

## Tesis de Posgrado

# Estudio e identificación de enzimas extracelulares en *Ascobolus gamundii*

Sivori, Andrea Silvia

1999

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](http://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 doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Sivori, Andrea Silvia. (1999). Estudio e identificación de enzimas extracelulares en *Ascobolus gamundii*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3211\\_Sivori.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3211_Sivori.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Sivori, Andrea Silvia. "Estudio e identificación de enzimas extracelulares en *Ascobolus gamundii*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3211\\_Sivori.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3211_Sivori.pdf)

**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

ESTUDIO E IDENTIFICACION DE ENZIMAS  
EXTRACELULARES EN *Ascobolus gamundii*

Lic. ANDREA S. SIVORI  
Directora: Dra. FLAVIA FORCHIASSIN

TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE  
DOCTOR DE UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1999

Encontré que la vida  
era como un gran barco,  
enorme a mi lado  
y en la inmensidad del océano,  
insignificante.

Navegamos días y noches  
a lo largo de muchos años,  
buscamos y buscamos  
un espacio, isla, tierra fiel,  
que no llega,  
no encontramos nunca.

El camino es hermoso,  
pero muy largo;  
la búsqueda es continua, pero no cansa.

Sigo navegando  
entre tormentas, sol y pájaros.

Mi espíritu late  
contra todo destino,  
contra toda suerte;  
y mi barco y yo sabemos  
que el rumbo no es vano  
y que nuestra fuerza no es locura.

En el espacio que nos rodea  
solo hay horizonte,  
en mi camino, esperanzas;  
el gran día se acerca,  
pero el puerto ...

Todavía es distancia.

*Andrés Sturla.*

*A la memoria de mi padre,  
Y a la grandeza de mi mamá.*

## AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias Flavia, por estar siempre dispuesta y brindarme tu ayuda y experiencia. Y muchas más gracias aún, por insistir...!

Muchas gracias María Esther, Marce, Diana, Luisito y Oscar, por hacer que estos años sean imborrables, en el laboratorio 8, muchas veces nuestro segundo hogar.

Muchas gracias Frachia, Pauli, Alex y Pepa, el "Dream Team" de Botánica, insuperable !

Muchas gracias Ale, Matías, Ramiro, Leandro por la buena onda y tiempo compartido.

Muchas gracias a Mercedes y Bruna por su colaboración diaria y buena disposición !

Muchas gracias a todos los "vecino y vecinas", porque hasta me da pena terminar !

Muchas gracias Andrés Sturla por tu inspiración en la clase de Albertito !

Muchas gracias a toda mi familia, por la confianza, el apoyo y otros pormenores !

Muchas gracias a CONICET y a la UBA por las becas y subsidios otorgados.

Muchas gracias a todos mis amigos, que los quiero tanto, a festejar !!



Andrea S. Sivori

## Resumen

Se estudió la capacidad de *Ascobolus gamundii* (Pezizales, Ascomycetes) para producir enzimas degradativas extracelulares in "vitro".

Luego de analizar el patrón enzimático producido en medios sintéticos líquidos, se concluyó que *A. gamundii* es un hongo coprófilo productor de enzimas celulolíticas, xilanolíticas y amilolíticas.

Los tres complejos enzimáticos estudiados son inducibles por sustrato, y parcialmente inhibidos en presencia de glucosa en el medio de cultivo. Todos presentaron también una inducción específica, así como una inducción generalizada de menor intensidad con otros sustratos complejos no específicos. Los tres sistemas presentan además múltiples formas enzimáticas, isoenzimas, característica de este tipo de enzimas. Todas las enzimas son extracelulares, liberadas al medio después de sintetizarse durante el crecimiento activo y no se quedan adsorbidas a las paredes micelianas. Se determinaron además características bioquímicas de todas las enzimas estudiadas, así como el requerimiento de cationes en el medio de cultivo.

El sistema celulolítico está compuesto por las tres enzimas componentes características de este complejo enzimático: actividad endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa. Estos resultados confirman que este hongo es un verdadero agente celulolítico, adaptado al medio en el que vive naturalmente. El sistema celulolítico se induce preferencialmente en presencia de celulosa cristalina como sustrato. Se logró aún mejor inducción al utilizar un medio mixto de celulosa cristalina y xilano, que estaría reflejando en mejor medida las condiciones naturales en que crece *A. gamundii*. Con lactosa, se indujo el sistema celulolítico pero ésta fuente de carbono no logró promover el crecimiento del hongo. La celobiosa no resultó un buen inductor del sistema celulolítico.

El sistema xilanolítico está representado mayoritariamente por la actividad endoxilanasas, ya que la actividad  $\beta$ -xilosidasa resultó muy baja, casi nula. Este sistema se indujo preferencialmente con xilano; pero al igual que en el caso del sistema celulolítico, el medio mixto resultó superior. La lactosa tuvo un comportamiento similar al obtenido con el sistema celulolítico.

El sistema amilolítico está representado por la actividad  $\alpha$ -amilasa y la actividad glucoamilasa. La inducción con almidón obviamente resultó la más favorable para este complejo enzimático, así como el uso de maltosa.

Palabras clave: *Ascobolus*, celulasas, xilanasas, amilasas, isoenzimas, inducción, represión.

## Summary

The ability of *Ascobolus gamundii* (Pezizales, Ascomycetes) to produce extracellular degrading enzymes "in vitro" was studied.

After analysing the enzymes produced in artificial liquid media, *A. gamundii* appears to be a true cellulolytic fungus also showing xylanolytic and amylolytic activity.

The three enzyme systems studied are truly extracellular. The enzymes in all cases are synthesised during active growth and diffuse out of the mycelium into the liquid media away from the hyphal walls. These enzyme systems can be induced not only by specific substrates, but also in a lower degree by other complex polymers as well. The three are partially inhibited in the presence of glucose (in no case total inhibition is achieved). For each enzymatic activity *A. gamundii* produces several isozymes, characteristic of these types of enzymes. Biochemical characterisation, of each enzyme as well as the need of several cations in the growth media was also determined.

The cellulolytic system of *A. gamundii* produces its three characteristic enzymes: endoglucanases, exoglucanases and  $\beta$ -glucosidases, confirming its role as a decomposer and its adaptation to its natural habitat: dung. This enzyme system is induced specifically by crystalline cellulose. An even better induction was achieved when using a combined medium of crystalline cellulose and xylan which mirrors better this fungus' natural environment. When lactose was used as an inducer, high specific activity was obtained because growth was not promoted. Cellobiose proved to be a poor inducer for this enzyme system.

The xylanolytic system is nearly entirely represented by the endoxylanase activity.  $\beta$ -xylosidase activity was found to be very low in all fractions studied, rendering a limitation for its survival in nature. Good induction was obtained with xylan, but as it happened with the cellulolytic system, the combined medium of crystalline cellulose and xylan proved better induction. With lactose, the results obtained were similar to those for the cellulolytic system.

The amylolytic system is represented by the  $\alpha$ -amylase and the glucoamylase activity. Induction with starch was the best for this enzyme system, as well as the use of maltose for this purpose.

**Key words:** *Ascobolus*, cellulases, xylanases, amylases, induction, repression, isozymes.

## INDICE

### I.- INTRODUCCION

I.1.- Mitos y leyendas	1
I.2.- Antecedentes de la familia Ascobolaceae	2
I.3.- Consideraciones generales	
I.3.1.- Hongos filamentosos: reales descomponedores	3
I.3.2.- El estiércol	4
I.3.3.- La pared de las células vegetales	6
I.4.- La celulosa	
I.4.1.- Estructura y composición química de la celulosa	9
I.5.- Hemicelulosas	
I.5.1.- Estructura y composición química de las hemicelulosas	11
I.6.- El almidón	
I.6.1.- Estructura y composición química del almidón	12
I.7.- Biodegradación	
I.7.1.- Enzimas extracelulares fungicas	13
I.7.2.- Ecología de los sistema enzimáticos extracelulares fúngicos	14
I.7.3.- Celulasas fúngicas	
I.7.3.1.- Composición del sistema enzimático	15
I.7.3.2.- Secresión	17
I.7.3.3.- Isoenzimas	17
I.7.3.4.- Estructura molecular	19
I.7.3.5.- Modo de acción de las celulasas	22
I.7.4.- Xilanasas fúngicas	
I.7.4.1.- Composición del sistema enzimático	26
I.7.4.2.- Regulación	27
I.7.4.3.- Isoenzimas	28
I.7.4.4.- Genes de las xilanasas	29
I.7.4.5.- Modo de acción de las xilanasas	29

1.7.5.- Amilasas	
1.7.5.1.- Composición del sistema enzimático	31
1.7.5.2.- Modo de acción de las amilasas	34
1.7.5.3.- Genes de las amilasas	34
1.8.- Aplicación de las enzimas fúngicas extracelulares	35
<b><u>M. MATERIALES Y METODOS</u></b>	
<b>M.1.- Organismo</b>	<b>40</b>
M.1.1.- Origen	40
M.1.2.- Mantenimiento y mantención del inóculo	40
<b>M.2.- Medios de cultivo</b>	
M.2.1.- Medios sólidos	41
M.2.2.- Medios líquidos	40
<b>M.3.- Preparación de los medios de cultivo</b>	<b>45</b>
<b>M.4.- Condiciones de cultivo</b>	<b>45</b>
<b>M.5.- Métodos analíticos</b>	<b>46</b>
M.5.1.- Cosecha del micelio	46
M.5.2.- Estimación del crecimiento	46
<b>M.5.3.- Valoración de las actividades enzimáticas</b>	<b>47</b>
M.5.3.1.- Sistema celulolítico	47
M.5.3.2.- Sistema xilanolítico	49
M.5.3.3.- Sistema amilolítico	50
M.5.4.- Valoración de las actividades enzimáticas en placa	51
M.5.4.1.- Sistema celulolítico	51
M.5.4.2.- Sistema xilanolítico	51
M.5.4.3.- Sistema amilolítico	52
M.5.5.- Concentración de proteínas y enzimas	52
M.5.6.- Reactivos utilizados	52
<b>M.6.- Fraccionamiento celular</b>	<b>55</b>
<b>M.7.- Caracterización bioquímica de los sistemas enzimáticos</b>	<b>55</b>
M.7.1.- Ph óptimo	56
M.7.2.- Temperatura óptima	56
M.7.3.- Termoestabilidad	56



M.7.4.- Constante de Michaelis-Menten	56
M.7.5.- Efecto de iones y EDTA	57
M.8.- Estudios de inducción enzimática	57
M.9.- Estudios de represión enzimática	58
M.9.1.- Ensayos de adición al medio	58
M.10.- Técnicas electroforéticas	58
M.10.1.- Preparación de los geles	59
M.10.2.- Preparación de las muestras	60
M.10.3.- Tinción de proteínas	61
M.10.4.- Detección de actividades enzimáticas en el gel	61
M.11.- Abreviaturas	63
M.12.- Drogas y análisis de los datos	64
<b><u>R.- RESULTADOS Y DISCUSION</u></b>	
R.1.- Cinética de producción enzimática	65
R.1.1.- Medios de cultivo con glucosa	65
R.1.2.- Medios con celulosa cristalina	70
R.1.3.- Medios con xilano	74
R.1.4.- Medios con almidón	78
R.1.5.- Medios con celulosa cristalina/xilano	81
R.2.- Optimización de la producción enzimática	84
R.2.1.- Variación de la fuente de carbono	84
R.2.2.- Variación de la fuente de nitrógeno	90
R.2.2.1.- Optimización de la concentración de la fuente nitrogenada	99
R.2.3.- Influencia de surfactantes en la producción de enzimas extracelulares	105
R.3.- Regulación de la producción enzimática	110
R.3.1.- Experiencias de inducción enzimática	110
R.3.1.1.- Sistema celulolítico	110
R.3.1.2.- Sistema xilanolítico	117
R.3.1.3.- Sistema amilolítico	120

R.3.2.- Experiencias de represión enzimática	124
R.3.2.1.- Sistema celulolítico	124
R.3.2.2.- Sistema xilanolítico	126
R.3.2.3.- Sistema amilolítico	131
R.3.3.- Efecto de la celobiosa	133
R. 4.- Localización enzimática	138
R.5.- Caracterización bioquímica	141
R.5.1.- Sistema celulolítico	141
R.5.1.1.- Efecto de cationes	141
R.5.1.2.- Efecto de pH	144
R.5.1.3.- Efecto de la temperatura	146
R.5.1.3.1.- Temperatura óptima	146
R.5.1.3.2.- Termoestabilidad	148
R.5.1.4.- Efecto de la concentración de sustrato	150
R.5.2.- Complejo xilanolítico	155
R.5.2.1.- Efecto de cationes	155
R.5.2.2.- Efecto de pH	157
R.5.2.3.- Efecto de la temperatura	157
R.5.2.3.1.- Temperatura óptima	157
R.5.2.3.2.- Termoestabilidad	157
R.5.2.4.- Efecto de la concentración de sustrato	159
R.5.3.- Sistema amilolítico	161
R.5.3.1.- Efecto de cationes	161
R.5.3.2.- Efecto de pH	163
R.5.3.3.- Efecto de la temperatura	166
R.5.3.3.1.- Temperatura óptima	166
R.5.3.3.2.- Termoestabilidad	166
R.5.3.4.- Efecto de la concentración de sustrato	169
R.6.- Isoenzimas	173
R.6.1.- Sistema celulolítico	173
R.6.1.1.- Fuente de carbono: celulosa cristalina	173
R.6.1.2.- Otras fuentes de carbono	176
R.6.2.- Sistema xilanolítico	179
R.6.2.1.- Fuente de carbono: xilano	179
R.6.2.2.- Otras fuentes de carbono	181

R.6.3.- Sistema amilolítico	182
R.6.3.1.- Fuente de carbono: almidón	182
R.6.3.2.- Otras fuentes de carbono	182
<b><u>C.- CONCLUSIONES</u></b>	<b>184</b>
<b><u>B.- BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b>193</b>



*Introducción*

### 1.1.- MITOS Y LEYENDAS . . .

Hace más de tres mil quinientos años, según cuenta la leyenda, Perseo, héroe griego, habiendo recibido el reinado de Proteo, fundó la ciudad de Mycenae. Mientras recorría su reinado, se le cayó la vaina de su espada, interpretando que esta era una señal divina fundó allí la ciudad. Cuenta también la leyenda, que la ciudad recibió su nombre ya que Perseo, al estar sediento tomó el agua contenida en un basidiocarpo (mykes) y agradecido nombró así su ciudad (Alexopoulos et al., 1996).

A esos tiempos remotos se remonta el estudio de los agaricales, ya que se trata de hongos macroscópicos que siempre han acaparado la curiosidad de los hombres.

Si bien la humanidad se ha beneficiado de la presencia de los hongos desde que se propuso el primer brindis y desde que se alimentaron con un pedazo de pan horneado, el estudio sistemático de los hongos (micología) tuvo sus inicios hace alrededor de 250 años. Desde entonces esta disciplina ha adquirido más y más interés cuanto más se estudió a estos maravillosos organismos. Entre leyendas, mitos y rituales, comenzó a aflorar el uso medicinal que estos proveen y hoy en día, dado su uso en biotecnología, siguen acaparando el interés de la humanidad.

Presentes siempre en nuestra vida cotidiana, desde su presencia en los alimentos que ingerimos, en las enfermedades que padecemos y hasta en las medicinas que usamos, muchas veces no somos conscientes hasta que punto estamos relacionados con la presencia de los hongos.

Los hongos constituyen un amplio grupo de organismos presentes en casi cualquier nicho ecológico. Sin embargo, su definición como grupo aún es polémica.

Tradicionalmente, se los definió como organismos eucarióticos, productores de esporas, faltos de clorofila, con nutrición absorbotrófica, que se reproducen sexual y asexualmente, con estructuras somáticas, generalmente filamentosas ramificadas o no, conocidas como hifas, cubiertas por una pared celular.

Pero, como toda definición no es completamente correcta, ya que reúne organismos que muchas veces no están evolutivamente muy relacionados. De esta manera, polémicas y debates, siguen aportando mayor riqueza al desarrollo de la micología .

## 1.2.- ANTECEDENTES EN LA FAMILIA ASCOBOLACEAE.

*Ascobolus gamundii* es una especie perteneciente a la familia Ascobolaceae (Pezizales operculados). Es una familia que incluye organismos típicamente coprófilos que se desarrollan naturalmente sobre el estiércol de animales herbívoros. Dado este habitat particular, abundante en restos vegetales, se ha iniciado el estudio de varias enzimas extracelulares capaces de degradar el sustrato en un miembro de esta familia.

