

Tesis Doctoral

Regulación de la producción del sistema celulolítico por *Saccobolus saccoboloides*

Magnelli, Paula E.

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Magnelli, Paula E.. (1998). Regulación de la producción del sistema celulolítico por *Saccobolus saccoboloides*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3082_Magnelli

Cita tipo Chicago:

Magnelli, Paula E.. "Regulación de la producción del sistema celulolítico por *Saccobolus saccoboloides*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3082_Magnelli

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas.

Regulación de la producción del sistema celulolítico
por *Saccobolus saccoboloides*

Lic. Paula E. Magnelli
Directora: Dra. Flavia Forchiassin

Tesis para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

1998

Nº 3 0 8 2

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas.

Regulation of the cellulase complex production
by *Saccobolus saccoboloides*

Lic. Paula E. Magnelli
Director: Dra. Flavia Forchiassin

Doctoral Thesis
Universidad de Buenos Aires

1998

Esta Tesis está dedicada a la memoria de mi papá
Marcelo, quien me enseñó a estudiar
Y a mi mamá, Susana, que me enseñó que una
mujer, si se cae, siempre se levanta.

Y siempre recuerden:

there is a fine line between searching
and becoming a monster.

adaptado de García, C. y Aznar P. 1991. Cocamonga Dance
En: Tango 4. Columbia Rec. (ed). Sony Discs Inc.(dist.)

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis, la Dra. Flavia Forchiassin, porque su guía y especial colaboración fueron fundamentales para mi formación y mi trabajo.

Muchas gracias también por tu interés y dedicación en todos mis proyectos anteriores y actuales, porque siento que gracias a tu apoyo pude llegar a ser una mejor investigadora y docente. Y también te tengo que agradecer tu infinita paciencia para congeniar conmigo y para escucharme durante tantos años.

A la Dra. María Esther Ranalli, por su interés en mi trabajo y por todos sus consejos.

A todos mis compañeros de laboratorio, porque me encontré con un lugar de trabajo que voy a extrañar muchísimo. Gracias por acompañarme y ayudarme; a Diana y Marcela por enseñarme las electroforesis, a Laura por compartir siempre información útil, a María Delia por su apoyo en esta tarea y a Luis y a Oscar, por su especial ayuda técnica con el escáner y las computadoras. A Carlos, por su ayuda con las columnas. Además, a todos, por el cariño que me dieron por tantos años.

A todos los micólogos y botánicos que me formaron y hoy trabajan cerca mío, porque siempre tuvieron la mejor disposición para ayudarme con mi trabajo. A toda la nueva gente, por su cariño e interés, y les deseo mucha suerte para el futuro.

A mis queridos amigos: Andrea por tus ideas y toda tu ayuda, Alejandro, Ramiro, Leandro, Pepa, Sebastián, Alex y Matías. Primero, por su amistad y comprensión. Y por hacer de mis días acá tan divertidos, por ser tan buenos compañeros y por pasar días de docencia inolvidables. Nos deseo suerte a todos, y ojalá algún día podamos compartir nuevamente el trabajo de micólogos.

A la Sra Mercedes y la Sra Bruna, por su gentil colaboración todos los días. A toda la gente de la Secretaría del Departamento de Ciencias Biológicas por la buena disposición y amabilidad que siempre tuvieron conmigo.

Al CONICET y a la UBA, por las becas y subsidios otorgados.

A todos mis amigos, porque me hicieron sentir orgullosa de estar haciendo esta Tesis, y porque sin saberlo me permitieron seguir adelante aunque fuera un mal momento. A Cali, a Pepi, a Andy y a Andre Eleni, que me siguen desde la escuela, a Pata, a Rodi, a Sebas, a Clau y Juancho, a Mariana y a Sebas, por todo su apoyo.

A mi querida familia, por ser tan especiales. A mis hermanas Malena y Bettina, a mi hermano Esteban y también a Valeria. A todos por comprender este trabajo mio, que me saca tiempo para estar con ustedes, y sobre todo a mi mamá, Susana, por ser la mejor, más valiente y divertida madre que hay.

A Hernán, mi Caver, porque no vamos a parar, ya que gozar es tan necesario y diferente al dolor, porque tu walkman tiene pilas, porque encontré mi mapa y entonces la alegría no es sólo brasilera.

Y, como dijo Yuli:

MUCHO
TRABAJO
PERO NO IMPORTA
HAY GRANDES
OPORTUNIDADES

RESUMEN:

Regulación de la producción del sistema celulolítico por *Saccobolus saccoboloides*

Se evaluó la capacidad de *Saccobolus saccoboloides* (Pezizales, Ascomycetes) de producir el sistema celulolítico completo en medio de cultivo líquido sintético. La caracterización de las enzimas producidas permite afirmar que este hongo coprófilo es un verdadero agente celulolítico, ya que su complejo enzimático presenta las tres actividades necesarias para la digestión del polímero (β -1,4 endoglucanasa, β -1,4 exoglucanasa y β -glucosidasa), y que estas enzimas son extracelulares, termoestables y (a diferencia de las de otros organismos) poco inhibidas por producto final.

El crecimiento fue alto en glucosa y celobiosa, sin producción de enzimas, en tanto que en celulosa hubo muy buen crecimiento y actividad enzimática, evidenciándose diferencias de respuesta según el medio elegido. La nutrición nitrogenada no afecta la producción enzimática, sino el crecimiento: se investiga, por lo tanto, el control por fuente carbonada, en cultivos de reemplazo.

En la inducción, cuando no pudo medirse endoglucanasa, se utilizó un método alternativo de degradación de CMC (Carboximetilcelulosa) en placa (CMCasa).

La celulosa fue el mejor inductor, seguida por la lactosa. El sistema no se induce en presencia de glucosa, sorbosa, maltosa ni almidón, y se detecta una mínima actividad en xilano. La CMC es un pobre inductor, en tanto que la celobiosa tiene un efecto diferencial. Cuando se ensayó el efecto represor de los no inductores se ve que el sistema no se reprime fácilmente y que la glucosa y celobiosa tienen efecto diferencial. Finalmente la mezcla de dos inductores tiene un inesperado efecto negativo.

Las enzimas se producen en todos casos por síntesis *de novo*, las dos formas diferentes de β -glucosidasa se regulan independientemente, y existe inducción cruzada con el complejo xilanasa.

Estos datos, junto al análisis de isoenzimas producidas en cada condición permite postular un novedoso modelo regulatorio que explicaría cómo los hongos filamentosos son estimulados a producir las hidrolasas específicas para degradar celulosa.

Palabras clave: β -glucosidasa, celulasas, hongos filamentosos, *Saccobolus*

ABSTRACT:

Regulation of the cellulase complex production by *Saccobolus saccoboloides*

The cellulase complex production by *Saccobolus saccoboloides* (Pezizales, Ascomycetes) was evaluated. This fungus produces a complete cellulase system. The enzyme characterisation shows that *S. saccoboloides* is a true cellulolytic organism, the three enzymes (β -glucosidase, β -1,4 endoglucanase and β -1,4 exoglucanase) required for the complete cellulose hydrolysis were produced. All the enzymes were thermostable and did not show end-product inhibition.

Glucose and cellobiose were good sources for growth but not for enzyme production, cellulose was a suitable carbon source for growth and cellulase production: there was evidence for carbon regulation. The nitrogen source affected biomass production, and therefore enzyme production. For these reasons carbon nutrition was investigated as the primary control of cellulase production.

When endoglucanase and exoglucanase could not be measured, an alternative Carboxymethylcellulose-clearing method was used.

Crystalline cellulose was the best inducer, followed by lactose. The other mono- di- or polysaccharides were non inducers or poor inducers. Cellobiose or glucose repressed cellulase production in cellulose containing media. This repression was selective for some components of the cellulase complex, and was not observed using repressor concentrations below 3% w/v. Moreover, the degree of repression varied with the age of the cultures. The mixture of both inducers had an unexpected negative effect. Cellulase production by this fungus is inducible and subject to a complex repression by easily metabolized sugars.

The enzyme production is due to *de novo* synthesis, two different β -glucosidase forms were observed and cellulase-xylanase cross-induction was observed as well.

The data analysis shows that it is possible to present a new model of cellulase regulation, that would explain cellulose recognition and cellulase induction in filamentous fungi.

Key Words: β -glucosidase, cellulase, filamentous fungi, *Saccobolus*.

INDICE:

INTRODUCCION.....	1
Nota personal.....	1
Celulosa.....	2
Los hongos filamentosos: su rol como descomponedores.....	4
Degradación de celulosa.....	5
Degradación en hojarasca y suelo	6
Degradación de la madera	11
Degradación en estiércol	12
Degradación en el rumen	16
Degradación por hongos acuáticos	16
Celulasas fúngicas.....	17
Sistemas celulolíticos	17
Isoenzimas	18
Estructura molecular	18
Modo de acción	22
Producción del sistema celulolítico.....	25
El modelo regulatorio.....	25
Las primeras aproximaciones	25
¿Cómo se reconoce la celulosa?	27
El problema de la molécula inductora	28
El control por carbono	29
La represión catabólica	29
El promotor de los genes	30
Las exoglucanasas en la inducción	30
La β -glucosidasa en la inducción	30
La secreción: otro punto de control	31
¿cuál es la validez de este modelo?	31
Otras consideraciones.....	32
¿qué ocurre en otros hongos?	32
La transferencia tecnológica.....	32
Antecedentes en la familia Ascobolaceae.....	33
OBJETIVOS.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Organismo.....	35
Inóculo.....	35
medios de cultivo.....	35
medio líquido basal	35
medio celulosa cristalina	35
medio glucosa asparagina	35
medio maltosa	36
medio CMC	36
medio xilano	36
otros medios	36
medios para inducción	36

Cultivo.....	36
Cosecha.....	37
Determinación de peso seco.....	37
Proteínas de micelio.....	37
Proteínas extracelulares.....	37
Inducción en cultivos de reemplazo.....	37
Determinación de actividad enzimática.....	38
endoglucanasa.....	38
exoglucanasa.....	38
β-glucosidasa.....	38
CMCasa.....	39
endoxilanasas.....	41
xilanasas en placa.....	41
Localización de la actividad enzimática.....	41
obtención del micelio.....	41
procesamiento.....	43
tratamientos.....	43
reacciones.....	43
localización durante la inducción.....	44
Técnicas electroforéticas.....	44
preparación de las muestras.....	44
preparación del gel.....	45
condiciones.....	45
revelado.....	45

RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 46

1) CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO.....	46
Variables de reacción.....	46
intervalo de linealidad.....	46
temperatura de reacción.....	46
efecto del pH.....	48
termoestabilidad.....	48
Efecto de inhibición por producto.....	48
2) INFLUENCIA DE LOS NUTRIENTES.....	52
Nitrógeno.....	52
relación carbono/nitrógeno.....	52
variación de la concentración.....	53
Carbono.....	56
crecimiento en celulosa.....	57
crecimiento en glucosa.....	59
crecimiento en celobiosas.....	59
crecimiento en lactosa.....	61
crecimiento en maltosa y CMC.....	61
crecimiento en xilano.....	61
Crecimiento en celulosa combinada.....	64
adición de glucosa.....	64
adición de celobiosas.....	64
adición de lactosa.....	67
adición de CMC.....	67
Comentarios.....	70

3) UNA ALTERNATIVA EXPERIMENTAL:	
CULTIVOS DE REEMPLAZO.....	71
Influencia de la fuente de nitrógeno.....	71
Influencia de surfactantes.....	75
Condiciones estandar.....	75
4) EL CONTROL POR FUENTE DE CARBONO: INDUCCIÓN.....	77
Hipótesis generales.....	77
inducción con celulosa.....	77
inducción con CMC.....	79
inducción con celobiosa.....	81
inducción con lactosa.....	83
inducción con sorbosa.....	83
otros compuestos.....	83
Comentarios.....	86
5) EL CONTROL POR FUENTE DE CARBONO: REPRESIÓN.....	87
Efecto de la glucosa.....	87
Efecto de la maltosa.....	89
Efecto de la celobiosa.....	89
6) EL CONTROL POR FUENTE DE CARBONO:	
¿EXISTE EFECTO ADITIVO?.....	93
celulosa/lactosa.....	93
lactosa/CMC.....	98
celulosa/CMC.....	98
7) LOCALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	101
Naturaleza de la asociación.....	101
tratamientos químicos.....	101
tratamientos enzimáticos.....	103
comentarios.....	104
Localización a lo largo de la inducción.....	104
8) LA INDUCCIÓN SE DA POR SÍNTESIS DE NOVO.....	107
9) COINDUCCIÓN DE CELULASAS Y XILANASAS.....	107
10) DETECCIÓN DE ISOENZIMAS: ENDOGLUCANASA.....	112
Curva celulosa cristalina.....	112
Curva celulosa y CMC.....	112
Inducción con celulosa.....	112
Inducción con lactosa.....	116
Otros compuestos.....	116
11) DETECCIÓN DE ISOENZIMAS: ENDOXILANASA.....	119
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	120
BIBLIOGRAFÍA.....	129

introducción y
objetivos

NOTA PERSONAL

La degradación biológica de los materiales lignocelulósicos, haciendo una primera aproximación, parece un fenómeno simple, dado que se lo puede explicar como uno de los procesos que cierran el ciclo del carbono. A través de numerosas reacciones se degrada lo que se sintetizó a partir de los productos de fotosíntesis, hasta llegar a dióxido de carbono. El panorama se simplifica aún más si nos limitamos a analizar la biodegradación de la celulosa.

Presentado así, este fenómeno no nos pone frente a ningún problema que parezca importante resolver.

Un análisis más profundo muestra que algunos de los mecanismos y organismos involucrados son potencial o efectivamente útiles para las actividades humanas. Esto abre muchos puntos de interés, planteando el desafío de lograr que un proceso natural funcione en condiciones controladas y eficientes. De hecho, gran parte de la investigación apunta al desarrollo de nuevas tecnologías.

Pero, y a pesar de lo anterior, esta Tesis no tiene este enfoque biotecnológico. ¿Es que hay algo más para decir acerca de la celulólisis? Sí, porque si se observa en detalle se ven numerosos puntos oscuros, y muchos mecanismos fundamentales sin explicación.

Durante todo el tiempo que llevó hacer este trabajo estuvo presente la siguiente pregunta, que en mi opinión es el eje conceptual del mismo: ¿cómo puede la celulosa, un polímero insoluble, inducir la síntesis de las enzimas encargadas de degradarla? ¿cuál es el verdadero inductor de este sistema?. Analizando conjuntamente otros aspectos, los interrogantes se hicieron más complicados: ¿porqué los hongos filamentosos son los principales agentes celulolíticos? ¿existe o no un mecanismo que regule la degradación? ¿están acopladas, o mutuamente reguladas, síntesis y degradación?

Dado el nivel de entendimiento al que se llegó para otros procesos biológicos (la síntesis de pared celular, por ejemplo) parece increíble que no exista un modelo satisfactorio que explique el fenómeno por el cual se recicla la mayor parte del carbono existente en la Tierra.

Intentar develar alguno de estos interrogantes, que fueron planteados hace ya 40 años, fue el motor de esta Tesis, que procura dar explicaciones desde un enfoque lo más biológico posible, entendiendo esto último como la visión que considera simultáneamente todos los niveles (desde lo bioquímico a lo ecológico) que explican los procesos vitales.

Celulosa

Es imposible hacer un cálculo exacto de la cantidad de celulosa presente en este momento en la biosfera, una estimación razonable indica que hay alrededor de 1400 billones de toneladas. Cada año cerca de 28 billones de toneladas de celulosa son sintetizadas por las plantas, correspondiendo al 6% del CO₂ atmosférico fijado por los organismos terrestres y marinos.

La tasa anual de producción de celulosa (28 bill. ton.) representa sólo un 0.02% del total estimado (1400 bill. ton.). Pareciera que la masa de celulosa de la biosfera permanece estable, pero en realidad existe un sistema dinámico, en el cual se sintetiza y degrada constantemente (Markham y Bazin, 1990). Esta síntesis es realizada casi con exclusividad por las plantas y algas, siendo el principal componente de sus paredes celulares. Dado que, excluyendo el agua, un vegetal está constituido mayoritariamente por pared, se entiende por qué la celulosa es el biopolímero más abundante en la Tierra.

Es necesario analizar la estructura y función de la pared celular para comprender los factores que determinan su degradación, dado que los microorganismos no se enfrentan a los componentes de la misma en forma aislada. Es razonable decir que lo que funciona como sustrato son en realidad fragmentos de pared, en donde las macromoléculas están íntimamente relacionadas en determinada disposición espacial.

Las paredes celulares primarias de una gran variedad de plantas parecen tener muchas características en común, y pueden tener estructuras muy similares. Utilizando cultivos celulares de sicomoro, se pudo aislar pared primaria intacta, y analizar su composición sin interferencia de otros componentes del tejido. La composición porcentual obtenida (23% de celulosa, 21% de xiloglucanos, 20% de arabinogalactanos, 16% de ramnogalactanos, 10% de proteína rica en hidroxiprolina y 9% de tetraarabinosidos unidos a hidroxiprolina), sería semejante en otras especies (Albersheim, 1976). En estadíos maduros la pared primaria puede presentar, además, cantidades variables de lignina.

Un modelo estructural de la pared primaria muestra que la celulosa, un homopolímero lineal $\beta(1-4)$ -D-glucosa (formado por aproximadamente 2000 unidades), se dispone en haces de cientos de moléculas fuertemente empaquetadas (fibrilla). Estas fibrillas tienen zonas externas amorfas, y un centro altamente cristalino, lo que confiere a éstas una alta resistencia mecánica, además las zonas amorfas internas generan regiones de torsión, por lo cual las fibrillas no son rectas (Blackwell, 1982).

Estos haces de celulosa están inmersos en una matriz de hemicelulosa, sustancias pécticas y proteínas, como se esquematiza en la figura I (según Albersheim, 1976).

Los xiloglucanos (o los arabinoglucanos en monocotiledóneas) forman una monocapa que rodea la fibrilla, interconectándola a los polisacáridos pécticos. Las fibrillas no corren paralelas, sino que forman una red, cuya estructura queda determinada por las interconexiones en la matriz, la figura también muestra la disposición reticular propuesta para las gramíneas (Carpita y Gibeaut, 1993).

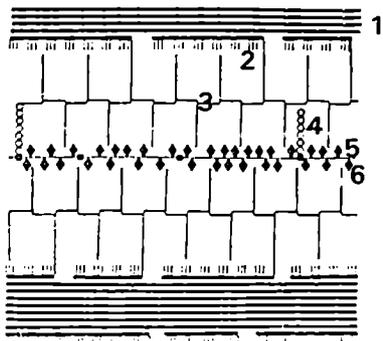


figura 1a: esquema de la composición de la pared primaria (sicomoro), según Albersheim, 1976.

- 1: fibrilla de celulosa
- 2: xiloglucano
- 3: ramnogalactano
- 4: arabinoglucano
- 5: proteína
- 6: tetraarabinósido

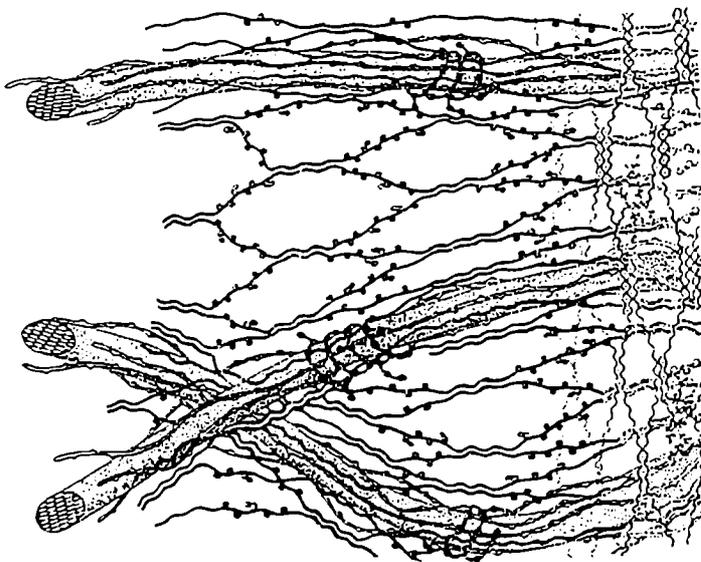
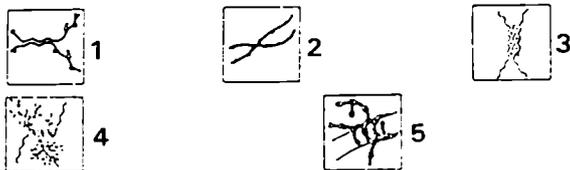


figura 1b: disposición espacial de los componentes de la pared celular de monocotiledóneas (Poaceae), según Carpita y Gibeaut, 1993.



- 1: glucuroarabinoxilano 2: xiloglucano 3: zona de unión pectina-glucuroarabinano
- 4: ramnogalactano 5: uniones fenólicas

La pared secundaria tiene una composición y estructura más variable, pero en líneas generales presenta las siguientes características: son más gruesas, están usualmente lignificadas y las fibrillas de celulosa están formadas por moléculas más largas (16000 unidades). La lignina, un compuesto aromático que incrusta la pared previamente formada por polisacáridos, es un heteropolímero amorfo, que ocupa el espacio entre las fibrillas confiriendo mayor resistencia a esta pared. La matriz de la pared secundaria, además, está compuesta por hemicelulosas y pectinas (Frey Wyssling, 1976).

La pared celular funciona a la vez como sostén y protección de los protoplastos, tejidos y órganos de las plantas, organismos sésiles que poseen estructuras perennes. Es comprensible, entonces, que la pared deba ser lo más inerte posible.

Esta necesaria estabilidad, sin embargo, dificulta el reciclado del carbono que las compone. La energía acumulada en otros componentes de un vegetal (por ejemplo almidón, azúcares o lípidos) es rápidamente transferida hacia los niveles tróficos superiores. La pared celular queda como un remanente, ya que no puede ser aprovechada por ningún metazoo. El caso extremo son los órganos leñosos, para los cuales prácticamente no existen consumidores.

El aprovechamiento de la energía que se encuentra acumulada en estas estructuras queda naturalmente restringido, en cuanto a organismos y posición dentro de las redes tróficas. Este material debe ser degradado sólo por organismos pequeños, preferiblemente sésiles, que influyan lo menos posible en la tasa de incorporación del material al ambiente: los descomponedores.

Los hongos filamentosos: su rol como descomponedores

La mayor parte de los organismos pertenecientes al Reino Fungi son organismos filamentosos. No puede hacerse una generalización acerca del tipo de nutrición, dado que si bien gran parte de los hongos son saprobios, numerosas especies son biotróficas (los endofitos, las micorrizas y los hongos parásitos). Sin embargo, sea biotrófica o saprófita, la nutrición fúngica está casi siempre asociada a las plantas.

Gran parte de los hongos son saprófitos sobre material de origen vegetal, el cual aprovechan por absorción directa (en el caso de moléculas sencillas) o por degradación extracelular, por medio de enzimas líticas. Entre los saprófitos existen organismos con una amplia capacidad degradativa, por lo tanto con una estrategia oportunista, y otros que se especializan en el aprovechamiento de sólo algunos compuestos.

Los hábitats de estos saprófitos son variadísimos, y algunos ocupan oportunamente más de uno. Es el caso de organismos de vida libre que ocasionalmente invaden

tejidos vegetales, nutriéndose de los mismos. Estos organismos llegan a ser patógenos (dado que causan un daño en la estructura de la planta) sin ser biótrofos, un ejemplo es *Penicillium oxalicum* (Ikotun, 1984). Este oportunismo también se hace evidente cuando se ve la diversa capacidad degradativa que presentan diferentes cepas de una misma especie.

Antes de continuar es importante destacar que, si bien muchos hongos parásitos causan necrosis y desorganización del tejido del hospedante, la capacidad celulolítica no es un determinante de la virulencia del patógeno. En particular en los hongos patógenos la regulación de la actividad celulolítica es diferente que en los típicos organismos saprobios (Heiler et al., 1993; Schauwecker et al., 1995). La patogenicidad, por lo tanto, no es causada por una falta de control en la actividad celulolítica sobre la planta viva,

Todo lo expuesto permite afirmar que el grueso de la degradación de celulosa es consecuencia de actividad no biotrófica.

Finalmente es necesario puntualizar algo más acerca de la función de los hongos filamentosos, responsables del 90% de la degradación de material de origen vegetal (ver siguiente sección). ¿Por qué los hongos y no las bacterias (o las levaduras) ocupan exitosamente este lugar? Ambos son descomponedores, pero la diferencia en el nivel de organización parece haber definido el éxito competitivo.

Además de enzimas (en verdad complejos enzimáticos) que permiten degradar paredes celulares vegetales, sin que sus componentes de pared (β -1,3 glucanos y quitina) sean afectados, los hongos poseen sistemas hifales de penetración en el sustrato sumamente eficientes. Estos presentan crecimiento polarizado y capacidad de traslocar nutrientes entre diferentes zonas del micelio, lo cual les permite crecer bien, con independencia de las microheterogeneidades del sustrato (Carlile, 1995). Por otro lado, facilita la dispersión, ya que en muchos casos el micelio vegetativo coloniza profundamente el medio, y sólo las porciones reproductivas emergen. Un organismo unicelular no podría lograr esto.

Degradación de celulosa:

Cabe aclarar que, y dado que la celulosa está físicamente protegida por los otros componentes de la pared celular, no parecen existir organismos exclusivamente celulolíticos, sino organismos degradadores de pared. Para tener éxito competitivo en estos sustratos un hongo debe poseer los sistemas enzimáticos celulasa, xilanasas y

pectinasa, inexistentes en otros grupos naturales, excepto algunas bacterias (una buena revisión de organismos celulolíticos puede verse en Mercuri, 1987a). Algunos de estos hongos, además, son capaces de degradar lignina.

La degradación de materiales lignocelulósicos se logra gracias a una acción biológica, en la que no sólo participan hongos, y la acción de otros organismos, inclusive los no celulolíticos, condiciona la velocidad de la degradación. Además los factores físico-químicos del sustrato afectan al proceso. Entre estos dos son fundamentales: la cantidad de humedad, y la cantidad de nitrógeno. Este último es particularmente escaso en los materiales celulósicos naturales, normalmente en una relación carbono/nitrógeno de 100:1, o aún mayor. Park (1975) presenta un análisis interesante de la influencia de esta variable en el proceso degradativo.

Los diferentes organismos van creciendo y aprovechando el sustrato, que a causa de esto cambia y adquiere propiedades nuevas. A medida que los cambios se suceden los primeros colonizadores ceden espacio a los siguientes, quienes pueden utilizar el sustrato en parte degradado. En cada una de estas etapas conviven e interactúan los muchos componentes de la microflora (y microfauna) que habita este espacio.

Teniendo en cuenta estas observaciones se puede describir a los hongos degradadores de material lignocelulósico como aquellos que poseen sistemas enzimáticos completos para digerir los polímeros de pared, y cuya nutrición se da en la naturaleza por este mecanismo. Esto descarta organismos que tienen capacidad de producir estas enzimas, pero que no ocupan estos espacios en forma habitual, y a los organismos que se encuentran habitualmente en estos materiales, pero aprovechando sustancias o bien aprovechando productos generados por las enzimas de otro organismo.

Teniendo en cuenta que la degradación de celulosa en cualquier ambiente implica la degradación más o menos simultánea de otros compuestos, y la acción conjunta de más de un organismo, se hace en la siguiente sección una breve descripción de este fenómeno.

Degradación de celulosa en hojarasca y suelo:

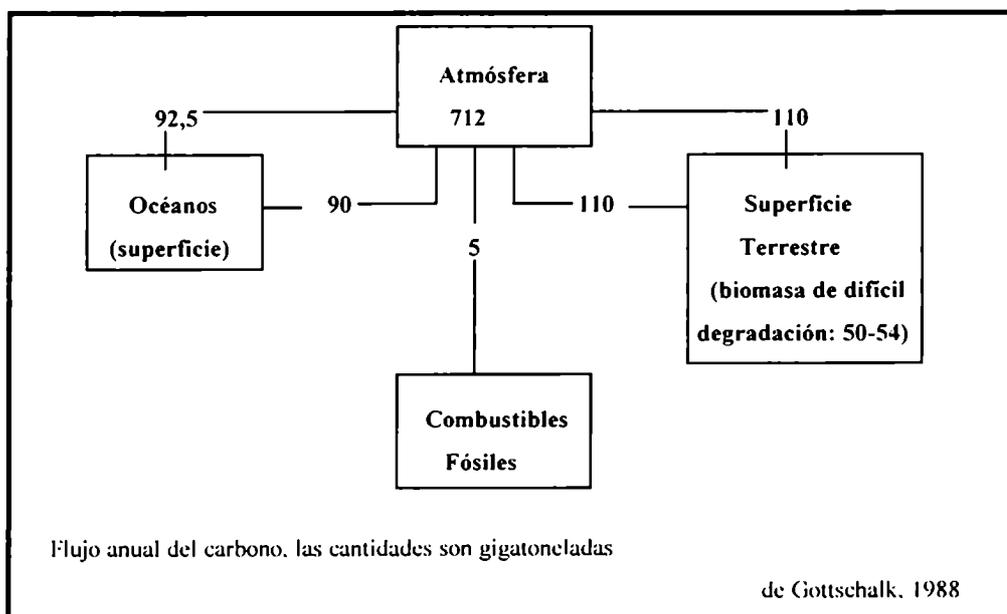
No es simple clasificar el material de origen biológico presente en el suelo, ni describir los procesos degradativos en este ambiente complejo y estratificado. Por otra parte no se pretende en esta sección explicar en detalle los numerosos y complejos fenómenos

que estudia la ecología del suelo, sino mencionar algunos puntos salientes relacionados con la degradación de lignocelulosas. Ciertos aspectos específicos, como la degradación de estiércol y madera, ambos presentes en el suelo, se tratan en detalle más adelante.

Al principio de la introducción se plantea, entre otros interrogantes, si la síntesis de lignocelulosas (por parte de las plantas) y su degradación (por parte de los descomponedores) están mutuamente reguladas. Para responder esto podría analizarse si la degradación de estos polímeros (hasta CO_2 y agua) se sincroniza anualmente con la síntesis.

Para empezar, y dada la gran cantidad de agua en el planeta, correspondería hacer un balance de masa de CO_2 , que no es abundante y sufre un ciclo de transformaciones químicas. Este análisis muestra que la cantidad de CO_2 en la atmósfera no es el factor limitante de la producción de biomasa vegetal. Dicho de otro modo: fluctuaciones más o menos grandes en la conversión de lignocelulosas a CO_2 no pueden alterar en forma significativa la productividad: si existe la coordinación entre ambos procesos, no es la liberación de CO_2 el paso que los sincroniza.

La figura II ilustra sintéticamente el balance en el ciclo del carbono:



Sin embargo, si se mira esta dinámica desde otro punto, la hipótesis de coordinación entre síntesis y degradación puede ser planteada. A continuación se hace una síntesis de la misma, según las revisiones de Witkamp y Ausmus (1975) y Swift (1975)

Primero hay que tener en cuenta los factores que realmente limitan la productividad primaria: cuando el agua es suficiente, como en los bosques caducifolios templados, los nutrientes limitantes suelen ser fósforo, potasio y nitrógeno. En segundo término hay que pensar a un bosque como un sistema acumulador de nutrientes. En estos ecosistemas ocurre un casi completo reúso de los elementos esenciales, lo cual determina su éxito y estabilidad. Un ejemplo que apoya esta interpretación es el de la selva tropical, cuyo suelo es pobre, si bien sostiene una abundante biomasa vegetal. Cuando con fines agrícolas se elimina la vegetación, se retira también la reserva de nutrientes inmovilizados en ella, interrumpiéndose el ciclo de aprovechamiento. Estos suelos sólo rinden unas pocas campañas de cultivo, y rápidamente se convierten en páramos de arcilla suelta.

Antes de continuar es necesario aclarar que este enfoque de sistema acumulador es válido también para otros ecosistemas, como la tundra, las praderas o los bosques de coníferas.

La acción de los microorganismos descomponedores está limitada también por estos elementos. A causa de esto se establecen relaciones de competencia, que determinan la aparición de estrategias muy diversas para el aprovechamiento: a partir del recurso primario (por ejemplo las hojas de determinada especie) se generan, por la acción de la microflora y microfauna, muchos recursos secundarios (heces, restos de material no atacado, material parcialmente degradado, etc.). Cada uno de estos recursos secundarios, además, es aprovechado de varios modos. La diversificación se da por especialización espacial (p.ej: degradación preferencial de un componente de esa hoja) o temporal (acción temprana o acción tardía). El resultado final es que cada parte de una planta se descompone gradualmente. Los elementos limitantes que la componen quedarán retenidos dentro de las células de los diferentes descomponedores. Como unos perduran más que otros, la liberación de los elementos al suelo es gradual, permite al humus retenerlos y a las raíces asimilarlos, evitando gran parte de la lixiviación.

Todo en conjunto determina una sincronía anual entre descomposición (que marca la tasa de liberación de nutrientes) y productividad primaria (determinada por la asimilación de nutrientes en las raíces).

La senescencia periódica de hojas y raíces parece ser una manera efectiva de mantener los niveles de productividad muy por encima de lo que se espera (según la cantidad de nutrientes libres o aportados externamente desde la atmósfera o desde la roca madre).

Este mecanismo parece estar bien ajustado en los bosques de caducifolias, en tanto que en los bosques de coníferas podría ser menos eficiente. Dado que estas plantas trastocan gran parte de los nutrientes desde las hojas hacia otras partes de la planta, estas caen empobrecidas y, además, con alto contenido de lignina y resinas, lo cual dificulta su descomposición. En algunas áreas la acumulación crónica de detritus resulta en un "secuestro" de nutrientes, que eventualmente puede determinar la desaparición del bosque.

El reciclado de nutrientes se impulsa con la energía acumulada en la celulosa y otros materiales de pared. Los hongos, entonces, como principales agentes de degradación, juegan un papel clave en esta liberación gradual de nutrientes limitantes.

No puede hacerse con facilidad una lista de los hongos que actúan en el suelo. El tipo de vegetación y las condiciones climáticas determinan qué organismos van a desarrollarse: es inapropiado hacer una flora "típica", la enumeración de la flora fúngica del suelo sólo tiene sentido si se conoce el área en cuestión.

La descripción general que sí puede hacerse es la secuencia aproximada según el tipo de estrategia en el uso del recurso. Este puede ser cualquier órgano vegetal, los organismos que aparecen sobre órganos diversos (de diversas especies vegetales) son recurso-independientes (o generalistas). Los Deuteromicetes, que en general aprovechan rápidamente el sustrato y dan gran cantidad de esporas, son organismos de este tipo. Los organismos recurso-dependientes son los que aparecen preferentemente en ciertos sustratos, por ejemplo se ve que las especies de Xylariales y Aphylllophorales se dan sobre órganos leñosos, y no sobre hojarasca.

Para la descomposición de hojas, por ejemplo, los primeros en aparecer son hongos del filoplano, saprófitos o parásitos de la hoja viva, todos especialistas. Con respecto a los parásitos biótrofos, en la hoja caída se ve en realidad la fase reproductiva, que da estructuras de resistencia o de dispersión hacia nuevo follaje. Esta primera flora recurso-dependiente (saprófita o parásita) se ve también en material leñoso caído. Luego aparece una segunda flora, que es mixta, con hongos generalistas y hongos especialistas, que sólo colonizan el material una vez incorporado al suelo. Esta flora no tiene una composición de especies constante, ya que las características del sustrato van cambiando a causa de la actividad biológica (pH, tamaño de la partícula, presencia de metabolitos y nutrientes). Es importante aclarar que celulosa, hemicelulosa y lignina no se degradan sucesivamente como anteriormente se postulaba (ver degradación de estiércol, hipótesis nutricional) y no es la cantidad relativa de estos compuestos la que

determina fuertemente la composición de la flora celulolítica o lignolítica. Por otra parte las relaciones interespecíficas (antibiosis, micoparasitismo, predación) y los factores físicos (humedad, temperatura) también van marcando el momento en que un hongo aparece o desaparece de la comunidad.

Además de los determinantes ambientales, los métodos de aislamiento generan inconvenientes para la correcta descripción de la flora del suelo. Aún los mejores ejercen algún tipo de selección, siempre es posible no registrar algún organismo que está creciendo activamente en el suelo, o bien aislar alguno que estuviera presente en una forma de resistencia.

El uso de medios de cultivo inadecuados (medios ricos, por ejemplo), ha llevado a conclusiones erradas. En un relevamiento de hongos celulolíticos, especies de *Penicillium* y *Trichoderma* sólo se aislaron usando niveles de nitrógeno muy superiores a los calculados para el suelo. En condiciones similares a las que existirían en la naturaleza (un nivel de nitrógeno 100 veces menor que el medio anterior) aparecieron especies que normalmente son consideradas como poco significativas en la degradación de celulosa (Park, 1975).

Además, algunos hongos que no presentaron actividad degradativa en este medio pobre son mencionados usualmente como degradadores de celulosa característicos y cosmopolitas: su alta actividad se describe para condiciones de laboratorio óptimas, con respecto a nutrición, pH y temperatura. Estas condiciones seleccionan positivamente para una alta velocidad específica de crecimiento, mientras que en el suelo los organismos pueden ser exitosos con velocidades de crecimiento relativamente bajas, en tanto presenten alta afinidad por el sustrato.

Como se ve además de ser compleja, la degradación de celulosa en el suelo respondería a factores que normalmente no se tienen en cuenta. En especial parece que la presión selectiva no es en la dirección de degradarla lo más rápido posible, al contrario, se favorecería la degradación lenta, en tanto responda a un aprovechamiento más eficiente del recurso primario. Por otra parte la actividad real que un organismo desarrolla en el suelo no necesariamente se refleja en condiciones estandarizadas. La potente degradación de celulosa es un fenómeno de laboratorio, de interés biotecnológico. Poco aclaran los estudios realizados con estas cepas hiperproductoras acerca del pobremente comprendido proceso global de descomposición.

Degradación de la madera:

Los hongos celulolíticos que actúan en la descomposición de la madera se clasifican en tres grupos, según el mecanismo de ataque (Markham y Bazin, 1990).

Los hongos de pudrición blanda atacan la celulosa, ingresando por el lumen de las células, atraviesan la capa más interna de la pared secundaria (S_3 , la más lignificada), llegando a las capas exteriores, más ricas en celulosa, las cuales degradan. Sus sistemas enzimáticos están muy asociados a las hifas, por lo que dejan un "fantasma" de degradación alrededor de las mismas, dado que sus sistemas son muy poco difusibles. Este tipo de pudrición fue descrito inicialmente para especies de *Chaetomium*, pero actualmente se consideran de este grupo muchos Ascomicetes y Deuteromicetes celulolíticos, y no todos están especializados en degradación primaria de la madera.

Los dos grupos siguientes incluyen hongos típicamente xilófagos. Los hongos de pudrición castaña, los cuales también mayormente degradan celulosa e ingresan por el lumen, poseen sistemas enzimáticos muy difusibles, que llegan a las capas exteriores (S_2 y S_1). Estas enzimas desorganizan severamente la pared, dejando casi intacta la lignina (presente en mayor cantidad en la capa S_3), por lo que el tejido pierde cohesión, generándose las estructuras poliédricas castañas, típicas de este tipo de pudrición. Algunas especies de los géneros *Gloeophyllum* y *Poria* pertenecen a este grupo de hongos.

Finalmente se definen los hongos de pudrición blanca. Estos pueden degradar celulosa y lignina, por lo que este tipo de pudrición desorganiza completamente el tejido lignificado. A este grupo pertenecen los agentes de pudrición de la madera más potentes: especies de los géneros *Ganoderma*, *Trametes*, *Polyporus*, *Pleurotus*, *Phellinus*, *Libertella*, *Xylaria*, *Hypoxylon*, y *Phanerochaete chrysosporium* (*Sporotrichum pulverulentum*), el más estudiado degradador de lignina. Muchas de estas especies atacan madera en pie, causando graves daños en la estructura de sostén, por ejemplo especies pertenecientes a *Ganoderma*, que generan enfermedades crónicas en árboles, los cuales pueden llegar a marchitarse al cabo de muchos años.

Junto a estos hongos siempre progresan hongos y bacterias oportunistas no celulolíticos que aprovechan azúcares libres (presentes en la madera o producidos por la acción de los xilófagos). Entre estos aparecen los hongos de tinción (stainers), cuya acción de deterioro de la madera (sobre todo en almacenamiento), no se relaciona

directamente con su capacidad celulolítica (Sanchez et al., 1995). Otro componente importante del proceso degradativo, es la acción de insectos que reducen rápidamente el tamaño de la partícula.

Degradación de la celulosa en estiércol:

Las heces de herbívoros, un sustrato rico en material lignocelulósico, están notoriamente enriquecidas en nutrientes con respecto al material vegetal original. Por lo tanto representa un hábitat excelente para muchos hongos y también para pequeños animales, bacterias y protozoos, quienes aprovechan la materia orgánica remanente. De hecho en la materia fecal, tanto la producida por mamíferos herbívoros (estiércol) como la originada por artrópodos y otros pequeños animales del suelo, se observa mayor actividad fúngica y mayor cantidad de organismos que en el suelo circundante (Lodha, 1974).

Los factores que determinan su mayor degradabilidad son: una cantidad relativamente alta de materia orgánica soluble, alto contenido de nitrógeno, vitaminas, minerales y otros factores de crecimiento, y una estructura física (donde el material vegetal está procesado y particulado) que resulta en una buena aireación, retención de agua y exposición de los polímeros de pared. Con respecto al estiércol de grandes herbívoros, especializados en el aprovechamiento de la celulosa por la acción de organismos simbiotes, queda en este material suficiente celulosa como para sostener el desarrollo de organismos especializados.

Los hongos fimícolas no se clasifican como hongos del suelo, si bien el estiércol está normalmente en él, debido a que no sólo están especializados en el aprovechamiento de este sustrato, sino además porque tienen mecanismos (estrechamente asociados con el herbívoro) que les permiten reaparecer en el estiércol.

Este particular modo de dispersión se da por medio de la descarga violenta de las esporas, a considerables distancias, en dirección a la luz. Esto permite que las esporas lleguen a la hierba, y queden allí adheridas gracias al mucílago que las recubre. Como la mayoría posee pigmentos oscuros, están protegidas de la acción de los rayos solares. En el género *Pilobolus*, con esporas hialinas, estas son descargadas en masa, protegidas por la pared del esporangio que es pigmentada. Las esporas entran junto con la hierba al tracto digestivo del herbívoro, pasan por él manteniendo su viabilidad y sufriendo procesos que les permitirán germinar rápidamente una vez que la materia fecal es depositada.

Este grupo está formado por los géneros *Pilobolus* (Mucorales), *Podospora*, *Sordaria* (Sphaeriales), *Ascobolus*, *Ascodesmis*, *Ascophanus*, *Coprotus*, *Iodophanus*, *Lasiobolus*, *Saccobolus*, *Thelebolus* (Pezizales, Ascobolaceae) y *Coprinus* (Agaricales), entre otros. Algunas especies pertenecientes a estos géneros pueden colonizar, además, otros sustratos (Lodha, 1974).

Muchos hongos que usualmente aparecen en el estiércol no llegan a él por estos mecanismos especializados, y por lo tanto son muy comunes también en el suelo y hojarasca. Algunos ejemplos son especies de los géneros: *Cunninghamella*, *Kickella*, *Mucor*, *Rhizopus* (Mucorales), *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Trichoderma* (Deuteromicetes), *Chaetomium*, *Lasiosordaria* (Sphaeriales), *Gymnoascus*, *Eurotium*, *Thielavia* (Eurotiales). Sus esporas alcanzan el estiércol por medio de salpicaduras, corrientes de aire o transporte por insectos. Estos hongos son muy comunes en las heces de artrópodos y nematodos del suelo, donde crecen mejor que en los restos vegetales intactos.

La sucesión regular de las fructificaciones de ciertos grupos de hongos es un fenómeno natural bien conocido (Webster, 1970). A partir de estas observaciones se propuso lo que luego se denominó hipótesis nutricional. Según lo propuesto por este modelo, los requerimientos nutricionales de cada hongo son la causa de esta sucesión. Los Zigomicetes aparecen en la fase temprana de la secuencia. Sus esporas germinan fácilmente y su crecimiento es comparativamente rápido. Son incapaces de degradar celulosa o lignina, y por ende dependen de altas concentraciones de azúcares solubles. En cuanto estas moléculas se agotan, desaparecen, momento en que surgen Ascomicetes e Hifomicetes capaces de degradar celulosa. La lignina se descompone hacia la fase final, dado que los Basidiomicetes (que pueden degradar este polímero) aparecen tarde en la secuencia. Las esporas de Ascomicetes y Basidiomicetes germinan más tarde que las de los Mucorales, y el crecimiento del micelio es más lento.

Esta explicación fue aceptada sin haberse comprobado experimentalmente algunas suposiciones, tanto acerca de los requerimientos nutricionales como de la composición química del sustrato a lo largo de la degradación.

Por esto, cuando se analizó la sucesión en estiércol bajo condiciones controladas se obtuvieron resultados que no coinciden exactamente con lo que esta hipótesis propone.

La siguiente tabla reúne los datos obtenidos por diferentes investigadores, y muestra que la secuencia de aparición no está claramente delimitada. Las superposiciones indican que organismos con diferentes tipos de nutrición conviven por largos períodos.

	estiércol de:					
	caballo	vaca	búfalo	rata	mono	conejo
Mucorales	4 - 8	4 - 6	4	4 - 8	4 - 8	2 - 8
Hifomicetes	6 - 10	6 - 18	8 - 12	6 - 8	6 - 14	2 - 22
Pezizales	8 - 12	10 - 14	10	8 - 10	---	6 - 22
Sphaeriales	12 - 16	10 - 20	14	10 - 18	16 - 22	9 - 28
Eurotiales	---	16 - 18	16	12 - 14	---	---
Basidiomicetes	*	*	*	*	*	9 - 37

(los números corresponden a días).
*: aparece, pero no fue identificado

de Lohda. 1974

Con respecto a la composición del sustrato no hay muchos estudios realizados, pero al menos en uno se muestra que los polímeros son degradados simultáneamente desde el inicio, aunque con tasas diferentes.

Además el contenido de materia orgánica soluble no decae rápidamente, por el contrario, se mantiene constante a lo largo del proceso de descomposición, como muestra la tabla:

Composición química del estiércol de caballo durante la descomposición (datos en gramos, peso seco)					
	inicial	9 días	19 días	33 días	47 días
materia orgánica soluble	6.92	6.93	6.08	5.43	4.50
hemicelulosa	31.93	26.06	18.17	13.31	8.04
celulosa	48.00	36.81	22.79	12.98	10.06
lignina	31.80	27.39	25.97	24.50	23.40
cenizas	13.86	13.15	12.86	14.59	14.79
proteína. insolubles	8.94	11.25	13.08	12.40	13.26
total	115.45	134.29	107.95	89.71	84.55

de Lohda. 1974

El estudio de la reproducción de estos organismos hace suponer que la sucesión es consecuencia del tiempo mínimo (factor intrínseco) que cada especie necesita para alcanzar la madurez, y muestra, además, que es falsa la suposición de que las

esporas germinan en momentos significativamente diferentes (Wicklow et al., 1980). Tampoco la persistencia de los cuerpos fructíferos puede ser interpretada usando la hipótesis nutricional. Con respecto a este carácter se establecen dos categorías: especies efímeras, que perduran menos de 40 días, y especies persistentes, que fructifican por más de 50 días. Dentro de la primer categoría están las especies que se presumen típicamente coprófilas (descargan violentamente sus esporas). En la segunda, con excepción de *Sordaria*, se agrupan organismos que no se dispersan por mecanismos especializados. La falta de correlación entre persistencia y nutrición es clara, en ambos grupos hay tanto hongos que usan materia orgánica soluble como hongos que degradan celulosa y hemicelulosas.

Por último hay que analizar la influencia de interacciones interespecíficas sobre la fructificación. Se ha comprobado que, si bien la degradación de un sustrato es un proceso natural cooperativo, la competencia entre ciertos hongos disminuye la potencia de la degradación (Wicklow et al., 1979; Wicklow y Hirschfield, 1979). Esta ineficiencia en la utilización del sustrato podría generar, por ejemplo, un retardo en la fructificación para alguna especie (Wicklow y Yocom, 1981). Otros antagonismos pueden contar también, por ejemplo la antibiosis impediría que prosperen algunas especies capacitadas para la degradación. Por otra parte, la producción de metabolitos por parte de un hongo podría facilitar el crecimiento de otro.

Como se ve la hipótesis nutricional tal como fue postulada no es correcta, sin embargo no se invalida que la degradación completa del sustrato se da por la acción conjunta, simultánea o sucesiva, de distintos organismos, incluyendo bacterias y animales, además de hongos. Para cada uno podría definirse un nicho: un espacio n-dimensional (donde n es el número de factores ambientales que afectan su desarrollo) que está determinado básicamente por sus características genéticas. Sin embargo, la magnitud que este hipervolumen tiene en la naturaleza está determinada por la presencia de otros organismos que alteran la disponibilidad de los recursos. Este enfoque permite ver por qué la velocidad y alcance de la degradación de celulosa en el estiércol no dependen de la cantidad y calidad de enzimas que los hongos puedan producir, sino de la acción enzimática que realmente se da, sobre un sustrato que está previamente procesado de determinada manera.

Degradación en el rumen:

En el tracto digestivo de los rumiantes una flora mixta de bacterias, protistas y hongos permite a estos herbívoros aprovechar polímeros ricos en energía, sin poseer los complejos enzimáticos para ello.

Estos animales desgarran precipitadamente las hojas de gramíneas, y otras partes vegetales y las almacenan, regurgitándolas y masticándolas luego.

La fermentación anaerobia ocurre en el rumen, donde se degradan celulosa y otros polisacáridos. Los productos finales de degradación son aprovechados por el animal, que depende de la energía que obtenga de la celulosa.

Entre estos microorganismos simbioses se encuentra el hongo *Neocallimastix frontalis*. Hasta la década del '60 las zoosporas de este Chitridiomycete se confundieron con protozoos y no se consideraba que existieran hongos en esta microflora, actualmente se conoce que es uno de los hongos más comunes en este hábitat, se describió su capacidad celulolítica y se han caracterizado sus enzimas (Vavra y Joyon, 1966; Orpin, 1981; Borneman y Akin, 1994).

Degradación de celulosa por hongos acuáticos:

Gran parte de la síntesis de celulosa es realizada por algas y plantas acuáticas, sin embargo poco se conoce acerca de la dinámica de descomposición en ambientes acuáticos, particularmente en los océanos. Comparado con la cantidad de especies terrestres el número de hongos marinos o de agua dulce es bajo, si bien es cierto que el número de especies acuáticas está subestimado, debido a obvias dificultades metodológicas.

Se conocen especies celulolíticas entre los Ascomycetes marinos y entre los Chitridiomycetes e Hifomicetes de agua dulce, aunque no hay certeza de que actúen como degradadores de celulosa *in situ* (Markham y Bazin, 1990).

Dado que los hongos son en su mayoría organismos aerobios se explica por qué no representan una parte importante de la microflora de estos ambientes, por ejemplo los fondos marinos y lacustres, que son fuertemente anaerobios.

Por otro lado la actividad celulolítica que algunos Oomicetes presentan, por ejemplo Saprolegnia, no tiene carácter nutricional, sino morfogénico. En estos hongos (con paredes de celulosa), las enzimas son importantes en el crecimiento (Fevre, 1977).

Celulasas fúngicas:

Como ya se explicó, los procesos de descomposición del material de origen vegetal son numerosos y complejos. El tamaño de partícula del sustrato, la humectación y otros factores no enzimáticos juegan un papel clave. Sin embargo la degradación de las moléculas de celulosa (y otros polímeros de pared) sólo es posible a través de mecanismos enzimáticos. Es decir: a menos que organismos celulolíticos colonicen el sustrato, y efectivamente sintetizen celulasas, esta permanecerá intacta.

Todos los organismos que pueden degradar celulosa secretan sistemas enzimáticos más o menos complejos, compuestos por varias enzimas que actúan conjuntamente para hidrolizar la celulosa hasta glucosa. Los mejor caracterizados son los de *Phanerochaete chrysosporium* (*Sporotrichum pulverulentum*), un hongo de pudrición blanca, los de algunas especies de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Agaricus* y los de *Trichoderma koningii*, *T. viride* y *T. reesei* (Coughlan y Ljungdahl, 1988), este último el más estudiado agente celulolítico, que ha servido para elaborar los modelos de regulación, producción y modo de acción de celulasas (Kubicek et al., 1993a). *T. reesei* (Simmons, 1977) es un mutante hiperproductor obtenido en laboratorio (Mandels et al., 1971), lo cual explica, en parte, que los modelos propuestos no siempre ajusten con los resultados obtenidos usando otras especies.

La producción y modo de acción de las celulasas fúngicas no han sido muy estudiados en el ambiente natural, los estudios de laboratorio, debido a su factibilidad y repetibilidad, permiten elaborar hipótesis (con ciertas limitaciones) acerca de cómo ocurre. Los datos experimentales obtenidos son muchos, están compilados en muy buenos trabajos (Wood y García Campayo, 1990; Béguin, 1990; Kubicek et al., 1993a). La siguiente sección sintetiza los conceptos más relevantes mencionados en ellos, actualizados con algunos datos recientes.

