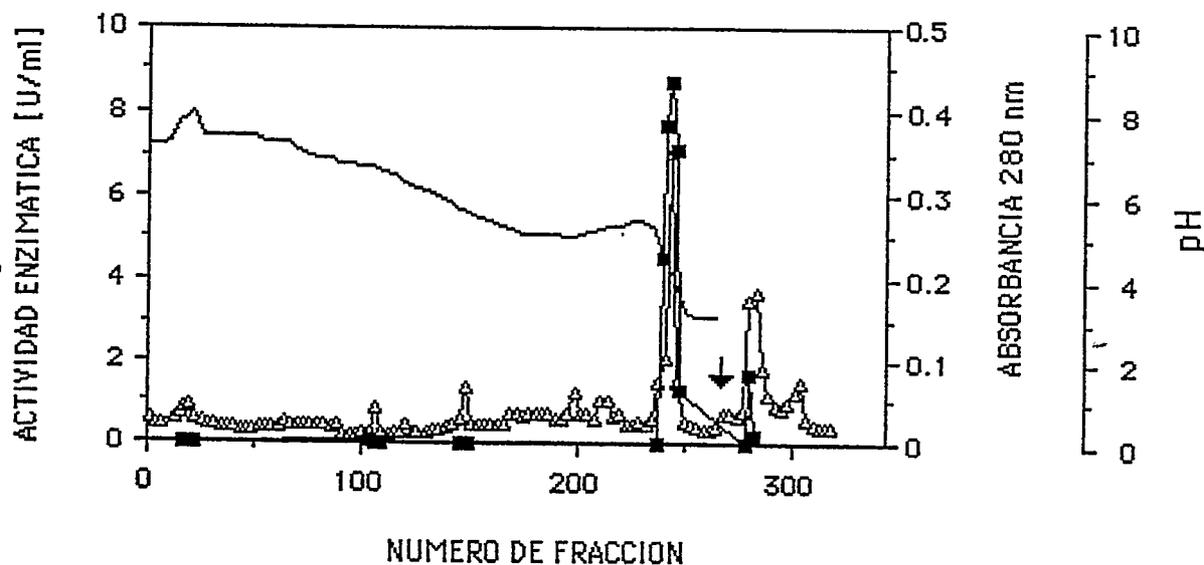


Figura 21: Separación por cromatoenfoco de las proteínas presentes en el medio de cultivo de *G. trabeum* con celobiosa como fuente de carbono.

Las proteínas fueron eluidas con un gradiente de pH entre 7,4 y 3,0 (-). La actividad endoglucanásica (■) fue medida en las fracciones de la columna por el método de liberación de azúcares reductores. (△) absorbancia a 280 nm. La flecha indica el momento en que se comenzó a lavar con NaCl 1M.

este último gen tenía dos objetivos; el primero era analizar si existía en *G. trabeum* algún gen que tuviera homología con las celobiohidrolasas, ya que se ha descrito que este hongo no expresaría esta enzima. Con este fin, se utilizó este gen sin la región que codifica para el dominio de unión a la celulosa, debido a que esta región presenta gran homología entre las diferentes enzimas del sistema celulolítico de distintos hongos. El segundo objetivo era analizar si presentaba homología con el gen de la endoglucanasa de *G. trabeum*. Para ello se utilizó el gen completo, incluyendo la región que codifica para el dominio de unión a la celulosa.

Para hacer estos estudios se obtuvo DNA genómico de *G. trabeum* el que fue digerido con distintas enzimas de restricción (XhoI, EcoRI, HindIII y BamHI). Los fragmentos de restricción fueron separados en un gel de agarosa al 1,0 % y traspasados a un filtro de nylon. Luego se hibridó en condiciones poco estrictas con los genes *egl1* de *T. reesei* (Figura 22 A) y *cbh1* de *P. chrysosporium* con y sin el dominio de unión a la celulosa (Figura 22 B y C respectivamente).

Se observó que no hay bandas de homología importantes entre los genes *egl1* de *T. reesei* y *cbh1* de *P. chrysosporium* con y sin el dominio de unión a la celulosa y el DNA genómico de *G. trabeum*. Ya que la hibridación se realizó en condiciones poco estrictas, se puede concluir que no existiría homología, a nivel de la secuencia nucleotídica, entre las endoglucanasas de *G. trabeum* y la endoglucanasa de *T. reesei* o celobiohidrolasa de *P. chrysosporium*.

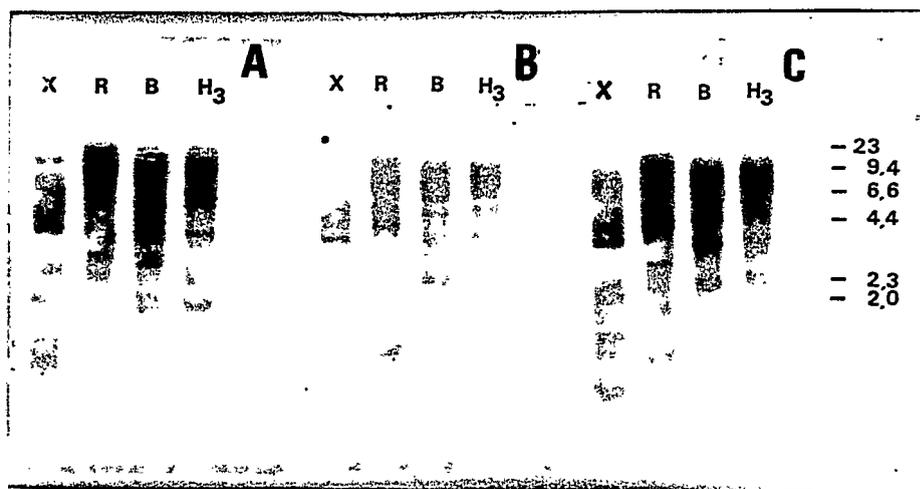


Figura 22: Análisis mediante la técnica de Southern del DNA genómico de *G. trabeum*.

El DNA genómico de *G. trabeum* fue digerido con Xho I (X), EcoRI (R), BamHI (B) y HindIII (H₃). Como sonda se usó el gen que codifica para la endoglucanasa 1 de *T. reesei* (A), el gen que codifica para la celobiohidrolasa 1 de *P. chrysosporium* con el dominio de unión a la celulosa (B) y el gen que codifica para la celobiohidrolasa 1 de *P. chrysosporium* sin el dominio de unión a la celulosa (C).

2.4- Identificación de mRNAs que codifican para las endoglucanasas de *G. trabeum*.

Con el objeto de determinar si existían dos poblaciones distintas de mRNAs que codificaran para las endoglucanasas que presentaban igual secuencia aminoterminal se usó la siguiente estrategia experimental: los mRNAs que codificaban para las endoglucanasas se amplificaron utilizando la técnica RACE (amplificación rápida de los terminales de cDNA), según se describe en Materiales y Métodos (Figura 8). En esta técnica se emplean tres partidores. El primero es el adaptador (dT). El otro partidór es el adaptador 5', que es homólogo a la porción 5' del adaptador (dT). Finalmente, el tercer partidor, partidior 3' amp, es específico para el gen que se quiere amplificar.

2.4.1.- Diseño del partidior, 3' amp, para la amplificación de los genes de las endoglucanasas.

El diseño de este partidior se hizo a partir de la secuencia aminoterminal de las endoglucanasas de *G. trabeum*. Debido a que no se conoce la preferencia codogénica de este hongo, el diseño de la sonda se basó en la preferencia codogénica para los genes de lignina peroxidasa de *P. chrysosporium* y del gen *egl 1* de *T. reesei* . (Holzbaaur y col., 1991 y Penttilä y col., 1986).

Se sintetizó el siguiente oligonucleótido degenerado formado por 20 nucleótidos:

5' AAG TTC GC(C/T) GG(T/C/A) GT(C/T) AAC AT-3'

Este oligonucleótido corresponde a la porción de la endoglucanasa de *G. trabeum* que es homóloga con la endoglucanasa II de *T. reesei*.

2.4.2.- Amplificación de los genes que codifican para las endoglucanasas de *G. trabeum*.

Para amplificar los genes que codifican para las endoglucanasas de *G. trabeum* se usó como material de partida mRNAs. Para ello, se purificó el RNA total a partir de micelio precrecido, el que fue transferido a un medio de cultivo con lactosa y se indujo la producción de endoglucanasas con celobiosa durante un periodo de 12 h. La obtención del RNA total se hizo como se describe en Materiales y Métodos. La concentración de RNA óptima para amplificar los mRNAs fue de 1 µg por reacción de amplificación, ya que con concentraciones mayores o menores de RNA se obtenían productos de muy baja masa molecular, menores de 500 pb (resultado no mostrado).

Los resultados de la amplificación, usando una concentración de RNA de 1 μg , se muestran en la figura 23, carriles 7 y 8. Se obtuvieron tres bandas, las que correspondían a 1000, 800 y 500 pb. Según el tamaño de las endoglucanasas se esperaba obtener un fragmento de aproximadamente 1000 pb.

A continuación las bandas correspondientes a 1000 y 800 pb fueron purificadas (Figura 23, carriles 5 y 6) y reamplificadas (Figura 23, carriles 2 y 3). Cuando se reamplificó la banda de 1000 pb se obtuvo una banda de 800 pb y principalmente una de 500 pb. No se observó una banda correspondiente a 1000 pb (Figura 23, carril 3). Cuando se reamplificó la banda de 800 pb se obtuvo la banda correspondiente a 800 pb y una de 500 pb (Figura 23, carril 2).

2.4.3.- Análisis de los transformantes

Los productos del RACE fueron clonados en el vector pCR II, en el cual es posible clonar directamente los productos de PCR. Este plasmidio contiene el gen de la β -galactosidasa, por lo tanto aquellas colonias que poseían sólo el vector eran de color azul, debido a que se había expresado el gen de la β -galactosidasa. En cambio, aquellas colonias que tenían el vector con un inserto eran de color blanco, ya que no se expresó el gen de la β -galactosidasa.

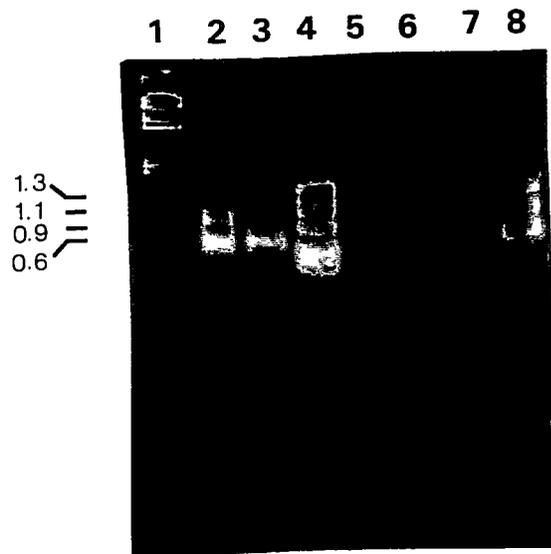


Figura 23: Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos del RACE.

Carriles 7 y 8, productos del RACE. Carriles 5 y 6, purificación de los productos del RACE, bandas de 800 y 1000 pb respectivamente. Carriles 2 y 3, reamplificación de las bandas purificadas de 800 y 1000 pb, respectivamente. Carriles 1 y 4, estándares de masa molecular. Los tamaños de los fragmentos están indicados en pares de bases en la figura.

Fueron replicadas 50 colonias blancas y se purificó el DNA plasmidial. A este DNA se le analizó, en primer lugar, la presencia de un inserto del tamaño esperado; posteriormente, se estudió si los insertos podían ser reamplificados utilizando los mismos partidores que para el RACE.