Al inicio de este trabajo de tesis se habían realizado estudios de celulolisis en hongos coprófilos (Wicklow et al., 1981), pero poco se sabía acerca de sus sistemas enzimáticos (Dennison y Kohen, 1978; Taj-Aldeen et al., 1990). Entre los miembros de la familia Ascobolaceae sólo *Ascobolus furfuraceus* (Mercuri, 1987) y *Ascobolus immersus* (Taj-Aldeen et al., 1990) habían sido estudiados.

En el laboratorio donde desarrollé el presente trabajo se realizan estudios sobre la producción del sistema celulolítico en esta familia. Varios trabajos han sido publicados recientemente en relación al tema aquí expuesto: celulolisis en *Ascobolus furfuraceus* (Mercuri, 1996 a y b; Mercuri y Diorio, 1995), en *Saccobolus saccoboloides* (Magnelli et al., 1996; Magnelli y Forchiassin, 1999), en tres especies de *Ascobolus* (Sivori et al., 1997), así como trabajos comparativos sobre la producción de celulasas en especies de *Saccobolus*, *Ascobolus*, *Iodophanus* y *Thecotheus* (Levin et al., 1996; Ramos y Forchiassin, 1996 y 1998; Pardo et al., 1997).

Con respecto a la producción de amilasas, se ha publicado en nuestro laboratorio un estudio comparativo de la producción de amilasas por cuatro especies de *Saccobolus* (Ramos y Forchiassin, 1996), mientras que, en relación a la producción de xilanasas, solo se ha publicado un trabajo (Sivori, et al., 1997).

La elección de *Ascobolus gamundii* para la realización de esta tesis se basó en estudios previos de comparación entre varias especies pertenecientes al género *Ascobolus*.

### 1.3.- CONSIDERACIONES GENERALES.

#### 1.3.1.- HONGOS FILAMENTOSOS: REALES DESCOMPONEDORES.

Los hongos son organismos heterótrofos y absorbotróficos. Es decir que no son capaces de fijar carbono atmosférico y que los nutrientes que ingresan al micelio deben atravesar la pared celular y la membrana plasmática. Este tipo particular de nutrición caracteriza al reino e implica la producción de enzimas extracelulares que una vez liberadas al medio degradan el sustrato para luego permitir la difusión de los nutrientes al micelio.

La mayor parte de los organismos pertenecientes a este Reino son filamentosos. Es decir, que poseen estructuras somáticas llamadas hifas que les facilitan la penetración del sustrato, y por consiguiente la accesibilidad de sus enzimas extracelulares al mismo. Esta característica los beneficia con respecto a las bacterias, que siendo unicelulares, muchas veces se ven en desventaja, en relación a los hongos para atacar ciertos sustratos como descomponedores.

Las hifas presentan un crecimiento polarizado así como la capacidad de traslocar nutrientes hacia el ápice hifal, permitiéndoles crecer adecuadamente a pesar de las microheterogeneidades del sustrato (Carlile, 1995). También les facilita la dispersión, ya que en muchos casos el micelio vegetativo coloniza profundamente el medio y solamente las estructuras reproductivas emergen.

En el caso de la degradación de biopolímeros de origen vegetal, la primacía de los hongos en el proceso de descomposición no es una consecuencia de la eficiencia y diversidad de los sistemas enzimáticos producidos, ya que las bacterias también las producen, sino de su hábito particular de crecimiento.

Este hábito de crecimiento micelial les permite colonizar rápidamente un mayor área del sustrato que las bacterias unicelulares. Incluso, más importante aún es la capacidad que poseen de penetrar y ramificarse dentro del sustrato. Esto les permite descargar las enzimas necesarias en el lugar adecuado, así como transportar a grandes distancias los productos de degradación de los polímeros a través de su red hifal.

Estas características, son las que los distinguen de los demás organismos como los principales descomponedores.

### 1.3.2.- EL ESTIERCOL

Las heces de herbívoros constituyen un sustrato rico en material lignocelulósico, notoriamente enriquecido en nutrientes con respecto al material vegetal original. Es por ello que resulta un hábitat excelente para muchos hongos, así como para muchos pequeños animales, protozoos y bacterias.

Los factores que determinan su mayor degradabilidad son: la cantidad relativamente alta de materia orgánica soluble, alto contenido de nitrógeno, vitaminas, minerales y otros factores de crecimiento. Favorece también su estructura física ya que el material vegetal se encuentra procesado y particulado, presentando en consecuencia una buena aireación, buena retención de agua así como exposición de los polímeros de pared.

En el caso del estiércol de los grandes herbívoros que están especializados en el aprovechamiento de la celulosa por la acción de organismos simbiotes, queda en este material suficiente celulosa como para sostener el crecimiento de organismos especializados.

Los hongos que crecen sobre el estiércol pueden dividirse en dos grandes grupos, según los mecanismos de dispersión con que cuentan.

Los hongos fimícolas (no son considerados hongos del suelo), poseen mecanismos que les permiten reaparecer en el estiércol. La descarga de esporas es violenta y éstas quedan adheridas a las hierbas por el mucílago que las recubre normalmente. Así las esporas entran al tracto digestivo del herbívoro junto con las hierbas. Pasan por él manteniendo su viabilidad a la vez que sufren un proceso de escarificación que les permite germinar rápidamente una vez que el estiércol fue depositado. Entre otros, los géneros *Ascobolus*, *Ascodesmis*, *Saccobolus*, *Iodophanus*, *Ascophanus*, *Lasiobolus* (Pezizales); *Pilobolus* (Mucorales); *Podospora*, *Sordaria* (Sphaeriales) y *Coprinus* (Agaricales) pertenecen a este grupo (Lodha, 1974).



El otro grupo está compuesto por los hongos presentes en el suelo y la hojarasca. Sus esporas alcanzan el estiércol por medio de salpicaduras, corrientes de aire o transporte por insectos. No poseen ningún mecanismo de dispersión especialmente adaptado a este medio en particular. Algunos ejemplos son especies de los géneros *Mucor*, *Rhizopus* (Mucorales), *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichoderma* (Deuteromycetes), *Chaetomium*, *Lasiosordaria* (Sphaeriales) y *Gymnoascus*, *Eurotium*, *Thielavia* (Eurotiales).

Con respecto a la composición del sustrato, no hay muchos estudios realizados. Se plantea que la hidrólisis de los polímeros se da simultáneamente desde el inicio, aunque con diferentes tasas, siendo los principales componentes celulosas, hemicelulosas y ligninas, aunque se ha detectado una baja cantidad de almidón también.

El contenido de materia orgánica no decae rápidamente, al contrario, como se muestra en la tabla #1 es un lento proceso de descomposición.

**TABLA 1:** Composición química del estiércol de caballo durante la descomposición (datos en gramos, peso seco). Lodha, 1974.

	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
Proteínas, insolubles	8.94	11.25	13.08	12.40	13.26
<b>TOTAL</b>	<b>115.45</b>	<b>134.29</b>	<b>107.95</b>	<b>89.71</b>	<b>84.55</b>

La velocidad y alcance de la degradación de la celulosa en el estiércol no depende solo de la cantidad ni calidad de las enzimas producidas por los hongos, sino además de la acción enzimática que realmente se pueda llegar a dar teniendo en cuenta que el sustrato está previamente procesado.

Entre los Ascomycetes coprófilos se encuentran *Sordaria fimícola*, especies pertenecientes a los géneros *Podospora* y *Chaetomium* y los miembros de la familia Ascobolaceae.

### 1.3.3.- LA PARED DE LAS CELULAS VEGETALES.

Es necesario analizar la estructura y función de la pared vegetal para poder comprender los factores que determinan la degradación de sus componentes. En la naturaleza, los organismos no se enfrentan a los componentes de la misma en forma aislada. Su sustrato natural son fragmentos de paredes celulares en los cuales las macromoléculas componentes están íntimamente relacionadas en determinada disposición espacial que determina la accesibilidad o no al ataque y posterior degradación.

La arquitectura de la pared celular vegetal está determinada en gran parte por la celulosa. Tradicionalmente se ha dividido en tres regiones de acuerdo a su estructura y función: laminilla media, pared primaria y pared secundaria (Esau, 1977).

La pared primaria es la primera que se deposita en las células en el período de activo crecimiento. Las paredes vegetales primarias de dos células contiguas se encuentran unidas por la laminilla media. En muchos tipos celulares se depositan capas adicionales cuando ya ha terminado la elongación celular. La pared secundaria se deposita por dentro de la pared primaria. Su principal componente es la lignina, confiriendo rigidez a la célula ( figura 1)

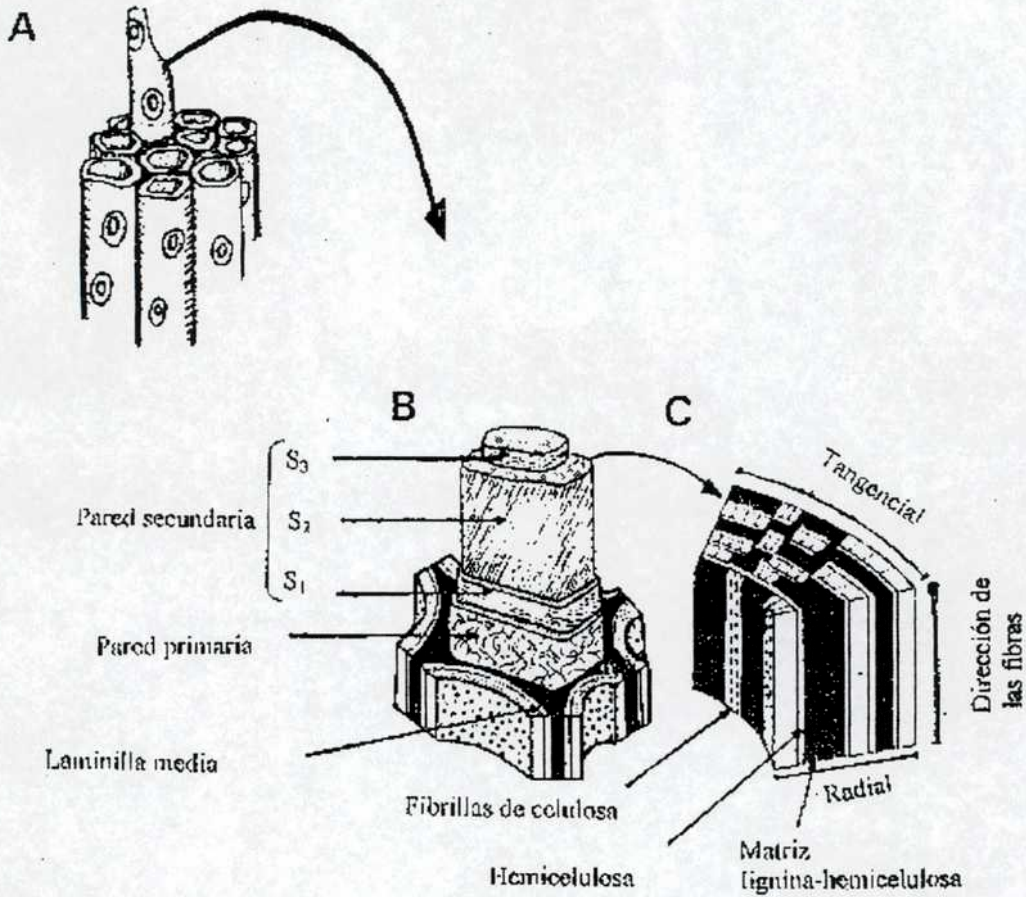


Figura 1 : Arquitectura molecular de tejidos leñosos

A: Haz de células leñosas contiguas.

B: Corte de una célula leñosa mostrando las capas que constituyen la pared vegetal.

C: Sección de la pared celular secundaria mostrando la relación de hemicelulosa y lignina con las fibras de celulosa.

(Kirk, 1983).

En la pared primaria la celulosa se dispone en haces de cientos de moléculas fuertemente empaquetadas formando fibrillas como se puede observar en la figura 2. Estas fibrillas tienen zonas externas amorfas y un centro altamente cristalino, lo que les confiere una alta resistencia mecánica. Las zonas amorfas internas generan zonas de torsión, por lo cual las fibrillas no son rectas (Blackwell, 1982).

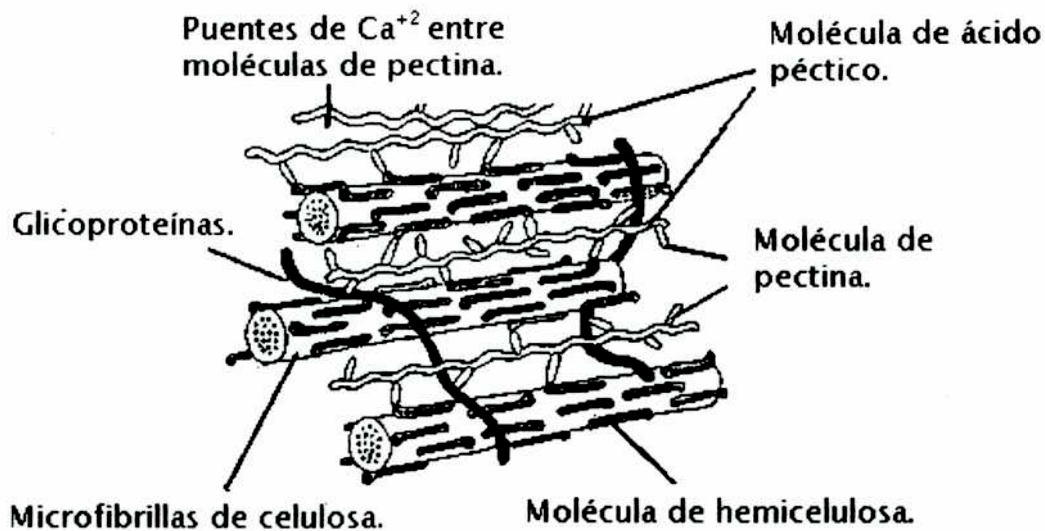


Figura 2: Esquema de la interconexión existente en la pared celular primaria de vegetales superiores, entre las fibrillas de celulosa, la matriz de hemicelulosas y sustancias pécticas. Las moléculas de hemicelulosa (xilano) se unen por puentes de hidrógeno a la superficie de las microfibrillas de celulosa. Algunas de estas hemicelulosas se unen a las moléculas de ácido péctico a través de cadenas cortas de pectina. Existen glicoproteínas adheridas a las moléculas de pectina.

Los haces de celulosa están inmersos en una matriz de hemicelulosas, sustancias pécticas y proteínas. Con el estudio de la pared primaria de sicomoro se pudo comprobar que esta está constituida por 23% de celulosa, 21% de xiloglucanos, 20% de arabinogalactanos, 16% de ramnogalactanos, 10% de proteínas ricas en hidroxiprolina y 9% de tetraarabinósidos unidos a hidroxiprolina (Albersheim, 1976).

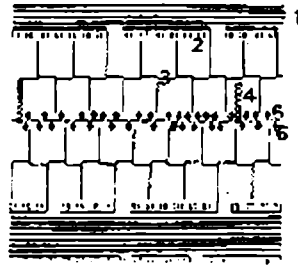


Figura 3: esquema de la composición de la pared primaria.  
 1: fibrilla de celulosa; 2: xiloglucano; 3: ramnogalactano;  
 4: arabinogalactano; 5: proteína; 6: tetraarabinósido.

(Albersheim, 1976)

Los xiloglucanos forman una monocapa que rodea la fibrilla interconectándola con los polisacáridos pécticos. En la pared primaria las microfibrillas no corren paralelas, sino que forman una red, cuya estructura queda determinada por las interconexiones con la matriz (figura 3).

En la pared secundaria las microfibrillas de celulosa están dispuestas paralelas entre sí y se encuentran embebidas en lignina. La lignina es un heteropolímero amorfo con componentes aromáticos que ocupa el espacio entre las fibrillas, confiriendo mayor resistencia a la pared. La matriz de la pared secundaria también presenta hemicelulosas y pectinas (Frey Wyssling, 1976).

## 1.4.- LA CELULOSA

### 1.4.1.- ESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DE LA CELULOSA.

La celulosa es el biopolímero más abundante sobre la corteza terrestre. Es imposible hacer un cálculo exacto de la cantidad de celulosa presente en este momento en la biósfera. Cada año cerca de 28 millones de toneladas de celulosa son sintetizadas por las plantas. Esta cifra corresponde

alrededor del 6% del CO<sub>2</sub> atmosférico fijado tanto por plantas terrestres como marinas.

La tasa anual de producción de celulosa representa solo un 0.02 % del total de celulosa estimado en 1400 billones de toneladas.

La celulosa (constituyente principal de las paredes vegetales) no es sintetizada exclusivamente por las plantas. Esta también es sintetizada por algas y forma parte de la pared fúngica en el phylum Oomycota (Alexopoulos et al., 1996) y es parte de la pared celular también en una especie del phylum Chytridiomycota.