Sistemas celulolíticos:

Se han definido tres tipos de celulasas fúngicas: a) celobiohidrolasas o exoglucanasas (CBH), las cuales atacan la molécula por el extremo no reductor, liberando paso a paso dímeros (celobiosa), b) endoglucanasas (EG) las cuales atacan uniones en cualquier zona de la molécula, al azar, y c) β -glucosidasas (BG) que hidrolizan celobiosa (ocasionalmente celooligosacáridos de bajo peso molecular) hasta glucosa.

Todas estas enzimas actúan sobre uniones β -1,4. Aunque hay algunas excepciones, los sistemas celulolíticos eficientes están compuestos por las tres clases de enzimas.

Para determinar si una enzima ya purificada es de uno u otro tipo, debe analizarse su actividad sobre varios sustratos. La tabla muestra el criterio de mayor consenso:

	celulosa cristalina	celulosa amorfa	CMC	celooligosacáridos	celobiosa
CBH	baja	muy activa	nula	activa	nula
EG	nula	muy activa	muy activa	activa	nula
BG	nula	nula	nula	activa	activa

según Wood y García Campayo, 1990.

Es pertinente aclarar que este diagnóstico es utilitario y no debe considerarse como una descripción del modo de acción. Este error se comete muchas veces, ambos conceptos se confunden y se oscurece la interpretación de los datos obtenidos. Más adelante se vuelve sobre esta problemática, explicando, por ejemplo, qué significa que la endoglucanasa no sea activa sobre celulosa cristalina.

El criterio de especificidad antes presentado puede ser contradictorio con ciertas observaciones: se han encontrado exoglucanasas que no liberan exclusivamente celobiosa (Schmid y Wandrey, 1990), o que presentan actividad de tipo endoglucanasa (Kyriacou et al., 1987). La explicación puede ser simple: las enzimas pueden no estar perfectamente purificadas, o pueden formar complejos. Desde que se difundió el uso de técnicas de clonación las enzimas han podido obtenerse en forma pura, y en algunos se resolvió el interrogante planteado. Por otra parte el uso de sustratos celulósicos no estandarizados también da lugar a resultados confusos.

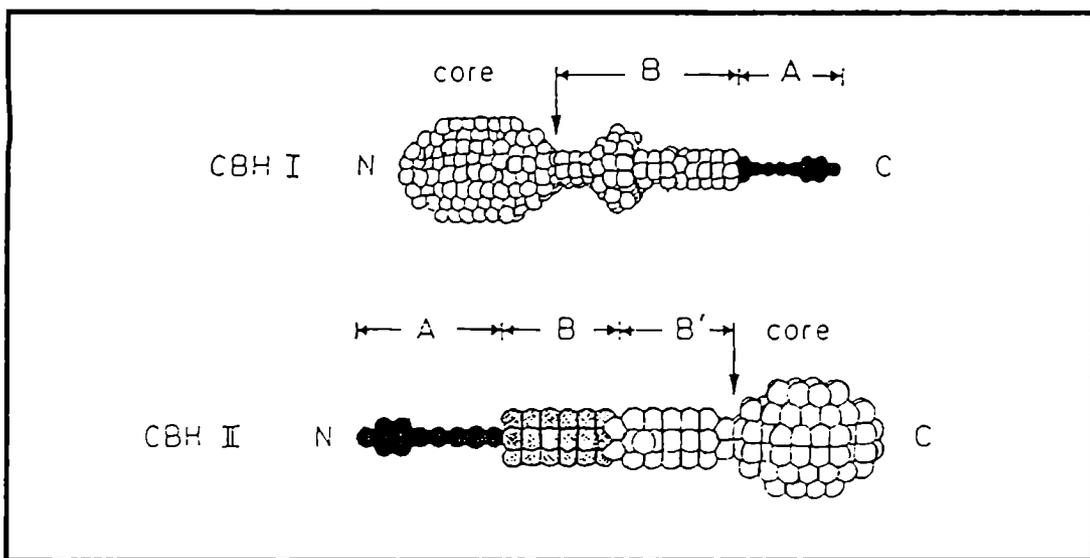
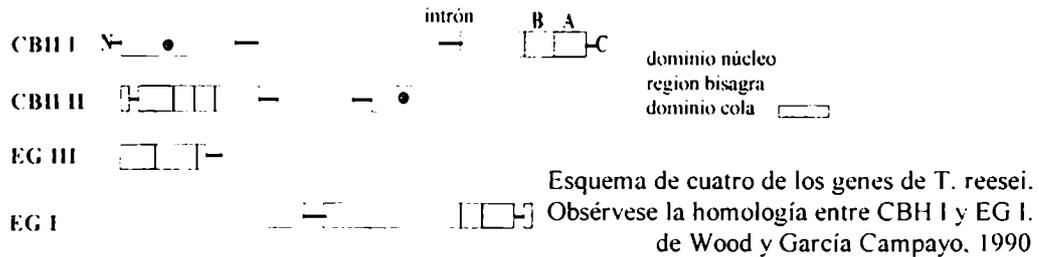
Isoenzimas:

Todos los sistemas fúngicos conocidos son multienzimáticos, el número de componentes depende del organismo, las condiciones de cultivo y las técnicas de purificación. Por ejemplo para *T. reesei* se conocen entre 4 y 8 endoglucanasas 2 exoglucanasas y 1 a 2 β -glucosidasas. En todos los casos parece que sólo algunos componentes están genéticamente determinados, otros son el resultado de glicosilación diferencial, de proteólisis parcial, de asociación con fragmentos de pared fúngica o de agregación entre enzimas (Willick et al., 1984).

Estructura molecular de las celulasas:

Las secuencias primarias de celulasas de origen fúngico y bacteriano han sido comparadas, parece que todas estas enzimas están compuestas por dos dominios funcionales distintos: un dominio núcleo (poco conservado) y un dominio cola (muy conservado).

Por ejemplo, para *T. reesei* han sido clonadas y secuenciadas dos exoglucanasas (CBH I y II) y dos endoglucanasas (EG I y III). La figura muestra un esquema de las secuencias, y la estructura tridimensional propuesta.



Las cuatro enzimas tienen regiones de alta homología (A: 70 %, B: 50-60%). La estructura del dominio cola tiene forma aplanada, con una cara hidrofóbica y otra hidrofílica, su función es la adhesión al sustrato y además se postula que interactúa con la fibrilla, "abriéndola" y disminuyendo localmente la cristalinidad, favoreciendo así el clivaje de las uniones. El dominio núcleo es la región catalítica, tiene la forma de un túnel (en las CBH) y contiene al sitio activo.

La región bisagra conecta ambos dominios, es flexible y está altamente glicosilada, se supone que para prevenir el ataque proteolítico o bien para asegurar una distancia mínima entre ambos dominios funcionales. Esta región permite a la enzima unirse al sustrato por el dominio de adhesión, y deslizarse lateralmente llevando al dominio catalítico hacia nuevos sitios de corte (Srisodsuk et al., 1993).

La comparación de los dominios catalíticos según el análisis de secuencias de aminoácidos establece diferentes familias, como se resume en la sig. tabla:

Familia	Sub-Familia	Organismos	modo de acción y enzima
A	A1 a A4 A5	diferentes géneros bacterianos <i>Trichoderma reesei</i> <i>Schizophyllum commune</i>	ENDO y algunas xilanasas ENDO (EG III) ENDO
B	B1 B2	diferentes géneros bacterianos <i>Trichoderma reesei</i>	ENDO EXO (CBH II)
C		<i>Trichoderma reesei</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	ENDO (EG I) EXO (CBH I) EXO
D y E		Diferentes géneros bacterianos	ENDO
F		Diferentes géneros bacterianos	xilanasas y ENDO

adaptado de Béguin. 1990

Esta clasificación realizada por Henrissat se ha ampliado: se definieron más familias en donde se incluyen celulasas de otros hongos (Henrissat, 1991; Henrissat y Bairoch, 1993). La mayor parte de estas familias incluyen enzimas de origen muy diferente, y de acción muy distinta. Asumiendo que estas secuencias primarias similares se corresponden con una forma tridimensional y sitios activos también similares, se puede pensar que la variedad de enzimas requeridas para la hidrólisis podría generarse con cambios sutiles en el dominio catalítico, no es estrictamente necesaria la aparición de enzimas totalmente diferentes.

El análisis para la región de adhesión muestra una situación muy diferente:

Dominio catalítico Tipo	Función	Presente en	Familia	Posición
<i>Trichoderma reesei</i>	adhesión sustrato	<i>T.reesei</i> CBH I <i>T.reesei</i> CBH II <i>T.reesei</i> EG I <i>T.reesei</i> EG III <i>P. chrysosporium</i> CBH I	C B C A C	C term. N term. C term. N term. C term.
<i>Cellulomonas fimi</i>	adhesión sustrato	<i>C. fimi</i> y otras bacterias	varias	C o N term.
<i>Clostridium thermocellum</i>	adhesión sustrato o unión al celulosoma	<i>C. thermocellum</i>	varias	C o N term.
<i>Bacillus subtilis</i>	?	<i>Bacillus</i> sp.	A y F	C term.

adaptado de Béguin, 1990.

Como se ve, al menos para los genes analizados, cada familia se corresponde con un tipo de organismo y, al contrario que para el dominio núcleo, no comparten secuencias procariontes y eucariontes. Todas las enzimas de un organismo presentan una

región de adhesión similar, independientemente de qué clase de región catalítica posean o de qué tipo enzima sea.

¿Qué parte de la estructura molecular es responsable del modo de acción endo o exo? Observando la estructura de las celulasas de *T. reesei* se puede decir que no está determinado por el dominio de adhesión, se ha demostrado que una proteína heteróloga formada por el núcleo de la CBH I y el dominio cola de la EG I presenta actividad exoglucanasa (Srisodsuk et al., 1997). Tampoco la posición amino o carboxiterminal es determinante.

El modo de acción parece ser consecuencia de diferencias clave en el dominio catalítico, esto al menos es cierto para las muy similares CBH I y EG I.

El estudio de la estructura terciaria de ambas muestra que unos pocos aminoácidos diferentes son responsables de una forma más abierta para el núcleo de la endoglucanasa (Rouvinen et al., 1990).

Estos autores proponen que la forma de túnel es típica de la exoglucanasas, ya que restringe la acción a los extremos de la molécula. Las mismas no tendrían acción sobre CMC dado que se detendrían en el primer residuo sustituido. Las endoglucanasas tendrían un núcleo con una forma más típica, como una grieta o hendidura, así pueden acceder a los enlaces en zonas internas de la molécula de celulosa.

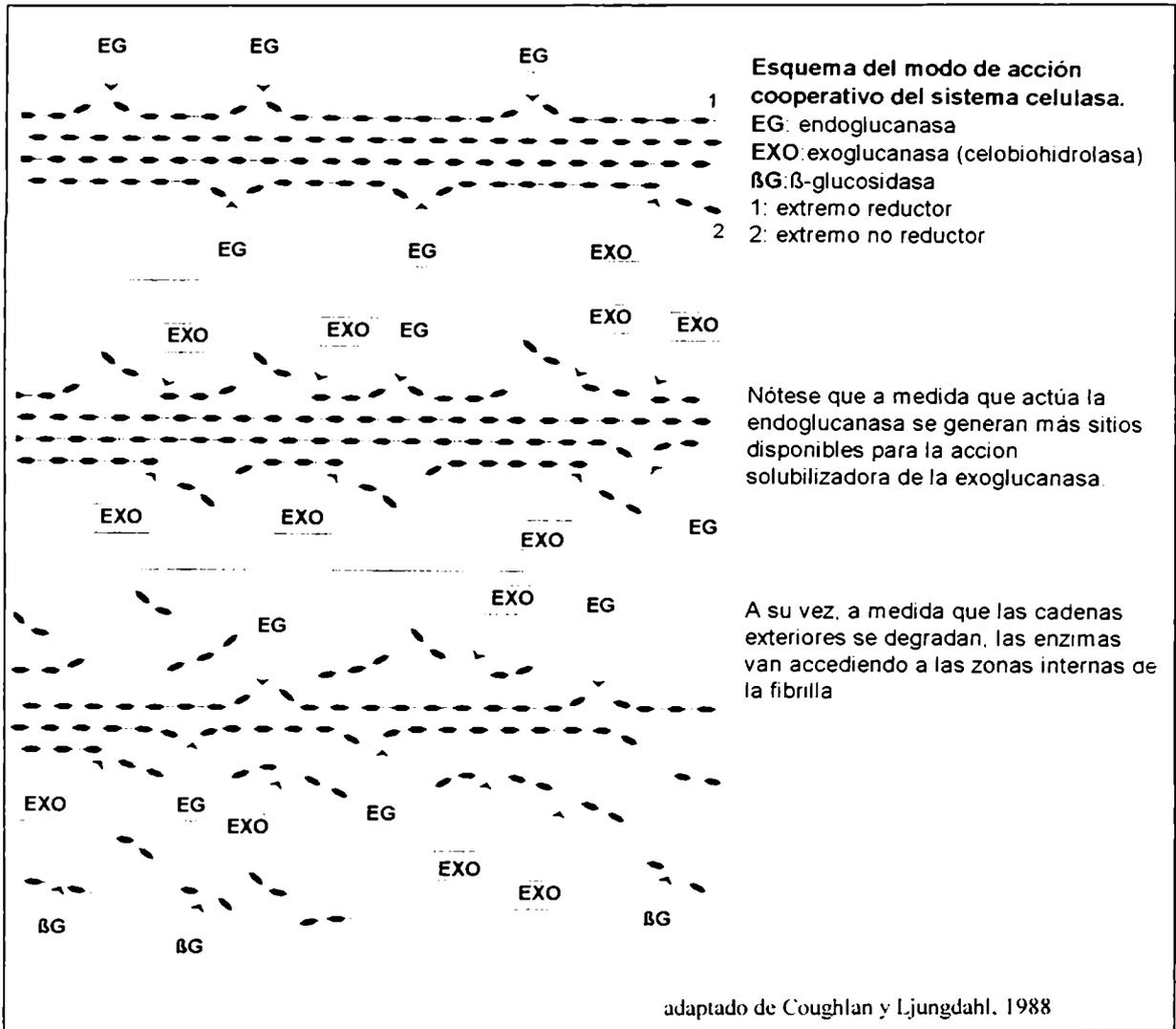
¿Cuál es la funcionalidad del dominio de adhesión en las endoglucanasas, que se adhieren a la celulosa cristalina sin degradarla?

Aquí no corresponde buscar una respuesta, es incorrecta la pregunta por un error de enfoque: la función de este dominio en cualquier celulosa es la de unirse a las formas nativas de celulosa (heterogéneas e inmersas en una matriz de pared), que no son celulosa cristalina (una preparación purificada y recristalizada), pero sí son insolubles.

Si se piensa en la celulólisis fuera del tubo de ensayo, parece claro que las endo y exoglucanasas no son tan diferentes como parecen según la caracterización utilitaria (pero artificial) que se utiliza habitualmente.

Modo de acción

Aunque la degradación de celulosa no está perfectamente entendida, puede esquematizarse en líneas generales el siguiente mecanismo:



Actualmente se cree que previa a la hidrólisis sólo se necesita de la apertura local de la fibrilla por parte del dominio de adhesión. Sin embargo algunos autores todavía consideran que existe un evento previo, aunque hay mucha discusión al respecto de su validez.

Este primer paso (no enzimático) sería la pérdida de la cristalinidad (amorfogénesis). No está claro que exista un agente para este efecto y los resultados no son en absoluto concluyentes (históricamente se postulaba la existencia del componente C1, que nunca pudo ser descrito). Inclusive hay modelos que proponen más de un paso antes de la degradación, como desgajado o segmentación de la fibrilla (Coughlan y Ljungdahl, 1988).

La hidrólisis enzimática puede describirse así: la endoglucanasa actúa sobre zonas amorfas de la fibrilla, generando numerosos sitios de acción (extremos no reductores) para la exoglucanasa, quien es el agente responsable de la solubilización porque libera sucesivamente dímeros. Finalmente la β -glucosidasa actúa sobre los oligómeros solubles.

A medida que la fibrilla es atacada ambas enzimas acceden a las zonas profundas, el resultado es la completa digestión de la celulosa.

Este modelo está avalado por un estudio reciente (Kleman Leyer et al., 1996), en donde se utilizaron enzimas purificadas de *T. reesei*, solas o en combinación. La acción individual de la endoglucanasa sobre fibras de algodón resulta en una rápida pérdida del grado de polimerización, sin solubilización, en tanto que la exoglucanasa es incapaz de actuar sobre el sustrato en forma significativa, si antes no actuó la otra enzima. Cuando ambas enzimas están juntas el sustrato es convertido eficientemente en productos solubles (sinergismo endo-exo).

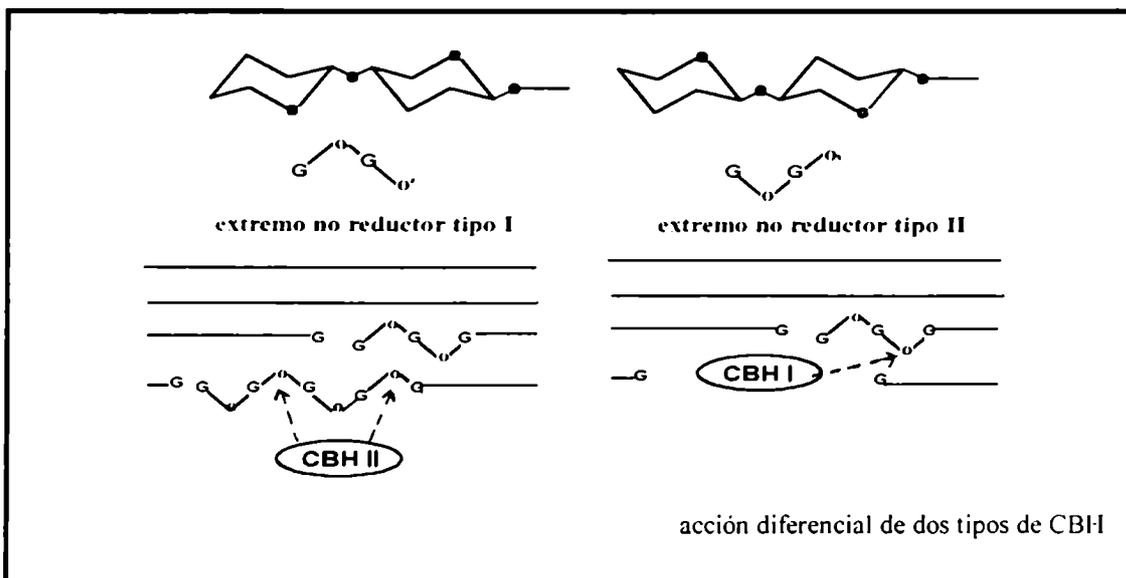
Otros autores ya habían propuesto la cooperación entre endo y exoglucanasas de *P. pinophilum* (Wood et al., 1989) aunque mostraron que debían estar presentes dos exoglucanasas (CBH I y II) y una endoglucanasa (III o V). Al respecto de esto es interesante la propuesta de que las endoglucanasas que tienen respuesta sinérgica serían las que interactúan eficientemente con la celulosa cristalina, explicándose por qué algunas endoglucanasas (en *P. pinophilum* la I, II o IV) no presentan sinergismo.

Las cantidades absolutas y relativas de cada enzima también determinan el grado de cooperación, el balance óptimo sería el que se registra normalmente en el medio de cultivo. Con todo esto queda claro que el modelo expuesto aquí es una simplificación de la situación real.

Los ensayos de degradación de celulosa por hongos de pudrición castaña, que no tienen exoglucanasa (Uemura et al., 1993), no responden a este modelo. En estos organismos se vio que la fibrilla queda reducida a las zonas cristalinas luego de la digestión completa de las áreas amorfas de torsión (Kleman Leyer et al., 1992). Parece que el aprovechamiento de la celulosa en estos sistemas es ineficiente ya que la endoglucanasa sería la única responsable de la degradación de la celulosa. Se propone, además, que un ataque oxidativo (no enzimático), abriría la fibrilla y liberaría algunos productos solubles.

En los hongos de pudrición blanca, como *P. chrysosporium*, la situación parece muy compleja, porque las endo y exoglucanasas estarían actuando al mismo tiempo que el complejo ligninasa (de todos modos el resultado de la degradación es consistente con la cooperación endo-exo). La representación esquemática de ambos sistemas incluye el efecto de fuertes oxidantes (generados por las ligninasas) sobre la celulosa (Jennings, 1995).

Otro tipo de sinergismo se ha registrado entre dos exoglucanasas: CBH I y II de *T.reesei* (sinergismo exo-exo), pero hay mucha controversia al respecto y no se sabe si es un efecto natural. Algunas explicaciones para esta observación son: a) que existen exoglucanasas que cortan en los extremos reductores (Barr et al., 1996), b) que podrían existir dos tipos estereoquímicos de extremos no reductores y que cada exoglucanasa tendría preferencia por uno de ellos, el ataque de una enzima dejaría, en la otra cadena, expuesto el extremo (del otro tipo) preferido por la otra (Wood y McCrae, 1986).



Sin embargo, otra opinión al respecto es que la observada cooperación entre exoglucanasas podría deberse a errores metodológicos: contaminación de endoglucanasa en la fracciones tomadas como puras, sustratos inadecuados para definir una forma como exoglucanasa (pudiendo ser en realidad una endoglucanasa) o existencia de complejos multienzimáticos, que son obtenidos como fracciones puras por los métodos usuales.

Producción del sistema celulolítico:

La regulación de la formación de las celulasas, si bien ha sido objeto de intensos estudios por parte de muchos grupos de investigación, es un proceso metabólico que no ha sido develado por completo.

El panorama, que en un principio parecía relativamente sencillo, a lo largo de años de estudio se fue haciendo muy complicado.

La gran mayoría de los hongos celulolíticos sólo producen estas enzimas extracelulares en presencia del sustrato (celulosa). Asimismo, se sabe que habiendo azúcares junto a este polímero complejo, se da (en líneas generales) una utilización secuencial, comenzando por la fuente de energía de más fácil asimilación. Esta es toda la generalización que puede hacerse.

Actualmente se sabe que la regulación de este sistema es realmente compleja, dado que hay distintos niveles de reconocimiento del sustrato y de regulación (a nivel genético fundamentalmente).

En resumen, no se puede describir la regulación de la producción de celulasas como un proceso de inducción por sustrato, del tipo operón lactosa, ni tampoco explicarlo como represión catabólica por azúcares sencillos, del tipo que se da en diauxia. Lamentablemente, y a falta de un modelo de proceso, hay que exponer gran parte de los resultados obtenidos por diferentes investigadores, para luego armar un esquema actualizado, pero provisorio. Esto se hace en la siguiente sección.

El modelo regulatorio para hongos celulolíticos:

Como fue expuesto en otras partes de la introducción la mayor cantidad de investigación respecto a las celulasas fúngicas se han realizado con *Trichoderma reesei* (antes *T. viride*).

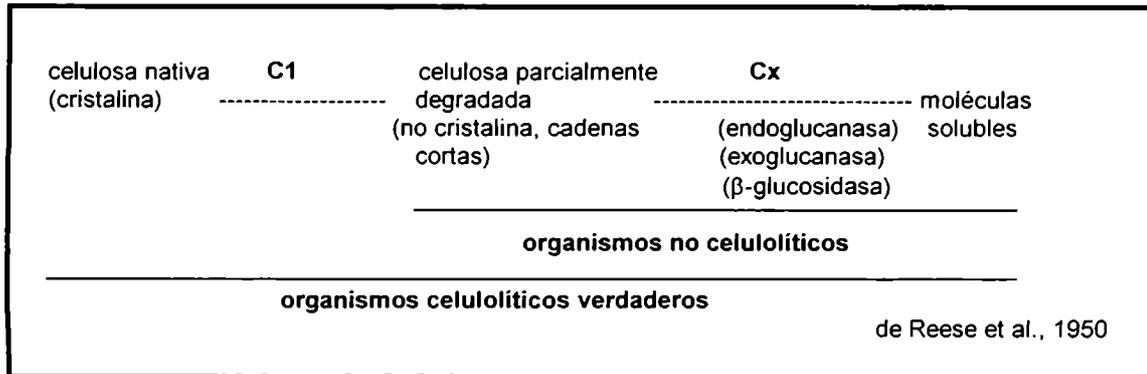
Por ello, y para empezar, se hará una síntesis de estos trabajos, para mostrar como se fue formando el actual panorama, dejando de lado lo referente a otros organismos.

Lo que se resume, además, es sólo acerca de la influencia de la fuente de carbono, ya que otros factores (nitrógeno, pH, etc.) influyen, pero sin ser los determinantes primarios.

Las primeras aproximaciones:

Elwin T. Reese y sus colaboradores realizaron los primeros ensayos de celulólisis en que se relacionó la capacidad celulolítica de diferentes hongos sobre celulosa (y sus

derivados) con la posible estrategia de ataque, estableciendo el modelo C1-Cx (que actualmente no es válido):



Con el antecedente de que los productos de hidrólisis actúan sobre la inducción de hidrolasas (como ocurre con las amilasas), Reese y Levinson (1952) estudiaron el efecto de la glucosa y celobiosa sobre la producción del sistema celulasa. Estos azúcares no inducían este sistema enzimático, que mostró ser adaptativo (inducible por sustrato) en un gran número de especies fúngicas. A partir de aquí los estudios se centraron en *Trichoderma viride*.

Mandels y Reese (1957) plantearon una pregunta fundamental acerca de la producción de estas enzimas: "las celulasas son enzimas adaptativas, pero su sustrato es [una macromolécula] insoluble: ¿cómo puede ocurrir la inducción?". En este trabajo se demostró que la lactosa (además de la celulosa) era inductora, en tanto que se confirmó que la celobiosa y la glucosa no inducían.

El efecto negativo de la celobiosa, sin embargo, se consideraba un artificio. La hipótesis de que era el inductor natural seguía vigente. Mandels y Reese (1960) postularon que la tasa de crecimiento (alta en cultivos con celobiosa) interferiría con el efecto activador de la misma, en tanto que en condiciones de crecimiento lento (similares a las naturales) tendría un efecto positivo. Por otra parte encontraron una impureza en la glucosa que tenía un fuerte efecto inductor, y propusieron que un intermediario en el metabolismo de la celobiosa (de la misma naturaleza química que esta impureza) sería el verdadero inductor.

Estudios sobre esta hipótesis confirmaron que la impureza era un disacárido, la soforosa (β,2-glucopiranosil glucosa), y demostraron el fuerte efecto inductor de este compuesto (Mandels y Reese, 1962).

Nisizawa y sus colaboradores demostraron que, en presencia de un inductor, la

respuesta (liberación de enzimas) se debe a síntesis *de novo* (Nisizawa et al., 1971 y 1972), y además está regulada por represión catabólica (Nisizawa, 1972; Sternberg, 1976).

A partir de 1977 los mutantes de laboratorio de *T. viride* se denominaron como una nueva especie: *Trichoderma reesei* (Simmons, 1977). Ya en 1971 se había desarrollado uno de estos mutantes, la cepa QM9414 (Mandels et al., 1971), la cual ha sido usada casi con exclusividad para todos los estudios posteriores.

Teniendo evidencia firme de un proceso de inducción se continuó trabajando en la búsqueda de la molécula que dispara el proceso. La hipótesis originalmente planteada por Mandels y Reese (1960) (el inductor sería formado a partir de la celulosa por enzimas constitutivamente presentes en bajos niveles), fue retomada. Se postuló que la soforosa podría ser el real inductor. Este disacárido sería el resultado de la actividad transglucosilasa de la β -glucosidasa (Crook y Stone, 1957) sobre la celobiosa (Sternberg y Mandels, 1979). Esta hipótesis se convalidó por los trabajos de otros grupos de investigación (Vaheiri et al., 1979).

Dado el posible rol de la exoglucanasa como productora de celobiosa y el de la β -glucosidasa como formadora del verdadero inductor, se comenzó a investigar si la regulación por sustrato (fuente de carbono) era diferente para ambas enzimas. Sternberg y Mandels (1982) mostraron que gran parte de la actividad β -glucosidasa permanece asociada a la pared y existe allí en forma constitutiva, en tanto que las otras celulasas son solubles e inducibles.

En este punto la hipótesis de la soforosa como verdadero inductor era muy firme, y este concepto fue el rector de muchos estudios durante años. También la supuesta influencia de la tasa de crecimiento sobre la inducción, así como la idea de la naturaleza parcialmente constitutiva de la β -glucosidasa, siguieron vigentes muchos años. La hipótesis de que fuera la celobiosa el inductor verdadero, dados los resultados obtenidos, fue abandonada.

¿Cómo se reconoce la presencia de celulosa?:

El problema del reconocimiento inicial de la celulosa fue enfocado de modo diferente por varios grupos.

Por un lado se propuso que la pared de los conidios contiene cantidades constitutivas de endoglucanasa, y así se iniciaría el ataque (Kubicek, 1987; Kubicek et al., 1988).

Luego se demostró que, en realidad, tienen exoglucanasa (Messner et al., 1991), y se postuló un sinergismo del tipo exo-exo para la degradación inicial.

En contraposición, se tenían evidencias de que las enzimas eran sintetizadas constitutivamente (en niveles basales) por el micelio, y que esta actividad basal sería responsable de la producción del inductor (El Gogary et al., 1989).

El problema de la molécula inductora:

La naturaleza del inductor aún hoy sigue siendo motivo de controversia.

A favor de la soforosa está la evidencia mostrada por Claeysens et al. (1990) y Toussaint y Vignon (1990), de que es un producto de la transglicosilación (*in vitro*) de la β -glucosidasa. Umile y Kubicek (1986) habían demostrado su formación *in vivo*, por parte de la β -glucosidasa constitutiva de pared.

La celobionolactona se postuló como inductor también (Vaheri, 1982), este compuesto se detectó en cultivos en celulosa cristalina (Szakmary et al., 1991) y se propuso un posible mecanismo de producción por parte del micelio (Kubicek et al., 1993a).

Asimismo la sorbosa, un monosacárido, mostró efecto activador en particular para la β -glucosidasa (Bisaria et al., 1986; Nanda et al., 1981; Chen y Waysman, 1993). El efecto de la sorbosa se considera actualmente indirecto, dado que altera la formación de la pared. En estas condiciones la β -glucosidasa presente se liberaría, y además se facilitaría el ingreso del inductor.

Dado que los modelos no eran satisfactorios se reconsideró la posibilidad de que sea la celobiosa, el producto natural de la hidrólisis, el real inductor. Se demostró la existencia de una permeasa para β -diglucósidos (Fristcher et al., 1990; Kubicek et al., 1993b). El descubrimiento de esta permeasa cambió el enfoque del problema: se demostró una relación competitiva entre ésta y la β -glucosidasa, con respecto al sustrato común (celobiosa). En condiciones de alta concentración, dados el K_m y V_{max} de ambas, se favorecería la hidrólisis (es decir la conversión a glucosa) y no habría inducción. En baja concentración la celobiosa "escaparía" a la β -glucosidasa, e ingresaría a la célula.

De hecho se demostró el transporte de celobiosa en estas condiciones. También se demostró que los inductores probados del sistema, soforosa, celobionolactona y lactosa son pobres sustratos de la β -glucosidasa, por lo que serían transportados por la permeasa, explicándose su acción como inductores.

Actualmente el modelo propuesto por Kubicek es el más coherente, aunque no se sabe cómo llega a activarse la transcripción de los genes.

Estos trabajos prácticamente descartan a la soforosa como inductor real (la lactosa nunca se consideró, dado que no existe en el entorno natural), sin embargo todavía

hay gran confusión al respecto. Mucho trabajos se enfocaron a descubrir cómo se forma la celobiosa a partir de celulosa y cómo ingresa a la célula. Adicionalmente se demostró que la baja tasa de crecimiento, por sí misma, no es en medida alguna responsable de la inducción de este sistema enzimático.

Dentro de este nuevo enfoque cobró gran importancia entender el rol de la β -glucosidasa.

El control por fuente de carbono

Como ya se mencionó, era bien conocida la represión por glucosa de las celulasas, ya que ésta anula el efecto inductor de la celulosa. Además, como no se observa producción de enzimas en medio mínimo, se sabía que era necesario el inductor. Estas observaciones son consistentes con la idea de una coexistencia de regulación por inducción y represión (Messner y Kubicek, 1991). Esta doble regulación explica por qué (en celulosa) bajo ciertas condiciones la inhibición con glucosa no es completa. La edad del micelio parece determinar el grado de respuesta al represor (Messner y Kubicek, 1991; El Gogary, 1989).

Existe al menos un trabajo reciente que postula que la fuente de carbono ejerce un efecto represor indirecto: el nivel de actividad respiratoria mediaría la expresión (Abrahão Neto et al., 1995).

La represión catabólica:

Las regiones de ADN que controlan la expresión de varios genes fúngicos han sido estudiadas, estableciéndose dos tipos de secuencias de regulación: a) secuencias típicas, responsables de la inducción basal (TATAA, CAAT, entre otras); b) secuencias gen-específicas, con las que interactúan proteínas regulatorias.

Estas proteínas (factores de transcripción) funcionan en dos niveles: i) ejercen regulación en determinado gen (o grupo de genes), que codifica para una determinada actividad metabólica.; ii) tienen función regulatoria sobre numerosos grupos de genes, actuando a nivel más global (como es la regulación del metabolismo general por niveles de nitrógeno o carbono) (MacKenzie et al., 1993).

A este segundo tipo de factores de transcripción pertenece la proteína CREA de *Aspergillus nidulans*, que contiene dos zonas de unión a zinc y una región rica en alanina (ambas características son típicas de proteínas de adhesión al ADN). Este factor de inhibición de la transcripción es el responsable de la represión por catabolito (glucosa) en numerosos genes de este hongo (Dowzer y Kelly, 1991).

Con estos antecedentes se buscaron, en los promotores de los genes de celulasas de *T. reesei*, secuencias del tipo de adhesión para CREA. La primer evidencia se encontró para el gen de la endoglucanasa 1 (González et al., 1994).

Más adelante se encontró gen *cre1*, homólogo a *creA*. De la secuencia aminoacídica prevista se deduce que la proteína sería similar en estructura a CREA (Strauss et al., 1995) y tendría su misma función.

Estudios de interrupción del promotor (en la CBH I) demostraron la pérdida de represión catabólica (Ilmen et al., 1996a). El análisis del gen *cre1* en mutantes, que no son reprimidos por glucosa, mostró que éste no codifica la secuencia completa, confirmando la naturaleza regulatoria represora del producto de este gen (Ilmen et al., 1996b), que interactuaría con el promotor de la CBH I.

El promotor de los genes de celulasas:

Las regiones promotoras de los genes de las CBH poseen diferentes secuencias regulatorias: para activación o represión catabólica (Ilmen et al., 1996a y 1997). Además se comprobó que tienen secuencias responsables de la expresión basal (El Dorry et al., 1996; Henrique Silva et al., 1996).

Esto daría dos niveles diferentes de activación de la transcripción: basal e inducida por sustrato.

Las exoglucanasas en la inducción de las celulasas:

La existencia de niveles basales de celulasas fue durante mucho tiempo sólo una hipótesis (El Gogary et al., 1989). Pero el uso de anticuerpos monoclonales permitió obtener evidencia muy fuerte a favor de esta hipótesis. Las celulasas por sí mismas (CBH I y II) son necesarias para la inducción con celulosa.

Es importante destacar que la inducción con soforosa no necesita de ninguna enzima presente para iniciarse, lo cual también confirma la idea propuesta (Torigoi et al., 1996; Carle-Urioste et al., 1997).

La interrupción de cada uno de estos genes comprobó definitivamente que la síntesis basal de las enzimas es condición necesaria para la producción (en celulosa y no en soforosa) del resto sistema (Seiboth et al., 1992; 1997).

La β -glucosidasa en la inducción de las celulasas:

Con respecto a la regulación de la actividad β -glucosidasa hubo siempre poco acuerdo. Se describía usualmente como parcialmente constitutiva, se sabía que

se localizaba en pared, y se creía que la aparición en el sobrenadante se debía a lisis (Sternberg y Mandels, 1982; Acebal et al., 1988). Inclusive se postuló que esta enzima no era en absoluto inducible y que su función no estaba relacionada con la celulólisis, sino con la morfogénesis (Jackson y Talburt, 1988).

T.reesei, en relación a las otras celulasas, no produce gran cantidad de β -glucosidasa extracelular. Durante mucho tiempo, este hecho complicó el análisis y sostuvo la hipótesis de la localización en pared y liberación por lisis (Kubicek, 1982b).

Sin embargo, el panorama cambió cuando el enfoque se desvió hacia el rol de esta enzima en la inducción. Se conoce que mutantes defectivos en la β -glucosidasa constitutiva de pared no se inducen eficientemente por celulosa (Mishra et al., 1989, Strauss y Kubicek, 1990; Fowler y Brown, 1992).

Recientemente se clonó y secuenció el gen *bgl1*, que codifica para la β -glucosidasa soluble, demostrándose que existen dos especies, una totalmente inducible (al igual que las glucanasas) y otra de pared y constitutiva, que estaría involucrada en la formación de la molécula inductora (Mach et al., 1995).

La secreción, otro punto de control:

No hay muchos estudios realizados al respecto. Se estudió la secreción, pero en un mutante hipersecretor (Glenn et al., 1985; Ghosh et al., 1984), estos estudios de microscopía muestran un patrón secretorio clásico, comenzando en el retículo y pasando por el aparato de Golgi. Estas enzimas son glicoproteínas, pero no hay muchos estudios de la maduración de las mismas, aunque se sabe que este procesamiento postraduccional es indispensable para su actividad y estabilidad (Kubicek et al., 1993a, Goller et al., 1998).

También se ha estudiado la composición de la pared con respecto a su influencia como barrera en el mecanismo de liberación de las celulasas (Nevalainen et al., 1995).

¿Cual es la validez de este modelo?

Todo lo expuesto muestra que existe un acuerdo acerca de la inducción coordinada de las celulasas en *T.reesei*, mediada por un inductor soluble (celobiosa o un derivado de la misma) producido por la acción constitutiva de exoglucanasas y/o β -glucosidasas. Además el sistema se reprime por glucosa a nivel de transcripción.

Un trabajo muy reciente (Ilmen et al., 1997) muestra resultados coherentes con este "modelo acordado", aunque los autores interpretan los mismos a la luz de una hipótesis de inducción por desrepresión. Esto es sólo un ejemplo de cómo, en la historia del

estudio de la celulólisis, una misma observación experimental ha servido para sostener hipótesis contrapuestas. Esta contradicción interna es, en mi opinión, el factor que más ha demorado la comprensión global del mecanismo regulatorio, mucho más que las limitaciones materiales. Esta tendencia a forzar las conclusiones según las hipótesis vigentes al momento, hace necesario analizar detenidamente los resultados y reinterpretarlos.

Otras consideraciones respecto de la producción del sistema celulolítico:

¿Qué ocurre en otros hongos?

Lo expuesto anteriormente es válido en *T. reesei* solamente, aunque los estudios realizados en otras especies de este género son en general consistentes con el modelo propuesto. Para otros hongos se ha investigado con menos profundidad, y hay solamente datos aislados. En principio sería razonable decir que ajustan al modelo en cuanto a la capacidad de inducción y a la represión por catabolito. La excepción se da en hongos de pudrición castaña, que mostraron poseer sistemas más o menos constitutivos.

En la discusión de los resultados obtenidos se comentará puntualmente algunos datos relevantes de estas investigaciones.

La transferencia tecnológica:

Para comprender por qué se estudió en una sola especie la producción de celulasas durante tantos años, hay que revisar los objetivos últimos de esta línea de investigación.

Las primeras investigaciones empezaron durante la posguerra, en laboratorios de la Armada de Estados Unidos (curiosamente las cepas originales provienen de islas del Pacífico). La exitosa fabricación a gran escala de penicilina (otro proceso desarrollado por las fuerzas armadas) parece haber sido el molde sobre el cual se intentó llegar a la producción masiva de celulasas, o bien a la bioconversión de material lignocelulósico. No cabe duda que, de haberse logrado, sería un proceso biotecnológicopreciado, de importancia estratégica.

Este fue fin último de la investigación hasta 20 años (ver las revisiones de Ryu y Mandels, 1980 y Bisaria y Ghose, 1981). Pero las celulasas no son la penicilina, y el mutante *T.reesei* no es un *Penicillium*: el proceso nunca logró llevarse a escala. Parece que las especies de *Trichoderma* son inapropiadas para el cultivo en masa, a pesar de existir cepas de producción constitutiva en glucosa (Ma et al., 1990; Gadgil et al., 1995). Al respecto, es interesante la revisión que se hace en Eveleigh et al.(1995).

Los esfuerzos para mejorar la producción comercial de celulasas se orientan ahora a la búsqueda de otras estrategias de cultivo, como fermentación en estado sólido, en donde se utilizan, además de *Trichoderma*, cepas bacterianas o cepas de *Aspergillus* (Pandey, 1992), sobre todo por sus propiedades termofílicas (Taj-Aldeen y Jaffar, 1992). Se ha probado también la fermentación con células inmovilizadas de *Aspergillus niger* (Kang et al., 1995). En este nuevo enfoque, se buscan cepas que produzcan celulasa libre de xilanasa, o enzimas no inactivadas por producto final (Riou et al., 1998).

Otro enfoque novedoso es la transformación de levaduras: se logró producir, en *Saccharomyces cerevisiae*, celulasas de *T. reesei* (Salohemio et al., 1997) o de *Aspergillus* (Sakamoto et al., 1995; Murai et al., 1997).

Estas cepas servirían para lograr el proceso de bioconversión en un sólo paso (Van Rensburg et al., 1998). También se usan exitosamente en vinificación, dando un producto con mejor aroma gracias a la acción de las enzimas sobre el mosto de la uva (Pérez González et al., 1993). La transformación con genes de celulasas también se hizo con éxito en *E. coli* (Laymon et al., 1996; Sanchez Torres et al., 1994).

De todas las aplicaciones tecnológicas para las celulasas, la más curiosa es la que se expone en el trabajo de Mitra y Bachhawat (1997). Las enzimas se acomplejan con PEG, y se usan como inyectable, en el tratamiento de trabajadores textiles con neumoconiosis causada por la exposición al polvo de algodón.

Antecedentes en la familia Ascobolaceae

Saccobolus saccoboloides es una especie perteneciente a Ascobolaceae (Pezizales), una familia típicamente coprófila. Existen estudios acerca de la celulólisis por hongos coprófilos (Wicklow et al, 1979), pero se sabe poco acerca de sus enzimas (Taj-aldeen et al, 1990; Denninson y Kohen, 1977; Robertson y Kohen, 1978). Entre los miembros de la familia Ascobolaceae sólo *Ascobolus furfuraceus* (Mercuri, 1987a) y *Ascobolus immersus* (Taj-Aldeen et al., 1990), habían sido estudiados al inicio de este trabajo de Tesis.

En este momento se encuentran publicados trabajos muy recientes sobre la producción de enzimas o sobre la utilización de celulosa en *Ascobolus gamundii* (Sívori et al., 1996), *Ascobolus furfuraceus* (Mercuri, 1996a y b; Mercuri y Diorio, 1995; Mercuri, 1994) y en *Saccobolus saccoboloides* (Magnelli et al., 1996). Además hay trabajos comparativos de la producción de celulasas en especies de *Saccobolus*, *Ascobolus*, *Iodophanus* y *Thecoteus* (Levin et al., 1996; Ramos y Forchiassin, 1996 y 1998; Pardo et al., 1997)

Objetivos:

- 1) Determinar bajo qué condiciones de cultivo se da la máxima producción de celulasas.
- 2) Desarrollar un diseño de cultivo y determinación de enzimas que permitiera obtener resultados satisfactorios acerca del control de la síntesis de celulasas.
- 3) Obtener un modelo lo más completo posible de cómo se regula la producción de celulasas, que sea lo más coherente posible con los sistemas conocidos en otros hongos filamentosos.

materiales y
métodos

Organismo: *Saccobolus saccoboloides*

Reino Fungi

Clase Ascomycotina

Orden Pezizales (discomicetes operculados)

Flia. Ascobolaceae (coprófilos sobre estiércol de herbívoros).

La cepa usada fue *Saccobolus saccoboloides* BAFC 22389. La cepa fue mantenida en tubos de PF (extracto de levadura, 3 g/l; agar 20 g/l, con una tira de papel de filtro). en pico de flauta en la heladera (5°C) y repicados periódicamente.

Inóculo: Para todos los cultivos se partió de micelio crecido por 6 días en agar-agua. El inóculo fueron bloques de agar con micelio periférico de 5 mm².

Medios de cultivo:

Medio líquido basal (MB):

SO ₄ Mg.7H ₂ O	0.5g.
PO ₄ H ₂ K	0.5g.
PO ₄ HK ₂	0.6g.
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0.4mg.
Cl ₂ Mn.4H ₂ O	0.09mg.
BO ₃ H ₃	0.07mg.
MoO ₂ Na.2H ₂ O	0.02mg.
Cl ₃ Fe	1mg.
Cl ₂ Zn	10mg.
Biotina (100µg/ml)	0.05ml.
Tiamina(1mg/ml)	0.1ml.
Completar con H ₂ O destilada hasta 1000ml.	

Medio celulosa cristalina (CC):

celulosa cristalina	1% (500 mg por erlenmeyer)
asparagina	4g
Completar con medio basal hasta 1000 ml.	

cuando el medio fue combinado, se agregaron glucosa, lactosa, celobiosa o CMC 0,1% (1g/l) a este medio CC.

Medio glucosa asparagina (GA)

glucosa	10g
asparagina	4g
Completar con medio basal hasta 1000 ml.	

Medio maltosa: igual que el medio GA, reemplazando la glucosa por maltosa 10g/l

Medio lactosa: igual que el medio GA, reemplazando la glucosa por lactosa 10g/l

Medio CMC:

CMC 1% (500 mg por erlenmeyer)

asparagina 4g

Completar con medio basal hasta 1000 ml.

Medio xilano:

xilano 1% (500 mg por erlenmeyer)

asparagina 4g

Completar con medio basal hasta 1000 ml.

Otros medios de cultivo para crecimiento:

a) Para el estudio de la variación en la relación C/N se usó el medio CC, modificando la cantidad de asparagina (0, 0.4, 2, 4 y 8 g/l) y manteniendo la cantidad de celulosa (10 g/l) constante. La tasa resultante se muestra en la figura 5 de resultados y discusión.

b) Para el estudio de la concentración de sustrato se usó el medio CC, modificando la cantidad de celulosa y asparagina (ver en la figura 6 de resultados y discusión), manteniendo la relación C/N en 6.

Medio para inducción:

fuerce de carbono 1; 0,1 o 0,01%: (300, 30 o 3 mg por erlenmeyer)

[para sust insolubles como xilano o celulosa]

10, 1 o 0,1 g

[para sust solubles como mono o disacáridos]

asparagina 1g

Completar con medio basal (preparado sin vitaminas) hasta 1000 ml.

Obs: el medio inductivo puede ser simple (un solo carbohidrato) o mixto (dos carbohidratos).

Medio para inducción con diferentes fuentes nitrogenadas:

Se utilizó el medio anterior, usando celulosa cristalina 1% como fuente de carbono, y reemplazando la asparagina 0,1% (1g) por la cantidad equivalente (en nitrógeno) de los siguientes compuestos: NO_3Na , NO_3NH_4 , NO_3K , $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y Tartrato de amonio.

Cultivo:

Se inocularon erlenmeyers de 125ml (50 ml de medio). Se incubaron en cámara temostatizada (23°C) en agitador rotativo 125 a rpm.

Cosecha:

Para curva de crecimiento, a los tiempos indicados, se tomaron dos erlenmeyers muestra y se filtraron los cultivos por embudo Buchner en vacío, se almacenó el sobrenadante en freezer (para determinar proteína extracelular, pH o actividad enzimática según Wood et al., 1988) y se secó el micelio.

Determinación de peso seco:

El micelio se secó en estufa a 70°C hasta peso constante.

Proteínas de micelio:

Los sólidos de cultivo secos fueron molidos en mortero. Se tomaron muestras de 50 mg para determinación de proteínas totales de micelio por el método de Bradford (1976), previa hidrólisis con 1N NaOH a 100° C por 1 h.

Proteínas extracelulares:

Se tomaron alícuotas del sobrenadante de cultivo y se dosaron proteínas según el método de Bradford, 1976. Se utilizó una curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA 1 mg/ml) en buffer Acetato de Na 0.1M pH = 4.8 como standard.

Inducción del sistema en cultivos de reemplazo:

Se cultivó el micelio (agitación en cámara termostatzada a 23°C) en medio GA (erlenmeyers de 125ml con 50 ml de medio) durante 6 días para llegar a la fase exponencial de la curva de crecimiento (verificándose que la glucosa había sido consumida). Se filtró el micelio en esterilidad por vacío. El micelio fue dividido en partes equivalentes y cada una se transfiere al medio de inducción (erlenmeyers de 100 ml con 30 ml de medio). Esto se hace para disminuir la influencia del estado particular del micelio de cada frasco.

Los erlenmeyers se incubaron en agitación a 23°C, y se tomaron a los tiempos indicados, alícuotas de 3 ml, en esterilidad. Las alícuotas se tomaron de tal manera que contengan micelio y sobrenadante, para no alterar la composición relativa del medio. Estas alícuotas se centrifugaron, se recuperó la fase líquida que fue almacenada en freezer.

En todos los casos el control negativo fue medio sin carbohidrato y el control positivo medio con celulosa cristalina 1%. En el caso que se agregue otro compuesto durante

la inducción (por ejemplo para estimar represión) se tomaron las siguientes precauciones: que se mantenga la esterilidad y que no se altere el volumen del sistema, por lo que se usan alícuotas de una solución concentrada del carbohidrato a agregar, de modo de alcanzar una determinada concentración final, la cual se indica en las figuras.

Determinación de la actividad enzimática:

1) endo β -D 1,4 glucanasa

Se utilizó como sustrato 0.4 ml de CMC (0.5%) en buffer Acetato de Na 0.1M pH = 4.8 que se incubó con 0.1 ml de sobrenadante por 30 min a 50°C y se determinaron azúcares reductores por el método de Somogyi (1952) y Nelson (1944).

La absorbancia resultante es transformada, luego de la sustracción del blanco de sustrato y de sobrenadante, a μ g equivalentes de glucosa liberados utilizando una curva patrón con glucosa (1 mg/ml) en el mismo buffer Acetato de Na como standard.

Unidad enzimática (UE): la cantidad de enzima necesaria para liberar , en las condiciones del ensayo, 1 μ mol de azúcar reductor por minuto, expresado como equivalente de μ moles de glucosa por ml de cultivo.

2) exo β -D 1,4 glucanasa

Se utilizó como sustrato 0.4 ml de una suspensión de celulosa cristalina (1%) en buffer Acetato de Na 0.1M pH = 4.8 que se incubó con 0.1 ml de sobrenadante por 60 min a 50°C, determinándose el poder reductor por el método de Somogyi (1952) y Nelson (1944).

La absorbancia resultante es transformada, luego de la sustracción del blanco de sustrato y de sobrenadante, a μ g equivalentes de glucosa liberados utilizando una curva patrón con glucosa (1 mg/ml) en el mismo buffer Acetato de Na como standard.

Unidad enzimática (UE): la cantidad de enzima necesaria para liberar, en las condiciones del ensayo, 1 μ mol de azúcar reductor por minuto, expresado como equivalente de μ moles de glucosa por ml de cultivo.

3) β -glucosidasa

Se utilizó como sustrato 0.9 ml de p- nitrofenil- β -D 1,4 glucopiranósido (0.2 mg/ml) en buffer Acetato de Na 0.1M pH = 4.8, que se incubó con 0.1 ml de sobrenadante durante 30 min a 50°C. La reacción se paró con 2 ml de buffer Clark - Lubs 25mM pH=9.8 y la absorbancia se leyó a 445nm . La absorbancia se transforma a μ moles de p-nitrofenol liberados utilizando una curva patrón de p-nitrofenol (1 mM) en buffer Acetato de Na 0.1M pH=4.8 como standard. Unidad enzimática (UE): la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto, por ml de medio.

4) actividad CMCasa:

Cuando la cantidad de azúcares reductores presente en los sobrenadantes es alta el método antes descrito para endoglucanasa es inapropiado.

La actividad endoglucanasa (CMCasa) fue medida como degradación de CMC en medio sólido, en lugar de liberación de producto (Magnelli et al., 1997). Se usaron cajas de Petri con 20 ml de medio CMC agarizado (CMC 0.1%, agar 1,5% en buffer acetato 0,05 M, pH 4.8), sobre una base de agar-agua firme (2,7 %). Se hicieron pocillos con sacabocados (5 mm diam) y se llenaron con 50 μ l de sobrenadante. Luego de 4 de incubación a 50°C en estufa, las placas fueron teñidas con Rojo Congo (0.1% en agua), por 10 min y lavadas tres veces con NaCl 1M. Se registró el diámetro del halo de degradación, los resultados fueron expresados como el área de degradación en mm² (según las leyes de la difusión radial, Kavanagh, 1972) y son el resultado de 6 medidas sobre dos duplicados. Este ensayo tiene una buena correlación con los otros métodos, un bajo desvío estándar (menor al 5%), y es específica para celulasas.