La figura 24 muestra los plasmidios purificados y digeridos con las enzimas de restricción Eco RI y Hind III, obtenidos de algunas de las colonias transformantes. El plasmidio pCR II tiene dos sitios de restricción para la enzima Eco RI, cercanos al sitio de clonamiento, lo que permite liberar el inserto completo al digerir con esta enzima de restricción. En cambio, este plasmidio tiene un único sitio de corte para la enzima Hind III, por lo tanto con esta enzima sólo se linealiza el plasmidio.

Al analizar la figura 24 se puede observar que se obtuvieron tres tipos de transformantes; aquellas que tenían inserto un fragmento de 1000 pb (Carriles 4 y 5), otras con un fragmento de 800 pb (Carriles 1 y 2) y finalmente las que tenían un inserto de 500 pb (Carriles 7 y 8).

Posteriormente, los insertos de 1000 y 800 pb fueron purificados y reamplificados por PCR, utilizando condiciones de amplificación similares a las descritas para las amplificaciones anteriores. Los resultados de la amplificación se muestran en la figura 25. Los carriles 3 y 4 muestran la amplificación del fragmento

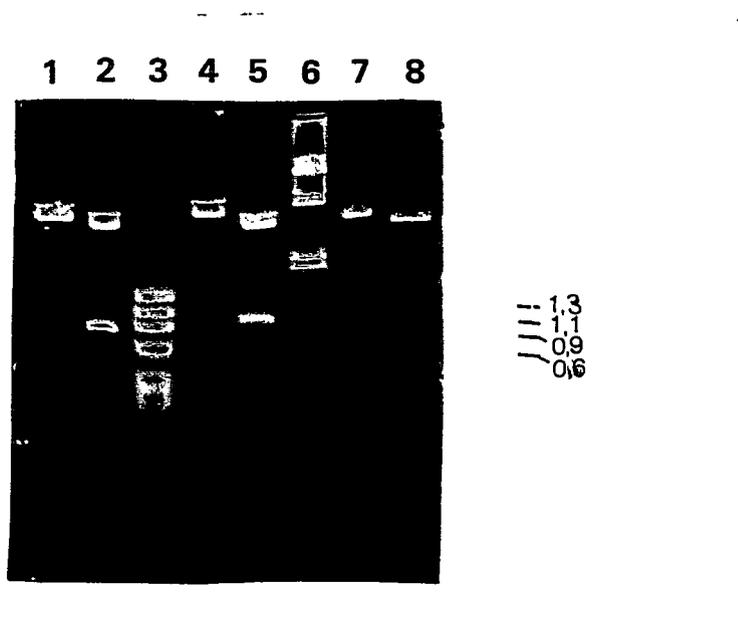


Figura 24: Análisis por electroforesis en geles de agarosa de los plasmidios de algunas células transformantes.

Los plasmidios fueron digeridos con las enzimas de restricción Hind III (carriles 1, 4 y 7) y Eco RI (carriles 2, 3 y 8). DNA plasmidial correspondiente a los clones 1.14 (carriles 1 y 2). 2.33 (carriles 4 y 5) y 3.31 (carriles 7 y 8) Carriles 3 y 6 corresponden a estándares de masa molecular. Los tamaños de los insertos están indicados en pares de bases en la figura.

de 1000 pb y los carriles 5 y 6 muestran la amplificación del fragmento de 800 pb. Cuando se reamplificó el fragmento de 800 pb se obtuvo un producto único de 800 pb. En cambio, cuando se reamplificó el fragmento de 1000 pb se obtuvo mayormente un producto de 500 pb y en mucho menor proporción uno de 1000 pb.

Para demostrar si estos productos de PCR clonados correspondían a mRNAs que codificaban para las endoglucanasas los insertos de mayor masa molecular (1000 y 800 pb) fueron secuenciados. La secuencia fue realizada gentilmente por el Sr Eduardo Rojas de Regeneron Pharmaceutical en E.E.U.U y por el Dr Dan Cullen del IMBT, Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin, E.E.U.U. El inserto de 800 pb correspondió al gen de la glutamina sintetasa, ya que por análisis de la secuencia en Genbank se encontró que presentaba homología con este gen. En cambio, el inserto de 1000 pb no presenta homología con ninguno de los genes depositados en este banco de datos.

En la figura 26 se muestra la homología que presenta la glutamina sintetasa de levadura con la de *G. trabeum*. Los aminoácidos subrayados son aquellos altamente conservados en todas las glutamina sintetasa de diferentes organismos tanto eucariontes como procariontes.

De esto podemos concluir que ninguno de los clones correspondía a los genes que codificaban para las endoglucanasas de *G. trabeum*. Por lo tanto, los mRNAs amplificados no codificaban para endoglucanasas.

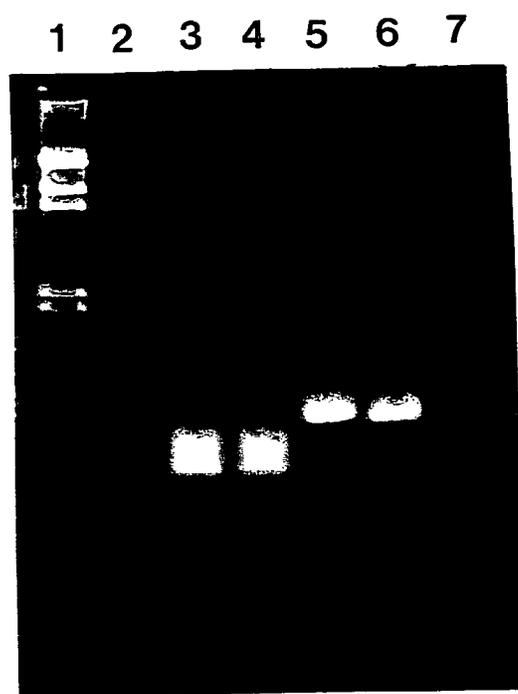


Figura 25: Amplificación de los productos del RACE clonados.

Se hizo una reamplificación de los insertos de los clones de 1000 pb (carriles 3 y 4) y de 800 pb (carriles 5 y 6). Los carriles 2 y 7 corresponden a los controles de la reacción de amplificación sin DNA polimerasa y sin DNA, respectivamente. Carril 1, estándar de masa molecular DNA del fago λ digerido con Hind III.

LHRVAEEFGIK ISFHPKPLKGDWNGAGCHTNVSTKEMRQP

LVRIAEQWGIKVSFHPKPLQGDWNGAGAHT - - - - -

GGMKYIEQAIEKLSKRHAEHIKLYGSDN

GGMKHIEAAIEHLSKRHDEHIA?YGEDN

Figura 26: Comparación de la secuencia primaria de parte de la glutamina sintetasa de levadura (arriba) con la de *G. trabeum* (abajo). Los aminoácidos subrayados son aquellos altamente conservados en las glutamina sintetasas de todas las especies secuenciadas tanto eucariontes como procariontes.

3. - Regulación de la producción de endoglucanasas por *G. trabeum*

3.1.- Inducción de la producción de endoglucanasas

Debido a que la producción de endoglucanasas es mayor cuando se usa celobiosa como fuente de carbono se estudió el efecto de este disacárido sobre la expresión de estas enzimas por *G. trabeum*. Para ello, micelio precrecido fue transferido a medios que contenían CMC o lactosa. Cuando la celobiosa se agregó a medios que contenían CMC, como fuente de carbono, no se observó una mayor producción de endoglucanasas (Figura 27A). Sin embargo, cuando la celobiosa fue agregada a medios que contenían lactosa se produjo una importante inducción de la expresión de estas enzimas (Figura 27B). El efecto de inducción es apreciable una hora después de agregar la celobiosa a los cultivos. Al agregar glucosa a los cultivos en vez de celobiosa, no ocurrió inducción (Figura 27B).

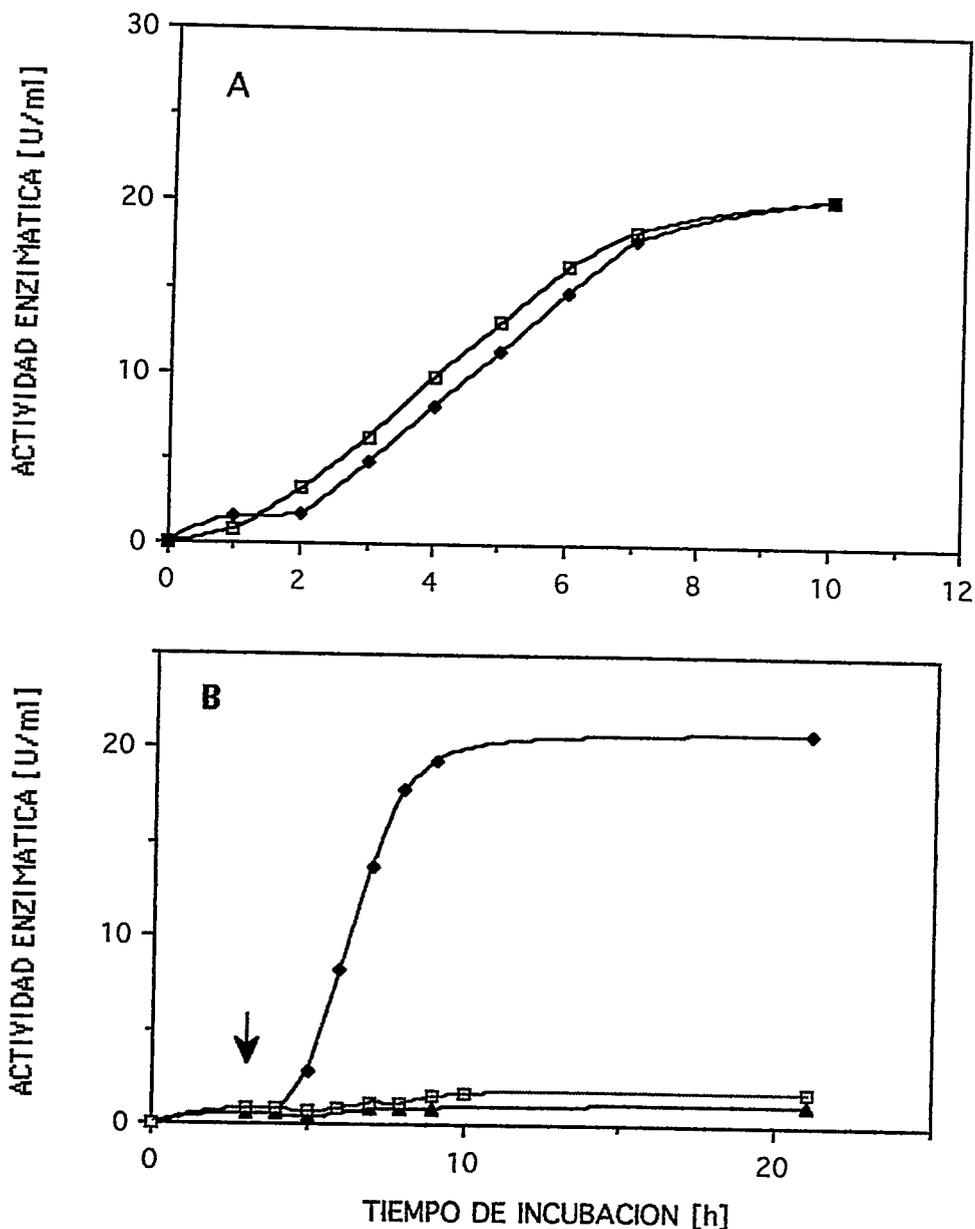


Figura 27: Efecto de la celobiosa sobre la producción de endoglucanasas por *G. trabeum*.