Se trata de un sistema dinámico en el que a la vez que se sintetiza, la celulosa es también degradada por una serie de microorganismos, mayoritariamente bacterias y hongos.

La celulosa es un homopolímero lineal. Está constituido por monómeros de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y no presenta cadenas laterales.

La longitud del polímero es altamente variable, dependiendo del organismo a partir del cual se ha extraído, así como de su edad y estado metabólico (Markham y Bazin, 1991).

Cada monómero de glucosa presenta una rotación de 180° respecto de los residuos contiguos. La fibrilla se estabiliza por la presencia de puentes de hidrógeno intramoleculares como se ve en la figura 4.

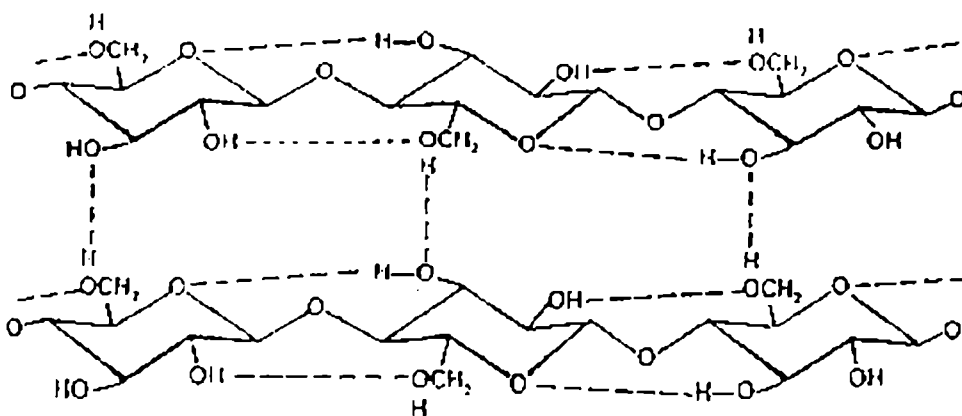


Figura 4: molécula de celulosa mostrando los puentes de hidrógeno inter e intramoleculares.

La ausencia de cadenas laterales y la estabilización por puentes de hidrógeno entre cadenas paralelas permite la formación de agregados moleculares conocidos como microfibrillas (Zarra y Revilla, 1993).

Se consideran dos tipos de celulosa:

- 1) celulosa nativa o cristalina. Caracterizada por un alto grado de cristalinidad y polimerización y por consecuencia insoluble. Ej.: avicel, fibras de algodón, papel de filtro, etc.
- 2) celulosa modificada. Es una celulosa amorfa, caracterizada por un bajo grado de ordenamiento y polimerización que resulta soluble en agua. Ej.: carboximetilcelulosa, celooligosacáridos, etc.

### 1.5.- HEMICELULOSAS.

#### 1.5.1.- ESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DE LAS HEMICELULOSAS.

Las hemicelulosas son polímeros de diversas hexosas y pentosas, principalmente D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa y ácido D-glucurónico. Estos polisacáridos forman parte de la pared vegetal en forma amorfa y por lo tanto constituyen la porción más fácilmente degradable de la pared vegetal (Sjöström, 1993).

Las hemicelulosas se sintetizan como heteropolímeros. Poseen una columna vertebral formada por una cadena plana corta (grado de polimerización 100 - 200) de azúcares unidos por enlaces, casi siempre  $\beta$ -1,4; de la que pueden salir ramificaciones muy cortas, muchas veces de un solo azúcar de longitud. Se clasifican generalmente según los azúcares residuales presentes.

Los xilanos son las principales hemicelulosas de las maderas de angiospermas. Constituyen del 10 al 35 % del peso seco (Joseleau y Ruel, 1994).

Consisten de una cadena principal de unidades  $\beta$ -D xilopiranosidos con uniones  $\beta$ -1,4 ( ver figura 5). Dependiendo de su origen, esta cadena puede tener diferentes sustituyentes y cadenas laterales. Se consideran tres familias principales de xilanos (Puls y Schuseil, 1993):

- 1) de maderas de angiospermas. Acetil-4-O-metilglucuronoxilano, con un grado de polimerización de 200.

- 2) de maderas de coníferas. Arabino-4-*O*-metilglucuronoxilano, con un grado de polimerización de 120.
- 3) De pastos. Arabino-4-*O*-metilglucuronoxilano, con un grado de polimerización de 70.

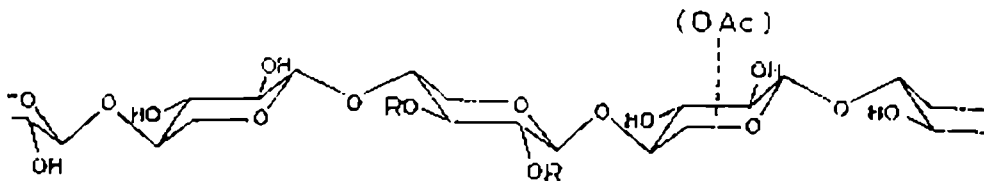


Figura 5: Conformación de la molécula de xilano.

Las hemicelulosas cubren y unen a las microfibrillas de celulosa en una matriz común. Su bajo grado de polimerización incrementa la solubilidad de las hemicelulosas y su posición expuesta en las superficies de las microfibrillas, explican porqué son los primeros componentes de la pared vegetal que es atacada por los microorganismos, junto con las pectinas (Zabel y Morrel, 1992).

## 1.6.- ALMIDON

### 1.6.1.- ESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DEL ALMIDON.

Más de la mitad de los carbohidratos que ingerimos son almidón. El reservorio nutritivo en las plantas es el almidón, que está presente en dos formas: la amilosa (15 - 25%) y la amilopectina (75 - 85%). Estas proporciones varían según el origen del almidón.

Los almidones provenientes de fuentes diferentes varían su contenido de amilosa y amilopectina, lo cual determinará diferencias en propiedades tales como solubilidad en agua, tamaño molecular, capacidad de tinción con lugol y susceptibilidad a la degradación enzimática (Fogart y Kelly, 1979 ).

La amilopectina es una molécula ramificada. Tiene aproximadamente



un enlace  $\alpha$ -1,6 cada treinta unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 de manera lineal. Es una de las moléculas naturales de mayor peso molecular.

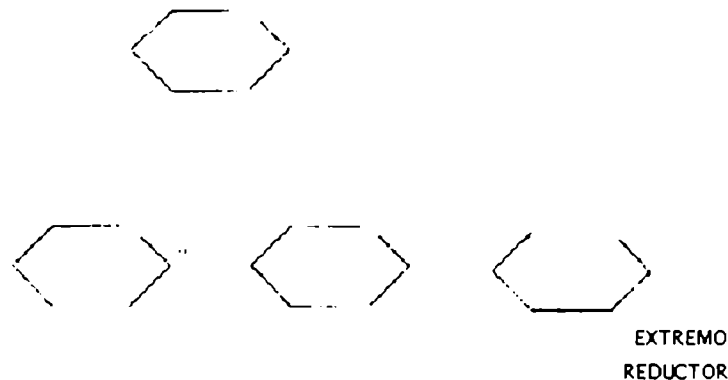


Figura 6: Punto de ramificación en una molécula de amilopectina.

La amilosa es una molécula lineal, no ramificada, compuesta por unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces  $\alpha$ -1,4 (entre 100 y 6000 unidades). Este polisacárido lineal adopta una forma espiralada (seis unidades de glucosa por vuelta), debido a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares.

## 1.7.- BIODEGRADACION

### 1.7.1.- ENZIMAS EXTRACELULARES FUNGICAS .

Los sistemas enzimáticos fúngicos involucrados en la degradación de polímeros complejos (enzimas extracelulares) son liberados al medio durante la fase de activo crecimiento del hongo facilitando la movilización de nutrientes hacia el interior del micelio en crecimiento.

Su ubicación afuera de la célula resulta imprescindible, dado que, debido al alto peso molecular de los polímeros, estos no pueden ingresar a la célula tal cual. Solo serán incorporados a la célula para su posterior utilización a través de productos de su hidrólisis llevada a cabo por dichas enzimas degradativas extracelulares.

Entre las enzimas degradativas fúngicas extracelulares, las celulasas, xilanasas, amilasas y proteasas revisten un interés fundamental tanto a nivel ecológico como potencialmente biotecnológico.

### 1.7.2.- ECOLOGIA DE LOS SISTEMA ENZIMATICOS EXTRACELULARES FUNGICOS.

Cada día se fijan a través del proceso fotosintético alrededor de  $3 \times 10^{10}$  toneladas de carbono a partir de  $\text{CO}_2$  atmosférico. La biomasa resultante de los residuos vegetales representa una importante fuente de energía, sin embargo esta no puede ser utilizada como tal, ya que esta constituida por moléculas complejas como la celulosa, hemicelulosa, etc. Esta debe ser degradada previamente a productos simples más fácilmente asimilables.

Otra fuente importante de materia orgánica la constituyen las heces de animales de pastoreo. El estiércol contiene grandes cantidades de celulosa y hemicelulosa no digeridas por el rumiante. Los grandes centros urbanos, a su vez, contribuyen con un gran caudal de desechos de papel y cartón.

En la naturaleza los hongos celulolíticos, que habitan el suelo, la hojarasca, las raíces, los troncos e inclusive el follaje arbóreo, son los responsables de la conversión de la biomasa vegetal en compuestos simples. Estos pueden ser reutilizados por otros organismos o pueden pasar a formar parte del suelo. La celulosa es el biopolímero natural más abundante sobre la corteza terrestre y esta formado por unidades de glucosa. Al ser degradado, no solo aporta nutrientes para el crecimiento de los hongos sino también para el crecimiento de muchos otros organismos. Estos se ven beneficiados por un aporte energético que de otra manera quedaría inutilizado.

Las enzimas celulolíticas son sintetizadas dentro de la célula fúngica y son transportadas a la superficie celular o excretadas al medio extracelular, lo cual permite degradar la celulosa que es un polímero de alto peso molecular. Así, sucesivamente, y en forma sincronizada, varias enzimas son liberadas al medio para lograr la efectiva degradación del polímero de

celulosa a sus monómeros de glucosa. Esta actividad extracelular multienzimática es un complicado proceso biológico.

### 1.7.3.- CELULASAS FUNGICAS.

#### 1.7.3.1.- COMPOSICION DE LOS SISTEMAS ENZIMATICOS.

Los organismos celulolíticos son aquellos capaces de producir un sistema enzimático extracelular capaz de hidrolizar la celulosa a componentes solubles. Los hongos filamentosos son los organismos celulolíticos por excelencia debido a su hábito filamentoso de crecimiento micelial y a la eficiencia y diversidad de sus sistemas enzimáticos.

El sistema celulolítico esta formado por tres tipos de enzimas:

a) Endoglucanasas (EC 3.2.1.4.) EG  $\Rightarrow$  su acción se caracteriza por producir rupturas de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos al azar disminuyendo el grado de polimerización de la celulosa. No es capaz de actuar sobre la celulosa cristalina, sino que lo hace sobre la celulosa amorfa, reduciendo así, su viscosidad.

b) Exocelulasas  $\Rightarrow$  estas enzimas producen rupturas consecutivas en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor liberado. Están representadas por dos tipos de enzimas:

- Celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91.) CBH  $\Rightarrow$  liberan unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor.

- Glucohidrolasas (EC 3.2.1.74.) GH  $\Rightarrow$  liberan unidades de glucosa a partir del extremo no reductor liberado. Generalmente actúan sobre dextrinas.

c)  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21.) BG  $\Rightarrow$  clivan los dímeros de celobiosa a los monómeros de glucosa. También pueden actuar sobre pequeños celooligosacáridos.

Los hongos de pudrición castaña, a diferencia de los de pudrición blanca, no son capaces de producir celobiohidrolasas, si bien sintetizan endoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas. Se sugiere que llevan a cabo la hidrólisis de la celulosa utilizando la endoglucanasa que producen asociada a factores no proteicos como  $H_2O_2$  y  $Fe^{++}$  (Wood y García Campayo, 1990; Uemura et al., 1993).

En adición a los tres tipos de enzimas mencionadas anteriormente, existen otras enzimas que también participan en la degradación de

celulosa en ciertos casos. Los hongos de pudrición blanca sintetizan una enzima oxidativa, la celobiosa oxidasa (EC1.1.99.18). Se trata de una enzima flavin dependiente con estructura similar al citocromo b, que posee un dominio de unión a la celulosa. Utiliza como aceptor electrónico el O<sub>2</sub> y produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta enzima podría actuar también con otros aceptores electrónicos como el citocromo c, diclorofenol-indofenol, Mn<sup>3+</sup> y benzoquinonas (Bao et al., 1993). Posiblemente esta enzima actúe oxidando el extremo reductor creado al romperse el enlace β-glucosídico tras la acción de la endoglucanasa. De esta manera se aseguraría que dicho enlace no se vuelva a formar.

La celobiosa quinona oxidoreductasa, una enzima flavin dependiente, que utiliza quinonas y radicales fenoxi como aceptores electrónicos es producida por todos los hongos de pudrición blanca conocidos. Se la considera un importante nexo entre los procesos de hidrólisis de celulosa y lignina (Eriksson et al., 1993). Roy et al. (1994) proponen un modelo que interrelaciona ambos procesos de hidrólisis en *Trametes versicolor*.

Las enzimas oxidativas dependientes de O<sub>2</sub> podrían estar involucradas también en la degradación de celulosa por *Polyporus adustus*, *Myrothecium verrucaria* y *Trichoderma reesei*, ya que la degradación de algodón por los sistemas enzimáticos de estos organismos se ve reducida un 50% cuando la atmósfera normal es reemplazada por N<sub>2</sub>. Se han detectado ácidos glucónico y celobiónico en los sobrenadantes de cultivo de *T. reesei*. En contraste con estos resultados, se sabe que la capacidad para degradar celulosa por parte de *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma koningii* y *Talaromyces emersonii* no es dependiente de la presencia de O<sub>2</sub>. Sin embargo, es posible que posean una celobiosa deshidrogenasa similar a la de *Monilia sp.* que no utiliza O<sub>2</sub> ni quinonas como aceptores electrónicos (Coughlan y Ljungdahl, 1988).

De todos los hongos filamentosos estudiados, *T. reesei* ha sido el más utilizado en las investigaciones y también el elegido con fines de producción industrial de enzimas (Markham y Bazin, 1991).

### 1.7.3.2.- SECRECION

El sistema de secreción enzimática en los hongos filamentosos presenta modificaciones del ya estudiado sistema en células eucarióticas dado que existe una direccionalidad en el crecimiento y en el transporte de nutrientes hacia el ápice hifal. Esta es el área activa de secreción enzimática. Lo que no se descarta, es que exista una cierta actividad secretora a lo largo del resto del micelio para mantener la actividad metabólica.

De los estudios realizados se ha propuesto que la endoglucanasa es sintetizada en el retículo endoplasmático y que es transferida rápidamente a vesículas que la transportan a otras vesículas en las que sufren las últimas modificaciones post traduccionales antes de ser secretadas al medio de cultivo. Para ser secretadas, las vesículas se funden con la membrana plasmática por un proceso de exocitosis. Una vez en el exterior las enzimas se adsorben rápidamente al sustrato disponible.

Las celulasas son realmente enzimas extracelulares ya que sus tres componentes, endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa, son secretadas al medio durante la fase de activo crecimiento con una tasa muy alta y son luego recuperables del medio de cultivo.

Las celulasas contienen carbohidratos en su estructura. Este dato es consistente con el concepto de que todas las proteínas de excreción en las células eucariotas son glicoproteínas. La porción glucosídica es añadida a las enzimas en la etapa post traduccional a través de un residuo de glucosamina y esta última modificación parece ser imprescindible para las enzimas de excreción.

### 1.7.3.3.- ISOENZIMAS

Las enzimas del complejo celulolítico existen en múltiples formas. La síntesis de isoenzimas responde en ciertos casos a productos de genes diferentes, pero en algunos casos, se sintetizan como consecuencia de estados fisiológicos diferentes (componentes del medio de crecimiento, diferentes pH, etc.) a partir de un mismo gen original. Es un hecho ya ampliamente observado que en medios de cultivo ligeramente diferentes se sintetizan diferentes formas de una misma enzima, que a pesar de poseer características catalíticas similares difieren notablemente en sus

características físico-químicas. Las dos teorías más aceptadas para explicar su síntesis son las siguientes:

1.- se originan a partir de modificaciones post traduccionales reguladas fisiológicamente.

2.- se originana a partir de digestiones proteolíticas luego de su secreción.