Descripción del desarrollo y puesta a punto de la metodología:

Se desarrolló el método de placa, partiendo del propuesto por Mercuri (1987a) en el cual se mide degradación de CMC en cultivos, estimándola por tinción posterior con Rojo Congo, colorante afín a los polisacáridos de unión beta (Teather y Wood, 1982).

En una primer etapa se comprobó que este ensayo era apropiado para todo tipo de sobrenadantes. Posteriormente se analizó si el método era cuantitativo, y si podían correlacionarse los resultados con los métodos colorimétricos.

La figura A muestra que las áreas son proporcionales a la dilución. La forma de ambas curvas es la misma, por lo tanto la respuesta se mantiene, independientemente de la fuente de enzima (sobrenadante de cultivo: enzimas de *S. saccoboloides*, o comercial: enzimas de *Trichoderma sp.*, origen: Sigma), y es la misma tanto a bajas como a altas diluciones.

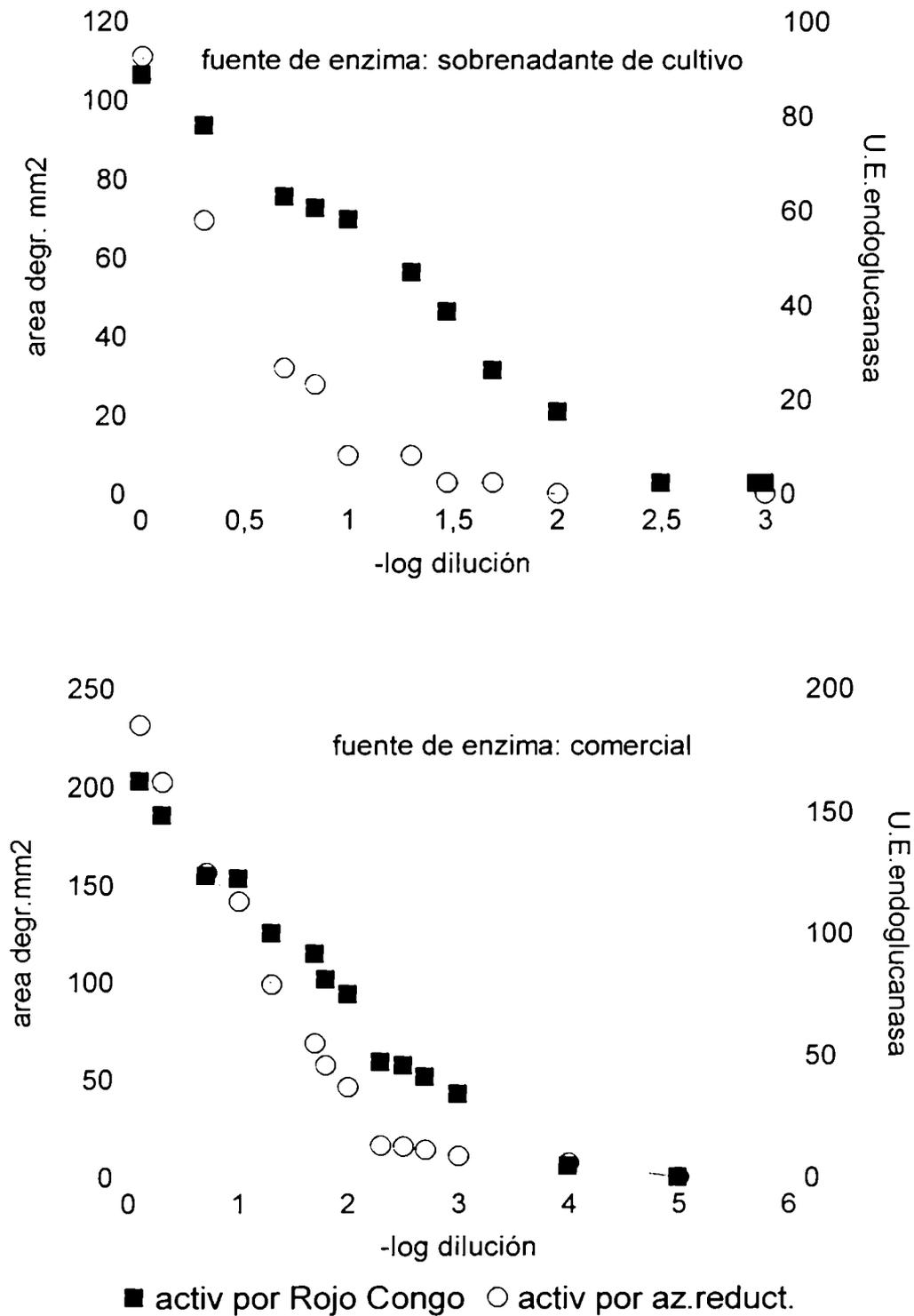
Al comparar estos resultados con los obtenidos por el método de liberación de azúcar reductor, vemos que el ensayo tradicional pierde linealidad y sensibilidad a altas diluciones. Por lo tanto la correlación entre ambos métodos existe solamente cuando hay una alta concentración de enzima.

La posible falta de correlación no indicaría necesariamente que uno de los dos es inadecuado, sino que es distinto medir producto liberado que sustrato degradado.

Muchos autores ya señalaron que al medir extremos reductores solubles se está subestimando la actividad (Enari y Niku-Paavola, 1986). Cuando el sustrato es celulosa

figura A

comparacion de la actividad celulasa estimada por dos métodos diferentes



(soluble o no) el ensayo por Somogyi-Nelson detecta los productos de bajo peso molecular (glucosa, celobiosa, celotriosa, etc) pero los oligosacáridos mayores precipitan y no son determinados.

Una vez ajustado el ensayo se probó cómo resultaba la reacción en placa usando el sustrato (CMC) diluido en buffer acetato pH 4.8 (0.05M). De este modo se optimizó la reacción, resultando en un mayor contraste de los halos. El paso siguiente fue hacer el ensayo con CMC al 0.1%. Como se ve en la figura B la linealidad se mantiene, pero la pendiente es ligeramente superior, por lo que las diferencias entre dos soluciones de diferente concentración son más marcadas, y sumado a que la respuesta es de mayor magnitud, se reduce la incidencia del error en la medición por lupa de los halos.

Por lo tanto, se eligió continuar con el ensayo usando CMC al 0.1% y buffer acetato 0.05M. Cabe aclarar que la acidez del sustrato cambia hacia el púrpura la reacción de color.

5) endo β -D 1,4 xilanasa

Se utilizó como sustrato 0.4 ml de xilano (0.2%) en buffer Acetato de Na 0.1M pH = 4.8 que se incubó con 0.1 ml de sobrenadante por una hora a 50°C y se determinó poder reductor por el método de Somogyi (1952) y Nelson (1944). La absorbancia resultante es transformada, luego de la sustracción del blanco de sustrato y de sobrenadante, a μ g equivalentes de xilosa liberados utilizando una curva patrón con xilosa (1 mg/ml) en el mismo buffer Acetato de Na como standard.

Unidad enzimática (UE): la cantidad de enzima necesaria para liberar , en las condiciones del ensayo, 1 μ mol de azúcar reductor por minuto, expresado como equivalente de μ moles de xilosa por ml de cultivo.

6) actividad xilanasa en placa

Se adaptó el método para la CMCasa, utilizando xilano 0,2% en lugar de CMC. El resto del procedimiento es igual que el anteriormente expuesto.

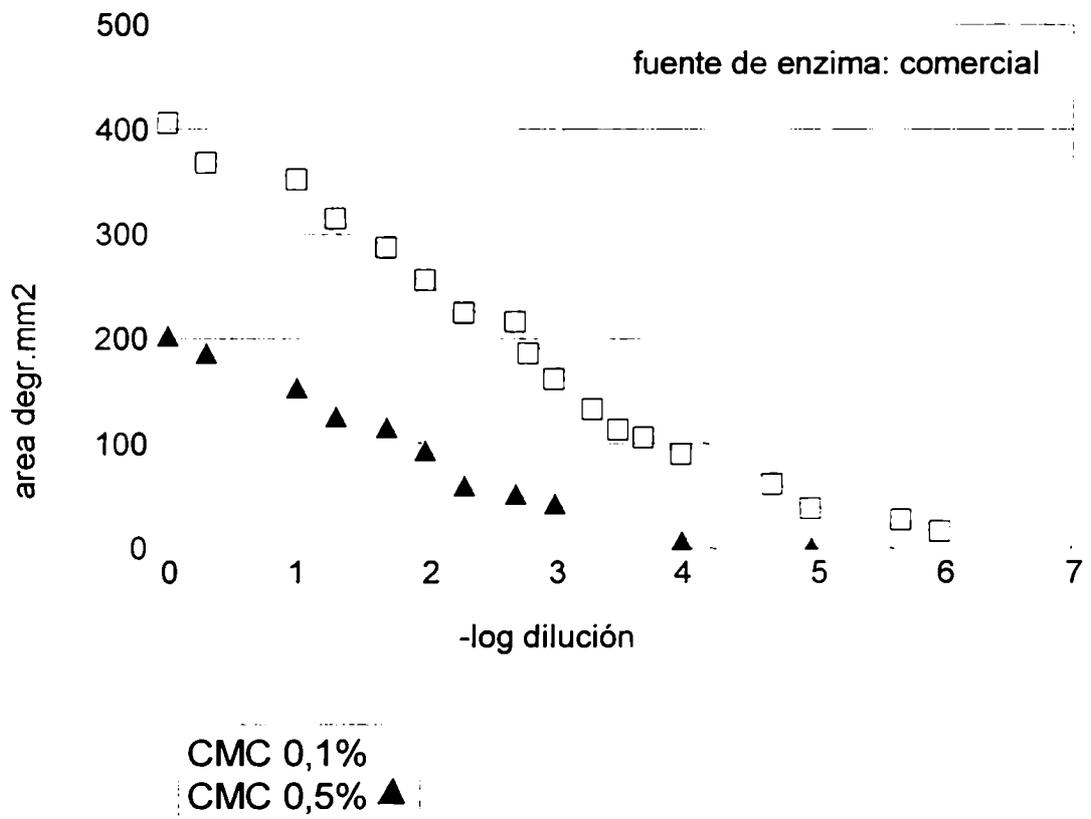
Localización de la actividad enzimática y naturaleza de la asociación al micelio:

obtención de micelio para el estudio de la β -glucosidasa:

Para estos ensayos el micelio se cultivó en medio GA durante 6 días, luego de lo cual se recuperó por filtración. Las muestras se separaron, para determinación de actividad β -glucosidasa intracelular (almacenadas a -20 °C) o para determinación de peso seco (secadas en estufa)

figura B

aumento de la sensibilidad del método: comparacion entre placas de CMC 0,5% y 0,1%.



procesamiento de las muestras:

Las muestras de micelio (aproximadamente 1250 mg de peso fresco cada una) almacenadas a -20°C fueron molidas con aire líquido, hasta no observar células intactas al microscopio. El homogenato se resuspendió en 15 ml de buffer acetato, y se centrifugó 15 min. El sobrenadante se consideró la fracción intracelular (citosol), se separó y almacenó a -20 °C. El precipitado se lavó dos veces con una solución de NaCl 0.1 M y dos veces con una solución de sacarosa 0.1 M (para lavar este precipitado de restos de material citoplasmático). Finalmente se lo resuspendió en buffer acetato y se consideró a esta fracción, pared celular más restos de membrana.

Sobre esta fracción de pared se realizaron los ensayos de liberación de la actividad β -glucosidasa. Se hicieron tratamientos con Tritón (libera actividad asociada a membrana), Mercaptoetanol (para reducir uniones puente disulfuro), EDTA (quelante de hierro), y KCl (para romper uniones iónicas). En todos los tratamientos se estimó actividad liberada y actividad remanente en la fracción.

tratamientos (Chang y Trevithick, 1972):

K: 0.75 ml KCl (4M) + buffer acetato 0.25 ml + suspensión de pared 2 ml

M: 0.25 ml Mercaptoetanol (0.23M) + buffer acetato 0.75 ml + suspensión de pared 2 ml

E: 0.015 ml EDTA (0.1M) + buffer 0.98 ml + suspensión de pared 2 ml

C: 1 ml buffer acetato + suspensión de pared 2 ml (control)

Se incubaron 4 h a 30 °C. Una vez finalizada la incubación con el agente químico, se centrifugó, se midió actividad liberada en el sobrenadante, se lavó dos veces el precipitado, y se resuspendió para medir actividad remanente.

T: 0.5 ml TritónX100 (2% v/v) + 0.5 ml de suspensión de pared.

Se incubó por 2h a 0°C. Al finalizar se procedió igual que con los otros tratamientos.

reacciones para determinar actividad enzimática:

a) actividad remanente: 200 μ l de suspensión de pared más 800 μ l de sustrato. Luego de terminada la reacción se centrifugó para precipitar los restos de pared.

b) actividad liberada: 400 μ l de sobrenadante de tratamiento más 600 μ l de sustrato

c) actividad intracelular: 200 μ l de fracción citosol más 800 μ l de sustrato

En todos los casos la concentración del sustrato se ajustó para alcanzar los mismos valores que la reacción convencional. La reacción se llevó a cabo en las condiciones de tiempo y temperatura estándar. En todos los casos se comprobó que la presencia de los distintos agentes no afecta la reacción ni la estabilidad del sustrato.

Para tener un parámetro uniforme los resultados se expresaron como UE β -glucosidasa por mg (peso seco) de micelio. Los valores que se presentan como comparación (de actividad extracelular), también están expresados de esta manera.

En estos ensayos se estimó también la actividad endoglucanasa intracelular en micelio crecido en medio GA. La metodología para adaptar la reacción fue la misma que para la β -glucosidasa

Localización de las enzimas a lo largo de la inducción:

Se determinó la localización de las enzimas en micelio proveniente de cultivos de reemplazo, a distintos tiempos de inducción. Cada punto es el ensayo de un erlenmeyer (por duplicado) y no de alícuotas del mismo. El sobrenadante se recuperó por filtrado al vacío y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. El micelio fue lavado dos veces con agua destilada, escurrido entre papel de filtro, pesado (peso fresco) y partido en dos porciones equivalentes. Sobre una se realizó la homogeneización y sobre la otra las determinaciones de peso seco.

Las muestras de micelio almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron molidas con aire líquido, hasta no observar células al microscopio. El homogenato se resuspendió en 15 ml de buffer acetato, y se centrifugó 15 min. El sobrenadante se consideró la fracción intracelular (citosol), se separó y almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El precipitado se lavó dos veces con una solución de NaCl 0.1 M y dos veces con una solución de sacarosa 0.1 M (para lavar este precipitado de restos de material citoplasmático). Finalmente se lo resuspendió en buffer acetato y se consideró a esta fracción, pared celular más restos de membrana (WS).

Para los ensayos de actividad (endoglucanasa y β -glucosidasa) se tomaron alícuotas de las tres fracciones, y se procedió como se describe arriba.

Con los resultados de peso seco se realizó el cálculo de actividad por 100 mg peso seco, a partir de los datos de actividad en función del peso fresco.

Técnicas electroforéticas

Se realizaron corridas de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (PAGE), en cuba horizontal. La metodología es una adaptación de los protocolos descritos en Andrews (1986), Ramos y Forchiassin (1998) y Pardo et al., (1997).

preparación de las muestras:

Los sobrenadantes de cultivo fueron concentrados entre 10 y 20 veces por liofilización. El crudo enzimático concentrado se ajustó por dilución hasta tener 3 UE endoglucanasa/ 5 μ l suspensión (las diluciones se hacen en buffer acetato). En algunos casos en que la actividad inicial era baja no se logró concentrar lo suficiente, de modo que no se alcanza la actividad necesaria para una buena definición de las bandas. Esto se indica en los resultados.

preparación del gel:

soluciones stock: a) acrilamida	30 g	b) Tris	36,6 g
bisacrilamida	0,8 g	HCl 1N	48ml
agua dest. hasta 100 ml		agua destilada hasta 100 ml	

gel (7%):

solución a	21 ml
solución b	11,2 ml
TEMED	45 µl
agua destilada	52,3 ml
persulfato de amoni	Pta de espátula.

Una vez preparada la solución de gel (84 ml vol total) se vuelca en un marco de vidrio de 15 x 17 cm, de 2 mm de profundidad. Al colocar el vidrio superior se logra un espesor uniforme. En este mismo marco se realiza la electroforesis.

Una vez que el gel polimeriza se retira el vidrio superior, se marcan los orígenes con un peine de acero, en cada hendidura se inserta un papel de filtro del mismo tamaño, previamente embebido con la muestra. Cada papel absorbe alrededor de 5 µl de muestra, de modo que se corren aprox. 3 UE en cada calle. Finalmente se agrega en cada origen la solución de azul de bromofenol (frente de corrida).

condiciones:

buffer de corrida: Tris 3 g/l, glicina 14,4 g/l (pH 8,3).

Se utiliza una cuba horizontal, con mechas de esponja que conectan el gel con ambas cámaras. Se corre a voltaje constante (170 V) hasta que el frente alcanza la mecha inferior (aproximadamente 5 h).

revelado de la actividad enzimática:

El gel se coloca sobre una placa de agar-CMC (2% agar, 0.1% CMC, en buffer acetato) de 5 mm de espesor. Se deja incubar a 50° C por una hora, y luego se revela. Para ello se cubre la placa de CMC con una solución de Rojo Congo (0.1%) durante 20 minutos. Pasado este tiempo se quita el exceso de colorante con una solución de NaCl 1N. Las bandas de actividad enzimática se visualizan como bandas claras (debido a la digestión de la celulosa de la placa) sobre un fondo rojo.

Luego de 24 hs de lavado en NaCl se registra la posición de las bandas observando en un transiluminador y del mismo modo se toman las fotografías.

Para determinar la posición de las bandas con actividad xilanasas la metodología fue la misma que para los geles y placas de endoglucanasa, pero usando una placa de xilano 0,2% en buffer acetato.

resultados y
discusión

1) Caracterización del sistema enzimático:

Las celulasas, como otras enzimas fúngicas extracelulares, tienen propiedades especiales, relacionadas con el espacio en el actúan. Dado que están fuera del ambiente celular interno y controlado, en general son mucho más estables que otras enzimas, sobre todo con respecto a la resistencia a altas temperaturas. Además suelen presentar temperaturas óptimas de acción relativamente altas, así como un pH óptimo de alrededor de 5.

En la siguiente sección se realiza la caracterización para cada una de las actividades que el sistema presenta, con respecto a ciertos parámetros que no habían sido determinados previamente.

variables de reacción:

Intervalo de linealidad:

Se determinó el intervalo en que la reacción enzimática (liberación de producto) aumenta en forma directamente proporcional con el tiempo. A la concentración de sustrato utilizada, la reacción para la endoglucanasa alcanza el máximo a los 30 minutos (fig 1), para la exoglucanasa esto ocurre a los 60 minutos (no se muestra). Para la β -glucosidasa, aún en el máximo intervalo ensayado (100 min.), se mantiene la linealidad (fig 1).

Como se ve, y dado que el sustrato está en exceso, la actividad de las enzimas es proporcional durante un lapso de tiempo relativamente largo, si se tienen en cuenta las condiciones de temperatura (50°C). Esta es una primera evidencia de su termoestabilidad (ver más adelante).

Temperatura de reacción:

Las temperaturas óptimas fueron de 55°C para endoglucanasa y β -glucosidasa y de 50°C para la exoglucanasa (fig 2), siendo estos resultados similares a los obtenidos para otras especies (Shewale y Sadana, 1978; Fahrnich and Irrgang, 1982; Yoshida et al, 1989; Oguntimein y Moo-Young, 1991), en tanto que son menores que los observados para celulasas de organismos termofílicos (Akiba et al., 1995; Christakopoulos et al., 1995).

figura 1

intervalo de linealidad

actividad endoglucanasa: medida por equivalentes de glucosa liberados.
actividad β -glucosidasa: medida por p-nitrofenol liberado

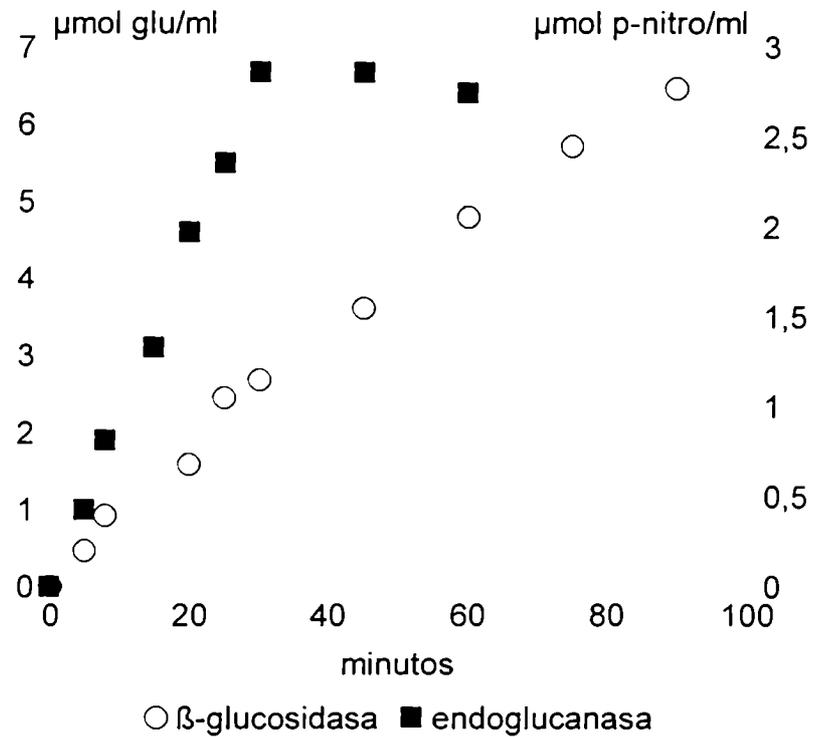
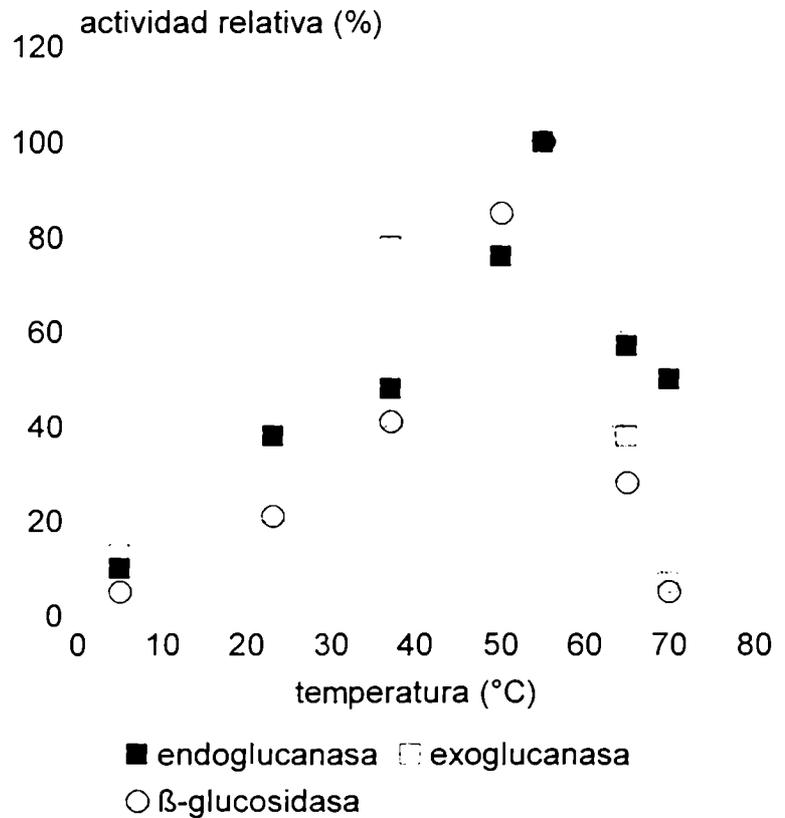


figura 2

temperatura óptima

actividad relativa: porcentual de actividad comparado con la maxima actividad registrada para cada enzima



Efecto del pH:

Para la endoglucanasa el pH óptimo estuvo alrededor de 5 en buffer acetato, en donde respuesta es mayor (punto óptimo de 4.8, fig 3A). Lo mismo ocurre para la exoglucanasa, con un punto óptimo de 5.2 (fig 3A). La β -glucosidasa también presenta actividad máxima en buffer acetato, a pH 5.4 (fig 3A). La naturaleza del buffer influye, aunque menos que la variación de pH (fig 3B).

Los valores están en el mismo rango que los sistemas de otras especies (Yoshioka y Hayashida, 1980; Desroches et al., 1980; Dekker, 1986; Sengupta et al., 1991).

Termoestabilidad:

Dados los resultados antes expuestos se estudió la resistencia al calor para las tres actividades.

La endo y exoglucanasa presentan patrones de termoestabilidad semejantes, siendo relativamente estables a 25 y 37°C, por lo menos durante 24 horas. A 50°C tienen una vida media de 1 a 2 hs (fig 4 B y C). La β -glucosidasa mantiene el 100% de actividad durante 70 hs (a 25°C) o sólo pierde un 30% de la misma (a 37°C), en tanto que a 50°C tiene una vida media de 6 a 7hs (fig 4 A).

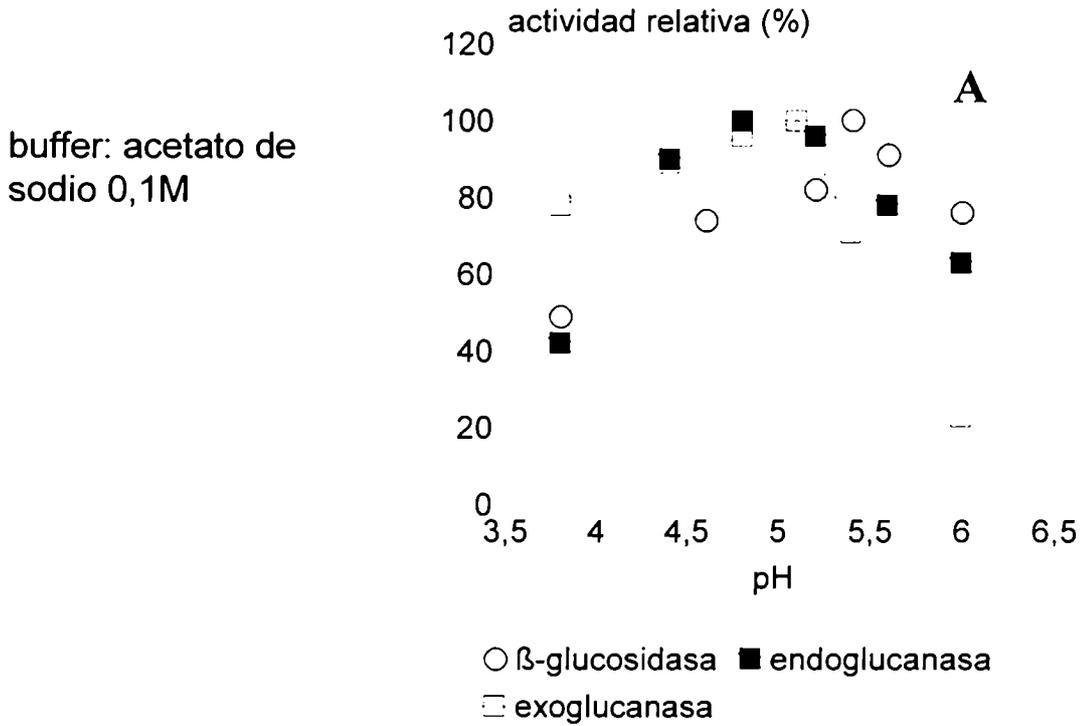
La β -glucosidasa de *S. saccharoboloides* es menos estable que la de *Aspergillus niger* (Dekker, 1981), y *Neurospora sitophila* (Oguntimein y Moo-Young, 1991) las cuales tienen una vida media de 45 hs y 12 hs a 50°C, respectivamente.

La endo y exoglucanasa también son menos estables que las de *Fusarium oxysporum* (Christakopoulos et al., 1995) o las de *Aspergillus niger* (Akiba et al., 1995).

Efecto inhibitorio por producto final:

Cuando se trabajó utilizando sobrenadantes con alta concentración de azúcares (ver más adelante, ensayos con inductores y represores), debió comprobarse que éstos no alterasen la actividad enzimática. Las reacciones de β -glucosidasa y CMCasa, se realizaron adicionando celobiosa o glucosa en un amplio rango de concentraciones al sobrenadante de celulosa cristalina. La presencia de las mismas en hasta un 4% (en el sobrenadante) no altera competitivamente en forma significativa la reacción enzimática.

figura 3 efecto del pH



maxima actividad para cada enzima y cada buffer

en todos los casos la concentración fue 0,1M. Se utilizaron las siguientes soluciones: acetato, citrato-fosfato y citrato-fosfato-borato

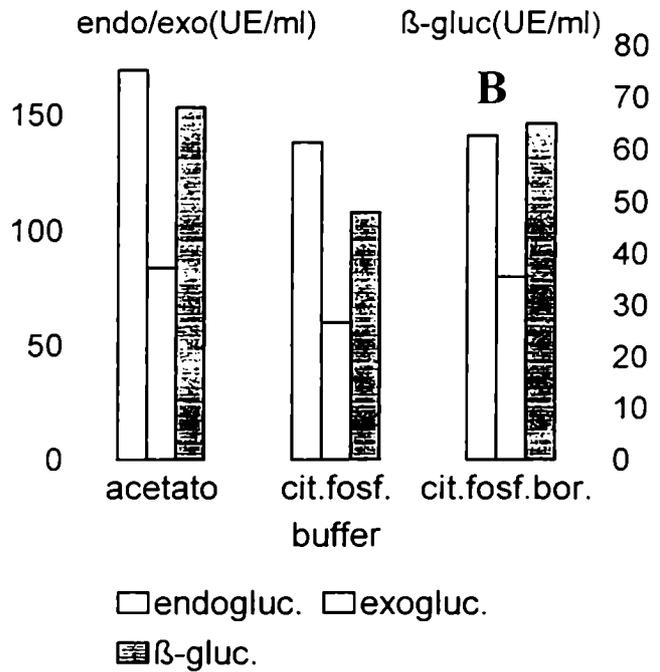
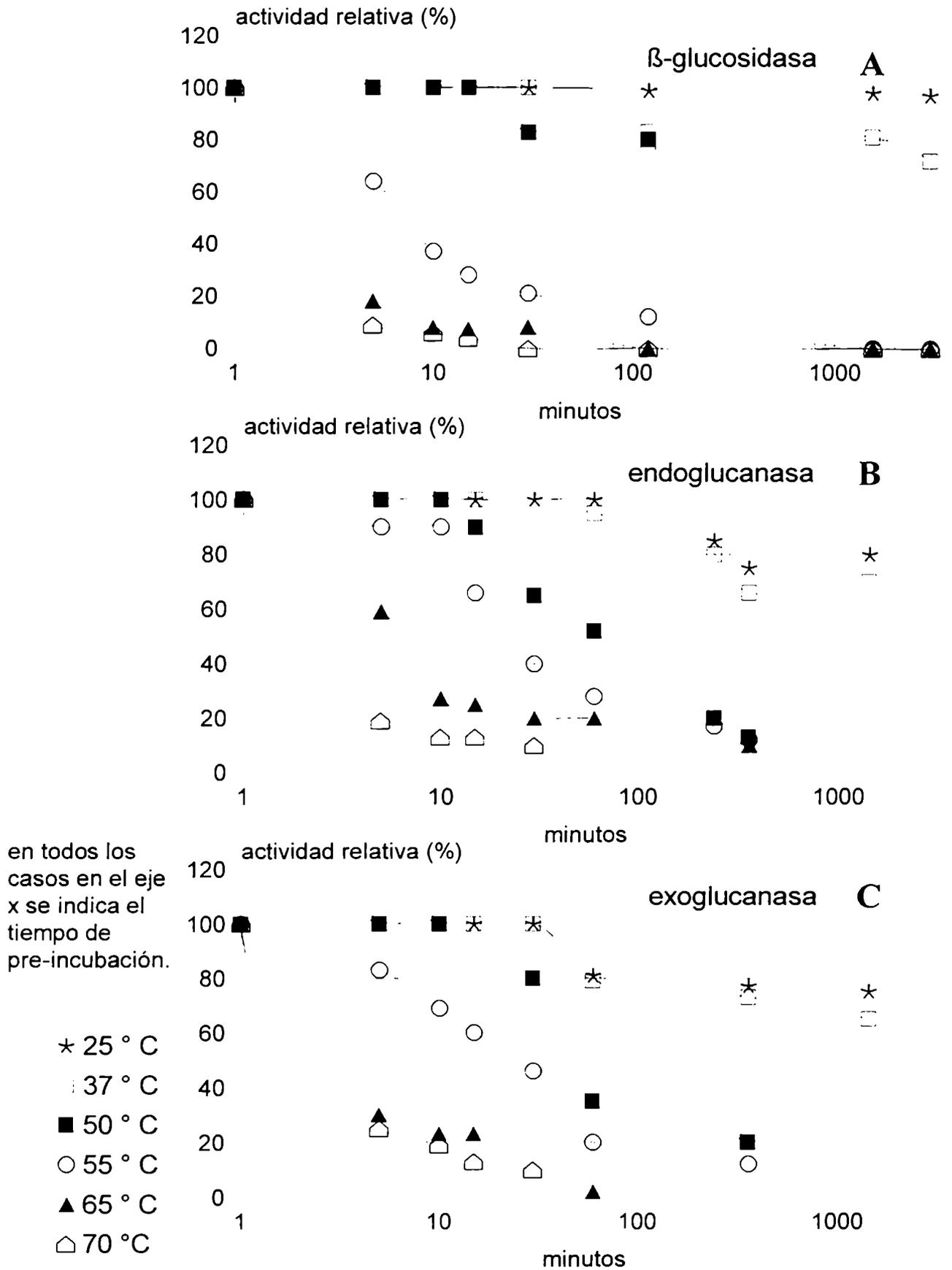


figura 4

termoestabilidad



Estos resultados son los esperados para enzimas extracelulares, que deben permanecer activas en amplios rangos de temperatura, por tiempos prolongados, en presencia de muchas otras sustancias junto al sustrato sobre el que actúan.

En particular resultó sorprendente la baja inhibición por producto final, ya que se menciona usualmente que la actividad de las celulasas sería afectada fuertemente por sus productos de degradación. Este es un concepto teórico, que no coincide con los resultados obtenidos: esta discrepancia sirvió posteriormente para enfocar novedosamente el problema de la regulación del sistema.

Adicionalmente, estos resultados determinaron la elección del protocolo para hacer las reacciones enzimáticas, así como la metodología general de manipulación de los sobrenadantes.

2) Influencia de los nutrientes: cómo el medio de cultivo afecta el crecimiento y la producción de enzimas.

Es importante saber si una variable del medio de cultivo ejerce una acción directa o indirecta sobre la producción de enzimas. Un carbohidrato que sustenta buen crecimiento tiene una acción indirecta: más células pueden secretar más enzima. Pero si es un inductor, tiene además un efecto directo: actúa estimulando a las células.

La biomasa alcanzada en un cultivo depende del estado de las variables del medio. Pero, a su vez, es uno de los factores que determinan la cantidad de celulasas producidas. En esta sección, así como en las siguientes, se analiza cómo (directa o indirectamente) y cuánto es afectada la biosíntesis de celulasas por las más importantes variables del sistema.

Nitrógeno:

Una de las hipótesis que se formularon al respecto fue la siguiente: el sustrato nitrogenado sería una de las variables que tienen sólo un efecto indirecto sobre la producción de enzimas. En condiciones equivalentes, la producción de enzimas no dependería de la fuente nitrogenada en sí, sino de la biomasa que esta es capaz de promover, y podría existir una relación biomasa-producción constante. Es importante investigar la validez de esta hipótesis, ya que se ha planteado que el nivel de aminoácidos determina la inducción del sistema (Sengupta y Sengupta, 1990).

Se tomó el criterio de utilizar la fuente nitrogenada con la que se hubieran obtenido mejores resultados en experimentos precedentes (Magnelli et al., 1996). Estas fueron asparagina y casaminoácidos. Esta última es una fuente natural, cuya composición no es conocida, por lo tanto se decidió trabajar con el aminoácido. Esta será la fuente utilizada en todos los otros experimentos.

Relación carbono/nitrógeno:

Según muchos autores este parámetro es determinante tanto para la producción de enzimas como para el aprovechamiento del sustrato. Dado que esta relación es baja en los sustratos celulósicos, y que de hecho los organismos tienen éxito en estos ambientes, los siguientes experimentos y sus resultados no deben verse como un reflejo del comportamiento natural. Calcular el equilibrio entre carbono y nitrógeno (para un medio de cultivo) sirve, solamente, para poder estudiar el sistema en condiciones óptimas de crecimiento y producción de celulasas.

Se varió la relación carbono/nitrógeno (fig 5) usando celulosa 1%, cantidades variables de asparagina y cosechando el día de máximo crecimiento (8° día, según experiencias preliminares).

En bajas proporciones de C/N (alta asparagina) la biomasa no varía demasiado entre los puntos ensayados, a medida que aumenta la relación C/N (es decir disminuye la asparagina) la biomasa disminuye (fig 5A). Las actividades enzimáticas (fig 5B y 5C) se corresponden con la biomasa, esto concuerda con la hipótesis planteada. La validez de la misma se continúa discutiendo más adelante.

La relación C/N óptima para *S. saccoboloides* es similar a la encontrada para *Penicillium occitanis* (Ellouz-Chaabouni et al., 1995). Esta tasa dista mucho de la que se encuentra en el sustrato natural. Sin embargo podría ser un valor "artificial": un hongo puede concentrar nitrógeno en ciertas áreas, permitiendo la producción de enzimas en esa región. Tales áreas de actividad tendrían una tasa C/N menor (más cercana a valores estimados en cultivo) que el total del sustrato, con gran parte del material celulósico actuando como matriz inerte (Park, 1975).

Variación en la cantidad de sustrato nitrogenado:

Se continuó trabajando con la relación C/N óptima (6), los cultivos se cosecharon todos a los 8 días, el tiempo de máximo crecimiento en todos los casos.

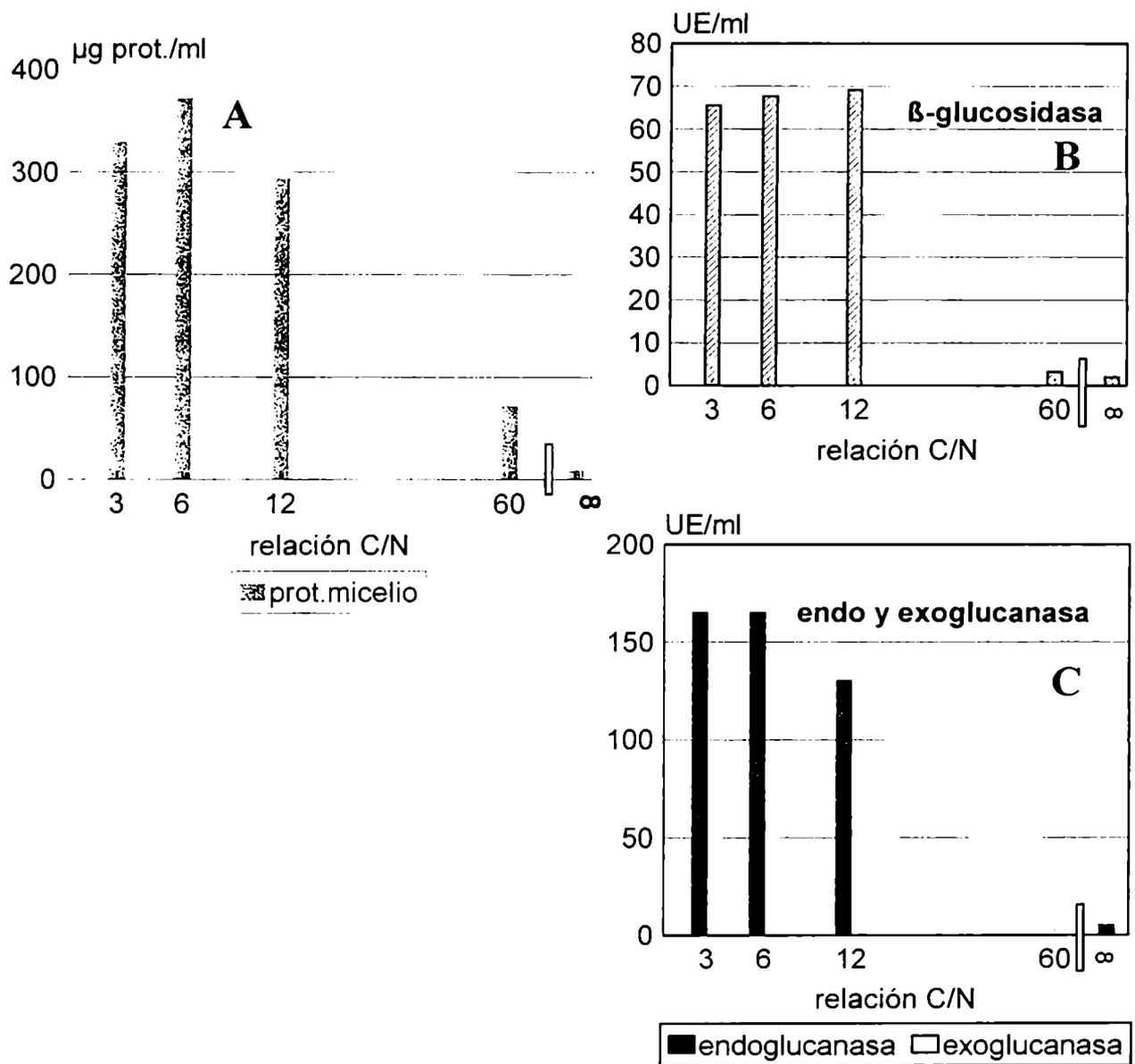
Se ve que a medida que aumenta la cantidad de sustrato aumenta la biomasa (fig 6A), hasta llegar a una meseta, donde el aprovechamiento es ineficiente (algún otro factor se hace limitante y la utilización del sustrato no es óptima). De hecho se observó a simple vista que quedaba bastante celulosa remanente en los cultivos con 15-6 o 20-8 g celulosa-asparagina/l.

La producción de enzimas sigue la misma tendencia ascendente, pero para alta celulosa-asparagina no se ve la meseta, sino un descenso marcado (fig 6B y C). A pesar de esta falta de correlación biomasa-celulosa para estos dos puntos, la hipótesis planteada puede sostenerse. Podría decirse que las enzimas se han liberado, pero quedan adsorbidas a la celulosa remanente. Esto explicaría la menor actividad endo o exoglucanasa en el sobrenadante, pero no la baja actividad β -glucosidasa. Hay otra explicación, si se considera que la fuente de nitrógeno puede ejercer represión catabólica.

Así como se ha descrito para *A. nidulans* la proteína reguladora CREA, se conoce la proteína AREA, que ejerce control transcripcional sobre genes del metabolismo del nitrógeno. La represión metabólica por nitrógeno involucra a esta proteína.

figura 5

efecto de la relación C/N
(cantidad de celulosa constante)

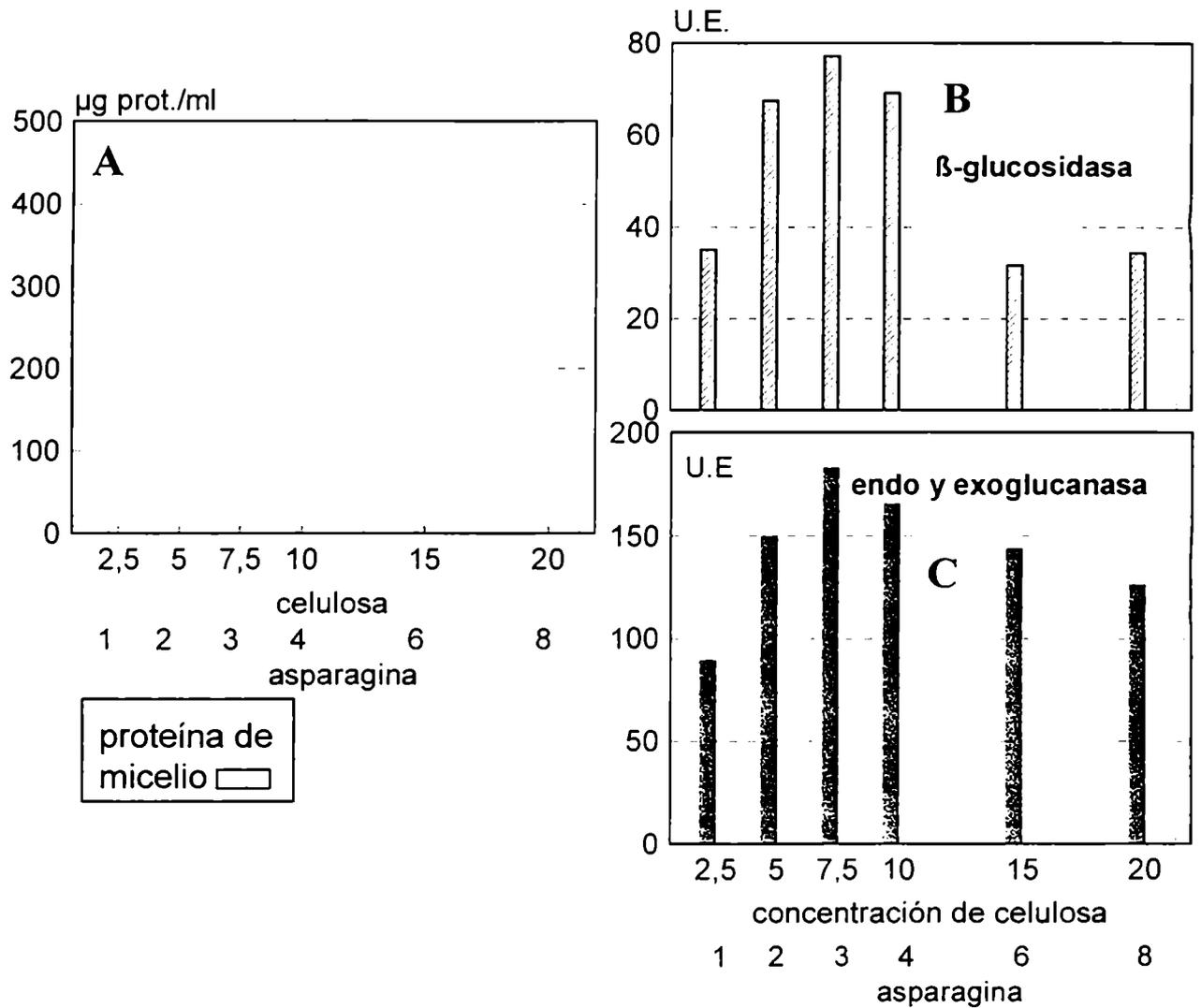


Las diferentes relaciones se obtuvieron del siguiente modo:

relación:	Celulosa	asparagina
∞	10 g	0 g
60	10 g	0.4 g
12	10 g	2 g
6	10 g	4 g
3	10 g	8 g

figura 6

variación en la concentración de sustrato
(relación C/N constante: 6)



los cultivos se realizaron del siguiente modo:

Celulosa (g/l)	asparagina (g/l)
2,5	1
5	2
7,5	3
10	4
15	6
20	8

Dada la complejidad de los mecanismos regulatorios conocidos (con vías que se cruzan o complementan) y dado que se sabe que para algunos genes de este organismo los sitios para CREA y AREA se solapan (MacKenzie et al., 1993), se puede pensar que, en *S. saccoloides* el exceso de asparagina dispararía algún mecanismo represor de la vía del nitrógeno, que alteraría la síntesis de celulasas (reguladas normalmente por carbono).

Si bien es cierto que no fue un objetivo estudiar la represión metabólica por nitrógeno, los datos obtenidos son coherentes con esta explicación.

La propuesta de correlación entre biomasa y celulasas que se propone en esta Tesis es válida en condiciones de inducción del sistema. Como se verá más adelante, en glucosa tal correlación no existe, por ser un azúcar represor.

Un estudio anterior (Magnelli et al., 1996) es coherente con esta hipótesis: usando variadas fuentes de nitrógeno (en condiciones equivalentes a las que aquí no son represoras) se ve que la producción de enzimas correlaciona con la biomasa.

Con estos datos se determina cuáles son las cantidades de celulosa y asparagina óptimas para que el sistema celulasa se exprese en mayor cantidad en cultivo (evitar la represión al mismo tiempo que se obtiene alta biomasa).

Carbono:

La fuente de carbono del medio de cultivo tiene una influencia muy grande en la síntesis de enzimas extracelulares para gran número de especies fúngicas. Los carbohidratos son la fuente de energía para el crecimiento y además, como se explicó en la introducción, sirven de estímulo para que la célula pueda ejercer un control del estado metabólico. La regulación de la síntesis y liberación de celulasas en *S. saccoloides* (así como en otras especies) dependen fuertemente del estado de esta variable, como se muestra en estudios previos (Magnelli et al., 1996). En la siguiente sección se muestran los resultados del estudio de la cinética de producción de enzimas en relación a la variación en calidad de carbono, con el fin de comprobar la hipótesis de que la fuente de carbono, a diferencia del nitrógeno, ejerce influencia directa (como inductor o no del sistema) e indirecta (como un determinante de la cantidad de biomasa) sobre la síntesis de enzimas.

Crecimiento en celulosa:

Si bien ha sido descripta previamente la cinética de crecimiento en este sustrato (Magnelli et al., 1996), aquí se repitió como primer paso para comenzar a estudiar la hipótesis planteada arriba.

Se usó celulosa cristalina, que si bien es una forma no nativa de celulosa, es adecuada para cultivos en condiciones controladas, dado que además de ser insoluble tiene composición conocida, es pura y es homogénea (en cuanto a calidad de la partícula). Este último parámetro es particularmente importante al trabajar con un sustrato insoluble que se encuentra en suspensión.

Dado que *S. saccharoboloides* crece bien en este sustrato, dando los máximos rendimientos de enzimas, el cultivo en celulosa cristalina se utilizó como control de todo el análisis.

Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 7. El crecimiento (fig 7A) precede a la liberación de proteínas al sobrenadante. Las curvas de actividad enzimática (fig 7B) también están un poco desplazadas con respecto a la curva de crecimiento. También puede observarse que la actividad β -glucosidasa no decae cuando el micelio entra en la fase de autólisis.

El pH (fig 7A) baja rápido, por respiración celular activa, y se mantiene así mientras dura el metabolismo primario. Cuando comienza la fase de autólisis, el pH sube hasta 8,4.

De este ensayo, cuyos parámetros serán usados como control en los siguientes experimentos, se desprende que la producción de enzimas en la fase de activo crecimiento depende de que exista biomasa que las sintetice: la celulólisis es parte del metabolismo primario. En la fase estacionaria y de autólisis la actividad decae. La producción de enzimas, además, es coordinada.