(A) Micelio precrecido fue transferido a medios de cultivo que contenían CMC al 1% (p/v) (□) o CMC al 1% (p/v) más celobiosa 5,5 mM (◆).

(B) Micelio precrecido fue transferido a medios de cultivo que contenían lactosa al 1% (p/v) (□) o lactosa al 1% más celobiosa 5,5 mM (◆) o lactosa al 1% más glucosa 5,5 mM (▲); la celobiosa se agregó al tiempo de incubación indicado por la flecha.

3.2.- Estudios de represión catabólica en la producción de endoglucanasas.

Los niveles de expresión de endoglucanasas en medios que contenían glucosa o glicerol son menores a los producidos sobre celulosa (Figura 10). Debido a esto, se estudió si estos compuestos eran capaces de reprimir la producción de estas enzimas cuando el hongo *G. trabeum* era incubado en un medio que contenía CMC (Figura 28A). Para esto, el micelio precrecido fue transferido a un medio con CMC, como fuente de carbono, el cual fue suplementado con glucosa o glicerol. Ambos, glucosa y glicerol, retardaron la producción de endoglucanasas; este efecto fue mayor en el caso de la glucosa. Sin embargo, al cabo de 10 horas de incubación, se alcanzó el mismo nivel de producción de estas enzimas.

Como control se realizó los mismos experimentos con el hongo de pudrición blanca *P. chrysosporium* (Figura 28B). En este hongo se observó claramente un efecto de represión catabólica por glucosa, ya que este compuesto reprimió completamente la producción de endoglucanasas. Por el contrario, el glicerol no reprimió la expresión de estas enzimas.

Por otra parte, se verificó que la glucosa y el glicerol no inhibían a las endoglucanasas a las concentraciones empleadas para estos ensayos. Para ello, se midió la actividad endoglucanásica en una alícuota de un medio de cultivo que contenía endoglucanasas. Por otra parte, la reacción enzimática también fue hecha en presencia de glucosa o glicerol en una concentración final de 5,5 mM (Tabla 2).

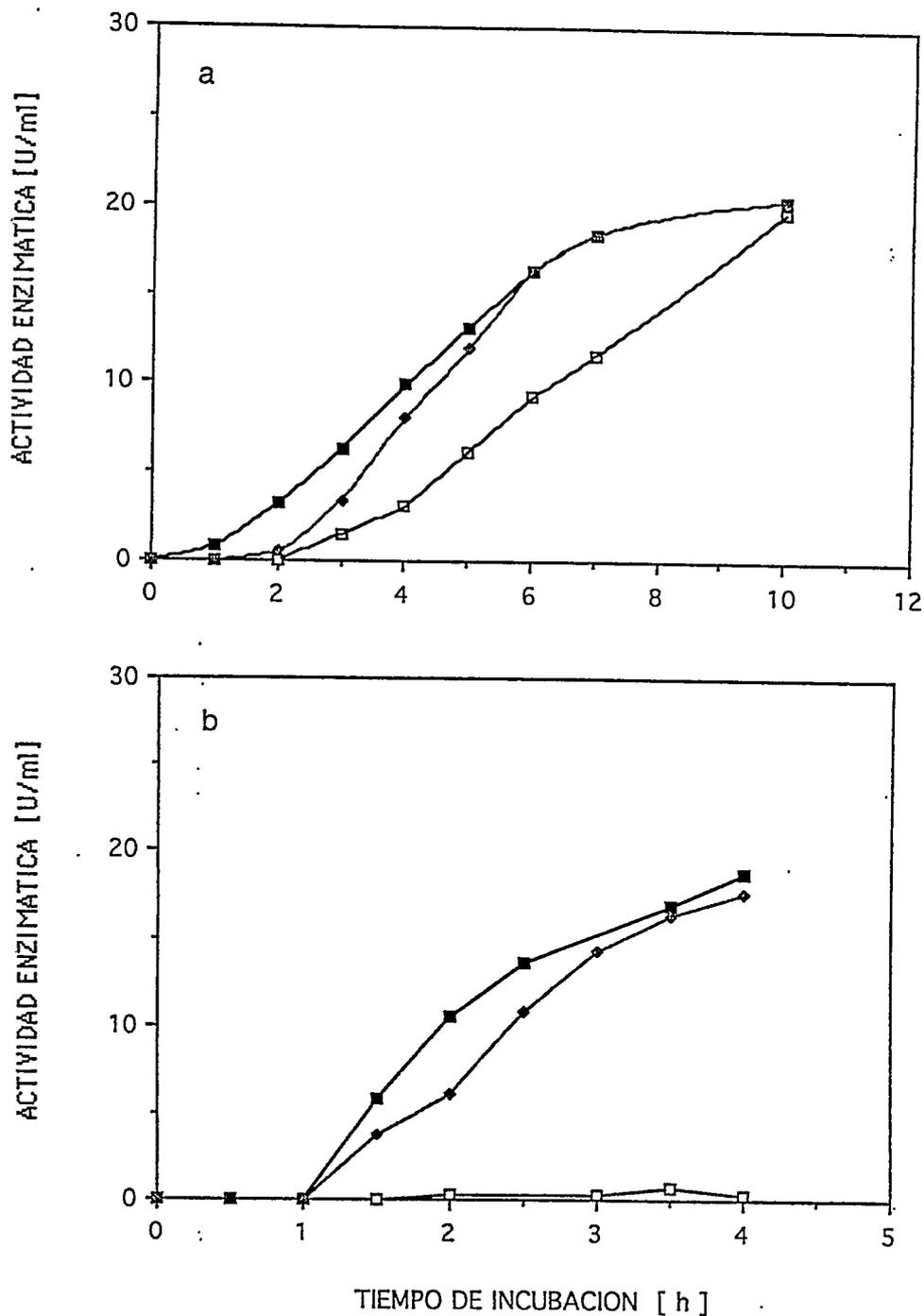


Figura 28: Producción de endoglucanasas por *G. trabeum* (a) y *P. chrysosporium* (b) en medios de cultivo que contenían CMC al 1% (p/v) (■), CMC al 1% (p/v) más glucosa 5,5 mM (□) o CMC al 1% (p/v) más glicerol 5,5 mM (◆).

Tabla 2: Efecto de la glucosa y el glicerol sobre la actividad enzimática de las endoglucanasas de *G. trabeum*

Condición	Actividad enzimática [U/ml]
Enzima control ^a	13,8 ± 0,1 "
Enzima más glucosa 5,5 mM	13,6 ± 0,3
Enzima más glicerol 5,5 mM	13,6 ± 0,2

^aLa enzima control empleada se obtuvo después de incubar el hongo *G. trabeum* por 18 h en un medio de cultivo que contenía carboximetilcelulosa (CMC). Para estudiar el efecto de la glucosa o glicerol, éstos fueron incluidos en el medio de reacción de la endoglucanasa en una concentración de 5,5 mM y la actividad enzimática se midió en triplicado por viscosimetría.

Para confirmar que en *G. trabeum* la producción de endoglucanasas no estaba sujeta a represión catabólica, se agregó diferentes concentraciones de glucosa, desde 5 a 40 mM, a cultivos inducidos con celobiosa que contenían lactosa como fuente de carbono (Figura 29). La adición de glucosa a estos cultivos no disminuyó la expresión de endoglucanasas.

Finalmente, se estudió si la expresión de endoglucanasas era inducible en medios de cultivo que contenían glucosa. Para ello, micelio precrecido fue transferido a medios con glucosa, y al cabo de tres horas se agregó celobiosa, como inductor (Figura 30). La celobiosa fue capaz de inducir la expresión de endoglucanasas, aún en aquellos medios que contenían glucosa como fuente de carbono. Por lo tanto la glucosa no suprimió el efecto estimulador de la celobiosa. Sin embargo, la inducción fue más lenta que la observada en un medio que contenía lactosa como fuente de carbono, ya que la pendiente de la curva de inducción en el medio con lactosa es mayor que la obtenida para un medio con glucosa.

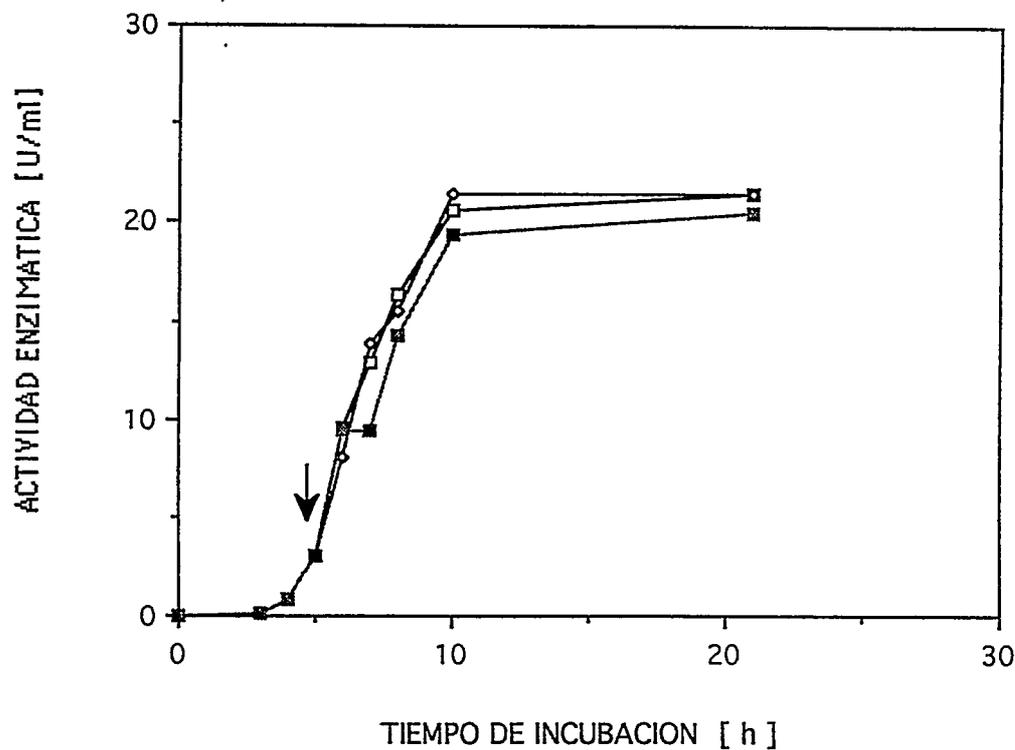


Figura 29: Efecto de la glucosa sobre la producción de endoglucanasas por *G. trabeum* en cultivos inducidos por celobiosa.

Micelio precrecido fue transferido a un medio de incubación que contenía lactosa al 1% (p/v). Después de tres horas de cultivo se indujo con celobiosa utilizando una concentración de 5,5 mM. Posteriormente, al tiempo indicado por la flecha, se agregó glucosa (□) 5 mM, (■) 20 mM o (◇) 40 mM.