Según la primer teoría expuesta, al tratarse de isoenzimas sintetizadas a partir de un proceso de regulación fisiológico, cada isoenzima sintetizada tendría un rol fisiológicamente definido; mientras que la segunda teoría resalta la falta de regulación en su síntesis, sugiriendo que se trataría de meros artefactos, consecuencia del procesamiento inespecífico de enzimas previamente secretadas.

Si bien los estudios fisiológicos se llevan a cabo utilizando medios sintéticos con sustratos puros, en la naturaleza los hongos se encuentran con una amplia gama de sustratos celulósicos heterogéneos, y serían estos los responsables de la aparición de las diversas isoenzimas fúngicas. Messner y Kubicek (1991), investigaron esta regulación, correlacionando la aparición de las diferentes formas enzimáticas con los sustratos utilizados.

La influencia del medio de cultivo en la multiplicidad de las celobiohidrolasas fue estudiado utilizando anticuerpos monoclonales (Mishra et al., 1989). Para *T. reesei* cepa QM9414 en un medio sin control de pH y con alto contenido de nitrógeno se demostró que se sintetiza una enzima de bajo peso molecular.

Se han encontrado también polimorfismos de la endoglucanasa en *Aspergillus nidulans*, *A. niger* (Akiba et al., 1995), en *T. reesei* (Micletzby et al., 1994), en especies del género *Iodophanus* y *Thecotheus* (Pardo et al., 1997), en especies del género *Saccobolus* (Ramos y Forchiassin, 1996a), *Humicola insolens* (Schulein, 1997), así como en la mayoría de los hongos estudiados.

La aparición de isoenzimas, que parece deberse a una correlación con el sustrato en el que crecen, como consecuencia de una modificación post traduccional relacionada con la actividad fisiológica suele estar asociada a un aumento en la eficiencia de la hidrólisis de la celulosa. Según Wood y Bhat (1988) la formación de un complejo enzima-enzima es necesario para favorecer el sinergismo entre estas enzimas. Es posible que ciertos

procesos fisiológicos causen cambios específicos en las enzimas para favorecer la formación de complejos enzima-enzima levemente diferentes capaces de hacer más eficiente la hidrólisis de la celulosa en la naturaleza.

#### 1.7.3.4.- ESTRUCTURA MOLECULAR

Los estudios sobre la arquitectura de las celulasas fúngicas coinciden en que la estructura básica consiste en todos los casos por dos dominios. Un dominio núcleo ó catalítico, poco conservado y un dominio cola que sirve para unir la enzima al sustrato, muy conservado. Estas dos regiones están unidas entre sí por una región bisagra. Esta región es flexible y rica en prolina, treonina y serina.

Para *T. reesei* se clonaron y secuenciaron dos celobiohidrolasas (CBH I y CBH II) y dos endoglucanasas ( EG I y EG III ). Su estructura puede observarse en la figura 7.

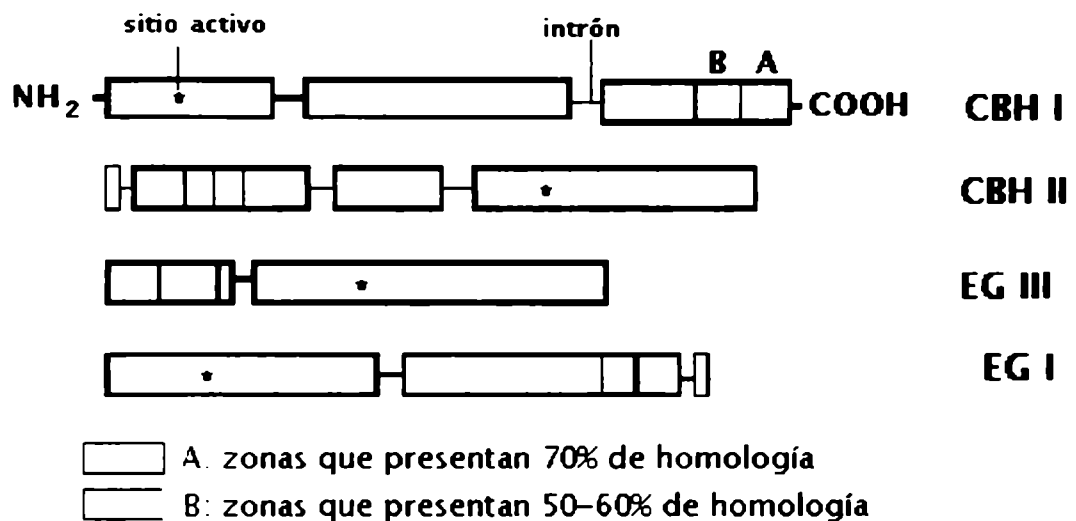


Figura 7: Esquema de cuatro de los genes de *T. reesei*

Se ha visto que existen ciertos bloques muy conservados en las cuatro enzimas estudiadas. El bloque A es el más conservado, presentando un 70% de homología entre las cuatro enzimas.

La estructura tridimensional de CBH II muestra que posee una estructura tipo "renacuajo" (ver figura 8). Presenta un núcleo y una cola, unidas por una región flexible. El dominio de la cola es N-terminal para esta enzima pero C-terminal para la CBH I. A pesar de que ambas enzimas son capaces de adherirse a la celulosa cristalina, lo hacen con diferentes especificidades y se postula que esta diferencia está relacionada con la acción sinérgica entre estas enzimas. Este dominio resulta de suma importancia al analizar su función en relación directa a la celulólisis. Es de esperar que una mejor adhesión al sustrato traería aparejada una mayor eficiencia del sitio activo. Puede tener también un papel fundamental al causar el desplazamiento de las fibras de celulosa en las regiones cristalinas, permitiendo así la actividad enzimática en estas regiones de difícil acceso.

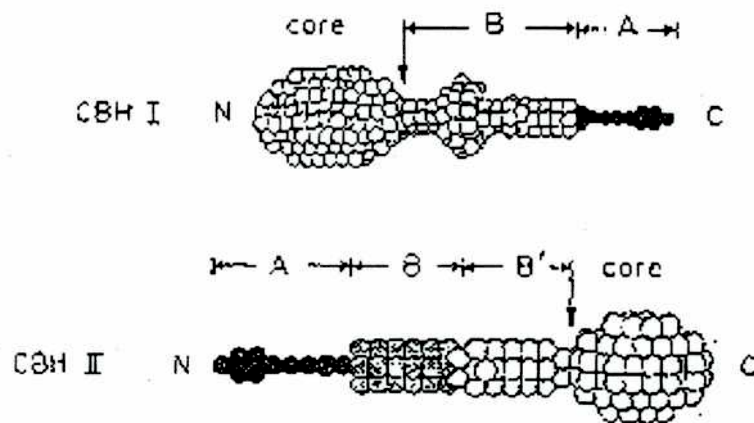


Figura 8: Estructura tridimensional de la CBH I y CBH II.

La región bisagra que conecta ambos dominios se encuentra altamente glicosilada, se supone que para prevenir el ataque proteolítico o bien, para asegurar una distancia mínima entre los dos dominios principales. Esta región permite la unión al sustrato por el dominio de



adhesión y deslizarse lateralmente llevando al dominio catalítico hacia nuevos sitios de corte (Srisodsuk et al., 1993). La siguiente tabla resume las diferentes familias que se establecen a partir de la comparación de los dominios catalíticos según la secuencia aminoacídica:

Tabla 2: Familias de genes de celulasas.

Familia	Sub-familia	Organismos	Tipo de 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	Endo y xilanasas

Esta clasificación fue realizada por Henrissat en 1993 (Henrissat y Bairoch, 1993). La clasificación se realiza por el dominio catalítico, ya que los dominios de reconocimiento de sustrato no varían dentro de las especies, sin importar el tipo de actividad que posea (Beguin, 1990).

El modo de acción de las enzimas está determinado exclusivamente por su dominio catalítico. Se vio que una enzima heteróloga con el núcleo de CBH I y cola de EG I presenta actividad exoglucanasa (Srisodsuk et al., 1997).

Así, un cambio de unos pocos aminoácidos en el dominio catalítico, conlleva a cambios drásticos en el modo de acción de la enzima. Esto explica las diferentes estrategias de ataque entre la CBH I y la EG I.

La estructura terciarias del dominio catalítico de la CBH I tiene forme de túnel que la hace eficiente para atacar la molécula desde los extremos. Sin embargo, con algunos aminoácidos cambiados, la EG I, posee un sitio activo más abierto conteniendo múltiples sub-sitios, permitiendo rupturas de enlaces al azar dentro de la molécula.

### I.7.3.5.- MODO DE ACCION DE LAS CELULASAS

Según el consenso histórico, la degradación de celulosa cristalina es más rápida y efectiva cuando todas las enzimas celulolíticas actúan en conjunto. Sin embargo, las interacciones moleculares involucradas en el sinergismo no están aún totalmente aclaradas. Esta dificultad surge de las diferentes propuestas de las acciones particulares de cada enzima purificada.

La aparente falta de especificidad enzimática de los componentes del sistema celulolítico es un tema ampliamente conocido. En algunos casos, este fenómeno es atribuido a la existencia de complejos enzima-enzima como el encontrado en *T. reesei* (Sprey y Lambert, 1983). Este complejo enzima-enzima entre endocelulasas, xilanasas y  $\beta$ -glucosidasas, electroforéticamente homogéneo resultó ser heterogéneo luego del tratamiento con urea/octyl glucósido.

También se han reportado complejos enzima-enzima entre diferentes tipos de celobiohidrolasas (I y II) en *T. reesei* y en *Penicillium pinophilum* así como complejos entre endocelulasas y celobiohidrolasas (Wood et al., 1989). Estos complejos fueron luego disociados en columnas de cromatografía de afinidad preparadas con p-aminobenzil 1-tio- $\beta$ -celobiósido y Affigel 10.

Esta falta de especificidad de los componentes del sistema celulolítico pueden ser el resultado de la diferente especificidad de enzimas provenientes de diferentes fuentes, así como de la presencia de complejos enzima-enzima que resultan estables en las condiciones de fraccionamiento usualmente utilizadas.

Sin embargo es actualmente aceptado que el sinergismo entre los componentes del sistema celulolítico existe y que este es más marcado al actuar sobre celulosa cristalina (particularmente sobre fibras de algodón). Este sinergismo decrece cuando el sustrato es celulosa amorfa y parece inexistente al utilizar celulosa soluble.

El modelo de acción enzimático más aceptado para hidrolizar celulosa en estado cristalino sostiene que es prerequisite fundamental para el clivaje enzimático la hidratación y separación de las fibrillas de celulosa. Por lo tanto, Wood et al (1990) proponen un modelo basado en

consideraciones estéricas utilizando como modelo el sistema celulolítico de *P. pinophilum* compuesto por cinco endocelulasas y dos celobiohidrolasas (I y II). El modelo sostiene, que la presencia constitutiva de las dos celobiohidrolasas es fundamental para lograr hidrolizar las fibras de celulosa.

El primer paso consistiría en la ruptura del enlace glucosídico por parte de una endocelulasa que genera un extremo no reductor con una configuración particular. Luego, la celobiohidrolasa I con especificidad estérica, usando el extremo no reductor liberado como sustrato liberaría sucesivamente unidades de celobiosa. De esta manera podría quedar expuesta otra cadena de la fibrilla de celulosa de configuración diferente que sería sustrato para la celobiohidrolasa II (ver figura 9).

El ataque de otra endoglucanasa (II), que actúa sobre otro tipo de configuración del enlace glucosídico generaría otro extremo no reductor de estereoespecificidad diferente que serviría de sustrato a otra celobiohidrolasa. De esta manera el sistema actuaría con máxima eficiencia. Finalmente las unidades de celobiosa liberadas de esta manera, serían atacadas por la  $\beta$ -glucosidasa para producir así los monómeros de glucosa finales.

El sinergismo entre los componentes del sistema celulolítico depende de diversos factores:

- 1) la naturaleza del sustrato.
- 2) La afinidad de el/los componentes enzimáticos por el sustrato.
- 3) La estero-especificidad de los componenetes.
- 4) La concentracion de las enzimas.
- 5) La proporción entre los componentes enzimáticos (Duff y Murray, 1996).

Sin embargo, el modelo que explica la acción sinérgica del sistema celulolítico para degradar la celulosa completamente a sus monómeros constituyentes de glucosa es una simplificación de lo que realmente ocurre en la naturaleza, ya que no tiene en cuenta la presencia de actividades oxidativas auxiliares. Coughlan y Ljungdahl (1988) han propuesto un modelo para explicar la biodegradación fúngica de la celulosa

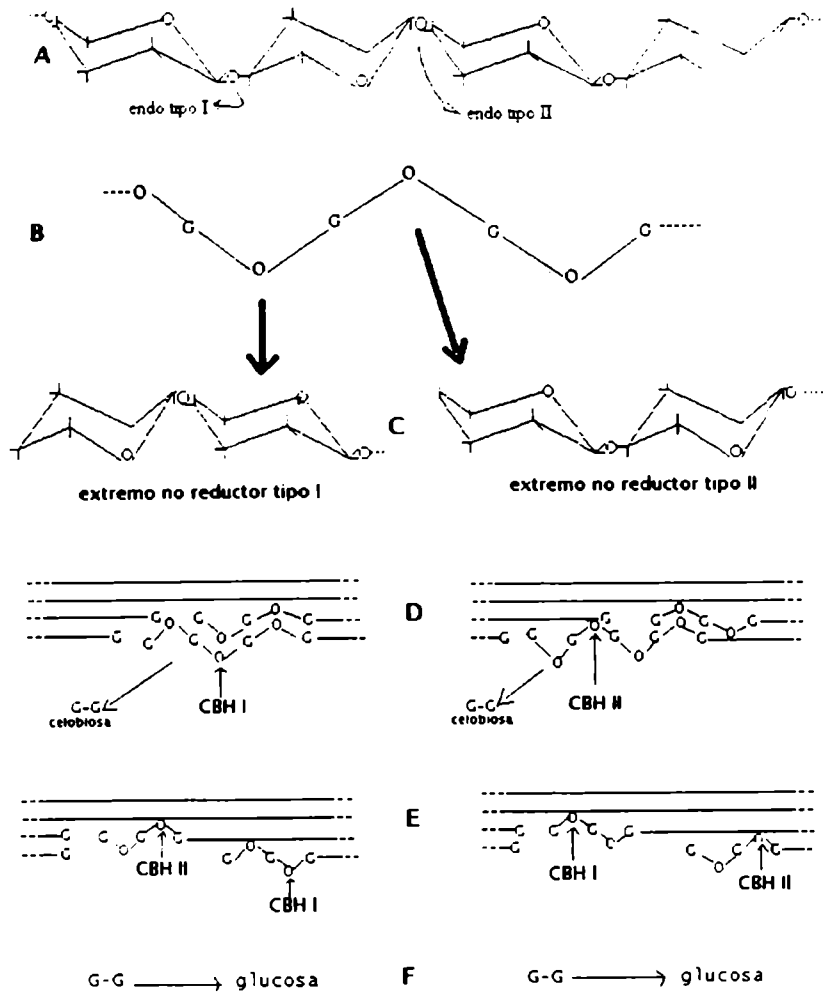


Figura 9: Modo de acción del sistema celulolítico.

A: molécula de celulosa.

B: representación de los dos tipos de enlaces presentes en la molécula de celulosa.

C: moléculas resultantes de la acción de dos endocelulasas.

D: ataque de dos exocelulasas.

E: liberación de nuevos sitios de ataque.

F: producción de glucosa a partir de celobiosa.

contemplando la actividad de los principales constituyentes del sistema celulolítico así como otras actividades accesorias encontradas en otros hongos.