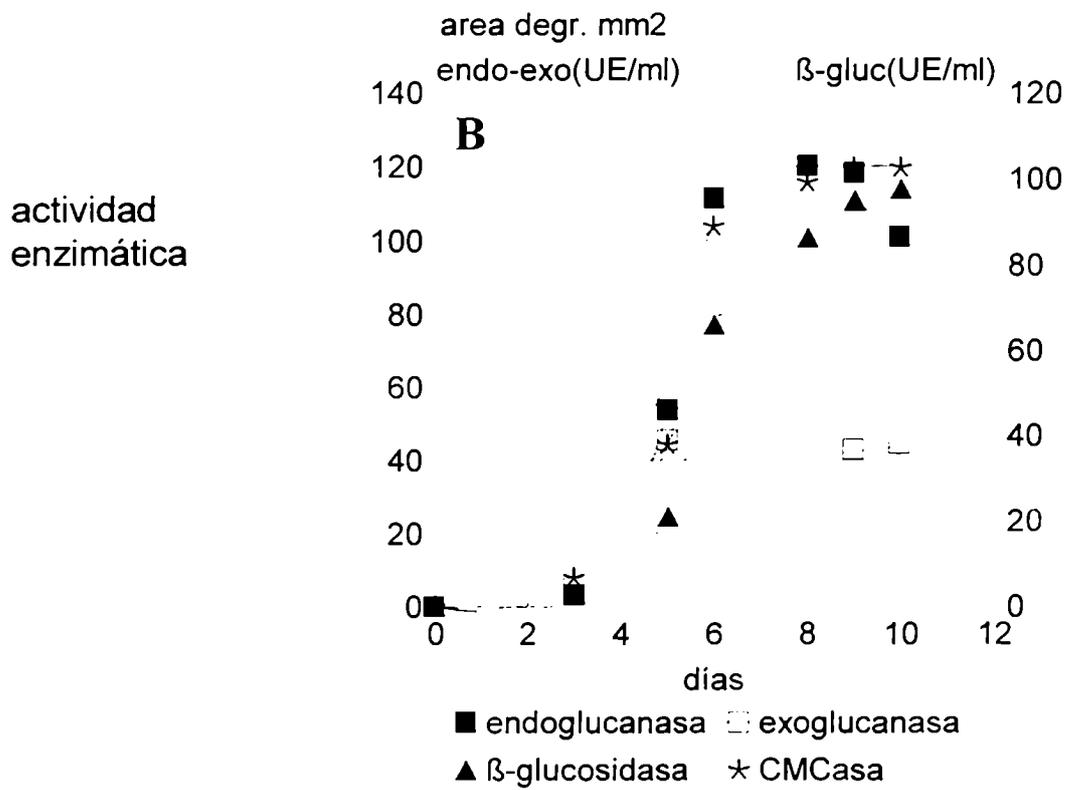
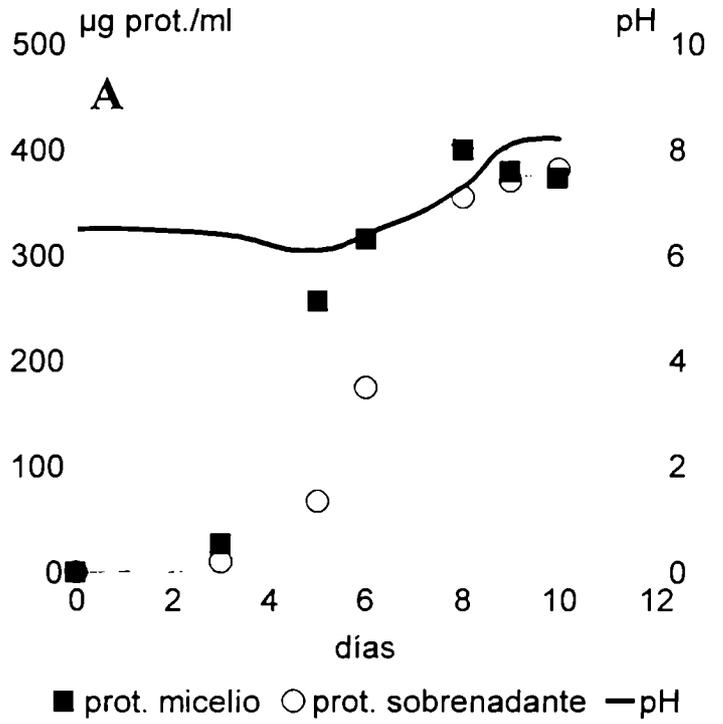
El aprovechamiento del sustrato es eficiente: no hay nunca altos niveles de azúcares solubles derivados de la degradación, lo que indica que la actividad está coordinada con la capacidad de incorporación de nutrientes por parte del micelio.

Existen varias explicaciones de la cinética ligeramente diferente de la β -glucosidasa: a) este componente del sistema tiene regulación diferente; b) la enzima tiene localización en pared celular y se libera por autólisis. La validez de estas hipótesis se investiga y discute más adelante.

figura 7

curva de crecimiento en celulosa cristalina

(medio CC)



Crecimiento en glucosa:

La figura 8 muestra los datos obtenidos de la curva en medio con glucosa como única fuente de carbono.

El día de máximo crecimiento es el 7°, adelantado con respecto al pico en celulosa cristalina, aunque la fase lag (3 a 4 días aproximadamente) es igual en ambas curvas, indicando que la adaptación a la celulosa cristalina es eficiente. La diferencia en los picos se genera, entonces, porque en glucosa la pendiente de la fase exponencial es mucho más pronunciada, mostrando que la tasa de asimilación es diferente entre la glucosa y celulosa.

El metabolismo de la glucosa implica, a lo largo de los primeros días, un descenso del pH desde 6,5 hasta 5. Se conoce que un pH inferior a 4 inhibe la actividad metabólica del hongo (Magnelli et al., 1996), y consecuentemente la producción de enzimas. Más adelante se muestra que la variación de pH observada en este ensayo no es la causa de la falta de actividad enzimática.

A pesar del alto rendimiento en peso (ver también sección anterior), y como es de esperar por datos teóricos, no existe un nivel considerable de enzimas celulolíticas. Las tres actividades medidas fueron bajas (fig 8B), así como las proteínas de sobrenadante (fig 8A) y no se correlacionan con el crecimiento.

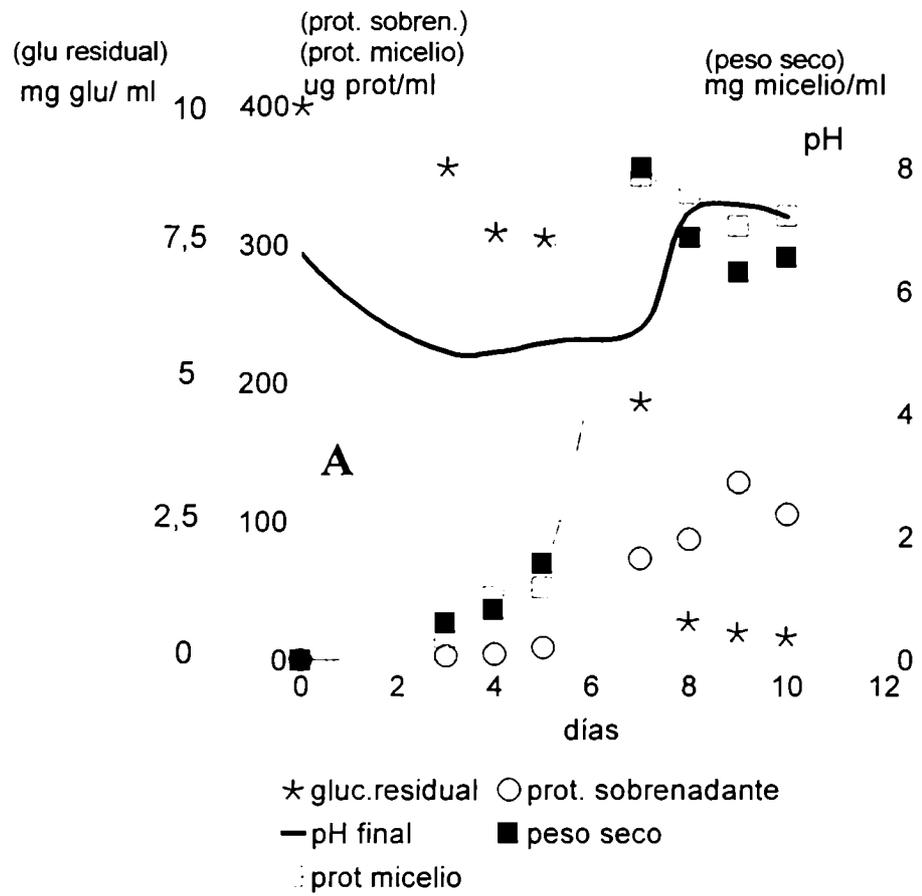
Esto es diferente a lo que ocurre en celulosa cristalina, donde las enzimas se liberan en gran cantidad dentro de la fase de crecimiento activo del micelio. Este resultado, que en principio parece obvio, es importante de considerar. Si se estudia la producción enzimática frente a una fuente de carbono, es necesario establecer el estado del micelio, ya que muchos metabolitos se producen inespecíficamente durante la fase de autólisis.

Crecimiento en celobiosa:

Los resultados obtenidos con este disacárido son muy similares (en cuanto a cinética y rendimiento de biomasa y enzimas) a los que se observan en cultivos con glucosa.

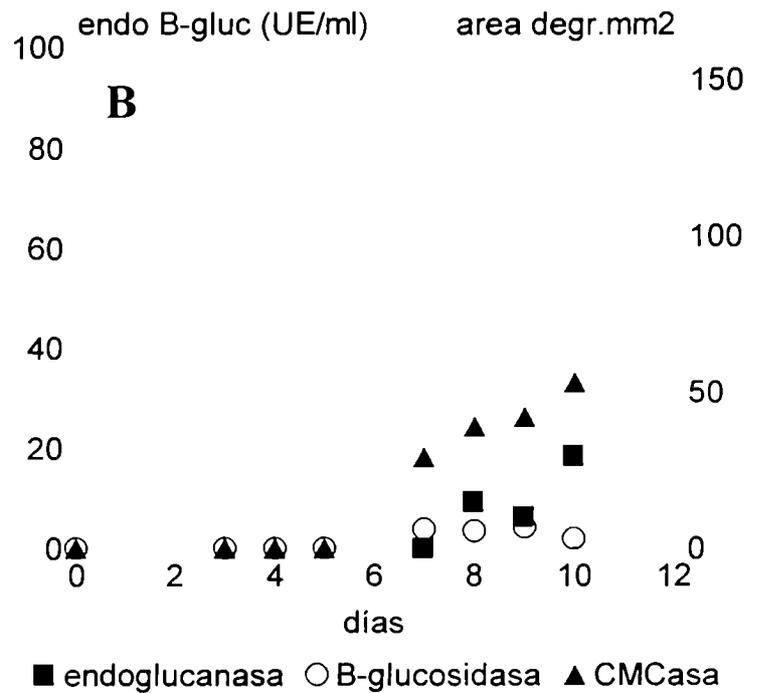
Estas observaciones son coherentes con la existencia de β -glucosidasa constitutiva: más adelante se muestran los resultados de la investigación sobre esta hipótesis.

figura 8 curva de crecimiento en glucosa
(medio GA)



actividad enzimática

la escala de ambos ejes muestra que el nivel enzimático producido es bajo



Crecimiento en lactosa:

A partir de resultados previos de cultivos de *S. saccoboloides* en lactosa (a los 10 días presenta crecimiento vestigial, con producción de celulasas) se diseñó una curva de crecimiento a 34 días (fig 9). Al máximo tiempo escogido se encuentra el mayor crecimiento (2 mg/ml en peso seco de micelio) mostrando que esta molécula es aprovechada con menor eficiencia que la glucosa. La curva de pH (fig 9A), que no varía durante los días de incubación, podría estar indicando que el mecanismo respiratorio no funciona activamente. La figura 9B muestra la actividad enzimática y el peso seco, comparados con los obtenidos en glucosa. En lactosa, a pesar del bajo crecimiento se producen cantidades apreciables de enzimas (durante la fase activa): este β ,1-4 disacárido parece actuar como inductor.

Crecimiento en maltosa y en CMC:

Para ambos medios se obtuvo crecimiento vestigial, por lo que no se pudo procesar las muestras. Sin embargo en CMC pudo determinarse cierta actividad enzimática, muy alta si se la refiere a la poca biomasa que se observaba. En este caso, al igual que para la lactosa, se consideró a la CMC como un potencial inductor del sistema.

Crecimiento en xilano:

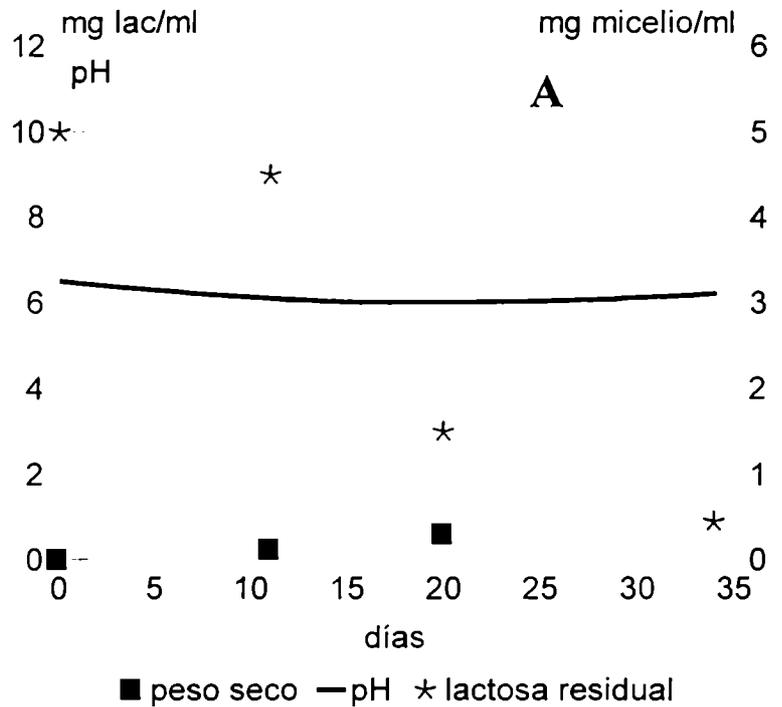
La curva en xilano se muestra en la figura 10. Algo muy interesante de destacar es que si bien el xilano requiere clivaje enzimático para ser aprovechado, el rendimiento en peso (o proteína de micelio) es semejante que en glucosa. Inclusive la velocidad del crecimiento es alta comparada con la curva de celulosa cristalina. La actividad celulolítica fue basal, del tipo que se registra en glucosa, indicando que el xilano no sería un inductor del sistema.

De todos estos experimentos se puede ver que *S. saccoboloides* aprovecha eficientemente fuentes de carbono que requieran clivaje enzimático. En particular se comprueba que es capaz de crecer bien y degradar la celulosa, comprobándose su carácter de organismo celulolítico "verdadero".

La glucosa y celobiosa son una buena fuente para el crecimiento de muchos hongos, y al igual que en *S. saccoboloides*, con estos carbohidratos no se obtienen buenos rendimientos de enzimas (Mandels y Reese, 1957; Shewale y Sadana, 1978; Canevascini et al., 1979; Stewart y Parry 1981; Riou et al., 1991; Garzillo et al., 1994; Levin y Forchiassin, 1995; Sívori et al., 1996; Pardo et al., 1994).

figura 9

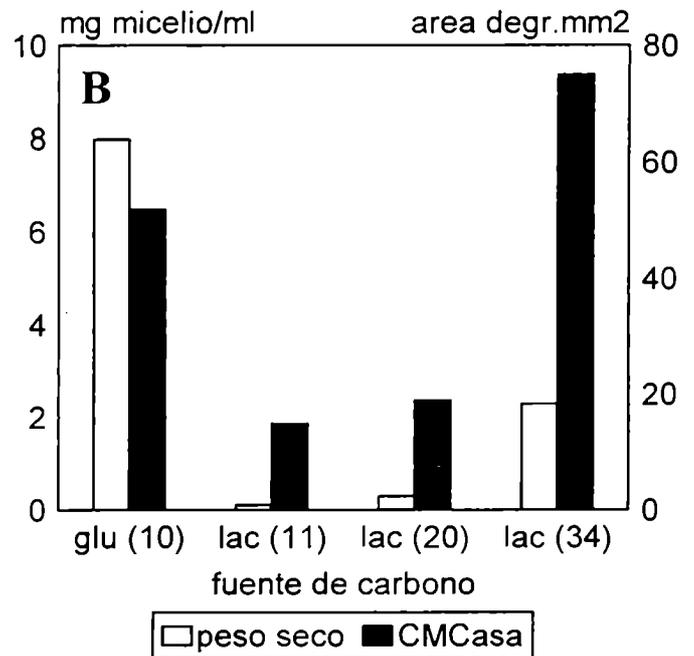
curva de crecimiento en lactosa (medio lactosa)



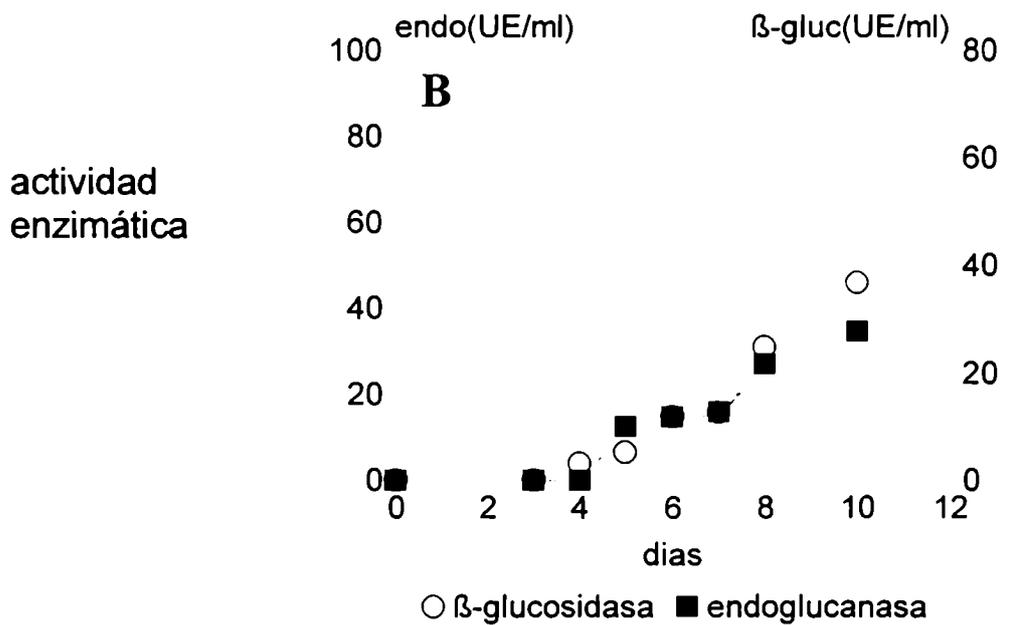
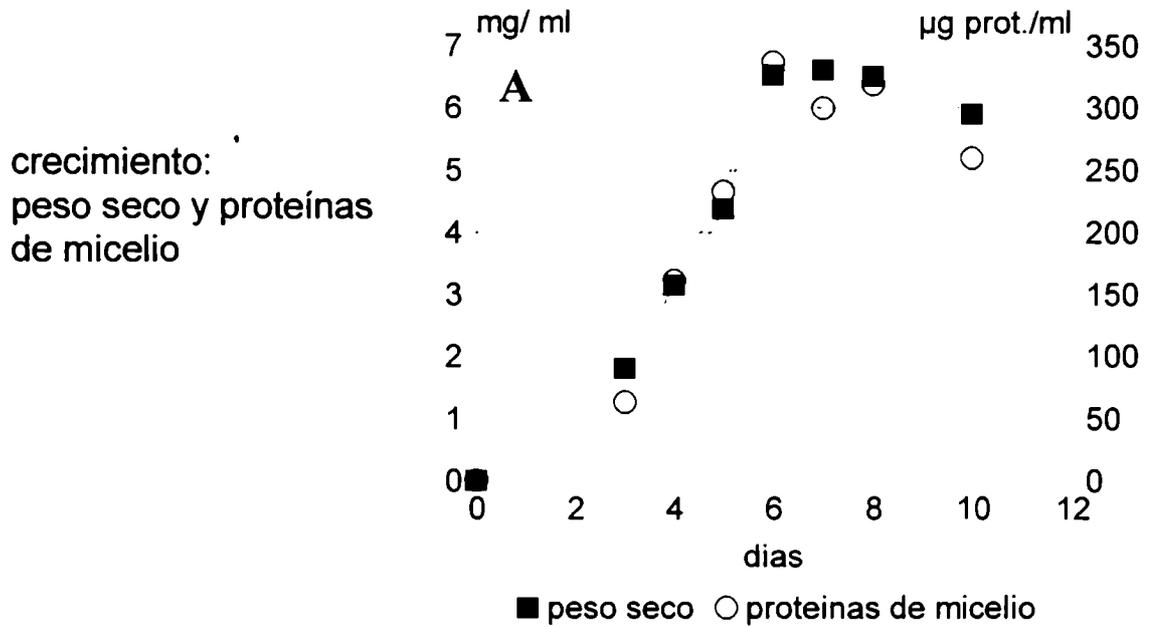
comparación de crecimiento y producción de celulasa entre cultivos en medio con lactosa o glucosa

los valores en glucosa se dan como referencia, y corresponden a los de 10 días de crecimiento

para lactosa (11, 20 y 34 días) se muestran los valores de peso seco y CMCasa.



curva de crecimiento en xilano



Para *T.reesei* (Messner y Kubicek, 1991; Chauduri y Sahai, 1993a y b), *Aspergillus terreus* (Singh et al., 1996) o *Gloeophyllum trabeum* (Cotoras y Agosin, 1992), entre otros, la CMC o la lactosa son apropiadas fuentes de carbono, a diferencia de lo que ocurre en *S. saccoboloides*.

Curvas de crecimiento en celulosa cristalina combinada con otro carbohidrato:

Se comparó el crecimiento y la producción enzimática entre cultivos con celulosa cristalina 1% como única fuente de carbono (control), y cultivos con un segundo compuesto (0.1%) como fuente de carbono adicional.

Estos medios representarían "celulosa semidegradada", y la idea fue estudiar si se alteraba la cinética de producción enzimática.

Adición de glucosa

Los resultados del agregado de glucosa 0.1% se muestran en la figura 11. No sólo el crecimiento no se vio significativamente adelantado, sino que los valores finales de proteínas de micelio fueron menores (fig 11A), así como los de proteínas de sobrenadante. La fase estacionaria duró más que en el cultivo control.

Sin embargo los valores de actividad enzimática fueron similares al control (fig 11B y C). No hubo efecto represor de la glucosa (se consumió dentro de los primeros cuatro días).

Adición de celobiosa:

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12. Ocurre lo mismo que con la glucosa, en lugar de adelantarse como se esperaba, la curva de crecimiento se retrasa un poco, aunque los valores máximos de proteína de micelio alcanzados son similares. También se retrasa la liberación de proteínas al sobrenadante (fig 12A).

Tampoco se observa un adelanto en las curvas de actividad enzimática (figs 12B y C). Los valores de CMCasa son ligeramente inferiores al control. Al igual que con la glucosa, la celobiosa es consumida dentro de los primeros tres días.

No hay datos suficientes para explicar porqué, si la glucosa y celobiosa son rápidamente aprovechadas por el organismo, no se verifica un incremento (aunque sea ligero) en la biomasa.

figura 11

crecimiento en celulosa/glucosa (medio CC+ glu 0,1%)

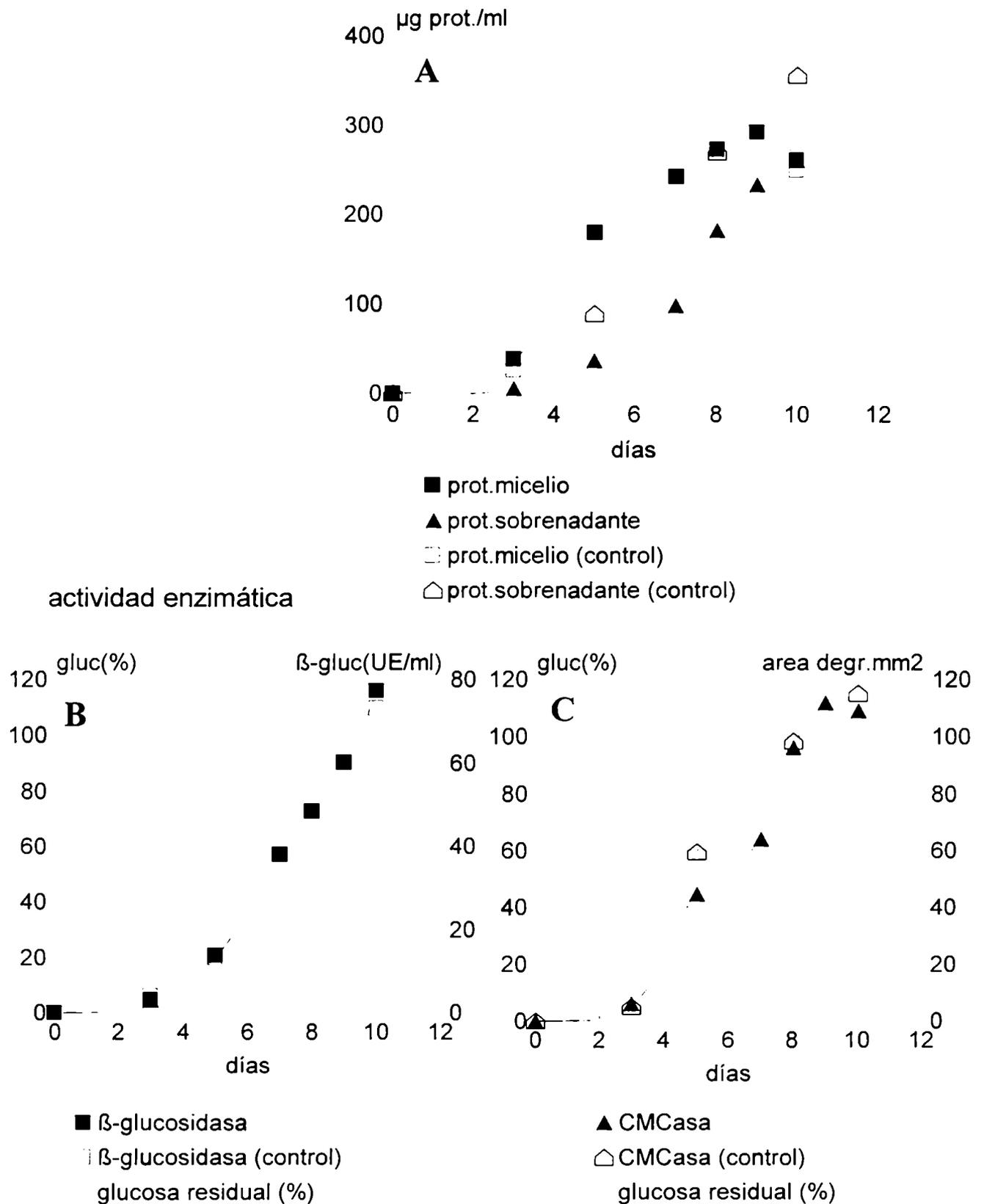
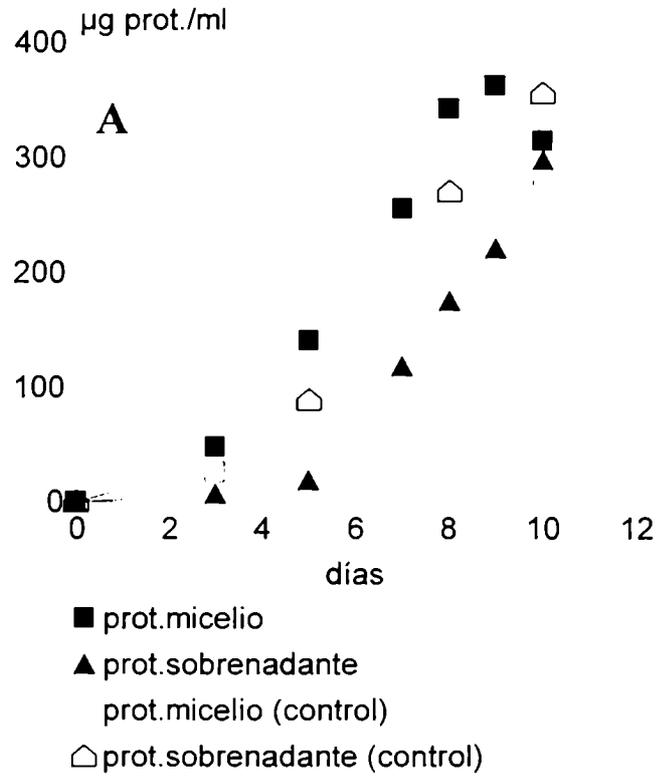
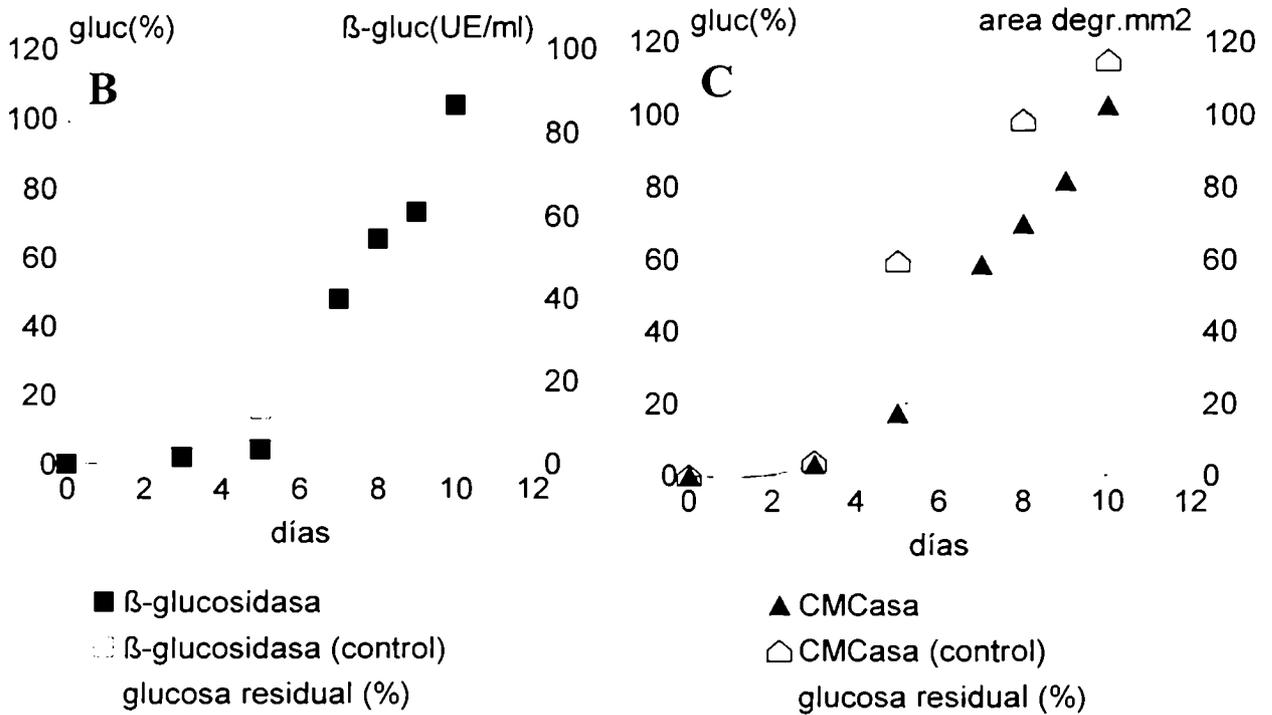


figura 12

crecimiento en celulosa/celobiosa
(medio CC+ clb 0,1%)



actividad enzimática



Adición de lactosa:

Se cultivó *S. saccharoboloides* en celulosa más lactosa 0.1% (fig 13 A). Aunque no sea un derivado de la celulosa este disacárido parece actuar como inductor: la lactosa sería similar a un producto de hidrólisis o a un derivado del mismo.

Sorprendentemente (por la baja concentración utilizada) el crecimiento se retrasó significativamente (alrededor de 6 días con respecto al control). Para descartar que esta inhibición fuera permanente se dejó progresar los cultivos hasta el 13° día. En ese momento la lactosa estaba casi agotada y el crecimiento se había iniciado (fig 13 A). Dado que el crecimiento precede a la producción enzimática, también queda desplazada la curva de celulasas (fig 13 B).

¿Por qué se retrasa tanto la utilización de celulosa estando presente una molécula que parecía ser inductora? Si se propone una curva en diauxia, es curioso que se consuma primero este disacárido, que se aprovecha lenta e ineficientemente (ver crecimiento en lactosa). Claramente la lactosa está interfiriendo con el proceso normal de degradación. ¿es un inductor del sistema o no?

Adición de CMC:

La figura 14 muestra el efecto del agregado de CMC 0.1%. Esta celulosa sustituida soluble ha sido mencionada como un inductor del sistema gracias a su capacidad de interactuar eficientemente con las hifas.

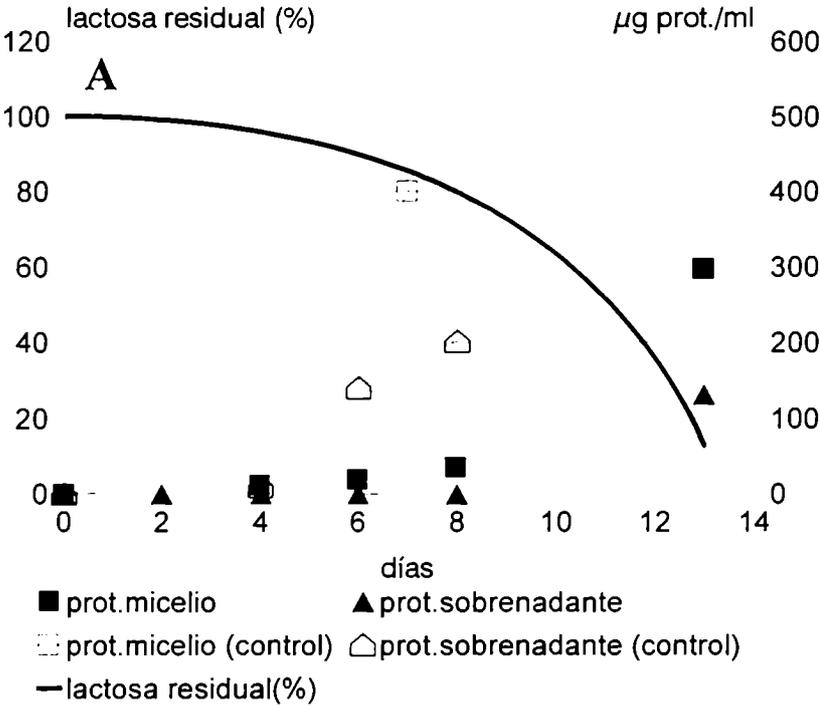
Con el agregado de CMC se verificó un adelanto significativo en la curva de crecimiento (fig 14 A), y también en la producción de enzimas (figs 14B y C). Si bien las proteínas de micelio no alcanzan los máximos valores del control, los niveles de actividad enzimática son mayores. Podría ser que la CMC sea "detectada" como celulosa "amorfa", disparando la síntesis de enzimas.

Pero antes de concluir que la CMC actúa como inductor hay que descartar otras explicaciones dado que, si bien es soluble, es una macromolécula (y por cierto dista mucho de ser semejante a algún producto natural).

Habría que comprobar si tiene un efecto "nutricional" o un efecto físico: la CMC aumenta la viscosidad del medio y altera la forma de crecimiento (Morris y Ward, 1990) siendo posible que mejore la interacción entre el micelio y la celulosa cristalina, sin tener un efecto directo en la síntesis de celulasas. Más adelante se comenta el efecto de la viscosidad del medio.

figura 13

crecimiento en celulosa/lactosa (medio CC+ lac 0,1%)



actividad enzimática

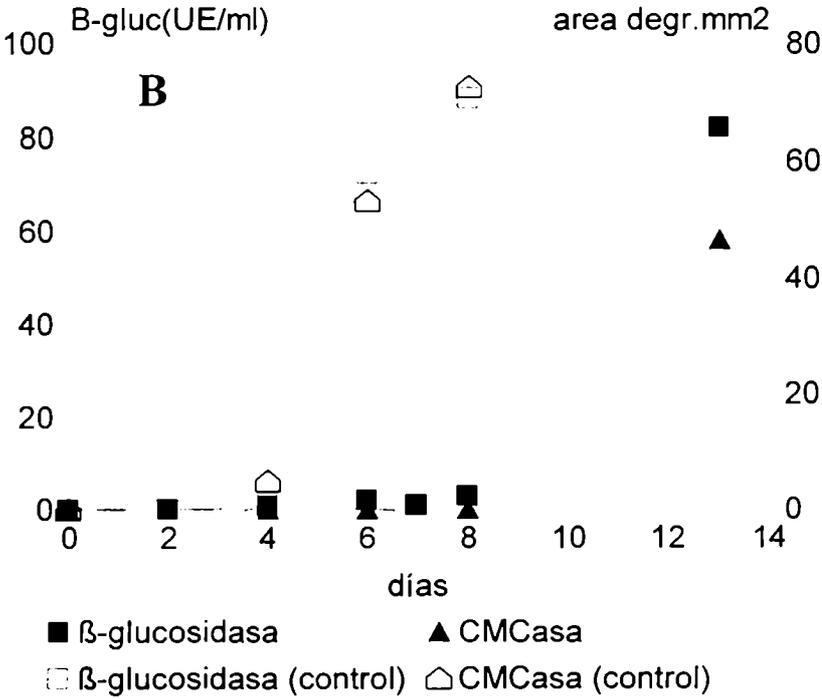
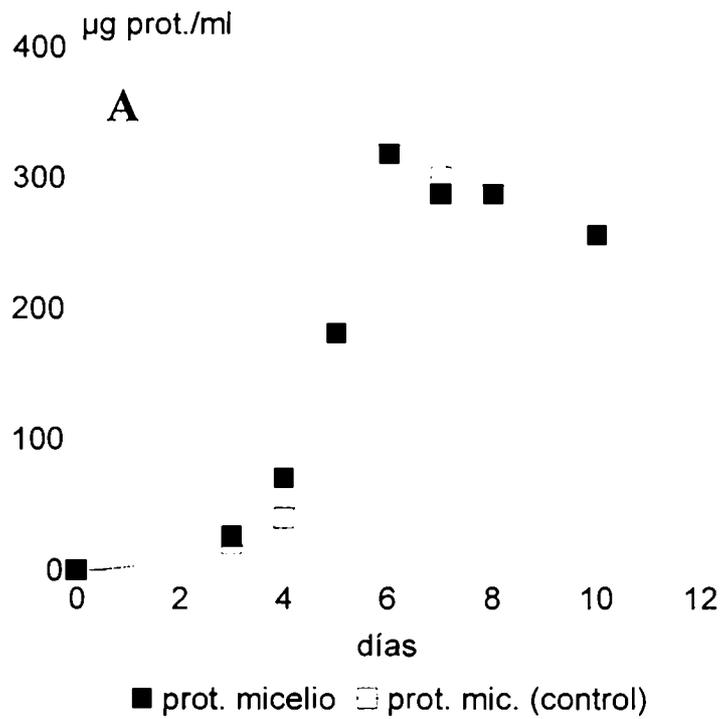
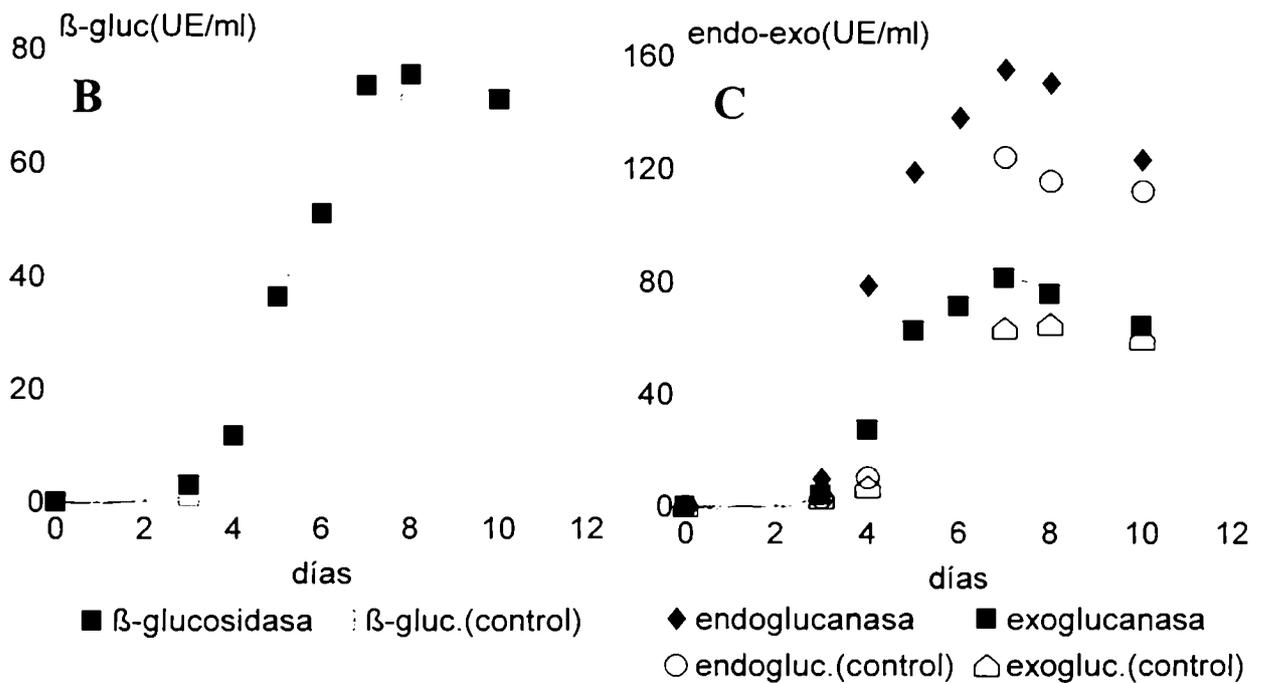


figura 14

crecimiento en celulosa/CMC (medio CC+ CMC 0,1%)



actividad enzimática



Comentarios:

El hecho de que el crecimiento no sea equivalente en las distintas curvas complica el análisis. Claramente, de la fuente de carbono dependen tanto el rendimiento en biomasa como la síntesis de enzimas. Hay que comprobar fehacientemente cuáles son los inductores del sistema, e investigar por qué el organismo responde de manera inesperada a los azúcares.

Para afirmar o descartar las ideas planteadas se continúa trabajando con un nuevo diseño del sistema de cultivo.

3) Una alternativa experimental: cultivos de reemplazo:

Esta metodología fue elegida luego de revisar los resultados previos, dado que no son comparables resultados tomados en base a curvas de crecimiento. Para evitar estos problemas y estudiar en forma controlada el proceso mismo de inducción se diseñó un sistema de cultivo secuencial tal que permitiera cantidades constantes de biomasa (en un estado fisiológico fijo).

Se logró la inducción en condiciones comparables al precrecer el micelio en medio con glucosa-asparagina (GA), cosechándolo dentro de la fase de crecimiento activo, y transfiriéndolo a medio fresco, el cual tiene bajo contenido de nitrógeno (ver más adelante) y carece de vitaminas, lo cual asegura que la biomasa permanezca constante. Las inducciones no duraron más que 24 horas en general, ya que la respuesta al inductor fue rápida y potente. Si bien no es el modo de cultivo más frecuente se consideró que trabajos que lo desarrollan así arrojan datos más concluyentes que los otros (Sanyal et al, 1988; Strauss y Kubicek, 1990; Messner y Kubicek, 1991). En esta sección se muestra cómo se determinaron las condiciones óptimas para llevar adelante estos ensayos.

Influencia de la fuente de nitrógeno:

En principio sólo se probó la influencia de la concentración de asparagina. Dado que la bibliografía presenta metodología muy variada al respecto de cómo debe ser el medio de inducción, se determinó si existían diferencias entre inducir supliendo o no con asparagina.

Se comprobó que a bajas concentraciones de inductor (celulosa cristalina 0,1 o 0,01%) la respuesta es equivalente con o sin asparagina, pero con alta concentración de celulosa (1%) se duplica la respuesta al aumentar de 0 a 0,1 o 0,4% de asparagina, cantidades mayores desmejoran la producción (esto coincide con las hipótesis de un efecto represor del nitrógeno en alta concentración).

La necesidad de cierta cantidad de nitrógeno es razonable, dado que la inducción implicaría síntesis proteica (ver más adelante), por lo que la fuente de nitrógeno sería limitante para una respuesta máxima (Sengupta y Sengupta, 1990; Ganju et al., 1990). Se eligió por lo tanto trabajar con un medio de inducción de asparagina al 0,1%. Estos resultados no se corresponden con otras metodologías elegidas para cultivos de reemplazo (Cotoras y Agosin, 1992), en donde la inducción se realiza en medio carente de fuente de nitrógeno.

Se ensayó, posteriormente, la influencia de diferentes fuentes nitrogenadas, a una concentración de nitrógeno equivalente a 0,1% de asparagina. Por los resultados de crecimiento previamente expuestos se sabe que la fuente de nitrógeno afecta indirectamente a la producción de enzimas.

Para las actividades endo y exoglucanasa la asparagina resultó el mejor tratamiento (fig 15A y B), ya que si bien la actividad inicial en nitrato es mayor, posteriormente decae, indicando la presencia de algún factor inhibitorio (inactivador) de la actividad enzimática (como se vio en los estudios de estabilidad, durante 24 hs a 23°C las enzimas son muy estables). Los compuestos de amonio son los que dan los niveles más bajos. La CMCasa presenta una respuesta similar (fig 16A). Para la β -glucosidasa, los nitratos resultan más favorables que la asparagina, y claramente el amonio desmejora la producción (fig 16B).

Estudios anteriores (Magnelli et al., 1996) mostraron que en curva de crecimiento el aprovechamiento del nitrato y amonio no es tan eficiente como el de un aminoácido. En esas condiciones ni el crecimiento ni la producción enzimática ocurren en medio con amonio, a consecuencia del descenso inicial muy brusco del pH ocasionado por el intercambio iónico devenido del transporte. El metabolismo del nitrato genera una curva de pH igual a la de asparagina, el rendimiento menor se debe a que su asimilación implica gasto de energía.

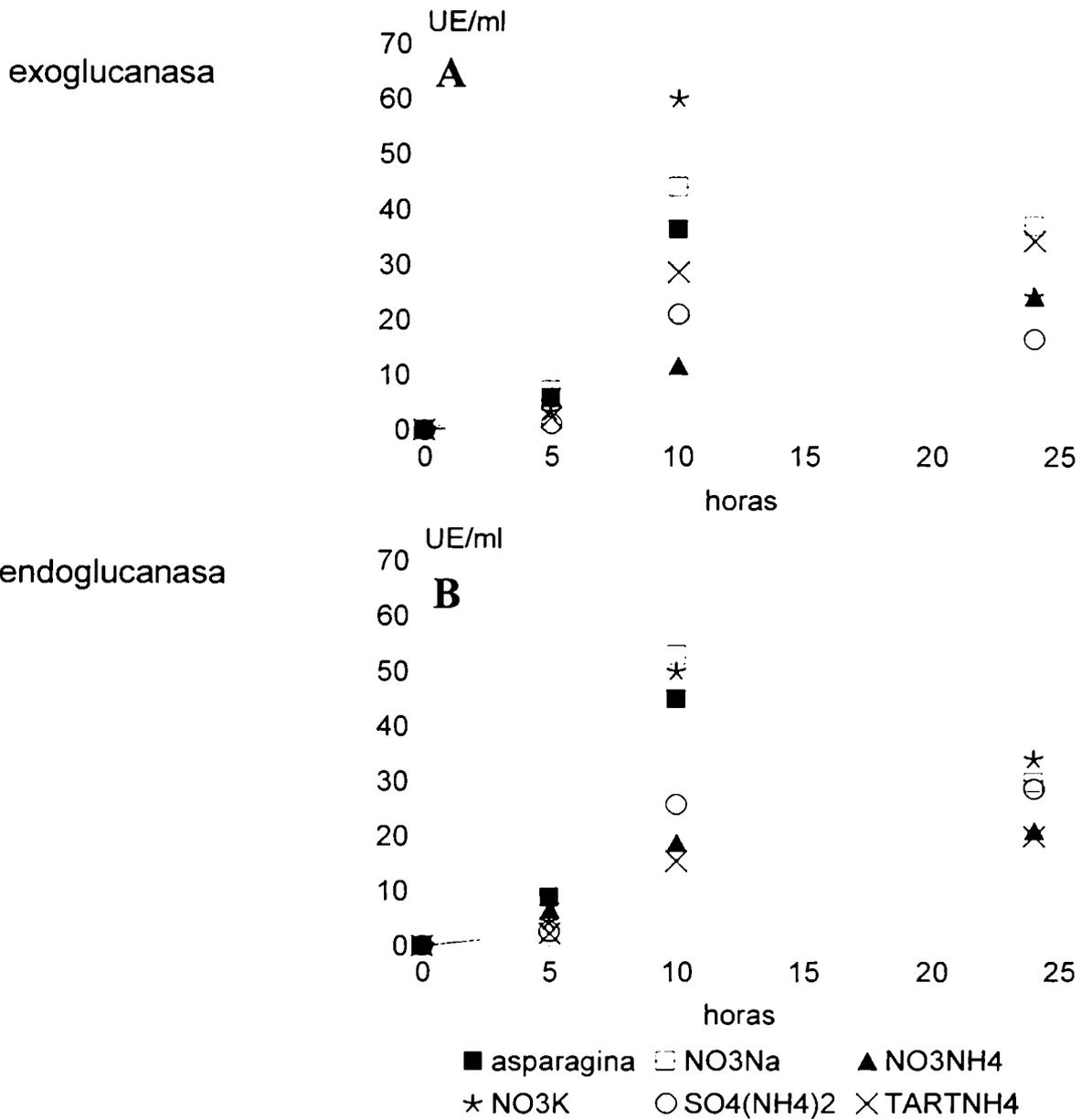
En estos cultivos de reemplazo se muestra que las enzimas se vuelven inestables en cultivos con nitrato, aunque no se encontró ninguna explicación para este efecto. En el caso del amonio, a 24 hs se registró un descenso del pH (de 6,5 a 4), suficiente como para alterar el metabolismo del hongo, explicándose la baja producción enzimática.

Este descenso es más marcado que el registrado en glucosa (donde no se producen enzimas), y no inhibe por completo la producción. Esto demuestra que no es el pH una señal para disparar la producción.

Aunque la producción de β -glucosidasa fue algo mayor en nitrato que en asparagina, el aminoácido resulta la mejor fuente de nitrógeno para la producción del sistema completo en 24 hs, por lo tanto se elige trabajar con asparagina 0,1%, para todos los ensayos de inducción.

figura 15

influencia de la fuente de nitrógeno
en inducción con celulosa cristalina



NO₃Na: nitrato de sodio

NO₃NH₄: nitrato de amonio

NO₃K: nitrato de potasio

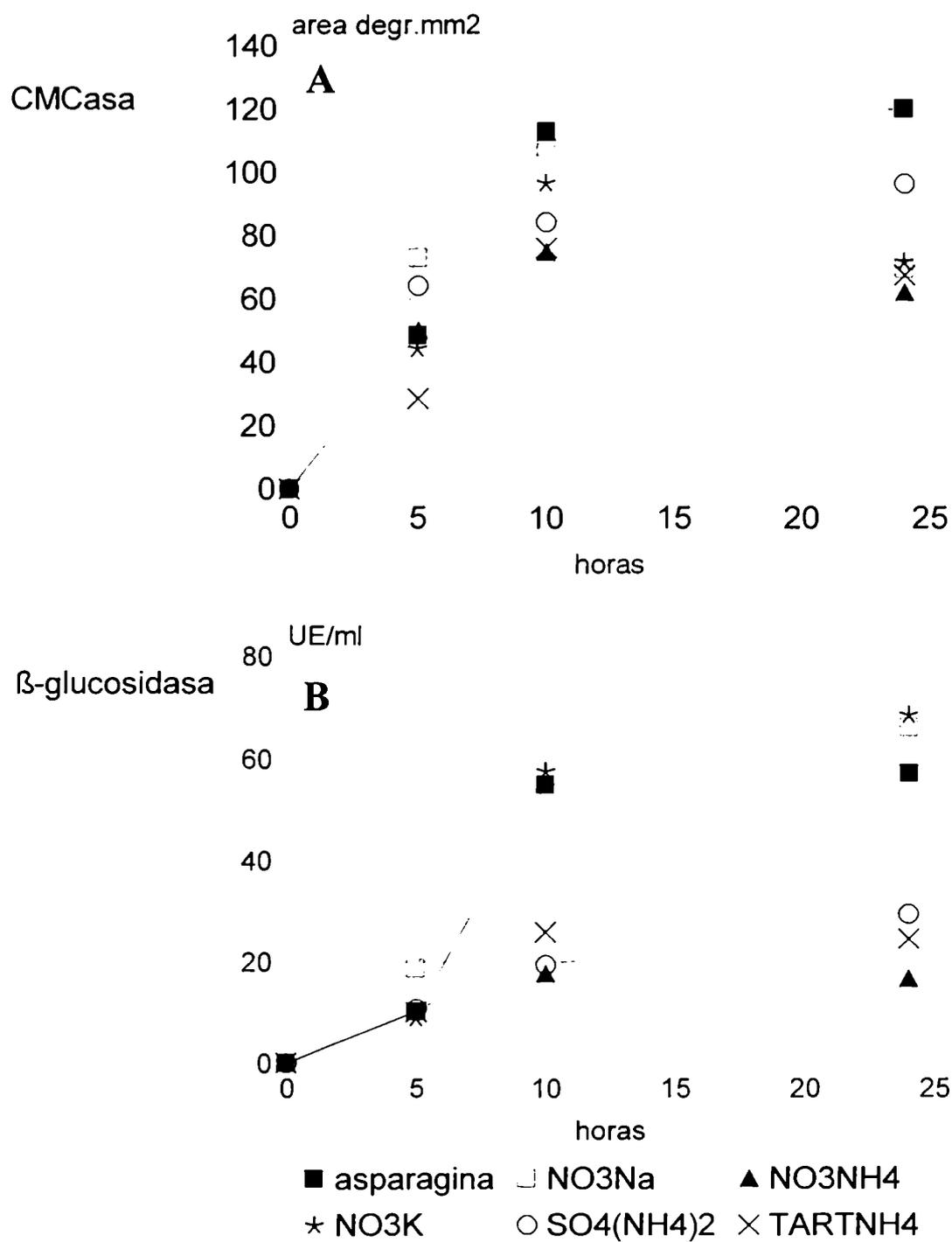
SO₄(NH₄)₂: sulfato de amonio

TARTNH₄: Tartrato de amonio

Se utilizo en cada caso una concentracion que fuera
equivalente en gramos de N a 1% de asparagina

figura 16

influencia de la fuente de nitrógeno en inducción con celulosa cristalina



Influencia de surfactantes:

Se adicionó Tween 80 a cultivos en celulosa cristalina 1%. La actividad CMCasa no responde favorablemente al detergente, la β -glucosidasa comienza a liberarse antes, pero el nivel final alcanzado es muy bajo (fig 17A).