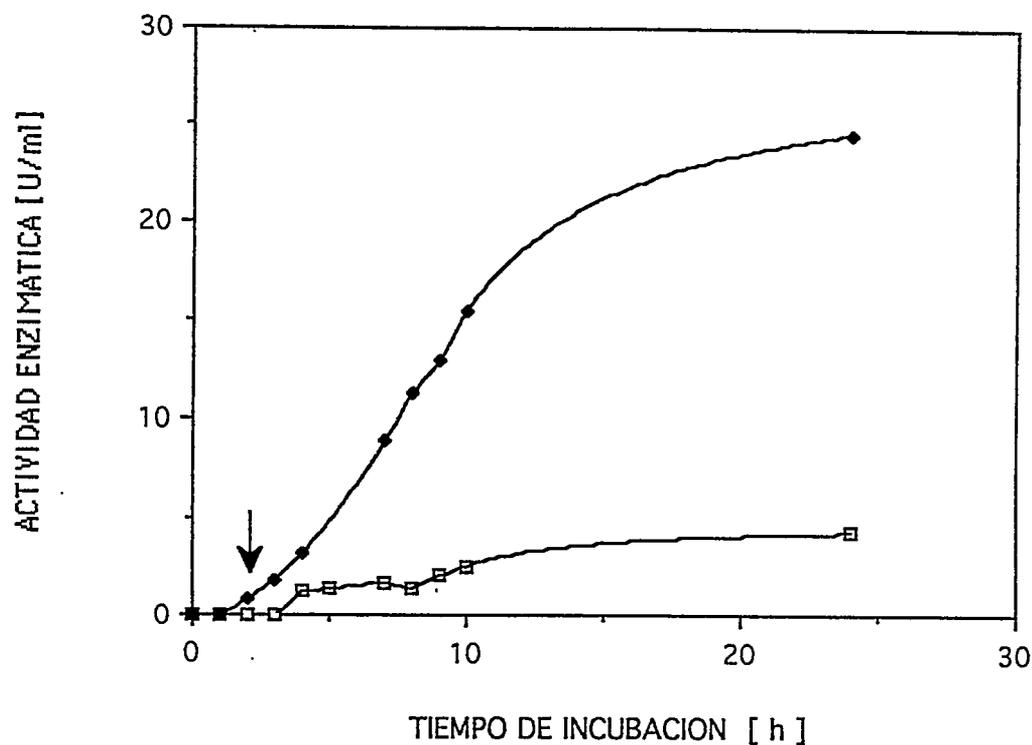


Figura 30: Efecto de la celobiosa sobre la producción de endoglucanasas por *G. trabeum* en un medio con glucosa.

Micelio precrecido fue transferido a un medio que contenía glucosa al 1% (p/v) (□) o glucosa al 1% (p/v) más celobiosa 5,5 mM (◆). La celobiosa fue agregada al tiempo indicado por la flecha.

3.3.- Síntesis de proteínas

El objetivo de este punto fue analizar si ocurría síntesis de endoglucanasas como consecuencia de la inducción con celobiosa. Para ello, se utilizó cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas en células eucariontes.

En primer lugar, se analizó si este inhibidor podía entrar a la célula. Para ello se creció el hongo en glucosa como fuente de carbono y se adicionó distintas concentraciones de cicloheximida (Tabla 3). Se observó que el hongo no fue capaz de crecer cuando la cicloheximida se encontraba presente en el medio de cultivo, lo que demuestra que este inhibidor fue capaz de entrar a la célula fúngica e inhibió la síntesis proteica, lo que impidió el crecimiento del hongo.

Para los estudios del efecto de la cicloheximida en la producción de endoglucanasas se utilizó micelio precrecido el que fue transferido a medios de cultivo con lactosa o glucosa como fuentes de carbono. Luego de tres horas de incubación, se agregó celobiosa como inductor. La cicloheximida fue agregada a las 0, 4 y 6 h de cultivo a una concentración de 100 µg/ml. Se observa que la cicloheximida agregada a las 0 y 4 horas de cultivo inhibió completamente la producción de las endoglucanasas (Figura 31 a y b). En cambio, cuando se agregó cicloheximida a las 6 horas de cultivo hubo expresión de endoglucanasas previa a la incorporación del inhibidor, pero ésta cesó totalmente al momento de agregar la cicloheximida. Este bajo nivel de expresión alcanzado con anterioridad a la adición del inhibidor se mantuvo constante durante el tiempo en que se realizó el experimento.

Tabla 3: Efecto de la cicloheximida en el crecimiento del hongo
G. trabeum

Concentración de cicloheximida ($\mu\text{g/ml}$)	Biomasa obtenida (mg en peso seco)
0	35,7
10	2,4
50	2,6
100	1,3
500	1,4
1000	1,2
5000	1,3

G. trabeum se creció en glucosa como fuente de carbono y se le adicionó diferentes concentraciones de cicloheximida; al quinto día de cultivo se determinó la biomasa por peso seco.

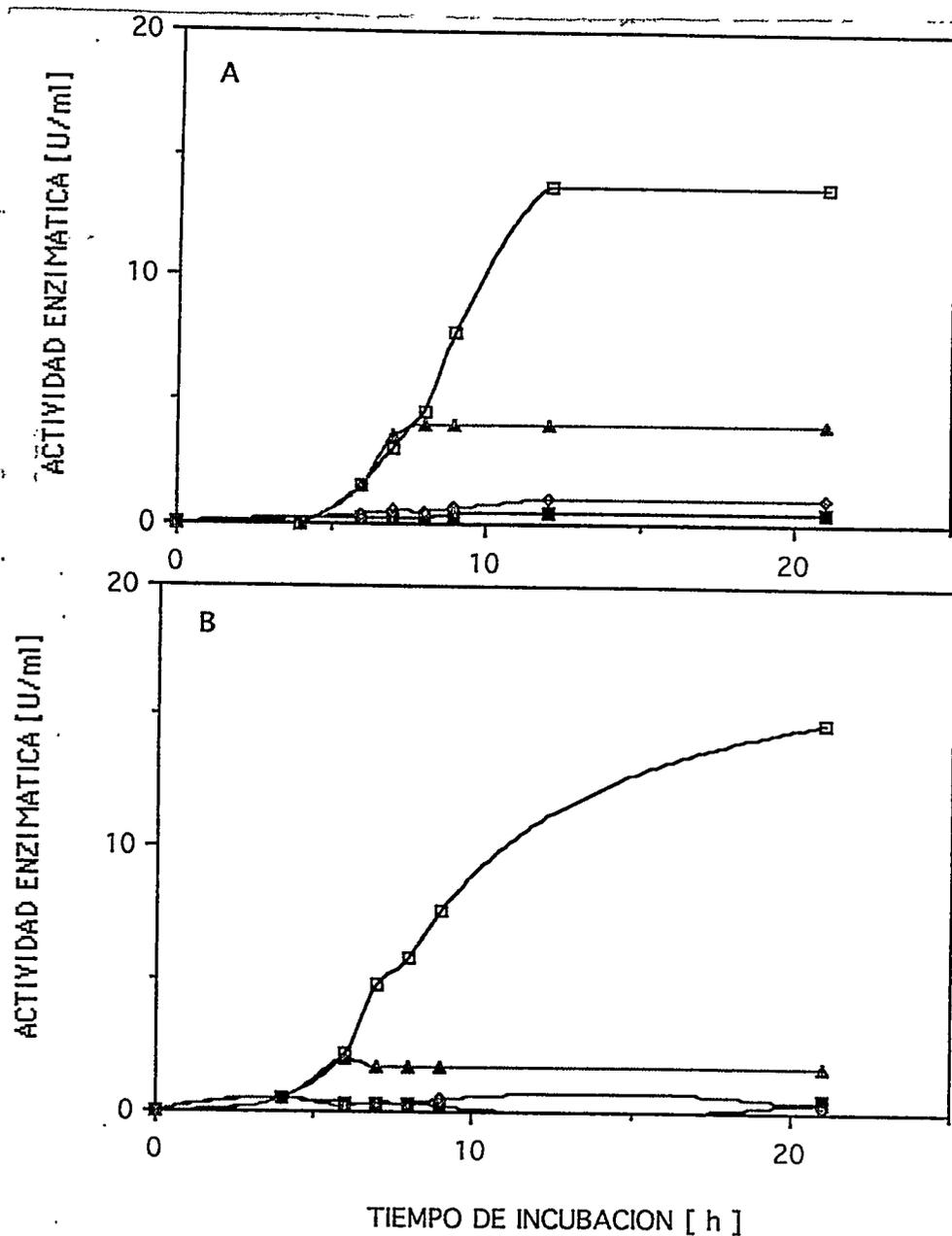


Figura 31: Efecto de la cicloheximida en la síntesis de endoglucanasas por el hongo *G. trabeum*.

Micelio precrecido fue transferido a medios con lactosa (A) o glucosa (B), como fuentes de carbono. Al cabo de 3 horas se indujo con celobiosa (□). Se agregó cicloheximida a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a las 0 (■), 4 (◆) y 6 (▲) horas de cultivo.

DISCUSION

El sistema celulolítico de los hongos de pudrición blanca y blanda ha sido caracterizado en detalle (Coughlan y Ljungdahl, 1988), en cambio el sistema celulolítico de los hongos de pudrición parda ha sido muy poco estudiado a pesar de las características únicas que éstos poseen. Se ha descrito que estos hongos expresan sólo endoglucanasas en cultivos líquidos (Highley, 1973), pero en estas condiciones de cultivo no degradan la celulosa cristalina. Sin embargo, en cultivos sobre un soporte sólido, estos hongos son capaces de degradar este tipo de celulosa. Debido a esto, en esta tesis se comparó la producción de enzimas del sistema celulolítico en cultivos líquidos y en cultivos sobre soportes sólidos. El hongo de pudrición parda *G. trabeum* produjo endoglucanasas en todos los cultivos analizados, pero no fue posible detectar la producción de celobiohidrolasas. La producción de endoglucanasas por este hongo en medio líquido y sobre soportes sólidos fue muy similar, ya que, en cultivos sobre soportes sólidos también se produjeron estas enzimas cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono. Además, la expresión de endoglucanasas fue mayor en medios de cultivo que contenían celobiosa que en los que contenían glucosa.

Al comparar la actividad de las endoglucanasas producidas en medios de cultivo líquidos que contenían glucosa o celobiosa con la actividad de estas enzimas en cultivos sobre soportes sólidos, se observó que en el caso de los cultivos sobre soportes sólidos, en presencia de glucosa, la actividad enzimática producida fue de aproximadamente 40 U/ml, cuatro veces mayor que la actividad endoglucanásica lograda en medios de cultivo líquidos que contenían glucosa. Una de las ventajas que presenta el cultivo sobre soportes sólidos con respecto a los cultivos en medio líquido es que los productos extracelulares se obtienen mucho más concentrados y fue lo que se observó cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, no ocurrió lo mismo al usar celobiosa como fuente de carbono. En cultivos líquidos la producción de endoglucanasas fue similar a la alcanzada en cultivos sobre soportes sólidos (aproximadamente 50 U/ml, en ambos casos). Esto se debe posiblemente a que la biomasa obtenida en cultivos sobre soportes sólidos, que contenían celobiosa, fue mucho menor que en los que contenían glucosa. Esto se tradujo, finalmente, en que la cantidad de endoglucanasas secretadas en cultivos sobre soportes sólidos al utilizar celobiosa como fuente de carbono fue muy baja.

La suposición que en cultivos sobre soportes sólidos, utilizando celobiosa como fuente de carbono, hay una menor producción de biomasa que en presencia de glucosa se apoya en los siguientes argumentos: la producción de biomasa de *G. trabeum* en cultivos líquidos fue mayor en presencia de glucosa que de celobiosa (42,4 y 18,8 mg respectivamente). Por otra parte, las curvas de crecimiento

sobre soportes sólidos, en presencia de glucosa o celobiosa, medidas en forma indirecta como la liberación de CO_2 , presentaron pequeñas diferencias, sobre todo al inicio del cultivo, siendo la producción de CO_2 sobre glucosa levemente superior. Esto sugiere que el crecimiento sería mayor en presencia de glucosa como fuente de carbono, lo que se correlaciona finalmente con lo observado en las cinéticas de consumo de las fuentes de carbono, en cultivos sobre soportes sólidos, en donde se apreció un consumo más rápido de la glucosa que de la celobiosa.