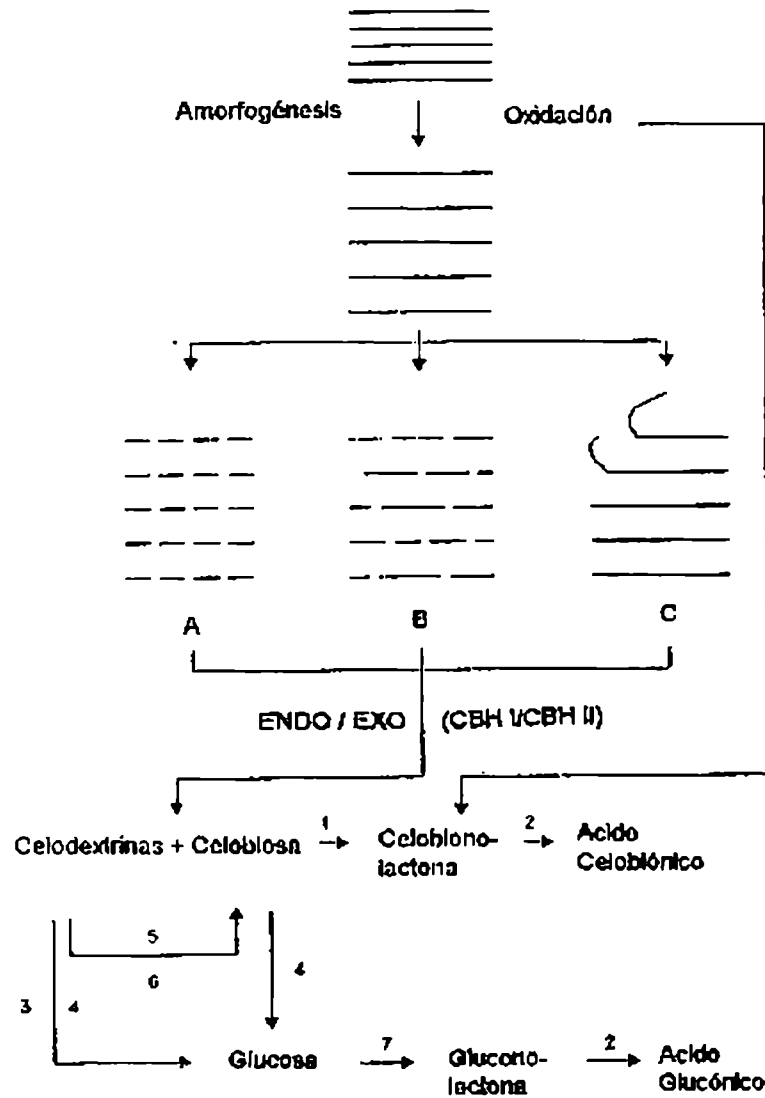


Figura 10: Modelo para la degradación fúngica de la celulosa según Coughlan y Ljungdahl (1988).

A: formación de fibras cortas, B: segmentación, C: desestratificación.

ENDO: endoglucanasa, EXO (CBH I/CBH II): exocelobiohidrolasas.

1: celobiosa oxidasa/deshidrogenasa, 2: lactonasa, 3: exoglucohidrolasa, 4:  $\beta$ -glucosidasa, 5: endoglucanasa, 6: exocelobiohidrolasa, 7: glucosa oxidasa.

Como se puede observar en la figura 10 la degradación comienza por un primer paso de amorfogénesis de la fibra de celulosa. En este paso se romperían los puentes de hidrógeno intermoleculares, que mantienen la estructura cristalina, relajando las cadenas de celulosa, que una vez hidratadas son susceptibles al ataque enzimático.

Este modelo involucra en este primer paso la segmentación, formación de fibras cortas y/o la desestratificación de la celulosa con la intervención de oxidasas y/o otras enzimas. Sin embargo, está mayormente aceptado que sería el dominio cola de unión al sustrato de las celulasas el responsable de lograr la amorfogénesis de las fibrillas.

En el sistema que poseen los hongos de pudrición castaña que no poseen exoglucanasas (Uemura et al., 1993) se vió que la fibrilla de celulosa queda reducida a las zonas cristalinas luego de la digestión de las áreas amorfas (Kleman Leyer et al., 1992). El aprovechamiento de la celulosa en este sistema es ineficiente ya que la endoglucanasa sería la única responsable de la degradación de la celulosa. Se propone también, que una oxidación no enzimática abriría la fibrilla liberando algunos productos solubles.

En el caso de los hongos de pudrición blanca, la situación es muy compleja ya que actúan simultáneamente el sistema celulolítico y el ligninolítico. Según los resultados finales de este tipo de pudrición, se sostiene el propuesto sinergismo endo-exocelulasa. Este sistema incluye además el efecto de fuertes oxidantes, producidos por las ligninasas, que podrían actuar sobre la celulosa (Jennings, 1995).

#### **1.7.4.- XILANASAS FUNGICAS**

##### **1.7.4.1.- COMPOSICION DE LOS SISTEMAS ENZIMATICOS.**

Las hemicelulasas se producen tempranamente en los procesos de pudrición y muchas veces están asociadas a la degradación de lignina (Eriksson et al., 1990). Estas enzimas degradarían las hemicelulosas en la pared celular inmediatamente adyacente al lumen y se introducirían así en la pared secundaria abriendo canales de suficiente tamaño para permitir el acceso de las enzimas degradadoras de lignina de mayor peso molecular. Las hemicelulosas degradadas proveerían de energía a los hongos ya que la

lignina sola aparentemente no sirve como sustrato para el crecimiento (Kirk y Farrell, 1987).

Dada la complejidad estructural del xilano, según la composición de la cadena principal, se requieren varias enzimas para lograr su modificación y completa degradación.

Para despolimerizar el xilano, se requieren las siguientes enzimas :

- a) endo  $\beta$ -1,4 xilanasas ( EC 3.2.1.8 )  $\Rightarrow$  esta enzima produce rupturas al azar entre unidades de xilosa, clivando los enlaces  $\beta$ -1,4. Produce una disminución drástica del grado de polimerización.
- b)  $\beta$ -D 1,4 xilosidasa ( EC 3.2.1.37 )  $\Rightarrow$  se trata de una exo enzima que ataca los dímeros de xilobiosa resultantes.
- c) Luego, las cadenas laterales son clivadas por una amplia variedad de enzimas, dependiendo de la naturaleza del xilano en cuestión.

Entre ellas se pueden encontrar las siguientes enzimas:

- i) 1,4- $\beta$ -D-glucosidasa
- ii)  $\alpha$ -L-arabinosidasa
- iii)  $\alpha$ -D-glucuronidasa
- iv)  $\alpha$ -D-galactosidasa

#### 1.7.4.2.- REGULACION

Las xilanasas, al igual que las celulasas son enzimas inducibles por sustrato y reprimibles por producto.

Dado que el xilano no es capaz de ingresar a las células, se postula que el real inductor, sería una molécula de bajo peso molecular, xilobiosa o xilotriosas. Estas serían el producto de la hidrólisis parcial del xilano que se llevaría a cabo por una muy pequeña cantidad de enzimas constitutivas, siempre presentes. También se ha logrado inducir el sistema xilanólítico en ausencia de xilano con variantes sintéticas de aril  $\beta$ -D-xilósidos y metil  $\beta$ -D-xilósidos (Bajpai, 1997).

Se ha logrado la inducción del sistema también con isómeros de posición. La inducción de las xilanasas por 1,2- $\beta$ -xilobiosa es análoga a la inducción del sistema celulolítico por soforosa (Zhu et al., 1982). Sin embargo, dado que la respuesta a la inducción con 1,2- $\beta$ -xilobiosa es muy lenta y a la evidencia de que ésta es convertida a 1,4- $\beta$ -xilobiosa, se

postula que el disacárido isómero solo estaría actuando como un precursor del real inductor natural del sistema (Biely, 1993).

Los estudios de regulación de este sistema en hongos filamentosos resulta muy difícil ya que hay una gran variedad de mecanismos de control celulares (Bajpai, 1997). Por otra parte, estos estudios se complican por la producción concurrente de xilanasas y celulasas así como por las especificidades por sustrato cruzadas entre estos dos grupos de enzimas. Por ejemplo, el sistema celulolítico de *Trichoderma reesei* QM 9414 tiene dos grupos de glucanasas que presentan actividad xilanolítica: un grupo de actividad específicamente endoxilanolítica y un segundo grupo de punto isoeléctrico más bajo ( pl 3.2-4.2 ) capaces de hidrolizar tanto celulosa como xilanos (Antranikian, 1992). Otro ejemplo de producción de xilanasas junto con la producción de celulasas se encontró en *Schizophyllum commune* (Willick et al., 1984) Este hongo crece muy pobremente en xilano sin la presencia de celulosa en el medio de cultivo.

También se ha registrado la favorable inducción de celulasas en presencia de xilano como sustrato. Esto se observó en *Streptomyces flavogriseus* (Honda et al., 1985). Resta confirmar si se trata de un real efecto inductivo por parte del xilano o si se trata de una estimulación celular por parte de una fuente de carbono más fácilmente metabolizable que la celulosa.

Al crecer en medios con xilano como fuente de carbono, varias especies son capaces de producir xilanasas específicas sin producir celulasas. Otras, como *Saccobolus saccoboloides* sintetiza tanto xilanasas como celulasas en este medio de cultivo (Magnelli, 1998). La síntesis de xilanasas en presencia de celulosa podría deberse a la existencia de un sistema regulatorio común para ambas enzimas.

#### 1.7.4.3.- ISOENZIMAS

Una gran variedad de enzimas xilanolíticas han sido reportadas en diferentes organismos. En todos los casos, se han encontrado formas múltiples para estas enzimas (Wong et al., 1988).

Se han encontrado entre tres y cinco isoenzimas xilanolíticas tanto en hongos como en bacterias (Okoshi et al., 1985; Tsujibo et al., 1990). En *Trchoderma sp.* se encontraron cinco isoenzimas. A igual que en caso de



celulasas todavía no se ha logrado esclarecer por completo la base funcional ni genética de estas formas enzimáticas.

Las isoenzimas son electroforéticamente distinguibles. Su origen puede deberse a modificaciones post traduccionales del producto de un mismo gen. Podría tratarse de diferencias de glicosilación o de proteólisis diversas. Las xilanasas de *Trichoderma* pueden o no estar glicosiladas (John y Schmidt, 1988). Se han encontrado un par de isoenzimas no glicosiladas en *T. koningii* y en *T. lignorum*. De esta manera se descartaría la teoría de diferenciación glicosídica para explicar la presencia de isoenzimas en este grupo. Incluso, el análisis de la composición aminoacídica de las isoenzimas de *T. harzianum* sugiere que éstas provienen de genes diferentes (Wong et al., 1986).

#### 1.7.4.4.- GENES DE LAS XILANASAS

El estudio de la arquitectura molecular de los genes de xilanasas fúngicas es más reciente y por lo tanto menos desarrollada que el estudio de las celulasas fúngicas. *T. reesei* es el organismo en el cual se han concentrado los mayores esfuerzos (Torronen et al., 1992).

Al comparar las secuencias aminoacídicas de la región catalítica de las diferentes xilanasas estudiadas (Bajpai, 1997), se las dividió en dos grupos o familias:

- 1) de bajo peso molecular, conteniendo 182-234 aminoácidos.
- 2) De alto peso molecular, conteniendo 269-809 aminoácidos.

Se ha demostrado que estas dos xilanasas se producen simultáneamente en *Bacillus subtilis* y *Clostridium acetobutylicum* (Wong et al., 1988) pero no se sabe si esta unidad genética presente en bacterias también corresponde a una unidad genética en hongos filamentosos.

#### 1.7.4.5.- MODO DE ACCION

Las enzimas que degradan las hemicelulosas son primariamente hidrolíticas y el patrón de ataque es análogo al de la degradación de celulosa por las celulasas. Sin embargo las exoenzimas están ausentes, debido probablemente al bajo grado de polimerización del sustrato (<200).

Dado que las hemicelulosas son heteropolímeros constituidos por diferentes azúcares, cadenas laterales y grupos sustituyentes, los procesos enzimáticos involucrados en su degradación son complicados y están recién comenzando a ser dilucidados (Zabel y Morrel, 1992).

Las xilanasas son el grupo de enzimas más estudiadas entre las hemicelulasas ya que el xilano es el componente hemicelulolítico más abundante.

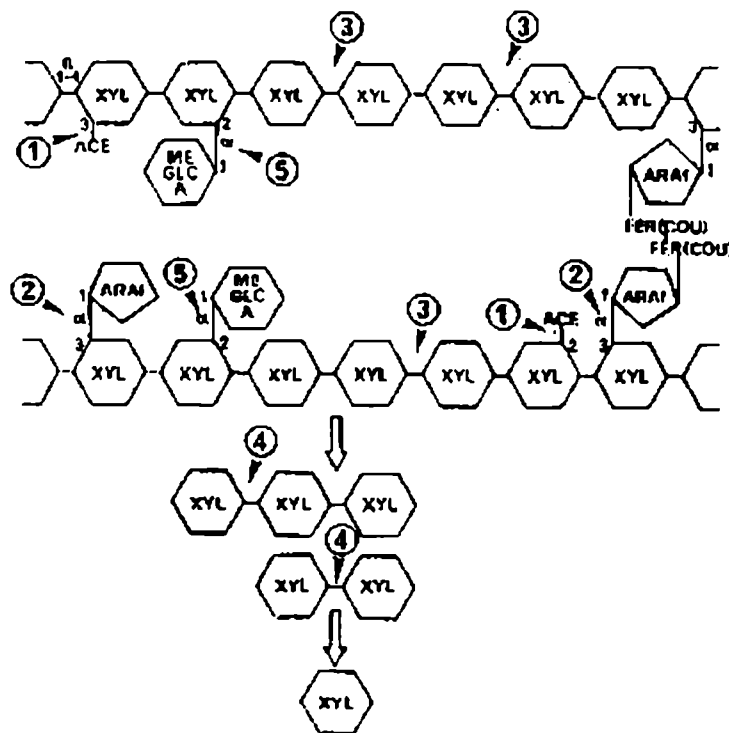


Figura 11: Enzimas involucradas en la degradación del xilano.

ACE: ácido acético, ARAf: arabinofuranosa, COU: ácido cumárico, FER: ácido ferúlico, MEGLCA: ácido metil glucurónico 4-O-metilglucurónico, xyl: xilosa. 1: acetilxilano esterasa, 2:  $\alpha$ -arabinofuranosidasa, 3: endoxilanasas, 4:  $\beta$ -xilosidasas, 5:  $\alpha$ -glucuronidasas.

La primer enzima en atacar el sustrato es la  $\beta$ -1,4-endoxilanasas. Esta produce rupturas del enlace glicosídico al azar dentro de la cadena

principal del xilano, causando una disminución en el grado de polimerización (ver figura 11). Producto de esta acción se liberan al medio xilooligosacáridos, xilobiosa y xilosa. La  $\beta$ -xilosidasa, una exoenzima ejerce su acción luego, usando como sustrato los xilooligosacáridos y la xilobiosa y actuando a partir de los extremos no reductores de estas moléculas previamente liberadas por la endo xilanasa. Así, se obtiene como producto la xilosa.

Sin embargo un sistema xilanolítico completo requiere también de las enzimas que actúan sobre sus ramificaciones (Biely, 1993; Zabel y Morrel, 1992; Joseleau y Ruel, 1994).

### 1.7.5.- AMILASAS.

#### 1.7.5.1.- COMPOSICION DEL SISTEMA ENZIMATICO.

Se conocen actualmente distintos tipos de amilasas que difieren entre sí según el modo de acción (Robyt, 1984; Manjunath et al., 1983):

- $\alpha$ -amilasas (EC 3.2.1.1)  $\Rightarrow$  estas son endo enzimas que solo clivan las uniones  $\alpha$ -1,4; pasando por alto las uniones  $\alpha$ -1,6.
- $\beta$ -amilasas ( EC 3.2.1.2)  $\Rightarrow$  estas son exo enzimas que clivan las uniones  $\alpha$ -1,4; pero se detienen ante una unión  $\alpha$ -1,6. Causa una inversión de la configuración, liberando  $\beta$ -maltosa.
- Amiloglucosidasa ( EC 3.2.1.3)  $\Rightarrow$  estas son exo enzimas que clivan tanto uniones  $\alpha$ -1,4; como  $\alpha$ -1,6.
- $\alpha$ -glucosidasas ( EC 3.2.1.20 )  $\Rightarrow$  esta enzima actúa clivando tanto enlaces  $\alpha$ -1,4; como  $\alpha$ -1,6. Es una exoenzima que libera unidades de glucosa de configuración  $\alpha$ . No posee gran afinidad por los polisacáridos, su principal sustrato es la maltosa y otros oligosacáridos.
- Enzimas desramificantes: clivan los enlaces  $\alpha$ -1,6 exclusivamente.
  - i.- isoamilasas; ii.- pululanasa I y iii.- pululanasa II.
- Ciclodextrin glicosiltransferasa (EC 2.4.1.19)  $\Rightarrow$  esta enzima solo ha sido encontrada en bacterias. Produce una serie de dextrinas cíclicas a partir de los polisacáridos.

Las  $\alpha$ -amilasas son las amilasas más ampliamente distribuidas, producidas por una amplia variedad tanto de bacterias como de hongos, animales y plantas. Las  $\alpha$ -amilasas obtenidas principalmente de

*Aspergillus niger* y *A. oryzae* se diferencian de las amilasas bacterianas por ser termolábiles, poseer un pH óptimo más ácido y poseer un alto poder sacarificante. Los productos de su hidrólisis son oligosacáridos de diferente longitud, debido a su modo de acción. Se trata de una endo - enzima, que ataca los enlaces glucosídicos al azar y lejos de los extremos de la molécula.