Este compuesto altera la permeabilidad de la membrana y ha sido usado con éxito para estimular la liberación de las enzimas (Oguntimein y Moo-Young, 1991; Menon et al., 1994; Cai et al., 1994). También puede alterar el patrón de crecimiento, el cual está directamente relacionado con la producción, dado que de él depende la interacción entre las hifas y el sustrato insoluble (Mercuri, 1987b).

La respuesta negativa parece estar causada por la desorganización de las estructuras celulares: se encontró un notable aumento de azúcares solubles en las inducciones con Tween, que indicarían autólisis de la pared o del protoplasto (probablemente también se liberen proteasas que normalmente no están presentes en el medio, responsables de la inactivación de las enzimas). La aparición de la actividad β -glucosidasa dentro de las primera dos horas indicaría que podría estar asociada al micelio. Esta es una evidencia más de las probables diferencias de localización y regulación para esta enzima, la investigación de este carácter se muestra más adelante.

El ensayo con Tween en CMC (fig 17B), no presentó tantas diferencias con el control, aunque éste fue mejor. La β -glucosidasa alcanza altos niveles en cuanto comienza el ensayo, pero finalmente la actividad decae. El patrón es similar al descrito arriba, reforzando la idea de un efecto negativo del Tween por inducción de autólisis.

Saccobolus saccoboloides, al igual que muchos miembros de la familia Ascobolaceae, responde desfavorablemente a estos agentes. Muchos hongos de esta familia ni siquiera comienzan a crecer en medio con surfactante (Sivori et al., 1996). Si bien es un agente que se suele utilizar para mejorar la producción (Gomes et al., 1994; Menon et al., 1994; Pushalkar et al., 1995) es probable que siempre tenga este efecto desorganizador de la estructura hifal. Es prudente no incluir Tween en los cultivos, con el fin de que el estado fisiológico del organismo se aleje lo menos posible del estado normal.

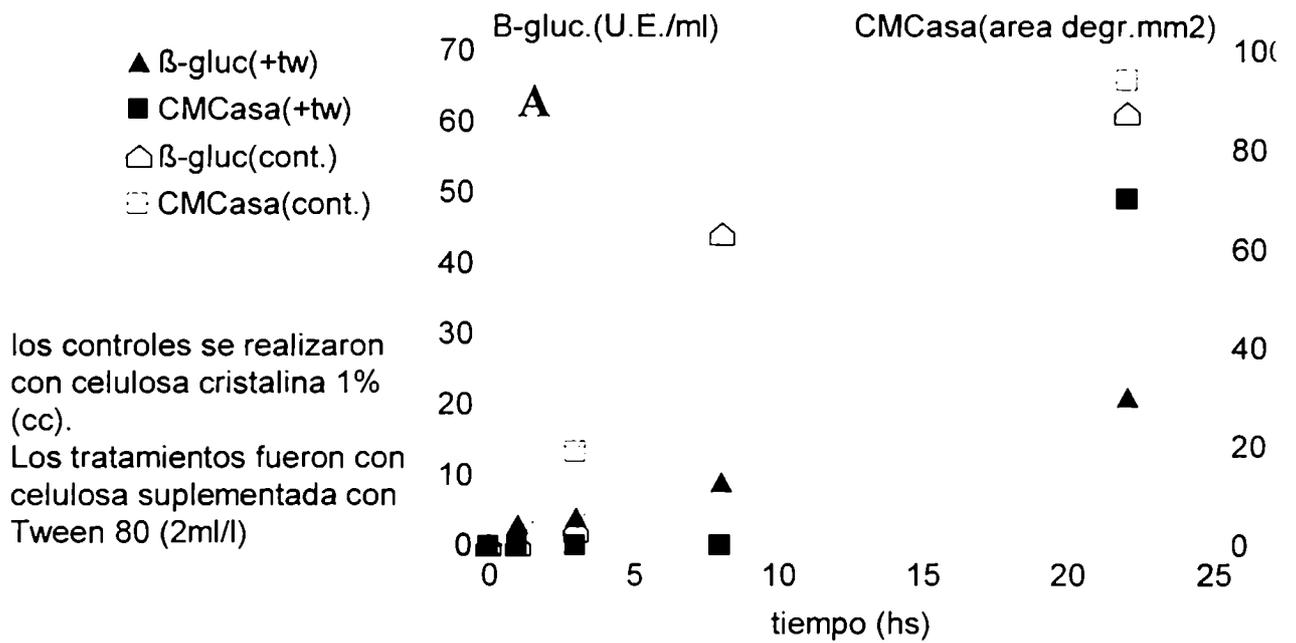
Condiciones estándar:

De los resultados anteriores se decide que el medio de inducción control lleva 0,1% de asparagina y 1% de celulosa cristalina, sin adición de surfactante (ver formulación en materiales y métodos).

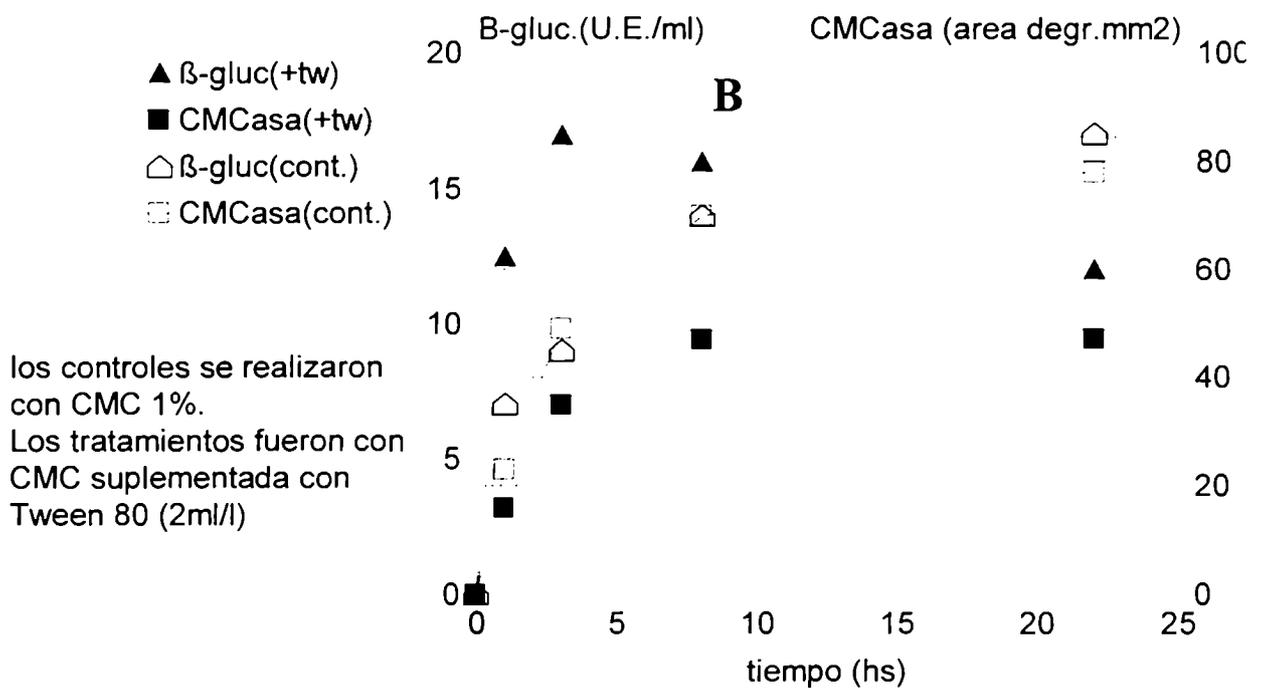
figura 17

efecto de surfactantes

inducción con celulosa cristalina



inducción con CMC



4) El control de la producción de celulasas por fuente de carbono: estudio de la inducción.

Una vez determinadas las condiciones estándar se comenzaron a usar los cultivos de reemplazo para investigar la regulación por fuente de carbono. Los resultados obtenidos arrojaron datos muy confiables: el control de las variables fue mucho más sencillo (no existe efecto de la biomasa o de la edad del cultivo). Además, y por la corta duración del ensayo y por las condiciones que disminuyen la tasa de crecimiento, se minimiza el efecto de los cambios producidos en el medio a causa del metabolismo (por ejemplo nunca se registraron cambios importantes en el pH).

En la introducción se señaló la importancia de los carbohidratos, y si bien no fue el objetivo del trabajo comprobar los mecanismos regulatorios a nivel génico, las hipótesis planteadas y los diseños experimentales apuntan a comprobar si *S. saccharoboloides* responde a los modelos propuestos para otros hongos.

Las hipótesis generales son:

- a) las celulasas son enzimas inducibles.
- b) la glucosa (y probablemente otros azúcares sencillos) actúan como represores catabólicos.
- c) de hallarse una molécula soluble que actúe como inductor, dispararía con rapidez la producción.
- d) no es la tasa de crecimiento que se dé en un carbohidrato, sino la naturaleza química del mismo, lo que determina la inducción del sistema.

Los siguientes ensayos estudian la validez de estas hipótesis, y en base a los resultados se plantean hipótesis alternativas y nuevos diseños experimentales.

Inducción con celulosa:

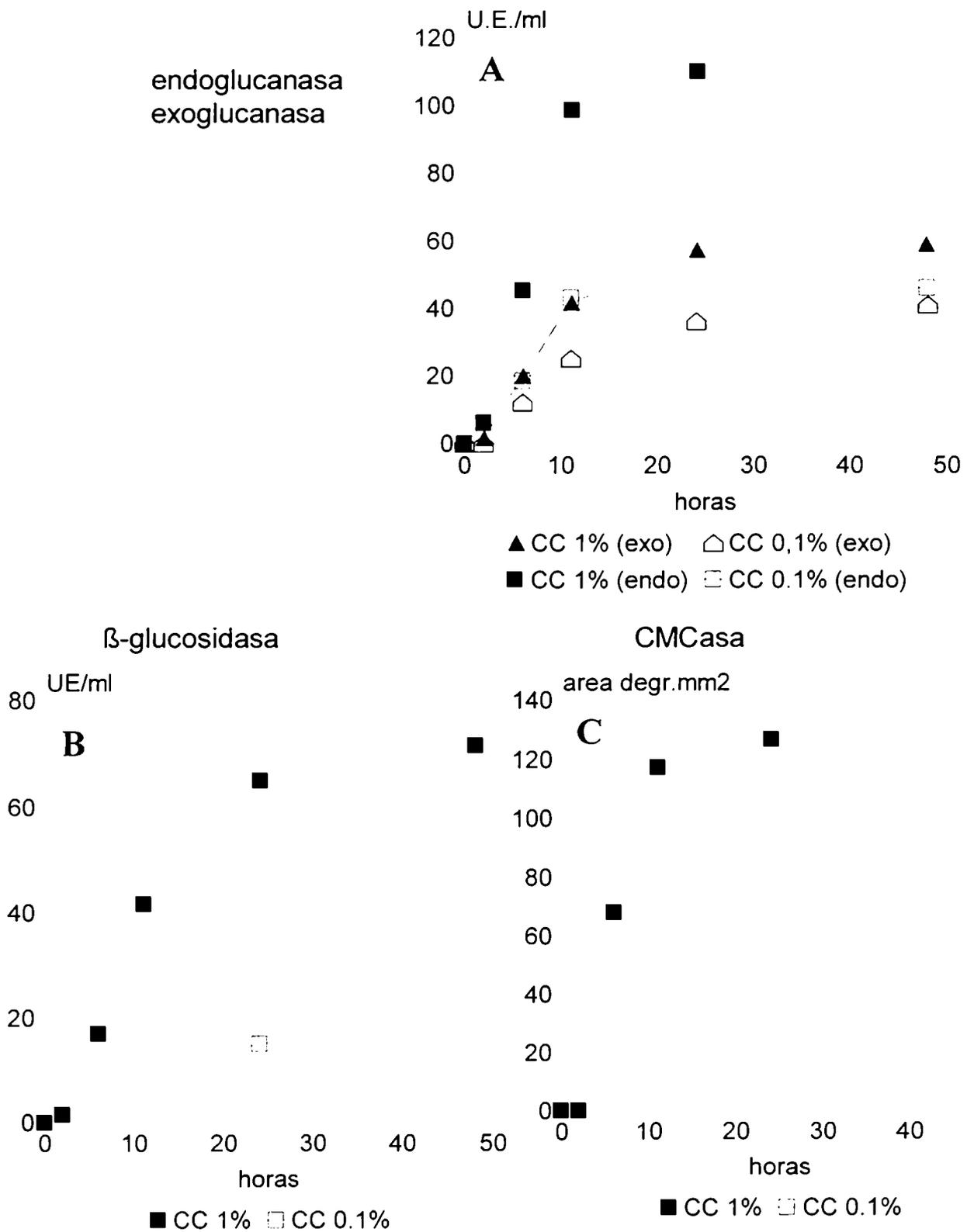
La figura 18 muestra la curva de inducción en celulosa cristalina. La respuesta es simultánea para las todas las enzimas.

Este resultado muestra que, aunque la celulosa en sí (por ser insoluble y tener un alto peso molecular) no sería el inductor directo (Mandels y Reese, 1960), el mecanismo de inducción a partir de este sustrato es altamente eficiente.

Debe distinguirse el concepto de inductor y sustrato "promotor". Inductor es la molécula que inicia la producción de enzimas, el sustrato promotor sería aquel a partir del cual se produciría el inductor, por ejemplo la celulosa o la CMC.

figura 18

inducción con celulosa cristalina



Esta distinción ha sido propuesta también por Kubicek y colaboradores (1993a). Si bien en el texto, por una cuestión de claridad, no se hablará de promotor, se explicita aquí que en el caso de la celulosa (cristalina o soluble) se dice inductor sobreentendiendo que no se trata de moléculas que ingresen a la célula.

Los controles (sin ningún compuesto carbonado) dieron negativo para todas las actividades, todas las veces que fueron realizados. Esto indica que la presencia de celulosa es necesaria para la producción de celulasas: hay un mecanismo de adaptación al sustrato. Hulme y Stranks (1971) propusieron que la síntesis de celulasas se desencadena en condiciones de reducida tasa de crecimiento, estos ensayos muestran que es una hipótesis inválida.

Que el nivel de actividad dependa de la "concentración" del sustrato (siendo un sustrato insoluble podría esperarse que la cantidad de celulosa no sea determinante), en parte se explica porque los ensayos se realizan en agitación: esto podría reflejar la necesidad de un contacto entre la hifa y el polímero a degradar.

Finalmente hay que destacar que en 24 horas de inducción se alcanzaron niveles enzimáticos similares a los de máximo día en cultivo en celulosa cristalina.

Inducción con CMC:

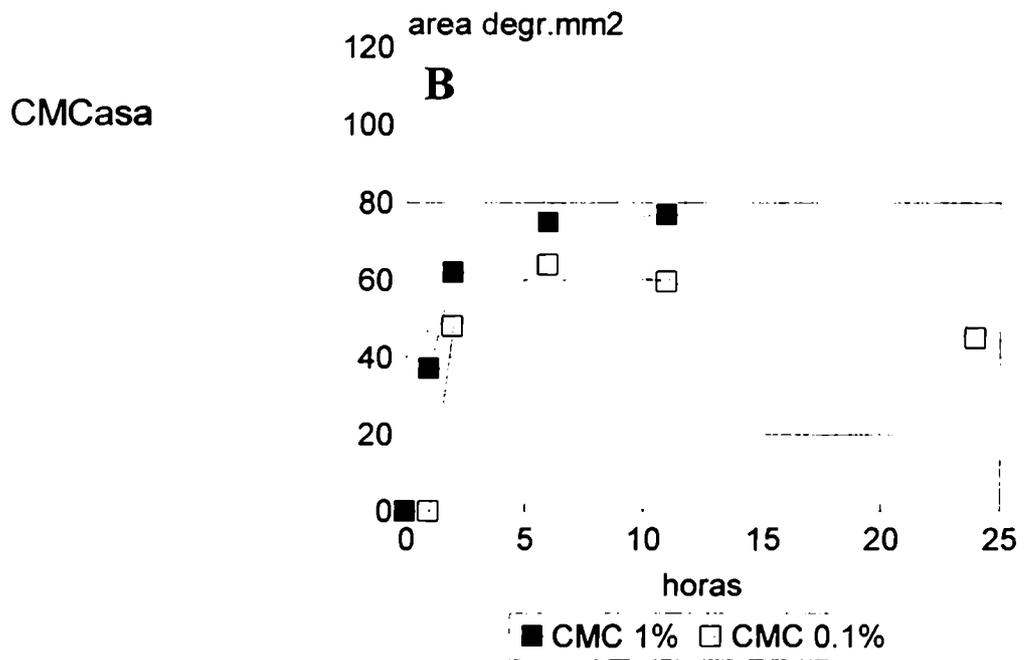
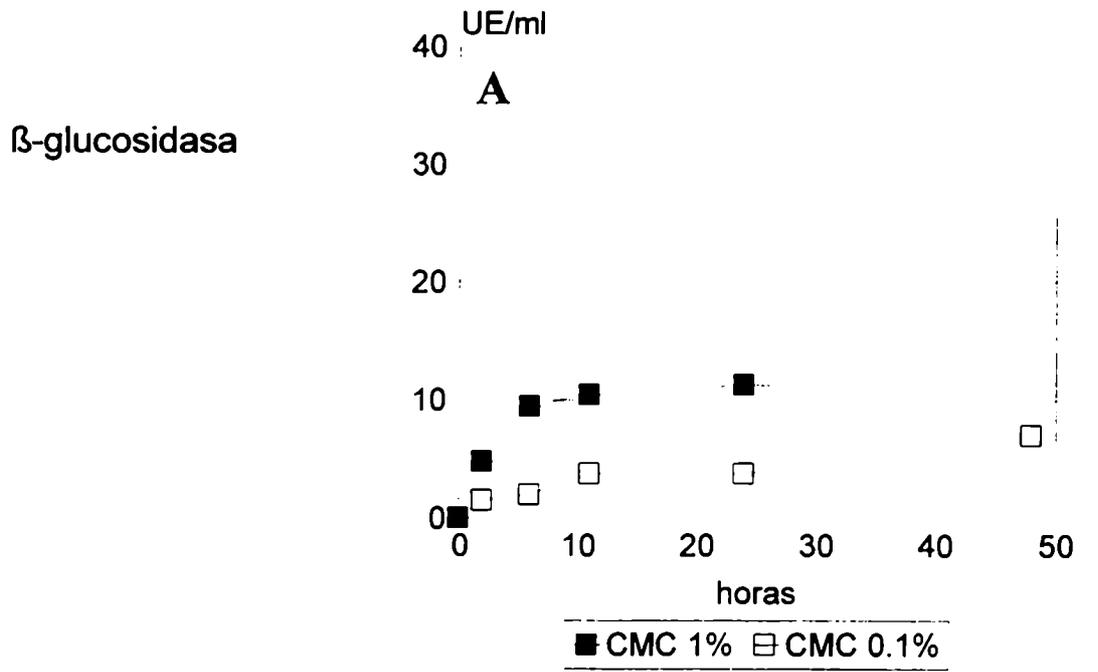
La figura 19 muestra la inducción con CMC, para las dos actividades que pudieron medirse, β -glucosidasa y CMCasa (los sobrenadantes centrifugados tenían gran cantidad de CMC en solución, por lo tanto las reacciones para endo y exoglucanasa arrojaron valores muy dispares).

La potencia de la inducción es menor que en celulosa, pero es mucho más rápida, observándose actividad desde los 30 minutos. El máximo de actividad soluble se alcanza entre las 6 y las 10 horas según la concentración de inductor.

La actividad enzimática cae a las 24 horas, y dada su estabilidad a la temperatura del ensayo (23°C) y dado que la biomasa también decae, es probable que durante la autólisis haya liberación de proteasas al sobrenadante. La CMC altera la viscosidad y el potencial agua del medio (Morrin y Ward, 1990), y esta podría ser la causa de la autólisis.

El efecto inicial favorable podría ser causado por la naturaleza soluble de este derivado celulósico, que interactúa con las hifas de modo diferente que la celulosa (Sternberg y Mandels, 1979). Sin embargo este efecto inicial fue observado solamente en CMC, los demás inductores solubles (ver más adelante) presentaron una fase lag similar a la celulosa cristalina.

inducccion con CMC



Los resultados de hecho se asemejan a los obtenidos en Tween, por lo tanto se planteó estudiar el efecto de la viscosidad del medio en la inducción (ver más adelante). El hecho de que la CMC no sea un sustrato adecuado para el crecimiento de este hongo, refuerza la idea de que altera la estructura celular.

Esta celulosa sustituida tampoco es buen inductor del sistema celulolítico en *Aspergillus fumigatus* (Stewart y Parry, 1981), o *Trichoderma longibranchiatum* (Sandhu y Kalra, 1985), en tanto que estimula la producción de celulasas en *Trametes trogii* (Levin y Forchassin, 1995), *Aspergillus japonicus* (Sanyal et al., 1988) o *Verticillium tricorpus* (Bahkali, 1995).

Inducción con celobiosa:

La figura 20 muestra la actividad β -glucosidasa y CMCasa para la inducción con celobiosa.

A las 7 horas se alcanza el pico para la CMCasa, que es bajo con respecto al obtenido en celulosa. Por otra parte, los niveles de β -glucosidasa son casi cero durante todo el tiempo ensayado. El posible "inductor natural" no actúa como tal en este caso.

Es claro que la celobiosa actúa en forma diferencial, induciendo algo de actividad CMCasa, pero casi nada de β -glucosidasa. Algunos trabajos citan también este efecto (Sternberg y Mandels, 1982).

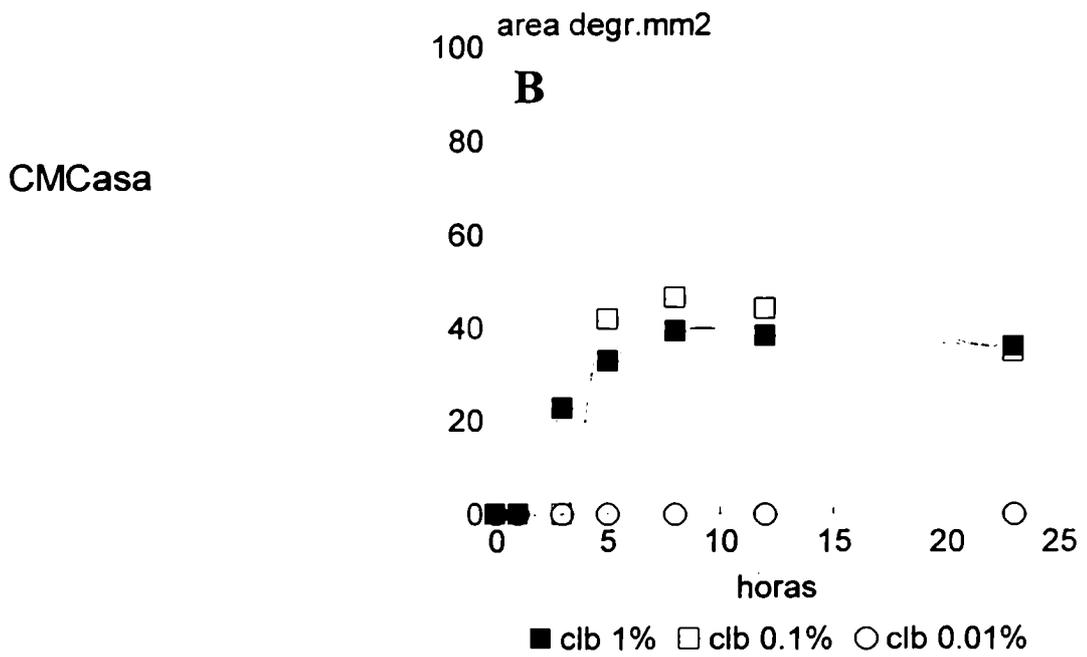
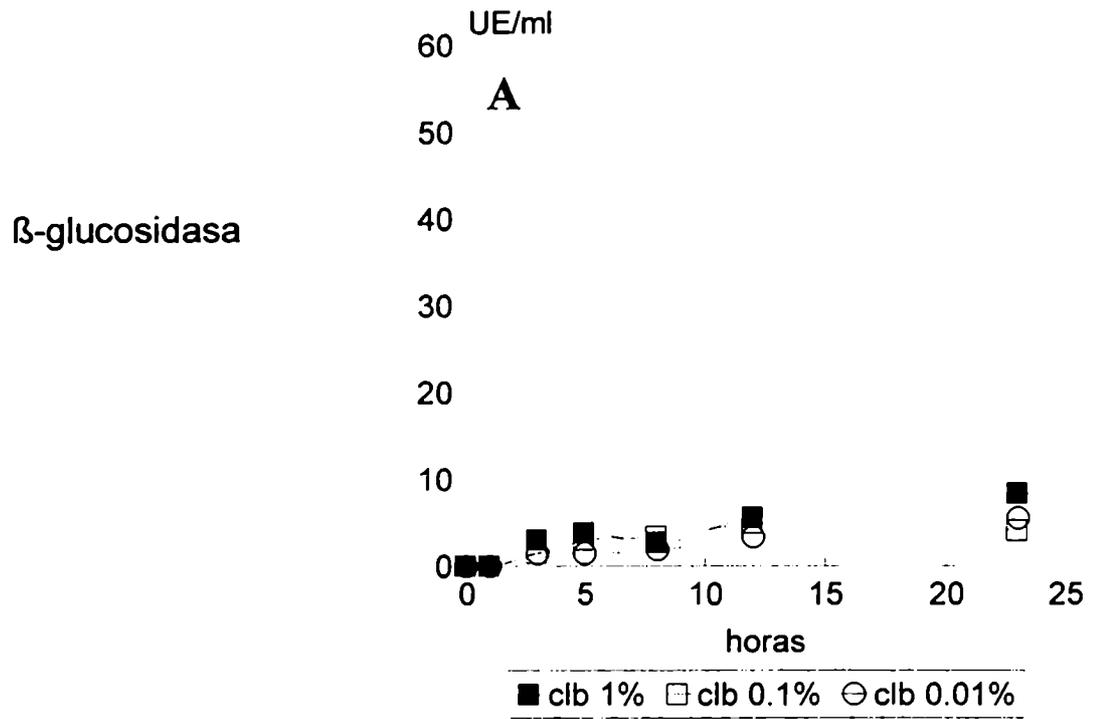
Dado que hay antecedentes de que este disacárido actuaría como inductor cuando está presente en baja concentración (Kubicek et al., 1993b), se probó su efecto usándolo al 0.1 y 0.01%, y al 1% como control.

Los resultados se muestran en la fig 20 (A y B). En principio ninguna concentración fue efectiva en la estimulación de la β -glucosidasa. Para la actividad CMCasa, con celobiosa 0.1 % se obtienen los mismos niveles (regulares) que con celobiosa 1%, y en 0.01% no se observa inducción alguna.

A diferencia de lo que ocurre en *S. saccharoboloides*, la celobiosa es un buen inductor del sistema celulolítico en *Sporotrichum termophile* (Canevascini et al., 1983), *Agaricus bisporus* (Manning y Wood, 1983) o *Neurospora sitophila* (Oguntimein y Moo-Young, 1991).

figura 20

inducción con celobiossa



Inducción con lactosa:

La lactosa, como se esperaba, resultó un buen inductor. Los máximos para las actividades β -glucosidasa y CMCasa (menores que en celulosa) se obtienen a las 30 horas para 1% de lactosa y a las 10 horas para 0.1% (fig 21). La respuesta de ambas actividades es simultánea, por lo que las curvas se asemejan más a las de celulosa *cristalina* que a las de celulosa soluble (CMC). El hecho de que un compuesto que no existe en el ambiente natural promueva la actividad enzimática indicaría un probable efecto "mimético". La lactosa es un β ,1-4 disacárido, y tendría semejanza con algún probable producto de hidrólisis, como se había pensado previamente.

La lactosa actúa induciendo las enzimas en *T. reesei* (Mandels y Reese, 1957), *T. longibranchiatum* (Sandhu y Kalra, 1985; Royer y Nakas, 1990), *Sclerotinia sclerotiorum* (Riou et al., 1991) o *Neurospora sitophila* (Oguntimein y Moo-Young, 1991), entre otros. Por el contrario, no es inductor en *Aspergillus fumigatus* (Stewart y Parry, 1981) o *Agaricus bisporus* (Manning y Wood, 1983).

Inducción con sorbosa:

Existen reportes de que este monosacárido actúa como inductor del sistema de *T. reesei* (Bisaria et al., 1986). También se ha informado que altera la forma de crecimiento de algunos organismos, y a ello se atribuye su efecto inductivo (Nanda et al., 1981). Se probó el efecto de la sorbosa (a diferentes concentraciones) sobre el micelio de *S. saccoboloides*. En ningún caso se detectó estimulación de la actividad enzimática.

Otros compuestos:

Algunos de los otros carbohidratos probados (todos al 1%) dieron un nivel bajo de inducción: xilano, galactosa, xilosa y glicerol.

No dieron prácticamente actividad el almidón y la maltosa, ni tampoco la glucosa (que también se probó al 0.1%).

La figura 22 compara la actividad CMCasa y β -glucosidasa máxima para cada inductor (fig 22^a y B). Sólo la lactosa y la celulosa cristalina (1%) dan altos niveles de inducción para ambas actividades.

figura 21

inducción con lactosa

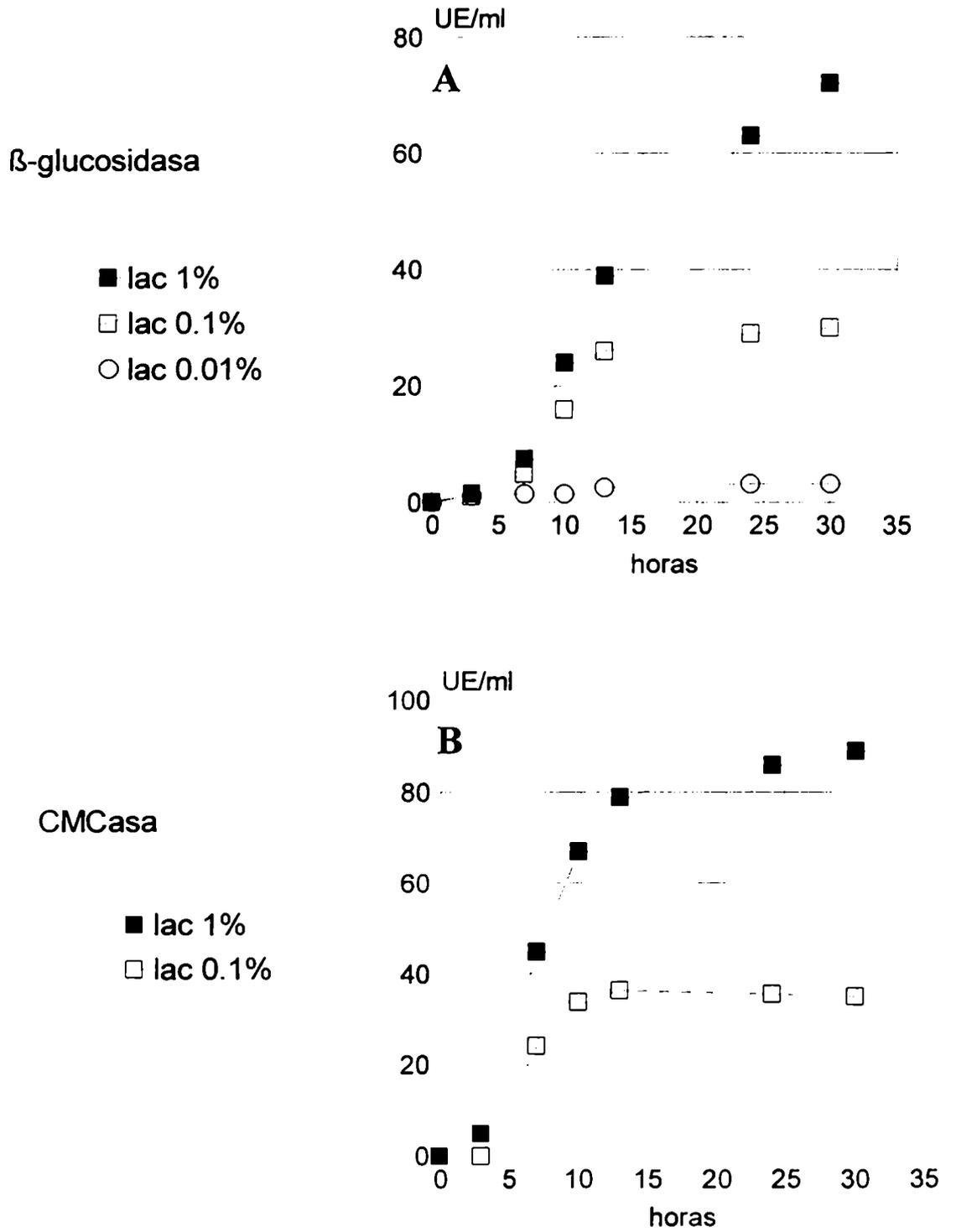
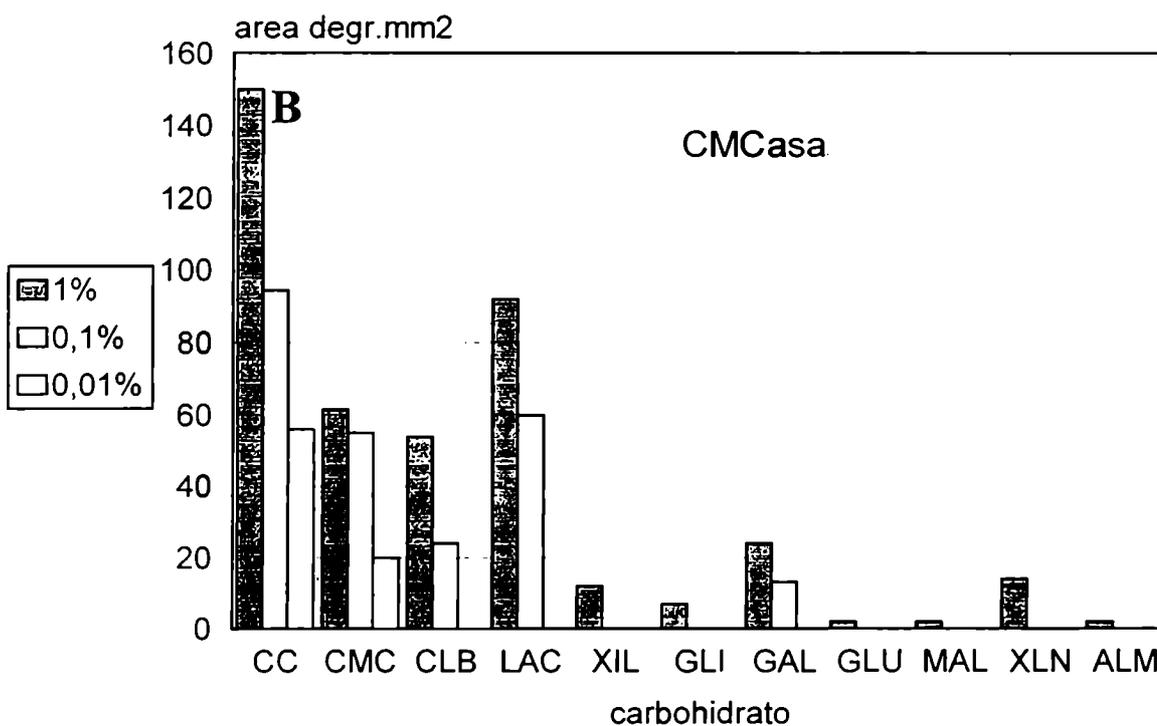
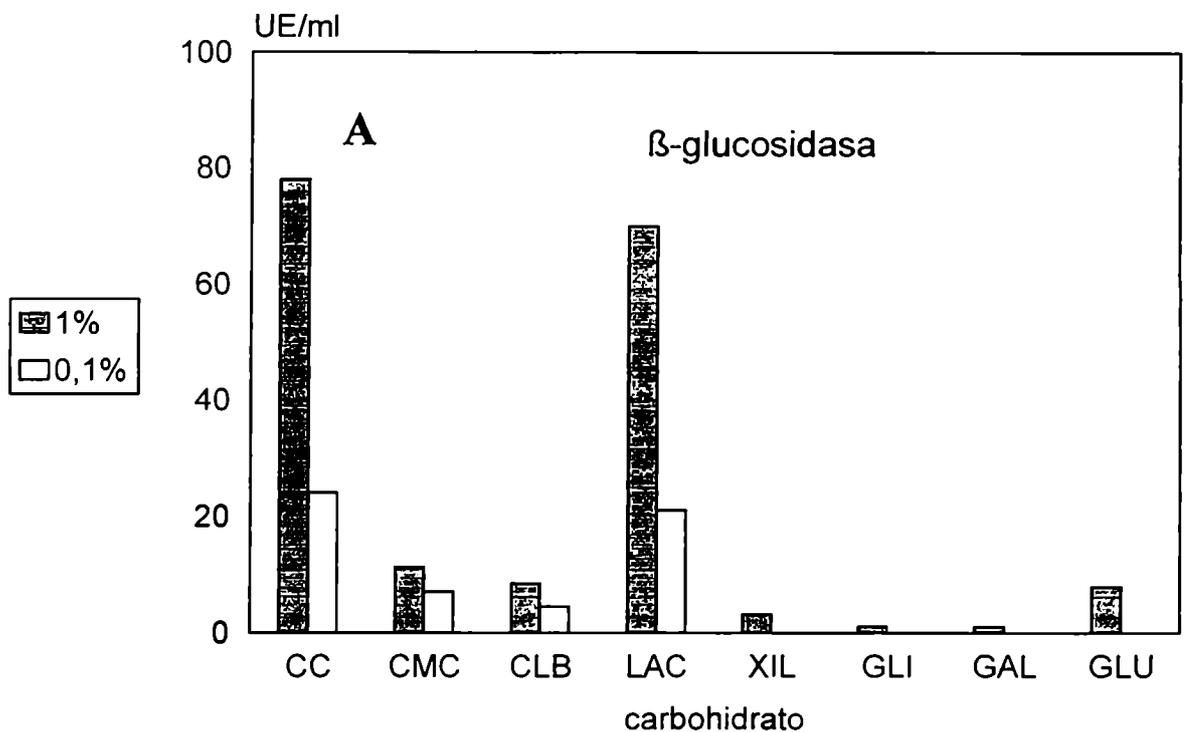


figura 22

maxima actividad para cada inductor



CC: celulosa cristalina , CMC: carboximetilcelulosa
 CLB: celobiosa, LAC: lactosa
 XIL: xilosa, GLI: glicerol, GAL: galactosa
 GLU: glucosa, MAL: maltosa
 XLN: xilano, ALM: almidón.

Comentarios:

Los estudios de inducción revisados para comparar y discutir estos resultados (en pocos se realizan cultivos de reemplazo) presentan datos heterogéneos con respecto a la acción de los carbohidratos. En general las formas nativas de celulosa son inductoras, para la CMC, celobiosa y lactosa la potencia de inducción varía mucho entre distintas especies (y según las condiciones de cultivo), la glucosa y otros compuestos de rápida asimilación, en general no son inductoras (Mandels y Reese, 1957; Sternberg y Mandels, 1979; Stewart y Parry, 1981; Rho et al., 1982; Canevascini et al, 1979; Canevascini et al., 1983; Cotoras y Agosin, 1992; Messner y Kubicek, 1991).

Como ya se aclaró, es difícil estimar comparativamente la potencia inductora de varios compuestos carbonados haciendo curvas de crecimiento. Por lo tanto la heterogeneidad de resultados en la bibliografía no puede asignarse con seguridad a reales diferencias en la respuesta de los sistemas celulolíticos de las distintas especies.

Finalmente cabe aclarar que el diseño experimental utilizado pone en duda la validez de la hipótesis de correlación entre baja tasa de crecimiento e inducción (ver que lactosa y maltosa, ambas lentamente aprovechadas, generan niveles enzimáticos totalmente diferentes). Los estudios de represión terminan por descartar esta hipótesis, que para *T. reesei* actualmente no se considera válida (Messner y Kubicek, 1991).

5) El control de la producción de celulasas por fuente de carbono: estudio de la represión.

De los ensayos anteriores se concluye cuáles compuestos son inductores o promotores de las celulasas. El resto no lo son, pero debe hacerse una distinción entre compuestos no inductores y compuestos verdaderamente represores.

Se plantea aquí que un compuesto represor, agregado en cualquier punto ascendente de una curva de inducción, debería detener la producción, en tanto que un no inductor no tendría ninguna influencia.

Efecto de la glucosa:

Los primeros ensayos se hicieron agregando glucosa 0,1% a la inducción en celulosa cristalina en marcha (a 6 horas), en esos experimentos (no se muestran los resultados) no se registró ningún efecto represor.

Esto fue inesperado, ya que se conoce (para otros organismos) que el sistema está bajo fuerte control por catabolito y que esa cantidad de glucosa es suficiente para arrestar la producción de enzimas (Nisizawa et al., 1972).

Por ello se investigó si mayores cantidades de glucosa tenían algún efecto (fig 23A). El resultado, otra vez, fue sorprendente: una vez disparada la inducción no se observa detenimiento alguno. Solamente, usando 3% de glucosa (una cantidad altísima), se ve una caída de la CMCasa. La actividad β -glucosidasa no deja de aumentar en ninguna de las condiciones ensayadas.

Una explicación posible para este inesperado efecto es que, si se da la producción por síntesis *de novo*, la vida media del mRNA sea muy larga. Una vez sintetizado se seguiría traduciendo, aunque se haya alterado la condición de cultivo.

Esta idea es congruente con lo observado en *T. reesei* en condiciones similares (Messner y Kubicek, 1991).

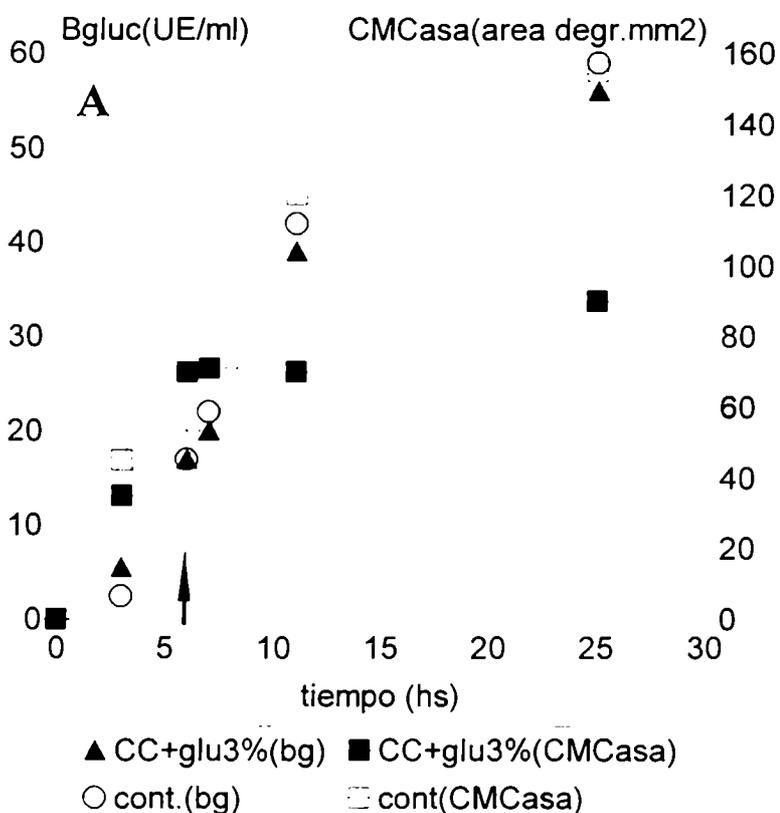
Con el fin de estudiar si la represión es más intensa si aún no está en marcha la inducción, se adicionó la glucosa desde el inicio del ensayo (fig 23B). En estas condiciones puede verse el efecto represor, sobre ambas actividades. El mismo también se da usando glucosa 1%.

Otra explicación para esta "determinación temporal" de la represión sería que el represor e inductor "compiten" por el "sitio" regulatorio, el resultado final dependerá de cuál estaba primero.

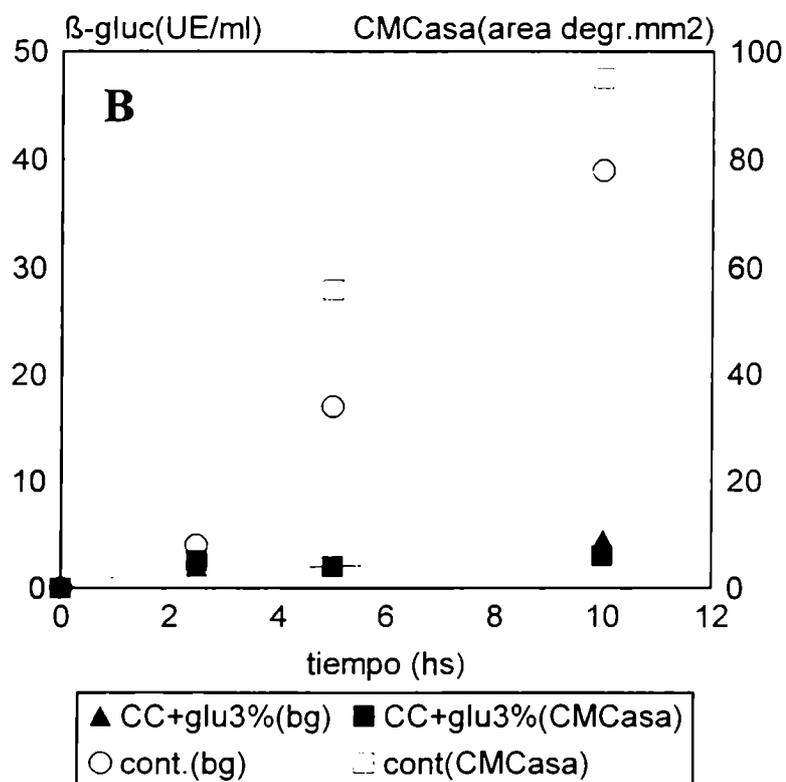
figura 23

efecto de la glucosa

a cultivos en celulosa cristalina 1% (CC) se le adiciona al tiempo indicado (6h) un segundo compuesto (se indica la concentración final del mismo). el control es celulosa cristalina 1%.



igual que arriba, pero la glucosa es adicionada desde el inicio del ensayo



Efecto de la maltosa:

Se probó si este disacárido no inductor tiene algún efecto represor. Los cultivos en que se agregó este compuesto (al 3%) no presentan diferencias importantes con respecto al control, para ninguna de las dos actividades (fig 24A). Este α -disacárido es neutro, y en su sola presencia no hay enzimas por falta de un adecuado inductor, lo mismo que ocurre en *Agaricus bisporus* (Chow et al., 1994). Adicionalmente se demuestra que el crecimiento lento (que ocurre en maltosa) por sí mismo no es causa ni de represión ni de inducción

Efecto de la celobiosa:

Este disacárido, producto natural de la degradación de celulosa, tiene un leve efecto inductor sobre la CMCasa, en tanto que no induce β -glucosidasa.

La figura 24B muestra los resultados del ensayo para evaluar si presenta efecto represor. La actividad β -glucosidasa se ve afectada por el agregado de celobiosa (ver la meseta). El efecto sobre la CMCasa es mucho menos drástico, coincidiendo con los resultados de inducción. Aquí también fue necesario agregar celobiosa al 3% para observar detenimiento. Usando el compuesto al 1% no se vio alteración, posiblemente por las mismas causas que se comentan para la glucosa.

Este disacárido, que no induce en absoluto actividad β -glucosidasa, es represor de la misma. Por otra parte se entiende que la actividad CMCasa no se reprime: evidentemente la hidrólisis del dímero no genera suficiente nivel de represor como para anular la inducción en marcha (se necesitan altas cantidades de glucosa para detener la producción de CMCasa). Este mismo efecto no represor se observó para *Sporotrichum termophile* (Canevascini et al., 1979).

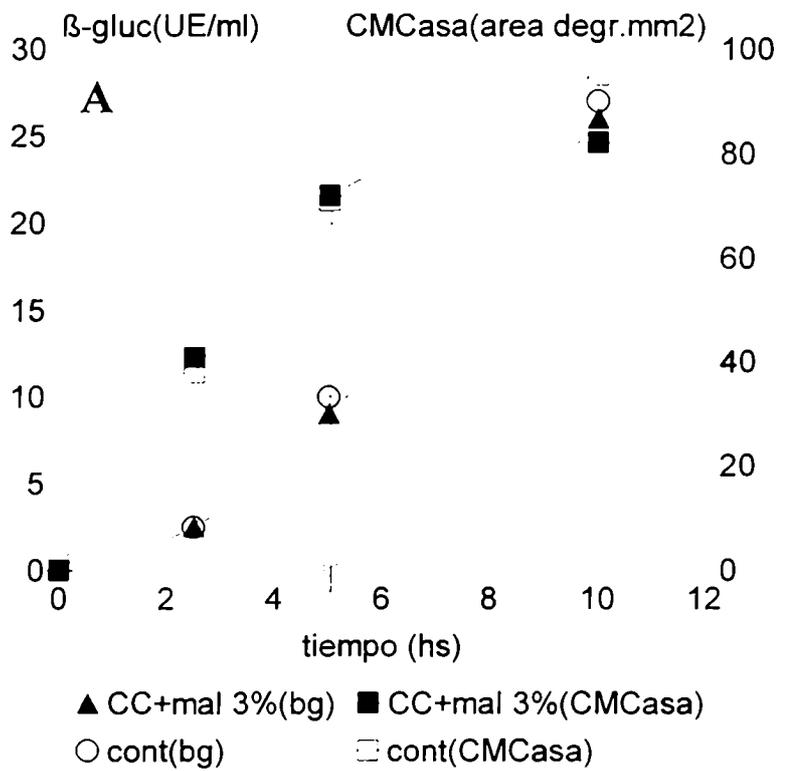
Finalmente, y sabiendo que la glucosa por sí misma no reprime la actividad β -glucosidasa, debe proponerse que la biosíntesis de esta actividad responde de modo diferente al nivel de celobiosa en el medio: es razonable pensar que, habiendo enzima constitutiva en la pared, el aumento del dímero anule la producción de una enzima que se hace innecesaria ante tal cantidad de nutriente disponible.