Otro de los aspectos que llama la atención al analizar las endoglucanasas secretadas sobre soportes sólidos inertes es que se produce un pico de expresión de estas enzimas; en cambio en medio líquido o en cultivos sobre el sustrato sólido, holocelulosa, la producción de endoglucanasas presentó un máximo el que se mantuvo en el tiempo. Esto puede deberse a que en los cultivos sobre el soporte sólido inerte, vermiculita, en presencia de glucosa o celobiosa como fuentes de carbono se produjeron proteasas extracelulares. La producción de estas enzimas estaría regulada por la limitación de las fuentes de carbono y/o nitrógeno. En *A. nidulans* y *N. crassa* se ha determinado que la expresión de las proteasas extracelulares estaría regulada por la limitación de la fuente de carbono, nitrógeno o azufre (Hanson y Marzluf, 1975; Cohen, 1973 y Abbott y Marzluf, 1984). Por otra parte, la expresión de estas proteasas en *N. crassa* (Hanson y Marzluf, 1975 y Abbott y Marzluf, 1984) es inducible por proteínas extracelulares. Todos estos factores podrían estar dando cuenta de una diferencia en la producción de

proteasas extracelulares por *G. trabeum* en medio líquido o sobre holocelulosa por una parte, y sobre el soporte sólido inerte, vermiculita, por otra.

Una de las características que distingue a los hongos de pudrición parda de los otros microorganismos celulolíticos conocidos es la regulación de la expresión de las enzimas involucradas en la degradación de la celulosa. En el hongo de pudrición blanda *T. reesei* la expresión de estas enzimas ha sido estudiada con algún detalle (Merivuori y col. 1984). La expresión de las enzimas celulolíticas en este hongo está bajo represión catabólica, lo que significa que son reprimidas en presencia de compuestos fácilmente metabolizables como glucosa, glicerol, etc. Por otra parte, la producción de estas enzimas es inducible por celulosa. En el hongo de pudrición blanca *P. chrysosporium* la glucosa también reprime la expresión de las celulasas. De los resultados obtenidos en esta tesis es evidente que existen diferencias importantes en la regulación de la expresión de las endoglucanasas entre los hongos de pudrición blanca y blanda y el hongo de pudrición parda *G. trabeum*.

En un trabajo anterior (Highley, 1973) se postuló que la producción de endoglucanasas en varios hongos de pudrición parda era constitutiva, debido a que este autor encontró estas enzimas en todos los medios de cultivo ensayados. En cambio, durante el desarrollo de esta tesis se demostró que la producción de endoglucanasas por el hongo de pudrición parda *G. trabeum* es inducible. A pesar que este hongo produjo endoglucanasas en todas las fuentes de carbono estudiadas, es claro que existen tres niveles

de producción enzimática. El nivel más bajo fue obtenido cuando se usó galactosa, fructosa, xilosa y glicerol como fuentes de carbono. Los monosacáridos galactosa y fructosa no fueron empleados como fuentes de carbono por el hongo, posiblemente, debido a que no existe un sistema de transporte para estos azúcares. Por otra parte, la expresión de las endoglucanasas sobre xilosa y glicerol podría corresponder al nivel constitutivo de expresión de estas enzimas por el hongo de pudrición parda *G. trabeum*, el cual es muchas veces superior al que se ha reportado para *T. reesei*.

Dentro de los azúcares que permiten el crecimiento del hongo, manosa, glucosa y lactosa producen un efecto de inducción significativamente mayor que xilosa y glicerol; por lo tanto, se podría especular que existiría alguna relación entre éstos o algún compuesto derivado de ellos y la inducción de la expresión de las endoglucanasas por *G. trabeum*. Además, resulta interesante la observación de Highley (1977) en la cual la adición de celobiosa, manosa o glucosa, pero no de xilosa, a cultivos del hongo de pudrición parda *Postia placenta* causó una reducción drástica del grado de polimerización de la celulosa. Tomando en conjunto ambos resultados se podría concluir que estos compuestos, celobiosa manosa y glucosa, estarían participando en la inducción tanto del sistema celulolítico como del sistema de despolimerización.

El mayor efecto de inducción fue obtenido con avicel, CMC y celobiosa. La celobiosa, en bajas concentraciones, agregada a medios de cultivo con lactosa o glucosa fue capaz de inducir la expresión de las endoglucanasas. Sin embargo, este efecto inductor no fue

apreciado cuando se agregó celobiosa a medios que contenían CMC como fuente de carbono. Este resultado puede explicarse por un efecto de saturación del sistema de inducción en este medio. Se obtuvieron resultados similares cuando el hongo *T. reesei* fue crecido en celulosa e inducido con soforosa, donde no se apreció un efecto de inducción por la soforosa (Fritscher y col., 1990).

La naturaleza exacta del inductor del sistema celulolítico en otros hongos no ha sido elucidada. En *P. chrysosporium* se ha demostrado que la celobiosa induce la expresión de las enzimas del sistema celulolítico (Eriksson y Hamp, 1978). Por otra parte, en *T. reesei* se encontró que la soforosa es el compuesto que mejor induce la expresión de estas enzimas (Mandels y col., 1962, Sternberg y Mandels, 1979) Sin embargo, fue recientemente demostrado que la celobiosa también puede inducir la expresión de las celulasas, pero solamente cuando la hidrólisis de este compuesto fue artificialmente inhibida con nojirimicina (Fritscher y col., 1990).

En el hongo *P. purpurogenum* se encontró que otro disacárido, gentiobiosa, era capaz de inducir la expresión de celulasas, cuando la enzima β -glucosidasa se encontraba inhibida con nojirimicina (Kurasawa y col., 1992).

Al analizar la inducción del sistema celulolítico de varios tipos de hongos se puede observar que en todos los casos son disacáridos los que actúan como inductores; sólo se ha descrito un caso de un monosacárido en *T. reesei* que causa inducción del sistema celulolítico, la L-sorbosa, pero se postula que el efecto inductor sería indirecto. En efecto, este compuesto produce alteraciones a nivel de

la pared fúngica, debido a que es un inhibidor de la síntesis de β -1,3-glucano, lo que provoca modificaciones en la morfología y composición de la pared celular (Kubicek y col., 1993a). En cambio, en el hongo de pudrición parda *G. trabeum*, monosacáridos como glucosa o manosa provocan una mayor expresión de las enzimas del sistema celulolítico. Por lo tanto, resultaría interesante estudiar a través de que mecanismo molecular estos compuestos pueden inducir la expresión de las endoglucanasas en estos hongos.

En los estudios de inducción realizados en este trabajo se observó que ésta ocurría aproximadamente una hora después de agregar la celobiosa, lo que sugiere que habría síntesis de RNA o de proteínas *de novo*. Para demostrar esto último, se analizó el efecto de la cicloheximida un inhibidor de la síntesis proteica. De los resultados obtenidos con este inhibidor se puede concluir que el aumento de la actividad endoglucanásica, producido después de agregar la celobiosa, no se debe a la modificación de una enzima pre-existente sino a un verdadero efecto de inducción. La celobiosa induciría de manera indirecta la síntesis de las endoglucanasas, ya que lo más probable es que ésta esté induciendo la síntesis de mRNAs que codifican para las endoglucanasas, como se ha descrito para las celulasas de *T. reesei* y *P. chrysosporium* (El-Gogary y col., 1989 y Covert y col., 1992).

Por otra parte, la naturaleza del inductor verdadero de la síntesis de endoglucanasas en *G. trabeum*, esto es aquella molécula que se uniría a las proteínas activadoras o represoras, no se conoce. Lo mismo sucede con la expresión del sistema celulolítico en otros

sistemas. Es así como algunos autores (Kubicek, 1993a) se refieren a aquellos compuestos que causan inducción de la síntesis de estas enzimas como "provocadores", para diferenciarlos de un inductor.

Otra importante diferencia en la expresión de las endoglucanasas entre el hongo de pudrición parda *G. trabeum* y los hongos de pudrición blanca *P. chrysosporium* y blanda *T. reesei* es que en presencia de glucosa *G. trabeum* produce endoglucanasas. Más aún, no se observó represión por glucosa cuando ésta fue agregada a cultivos inducidos. Por otra parte, hubo inducción por celobiosa en cultivos que contenían glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, cuando la glucosa fue agregada a los cultivos desde el comienzo se observó un retardo en el efecto estimulador del inductor. Una posible explicación es que la glucosa podría inhibir a la enzima que participa en la síntesis del inductor. Esta enzima es posiblemente la β -glucosidasa, ya que en otros hongos se ha propuesto que esta enzima participa en la síntesis del inductor (Vaheri y col., 1979; Kurasawa y col., 1992). La β -glucosidasa de *G. trabeum* es sólo parcialmente inhibida por glucosa; una concentración de 55 mM inhibió la actividad de esta enzima en un 25% solamente (Belancic, comunicación personal). Así, esta leve disminución de la actividad de la β -glucosidasa podría estar dando cuenta de este efecto de retardo de la expresión de las endoglucanasas en presencia de glucosa. En *T. reesei* se encontró que mutantes en la β -glucosidasa presentan una inducción retardada de la expresión de las endoglucanasas (Strauss y col., 1990; Fowler y col., 1992).

Por lo tanto, es posible concluir que la producción de endoglucanasas en el hongo de pudrición parda *G. trabeum* no está bajo represión catabólica y que los niveles de expresión más bajos observados en glucosa o lactosa se deben a la ausencia de un buen inductor. Recientemente, otros autores trabajando con *T. reesei*, llegaron a una conclusión similar (Messner y Kubicek, 1991). Ellos observaron que *T. reesei* producía celobiohidrolasa I en presencia de glucosa cuando el micelio era precrecido en lactosa. El nivel de expresión enzimática fue, sin embargo, muy bajo. La enzima sólo pudo ser detectada utilizando anticuerpos monoclonales. Estos autores sugirieron que la expresión de celulasas en *T. reesei* no está bajo represión catabólica y que estas enzimas son expresadas a un bajo nivel en glucosa debido a la ausencia del inductor. Sin embargo, la conclusión de estos autores no explica los resultados obtenidos por El-Gogary y col. (1989), donde se observa un efecto de represión catabólica. Estos autores demostraron que *T. reesei* no produce transcritos del gen de la celobiohidrolasa I cuando el hongo es crecido en avicel por 21 horas y luego expuesto a glucosa por 1 hora. Por otra parte, recientemente se demostró que el promotor del gen que codifica para la celobiohidrolasa I tiene una secuencia que sería reconocida por una proteína represora del tipo CRE A; al eliminar esta secuencia el gen *chb1* es expresado en presencia de glucosa (Kubicek, 1993b). Esto demuestra claramente que en *T. reesei* la expresión de las enzimas celulolíticas es reprimida por glucosa.

El mecanismo de degradación de la celulosa difiere entre los hongos de pudrición parda y blanca (Kleman-Leyer y col., 1992). Estos autores trabajando con los hongos de pudrición parda y blanca *P. Placenta* y *P. chrysosporium*, respectivamente, demostraron que los hongos de pudrición blanca atacan la superficie de la microfibrilla degradando inmediatamente los productos. Por lo tanto, en este caso no habría acumulación de compuestos de bajo masa molecular. Distinto es el caso de los hongos de pudrición parda los cuales hidrolizan enteramente la celulosa, posiblemente por ataque sobre las zonas amorfas, causando una disminución importante en el DP de ésta (Kleman-Leyer y col., 1992). Durante esta despolimerización inicial no hay degradación de los productos obtenidos. Esto haría que se libere una cantidad importante de compuestos de bajo masa molecular, los que se acumularían antes de la acción de las endoglucanasas. Esto explicaría los resultados obtenidos en esta tesis, donde se demostró que la producción de endoglucanasas por *G. trabeum* no está bajo represión catabólica. Por lo tanto, el hongo tendría que expresar las endoglucanasas en presencia de una alta concentración de compuestos de bajo masa molecular.