Esta enzima ha sido también aislada en hongos filamentosos como *Fusarium oxysporum*, *Mucor pusillus*, *Trichoderma viride* y *Humicola insolens* (Antranikian, 1992) .

Tabla 3: Producción de  $\alpha$ -amilasas por levaduras en medios semisólidos (Linardi et al., 1990).

Cepa	Actividad $\alpha$ -amilasa (AE/ml)
<i>Aureobasidium pululans</i>	100
<i>Candida edax</i>	8.4
<i>C. fomata</i>	162
<i>C. parapsilopsis</i>	4.9
<i>C. silvicola</i>	5.7
<i>C. steolytica</i>	9.5
<i>Cryptococcus sp.</i>	3.8
<i>Cr. luteolus</i>	7.6
<i>Debaryomyces vanreiji</i>	6.7
<i>Rhodotorula glutinis</i>	3
<i>Trichosporon terretre</i>	2

En general las  $\beta$ -amilasas, son de origen vegetal y actúan como exo - enzimas a partir del extremo no reductor de la molécula de almidón. Sus productos de hidrólisis son principalmente maltosas y dextrinas limites ya que no pueden hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,6 presentes en el almidón.

En hongos las enzimas amilolíticas están representadas por la  $\alpha$ -amilasa y la amiloglucosidasa mayoritariamente aunque recientemente se ha citado la presencia de  $\beta$ -amilasas en el sobrenadante de cultivo de

*Syncephalastrum racemosum* al hacerlo crecer en un medio con almidón como única fuente de carbono (Ray y Chakraverty, 1998).

Las amiloglucosidasas son también exo-enzimas que liberan  $\beta$ -D-glucopiranosas a partir del extremo no reductor de la molécula de almidón. También han sido aisladas a partir de cultivos líquidos de *A. niger* y *A. oryzae* (Takahashi et al., 1981). Son enzimas típicamente producidas por hongos, muy poco representadas entre los organismos procariontes. Difieren de las  $\beta$ -amilasas ya que no producen dextrinas límites y no producen inversión anomérica. Catalizan la ruptura de enlaces tanto  $\alpha$ -1,4, como  $\alpha$ -1,6; aunque con diferente velocidad, siendo mayor su afinidad por los enlaces  $\alpha$ -1,4. Son las únicas capaces de degradar el almidón a sus monómeros constituyentes de glucosa.

Tabla 4: Producción de amiloglucosidasas en hongos.

Organismo	Temp. Óptima de crec. (°C)
<b>Levaduras</b>	
<i>Candida tsukubaensis</i>	29
<i>Cephalosporium resiniae</i>	30
<i>Endomycopsis fibuligera</i>	32
<i>Saccharomyces cereviceae</i>	25
<i>Schwanniomyces alluvius</i>	30
<i>Pichia polymorpha</i>	28
<b>Hongos filamentosos</b>	
<i>Aspergillus awamori</i>	30
<i>A. candidus</i>	28
<i>A. niger</i>	28
<i>A. oryzae</i>	30
<i>Aureobasidium pullulans</i>	25
<i>Humicola lanuginosa</i>	37
<i>Mucor rouxianus</i>	30
<i>Penicillium oxanicum</i>	30
<i>Rhizopus nodosus</i>	28
<i>Trichoderma viride</i>	29

El estudio de cepas filamentosas amilolíticas con fines industriales está centrado en especies del género *Aspergillus* y *Mucor* principalmente, aunque existen registros de numerosas cepas tanto de levaduras como de hongos filamentosos (tabla 3 y 4).

#### 1.7.5.2.- MODO DE ACCION.

Son varias las enzimas que degradan el almidón. Las amilasas se dividen en dos grupos. Las endoenzimas:  $\alpha$ -amilasas y las exoenzimas:  $\beta$ -amilasas y las glucoamilasas. En la figura 12 se muestra como el almidón es degradado a glucosa y/o otros componentes por diferentes enzimas.

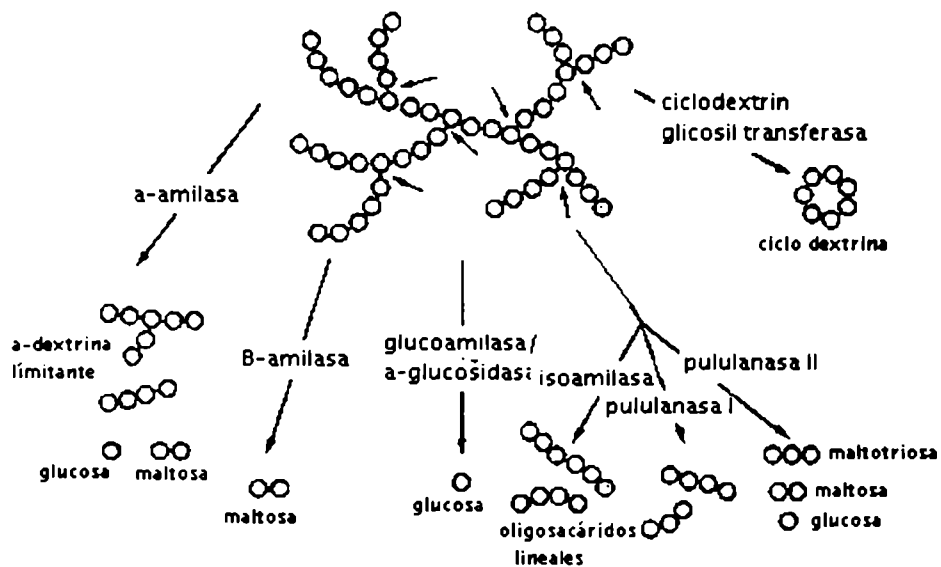


Figura 12: degradación del almidón.

#### 1.7.5.3.-GENES DE AMILASAS

La mayoría de los estudios genéticos de las  $\alpha$ -amilasas se han realizado en el género bacteriano *Bacillus*. Se ha clonado el gen (*amyE*) de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis*. Este ha sido mapeado en el cromosoma y

también se han transformado otras especies del mismo género con este gen (Antranikian, 1992).

Otros tres genes (sacU, pap, amyB) están también involucrados en la producción de  $\alpha$ -amilasa en *B. subtilis*. Organismos mutagenizados en estos genes han aumentado su producción enzimática. También se han mutagenizado cepas de *Aspergillus niger* lográndose cepas sobreproductoras.

En el caso de la glucoamilasa, se sabe que el número de genes que codifican para esta enzima varía según el organismo en cuestión. Se ha logrado clonar y secuenciar un gen de *Aspergillus awamori*. Este único gen codifica para dos formas de esta enzima, corroborando la presencia de isoenzimas en este sistema enzimático (Antranikian, 1992). *A. niger* y *Rhizopus oryzae*, también tienen un solo gen que codifica para esta enzima.

#### 1.8.- APLICACIÓN DE LAS ENZIMAS FUNGICAS EXTRACELULARES.

Tanto en la industria agrícola como en la química el interés por el uso potencial de las enzimas fúngicas degradativas es de interés a nivel mundial. El objetivo principal es producir glucosa para alimentos, tanto para animales como para el consumo humano, así como para elaborar otros productos derivados de ella.

La posibilidad de utilizar materiales celulósicos a partir de desechos agrícolas, urbanos, forestales e industriales de una manera efectiva y eficiente será posible solo a través de una optimización en la caracterización, entendimiento y producción de los sistemas enzimáticos involucrados en su descomposición.

La intensa investigación actual sobre la producción de enzimas extracelulares que actúan sobre la biomasa promueve el desarrollo de tecnologías basadas en la hidrólisis parcial o modificación de los biopolímeros. Hoy en día no es económicamente posible utilizar materiales lignocelulósicos que enfrentan la competencia de otros materiales. La producción de alcohol a partir de celulosa no resulta atractivo ya que la destilación de un exceso de vinos para producir etanol resulta más económico que producir glucosa de esta manera.

La hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos para la producción de monosacáridos puede resultar económicamente posible a nivel industrial, hoy en día existen algunos casos especiales como lo es la producción de xilitol a partir del monómero xilosa proveniente de degradar el xilano en forma enzimática.

Se pueden encontrar en el mercado varias preparaciones comerciales de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas y amilolíticas. Estas preparaciones contienen una mezcla de enzimas:

**Tabla 5: Preparaciones enzimáticas comerciales.**

<b>Celulolíticas</b>	<b>Celobiohidrolasa</b>
	<b>Endo-1,4-<math>\beta</math>-glucanasa</b>
	<b><math>\beta</math>-glucosidasa</b>
<b>Hemicelulolíticas</b>	<b>Endo-1,4-<math>\beta</math>-xilanasasa</b>
	<b><math>\beta</math>-xilosidasa</b>
	<b><math>\beta</math>-manosidasa</b>
	<b><math>\alpha</math>-arbinosidasa</b>
	<b><math>\alpha</math>-galactosidasa</b>
	<b><math>\alpha</math>-glucuronidasa</b>
	<b>Acetyl esterasa</b>
<b>Pectinolíticas</b>	<b>Endopoligalacturonasa</b>
	<b>Exopoligalacturonasa</b>
	<b>Pectinesterasa</b>
	<b>Pectinliasa</b>
<b>Ligninolíticas</b>	<b>Oxidasas</b>
	<b>Deshidrogenasas</b>
	<b>Peroxidasas</b>
<b>Amilolíticas</b>	<b><math>\alpha</math>-amilasa</b>
	<b><math>\beta</math>-amilasas</b>
	<b>glucoamilasas</b>
	<b>pululanasa I</b>
	<b>pululanasa II</b>



Algunas preparaciones enzimáticas comerciales incluyen mezclas de varios de estos grupos enzimáticos.

La composición de una preparación enzimática mixta se puede lograr con la correcta elección del hongo en cuestión, así como la correcta elección del sustrato y condiciones de producción. Si se desea una preparación de una única especie enzimática se debe recurrir a la ingeniería genética o a métodos más precisos de purificación.

El organismo más frecuentemente utilizado para producir celulasas es *Trichoderma reesei*, aunque también se utilizan *Talaromyces emersonii* y el hongo termófilo *Thermoascus aurantiacus* (Coughlan y Ljungdahl, 1988).

Al producir estas enzimas naturalmente, se obtiene una mezcla enzimática que no siempre es deseada. Si se utilizan en el biopulpado de celulosa, se obtiene un producto de menor calidad por rupturas no deseada de las fibras de celulosa. El sinergismo excesivo de estas enzimas puede prevenirse planificando sistemas de producción para enzimas individuales. Estos preparados de enzimas individuales tendrán su mayor uso en la industria del papel.

*Trichoderma reesei* ha resultado también buen productor de enzimas xilanolíticas. De las enzimas hemicelulolíticas, la  $\beta$ -xilosidasa, junto con otras enzimas, es especialmente necesaria en la hidrólisis de líquidos residuales de los biopulpados a monosacáridos (Poutanen y Puls, 1989).

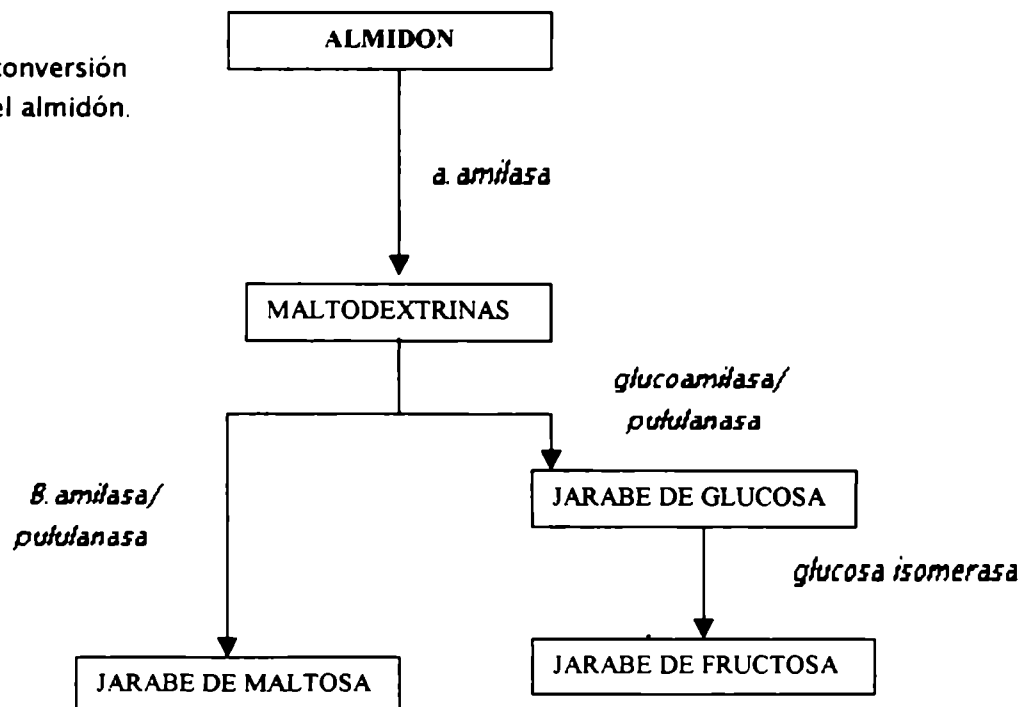
La preparación de mezclas enzimáticas xilanolíticas que no contengan enzimas celulolíticas, es también de sumo interés, por ejemplo en la industria papelera. Estas se pueden separar por ultrafiltrado, inactivación selectiva y/o tratamientos térmicos.

Dado que ya han sido clonados varios genes, la clonación molecular y la ingeniería genética parecen ser en el futuro cercano un método efectivo para obtener preparaciones comerciales de enzimas xilanolíticas completamente libres de actividad celulolítica.

En la industria papelera, la utilización de xilanasas en un tratamiento anterior al blanqueado favorece la extracción posterior de la lignina. Se reduce un 25% la utilización de cloro activo, lo que se traduce en la liberación de 10 kg menos de dióxido de cloro por tonelada de pulpa producida.

Las amilasas son muy utilizadas industrialmente para producir detergentes, así como diferentes tipos de jarabes, como se puede ver en la figura 13.

Fig. 13: Bioconversión Industrial del almidón.



Otra utilización de las levaduras amilolíticas es la posibilidad de aprovechar desechos de bajo contenido proteico. Al ser utilizado como sustrato de estas levaduras, se producen un material enriquecido en proteínas que es utilizado como alimento para animales (Linardi et al., 1990).

La producción de etanol a partir de desechos provenientes de almidón, ya esta siendo aprovechada. Se produce así no solo combustible, sino etanol para la producción de diferentes tipos de bebidas de bajo contenido alcohólico. Esta línea de investigación incluye la construcción de cepas recombinantes de levaduras amilolíticas (Antranikian, 1992).

Un enfoque novedoso es la transformación de levaduras. Se logró producir en *Saccharomyces cereviceae*, celulasas de *T. reesei* (Salohemio et al., 1997) y de *Aspergillus* (Murai et al., 1997). Estas cepas servirían para lograr ciertos procesos de bioconversión en un solo paso (Van Rensburg et al., 1998). Se usan exitosamente en la vinificación dando un producto con mejor aroma gracias a la acción de las enzimas sobre el mosto de la uva.

Recientemente, también se han logrado transformar cepas de *Saccharomyces cereviceae*, *Schizosaccharomyces pombe* y de la bacteria *E. coli* con el gen que codifica para una celulasa (EG.III) de bajo peso molecular de *Trichoderma reesei QM9414* (Okada et al., 1998). Esta enzima heteróloga ya ha sido sintetizada e incluso caracterizada.

## *Materiales y métodos*

---

## M.1. ORGANISMO

### M.1.1- ORIGEN

Este trabajo se realizó con la cepa monospórica de *Ascobolus gamundii* aislado originalmente de estiércol de vaca, BAFC 2719.

*Ascobolus gamundii* (Dokmetzian, Ranalli)

Familia. :Ascobolaceae

Orden: Pezizales

Subclase: Ascomycotina.

División: Amastigomycotina.

Reino: Fungi.

### M.1.2.- MANTENIMIENTO Y OBTENCION DEL INOCULO

La cepa de *Ascobolus gamundii* fue mantenida en tubos de ensayo en pico de flauta conteniendo medio PF a 5 °C , luego de crecer durante 10 días a 23 °C; repicándose periódicamente.