Al igual que con la glucosa, se estudió el efecto de este disacárido en combinación con celulosa cristalina, pero desde el inicio del ensayo (fig 25C y D). La mezcla con celobiosa 1% reprime completamente la producción de ambas enzimas (lo mismo que ocurre con glucosa 1%).

figura 24

efecto de la maltosa

a cultivos en celulosa cristalina 1% (CC) se le adiciona al tiempo indicado (5h) un segundo compuesto (se indica la concentración final del mismo). el control es celulosa cristalina 1%



efecto de la celobiosa

a cultivos en celulosa cristalina 1% (CC) se le adiciona al tiempo indicado (5h) un segundo compuesto (se indica la concentración final del mismo). el control es celulosa cristalina 1%

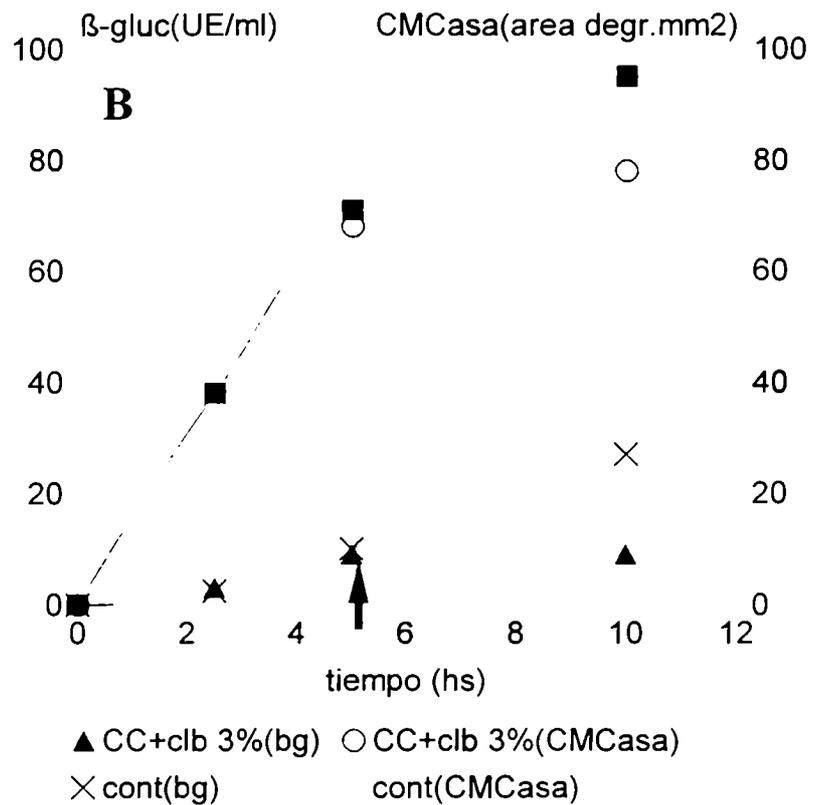
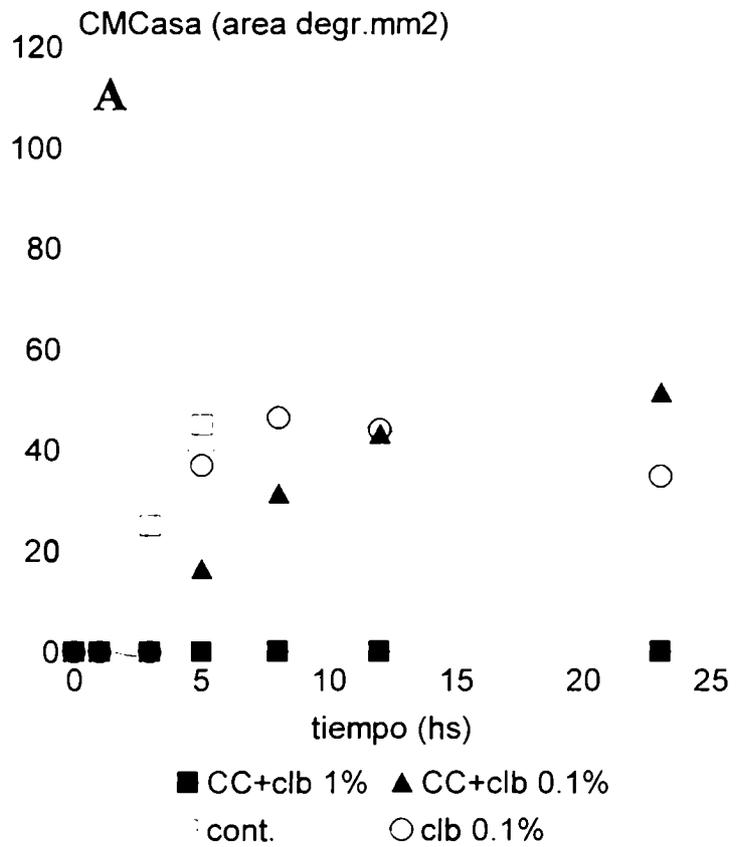


figura 25

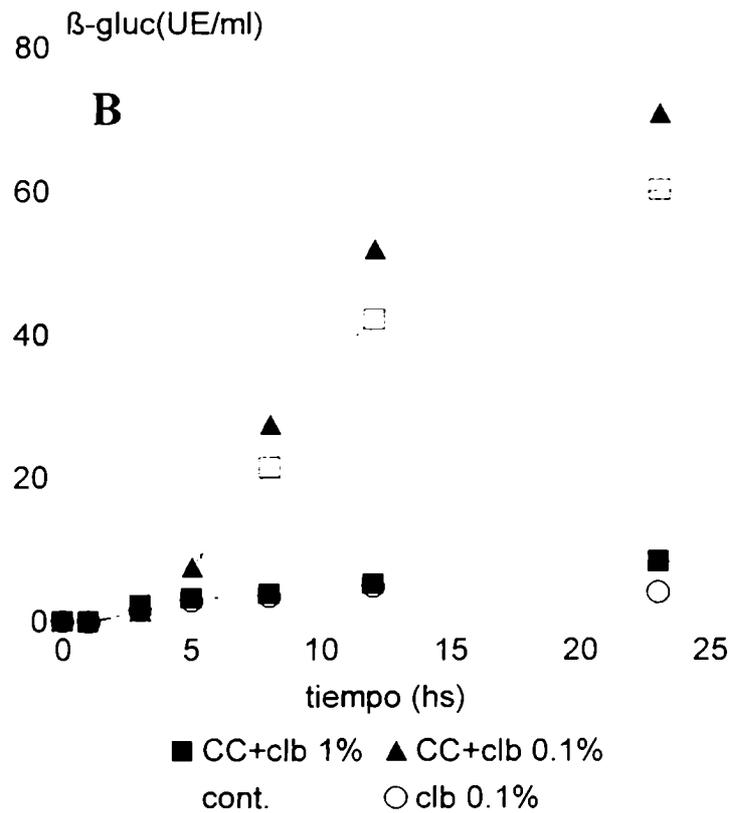
efecto de la celobiososa

a cultivos en celulosa cristalina 1% (CC) se le adiciona al tiempo inicial un segundo compuesto (se indica la concentración final del mismo). el control es celulosa cristalina 1%.

CMCasa



β -glucosidasa



La represión fuerte (cuando se adiciona al inicio) se explicaría por la formación de glucosa vía actividad de pared: sería el efecto de "competencia", llega primero la señal de represión que la señal de presencia de celulosa.

Hasta aquí todo es coherente: la única observación es que, al 0.1%, mejora la producción de β -glucosidasa soluble con respecto al control de celulosa cristalina sola. Este es un resultado interesante, dado que la celobiosa sola, no induce en absoluto esta actividad. ¿Existe alguna explicación para esto?

En distintos trabajos se menciona el efecto de la celobiosa sobre la β -glucosidasa y/o la endoglucanasa: según la especie y el método experimental su efecto es inductor (en general regular) o represor, o bien diferencial (Shewale y Sadana 1978; Freer y Greene, 1990; Pushalkar et al., 1995; Cotoras y Agosin, 1992; Strauss y Kubicek, 1990; Sternberg y Mandels, 1982).

Es difícil, de todos modos hacer comentarios, en ningún trabajo se prueba el efecto de ambos compuestos utilizados simultáneamente en inducción.

En *T. reesei* (Sternberg y Mandels, 1979) o en *Schizophyllum commune* (Willick et al., 1984) la endoglucanasa y la β -glucosidasa responden diferente a la celobiosa porque estarían bajo control regulatorio diferente.

En *S. Saccoboloides* el efecto diferencial de la celobiosa muestra que esto podría ser válido para la CMCasa (endoglucanasa) y la β -glucosidasa. La síntesis de ambas se dispararía coordinadamente en presencia del sustrato celulosa. El efecto diferencial de la glucosa sostiene también la hipótesis de que existen varios mecanismos de control.

6) El control de la producción de celulasas por fuente de carbono: ¿existe efecto aditivo entre inductores?

De los anteriores experimentos se ve que existen moléculas inductoras, o promotoras, de diferente naturaleza físico-química. Esto llevó a pensar que combinaciones de inductores podrían mejorar el rendimiento.

Es cierto, también, que esto no va a darse si la máxima respuesta hasta ahora observada (en celulosa 1%) se debe a saturación del sistema de biosíntesis. Sin embargo aún podría esperarse algún tipo de alteración en la cinética (un adelanto en la respuesta, por ejemplo).

Por otra parte, los resultados obtenidos en curvas de crecimiento hicieron interesante estudiar en cultivo de reemplazo combinaciones de inductores.

Celulosa combinada con lactosa .

Dado que la lactosa es un buen inductor soluble se experimentó qué efecto podría tener en combinación con celulosa cristalina. La hipótesis fue que, si mimetiza al inductor real, podría adelantarse la curva de inducción, o bien dar mayores rendimientos. De todos modos esta propuesta es débil, ya que este disacárido mostró anteriormente tener un extraño efecto sobre el crecimiento. Aún así se decidió probar, ya que las condiciones de los cultivos de reemplazo difieren mucho de las condiciones de crecimiento.

Los resultados del primer ensayo se muestran en la figura 26 y 27. No hubo efecto aditivo alguno entre los dos inductores, lo cual era un resultado posible. Pero no se esperaba que ni siquiera se dieran los valores obtenidos en lactosa sola.

La lactosa, en combinación, tiene un efecto negativo sobre ambas actividades (fig 26A), actuando de igual manera que un represor. Es importante destacar que la concentración usada fue 1%.

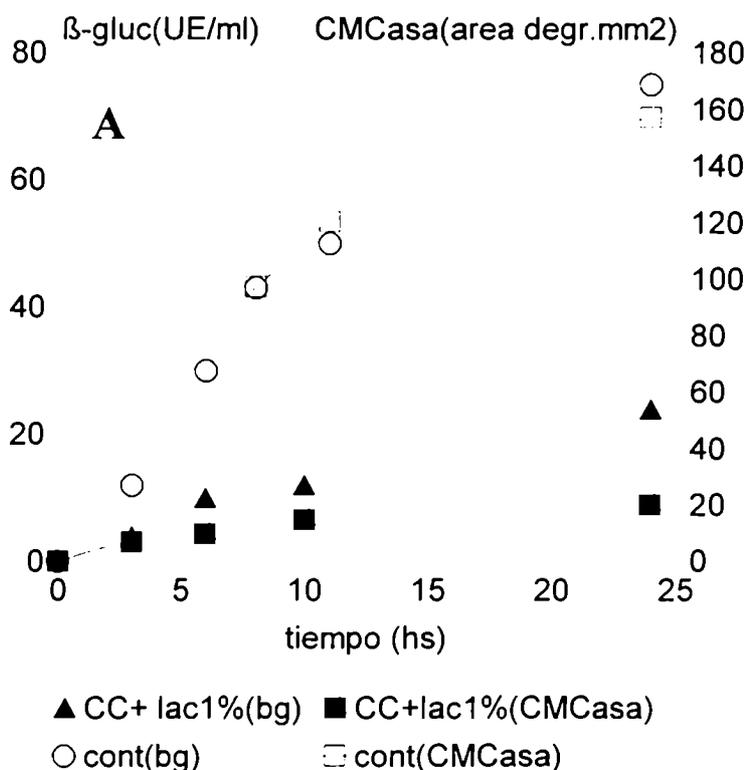
Dado que (en la curva de crecimiento) la mezcla de celulosa más lactosa 0.1% resultó en un atraso significativo del crecimiento, este ensayo se realizó también adicionando lactosa 0,1%. Los resultados (fig 27A y B) indican que aún muy bajas cantidades de lactosa interfieren con el proceso inductivo.

Dado que la glucosa (al 1%) no reprime una vez disparada la inducción, se estudió cómo afecta la lactosa (1%) al proceso en marcha (fig 26B). Otra vez el resultado fue inesperado: a esta concentración la lactosa presenta un claro efecto represor (ver la meseta), para ambas actividades.

figura 26

celulosa combinada con lactosa

a cultivos en celulosa cristalina 1% (CC) se le adiciona al tiempo inicial un segundo compuesto (se indica la concentracion final del mismo). el control es celulosa cristalina 1%.



a cultivos en celulosa cristalina 1% (CC) se le adiciona al tiempo indicado (6h) un segundo compuesto (se indica la concentracion final del mismo). el control es celulosa cristalina 1%.

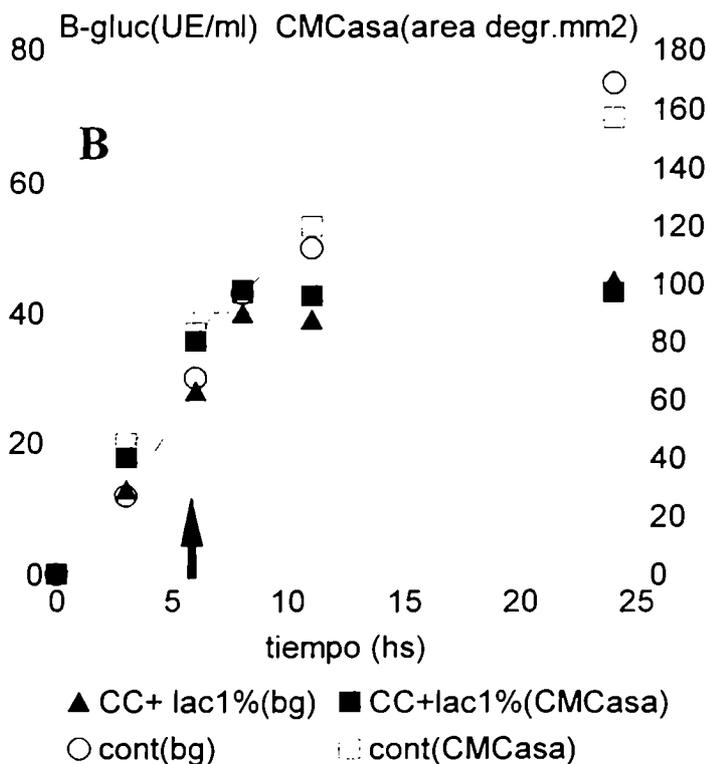
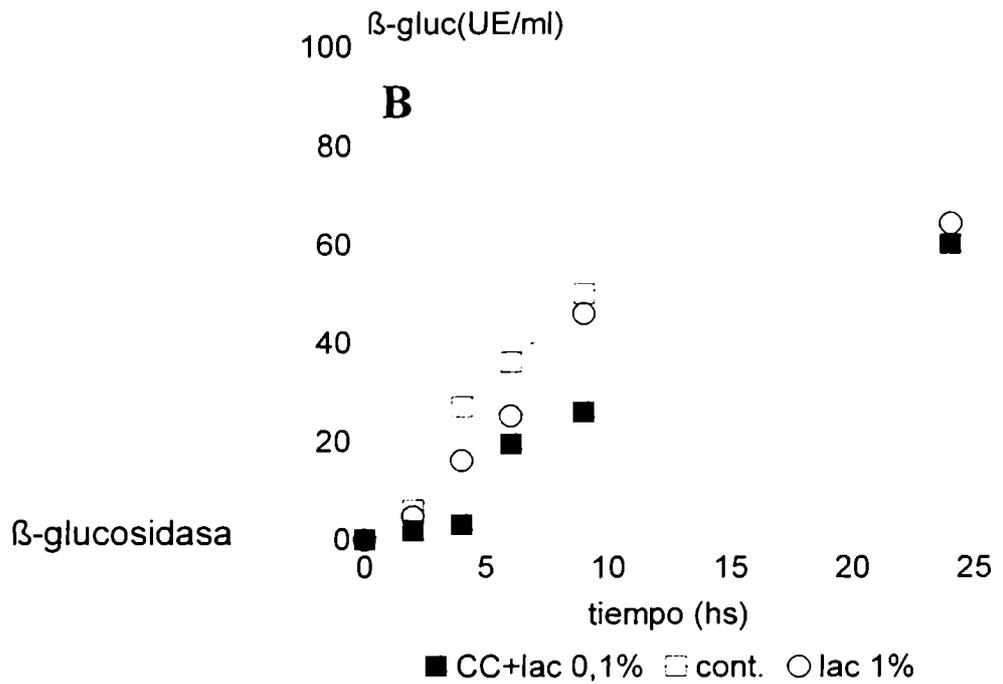
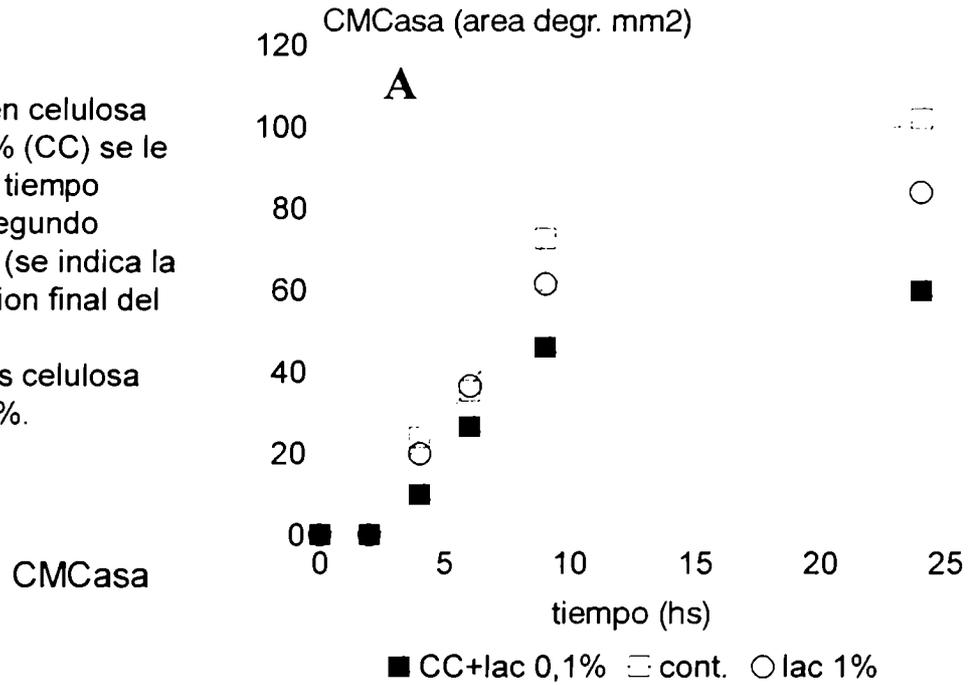


figura 27

celulosa combinada con lactosa (en baja concentración)

a cultivos en celulosa cristalina 1% (CC) se le adiciona al tiempo inicial un segundo compuesto (se indica la concentración final del mismo). el control es celulosa cristalina 1%.



Como el efecto represor se registra solamente cuando se usa lactosa en combinación con celulosa cristalina se formuló la hipótesis que se detalla a continuación.

Cuando el micelio entra en contacto con celulosa comienza la degradación del polímero, y la consiguiente aparición del producto final, que actuaría directa o indirectamente como inductor del sistema. La lactosa sería inductora porque imita la acción de este producto final de degradación. Ahora, la mezcla de celulosa y cierta cantidad exógena de "producto final" (lactosa), provocaría una disminución en la liberación de enzimas, por exceso de azúcar libre "fácilmente asimilable".

Cabe aclarar que esta propuesta no es completamente coherente con algunas ideas planteadas en la sección anterior, pero de todos modos se investigó, ya que lo mismo se ha propuesto para explicar un efecto similar por celobiosa en *T. reesei* (Fristcher et al., 1990).

De ser cierta esta hipótesis, altas concentraciones de lactosa (sola) deberían desmejorar la inducción. La figura 28 muestra el efecto de varias concentraciones de lactosa, y de la mezcla con celulosa cristalina. Para descartar el efecto del potencial osmótico, el gradiente de lactosa se construyó compensando con maltosa (neutra a los efectos de la inducción), de modo que los tres tratamientos tienen distintas cantidades de lactosa pero el mismo potencial osmótico. Además se comparó con un control de lactosa 1%.

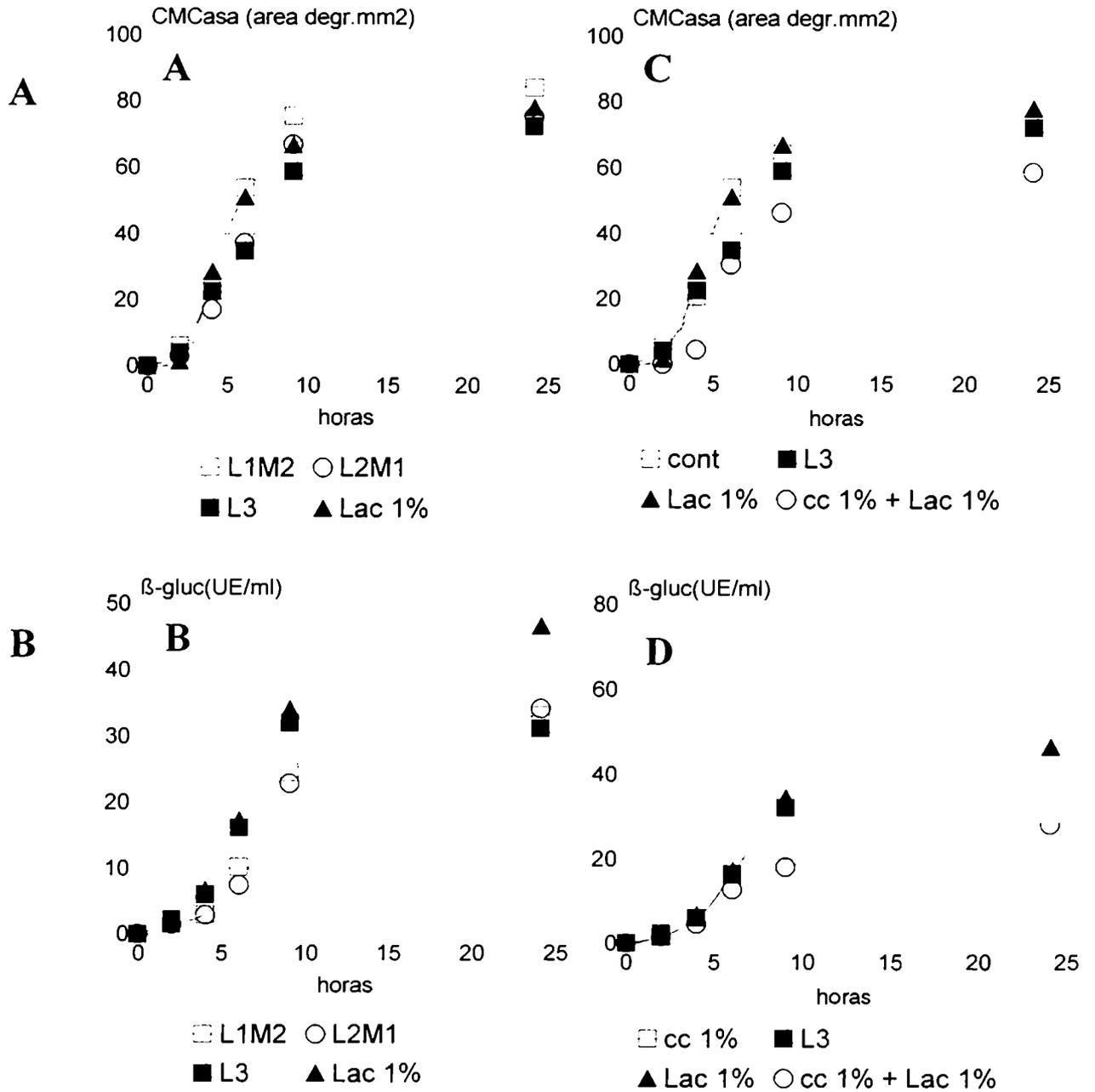
Los resultados muestran no hay una disminución significativa de la respuesta usando lactosa desde 1 hasta 3%, y que los tratamientos no difieran del control de lactosa 1% en forma significativa.

Estos resultados, en principio, muestran que la hipótesis anteriormente formulada es inválida. Además muestran que en celulosa y lactosa el efecto represor se da sobre la producción de enzimas, no hay un efecto inhibitorio de la actividad enzimática (la lactosa no afecta en sí a la actividad, como tampoco lo hacen la glucosa o celobiosa).

Con respecto a este extraño efecto de la lactosa se encontraron referencias de que altas concentraciones hacen decaer la liberación de enzimas en *T. reesei* (Chaudhuri y Sahai, 1993a y b) y en *Agaricus bisporus* (Chow et al., 1994; Yague et al., 1994 y 1997).

figura 28

efecto de la lactosa en alta concentración



el rendimiento obtenido en cultivos de celulosa más lactosa 0,1% se compara con los de cultivos en celulosa o lactosa.

lac 1%: lactosa como unico compuesto carbonado

L1M2: lactosa 1% compensada con maltosa (neutra) 2%

L2M1: lactosa 2% compensada con maltosa 1%

L3: maltosa 3%.

Lactosa combinada con CMC:

Dada la desmejora que ejerce la lactosa en tratamientos mixtos, se hizo el cultivo combinando el disacárido con celulosa soluble (CMC). Los resultados se ilustran en la figura 29. Es necesario aclarar que si bien no se muestran en el gráfico, los valores obtenidos con lactosa 1%, estos fueron intermedios entre celulosa cristalina y CMC.

Aquí, nuevamente, se observó un resultado inesperado: la mezcla de estos dos inductores tiene un efecto aditivo, la potencia de inducción para ambas actividades fue mayor que usando lactosa o CMC por separado. Además la curva no tiene fase lag (igual que con CMC sola).

Este efecto podría deberse a que se usó una cantidad (total) de inductor mayor que en el control. Si bien es una explicación razonable, está claro que el organismo no tiene siempre una respuesta proporcional a la cantidad de inductor (recordar los resultados en celulosa más lactosa).

Otro factor a tener en cuenta es el siguiente: La curva de liberación de enzimas en celulosa cristalina tiene fase lag, y no la tiene en CMC. ¿La falta de fase lag en CMC se debe a un adelanto real? ¿O la fase lag en celulosa no es tal sino un artificio debido a adsorción de las enzimas a la celulosa cristalina?. Es necesario observar aquí que el otro inductor soluble (lactosa) da una curva con fase lag, que no se puede explicar por adsorción inicial alguna.

Celulosa combinada con CMC:

Considerando los resultados comentados en el párrafo anterior, se probó qué efecto tienen en combinación ambos tipos de celulosa. El resultado muestra un efecto aditivo típico (fig 30). La combinación da mejor que cualquiera de los dos por separado: la producción se adelanta, pero a diferencia de lo que ocurre en CMC, las celulasas siguen subiendo, dando además más enzima que en celulosa cristalina sola.

La misma combinación, pero usando CMC 1% no dio buenos resultados, el micelio se desorganizó rápidamente.

Para comprobar si el efecto favorable del CMC se debe a su naturaleza celulósica o a que altera la viscosidad del medio y la morfología del micelio, se realizaron ensayos, combinando lactosa o celulosa con cantidades de polietilenglicol equivalentes a 0,1% de CMC. Lamentablemente este compuesto impidió la inducción por completo, y el micelio rápidamente entró en autólisis. La naturaleza de la mejora por adición de CMC 0,1% no pudo ser develada.

figura 29

lactosa combinada con CMC

se adiciona desde el inicio del ensayo lactosa 1 o 0,1% a medio CMC 1%. el control es celulosa cristalina 1%

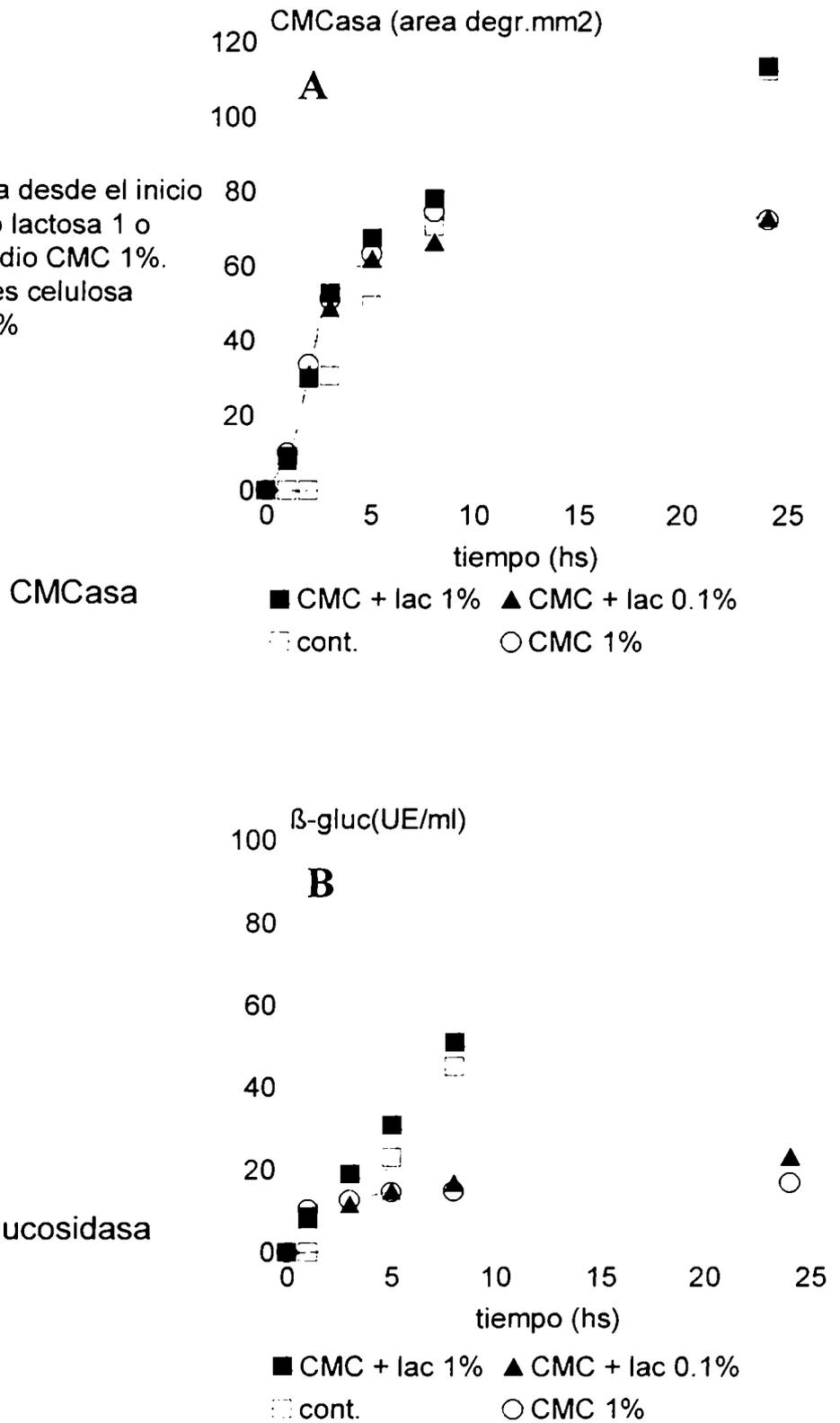
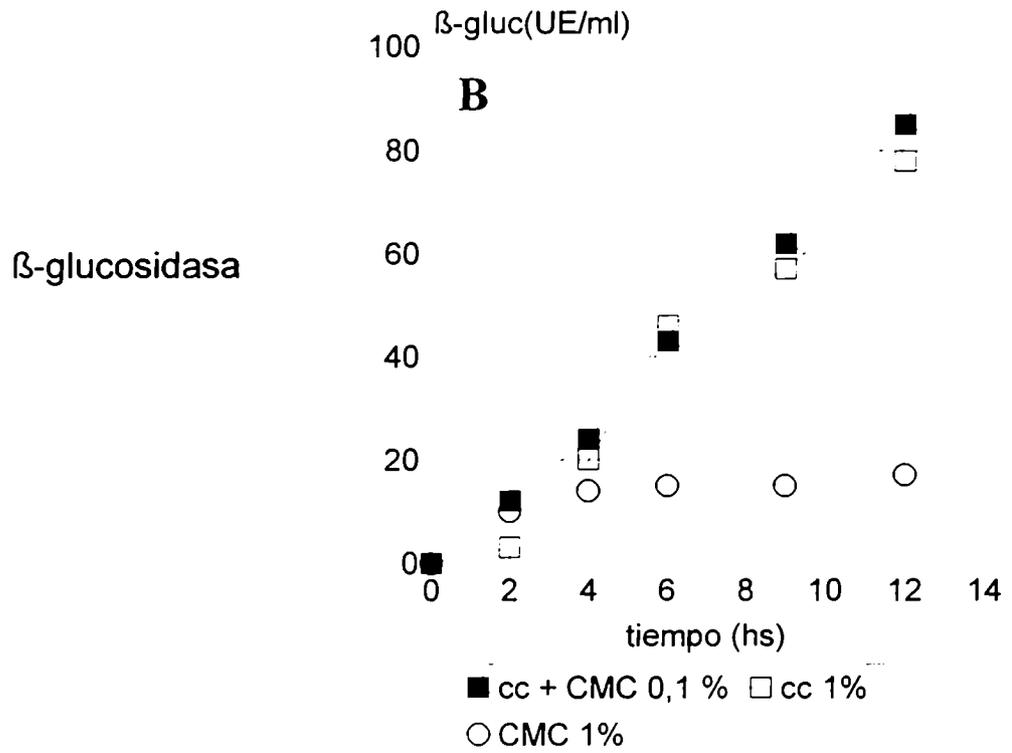
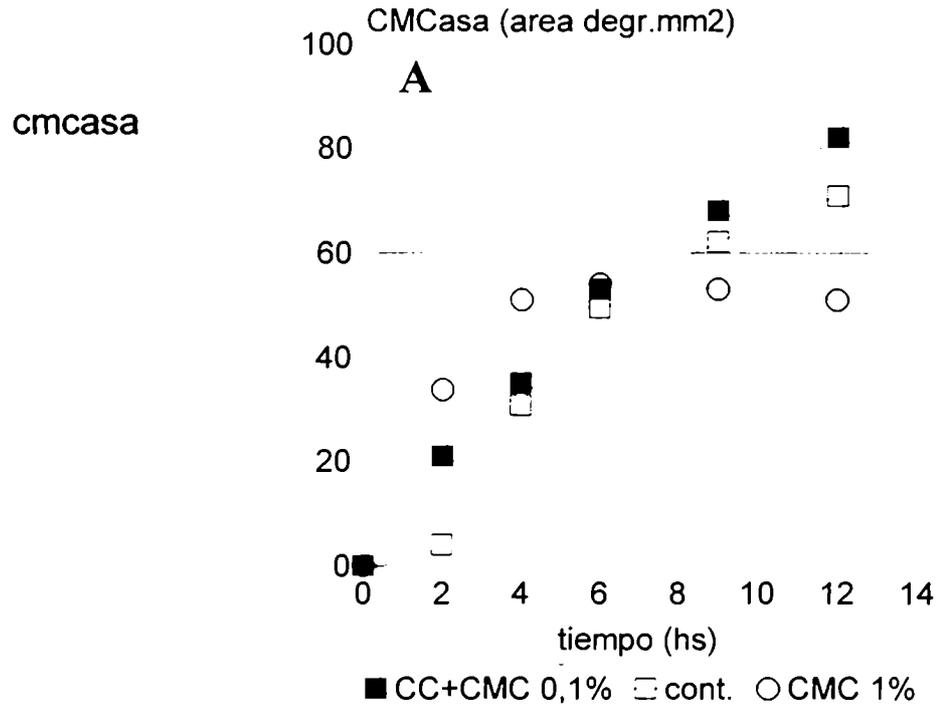


figura 30

celulosa cristalina combinada con CMC



7) Localización de la actividad enzimática:

Los efectos diferenciales de ciertos compuestos en la inducción de la β -glucosidasa llevaron a proponer la siguiente hipótesis: esta enzima aparecería en el sobrenadante no por síntesis *de novo* (como se propone para las endo y exoglucanasa) sino por liberación de una forma preexistente. Esta propuesta es consistente con el hecho de que en parte la β -glucosidasa es constitutiva para muchos hongos, y se encuentra asociada al micelio (Sandhu y Kalra, 1985; Taj Aldeen, 1993; Hoh y Yeoh, 1993).

Ensayos preliminares probaron que cultivos de 6 días en medio con glucosa poseen gran actividad β -glucosidasa intracelular y asociada a la pared, indicando que es constitutiva, y que existe antes de la inducción. Estos resultados explicarían por qué el efecto de algunos tratamientos fue diferencial para esta enzima, por ejemplo el agregado de Tween 80 o la inducción con celobiosa. Un análisis similar de este tipo de resultados se encuentra en Yazdi et al (1990a y b) y en Shewale y Sadana (1978).

Sin embargo esta observación no prueba por completo la hipótesis propuesta, ya que otros autores ponen en duda que la actividad soluble sea consecuencia de la liberación de la β -glucosidasa de pared (por autodigestión), y sugieren que podría ser el resultado de la expresión de isoenzimas con funciones y destinos iniciales diferenciales (Gaikwad y Maheshwari, 1994; Bhat et al., 1993).

Naturaleza de la asociación de la β -glucosidasa a la pared

Antes de investigar acerca de las identidades de las actividades β -glucosidasa soluble y asociada, se procuró determinar en qué modo la enzima se encuentra unida a la pared. Este dato es imprescindible para analizar la validez de la hipótesis de liberación.

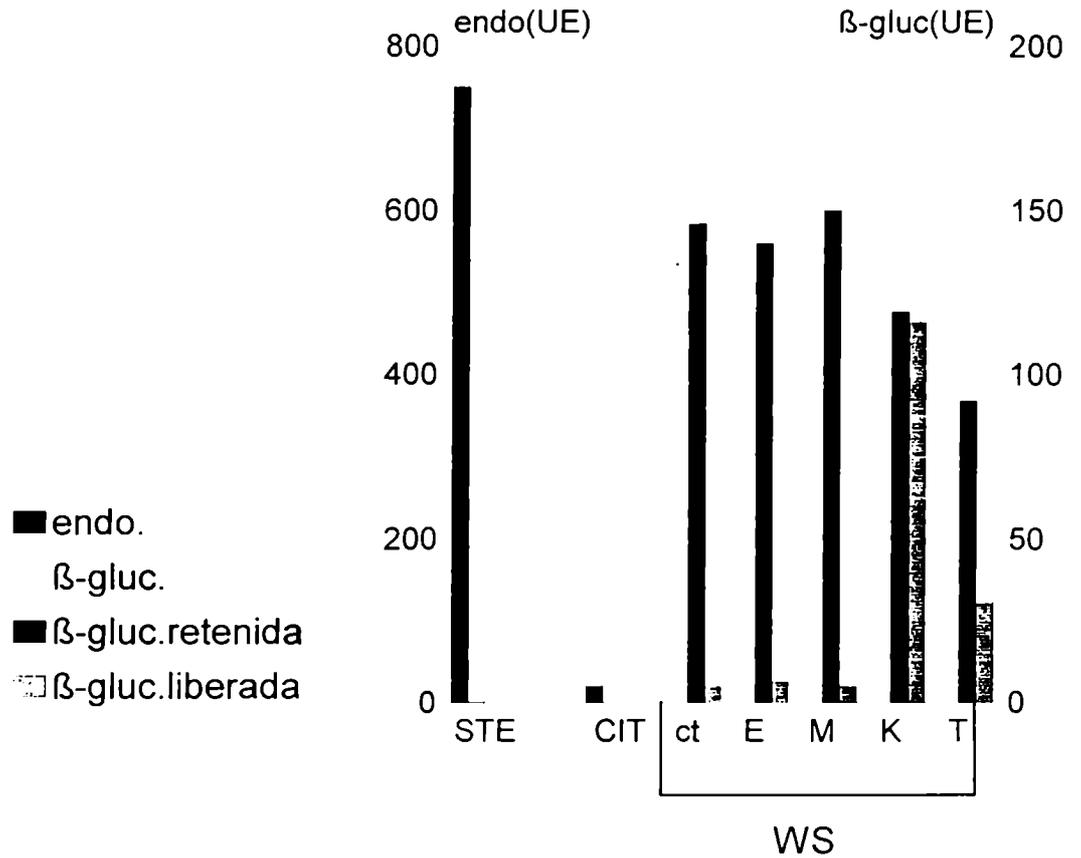
a) tratamientos químicos:

Estos ensayos se realizaron sobre la fracción de pared, siguiendo protocolos establecidos (Chang y Trevithick, 1972; Kubicek, 1982a). Los resultados se muestran en la figura 31.

El tratamiento control no libera actividad, indicando que no se trata de restos de citosol o de una unión débil. El tratamiento con una solución salina concentrada (KCl) reduce algo de la actividad en pared, indicando que la enzima (al menos en parte) se encuentra asociada por una unión no covalente. Sin embargo no hay una explicación válida de por qué la actividad liberada es mucho mayor a la perdida.

figura 31

localización de la actividad enzimática
estudio de la naturaleza de la asociación,
tratamientos químicos



Para ambas actividades la U.E. están expresadas por 100 mg de masa seca.

Las actividades en sobrenadante (STE) se muestran como referencia , y son las máximas promedio obtenidas en cultivos de celulosa .

Actividad en la muestra: CIT: citosol (intracelular),

WS: actividad en pared

ct: control,

tratamientos:

E: Edta

M: Mercaptoetanol

K: KCl

T: Tritón

No hay formas de la enzima asociadas por uniones mediadas por iones (no hay efecto con EDTA), ni por puente disulfuro (no hay efecto con mercaptoetanol). No hubo efecto del Tritón en cuanto a liberación, aunque sí se verificó una pérdida de actividad en la pared. Dado que el tratamiento no interfiere con la estabilidad y actividad de la enzima, se podría explicar como un error metodológico (es probable que la disminución de actividad se deba a una pérdida de masa de la muestra).

La actividad endoglucanasa no se detectó en la fracción de pared y sólo hubo niveles muy bajos en la fracción citosol (comparando con los niveles que se dan como valor de referencia: actividad endoglucanasa/100 mg masa seca, en cultivos inducidos), lo cual es coherente con el tipo de acción que tiene. Se puede afirmar que esta enzima es exclusivamente soluble y que no hay formas constitutivas asociadas al micelio. Estas observaciones coinciden con la localización que tiene la actividad endoglucanasa para otros organismos (Acebal et al., 1988; Sandhu y Puri, 1988).

Por otra parte, los niveles de β -glucosidasa asociada a pared o intracelular (relativos a la biomasa) son tan o más altos que los que se registran en el sobrenadante de cultivos inducidos.

b) tratamientos enzimáticos:

Los trabajos consultados muestran que la acción de enzimas líticas libera casi la totalidad de enzimas de pared (Chang y Trevithick, 1972; Kubicek, 1982a). Esto indicaría una asociación espacial, en donde la β -glucosidasa estaría "atrapada" en la matriz.

Por este motivo se ensayó el efecto de varias preparaciones enzimáticas comerciales sobre la pared de *S. saccoboloides*. El tratamiento con quitinasa no digiere la pared (no hubo liberación de azúcares solubles) ni libera la enzima. La laminarinasa y la Novozym (Sigma) tienen buena acción de digestión, disminuyendo algo la cantidad de enzima remanente. Sin embargo no pudo evaluarse la cantidad de enzima liberada, ya que los agentes (se obtienen de cultivos de *Trichoderma*) traen grandes cantidades de β -glucosidasa.

Por este motivo, y con el fin de repetir el ensayo en condiciones adecuadas, se intentó purificar fracciones de laminarinasa libres de β -glucosidasa, según el protocolo de Kubicek (1982b). A pesar de las numerosas repeticiones, nunca logró obtenerse la fracción deseada, por lo que no tuvo sentido volver a trabajar con el tratamiento enzimático.

c) comentarios:

El objetivo de extraer la enzima de pared era poder compararla con la forma soluble, según sus patrones de bandas de actividad, en geles de poliacrilamida. Además de fracasar el intento de extracción, el método utilizado de detección de isoenzimas para β -glucosidasa (según Sandhu y Puri, 1988) tampoco dio resultado. A la vista de los resultados negativos de los tratamientos químicos, podría ser válido decir que la enzima está incluida en la matriz, pero no se tiene prueba experimental de ello.

Para *Trichoderma* se ha propuesto un modelo de unión: un heteroglucano de la pared es el sitio en el que está unida (no covalentemente) la β -glucosidasa (Messner et al., 1994), la aparición de la forma extracelular se adjudicaba a autólisis de la pared, por actividad β ,1-3 glucanasa intrínseca (Kubicek, 1982b). Estos autores proponían alternativamente, una liberación pasiva en los ápices de crecimiento, en donde el recambio de material es alto, a causa de la elongación.

Localización a lo largo de la inducción:

Si la hipótesis de la liberación es válida, debiera registrarse una disminución de actividad β -glucosidasa en la pared (o citosol) y un aumento simultáneo en el sobrenadante, a lo largo del proceso de inducción.

Por otra parte la actividad endoglucanasa debiera ir aumentando en el sobrenadante, y no detectarse en las otras dos fracciones en ningún estadio del proceso. La figura 32 muestra que esto último es cierto, evidenciando que existe síntesis *de novo* de endoglucanasa una vez que las hifas entran en contacto con el inductor.

La razón de elegir estos tres inductores es que se deseaba observar el proceso en diferentes condiciones, y además probar con un azúcar (celobiosa) que tiene acción diferencial sobre el sistema (induce pobremente a la endoglucanasa y no induce, sino que reprime a la β -glucosidasa).

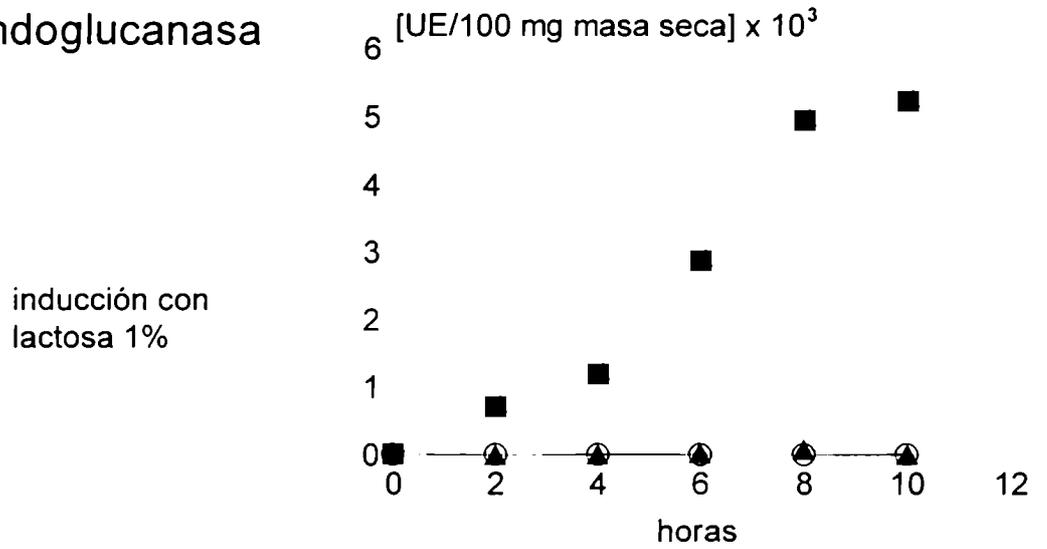
Los resultados para la β -glucosidasa (fig 33) no fueron los esperados: La actividad asociada al micelio es más o menos constante a lo largo de la inducción, y los valores son independientes del inductor usado. Esas fracciones presentan actividad β -glucosidasa constitutiva que no es en absoluto afectada por la inducción. Además la curva de actividad en sobrenadante es similar a la de la endoglucanasa, indicando que se trataría de otra forma de la enzima, inducible y producida por síntesis *de novo*.

No es válida la hipótesis, así como tampoco la idea de que las diferencias regulatorias se deban a que la β -glucosidasa aparezca en el sobrenadante debido a liberación de formas constitutivas de la enzima.

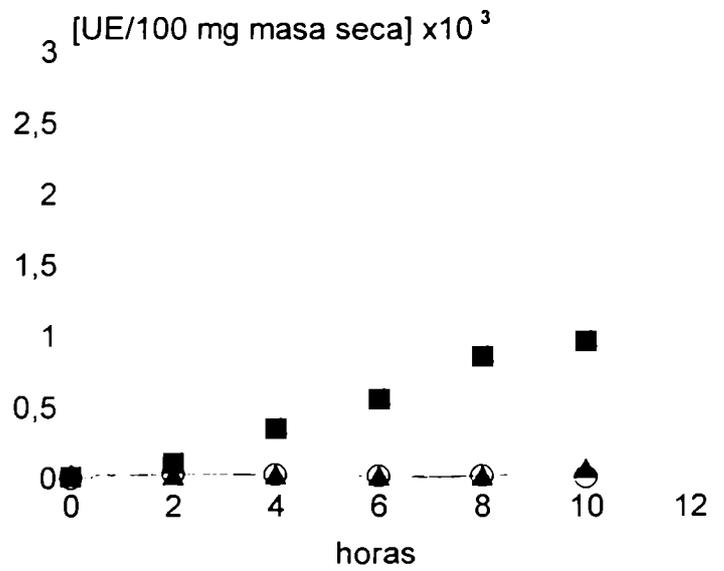
figura 32

localización a lo largo de la inducción

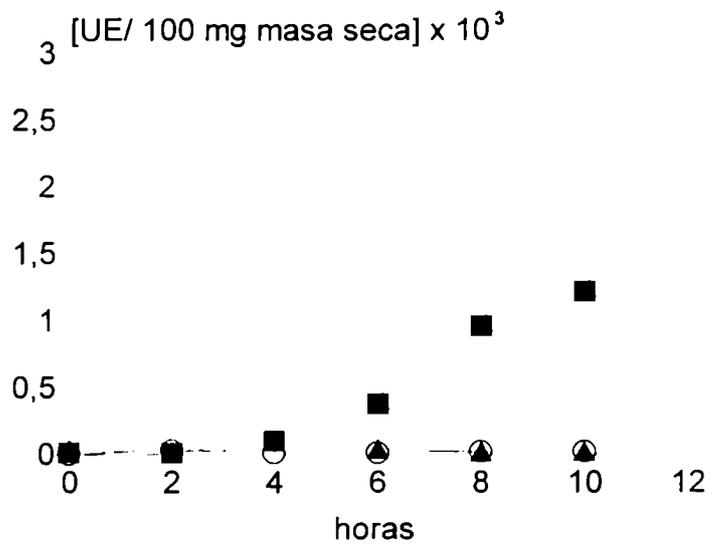
endoglucanasa



inducción con CMC 1%



inducción con celobiosa 1%

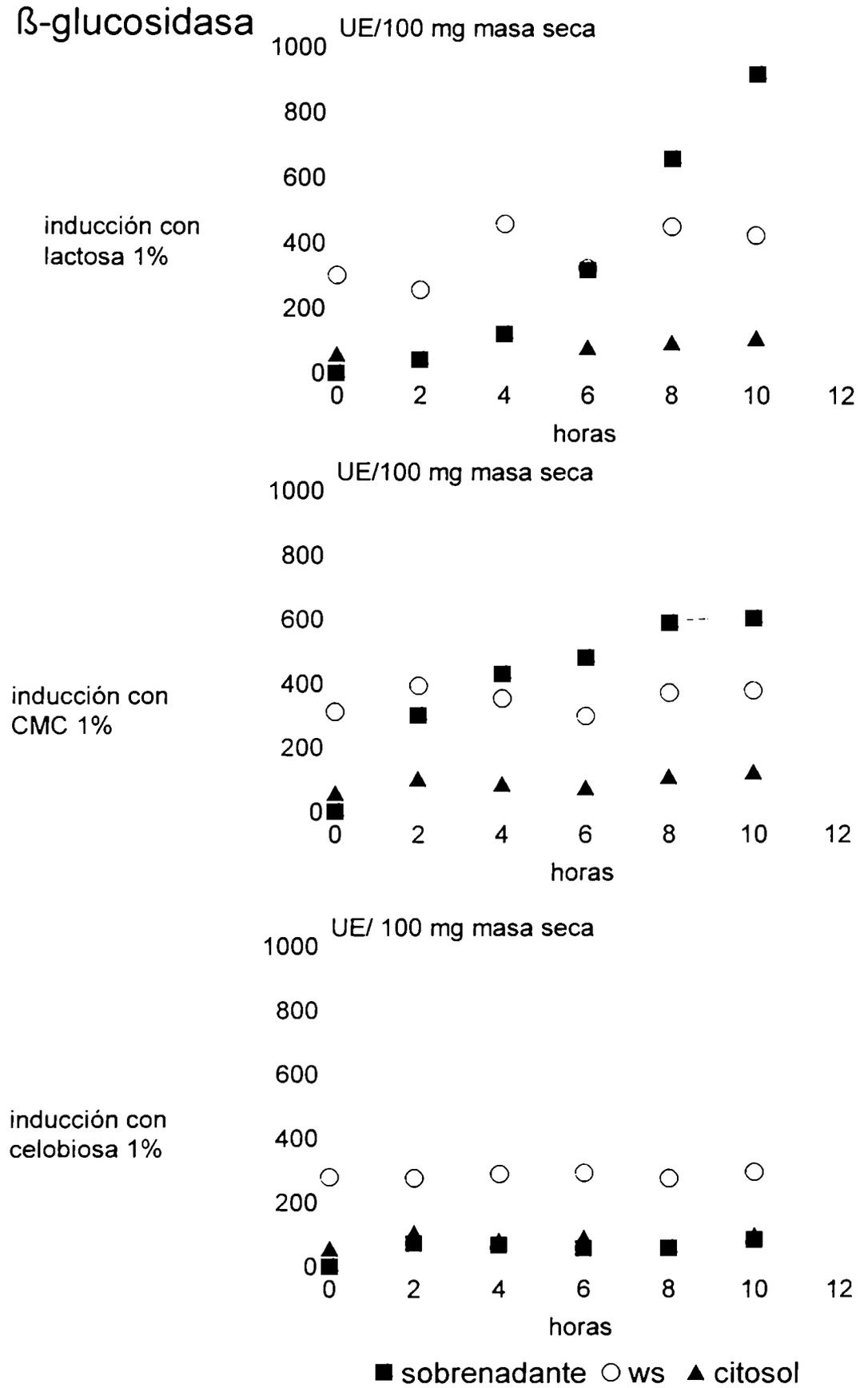


sobrenadante ○ ws ▲ citosol

figura 33

localización a lo largo de la inducción

β -glucosidasa



8) La inducción de todas las enzimas se da por síntesis *de novo*:

Usando un inhibidor de la síntesis proteica (cicloheximida) se comprobó que se detiene tanto la producción de CM Casa como de β -glucosidasa en el sobrenadante (fig 34), indicando que todo el sistema celulolítico extracelular se produce una vez iniciada la inducción, y que ninguna de las formas existe previamente como zimógenos, ni tampoco asociada al micelio a partir de donde se liberan. Es importante destacar que luego de 24 horas se reinició la producción de enzimas, indicando que el efecto de la cicloheximida no fue debido a una disminución de la vitalidad del micelio.