Uno de los principales intereses de estudiar la regulación de la expresión de los genes de las endoglucanasas en el hongo de pudrición parda *G. trabeum* es que, como fue demostrado en este trabajo, la expresión de estas enzimas no estaría sujeta a represión catabólica, lo que permitiría la producción de estas enzimas en medios de cultivos económicos.

Más interesante aún, es estudiar el promotor y las secuencias reguladoras de estos genes, debido a que, es un promotor muy fuerte e inducible por celobiosa, por lo tanto, en medios inducidos la mayor parte de las proteínas extracelulares corresponden a las endoglucanasas. Y finalmente no está regulado por glucosa. Todas estas características lo convierten en un buen candidato para ser utilizado en la expresión de proteínas heterólogas en hongos filamentosos. Esto permitiría obtener prácticamente sólo la enzima heteróloga clonada bajo el promotor de las endoglucanasas de *G. trabeum* y en altas concentraciones, ya que las demás proteínas estarían reprimidas.

A nivel molecular, la ausencia de represión catabólica en la expresión de las endoglucanasas por *G. trabeum* podría deberse a que en la región río arriba del promotor no se encontraría presente la secuencia reconocida por una proteína represora del tipo MIG1 de levadura o CREA de *A. nidulans*. En el caso de otras enzimas celulolíticas se ha encontrado que el promotor del gen que codifica para la celobiohidrolasa 1 de *T. reesei* posee una región homóloga al sitio de unión de la proteína CREA de *A. nidulans*; la delección de esta región produjo la expresión de este gen en presencia de glucosa (Kubicek y col., 1993a).

Cuando se estudió la producción de enzimas celulolíticas por *G. trabeum* en medios líquidos y en cultivos sobre soportes sólidos utilizando diferentes fuentes de carbono, sólo se detectó la presencia de endoglucanasas. Debido a esto, se realizó una caracterización preliminar de estas enzimas. En primer lugar, se identificaron, en

geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes, dos endoglucanasas las que tenían una masa molecular de 36000 y 32000 Dalton, respectivamente. Estas masas moleculares no coinciden con la descrita en un trabajo anterior, donde se purificó y caracterizó parcialmente una endoglucanasa de *L. trabea* (sinónimo de *G. trabeum*); la masa molecular determinada para esta enzima fue de 29000 Dalton (Herr y col., 1978). Posiblemente estos autores no encontraron las endoglucanasas de mayor masa molecular debido a que, para la purificación utilizaron las proteínas que se encontraban en un medio de cultivo obtenido después de nueve días de incubación, lo que podría haber facilitado la degradación de las especies de mayor masa molecular, para obtener una enzima de 29000 Dalton. A este respecto, se puede agregar que durante el desarrollo de esta tesis se detectó la presencia de una proteína extracelular de 28000 Dalton, cuando se trabajó con cultivos de varios días, no así en cultivos a tiempos más cortos.

Por otra parte, se determinó la secuencia aminoterminal de las dos endoglucanasas de *G. trabeum* identificadas durante este trabajo por electroforesis en geles de poliacrilamida y se encontró que éstas eran idénticas. El hecho que estas enzimas presenten diferente masa molecular, pero que su secuencia aminoterminal sea idéntica puede deberse a modificaciones post-traduccionales como diferentes grados de glicosilación o a cortes proteolíticos. Por otra parte, la presencia de estas enzimas con idéntica secuencia aminoterminal puede deberse, además, a modificaciones post-transcripcionales, lo que daría poblaciones distintas de RNAs

codificadas en un mismo gen, tal vez por inicio de la transcripción en sitios diferentes o por un procesamiento diferente de éstos.

Con respecto a la modificación proteolítica, recientemente se demostró que este mecanismo contribuye a la diversidad de las endoglucanasas en diferentes microorganismos (Paice y col., 1984 y Ståhlberg y col., 1988). Es así como, el basidiomicete *Schizophyllum commune* produce dos formas de endoglucanasas, EG-I y EG-II. Se ha propuesto que EG-II se produce a partir de EG-I por liberación proteolítica de la región aminoterminal (Paice y col., 1984). Por otra parte, en *T. reesei* se encontró una endoglucanasa de 38 KDa, la cual es producida por corte proteolítico a partir de la endoglucanasa EG I I (Ståhlberg y col., 1988). Esta endoglucanasa modificada es activa sobre sustratos solubles como carboximetilcelulosa, pero presenta una actividad muy disminuída sobre celulosas cristalinas como Avicel. Esto se debe a que la región eliminada de esta proteína corresponde a la región aminoterminal donde se encuentra el dominio de unión a la celulosa. Esto sugiere que, al igual que en *T. reesei* y *S. commune*, la existencia de dos endoglucanasas, en *G. trabeum*, con idéntica secuencia aminoterminal podría deberse a modificaciones proteolíticas, en las cuales se eliminaría una región cercana al extremo carboxiterminal.

Con respecto a la secuencia aminoterminal de las endoglucanasas de *G. trabeum* se puede apreciar que ésta no contiene las secuencias conservadas de los dominios de unión a la celulosa de las enzimas celulolíticas de *T. reesei* o *P. chrysosporium* (Gilkes y col., 1991). Por otra parte, a pesar de poseer varios

residuos treonina y uno de serina la región aminoterminal de las endoglucanasas de *G. trabeum* no correspondería al dominio de glicosilación; porque éste tiene un alto contenido de este tipo de aminoácidos. Por ejemplo, en la endoglucanasa II de *T. reesei* se ha descrito que hay 21 residuos serina o treonina de un total de 34 aminoácidos en este dominio (Saloheimo y col., 1988). Concordante con este análisis, se puede mencionar el hecho que la región aminoterminal de las endoglucanasas de *G. trabeum* presenta cierta homología con una porción de la endoglucanasa II de *T. reesei* que corresponde a una región en el dominio catalítico próxima al sitio de glicosilación y no a los dominios altamente conservados (Saloheimo y col., 1988). Estos antecedentes sugieren que en la región aminoterminal de las endoglucanasas de *G. trabeum* no se encontraría el dominio de unión a la celulosa, sino que éste estaría en el extremo carboxiterminal y que la región aminoterminal formaría parte del dominio catalítico.

Por otra parte, se intentó estudiar la posibilidad de que modificaciones post-transcripcionales de los mRNAs que codifican para las endoglucanasas dieran cuenta de proteínas con idéntica secuencia aminoterminal. Para ello, se amplificaron los mRNAs que codifican para estas enzimas utilizando un partidador degenerado. Pero al analizar, por secuenciación, los productos de la amplificación se vió que no correspondían a las endoglucanasas sino que a otros genes, entre ellos la glutamina sintetasa. Este resultado se debió posiblemente a la utilización de un partidador degenerado el cual hibridó con genes diferentes, los que posteriormente fueron

amplificados. Para evitar este problema se tendría que haber diseñado un partidador más específico. Esto no fue posible debido a que no se conocía la preferencia codogénica de este hongo.

El hecho de haber clonado el gen de la glutamina sintetasa puede aportar a este respecto, debido a que, actualmente se puede contar con al menos un antecedente de preferencia codogénica de *G. trabeum*, lo que podría ser utilizado en trabajos posteriores para sintetizar una sonda más específica que permitiría detectar aquellos clones que contendrían los genes de las endoglucanasas de este hongo. Por otra parte, analizando la preferencia codogénica que empleó *G. trabeum* en el gen de la glutamina sintetasa se pudo comprobar que ésta se asemeja más a la que emplea *P. chrysosporium*, para los genes de lignina peroxidasa, que la que utiliza *T. reesei*, para los genes de las celulasas (Holzbaur y col., 1991 y Penttilä y col., 1986).

Durante la caracterización de las endoglucanasas de *G. trabeum* se determinó además el punto isoeléctrico que fue alrededor de 3,5. Esto se correlaciona con el hecho que las endoglucanasas de *G. trabeum* migran mucho más rápido en una electroforesis en condiciones no desnaturantes que las endoglucanasas de *P. chrysosporium*, lo que indicaría que las enzimas del hongo de pudrición parda tendrían un pI más bajo que las enzimas de *P. chrysosporium*.

El punto isoeléctrico fue determinado tanto por isoelectroenfoque como por cromatoenfoque; es importante destacar que el procedimiento empleado para realizar el cromatoenfoque es

una buena alternativa para la purificación de las endoglucanasas, ya que se emplearon muy pocos pasos de purificación. Además, se utilizó micelio precrecido el que fue posteriormente incubado en un medio con celobiosa por un tiempo corto, de esta manera se minimizó la proteólisis. Además, la mayor parte de las enzimas producidas correspondían a endoglucanasas.

Otro de los aspectos que se estudió, durante la caracterización de las endoglucanasas de *G. trabeum* fue su posible homología con otras enzimas celulolíticas. Para ello, se emplearon diferentes genes que codifican para celulasas de *T. reesei* y *P. chrysosporium*. La idea de usar estos genes como sondas se basó en el hecho que los genes que codifican para las celulasas tienen regiones altamente conservadas, las que presenta homología incluso de una especie a otra (Eriksson y col., 1990). Más aún, parte del gen *cbh1* de *T. reesei* fue usado como sonda para clonar el gen *cbh1* de *P. chrysosporium* (Sims y col., 1988 y Covert y col., 1992). Al utilizar los genes *egl1* de *T. reesei* o *cbh1* de *P. chrysosporium*, como sondas, no dieron bandas de hibridación importantes con el DNA genómico de *G. trabeum*; lo que puede deberse a que las enzimas de este hongo serían muy diferentes a las de *T. reesei* y *P. chrysosporium*. De hecho, en este trabajo se demostró que las endoglucanasas de *G. trabeum* presentan cierta homología con una porción de la endoglucanasa II de *T. reesei*, enzima distinta de las otras celulasas de *T. reesei*.

CONCLUSIONES

- La expresión de estas enzimas no está bajo represión catabólica, característica única de estos tipos de hongos.
- La producción de endoglucanasas por el hongo de pudrición parda *G. trabeum* es inducible por celobiosa. El efecto de la celobiosa sobre la expresión de las endoglucanasas se debió a un verdadero efecto de inducción y no a la activación de una enzima pre-existente.
- *G. trabeum* produjo sólo endoglucanasas en los medios de cultivos líquidos analizados en los cuales se empleó diferentes fuentes de carbono (glicerol, glucosa, manosa, xilosa, lactosa, celobiosa carboximetilcelulosa y Avicel). En cultivos sobre soportes sólidos también se detectó sólo la expresión de endoglucanasas, la que fue muy similar a la obtenida en medio líquido. En todas estas condiciones de cultivo no se detectó la presencia de celobiohidrolasas

- En geles de poliacrilamida se identificaron dos endoglucanasas las que presentaron una secuencia aminoterminal idéntica. La masa molecular de estas proteínas es de 36000 y 32000 Dalton y su punto isoeléctrico inferior a 3,5. La región aminoterminal de las endoglucanasas de 36000 y 32000 Dalton de *G. trabeum* presenta homología con la endoglucanasa II de *T. reesei*. Por otra parte las endoglucanasas de *G. trabeum* no presentaron homología, en su secuencia nucleotídica, con la endoglucanasa I de *T. reesei* ni con la celobiohidrolasa I de *P. chrysosporium*.