Al cabo de dos años de uso y repiques continuos, se revigorizó la cepa aislada originalmente, ya que ha sido descrito un lento decaimiento fúngico a través del tiempo al crecer en medios sintéticos y con los sucesivos repiques (Forchiassin y Diorio, 1994). Para ello se cultivó la cepa en estiércol, a fin de obtener nuevas cepas monospóricas. Dado el carácter heterospórico de *Ascobolus gamundii*, y para garantizar una homogeneidad en el trabajo, se procedió a seleccionar de las nuevas cepas, aquellas que tenían la misma compatibilidad sexual que la utilizada hasta entonces. Este recaudo fue tomado ya que se han citado diferencias de comportamiento fisiológico entre cepas de diferente compatibili-



$\text{Cl}_2\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.09 mg
$\text{BO}_3\text{H}_3$	0.07 mg
$\text{MoO}_2\text{Na}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02 mg
$\text{Cl}_3\text{Fe}$	1 mg
$\text{Cl}_2\text{Zn}$	10 mg
Biotina	5 ug
Tiamina	100 ug
Fuente de carbono variable : 10 g/l	
Agua bidestilada: hasta 1000 ml	

#### M.2.2.2.- MEDIOS PARA EVALUAR LA FUENTE DE CARBONO EN LA PRODUCCION DE ENZIMAS:

# Se utilizó el medio basal, alternando las siguientes fuentes de carbono:

glucosa	10 g/l
CMC	10 g/l
maltosa	10 g/l
celobiosa	10 g/l
lactosa	10 g/l
xilano	10 g/l
almidón	10 g/l
celulosa cristalina	10 g/l
Celulosa cristalina	5 g/l, junto con xilano 5 g/l

### **M.2.2.3.- MEDIOS PARA EVALUAR LA FUENTE DE NITROGENO EN LA PRODUCCION DE ENZIMAS:**

Se utilizó el medio basal, con celulosa cristalina como fuente de carbono, alternando las siguientes fuentes de nitrógeno, de manera de obtener en todos los casos una concentración final de 0.75 g de nitrógeno/l:

Nitrato de amonio	2.14 g/l
Fosfato de amonio	3.48 g/l
Sulfato de amonio	3.53 g/l
Tartrato de amonio	4.93 g/l
Glutamina	3.92 g/l
Casaminoácidos	7.5 g/l
Fenilalanina	8.93 g/l
Asparagina	4 g/l

### **M.2.2.4.-MEDIOS PARA EVALUAR EL EFECTO DE SURFACTANTES EN LA PRODUCCION ENZIMATICA:**

Se utilizó el medio basal, con celulosa cristalina como fuente de carbono y asparagina como fuente de nitrógeno. Se agregaron dos surfactantes al medio de cultivo:

i) Tween 80: se agregó por separado a cada Erlenmeyer en concentraciones variables (entre 25 y 400 ul, dependiendo de la concentración final requerida ).

ii) Carbopol: se agregó por separado en cada Erlenmeyer en una concentración final de 0.1%.



**M.2.2.5.- MEDIOS PARA EVALUAR LA INDUCCION DE ENZIMAS EXTRACELULARES:****# MEDIO DE REEMPLAZO:**

SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O	0.25 g/l
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0.25 g/l
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub>	0.3 g/l

Inductor: se agregaron los siguientes inductores al medio en las concentraciones indicadas en el texto ( entre 0.1 % y 1 % ):

celulosa cristalina  
carboximetilcelulosa  
xilano  
almidón  
celobiosa  
maltosa  
xilosa  
lactosa  
fructosa  
sorbitol

### M.3- PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

En los casos en que se utilizaron polisacáridos insolubles, estos fueron pesados por separado en cada Erlenmeyer. Los surfactantes fueron agregados como soluciones a cada Erlenmeyer para evitar la formación de espuma excesiva.

Todos los medios fueron autoclavados a 121 °C, 1.2 atm. por 20 minutos.

Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico.

### M.4- CONDICIONES DE CULTIVO.

Los cultivos líquidos se llevaron a cabo en Erlenmeyers de 125 ml. conteniendo 50 ml. de medio e inoculados con un taco de 0.5 cm de lado tomados de el borde de una colonia de *A. gamundii* creciendo en agar-agua por 7 días. La masa inicial de micelio, así como la cantidad de sustrato presente en el taco, que se incorporaron a los cultivos se considera despreciable en un estudio de cinética de crecimiento.

Los Erlenmeyers fueron incubados en una cámara New Brunswick Psicrotherm G - 27 a una temperatura constante de 23 ± 0.25 °C y en agitación continua a 125 r. p. m. La iluminación fue constante, provista por un panel de tubos fluorescentes Philips Luz Día de 20 Watt, con una luminancia total de 4700 lux medida en la base de la platina de soporte.

## M.5- METODOS ANALITICOS.

### M.5.1 – COSECHA DEL MICELIO.

La cosecha se realizó por filtración en embudo Buchner de 7 cm de diámetro a presión reducida, sobre discos de papel de filtro Whatman GP o Schleicher & Schull # 595. El micelio junto con los sólidos de cultivos (en el caso de cultivos con polímeros insolubles, estos quedan retenidos junto con el micelio al cosecharse por filtración ) fueron lavados con agua bidestilada y llevados a estufa de 70 °C durante 18 horas, pesados, molidos y guardados a -20 °C hasta ser utilizados. El sobrenadante de cultivo se fraccionó en tubos Polistor, se rotularon y también se guardaron a - 20 °C.

En los casos de las curvas de crecimiento las cosechas se realizaron a intervalos de tiempo pre establecidos. En el resto de los casos se cosechó al día de mayor actividad enzimática, este dato fue obtenido para cada enzima a partir de las curvas de crecimiento y de producción enzimática.

### M.5.2 – ESTIMACION DEL CRECIMIENTO

#### M.5.2.1. – PESO SECO DEL MICELIO.

En los casos en que se utilizaron medios de cultivo con fuentes de carbono solubles, la estimación del crecimiento se realizó utilizando la medida de peso seco. Este dato se obtuvo, luego de pesar el micelio retenido en el papel de filtro, previamente lavado y secado hasta peso constante. Los resultados se expresaron como mg de micelio / ml de medio de cultivo.

#### M.5.2.2. – PROTEINAS TOTALES DE MICELIO

En los casos en que se utilizaron medios de cultivo conteniendo fuentes de carbono insolubles o en suspensión, es imposible separar el

micelio para dosar el crecimiento por la determinación del peso seco, por lo tanto se estimó el crecimiento indirectamente dosando las proteínas totales de micelio.

Se tomaron 50 mg de los sólidos de cultivo secos, se molieron en un mortero de porcelana y se realizó una hidrólisis alcalina con 1 ml de NaOH 1 N durante 30 minutos a 100 °C. Las muestras se centrifugaron 20 minutos a 1000 x g. Se descartó el precipitado y se dosaron las proteínas en el sobrenadante según el método de Bradford ( 1976 ).

Se realizó una curva patrón utilizando BSA 1 mg/ml en NaOH 1 N como estándar. Los resultados se expresaron como ug de proteína / ml. de medio de cultivo.

### **M.5.3. – VALORACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS**

#### **( ENSAYOS ESTANDAR )**

Se utilizó siempre el sobrenadante de cultivo (crudo enzimático) como fuente enzimática.

#### **M.5.3.1.– SISTEMA CELULOLITICO.**

##### **M.5.3.1.i.– *Actividad endo- $\beta$ -D-1,4-gluconasa ( E.C. 3.2.1.4 )***

Se incubó 0.1 ml de sobrenadante de cultivo con 0.4 ml de CMC 0.5% en buffer Acetato de sodio 0.1 M (pH = 4.8) durante 1 hora a 50 °C y se determinaron azúcares reductores por el método de Somogyi (1952)– Nelson (1944).

Se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Spectronical (Milton Roy Co.) y esta fue transformada, luego de la sustracción del blanco de sustrato y de sobrenadante, a  $\mu$ g equivalentes de glucosa

liberados, utilizando una curva patrón con glucosa 1 mg/ml en el mismo buffer de reacción como estándar.

**Unidad de actividad enzimática (UE) :** se define como una unidad enzimática, a la cantidad de enzima necesaria para liberar, en las condiciones del ensayo, 1 nmol de azúcar reductor por minuto, expresado como equivalente de glucosa por ml de cultivo.

#### **M.5.3.1.ii. – *Actividad exo-β-D-1,4-glucanasa ( E.C. 3.2.1.91 )***

Se incubó 0.1 ml de sobrenadante de cultivo con 0.4 ml de celulosa cristalina 1% en buffer Acetato de sodio 0.1 M (pH = 4.8 ) durante 1 hora a 50 °C en un baño con agitación continua. Se determinaron azúcares reductores por el método de Somogyi (1952 )– Nelson (1944). La absorbancia resultante fue transformada en µg equivalentes de glucosa con la misma metodología utilizada para la endo-β-D-1,4-glucanasa (pto. 5.3.1.i.), definiéndose también de la misma manera una unidad enzimática ( UE ).

#### **M.5.3.1.iii. – *Actividad β-glucosidasa ( E.C. 3.2.1.21 )***

Se incubó 0.1 ml de sobrenadante de cultivo con 0.9 ml de p-nitrofenil-β-D-1,4-glucopiranosido (0.2 mg / ml, en buffer Acetato de sodio 0.1 M pH = 4.8 ) durante 1 hora a 50 °C. La reacción se paró agregando 2 ml de buffer Clark – Lubs 25 mM ( pH = 9.8 ) y la absorbancia se leyó a 445 nm contra el blanco de sustrato. La absorbancia obtenida se transformó a µg de p-nitrofenol liberados utilizando una curva patrón de p-nitrofenol 1 mg / ml en el mismo buffer de la reacción como estándar.

**Unidad de actividad enzimática ( UE ):** se define como una unidad enzimática, a la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 nmol de p-

nitrofenol por minuto, en las condiciones del ensayo, por ml de medio de cultivo.

*Nota: Estos ensayos son adaptaciones de trabajos de determinación de enzimas celulolíticas (Wood, 1971; Mandels et al, 1976; Wood y Mahalingeshwara Bhat, 1988 ; Sharrock, 1988 ).*

### **M.5.3.2.- SISTEMA XILANOLITICO**

#### **M.5.3.2.i.- *Actividad endo-xilanasa ( E.C. 3.2.1.8 )***

Se incubó 0.1 ml de sobrenadante con 0.4 ml de xilano 0.2% en buffer Acetato de sodio 0.1 M ( pH = 5 ) durante 30 minutos a 50 °C y se determinaron azúcares reductores por el método de Somogyi - Nelson. La absorbancia obtenida fue transformada a  $\mu\text{g}$  equivalentes de glucosa, luego de restarle los blancos adecuados, utilizando la misma metodología que la aplicada a la endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa ( pto. 5.3.1.i. ). Para determinar una unidad enzimática ( UE ) se siguió también el mismo criterio usado con la enzima antes mencionada.

#### **M.5.3.2.ii.- *Actividad $\beta$ -xilosidasa ( E.C. 3.2.1.37 )***

Se incubó 0.1 ml de sobrenadante de cultivo con 0.4 ml de p-nitrofenil  $\beta$ -D-1,4-xilopiranosido (0.1 % en buffer Acetato de sodio 0.1 M pH = 5) durante una hora a 50 °C. La reacción se paró agregando 2 ml de buffer Clark - Lubs ( pH = 9.8 ) y se leyó la absorbancia a 445 nm. Se utilizó la misma metodología que en el caso de la  $\beta$ -glucosidasa ( pto. 5.3.1.iii.), definiéndose de la misma manera una unidad enzimática (UE).

### M.5.3.3.- SISTEMA AMIOLITICO

#### M.5.3.3.i.- *Actividad del complejo amilasa.*

Para medir la actividad amilolítica en general, se incubó 0.1 ml del sobrenadante de cultivo con 0.4 ml de almidón soluble 2% en buffer Acetato de sodio 0.1 M ( pH = 5) durante 30 minutos a 50 °C. Se midieron azúcares reductores por el método de Somogyi - Nelson y la absorbancia fue transformada de la misma manera que en el caso de la endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa ( pto. 5.3.1.i. ), definiéndose de la misma manera una unidad enzimática ( UE ) .

#### M.5.3.3.ii.- *Actividad $\alpha$ -amilasa (E C 3.2.1.1).*

Se incubó 0.05 ml del sobrenadante de cultivo con 1 ml de almidón soluble 0.1 % en buffer Acetato de sodio 0.1 M (pH = 5 ) durante 7 minutos a 50 °C. La reacción se paró agregando 1 ml de iodo 5 % ( en HCl 0.02 M ). Se agitó cada muestra por inversión y se agregaron ocho ml de agua destilada a cada una. Se leyó la absorbancia resultante a 640 nm.

Unidad de actividad enzimática : se define como una unidad enzimática, a la cantidad de enzima contenida en 100 ml de muestra que puede hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos en las condiciones de la reacción.

#### M.5.3.3.iii.- *Actividad glucoamilasa (E C 3.2.1.3).*

Se incubó 0.1 ml de sobrenadante con 0.5 ml de almidón soluble 0.5% en buffer Acetato de sodio 0.1 M ( pH = 5 ) durante 10 minutos a 50 °C. La reacción se paró hirviendo las muestras por 3 minutos. Final-

mente se mide la liberación de glucosa dosándola por el método de glucosa oxidasa ( ver pto. 5.6.9).

Unidad enzimática ( UE ) : se define como una unidad enzimática, a la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 ug de glucosa por minuto por mililitro de medio de cultivo en las condiciones de la reacción.

#### **M.5.4 – VALORACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN PLACA.**

##### **M.5.4.1. – SISTEMA CELULOLITICO**

Se utilizó el método de Magnelli et al. (1997) especialmente en los casos en que, debido a la composición del medio de cultivo, el método estándar de Somogyi (1952) – Nelson (1944), resultaba ineficiente, dadas las interferencias producidas por los extremos reductores de disacáridos y monosacáridos presentes.

Se prepararon cajas de Petri estériles con 25 ml de un medio base (AA 2 %), sobre el cual se agregaron 20 ml del medio reactivo (CMC 0.5 %, agar 1.7 %). Con un sacabocado de 0.5 cm de diámetro se perforó la capa superior, dejando pocillos de igual volumen. En cada pocillo se pusieron 50 µl de sobrenadante de cultivo y se incubó 5 horas a 50 °C. A las 5 horas se sacaron las cajas de la estufa y se inundaron con Rojo-Congo 0.1 % (acuoso) durante 20 minutos. Se volcó el colorante y se lavó el exceso con NaCl 1N. La actividad enzimática se visualiza como un halo de hidrólisis incoloro sobre un fondo rojo uniforme. Se midió finalmente el halo producido alrededor de cada pocillo y se calculó el área de cada halo como medida de la actividad enzimática en cada caso.

##### **M.5.4.2.– SISTEMA XILANOLÍTICO.**

Se utilizó el mismo método que el utilizado para las celulasas, exceptuando el mdio reactivo que en este caso fue de xilano 0.5%.



#### **M.5.4.2. – SISTEMA AMIOLITICO.**

Este método, se utilizó en los mismos casos que el descrito anteriormente, cuando las interferencias del medio con el método de Somogyi (1952)- Nelson (1944) así lo requirieron.

Se prepararon cajas de Petri estériles con 25 ml del medio base (AA 2 %) y se les agregó 20 ml del medio reactivo (almidón soluble 0.1 % , agar 1.7 %) y se perforaron al igual que en el caso anterior con el mismo sacabocado, obteniéndose, de la misma manera pocillos de igual volumen. Cada pocillo se llenó con 50 ul de sobrenadante de cultivo y se dejó incubando por 5 horas a 50 °C. Al cabo de 5 horas las cajas se retiraron de la estufa y se inundaron con una solución de iodo 5 % en HCl 0.02 M durante 15 minutos. Se descartó el iodo y se visualizaron los halos de degradación incoloros sobre un fondo azul – celeste uniforme. Al igual que en el caso anterior, se midió el halo producido y se calculó el área como medida de la actividad enzimática en cada caso.

#### **M.5.5 CONCENTRACION DE PROTEINAS Y ENZIMAS.**

Para los casos en que se necesitó una mayor concentración de proteínas o actividad enzimática que la obtenida directamente del sobrenadante en la cosecha, se decidió rotavaporizar las muestras ya que la actividad enzimática no era afectada con este tratamiento.

#### **M.5.6. – REACTIVOS UTILIZADOS.**

##### **M.5.6.1.– Reactivo para el dosaje de azúcares reductores :**

( Somogyi, 1952; Nelson, 1944 )

##### **REACTIVO DE SOMOGYI**

##### **solución I**

$\text{CO}_3\text{Na}_2$	24 g
Tartrato de sodio y potasio	12 g

Agua bidestilada hasta 250 ml

### Solución II

$\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4 g

Agua bidestilada hasta 40 ml

### solución III

$\text{SO}_4\text{Na}_2$  180 g

Agua bidestilada hasta 500 ml.