Que la endoglucanasa se genera por síntesis *de novo* no es tema de controversia, pero que esto sea cierto para la β -glucosidasa es interesante. En este caso el comportamiento coincide con lo que ocurre en *T.reesei*: recientemente se descubrió también en este organismo la existencia de la actividad β -glucosidasa soluble inducible (Mach et al., 1995).

9) Coinducción de celulasas y xilanasas:

Dada la estrecha relación entre la celulosa y hemicelulosas en los sustratos naturales se ha investigado para otros hongos la relación regulatoria entre ambos sistemas (Acebal et al., 1988; Royer y Nakas, 1990; Hrmová et al., 1991; Gomes et al., 1994; Vincken et al., 1997). En algunos casos se puede ver que ambos sistemas responden del mismo modo a los inductores. Para *S. saccharoboloides* se observó en ensayos preliminares considerable actividad endoxilanasas en sobrenadantes provenientes de celulosa cristalina.

En principio se realizó una curva de crecimiento en xilano, la cual se muestra en la figura 35. Se puede ver que la actividad endoxilanasas obtenida a lo largo de la curva de crecimiento (fig 35B) alcanza los mismos valores que se registran en celulosa cristalina (fig 35C). La producción de endoxilanasas es tan potente en celulosa cristalina como en xilano. De resultados antes expuestos se concluye que lo contrario no es válido: el xilano no promueve eficientemente la formación de celulasas.

Además se estimó la correlación entre el método de endoxilanasas clásico (liberación de azúcar reductor) y el método de degradación de xilano en placa. Ambos dan un patrón muy similar (fig 35 B y C), indicando que el método de placa es apropiado para medir actividad xilanasas cuando no sea posible utilizar el método de los azúcares reductores.

figura 34

efecto de inhibidores de la síntesis de proteínas

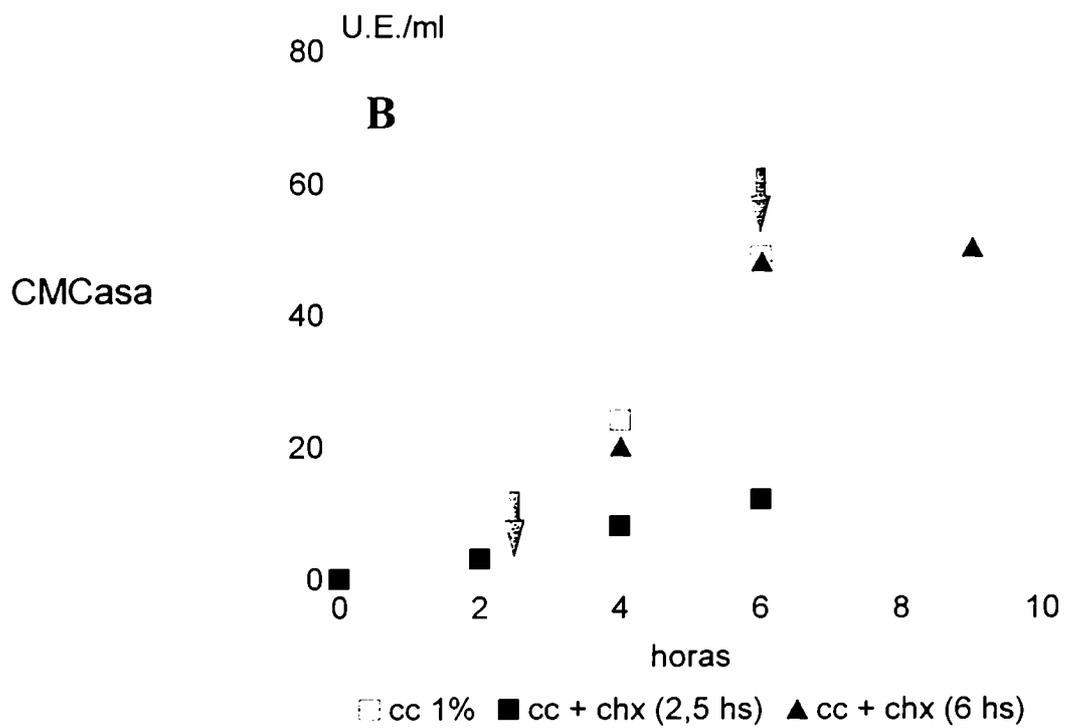
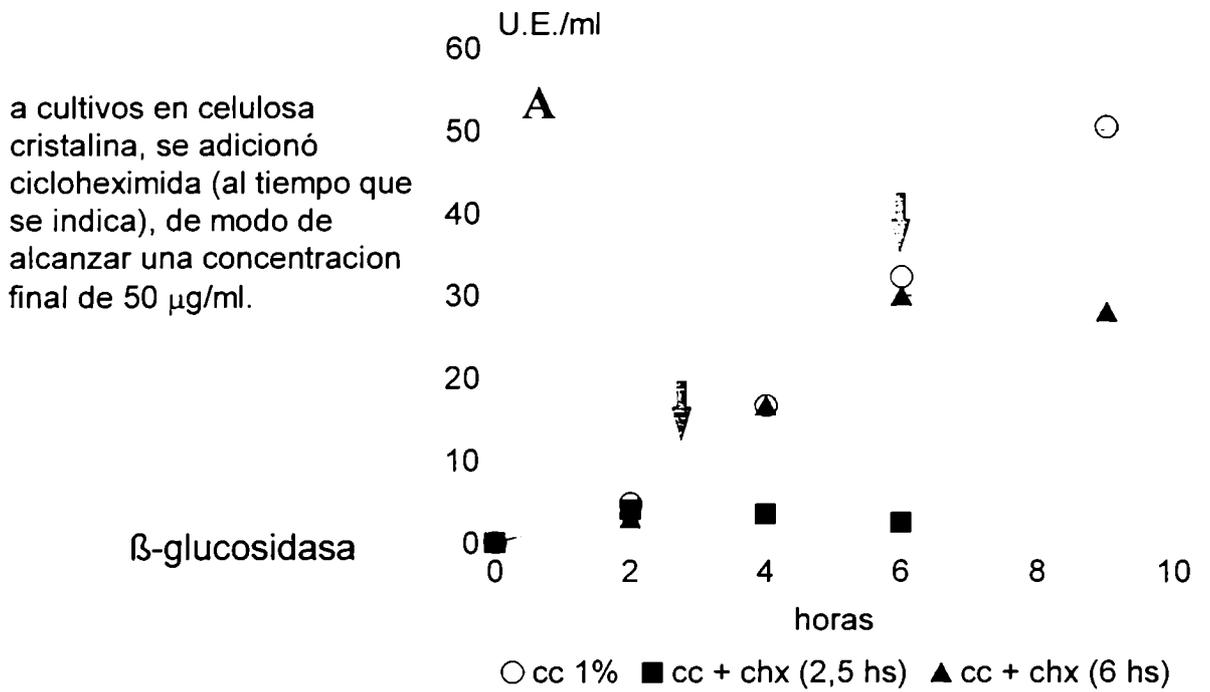
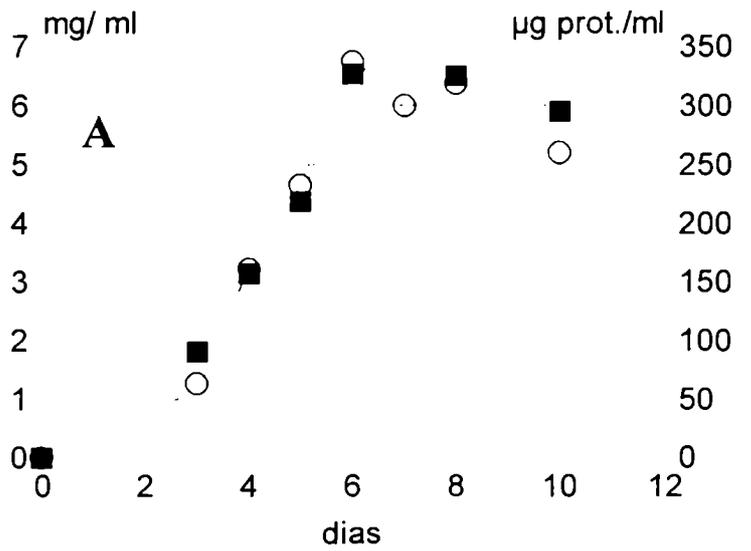


figura 35

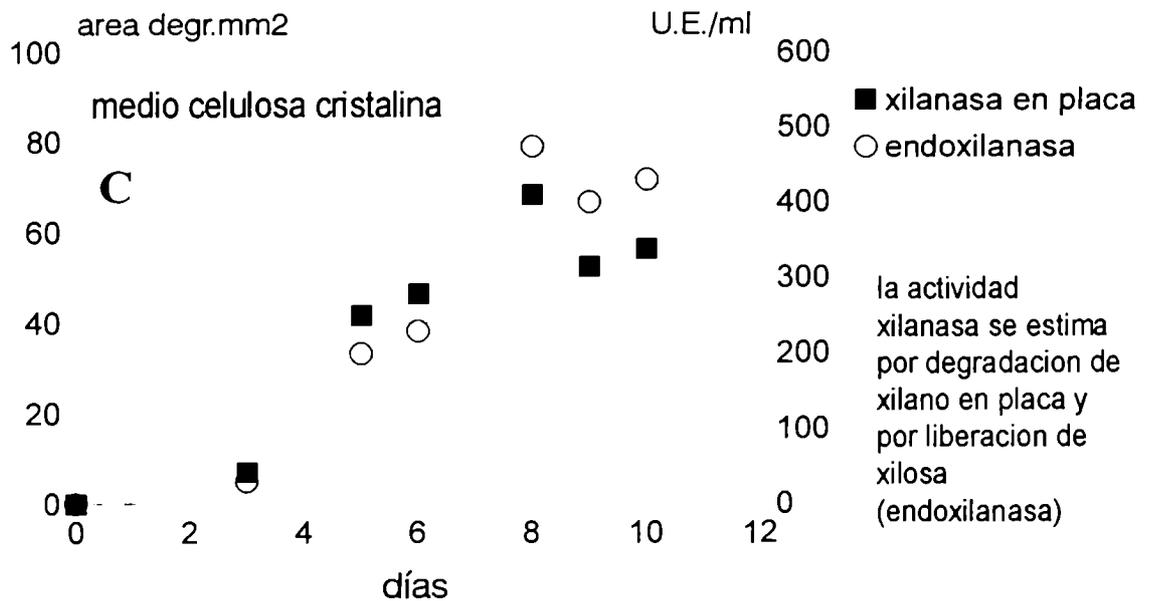
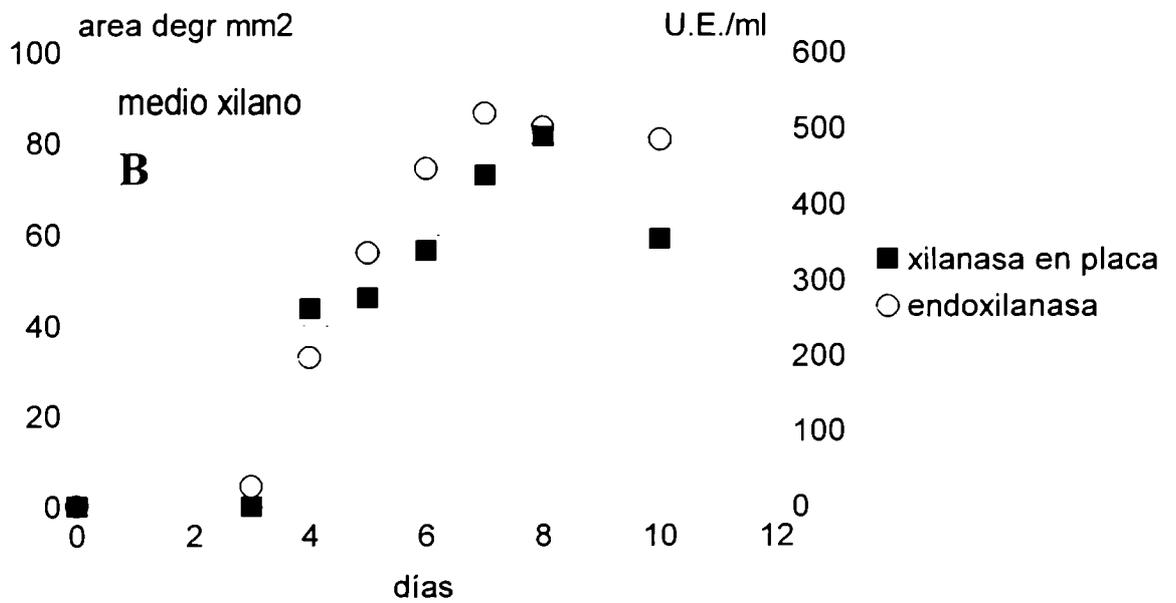
curva de crecimiento
fuente de carbono
xilano

crecimiento: peso seco y proteínas
de micelio



actividad xilanasa

■ peso seco ○ proteínas de micelio



la actividad
xilanasa se estima
por degradación de
xilano en placa y
por liberación de
xilosa
(endoxilanasa)

Los datos obtenidos podrían interpretarse en términos de una naturaleza constitutiva de esta enzima. Para determinar la validez de esta idea se realizaron ensayos de inducción.

La figura 36 muestra que la inducción con xilano es potente (fig 36A), la misma se comparó con los rendimientos obtenidos usando otros compuestos (36B).

La respuesta en glucosa es baja, indicando que no se trata de una enzima constitutiva. Por otra parte la endoxilanasas muestra un patrón similar a las celulasas: se induce bien en celulosa cristalina (la máxima actividad se da en 24 horas) y en lactosa. La única diferencia en su regulación es que se induce en xilano.

Esto es similar a lo que ocurre en *Sclerotinia sclerotiorum* (Riou et al., 1991), donde todos los inductores de celulasa inducen xilanasas. Al contrario se vio que para *Aspergillus terreus* la regulación de ambos sistemas es muy diferente (Hrmová et al., 1991).

Sería razonable que el xilano promoviera la producción de celulasa, como se ve en *P. chrysosporium* (Temperlaars et al., 1994). Como recubre las fibrillas de celulosa, es probablemente la molécula con que primero interactúa el micelio, sin embargo, en *S. saccoboloides* el xilano no tiene tal efecto.

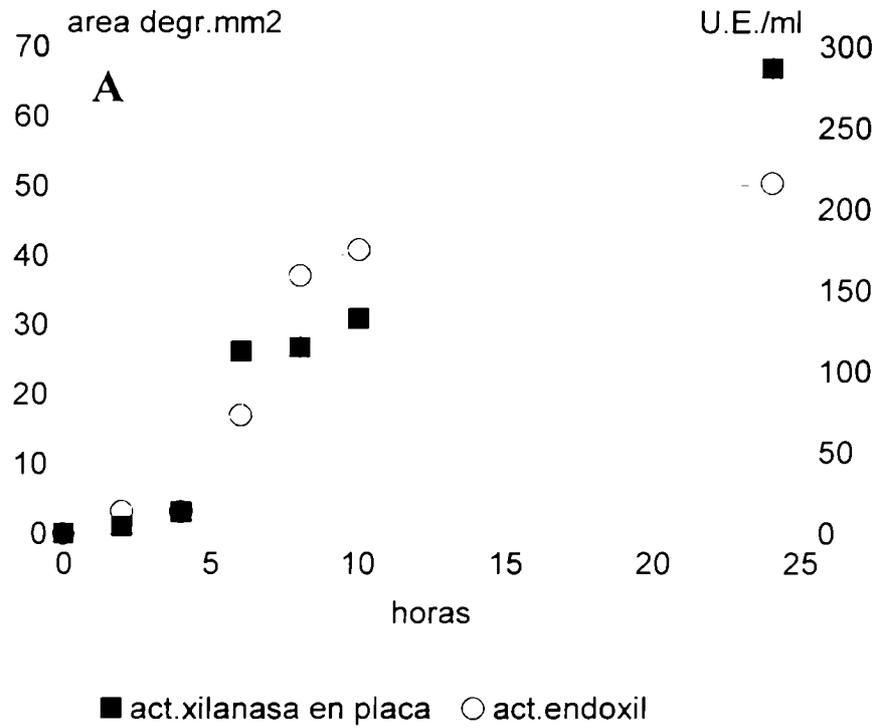
Podría proponerse que la regulación no está bien ajustada (ya que en celulosa se producen enzimas incapaces de degradarla). Este no es un enfoque correcto: antes de decir que un sistema metabólico es ineficiente, hay que pensar otras explicaciones posibles. Las condiciones del cultivo distan mucho de una situación natural, y el sustrato ofrecido (celulosa cristalina) podría estar generando respuestas de algún modo inespecíficas.

Otra posibilidad es que esta actividad no sea realmente endoxilanasas, sino las mismas celulasas, actuando inespecíficamente sobre el xilano, como se mostró para el sistema celulasa de *Fusarium oxysporum* (Christakopoulos et al., 1996). Esta última hipótesis se investiga en la siguiente sección.

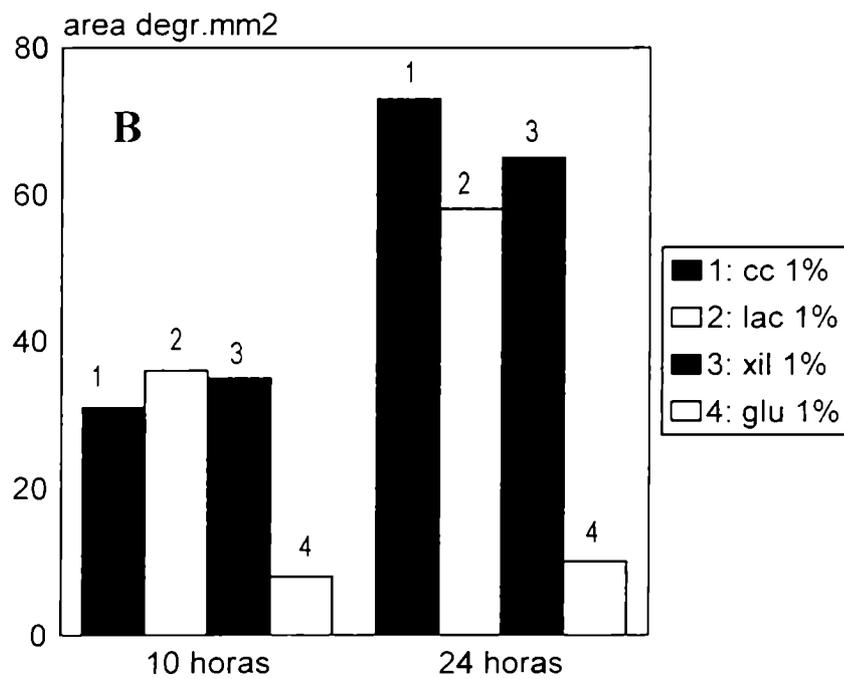
figura 36

inducción de la actividad xilanasa

inducción por xilano



inducción de xilanasa por diferentes carbohidratos



10) Detección de isoenzimas: endoglucanasa:

Curva de crecimiento en celulosa:

S. saccoboloides presenta varias bandas de actividad endoglucanasa, al igual que otros hongos de esta misma familia (Pardo et al., 1997; Ramos y Forchiassin, 1998).

Como se ve en el esquema y la fotografía (fig 37), el patrón básico de bandas no se modifica con el tiempo. Solamente van apareciendo bandas secundarias (como un "chorreado") mientras que algunas bandas principales (Rf 27.3, 48.1 y 57.5) van perdiendo intensidad.

Esto indica que las bandas secundarias se producirían por modificaciones (¿proteólisis parcial?) de la forma sintetizada y liberada originalmente. Esto ha sido propuesto para *T. reesei* (Haab et al., 1990; Goller et al., 1998) como una causa de la multiplicidad enzimática.

En otros organismos, a diferencia de lo que se ve en *S. saccoboloides*, el patrón de bandas se modifica mucho con el paso del tiempo (Canevascini et al., 1983; Sandhu y Puri, 1988).

Curva de crecimiento en celulosa más CMC:

La figura 38 muestra el patrón de isoenzimas en la curva de crecimiento de celulosa cristalina más CMC 0,1 %, en la cual se produjo un adelantamiento de 24 horas para todas las variables. Existiría la posibilidad de que sólo alguna de las bandas aparezcan más temprano, mostrando que la CMC tiene efecto diferencial sobre parte del sistema.

Sin embargo se ve que al día 4 ya aparecen todas las bandas principales: el adelantamiento es cuantitativo, no cualitativo. Además no hay diferencias importantes entre el tratamiento y el control (celulosa 1%) y también a lo largo de los días va apareciendo un "chorreado".

En el control de celulosa 1% una banda (Rf 5.6) permanece hasta el octavo día, esta banda en el ensayo anterior (fig 37) desaparece al sexto día.

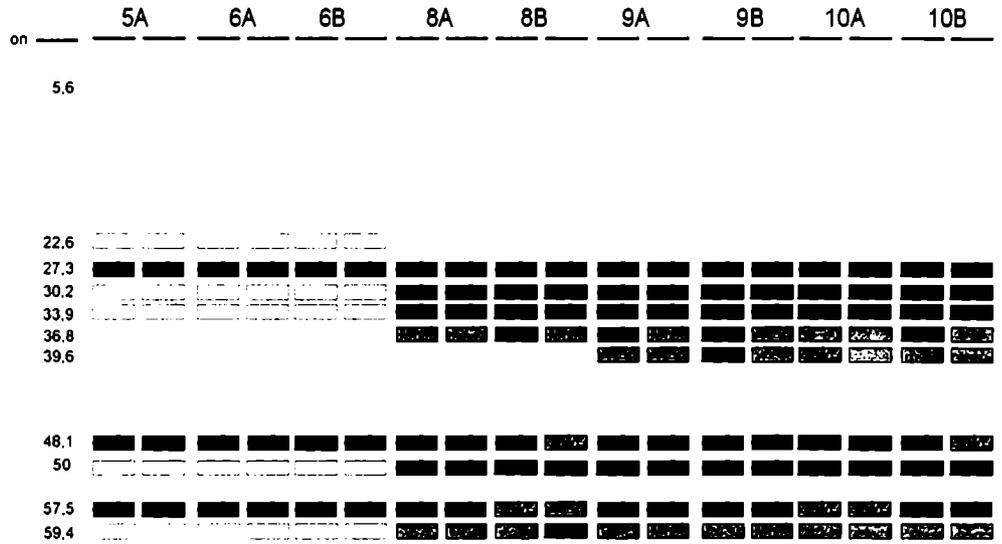
Inducción con celulosa cristalina:

La figura 39 muestra el patrón observado. Las bandas principales son las mismas que en curva de crecimiento (fig 37), el "chorreado" aparece recién a las 24 hs. La actividad se detecta a partir de las 4 horas, con un patrón casi completo. La que tarda más tiempo en aparecer es la banda suave de Rf 5.6.

figura 37 zimograma endoglucanasa

las calles indican el día en que se tomo la muestra,
las letras se refieren a los duplicados

Curva celulosa cristalina



los números representan
el Rf
las distintas tramas
representan la intensidad
de las bandas

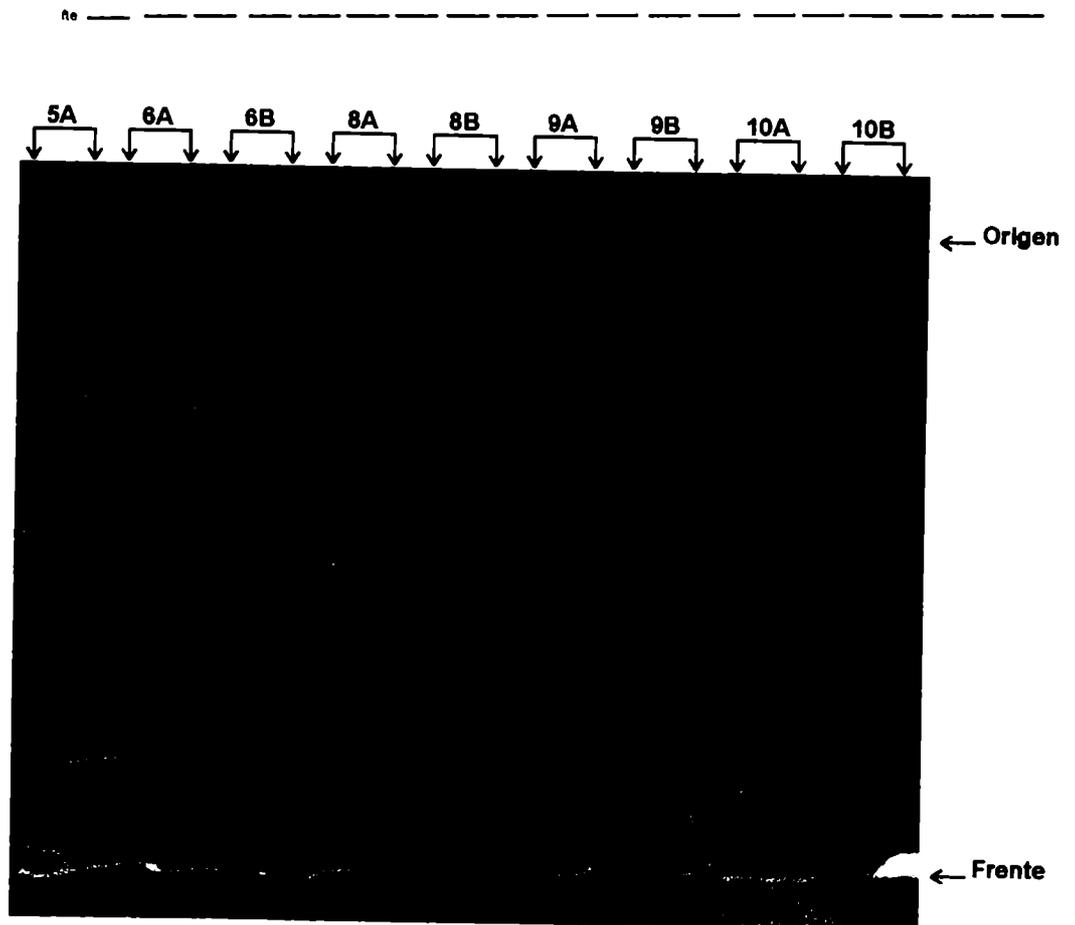
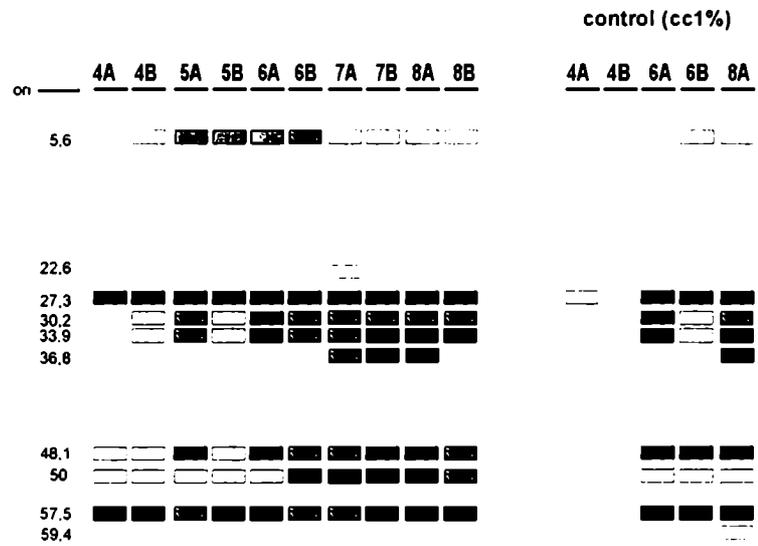


figura 38

zimograma endoglucanasa

las calles indican el día en que se tomo la muestra,
las letras se refieren a los duplicados

curva celulosa
cristalina
+ CMC 0,1%



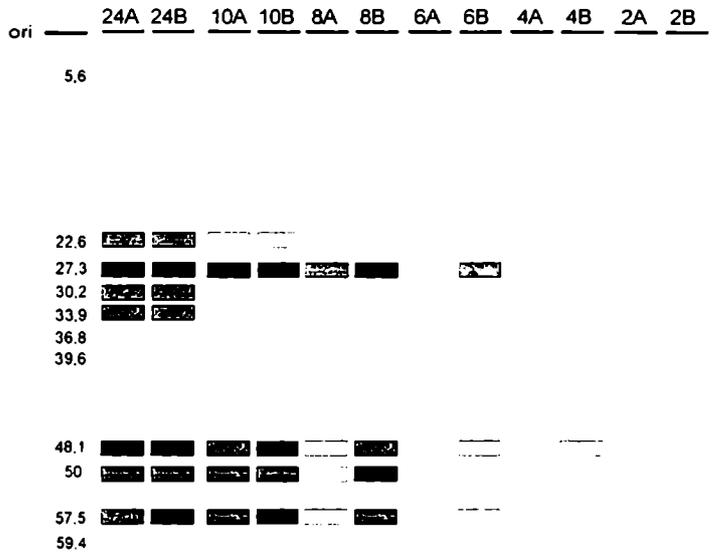
los números representan
el Rf
las distintas tramas
representan la intensidad
de las bandas

figura 39

zimograma endoglucanasa

las calles indican el tiempo (horas) en que se tomo la muestra, los numeros se refieren a los duplicados

inducción con
celulosa cristalina



los números representan
el Rf
las distintas tramas
representan la intensidad
de las bandas

Inducción con lactosa:

La lactosa tiene un particular efecto represor en combinación, lo cual fue sorprendente para una molécula que parece mimetizar al verdadero inductor.

El análisis del patrón de isoenzimas permitió determinar el alcance del concepto de la lactosa como análogo del verdadero inductor. La figura 40 muestra el patrón a lo largo de 10 horas de inducción.

Aquí aparece la mayor diferencia observada entre los tratamientos: la banda de Rf 27.3 es suave, en tanto que la banda en 5.6 es fuerte, y aparece con frecuencia la banda 17.9. Además de que el chorreado de bandas no se genera.

Se sabe que en *T.reesei* en cultivos de soforosa no se producen todas las formas de enzimas que se ven en celulosa (Sternberg y Mandels, 1979), este tipo de datos hace dudar de que este tipo de inductores solubles imiten perfectamente las condiciones normales.

No hay otros datos comparativos que permitan discutir lo observado en *S. saccoboloides*, sobre todo en relación al efecto negativo de la lactosa. Para determinar si la lactosa actúa en forma distinta al inductor verdadero debe resolverse el siguiente interrogante: ¿es más importante la alteración de intensidad de bandas que su sola presencia?. Este punto, como se verá más adelante en vista de todos los resultados obtenidos, solamente soporta una discusión especulativa.

Inducciones con otros compuestos:

La figura 41 muestra el patrón obtenido a 10 y 24 horas para diversos tratamientos.

Dado que en xilano la actividad es muy baja, se entiende por qué aparecen sólo tres bandas (5.6, 48.1 y 50), muy suaves. En lactosa se repite el patrón antes descrito.

En combinaciones de lactosa 1% y celulosa también aparecen sólo algunas bandas. Cabe aclarar que en este caso la actividad total era baja, lo que no permitió correr la cantidad de enzima estipulada en el ensayo. Lamentablemente este resultado, que hubiera dado un dato valioso para el análisis, no fue contundente. Al menos sirvió para determinar que la presencia de lactosa (1%) no impide la formación de las bandas principales 27.3, 48.1 y 57.5 (que son fuertes en celulosa sola).

La adición de lactosa 0,1%, que disminuye un poco la producción enzimática, no impide la aparición de ninguna banda, el patrón es idéntico a la inducción con celulosa.

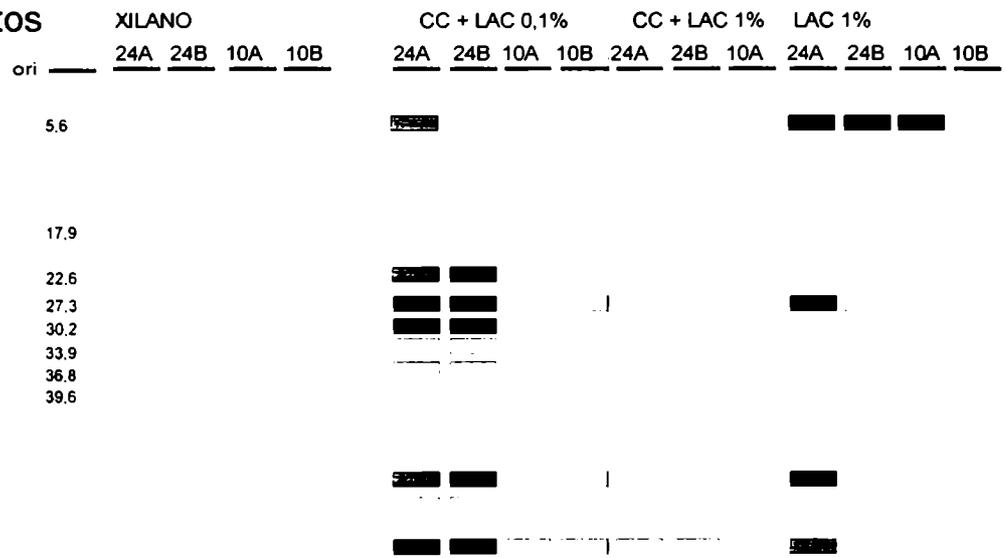
No pudo obtenerse una muestra suficientemente concentrada de los sobrenadantes de celobiosa 1% (por la baja actividad original), por lo cual es imposible saber qué isoformas se sintetizan con este inductor. Lo mismo ocurrió con CMC 1%.

figura 41

zimograma endoglucanasa

inducción con
diferentes
carbohidratos

las calles indican el tiempo (horas) en que se tomo la muestra,
A y B corresponden a los duplicados



los números representan
el Rf
las distintas tramas
representan la intensidad
de las bandas

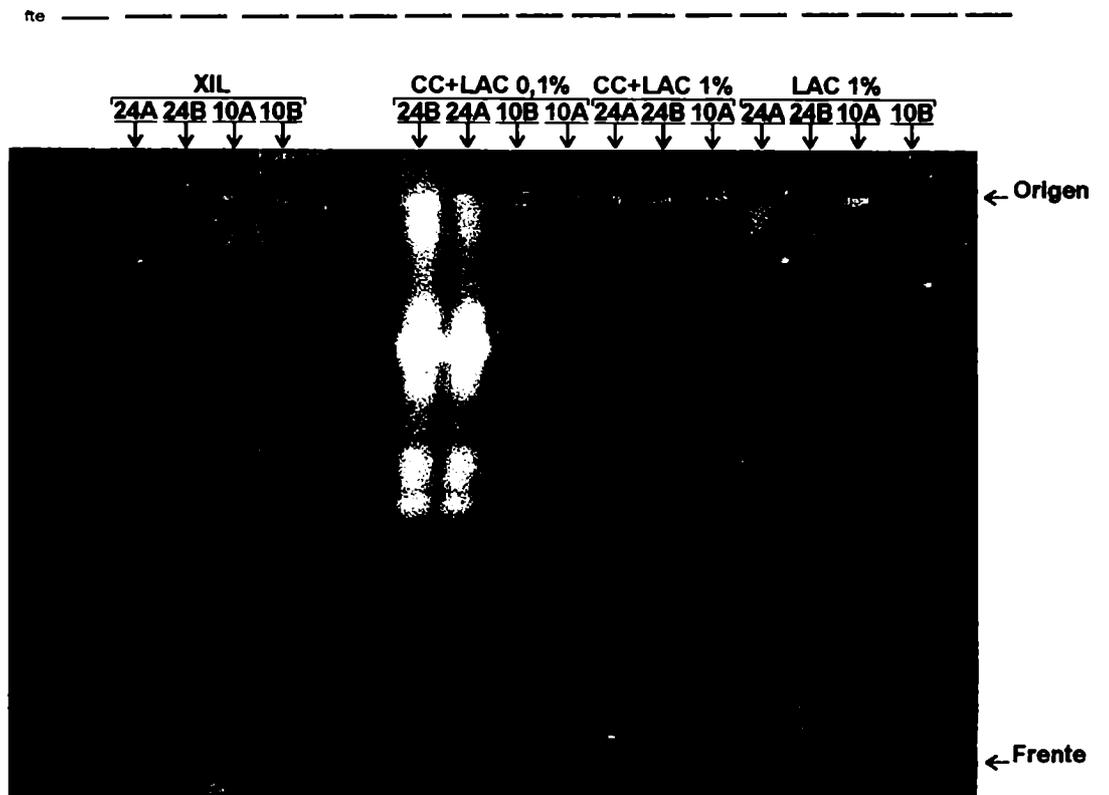
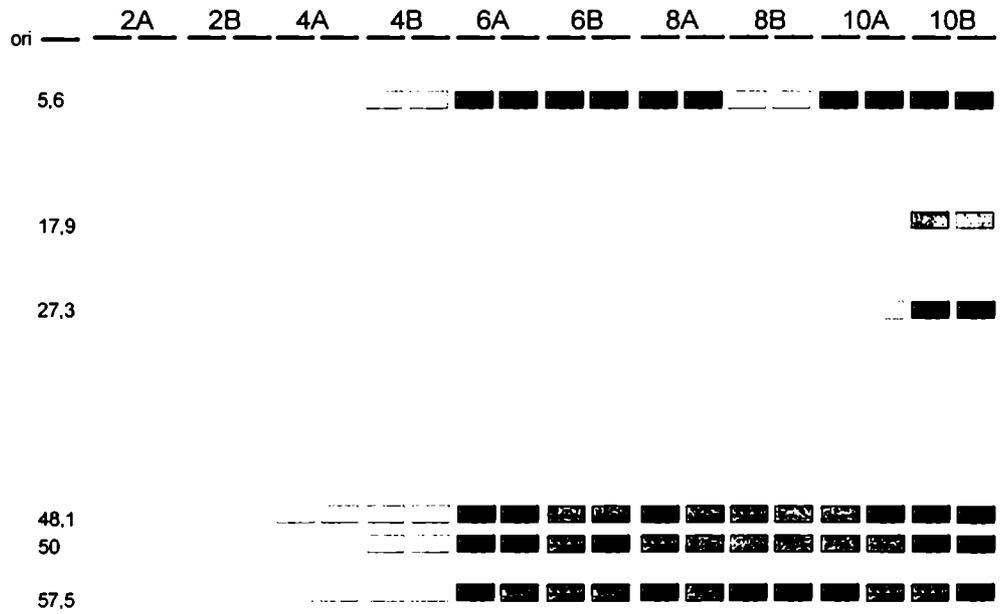


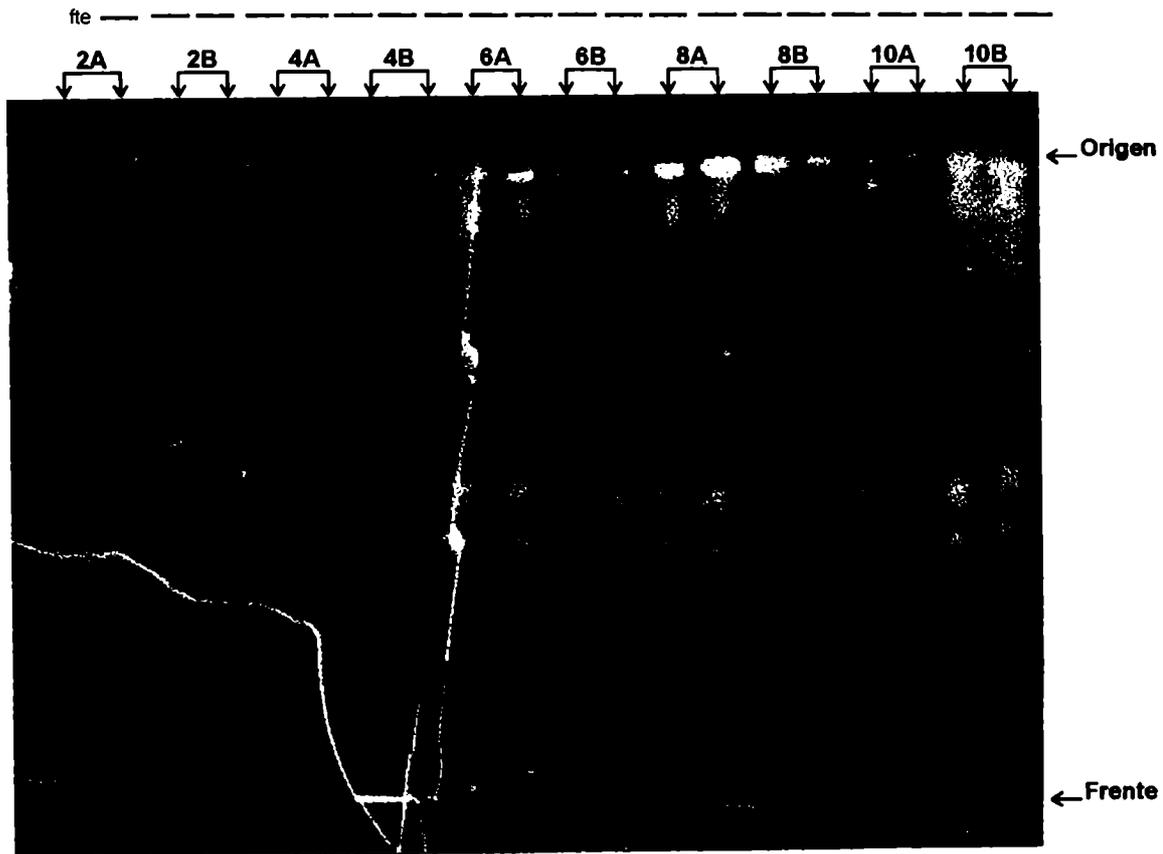
figura 40
inducción con
lactosa 1%

zimograma endoglucanasa

las calles indican el tiempo (horas) en que se tomo la muestra,
 A y B corresponden a los duplicados



los números representan
 el Rf
 las distintas tramas
 representan la intensidad
 de las bandas



11) Detección de isoenzimas: endoxilanasas

Aunque el resultado obtenido no permitió fotografiar (el color del agar queda muy suave) el resultado observado permite una conclusión definitiva: la posición de las bandas que degradan xilano es muy diferente a la posición de cualquier banda de endoglucanasa.

Esto se testeó en varios sobrenadantes (de cultivos en celulosa cristalina), dando el mismo resultado para todos: la mayor parte de la actividad no ingresa en el gel (queda en el origen). Es razonable pensar que la mayoría de las endoxilanasas tienen un peso molecular mayor que las endoglucanasas.

Se detectan dentro del gel solamente dos bandas, muy suaves, con Rf 46.2 y 52.8 (no coinciden con las bandas de endoglucanasa de esa región del gel).

discusión general y
conclusiones

Discusión general y conclusiones:

A pesar de ser un polímero insoluble, la celulosa (al menos en la forma que se ofreció como sustrato) es bien aprovechada por el organismo. En xilano (otro polímero que también es componente de la pared celular) los rendimientos en biomasa fueron aún mayores. Estos resultados no son sorprendentes: dado que los azúcares solubles no son abundantes en su sustrato natural (Lohda, 1974) es razonable esperar una gran eficiencia para la utilización de material celulósico.

El alto crecimiento y producción de un sistema celulolítico completo, activo in vitro (en condiciones estándar) y termoestable, muestra que *Saccobolus saccoboloides* es un verdadero agente de degradación de celulosa.

La respuesta de *S. saccoboloides* a la celulosa muestra, en cuanto a rendimiento en biomasa, que su aprovechamiento es tan eficiente como el de la glucosa o la celobiosa (aunque un poco más lento). Esto no es solamente característico de este organismo: muchos hongos celulolíticos crecen muy bien en cultivos con celulosa, produciendo alta actividad enzimática. Por ejemplo *Trametes trogii* (Levin y Forchiassin, 1995); *Ascobolus crenulatus*, *A. albidus*, *A. gamundii* (Sívori et al., 1996), *Agaricus bisporus* (Manning y Wood, 1983), *Sporotrichum termophile* (Canevescini et al., 1979) *Trichoderma viride* (*reesei*) (Mandels y Reese, 1957), *Aspergillus terreus* (Pushalkar et al., 1995), *Penicillium rubrum* (Menon et al., 1994). Es importante destacar esta característica, ya que hay hongos capaces de sintetizar celulasas (por ejemplo cepas patógenas de *Fusarium oxysporum*), que no crecen en celulosa como única fuente de carbono (Alconada, 1992).

Se conoce para algunos hongos que adiciones de glucosa o celobiosa reducen la duración de la fase lag en la curva de crecimiento o mejoran los rendimientos significativamente (Pardo y Magnelli, 1996; Shewale y Sadana, 1978; Bahkali, 1995).

En *Saccobolus saccoboloides*, por el contrario, el metabolismo de la celulosa parece ser muy eficiente, dado que no se acelera ni adelanta el crecimiento con adiciones de glucosa o celobiosa, las cuales parecen tener un efecto ligeramente negativo. Teniendo en cuenta esto surge el siguiente interrogante: ¿Podría ser que la glucosa o celobiosa "exógenas" no tuvieran el mismo efecto que las producidas por degradación enzimática de la celulosa?.

Esta "distinción", en el caso de la glucosa, podría existir si la β -glucosidasa asociada al micelio, al mismo tiempo que hidroliza la celobiosa, permitiera (o facilitara) el transporte del producto (glucosa) hacia el interior de las células. Esta hipótesis plantea la posible existencia de un mecanismo "vectorial" celobiosa-glucosa, con reacciones acopladas físicamente en la pared. Esta idea de mecanismo vectorial fue propuesta para *T. reesei* (Kubicek et al., 1993a).

Quedaría por entender porqué la celobiosa "exógena" tampoco promueve un adelanto. Más adelante se propone una explicación para este y otros efectos no predecibles de algunos azúcares.

Revisando, por último, los resultados del crecimiento en celulosa más lactosa, puede proponerse un efecto de competencia (¿con la celobiosa formada naturalmente?). Si el mismo sistema de transporte (o hidrólisis) fuera utilizado por la lactosa y la celobiosa, sería posible que se sature por lactosa, ya que se metaboliza lentamente. La celobiosa (producida por degradación de la celulosa) recién podría aprovecharse una vez agotada la lactosa. Es razonable pensar que un compuesto que no está normalmente presente genere una respuesta desajustada. Este y otros extraños efectos de la lactosa deben interpretarse desde este punto de vista.

El estado fisiológico determina la sensibilidad a moléculas que ejerzan acción inductora o represora. Si bien se pudo mostrar que la biomasa es determinante de la producción, las condiciones deben ser "inductivas". El exceso de fuente de nitrógeno, la falta de inductor o la presencia de represores catabólicos, llevan al micelio a una condición de baja producción (o no producción).

Hasta que no se desarrolló una estrategia experimental alternativa (cultivos de reemplazo) todo esto no era sino una suposición. Los cultivos de reemplazo (resting mycelia) no fueron utilizados frecuentemente hasta fines de los años '80. Gran parte de los trabajos de la presente década, enfocados hacia el estudio del control génico, han utilizado este tipo de cultivos. Con este diseño se pudo lograr producción enzimática en niveles altos, determinándose condiciones óptimas.

Con respecto a las hipótesis generales planteadas (al inicio de la sección 4, pág 77) el análisis de los resultados obtenidos (inducción, represión, mezcla de inductores, localización y zimogramas) permitió comprobar que:

a) las enzimas son inducibles: no se generan en respuesta a la baja tasa de crecimiento, ni a la desrepresión (agotamiento de la glucosa: equivalente a la

transferencia a medio sin inductor). La calidad y cantidad de fuente de carbono es el factor principal en la regulación de la biosíntesis de celulasas: la celulosa es necesaria para provocar la aparición de enzimas.

Gran parte de los sistemas celulolíticos conocidos son inducibles por celulosa, algunos ejemplos son: *Ascobolus furfuraceus* (Mercuri y Diorio, 1995), *A. gamundii* (Sívori et al, 1996); varias especies de *Saccobolus* (Ramos y Forchiassin, 1996); *Neurospora crassa* (Yazdi et al., 1990); *Trametes trogii* (Levin y Forchiassin, 1995); *Botrytis cinerea* (Touzani y Doneche, 1995), *Aspergillus japonicus* (Sanyal et al., 1988); *Aspergillus terreus* (Hrmová et al., 1991); *Chaetomium thermophile* (Ganju et al, 1990); *Sporotrichum thermophile* (Willick et al, 1984), *Gloeophyllum trabeum* (Cotoras y Agosin, 1992); *Agaricus bisporus* (Chow et al., 1994); *Sclerotinia sclerotiorum* (Riou et al, 1991); *Trichoderma viride (reesei)* (Mandels y Reese, 1960).

En algunos casos (igual que en *S. saccoboloides*), la inducción de celulasas también se da en presencia de algún otro compuesto (análogo o no a la celulosa, o a sus productos de hidrólisis). Sin embargo ninguno de los organismos arriba mencionados produce celulasas en glucosa.

A pesar de estar ampliamente distribuida, la inducción por sustrato no es universal. Por ejemplo *Ustilago maydis* (un hongo patógeno y dimórfico) expresa las celulasas en la fase filamentosa (Schauwecker et al., 1995). En *Uromyces viciae-fabae* (otro patógeno) la expresión también está determinada por el estado morfológico (Heiler et al, 1993). Existe un reporte para *T. reesei* que los niveles de cAMP y ATP determinan la inducción (Wang et al., 1995).

Aunque son excepciones, existen hongos en que la expresión de celulasas es considerable en cualquier fuente de carbono, inclusive glucosa (aunque en celulosa aumentan algo los niveles), por ejemplo *Fusarium oxysporum* (Osagie y Obuekwe, 1991) o *Aspergillus fumigatus* (Ximenes et al, 1996).

La no inducción del sistema en cultivos en glucosa se ha interpretado usualmente como represión. Sin embargo debe demostrarse que sea realmente represiva, la maltosa por ejemplo, tampoco es inductora, pero no ejerce ningún tipo de represión.

La naturaleza inducible o constitutiva del sistema siempre se describe para las endo o exoglucanasas. La revisión de muchos trabajos indica que la existencia de β -glucosidasa asociada a la pared probablemente esté muy distribuida, por lo que no es infrecuente encontrar reportes de "naturaleza parcialmente constitutiva" para esta actividad.

Por ejemplo: la β -glucosidasa de *T.reesei* se creía asociada al micelio y parcialmente constitutiva. Se postulaba que esta actividad aparecía en el sobrenadante por condiciones que determinaran autólisis (Jackson y Talburt, 1988; Ghosh et al, 1984; Nanda et al, 1981; Bisaria et al, 1986) o bien por actividad β ,1-6 glucanasa (autolítica) que tuviera la pared (Kubicek, 1982a y b).

Hasta que no se descubrió que se trataba de dos genes diferentes (Mach et al., 1995) no se tuvo un panorama claro. Los resultados de trabajos anteriores (por ejemplo en Strauss y Kubicek, 1990), vistos a la luz de los conocimientos actuales son válidos: si se los analiza en detalle muestran que la enzima es inducible, conclusión a la que los autores no llegaron.

Curiosamente se tenían antecedentes de la existencia de dos actividades β -glucosidasa diferentes en *Monilia sp* (Dekker, 1981), *Talaromyces emersonii* (Mc Hale y Coughlan, 1981), *Aspergillus japonicus* (Sanyal et al., 1988) e inclusive en *T. reesei* (Kolar et al., 1985). Es llamativo ver cómo una idea muy arraigada sesga la interpretación de datos objetivos.

Debe realizarse un análisis detallado para determinar cuál y cuánta actividad β -glucosidasa se está produciendo en determinado momento. Este tipo de análisis es más difícil pero da conclusiones firmes: los estudios realizados permiten afirmar que en *Saccobolus saccoboloides* la β -glucosidasa existe en dos formas, siendo solamente la soluble inducida por sustrato.

Por otra parte existen hongos que realmente no presentan actividad β -glucosidasa soluble (al menos en la fase activa de crecimiento), por ejemplo *Aspergillus nidulans* (Lee et al, 1996, Kwon et al., 1996) o *Sporotrichum termophile* (Bhat et al, 1993; Gaikwad y Maheshwari, 1994). Estos hongos, que no son mutantes, quizás no posean el gen de la actividad soluble e inducible.

b) Aunque no en todas las condiciones, la glucosa es represora de la formación de enzimas, en tanto que otros azúcares sencillos (como el disacárido maltosa) son neutros a tal efecto.

Esta capacidad represiva explicaría el ligero retraso que causa el agregado de bajas cantidades de glucosa en la curva de crecimiento en celulosa: empieza a crecer lentamente porque tiene poca fuente de carbono (por represión el micelio estaría "ciego" a la celulosa, sería como sólo tener glucosa 0,1%). Cuando la glucosa se agota, comienza un crecimiento vigoroso.