PROYECCIONES

Las conclusiones obtenidas de este trabajo de tesis da lugar a muchas proyecciones entre las cuales se puede citar el estudio de la secuencia primaria de las endoglucanasas lo que permitiría comprobar lo que se sugirió en esta tesis que estas enzimas serían distintas a las enzimas de los sistemas celulolíticos de los hongos de pudrición blanca y blanda.

Otra de las proyecciones interesantes de esta tesis es estudiar a que se debe que la expresión de estas enzimas no está bajo represión catabólica. A este respecto, en el laboratorio de la Dra Merja Penttila en Finlandia se está estudiando si *G. trabeum* posee una proteína represora de las características de CRE A. Otra forma de enfocar este problema es estudiar el promotor de las endoglucanasas, para establecer si existen secuencia capaces de unir la proteína represora del tipo CRE A.

Finalmente la obtención del promotor y de las secuencias que llevan la información para la secreción de las endoglucanasas al medio, permitiría construir un vector de expresión para hongos filamentosos, el que presentaría la característica de ser inducible por celobiosa en presencia de glucosa. Lo que haría que se libere al medio de cultivo casi exclusivamente la proteína heteróloga, ya que las otras proteínas estarían reprimidas por glucosa.

BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT, J. y MARZLUF, G. 1984. Major extracellular protease of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 159: 505-510.
- AGOSIN, E., y ODIER, E. 1985. Solid State fermentation, lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermented by selected white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 397-403.
- BAILEY, P.J., LIESE, W., ROESCH, R., KEILICH, G. y AFTING, E.G. 1969. Cellulase (β -1,4-glucan 4-glucanohydrolase) from the wood-degrading fungus *Polyporus schweinitzii* FR. *Biochim. Biophys. Acta.* 185 : 381-391.
- BAILEY, C. y ARST, H. 1975. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Eur. J. Biochem.* 51: 573-577.
- BAINBRIDGE, B.W., SPREADBURY, C. L., SCALISE, F. G. y COHEN, J. 1990. Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 113-118.
- BAJWA, W., TORCHIA, T. y HOPPER, J. 1988. Yeast regulatory gene *GAL3* : Carbon regulation; UAS_{GAL} elements in common with *GAL1*, *GAL2*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL80*, and *MEL1* ; encoded protein striking similar to yeast and *Escherichia coli* galactokinases. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3439-3447.
- BAUM, J., GEEVER, R. y GILES, N. 1987. Expression of qa-1F activator protein: Identification of upstream binding sites in the *qa* gene cluster and localization of the DNA-Binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1256-1266.

- BEGUIN, P. 1990. Molecular Biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 219-248.
- BERI, R., WHITTINGTON, H., ROBERTS, C. y HAWKINS, A. 1987. Isolation and characterization of the positively acting regulatory gene *QUTA* from *Aspergillus nidulans*. *Nucl. Ac. Res.* 15: 7991-8001.
- BERTHEAU, Y., MADGIDI-HERVAN, E., KOTOUJANSKY, A., NGUYEN-THE, C., ANDRO, T. y COLENO, A. 1984. Detection of Depolymerase Isoenzymes after Electrophoresis or Electrofocusing, or in Titration Curves. *Analytical Biochemistry* 139: 383-389.
- BHAT, P. y HOPPER, J. 1992. Overproduction of the GAL1 or GAL3 protein causes galactose-independent activation of the GAL4 protein: evidence for a new model of induction for the yeast *GAL/MEL* regulon. *Mol. Cell Biol.* 12: 2710-2707.
- CHEN, H., HAYN, M. y ESTERBAUER, H. 1992. Purification and characterization of two extracellular β -glucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1121: 54-60.
- COHEN, B. L. 1973. Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 79: 311-320.
- COUGHLAN, M. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.*, 3: 39-109.
- COUGHLAN, M., y LJUNGDAHL, L. 1988. Comparative biochemistry of Fungal and Bacterial cellulolytic enzyme systems. In *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, FEMS Symposium N° 43 (J.-P. Aubert, P. Beguin, J. Millet, Eds), pag 11-30. Academic Press, London.
- COVERT, S., VANDEN WYMELENBERG, A. y CULLEN, D. 1992. Structure, organization and transcription of a cellobiohydrolase gene cluster from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Env. Microbiol.* 58: 2168-2175.

- DOWZER, C. y KELLY J. 1989. Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr. Genet.* 15: 457-459.
- DOWZER, C. y KELLY J. 1991. Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 5701-5709.
- DRAYSDAY, M., KOLZE, S. y KELLY, J. 1993. The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *cre A*. *Gene.* 130: 241-245.
- EL-GOGARY, S., LEITE, A., CRIVELLARO, O., EVELEIGH, D., y EL-DORRY, H. 1989. Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. *Proc. Natl. Acad. Sci.-USA.* 86: 6138-6141.
- ENTIAN, K. 1980. Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 178: 633-637.
- ERIKSSON, K., BLANCHETTE, R., y ANDER, P. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components, Springer Verlag, KG, Berlin.
- ERIKSSON, K., y HAMP, S. 1978. Regulation of Endo-1,4- β -glucanase Production in *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* 90: 183-190.
- ERIKSSON, K. y PETTERSSON, B. 1975a. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. 1. Separation, purification and physico-chemical characterization of five endo-1,4- β -glucanases. *Eur. J. Biochem.* 51: 193-206.
- ERIKSSON, K. y PETTERSSON, B. 1975b. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. 3. Purification and physico-chemical characterization of an exo-1,4- β -glucanase. *Eur. J. Biochem.* 51: 213-218.

- ESPEJO, E. y AGOSIN, E. 1991. Production and degradation of oxalic acid by brown rot fungi. *Appl. Env. Microbiol.* 57: 1980-1986.
- FERNÁNDEZ, R., HERRERO, P., FERNÁNDEZ, E., FERNANDEZ, M. LOPEZ-BOADO, Y. y MORENO, F. 1988. Autophosphorylation of yeast hexokinase PII. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2493-2498.
- FLANAGAN, P., KELLEHER, R., SAYRE, M., TSCHOCHNER, H. y KORNBERG, R. 1991. A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription *in vitro*. *Nature.* 350: 436-438.
- FLICK, J. y JOHNSTON, M. 1990. Two system of glucose repression of the *GAL1* promotor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4757-4769.
- FLOURNOY, D., KIRK, K. y HIGHLEY, T. 1991. Wood decay by brown-rot fungi: changes in pore structure and cell wall volume. *Holzforschung.* 45: 383-388.
- FOWLER, T. y BROWN, R. 1992. The *bg11* gene encoding extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex. *Mol. Microbiol.* 6: 3225-3235.
- FRITSCHER, C., MESSNER, R., y KUBICEK, C. 1990. Cellobiose Metabolism and Cellobiohydrolase I Biosynthesis by *Trichoderma reesei*. *Experimental Mycology.* 14: 405-415.
- FROHMAN, M., DUSH, M. y MARTIN, G. 1988. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 8998-9002.
- GANCEDO, J. 1992. Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* 206: 297-313.
- GEEVER, R., HUIET, L., BAUM, J., TYLER, B., PATEL, V., RUTLEDGE, B., CASE, M. y GILES, N. 1989. DNA sequence, organization and regulation of the *qa* gene cluster of *Neurospora crassa*. *J. Mol. Biol.* 210: 15-34.

- GILES, N., CASE, M., BAUM, J., HUIET, L., PATEL, V. y TYLER, B. 1985. Gene organization and regulation in the *qa* (Quinic acid) gene cluster of *Neurospora crassa*. *Microbiol. Rev.* 49: 338-358.
- GILKES, N., KILBURN, D., MILLER, R. y WARREN, R. 1991. Bacterial cellulases. *Bioresource Technology.* 36: 21-35.
- GILKES, N., HENRISSAT, B., KILBURN, D., MILLER, R. y WARREN, R. 1991. Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol. Rev.* 55: 303-315.
- GOYAL, A., GHOSH, B. y EVELEIGH, D. 1991. Characteristics of fungal cellulases. *Bioresource Technology.* 36: 37-50.
- GRANT, S., ROBERTS, C., LAMB, H., STOUT, M. y HAWKINS, A. 1988. Genetic regulation of the quinic acid utilization (*QUT*) gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 347-358.
- GRENNBERG, M., MYERS, P., SKVISKY, R. y GREER, H. 1986. New positive and negative regulators for general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6: 1820-1829.
- GRIGGS, D. y JOHNSTON, M. 1991. Regulated expression of the *GAL4* activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 8597-8601.
- GUARENTE, L. 1988. UASs and enhancers: Common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell.* 52: 303-305.
- GWYNNE, D., BUXTON, F., SIBLEY, S., DAVIES, R., LOCKINTON, A., SCAZZOCCHIO, C. y SEALY-LEWIS, H. 1987. Comparison of the cis-acting control regions of the two coordinately controlled genes involved in the ethanol utilization in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* 51: 205-216.
- HALLIWELL, G. 1965. Catalytic decomposition of cellulose under biological conditions. *Biochem J.* 95: 35-41.

- HALLIWELL, B y GUTTERIDGE, J. M. 1988. Iron as a Biological Pro-oxidant. *ISI Atlas of Science Biochemistry*. 1: 48-52.
- HANSON, M. y MARZLUF, G. 1975. Control of the synthesis of a single enzyme by multiple regulatory circuits in *Neurospora crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 72: 1240-1244.
- HAWKINS, A., DA SILVA, A. y ROBERTS C. 1984. Evidence for two control genes regulating expression of the quinic acid utilization (*QUT*) gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 567-574.
- HERR, D., BAUMER, F., y DELLWEG, H. 1978. Purification and Properties of an Extracellular Endo-1,4- β -Glucanase from *Lenzites trabea*. *Arch. Microbiol.* 117: 287-292.
- HERRERO, P., FERNANDEZ, R. y MORENO, F. 1989. The hexokinase isozyme PII of *Saccharomyces cerevisiae* is a protein kinase. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1209-1216.
- HIGHLEY, T. 1973. Influence of Carbon Source on Cellulase Activity of White-rot and Brown-rot Fungi. *Wood and Fiber* . 5: 50-58.
- HIGHLEY, T. 1977 Requirements for cellulose degradation by a brown-rot fungus. *Mat Organism* . 11: 33-46.
- HOLZBAUR, E., ANDRAWIS, A. y TIEN, M. 1991. Molecular Biology of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in Molecular Industry Mycology (ed: Leong, S. y Berka, R. pgs: 197-223).
- IYAYI, C., BRUCHMANN, E., y KUBICEK, C. 1989. Induction of cellulase formation in *Trichoderma reesei* by cellobio-1,5-lacton. *Arch. Microbiol.* 151: 326-330.
- JONES, P., SHAHAB, B., TRINCI, A., y MOORE. D. 1988. Effect of polymeric additives, especially Junlon and Hostacerin, on growth of some basidiomycetes in submerged culture. *Trans. Br. mycol. Soc* . 90: 577-583.