La glucosa demostró ser represor catabólico para muchos otros organismos. Según la especie y las condiciones, su efecto es más o menos drástico (Nisizawa et al., 1971; Canevascini et al., 1979; Sanyal et al., 1988; Riou et al., 1991; Touzani y Doneche, 1995).

Para el caso de *Gloeophyllum trabeum* (un hongo de pudrición castaña) la falta de represión debería interpretarse como un sistema que escapa al efecto catabólico (Cotoras y Agosin, 1992).

La glucosa en *S. saccaboloides* actúa diferente según el momento en que se agregue, para esto se tienen dos posibles explicaciones: alta vida media del mRNA y competencia represor-inductor.

El mecanismo competitivo sería así: si la inducción no se ha disparado, el efector de represión (por glucosa) llegaría antes que el efector de inducción a las zonas regulatorias de los genes. Al contrario, si el sistema se ha "prendido", el efector de represión no puede alcanzar las zonas regulatorias. Esta propuesta alternativa es coherente con el hecho de que (para otros hongos) los sitios para proteínas activadoras o represoras, en algunos promotores, están solapados (MacKenzie et al., 1993; El Dorry et al., 1996).

No hay elementos para inclinarse por una u otra idea.

Con respecto a estos resultados queda por hacer un comentario: el organismo no cesaría de producir celulasas en condiciones normales, dado que nunca se observa que las cantidades de azúcares libres (resultantes de la hidrólisis de celulosa) sean suficientes para reprimir la producción de enzimas ya disparada.

Esto se contradice con un concepto usualmente mencionado: la mayor importancia de la β -glucosidasa es liberar el sistema de represión por producto final (glucosa). Esto parece más el resultado de homologar a este sistema enzimático extracelular con los sistemas intracelulares típicos, que el resultado de observaciones experimentales. Las celulasas de *S. saccaboloides* (y las de muchos otros hongos) parecen tener rangos de estabilidad y actividad mucho más amplios que cualquier enzima intracelular.

c) Los azúcares solubles capaces de generar inducción no adelantaron la respuesta, lo cual descarta la hipótesis planteada.

El adelantamiento esperado, en cambio, se vio con adiciones de CMC tanto a celulosa como a lactosa. En este último caso los rendimientos fueron muy altos, y se vio un efecto aditivo. La CMC por sí misma induce cierta actividad, pero no parece ser un efecto de inductor soluble típico, ya que: a) es una macromolécula; b) produce alteraciones

en la morfología del micelio. Esto último explicaría el efecto que tiene con la lactosa, generando una "facilitación" en la secreción de enzimas.

Volviendo a los azúcares solubles, dos de ellos podrían ser considerados inductores: celobiosa y lactosa. Ambos tuvieron efecto negativo en cuanto al adelantamiento.

Como la celobiosa induce pobremente a la CMCasa, no es llamativo que no existiera tal adelantamiento. Y como no induce (sino que reprime) a la β -glucosidasa se entiende también el efecto sobre esta actividad.

El otro inductor soluble hallado fue la lactosa, un disacárido que no existe en el entorno natural, y que probablemente actúe como tal debido a su semejanza molecular con la celobiosa. Por lo tanto los efectos observados en lactosa no deben interpretarse en el sentido de que actúe como el verdadero inductor, sino como evidencias para develar cuál puede ser el mecanismo normal.

d) Se observó que la CMCasa y la β -glucosidasa de *S. saccoboloides* presentan diferencias en su regulación, esto ya ha sido propuesto para los sistemas de otros organismos, por ejemplo en *T. reesei* (Sternberg y Mandels, 1982).

Hasta aquí la discusión de las hipótesis generales planteadas, la cual pudo hacerse comparando con resultados obtenidos para una cierta cantidad de hongos diferentes.

A continuación se plantea un posible mecanismo regulatorio, el cual se hará teniendo en cuenta el modelo para *T. reesei*, el único organismo en el cual el sistema celulolítico se ha estudiado en detalle y profundidad. Esto genera un problema acerca de la validez de la propuesta: *T. reesei* es un mutante, que no responde ni siquiera como otras especies del mismo género (Kubicek et al., 1995), ¿es correcto intentar ajustar los presentes resultados a un modelo que claramente es anormal?

Para que la discusión que sigue sea lo menos especulativa posible se tomó la siguiente decisión, en base a los resultados que se encontraron haciendo la revisión bibliográfica del tema: se considera que la existencia de la permeasa para β -diglucósidos podría ser generalizada en los hongos, y que es posible que sus propiedades también lo sean. Lo que corresponde a la β -glucosidasa puede considerarse también, ya que no es una cepa hiperproductora de esta actividad (Acebal et al., 1988). Estas serán las dos características consideradas para proponer un modelo en *S. saccoboloides*.

Esta permeasa para β -diglucósidos es la vía por la cual ingresa la celobiosa (y otros β -disacáridos, como soforosa y lactosa) y su actividad se relaciona con la vía de inducción.

La permeasa y la β -glucosidasa compiten por un sustrato común: la celobiosa. En alta concentración, la celobiosa es clivada por la β -glucosidasa, generando glucosa: es un represor y no hay inducción. En baja concentración (por ejemplo en el inicio de la degradación) la celobiosa escapa a la hidrólisis e ingresa a la célula en forma de dímero (dados el K_m y V_{max} de la enzima y la permeasa), bajo esas condiciones se da la inducción (Fristcher et al., 1990; Kubicek et al., 1993b). La inhibición de la β -glucosidasa por nojirimicina, resulta en alta inducción con celobiosa, confirmando el modelo. Cabe aclarar que las conclusiones de otros trabajos lo desestiman (Ilmen et al., 1997), pero los resultados no son realmente contradictorios con el mismo.

Curiosamente el "inductor soluble" de *T.reesei* (soforosa) reprime fuertemente la β -glucosidasa. En *S. saccoboloides* la celobiosa tiene ese mismo efecto. Además induce pobremente a la CMCasa. Todos estos datos son coherentes con la existencia del propuesto mecanismo de ingreso de celobiosa. De existir esta permeasa se explica porqué *S.saccoboloides* responde diferente a celobiosa que a glucosa: puede distinguir qué hay en el medio externo. Si no entra nada por la permeasa hay solamente glucosa, si entra algo hay celobiosa (aunque parte de ella se convierta en glucosa y actúe como tal).

Esto sirve también para explicar el efecto inductor de la lactosa. Como es mal sustrato de la β -glucosidasa es posible pensar que ingresa al sistema. El exceso de lactosa, entonces, nunca sería represor, porque el mecanismo de entrada se saturaría a baja concentración, y también porque muy poca cantidad se hidrolizaría a glucosa y galactosa.

La lactosa, entonces, actuaría como un análogo de la celobiosa.

En presencia de lactosa y celulosa ocurre algo difícil de explicar. El mecanismo antes descrito debiera funcionar igual, ya que la lactosa competiría exitosamente (por una cuestión de concentración) con la celobiosa formada por hidrólisis del polímero: el sistema se tendría que activar (por lactosa). Sin embargo no se verifica esto.

Esto lleva a pensar que la inducción por celulosa en *S. saccoboloides* podría ocurrir por dos vías simultáneas: a) un inductor soluble que ingresaría por una permeasa (lo cual implica niveles basales de exoglucanasas que hidrolicen el polímero), b) un reconocimiento superficial por contacto de la celulosa. Ambos sistemas deben estar bien regulados, la entrada de lactosa causaría un efecto negativo por alterar el funcionamiento normal.

El modelo de un reconocimiento superficial de la celulosa ya fue propuesto en *T. reesei* (Binder y Ghose, 1978) y se descartó (Kubicek, 1987) ya que, curiosamente, no hallaron inducción con celulosa en cultivos de reemplazo, afirmándose la idea de que es la soforosa el inductor real.

Es posible que *T. reesei* el sistema de reconocimiento exista (con un funcionamiento similar al salvaje, es decir relativamente poco activo en comparación a la otra vía). Este hongo es particularmente sensible a la presencia de un inductor soluble: la inducción por la vía de contacto quedaría enmascarada por la inducción por soforosa. El hecho de que la soforosa sólo sea inductor en *T. reesei* (Mandels et al., 1962), apoya la posición de no considerar a los mecanismos regulatorios descritos en este mutante como universales.

En este contexto es razonable proponer que en *S. saccharoboloides* (y quizás en muchos otros hongos) exista un mecanismo de reconocimiento por contacto de celulosa, el cual independientemente de la permeasa, indica la existencia del sustrato en el entorno.

La mayoría de los trabajos en *T. reesei* (asumiendo que la soforosa es el inductor natural), utilizan este disacárido e interpretan los resultados como si estuviera en funcionamiento el sistema normal. Nunca se considera la idea del reconocimiento, y no se han hecho ensayos para investigarla.

En *Saccobolus saccharoboloides*, donde no se ha comprobado la existencia de esta permeasa, esta discusión es meramente especulativa. Pero, y a falta de datos comparables que refuten la idea planteada aquí, debe sostenerse la hipótesis de un camino de reconocimiento accesorio, que funcionaría conjuntamente con la permeasa (de existir ésta). Las señales transducidas irían por caminos diferentes para disparar la síntesis de enzimas. Por otra parte, existe regulación diferencial para al menos la β -glucosidasa y la endoglucanasa.

Además, hay que observar el resultado del estudio de coinducción de celulasas y xilanasas. Las celulasas se producen en muy baja cantidad en xilano, en tanto que la actividad xilanasas se induce fuertemente en celulosa (y en otros inductores de celulasas). Esto hace más consistente la hipótesis de un reconocimiento por parte del micelio hacia la celulosa.

El modelo para *S. saccharoboloides* sería el siguiente: la ruta activada por el inductor soluble (podría llamarse ruta inespecífica) responde con mayor o menor potencia (mucho en lactosa, pobre en celobiosa) a moléculas solubles (β -disacáridos ya que no hay inducción en maltosa). Esta ruta prende fuertemente algunos de los genes de celulasas y a las xilanasas (¿y quizás a otras hidrolasas? de hecho se conoce

para la familia Ascobolaceae la producción de amilasas en celulosa). Esta ruta sería el mecanismo "amplio"

La ruta "específica" se prendería vía reconocimiento de celulosa, por eso se entiende la falta de inducción en xilano (no hay ni disacárido inductor ni polímero adecuado).

¿Por qué la lactosa estimula eficientemente la ruta amplia? La máxima respuesta de esta ruta debiera depender de la formación de celobiosa "producto" (la que se da a partir de la hidrólisis del polímero). Dado que la lactosa (un análogo) no "desaparece", la permanencia del "inductor" sería el factor responsable del efecto positivo.

La diferencia relativa de intensidades de bandas entre lactosa y celulosa da un dato para explicar la interacción negativa.

Las bandas 48.1, 57.5 y sobre todo la 27.3 son fuertes en celulosa: alguna/s de ellas sería/n la/s activada/s en la ruta "específica". También, pero suave, aparece la banda 5.6.

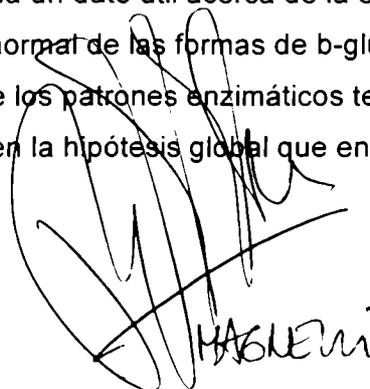
Viendo el patrón en lactosa puede deducirse esto: las bandas 5.6 y 48,1 que son fuertes (curiosamente las que aparecen en xilano) son las que corresponden, entonces, a activación "amplia".

Evidentemente cualquiera de ellas, según la condición, puede expresarse menos. La activación de ambas rutas en condiciones normales resulta en una producción óptima de enzimas. La presencia permanente del "inductor" soluble, junto a la señal de celulosa presente, sería "interpretada" por el mecanismo regulatorio como una condición en que se debe reprimir, al menos en parte, la producción del sistema.

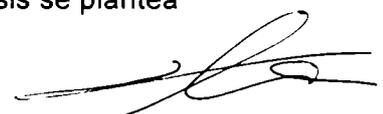
Este modelo es interesante porque es novedoso y además porque es posible someterlo a prueba. Se podría estudiar si existe inducción con celobiosa estando inhibida la β -glucosidasa: de ser así, y según el criterio de Fristcher et al., (1990), se tendría una fuerte evidencia de la existencia de la permeasa. Además el uso de estos inhibidores serviría para interpretar el efecto de la lactosa (sola o en combinación).

Como se postula para *T.reesei* que la β -glucosidasa de membrana o pared es necesaria para la síntesis del inductor real (Kubicek, 1987; Mishra et al., 1989; Strauss y Kubicek, 1990) el bloqueo de la misma en cultivos de *S. saccharoboloides* en celulosa (adicionada o no con celobiosa) daría un dato útil acerca de la existencia del mecanismo postulado y/o acerca de la función normal de las formas de β -glucosidasa de pared.

Finalmente un estudio profundo de los patrones enzimáticos terminaría por arrojar los datos que confirmasen o descartasen la hipótesis global que en esta Tesis se plantea como cierre a su discusión general.



M. Hagueni



bibliografía

- ABRAHÃO NETO J., ROSSINI C.B.H., EL-GOGARY S., HENRIQUE SILVA F., CRIVELLARO O. y EL-DORRY H. 1995.** Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. Biochemistry 34: 10456-10462.
- ACEBAL C., CASTRILLÓN M.P. y ESTRADA P. 1988.** Endoglucanase and β -glucosidase location in *Trichoderma reesei* QM9414 growing on different carbon sources. Biotechnol. Appl. Biochem. 10: 1-5
- AKIBA S., KIMURA Y., YAMAMOTO K. y KUMAGAI H. 1995.** Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. J. Ferm. Bioeng. 79: 125-130.
- ALBERSHEIM P. 1976.** The primary cell wall. En: Plant Biochemistry, 3° edición. Bonner & Vanner (eds). Academic press, New York.
- ALCONADA T.M. 1992.** Enzimas de *Fusarium oxysporum f.sp. melonis* involucradas en la degradación de la pared celular de las plantas superiores. Tesis Doctoral. FCEyN. Universidad de Buenos Aires.
- ANDREWS A.T. 1986.** Electrophoresis. Theory, techniques and biochemical and clinical applications. Oxford Univ. Press.
- BAHKALI A.H. 1995.** Production of cellulase, xylanase and polygalacturonase by *Verticillium tricorpus* on different substrates. Biores. Technol. 51: 171-174.
- BARR B.K., HSIEH Y.L., GANEM B. y WILSON D.B. 1996.** Identification of two functionally different classes of exocellulases. Biochemistry 35: 586-592.
- BATH M., GAIKWAD J.S. y MAHESHWARI R. 1993.** Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* and its influence on cellulase activity. J. Gen. Microbiol. 139: 2825-2832.
- BEGUIN P. 1983.** Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using Congo Red-sained agar replicas. Anal. Biochem. 131: 333-336.
- BEGUIN P. 1990.** Molecular biology of cellulose degradation. Annu. Rev. Microbiol. 44: 219-248.
- BINDER A. y GHOSE T.K. 1978.** Adsorption of cellulose by *Trichoderma viride*. Biotechnol. Bioeng. 20: 1187-1199.
- BISARIA V.S. y GHOSE T.K. 1981.** Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme Microb. Technol. 3: 90-104.
- BISARIA V.S., NANDA M. y GHOSE T.K. 1986.** Effect of L(-)sorbose on the release of β -glucosidase by *Trichoderma reesei* QM9414. J. Gen. Microbiol. 132: 973-978.
- BLACKWELL J. 1982.** The macromolecular organization of cellulose and chitin. En: cellulose and other natural polymer systems. Biogenesis, structure and degradation. Brown RM (ed). Plenum Press, New York.
- BORNEMAN S. y AKIN D.E. 1994.** The nature of anaerobic fungi and their polysaccharide degrading enzymes. Mycoscience 35: 199-211.
- BRADFORD M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72: 248-254.

- CAI Y.J., BUSWELL J.A. y CHANG S.T. 1994.** Production of cellulases and hemicellulases by the straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Mycol. Res.* 98: 1019-1924.
- CANEVASCINI G., COUDRAY M., REY R.J., SOTHGATE R.J. y MEIER H. 1979.** Induction and catabolite repression of cellulase synthesis in the thermophilic fungus *Sporotrichum termophile*. *J. Gen. Microbiol.* 110: 291-303.
- CANEVASCINI G., FRACHEBOUD D. y MEIER H. 1983.** Fractionation and identification of cellulases and other extracellular enzymes produced by *Sporotrichum (Chrisosporium) thermophile* during growth on cellulose or cellobiose. *Can. J. Microbiol.* 29: 1071-1080.
- CARLE URIOSTE J.C., ESCOBAR VERA J., EL-GOGARY S., HENRIQUE SILVA F., TORIGOI E., CRIVELLARO O., HERRERA ESTELLA A. y EL-DORRY H. 1997.** Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *J. Biol. Chem.* 272: 10169-10174.
- CARLILE M.J. 1995.** The success of the hypha and mycelium. En: The growing fungus. Gow y Gadd (eds). Chapman & Hall, London.
- CARPITA N.C y GIBEAUT D.M. 1993.** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1-30.
- CHANG, P.L.Y. y TREVITHICK J.R. 1972.** Release of wall bound invertase and threalase in *Neurospora crassa* by hydrolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* 70: 13-22.
- CHAUDHURI B.K. y SAHAI V. 1993a.** Production of cellulase enzyme from lactose in batch and continuous cultures by a partially constitutive strain of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.* 15 : 513-518.
- CHAUDHURI B.K. y SAHAI V. 1993b.** Production of cellulases using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on lactose in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 194-196.
- CHEN S y WAYMAN M. 1993.** Use of sorbose to enhance cellobiase activity in a *Trichoderma reesei* cellulase system produced on wheat hydrolysate. *Biotechnol. Tech.* 7: 345-350.
- CHOW C.M., YAGUE E., RAGUZ S., WOOD D.A. y THURSTON C.F. 1994.** The cel3 gene of *Agaricus bisporus* codes for a modular cellulase and is transcriptionally regulated by the carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2779-2785.
- CHRISTAKOPOULOS P., KEKOS D., MACRIS B.J., CLAEYSSSENS M. y BATH M.K. 1996.** Purification and characterization of a major xylanase with cellulase and transferase activities from *Fusarium oxysporum*. *Carbohydr. Res.* 289: 91-104.
- CHRISTAKOPOULOS P., KEKOS D., KOLISIS F.N. y MACRIS B.J. 1995.** Controlling simultaneous production of endoglucanase and β -glucosidase by *Fusarium oxysporum* in submerged culture. *Biotechnol. Lett.* 17: 883-888.
- CLAEYSSSENS M., VAN TILBEURGH H., KAMERLING J.P., BERG J., VRSANSKA M. y BIELY P. 1990.** Studies of the cellulolytic system of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* QM9414. Substrate specificities and transferase activity of endoglucanase 1. *Biochem. J.* 270: 251-256.
- COTORAS M. y AGOSIN E. 1992.** Regulatory aspects of endoglucanase production by the Brown-Rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Exp. Mycol.* 16: 253-260.

COUGHLAN M.P. y LJUNGDAHL L.G. 1988. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. En: *Biochemistry and Genetics of cellulose degradation*. 43° FEMS Symposium. Aubert, Béguin y Millet (eds). Academic Press, New York.

CROOK E.M. y STONE B.A. 1957. The enzymic hydrolysis of β -glucosides. *Biochemistry* 65: 1-12.

DEKKER R.F.H. 1981. Induction localization and characterization of β -glucosidases produced by a species of *Monilia*. *J. Gen. Microbiol.* 127: 177-184.

DENNINSON D. A. y R. D. KOHEN. 1977. Cellulase activity of *Poronia oedipus*. *Mycologia* 69: 592-603.

DESROCHES M., JURASEK L. y PAICE M.G. 1980. High production of β -glucosidase in *Schizophyllum commune*: Isolation of the enzyme and effect of the culture filtrate on cellulose hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 222-228.

DOWZER C.E.A. y KELLY J.M. 1991. Analysis of the creA gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* 11: 5701-5709.

EGGINS H. y ALLOP D. 1974. Biodeterioration and biodegradation. In *The filamentous fungi* Vol1. J.E.Smith & D.R.Berry Eds.

EL-DORRY H., CRIVELLARO O., LEITE A., ABRAHÃO NETO J., HENRIQUE SILVA F., ESCOBAR VERA J., MATHEUCCI JR. E., CARLE URIOSTE J.C., PEREIRA G.G., CARRARO PEREIRA D.M. y EL-GOGARY S. 1996. Transcriptional control of the cellulase genes in *Trichoderma reesei*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 905-909.

EL-GOGARY S., LEITE A., CRIVELLARO O., EVELEIGH D.E. 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.

ELLOUZ-CHABOUNI S., BELGUITH H., HASSARI I., M'RAD K. y ELLOUZ R. 1995. Optimization of cellulase production by *Penicillium occitanis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 267-269.

ENARI T.M. y NIKU-PAAVOLA M.L. 1986. Enzymatic hydrolysis of cellulose: is the current theory of the mechanisms of hydrolysis valid?. *Crit. Rev. Biotechnol.* 5: 67-87.

EVELEIGH D.E., BOK J.D., EL-DORRY H., EL-GOGARY S., ELLISTON K., GOYAL A., WALDRON C., WRIGHT R. y WU Y.M. 1995. Cellulase lessons revealed through the microbe's perspective. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51-52: 169-177.

FAHRNICH P. y IRRGANG K. 1982. Some characteristics of the cellulolytic enzyme system of *Chaetomium cellulolyticum*. *Biotechnol. Lett.* 4: 519-524.

FEVRE M. 1977. Subcellular localization of glucanase and cellulase in *Saprolegnia monoica* Pringsheim. *J. Gen. Microbiol.* 103: 287-295.

FOWLER T. y BROWN R.D. 1992. The bgl1 gene encoding extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex. *Mol. Microbiol.* 6: 3225-3235.

FREER S. y GREENE R. 1990. Transport of glucose and cellobiose by *Candida wickerhamii* and *Clavispora lusitaniae*. *J. Biol. Chem.* 265: 12864-12868.

FREY WYSSLING A. 1976. The plant cell wall. En: *Handbuch der Pflanzenanatomic*. vol 3. Gebrüder Borntraeger, Berlin.

- FRITSCHER C., MESSNER R. y KUBICEK CP. 1990.** Cellobiose metabolism and cellobiohydrolase I biosynthesis by *Trichoderma reesei*. Exp. Mycol. 14: 405-415.
- GADGIL N.J., DAGINAWALA H.F., CHAKRABARTI T. y KHANNA P. 1995.** Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma reesei*. Enzyme Microb. Technol. 17: 942-946.
- GAIKWAD J. y MAHESHWARI R. 1994.** Localization and release of β -glucosidase in the thermophilic and cellulolytic fungus *Sporotrichum thermophile*. Exp. Mycol. 18: 300-310.
- GANJU R.K., VITHAYATHIL P.J. y MURHTY S.K. 1990.** Factors influencing production of cellulases by *Chaetomium thermophile var. coprophile*. Indian J. Exp. Biol. 28: 259-264.
- GARZILLO A.M.V., DI PAOLO S., RUZZI M. y BUONOCORE V. 1994.** Hydrolytic properties of extracellular cellulases from *Pleurotus ostreatus*. Appl Microbiol. Biotechnol. 42: 476-481.
- GHOSH A., GHOSH B.K., TRIMINO VAZQUEZ H., EVELEIGH D.E. y MONTENECOURT B.S. 1984.** Cellulase secretion from a hyper-cellulolytic mutant of *Trichoderma reesei* Rut-C30. Arch. Microbiol. 140: 126-133.
- GLENN M., GHOSH A. y GHOSH B.K. 1985.** Subcellular fractionation of a hypercellulolytic mutant *Trichoderma reesei* Rut C30: Localization of endoglucanase in microsomal fraction. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1137-1143.
- GOLLER S.P., SCHOISSWOHL D., BARON M., PARRICHE M. y KUBICEK C.P. 1998.** Role of endoproteolytic dibasic proprotein processing in maturation of secretory proteins in *Trichoderma reesei*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3202-3208.
- GOMES D.J., GOMES J. y STEINER W. 1994.** Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus auranticus* and partial characterization of the enzyme. J. Biotechnol. 37: 11-22.
- GONZALEZ R., PEREZ GONZALEZ J.A., GONZALEZ CANDELAS L. y RAMON D. 1994.** Transcriptional regulation of the *Trichoderma longibranchiatum* egl1 gene. FEMS Microbiol. Lett. 122: 303-307.
- GOTTSCHALK G. 1988.** Cellulose degradation and the carbon cycle. En: Biochemistry and Genetics of cellulose degradation. 43^o FEMS Symposium. Aubert, Béguin y Millet (eds). Academic Press, New York.
- HAAB D., HAGSPIEL K., SZAKMARY K. y KUBICEK C.P. 1990.** Formation of the extracellular proteases from *Trichoderma reesei* QM9414 involved in cellulase degradation. J. Biotechnol. 16: 187-198.
- HEILER S., MENDGEN K. y DEISING H. 1993.** Cellulolytic enzymes of the obligately biotrophic rust fungus *Uromyces viciae-fabae* are regulated differentiation-specifically. Mycol. Res. 97: 77-85.
- HENRIQUE SILVA F., EL-GOGARY S., CARLE URIOSTE J.C., MATHEUCCI JR. E., CRIVELLARO O. y EL-DORRY H. 1996.** Two regulatory regions controlling basal and cellulose-induced expression of the gene encoding cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei* are adjacent to its TATA box. Biochem. Biophys. Res. Communications 228: 229-237
- HENRISSAT B. 1991.** A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. Biochem. J. 280: 309-316.

- HENRISSAT B. y BAIROCH A. 1993.** New families in the clasification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence simmlarities. Biochem J. 293: 781-788.
- HOH Y.K. y YEOH H.H. 1993.** Isolation and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus nidulans* mut usdb1183. World J. Microbiol. Biotechnol. 9: 555-558.
- HRMOVA M., PETRAKOVA E. y BIELY P. 1991.** Induction of cellulose and xylan degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. J. Gen. Microbiol. 137: 541-547.
- HULME M.A. y STRANKS D.W. 1971.** Regulation of cellulase production by *Myrothecium verrucaria* grown on noncellulosic substrates. J. Gen. Microbiol. 69: 145-155.
- IKOTUN T. 1984.** Cell-wall degrading enzymes produced by *Penicillium oxalicum* Curie et Thom. Mycopathologia 88: 15-21.
- ILMEN M., ONNELA M.L., KLEMSDAL S., KERANEN S. y PENTTILA M. 1996a.** Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Mol. Gen. Genet. 253: 303-314.
- ILMEN M., THRANE C. y PENTTILA M. 1996b.** The glucose repressor gene cre1 of *Trichoderma*: isolation and expression of a full length and truncated mutant form. Mol. Gen. Genet. 251: 451-460.
- ILMEN M., SALOHEMIO A., ONNELA M.L. y PENTTILA M. 1997.** Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1298-1306.
- JACKSON M.A. y TALBURT D.E. 1988.** Mechanism for β -glucosidase release into cellulose-grown *Trichoderma reesei* culture supernatants. Exp. Mycol 12: 203-216.
- JENNINGS D.H. 1995.** Carbon polymer utilisation (Chap. 5C). En: The physiology of fungal nutrition. Cambridge University Press.
- KANG S.W., KIM S.W. y LEE J.S. 1995.** Production of cellulase and xylanase in a bubble column using immobilized *Aspergillus niger* KKS. Appl. Biochem. Biotechnol. 53: 101-106.
- KAVANAGH F. 1972,** (Ed), Analytical Microbiology. Chapter 2: Diffusion assays. Academic Press, N.Y.
- KLEMAN LEYER K., AGOSIN E., CONNER A.H. y KIRK T.K. 1992.** Changes in molecular size distribution of cellulose during attack by white-rot fungi and brown-rot fungi. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1266-1270.
- KLEMAN LEYER K., SIIKA AHO M., TEERI T.T. y KIRK T.K. 1996.** The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2883-2887.
- KOLAR H., MISCHAK H., KAMMEL W.P. y KUBICEK C.P. 1985.** Carboxymethylcellulase and β -glucosidase secretion by protoplasts of *Trichoderma reesei*. J. Gen. Microbiol. 131: 1339-1347.
- KUBICEK C.P. 1982a.** β -glucosidase excretion by *Trichoderma pseudokoningii*: Correlation with cell wall bound β -1,3 glucanase activity. Arch. Microbiol. 132: 349-354.

- KUBICEK C.P. 1982b.** β -glucosidase excretion in *Trichoderma* strains with different cell wall bound β -1,3 glucanase activities. Can. J. Microbiol. 29: 163-169.
- KUBICEK C.P. 1987.** Involvement of a conidial endoglucanase and plasma-membrane-bound β -glucosidase in the induction of endoglucanase synthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. J. Gen. Microbiol. 133: 1481-1487.
- KUBICEK C.P., MÜHLBAUER G., KLOTZ M., JOHN E. y KUBICEK PRANZ E.M. 1988.** Properties of a conidial-bound cellulase enzyme system from *Trichoderma reesei*. J. Gen. Microbiol. 134: 1215-1222.
- KUBICEK C.P., MESSNER R., GRUBER F., MACH R.L. y KUBICEK PRANZ E.M. 1993a.** The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. Enzyme Microb. Technol. 15: 90-99.
- KUBICEK C.P., MESSNER R., GRUBER F., MANDELS M. y KUBICEK PRANZ E.M. 1993b.** Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. Involvement of a constitutive, sophorose-inducible, glucose-inhibited β -diglucoside permease. J. Biol. Chem. 268: 19364-19368.
- KUBICEK C.P., BOLZLBAUER U.M., KOVACS W., MACH R.L., KUHL S. K., LIECKFELDT E., BOERNER T. y SAMUELS G.J. 1995.** Cellulase formation by species of *Trichoderma sect. Longibranchiatum* and of *Hypocrea spp.* with anamorphs referable to *Trichoderma sect. Longibranchiatum*. Fungal Genet. Biol. 20: 105-115
- KWON K.S., LEE J.H. y HAH Y.C. 1996.** Differential carbon catabolite repression of two intracellular β -glucosidases in *Aspergillus nidulans*. Mycol. Res. 101: 473-476.
- KYRIACOU A., MACKENZIE C.R. y NEUFELD R.J. 1987.** Detection and characterization of the specific and nonspecific endoglucanase of *Trichoderma reesei*: evidence demonstrating endoglucanase activity by cellobiohydrolase II. Enzyme. Microb. Technol. 9: 25-32.
- LAYMON R.A., ADNEY W.S., MOHAGHEGHI A., HIMMEL M.E. y THOMAS S.R. 1996.** Cloning and expression of full-length *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I cDNAs in *Escherichia coli*. Appl. Biochem. Biotechnol. 57-58: 389-397.
- LEE J.H., KWON K.S. y HAH Y.C. 1996.** Regulation of β -glucosidase biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol. Lett. 135: 79-84.
- LEVIN L.N. y FORCHIASSIN F. 1995.** Influencia de fuentes carbonadas y nitrogenadas sobre la actividad celulolítica de *Trametes trogii*. Rev. Arg. Microbiol. 27: 11-20.
- LEVIN L.N., SÍVORI A.S. y PARDO A.G. 1996.** Actividad celulolítica de hongos coprófilos. Rev. Argent. Microbiol. 28: 132-138.
- LODHA, B.C. 1974.** Decomposition of digested litter. In: Dickinson, C. H. & G. F. H. Pugh (Eds.) Biology of plant litter decomposition. Acad. Press. New York.
- MA D.B., GAO P.J. y WANG Z.N. 1990.** Preliminary studies on the mechanism of cellulase formation by *Trichoderma pseudokoningii* S-38. Enzyme Microb. Technol. 12: 631-635.
- MACH R.L., SEIBOTH B., MYASNIKOV A., GONZALEZ R., STRAUSS J., HARKKI A.M. y KUBICEK C.P. 1995.** The *bgl1* gene of *Trichoderma reesei* QM9414 encodes an extracellular, cellulose-inducible β -glucosidase involved in cellulase induction by sophorose. Mol. Microbiol. 16: 687-697.

- MACKENZIE D.A., JEENES D.G., BELSHAW N.J. y ARCHER D.B. 1993.** Regulation of secreted proteins production by filamentous fungi: recent developments and perspectives. J. Gen. Microbiol. 139: 2295-2307.
- MAGNELLI P.E., RAMOS A.M. y FORCHIASSIN F. 1996.** Factors influencing cellulase production by *Saccobolus saccoboloides*. Mycologia 88: 249-255.
- MAGNELLI P.E., MARTINEZ A.O. y MERCURI O.A. 1997.** Método simple para determinar actividad celulolítica en hongos. Rev. Argent. Microbiol. 29: 210-214.
- MANDELS M. y REESE E.T. 1957.** Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. J. Bacteriol. 73: 269-278.
- MANDELS M. y REESE E.T. 1960.** Induction of cellulase in fungi by cellobiose. J. Bacteriol. 79: 816-826.
- MANDELS M., PARRISH F.W. y REESE E.T. 1962.** Sophorose as an inducer of cellulose in *Trichoderma viride*. J. Bacteriol. 83: 400-408.
- MANDELS M., WEBER J. y PARIZEK R. 1971.** Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. Appl. Microbiol. 21: 152-154.
- MANNING K. y WOOD D.A. 1983.** Production and regulation of extracellular endocellulase by *Agaricus bisporus*. J. Gen. Microbiol. 129: 1839-1847.
- MARKHAM P. y BAZIN M.J. 1990.** Decomposition of cellulose by fungi. En: Handbook of applied mycology, vol1. Arora et al. (eds). Marcel Dekker Inc., New York.
- McHALE A. y COUGHLAN M.P. 1981.** The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*, identification of the various components produced during growth on cellulosic media. Biochim. Biophys. Acta 662: 145-151.
- MENON K., RAO K.K. y PUSHALKAR S. 1994.** Production of β -glucosidase by *Penicillium rubrum* O.Stoll. Indian. J. Exp. Biol. 32: 706-709.
- MERCURI O.A. 1987a.** Degradación biológica de celulosa por *Ascobolus furfuraceus*. Tesis Doctoral. FCEyN. Universidad de Buenos Aires.
- MERCURI O.A. 1987b.** Macromorphological patterns of cellulolytic fungi growing in vitro. Nova Hedwigia 44: 465-472.
- MERCURI O.A. 1994 (1996).** Efecto de las condiciones de cultivo sobre la degradación de celulosa cristalina por *Ascobolus furfuraceus*. Physis secc.C 52: 1-6.
- MERCURI O.A. y DIORIO L.A. 1995.** Evaluación de la capacidad celulolítica de *Ascobolus furfuraceus* (fungi, Ascomycotina). Rev.Argent. Microbiol. 27: 130-138.
- MERCURI O.A. 1996a.** Efecto del ion bicarbonato sobre la degradación de celulosa por *Ascobolus furfuraceus* (fungi, Ascomycotina). Rev.Argent. Microbiol. 31: 221-224.
- MERCURI O.A. 1996b.** Cinética de crecimiento y degradación de celulosa por *Ascobolus furfuraceus* (fungi, Ascomycotina) empleando nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. Rev. Argent. Microbiol. 31: 173-175.
- MESSNER R., HAGSPIEL K. y KUBICEK C.P. 1990.** Isolation of a β -glucosidase binding and activating polysaccharide from cell walls of *Trichoderma reesei*. Arch. Microbiol. 154: 150-155.
- MESSNER R. y KUBICEK C.P. 1991.** Carbon source control of cellobiohydrolase I and II formation by *Trichoderma reesei*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 630-635.

- MESSNER R., KUBICEK PRANZ E.M., GSUR A. y KUBICEK C.P. 1991.** Cellobiohydrolase II is the main conidial-bound cellulase in *Trichoderma reesei* and other *Trichoderma* strains. Arch. Microbiol. 155: 601-606.
- MISHRA S., RAO S. y DEB J.K. 1989.** Isolation and characterization of a mutant of *Trichoderma reesei* showing reduced levels of extracellular β -glucosidase. J. Gen. Microbiol. 135: 3459-3465.
- MITRA G. y BACHHAWAT B.K. 1997.** Enhanced in vivo catalytic activity of PEG-modified cellulase complex from *Trichoderma reesei*. Biochem. Mol. Biol. Int. 42: 93-102.
- MORRIN M. y WARD O.P. 1990.** Relationships between fungal growth, morphology and fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus*. Mycol. Res. 94: 505-510.
- MURAI T., UEDA M., ATOMI H., SHIBASAKI Y., KAMASAWA N., OSUMI N., KAWAGUCHI T., ARAI M. y TANAKA A. 1997.** Genetic immobilization of cellulase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 499-503.
- NANDA M., BISARIA V.S. y GHOSE T.K. 1981.** Localization and release mechanism of cellulases in *Trichoderma reesei* QM9414. Biotechnol. Lett. 4: 633-638.
- NELSON N.J. 1944.** A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biochem. 153: 375-380.
- NEVALAINEN H., LAVYGINA I., NEETHLING D. y PACKER N. 1995.** The biochemical nature of the cell envelope of a high cellulase-secreting mutant differs from that of the *Trichoderma reesei* wild-type. J. Biotechnol. 42: 53-59.
- NISIZAWA T., SUZUKI H. y NISIZAWA K. 1971.** *De novo* synthesis of cellulase induced by sophorose in *Trichoderma viride* cells. J. Biochem. 70: 387-393.
- NISIZAWA T., SUZUKI H. y NISIZAWA K. 1972.** Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. J. Biochem. 71: 999-1007.
- OGUNTMEIN G.B. y MOO-YOUNG M. 1991.** Production and properties of β -glucosidase by *Neurospora sitophila*. World J. Microbiol. Biotechnol. 7: 4-11.
- ORPIN C.G. 1981.** Isolation of cellulolytic phycomycete fungi from the caecum of the horse. J. Gen. Microbiol. 123: 287-296.
- OSAGIE I.J. y OBUKWE C.O. 1991.** Extracellular hydrolytic enzyme production by pathogenic strains of *Fusarium oxysporum f.sp. elaeidis*. Mycol. Res. 95: 116-122.
- PANDEY A. 1992.** Recent process developments in solid-state fermentation. Process Biochem. 27: 109-117.
- PARDO A.G. y FORCHIASSIN F. 1994.** Inducción-represión de la actividad celolítica en *Nectria catalinensis*. Bol. Soc. Argent. Bot. 1-2: 43-49.
- PARDO A.G. y MAGNELLI P.E. 1996.** Inducción de endoglucanasa en *Nectria catalinensis* con distintas fuentes de carbono. Rev. Argent. Microbiol. 28: 182-189.
- PARDO A.G., SIVORI A.S. y RANALLI M.E. 1997.** Comparative study of cellulolytic enzyme zymograms of species of *Thecoteus* and *Iodophanus* (Pezizales- Ascomycetes). Mycotaxon 63l: 269-286.
- PARK D. 1975.** Carbon and nitrogen levels as factors influencing fungal decomposers. En: The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition processes. The 17th Symposium of the British Ecological Society. Anderson J.M. y Macfadyen A. (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- PEREZ GONZALEZ J.A., GONZALEZ R., QUEROL A., SENDRA J. y RAMON D. 1993.** Construction of a recombinant wine yeast strain expressing β -(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2801-2806.
- PUSHALKAR S., RAO K.K. y MENON K. 1995.** Production of β -glucosidase by *Aspergillus terreus*. Current Microbiol. 30: 255-258.
- RAMOS A.M. y FORCHIASSIN F. 1996.** Producción de endoglucanasa en cuatro especies del género *Saccobolus*. Rev. Argent. Microbiología 28: 55-62.
- RAMOS A.M. y FORCHIASSIN F. 1998.** Análisis comparativo de los patrones isoenzimáticos de β -1,4 endoglucanasa en especies del género *Saccobolus* (Ascobolaceae-Pezizales). Rev. Argent. Microbiología 30: 130-137.
- REESE E.T., SIU R.G.H. y LEVINSON H.S. 1950.** The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. J. Bacteriol., 59: 485-497.
- REESE E.T. y LEVINSON H.S. 1952.** A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms. Physiol. Plantarum 5: 345-366.
- RHO D., DESROCHES M., JURASEK L., DRIGUEZ H., DEFAYE J. 1982.** Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*. Tiocellobiose as a new inducer. J. Bacteriol 149: 47-53.
- RIOU C., FREYSSINET G. y FEVRE M. 1991.** Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1478-1484.
- RIOU C., SALMON J.M., VALLIER M.J., GÜNATA Z y BARRE P. 1998.** Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3607-3614.
- ROBERTSON L.D. y KOHEN D. 1978.** Characteristics of cellulase produced by the ascomycete *Poria punctata*. Mycologia 70: 1113-1121.
- ROUVINEN J, BERGFORS T., TEERI T., KNOWLES J.K.C. Y JONES T.A. 1990.** Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. Science 249: 380-386.
- ROYER J.C. y NAKAS J.P. 1990.** Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibranchiatum*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2535-2539.
- RYU D.D.Y. y MANDELS M. 1980.** Cellulase: biosynthesis and applications. Enzyme Microb. Technol. 2: 91-101.
- SAKAMOTO S., TAMURA G., KITO K., ISHIKAWA T., IWANO K. y NISHIYA N. 1995.** Cloning and sequencing of cellulase cDNA from *Aspergillus kawachii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Current Genet. 27: 435-439.
- SALOHEIMO M., NAKARI-SETALA T., TENKANEM M. y PENTTILA M. 1997.** cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. Eur. J. Biochem. 249: 584-591.
- SANCHEZ M.E., DE TROYA M.T. y NAVARRETE A. 1995.** Analysis of the cellulolytic activity of blue-stain fungi of wood. Rev. Iberoam. Micol. 12: 36-37.

- SANCHEZ TORRES P., GONZALEZ R., PEREZ GONZALEZ J.A., GONZALEZ CANDELAS L. y RAMON D. 1994.** Development of a transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use for constructing multicopy transformants for the *egl1* gene. Appl. Environ. Microbiol. 41: 440-446.
- SANDHU D.K. y KALRA M.K. 1985.** Effect of cultural conditions on production of cellulases in *Trichoderma longibrachiatum*. Trans. Br. mycol. Soc. 84: 251-258.
- SANDHU D.K. y PURI R. 1988.** The developmental patterns of endo- β -1,4-glucanase and β -glucosidase of *Chaetomium erraticum*. Can J. Bot. 66: 2162-2166.
- SANYAL A., KUNDU R.K., SINHA S.N. y DUBE D.K. 1988.** Extracellular celluolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus*: 1 effect of different carbon sources. Enzyme Microb. Technol. 10: 85-90.
- SCHAUWECKER F., WANNER G. y KAHMANN R. 1995.** Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. Biological Chemistry Hoppe-Seyler 376: 617-625.
- SCHMID G. y WANDREY C. 1990.** Evidence of the lack of exo-cellobiohydrolase activity in the cellulase system of *Trichoderma reesei* QM9414. J. Biotechnol. 14: 393-410.
- SEIBOTH B., MESSNER R., GRUBER F. y KUBICEK C.P. 1992.** Disruption of the *Trichoderma reesei* *chb2* gene coding for cellobiohydrolase II leads to a delay in the triggering of cellulase formation by cellulose. J. Gen. Microbiol. 138: 1259-1264.
- SEIBOTH B., HAKOLA S., MACH R.L., SUOMINEN P.L. y KUBICEK C.P. 1997.** Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. J. Bacteriol 179: 5318-5320.
- SENGUPTA S., GHOSH A.K. y SENGUPTA S. 1991.** Purification and characterization of a β -glucosidase (cellobiase) from a mushroom *Termitomyces clypeatus*. Biochim. Biophys. Acta 176: 215-220.
- SENGUPTA S. y SENGUPTA S. 1990.** Regulation by aminoacids of α -amylase and endo β -(1-4) glucanase induction in mycelial culture of the mushroom *Termitomyces clypeatus*. Can. J. Microbiol. 36: 617-624.
- SHEWALE J.G. y SADANA J.C. 1978.** Cellulase and β -glucosidase production by a Basidiomycete species. Can. J. Microbiol. 24: 1204-1216.
- SIMMONS E.G. 1977.** 2nd International Mycological Congress, vol II. Bigelow y Simmons (eds). Hamilton I Newell, Amherst, MA.
- SINGH S., BRAR J.K., SANDHU D.K. y KAUR A. 1996.** Isozyme polymorphism of cellulases in *Aspergillus terreus*. J. Basic Microbiol. 36: 289-296.
- SÍVORI A. S., MERCURI O. A. y FORCHIASSIN F. 1996.** Cinética de producción de xilanasas y celulasas por *Ascobolus gamundii* (Fungi, Ascomycotina). Rev. Argent. Microbiología 28: 9-15.
- SOMOGYI M.J. 1952.** Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 159: 19-23.
- SRISODUK M., REINIKAINEN T., PENTTILA M. y TEERI T.T. 1993.** Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. J. Biol. Chem. 268: 20756-20761.

- SRISODSUK M., LEHTIO J., LINDER M., MARGOLLES CLARK E., REINIKAINEN T. y TEERI T.T. 1997.** *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I with an endoglucanase cellulose-binding domain: action on bacterial microcrystalline cellulose. J. Biotechnol 57: 49-57.
- STERNBERG D. 1976.** Production of cellulases by *Trichoderma*. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6: 35-53.
- STERNBERG D. y MANDELS G.R. 1979.** Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. J. Bacteriol. 139: 761-769.
- STERNBERG D. y MANDELS G.R. 1982.** β -glucosidase induction and repression in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. Exp. Mycol. 6: 115-124
- STEWART J. y PARRY J. 1981.** Factors influencing the production of cellulase by *Aspergillus fumigatus*. J. Gen. Microbiol. 125:33-39
- STRAUSS J. y KUBICEK C.P. 1990.** β -glucosidase and cellulase formation by a *Trichoderma reesei* mutant defective in constitutive β -glucosidase formation. J. Gen. Microbiol. 136 : 1321-1326.
- STRAUSS J., MACH R.L., ZEILINGER S., HARTLER G., STOFFER G., WOLSCHEK M. y KUBICEK C.P. 1995.** CRE1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. FEBS Lett. 376: 103-107.
- SWIFT M.J. 1975.** Species diversity and the structure of microbial communities in terrestrial habitats. En: The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition processes. The 17th Symposium of the British Ecological Society. Anderson J.M. y Macfadyen A. (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- SZAKMARY K., WOTAWA A. y KUBICEK C.P. 1991.** Origin of oxidized cellulose degradation products and mechanism of their promotion of cellobiohydrolase I biosynthesis in *Trichoderma reesei*. J. Gen. Microbiol. 137: 2873-2878.
- TAJ-ALDEEN S.J., AL-HABBEH E.K. y ABDULLAH S.K. 1990.** Cellulolytic activity of coprophilous fungi. Crypt. Bot. 2: 25-29.
- TAJ-ALDEEN S.J. y JAFFAR W.N. 1992.** Cellulase activity of a thermotolerant *Aspergillus niveus* isolated from desert soil. Mycol. Res. 96: 14-18.
- TAJ-ALDEEN S.J. 1993.** Effect of starch on the induction of β -glucosidase in *Trichoderma reesei*. Mycol. Res. 97 : 318-320.
- TEATHER R.M y WOOD P.J. 1982.** Use of Congo Red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 43: 777-780.
- TEMPELAARS C.A.M., BIRCH P.R.J., SIMS P.F.G y BRODA P. 1994.** Isolation, characterization, and analysis of the expression of the cbh II gene of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4387-4393.
- TORIGOI E., HENRIQUE SILVA F., ESCOBAR VERA J., CARLE URIOSTE J.C., CRIVELLARO O., EL-DORRY H. y EL-GOGARY S. 1996.** Mutants of *Trichoderma reesei* are defective in cellulase induction, but not basal expression of cellulase-encoding genes. Gene 173: 199-203.
- TOUSSAINT B y VIGNON M.R. 1990.** Reactions of reversion occurring with the *Trichoderma reesei* CL-847 cellulase system. Biotechnol. Lett. 12: 587-592.

- TOUZANI A. y DONECHE B. 1995.** Production and properties of the cellulase complex of *Botrytis cinerea*. Can J. Bot. 74: 486-491.
- UEMURA S., ISHIHARA S. y JELLISON J. 1993.** Differential responses of wood-rot fungi cellulases towards polyclonal antibodies against *Trichoderma viride* cellobiohydrolase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 788-794.
- UMILE C. y KUBICEK C.P. 1986.** A constitutive plasma-membrane bound β -glucosidase in *Trichoderma reesei*. FEMS Microbiol. Lett. 34: 291-295.
- VAHERI M., LEISOLA M. y KAUPPINEN V. 1979.** Transglycosylation products of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei*. Biotechnol. Lett. 1: 41-46.
- VAHERI M. 1982.** Oxidation as a part of degradation of crystalline cellulose by *Trichoderma reesei*. J. Appl. Biochem. 4: 356-363.
- VAN RENSBURG P., VAN ZYL W.H. y PRETORUIS I.S. 1998.** Engineering yeast for efficient cellulose degradation. Yeast 14: 67-76.
- VAVRA J. y JOYON L. 1966.** Etude sur la morphologie, le cycle evolutif et la position systematique de *Callimastix cyclopsis* Weisenberg 1912. Protistologica 2: 2-15.
- VINCKEN J.P., BELDMAN G. y VORAGEN A.G. 1997.** Substrate specificity of endoglucanases: what determines xyloglucanase activity? Carbohydr. Res. 298: 299-310.
- WANG D., QU Y. y GAO P. 1995.** Regulation of cellulase synthesis in mycelial fungi: participation of ATP and cyclic AMP. Biotechnol. Lett. 17: 593-598.
- WEBSTER J. 1970.** Coprophilous fungi. Trans. Br. mycol. Soc. 54: 161-180.
- WICKLOW D.T., DETROY R.W. y ADAMS S. 1979.** Differential modification of the lignin and cellulose components in wheat straw by fungal colonists of ruminant dung: ecological implications. Mycologia 72: 1065-1076.
- WICKLOW D.T. y HIRSCHFIELD B.J. 1979.** Evidence of a competitive hierarchy among coprophilous fungal population. Can. J. Microbiol 25: 855-858.
- WICKLOW D.T., ANGEL K. y LUSSENHOP J. 1980.** Fungal community expression in lagomorph versus ruminant faeces. Mycologia 73: 1015-1021.
- WICKLOW D.T. y YOCOM D.H. 1981.** Fungal species number and decomposition of rabbit faeces. Trans. Br. mycol. Soc. 76: 29-32.
- WILLICK G.E., MOROSOLI R., SELIGY V.L., YAGUCHI M. y DESROCHES M. 1984.** Extracellular proteins secreted by the basidiomycete *Schizophyllum commune* in response to carbon sources. J. Bacteriol. 159: 294-299.
- WITKAMP M. y AUSMUS B.S. 1975.** Processes in decomposition and nutrient transfer in forest systems. En: The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition processes. The 17th Symposium of the British Ecological Society. Anderson J.M. y Macfadyen A. (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- WOOD T.M. y McRAE. 1986.** The cellulase of *Penicillium pinopilum*. Synergism between enzyme components in soubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically-distinct cellobiohydrolases. Biochem. J. 234: 93-99.
- WOOD T.M. y BATH K.M. 1988.** Methods for measuring cellulase activities. In Methods in enzymology, vol 160, cap 9. Academic Press, San Diego.

- WOOD T.M., McRAE S.I. y BATH K.M. 1989.** The mechanism of fungal cellulase action. Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose. Biochem J. 260: 37-43.
- WOOD T.M. y GARCIA CAMPAYO V. 1990.** Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1: 147-161.
- XIMENES E.A., FELIX C.R. y ULHOA C.J. 1996.** Production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* and characterization of one β -glucosidase. Current. Microbiol 32: 119-123.
- YAGUE E., WOOD D.A. y THURSTON C.F. 1994.** Regulation of transcription of the cel1 gene in *Agaricus bisporus*. Mol. Microbiol. 12: 41-47.
- YAGUE E., MEHAK ZUNIC M., MORGAN L., WOOD D.A. y THURSTON C.F. 1997.** Expression of CEL2 and CEL4, two proteins from *Agaricus bisporus* with similarity to fungal cellobiohydrolase I and β -mannanase, respectively, is regulated by the carbon source. Microbiology 143: 239-244.
- YAZDI M.T., WOODWARD J.R. y RADFORD A. 1990a.** The cellulase complex of *Neurospora crassa*: activity, stability and release. J. Gen. Microbiol. 136: 313-1319.
- YAZDI M.T., WOODWARD J.R. y RADFORD A. 1990b.** Cellulase production by *Neurospora crassa*: the enzymes of the complex and their regulation. Enzyme Microb. Technol. 12: 116-119.
- YOSHIDA N., FUKUSHIMA T., SAITO H., SHIMOSAKA M. y OKAZAKI M. 1989.** Cellulase and xylan degrading enzymes of the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* SUF 850. Agric. Biol. Chem. 53: 1829-1836.
- YOSHIOKA, H. ,S. HAYASHIDA. 1980.** Purification of β -glucosidase from *Humicola insolens* YH-8. Agr. Biol. Chem. 44:1729-1735.