- JOHNSTON, M. 1987a. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 51: 458-476.
- JOHNSTON, M. y DOVER, J. 1987b. Mutations that inactive a yeast transcriptional regulatory protein cluster in an evolutionarily conserved DNA binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2401-2405.
- JOHNSTON, M. 1987c. Genetic evidence that zinc is an essential co-factor in the DNA binding domain of GAL 4 protein. *Nature* 328: 353-355.
- KEILICH, G., BAILEY, P.J., AFTING, E.G. y LIESE, W. 1969. Cellulase (β -1,4-glucan 4-glucanohydrolase) from the wood-degrading fungus *Polyporus schweinitzii* FR. *Biochim. Biophys. Acta* . 185 : 392-401.
- KIRK, K., CROAN, S., TIEN, M., MURTAGH, K., y FARRELL, R. 1986. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium* . *Enzyme Microb. Technol.* 8: 27-32.
- KLEMAN-LEYER, K., AGOSIN, E., CONNER, A., y KIRK, K. 1992. Changes in molecular size distribution of cellulose during attack by white-rot and brown-rot fungi. *Appl. Env. Microbiol.* 58: 1266-1270.
- KNOWLES, J., LEHTOVAARA, P. y TEERI, T. 1987. Cellulase families and their genes. *Trends Biotechnol.* 5: 255-261.
- KOENIGS, J. W. 1974. Hydrogen peroxide and iron: a proposed system for decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes. *Wood Fiber.* 6: 66-80.
- KUBICEK, C. MESSNER, R., GRUBER, F., MACH, R. y KUBICEK-PRANZ, E. 1993a. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme. Microb. Technol.* 15: 90-99.
- KUBICEK, C. MESSNER, R., GRUBER, F., MANDELS, M. y KUBICEK-PRANZ, E. 1993b Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei* *J. Biol. Chem.* 268: 19364-19368.

- KUBICEK-PRANZ, E., STEINER, M., y KUBICEK, C. 1990. Stimulatory effect of oxidized cellulose on cellulase formation by *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol. Letters*. 68: 273-278.
- KULMBURG, P., PRANGÉ, T., MATHIEU, M., SEQUEVAL, D., SCAZZOCCHIO, C. y FELENBOK, B. 1991. Correct intron splicing generates a new type of a putative zinc-binding domain in a transcriptional activator of *Aspergillus nidulans*. *FEBS Lett.* 280: 11-16.
- KULMBURG, P., JUDEWICZ, N., MATHIEU, M., LENOUEVEL, F., SEQUEVAL, D., y FELENBOK, B. 1992a. Specific binding sites for the activator protein, ALCR, in the *alcA* promoter of the ethanol regulon of *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 267: 21146-21153.
- KULMBURG, P., SEQUEVAL, D., LENOUEVEL, F., MATHIEU, M. y FELENBOK, B. 1992b. Identification of the promoter region involved in the autoregulation of the transcriptional activator ALCR in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 12: 1932-1939.
- KULMBURG, P., MATHIEU, M., DOWZER, C., KELLY, J. y FELENBOK, B. 1993. Specific binding sites in the *alcR* y *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 7: 847-857.
- KURASAWA, T., YACHI, M., SUTO, M., KAMAGATA, Y., TAKAO, S. y TOMITA, F. 1992. Induction of cellulase by gentiobiose and sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. *Appl. Env. Microbiol.* 58: 106-110.
- LAMB, H., HAWKINS, A., SMITH, M., HARVEY, I., BROWN, J., TURNER, G. y ROBERTS, C. 1990. Spatial and biological characterisation of the complete quinic acid utilisation gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genetics.* 223: 17-23.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- LAUGHON, A. y GESTELAND, R. 1984. Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL 4* gene. *Mol. Cell. Biol.* 4: 260-267.

- LELOIR, L. 1951. The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch. Biochem.* 33: 186-190.
- LIN, Y.-S. y GREEN, M. 1991. Mechanism of action of an acidic transcriptional activator "in vitro". *Cell.* 64: 971-981.
- LUE, N., CHASMAN, D., BUCHMAN, A. y KORNBERG, D. 1987 Interaction of GAL 4 y GAL 80 gene regulatory proteins in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 7: 3446-3451.
- LOCKINGTON, R., SEALY-LEWIS H., SCAZZOCCHIO, C. y DAVIES, W. 1985. Cloning and characterization of the ethanol regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* 33: 137-149.
- LOCKINGTON, R., SCAZZOCCHIO, C., SEQUEVAL, D., MATHIEU, M. y FELENBOK, B. 1987. Regulation of *alcR*, the positive regulatory gene of the ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 1: 275-281.
- MA, J. y PTASHNE, M. 1987a. Deletion analysis of GAL 4 defines two transcriptional activating segments. *Cell.* 48: 847-853.
- MA, J. y PTASHNE, M. 1987b. The carboxyl-terminal 30 aminoacids of GAL 4 are recognized by GAL 80. *Cell.* 50: 137-142.
- MANDELS, M., PARRISH, E., y REESE, E. 1962. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *J. Bacteriol.* 83: 400-408.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. y SAMBROOK, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- MATSUDAIRA, P. 1987. Sequence from Picomole Quantities of Proteins Electroblotted onto Polyvinylidene Difluoride Membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038.

- MATSUMOTO, K., TOH-E, A. y OSHIMA, Y. 1980. Function of positive regulatory gene *gal4* in the synthesis of galactose pathway enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence that the *GAL81* region codes for part of the *gal4* protein. *J. Bacteriol.* 134: 446-457.
- MATSUMOTO, K., UNO, I., ISHIKAWA, T. y OSHIMA, Y. 1983. Cyclic AMP may not be involved in catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence from mutants unable to synthesize it. *J. Bacteriol.* 156: 898-900.
- MEAD, D., PEY, N., HERRNSTADT, C., MARCIL, R. y SMITH, L. 1991. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Bio/technology.* 9: 657-662.
- MERIVUORI, H., SIEGLER, K., SANDS, J., y MONTENECOURT, B. 1984. Regulation of cellulase biosynthesis and secretion in fungi. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 411-414.
- MESSNER, R., GRUBER, F., y KUBICEK, C. 1988. Differential Regulation of Synthesis of Multiple Forms of Specific Endoglucanases by *Trichoderma reesei* QM9414. *J. Bacteriol.* 170: 3689-3693.
- MESSNER, R., y KUBICEK, C. 1990. Evidence for a single, specific β -glucosidase in cell walls from *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 685-690.
- MESSNER, R., y KUBICEK, C. 1991. Carbon Source Control of Cellobiohydrolase I and II Formation by *Trichoderma reesei*. *Appl. Env. Microbiol.* 57: 630-635.
- MINEHART, P. y MAGASANIK, B. 1992. Sequence of the *GLN1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the upstream region in regulation of glutamine synthetase expression. *J. Bacteriol.* 174: 1828-1836.
- MUFTIC, M K. 1964. A new phenol-hypochlorite reaction for ammonia. *Nature* 201: 622-623.
- NEEDLEMAN, R. 1991. Control of maltase synthesis in yeast. *Mol. Microbiol.* 5: 2079-2084.

- NEHLIN, J. y RONNE, H. 1990. Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *The EMBO J.* 9: 2891-2898.
- NEHLIN, J., CARLBERG, M. y RONNE, H. 1991. Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *The EMBO J.* 10: 3373-3377.
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of a Somogy method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.
- PAICE, M., DESROCHERS, M., RHO, D., JURASEK, L., ROY, C., ROLLIN, C., DE MIGUEL, E. y YAGUCHI, M. 1984. Two forms of endoglucanase from the basidiomycete *Schizophyllum commune* and their relationship to the other β -1,4-glycoside hydrolases. *Bio/Technology* 2: 535-539.
- PARTHUN, M. y JAEHNING, J. 1992. A transcriptionally active form of GAL4 is phosphorylated and associated with GAL80. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4981-4987.
- PAVLETICH, N. y PABO, C. 1991. Zinc Finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* . 252: 809-817.
- PENTTILÄ, M., LEHTOVAARA, P., NEVALAINEN, H., BHIKHABHAI, R. y KNOWLES, J. 1986. Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete sequence of the endoglucanase I gene. *Gene*. 45: 253-263.
- PENTTILÄ, M., Lecture at the 1st European Conference on Fungal Genetics, Nottingham, August 1992.
- PESOLE, G., BOZZETTI, M., LANAVE, C., PREPARATA, G y SACCONI, C. 1991. Glutamine synthetase gene evolution: a good molecular clock. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA.* 88: 522-526.
- PTASHNE, M., 1988. How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature.* 335: 683-689.

PULS, J. y WOOD, T. 1991. The degradation pattern of cellulose by extracellular cellulases of aerobic and anaerobic microorganism. *Bioresource Technology*. 36: 15-19.

ROEDER, R. 1991. The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *TIBS*. 16: 402-408.

ROSE, M., ALBIG, W. y ENTIAN, K. 1991. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI y PII. *Eur. J. Biochem.* 199: 511-518.

SALOHEIMO, M., LEHTOVAARA, P., PENTTILÄ, M., TEERI, T., STÄHLBERG, J., JOHANSSON, G., PETERSSON, G., CLAEYSSENS, M., TOMME, P. y KNOWLES, J. 1988. EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme. *Gene*. 63: 11-21.

SAROKIN, L. y CARLSON, M. 1986. Short repeated elements in the upstream regulatory region of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6: 2324-2333.

SCHMIDT, C., WHITTEN, B. y NICHOLAS, D. 1981. A proposed role for oxalic acid in non-enzymatic wood decay by brown-rot fungi. *Am. Wood. Press. Assoc.* 77: 157-164.

SEIBOTH, B., MESSNER, R., GRUBER, F. y KUBICEK, C. 1992. Disruption of the *Trichoderma reesei cbh 2* gene coding for cellobiohydrolase II leads to a delay in the triggering of cellulase formation by cellulose. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1259-1264.

SHOEMAKER, S., SCHWEICKART, V., LLADNER, M., GELFAND, D., KWOK, S., MYAMBO, K. y INNIS, M. 1983. Molecular cloning of exocellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/technology*. 1: 691-696.

SHOEMAKER, S., WATT, K., TSITOVSKY, G. y COX, R. 1983. Characterization and properties of cellulases purified from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/technology*. 1: 687-690.

- SILVER, P., KEEGAN, L., y PTASHNE, M. 1984. Amino terminus of the yeast *GAL4* gene product is sufficient for nuclear localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 5951-5955.
- SIMS, P., JAMES, C. y BRODA, P. 1988. The identification, molecular cloning and characterisation of a gene from *Phanerochaete chrysosporium* that shows strong homology to the exo-cellobiohydrolase I gene from *Trichoderma reesei*. *Gene.* 74: 411-422.
- STÄHLBERG, J., JOHANSSON, G. y PETTERSSON, G. 1988. A binding-site-deficient, catalytically active, core protein of endoglucanase III from the culture filtrate of *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Biochem.* 173: 179-183.
- STERNBERG, D., y MANDELS, G. 1979. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* 139: 761-767.
- STRAUSS, J., y KUBICEK, C., 1990. β -Glucosidase and cellulase formation by a *Trichoderma reesei* mutant defective in β -glucosidase constitutive. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1321-1326.
- TEERI, T., SALOVOURI, I. y KNOWLES, J., 1983. The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. *Bio/technology.* 1: 696-700.
- TEERI, T., LEHTOVAARA, P., KAUPPINEN, S., SALOVOURI, I. y KNOWLES, J., 1987. Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene.* 51: 43-52.
- TORCHIA, T. y HOPPER, J. 1986. Genetic and molecular analysis of the *GAL 3* gene in the expression of the galactose/melibiose regulon of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 113: 229-246.
- TRUMBLY, R., 1992. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6: 15-21.

- TSCHOPP, J., EMR, S., FIELD, C. y SCHEKMAN, R. 1986. *GAL2* codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 166: 313-318.
- VAHERI, M., LIESOLA, M. y KAUPINEN, V. 1979. Transglycosylation products of the cellulase system of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Lett.* 1: 41-46.
- VAHERI, M. 1983. Formation of oxidative activity for the initial degradation of cristaline cellulose by *Trichoderma reesei*. *J. Appl. Biochem.* 5: 66-74.
- WALKER, L. y WILSON, D. 1991. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresourse Technology.* 36: 3-14.
- WOOD, T.M. y MCCRAE, S., 1979. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. *Adv. Chem. Ser.* 181: 181-209.