El reactivo debe hervirse para expulsar el aire.

### PREPARACION:

A) Agregar el reactivo II al I agitando.

B) Sobre la solución I + II añadir lentamente 16 g. de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ .

C) Una vez enfriado se añade la solución III y se completa el volumen a 1000 ml con agua bidestilada. Se guarda en botella color caramelo en oscuridad.

### REACTIVO DE NELSON.

#### solución I

$\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  25 g

Agua bidestilada hasta 450 ml.

Añadir 21 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado, agitando.

#### solución II

$\text{AsO}_4\text{HNa}_2$  3 g

Agua bidestilada hasta 25 ml.

#### PREPARACION:

Se mezclan las soluciones I y II y se guarda en botella color caramelo en oscuridad. El reactivo debe dejarse reposar por lo menos 48 horas antes de usarse.

#### PROTOCOLO

A 0.5 ml de la mezcla de reacción se agregan 0.5 ml de reactivo de Somogyi y se calientan los tubos a 100 °C por 15 minutos. Luego de dejar enfriar se añaden 0.5 ml de reactivo de Nelson. se agitan los tubos y finalmente se les añade 6 ml de agua bidestilada. Se agitan los tubos por inversión si es necesario, se centrifugan 10 minutos a 1000 x g y se descarta el precipitado. Finalmente se lee la absorbancia del sobrenadante a 540 nm.

#### M.5.6.2.- REACTIVO PARA EL DOSAJE DE GLUCOSA.

(GLUCOSA OXIDASA )

##### REACTIVO

Glucosa oxidasa	30 mg
Peroxidasa	3 mg
O-dianisidina	10 mg
Buffer Tri-HCl-glicerol ( pH = 7 )	100 ml

##### Buffer Tris-HCl-glicerol:

Disolver 12.25 g. de Tris en 21.2 ml de HCl 5 N. Diluir a 250 ml con agua bidestilada y añadir 165 ml de glicerol. Ajustar el pH a 7 con HCl 5 N.

### M.6.- FRACCIONAMIENTO CELULAR.

Luego de cosechar los cultivos el día de máxima actividad enzimática, se filtró y se separó el sobrenadante de cultivo ( fracción I ). El micelio fue resuspendido en 40 ml de buffer Acetato de sodio 0.1 M ( pH = 4.8 ) y molido con un Omni 5000 en tres intervalos de 3 minutos cada uno en un baño de hielo para evitar el recalentamiento. Luego se centrifugaron las muestras a 1000 x g durante 20 minutos, dos veces. El pellet resultante se separó y constituyó la fracción de restos de membranas y paredes (fracción II ) y el sobrenadante, correspondió al citosol celular (fracción III ).

La fracción I se guardó tal cual en freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesada.

Del pellet correspondiente a la fracción II, se resuspendieron 0.2 g (equivalentes a 0.1 g de peso seco ) en 3 ml de buffer Acetato de sodio 0.1 M ( pH = 4.8 ) y se agitó en vortex por 5 minutos. Esta suspensión fue utilizada luego como fuente enzimática.

La fracción III correspondiente al citosol celular, fue dializada durante una noche contra buffer Acetato de sodio 0.1 M ( pH = 4.8 ) y fue luego utilizada también como fuente enzimática.

### M.7.- CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LOS COMPLEJOS ENZIMATICOS.

Se trabajó con los sobrenadantes de cultivo filtrados, liofilizados y guardados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de manera de incluir el menor volumen posible en las reacciones.

### **M.7.1.- pH OPTIMO**

El pH óptimo se determinó incubando las diferentes enzimas con sus correspondientes sustratos en buffer citrato fosfato borato 50 mM en un rango de pH entre 3 y 10 unidades. Para obtener las diferentes soluciones de los sustratos a los diferentes pH se disolvieron los sustratos en agua bidestilada al doble de la concentración del ensayo, de manera de poner la mitad del volumen necesario para cada reacción, completando el volumen con el buffer a los distintos pH al doble de la molaridad deseada. La valoración enzimática se realizó como se indica en el punto 5.3. de esta sección.

### **M.7.2.- TEMPERATURA OPTIMA**

La temperatura óptima se determinó incubando las enzimas a estudiar con el sustrato correspondiente, disuelto en buffer Acetato de sodio 0.1 M (pH = 4.8) al pH óptimo de cada enzima. Las reacciones se incubaron en un rango de temperaturas entre 15 °C y 70 °C. La valoración enzimática se realizó como se indica en el punto 5.3. de esta sección.

### **M.7.3.- TERMOESTABILIDAD.**

La estabilidad térmica de las diferentes enzimas se determinó pre-incubando dichas enzimas en buffer Acetato de sodio 0.1 M (pH = 4.8) al pH óptimo de cada enzima en un rango de temperaturas entre 25 °C y 70 °C hasta las 72 horas. Al cabo de los distintos períodos de tiempo se valoraron las actividades enzimáticas según se indica en el punto 5.3. de esta sección.

### **M.7.4.- CONSTANTE DE MICHAELIS - MENTEN y VMAX.**

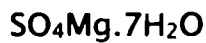
Para determinar la constante de Michaelis - Menten ( $K_m$ ) y la  $V_{max}$ , se siguió el método gráfico de Lineweaver - Burk. Se incubaron diferentes concentraciones de los sustratos correspondientes a las en-

zimas a estudiar, disueltos en buffer Acetato de sodio 0.1 M (pH = 4.8) con los sobrenadantes correspondientes y se valoró la actividad enzimática pertinente en cada caso según se indica en el punto 5.3. de esta sección.

#### **M.7.5.- EFECTO DE IONES METALICOS Y EDTA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.**

Se estudió el efecto de cationes sobre las diferentes actividades enzimáticas, a una concentración final en el ensayo de 10 mM de la sal correspondiente al igual que con el agente quelante EDTA.

Los cationes se incorporaron a la mezcla de reacción en forma de sales según la siguiente lista:



La mezcla de reacción se preparó disolviendo los sustratos correspondientes en buffer Acetato de sodio 0.1 M (pH = 4.8) al doble de concentración a utilizar y luego se completó el volumen de reacción con las soluciones de las diferentes sales disueltas en el mismo buffer también al doble de la concentración final a utilizar.

#### **M.8.- ESTUDIOS DE INDUCCION ENZIMATICA.**

Para los estudios de inducción enzimática, se inocularon Erlenmeyers de 125 ml conteniendo 50 ml del medio basl (MB) con glucosa como fuente de carbono, para obtener un buen crecimiento fúngico. Al cabo de 10 días de incubación a 23 °C con agitación continua, cuando la glucosa había sido completamente consumida se filtró el cultivo en for-

ma estéril. El micelio fue lavado con agua estéril tres veces y pasado estérilmente a otro Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 50 ml del medio inductor correspondiente (ver punto 2.2.5.).

Se varió, tanto el inductor, como su concentración en cada caso y se procedió a valorar las actividades enzimáticas a las 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas por el método en placa según se explica en el punto 5.4.1 y 5.4.2. de esta sección.

## **M.9. ESTUDIOS DE REPRESION ENZIMATICA.**

### **M.9.1.- ENSAYOS DE ADICION AL MEDIO.**

Se inocularon Erlenmeyers de 125 ml con 50 ml de medio base (MB) que contenían como fuente de carbono celulosa cristalina, xilano o almidón según la enzima a estudiar. Al cabo de 10 días de incubación a 23 °C con agitación continua, en plena etapa de crecimiento activo y cuando las enzimas extracelulares se están sintetizando y liberando al medio se agregó a los Erlenmeyers en forma estéril diferentes sustancias como posibles inhibidores. Se valoraron diferentes actividades enzimáticas antes de agregar los inhibidores (días 8 y 10) y después de agregarlos (días 12,14,17,21) como se indica en el punto 5.3. de esta sección.

## **M.10.- TECNICAS ELECTROFORETICAS.**

### **ELECTROFORESIS.**

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida en placas verticales con geles de 1mm de espesor. Las corridas se realizaron en condiciones desnaturizantes.

**M:10.1.- PREPARACION DE LOS GELES.**

Cada gel estaba constituido por dos partes, el gel empaquetador ( poro grueso ) en la parte superior, y el gel separador ( poro fino ) en el resto de la placa.

**Gel empaquetador:****solución I**

-acrilamida            10 g  
 -bisacrilamida      2.5 g  
 - Agua hasta 100 ml

**solución II**

-Tris                    5.98 g  
 -HCl 1 N                8 ml  
                               (para ajustar el pH a 6.8)  
 -Agua hasta 100 ml

**Preparación del gel.**

Agua	2.2 ml
Solución I	1.5 ml
Solución II	1.2 ml
SDS ( 10 % )	5 µl ( cuando se indica )
Temed	15 µl
Persulfato de amonio (10 % )	50 µl



**Gel separador****solución I**

-acrilamida	30 g
-bisacrilamida	0.8 g
-Agua hasta 100 ml	

**solución II**

-Tris	36.8 g
-HCl 1 N	48 ml
	(para ajustar el pH a 8.8)
-Agua hasta 100 ml	

**Preparación del gel**

Para preparar el gel separador, se utilizó la siguiente tabla, según el poro de gel deseado:

	5 %	8 %	10%
Agua (ml)	19.45	16.45	14.45
Solución I (ml)	5	8	10
Solución II (ml)	3.75	3.75	3.75
Temed ( $\mu$ l)	15	15	15
SDS 10 % (ml)	0.3	0.3	0.3
Persulfato de $\text{NH}_4$ 1.5% (ml)	1.5	1.5	1.5

**M.10.2.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS.**

Para las corridas electroforéticas se utilizaron los sobrenadantes de mayor actividad enzimática. Los sobrenadantes fueron concentrados por liofilizado. Luego se ajustó la cantidad de muestra a sembrar para poner 40  $\mu$ g. de proteínas o 4 UE en cada calle del gel. Dado que las cantidades de muestra para detectar proteínas o actividad enzimática no coincidían las muestras se prepararon por separado. En cada caso las

muestras se mezclaron en una relación 1:1 con el buffer de muestra que marcaba el frente de la corrida.

### **M.10.3.- TINCION DE PROTEINAS.**

La tinción de proteínas se llevó a cabo con Coomasie R - 250.

Una vez concluida la corrida electroforética se procedió a la fijación de las proteínas introduciendo el gel en una solución fijadora que contenía metanol 40 % y Acido acético glacial 10 % durante 20 horas. Luego se pasa el gel a un baño con la solución del colorante durante otras 20 horas y posteriormente se decolora durante un día en una solución que contiene metanol 20 % y Acido acético glacial 5 %. Para guardar el gel se lo deja en una solución de ácido acético glacial 7 %.

Junto con las muestras se sembraron proteínas marcadores de peso molecular conocido: AC- anhidrasa carbónica- (29 000), ovoalbúmina (45 000), BSA-albúmina sérica bovina- (66 000) y ureasa (110 000).

### **M.10.4.- DETECCION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL GEL.**

#### **M.10.4.1.- COMPLEJO CELULOLITICO**

##### **M.10.4.1.1.- Actividad endo- $\beta$ -D-1,4-glućanasa.**

Se siembra una muestra del sobrenadante crecido en celulosa cristalina y preparada según se indica en el punto 10.1.2. en un gel de poro 8 % con SDS. Luego de la corrida electroforética, se lava el gel en una solución de ácido cítrico 12.3 mM y fosfato de sodio 50 mM para quitar el SDS del gel.

Luego se lo coloca sobre una capa (overlay) (agar 2 %, CMC 0.1 % ) de 8 mm de espesor, asegurándose de que no quedan burbujas de aire entre el gel y el overlay. Para ello se pasa sobre ambos un tubo de hemólisis limpio a modo de rodillo. Se cubre el sandwich con parafilm y se

deja incubando una hora a 50 °C. Para revelar las bandas de actividad se sumerge el overlay en una solución de Rojo Congo 0.1 % durante 20 minutos. Pasado este tiempo se lava con una solución de NaCl 1 N. Las bandas de actividad enzimática se visualizan como bandas claras (debido a la digestión de la celulosa que estaba en el overlay) sobre un fondo rojo uniforme.

#### **M.10.4.1.2.- Actividad $\beta$ -glucosidasa.**

Se siembra una muestra del sobrenadante crecido en celulosa cristalina y preparado según se indica en el punto 10.1.2. en un gel de poro 6 % con SDS. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se lava con una solución de ácido cítrico 12.3 mM y fosfato de sodio 50 mM para quitar el exceso de SDS. Luego se sumerge un una solución de p- nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido 20 mM en buffer acetato de sodio 0.1M pH = 5 y se deja incubando a 50 °C. A los 50 minutos, se saca de este baño y se pasa a otro conteniendo buffer Clark - Lubs pH = 9.8. Las bandas de actividad enzimática se visualizan como bandas amarillo fuerte sobre un fondo transparente.

#### **M.10.4.2.- $\alpha$ -AMILASA.**

Se siembra una muestra del sobrenadante crecido en almidón y preparada según se indica en el punto 10.1.2. en un gel de poro 5% sin SDS. Luego de finalizada la corrida, se sumerge el gel en una solución de almidón soluble 1 % en el buffer Acetato de sodio 0.1 M pH = 5 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se saca el gel y se tiñe con una solución de yodo 5 % en HCl 0.02 M. Las bandas de actividad enzimáticas se visualizan como bandas incoloras (debido a la digestión del almidón) sobre un fondo azul oscuro.

#### M.10.4.3.- ENDO-XILANASA.

Se siembra una muestra del sobrenadante crecido en xilano y preparada según se indica en el punto 10.1.2. en un gel de poro 5 % con SDS. Luego de la corrida electroforética, se lava el SDS en un buffer de ácido cítrico 12.3 mM y fosfato de sodio 50 mM y se coloca el gel sobre un overlay (20 ml agar 3 %, RBB-xilano 150 mg en 10 ml de agua destilada) de 8 mm de espesor. Para asegurarse de que no queden burbujas de aire entre el gel y el overlay se pasa un tubo limpio de hemólisis a modo de rodillo. Se deja incubando a 50 °C hasta que las primeras zonas de actividad enzimática se visualicen contra luz blanca. Se saca el overlay y se puede o no dejar incubar solo un tiempo más en cámara húmeda. Luego se lo sumerge en una solución de etanol : buffer acetato de sodio 0.1 M pH = 5.4 en una relación 2 : 1 (v/v) para decolorar las zonas digeridas durante 15 horas.

Los zimogramas pueden secarse o guardarse en una solución de glicerol 5 %.

#### M.11.- ABREVIATURAS

AA: agar - agua

cc : celulosa cristalina.

cmc : carboximetil celulosa.

cc/x : celulosa cristalina y xilano

CP : carbopol

edta : tetra acetato de etilendiamina.

Fuentes nitrogenadas: SA- sulfato de amonio

NA- nitrato de amonio

TA- tartrato de amonio

FA- fosfato de amonio

GT- glutamina

FN- fenilalanina

CA- casaminoácidos

AS- asparagina

RBB - xilano: Remazol Brilliant Blue R - D - xilano.

sds : dodecil sulfato sódico.

T : tween 80

temed : N, N, N', N' tetrametil etilen diamina.

tris : 2 - amino -2 ( hidroximetil ) - 1,3 - propanodiol.

### **M.12.- DROGAS Y ANALISIS DE LOS DATOS.**

Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico.

Los resultados presentados se obtuvieron al promediar tres experimentos realizados, con un error estándar menor al 5 %.

## *Resultados y discusión*

---

## **R.1.-CINETICA DE PRODUCCION ENZIMATICA.**

Con el objetivo de analizar la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de *Ascobolus gamundii*, se estudió su crecimiento en medios con diferentes fuentes de carbono.

Dado que la producción de enzimas extracelulares, como es el caso del complejo celulolítico, es inducible y dependiente de la fuente de carbono en cuestión (Mandels y Reese, 1960), se estudió, en una primera etapa la cinética de producción y la identificación de las actividades enzimáticas de *Ascobolus gamundii* determinando así si efectivamente produce enzimas extracelulares y cuales serían dichas enzimas, dependiendo de la fuente de carbono a utilizar.

Se midieron también diferentes variables de crecimiento, para poder relacionar la posible producción enzimática con la fase de crecimiento en que se sintetizan y liberan al medio de cultivo.

### **R.1.1.-MEDIO DE CULTIVO CON GLUCOSA.**

#### **R.1.1.1.- Estimadores de crecimiento.**

Se comenzó analizando el crecimiento y la producción enzimática en el medio basal, usando glucosa como fuente de carbono. Este medio le ofrece a *Ascobolus gamundii*, una fuente de carbono fácilmente utilizable donde no se encuentra ningún posible inductor de sistemas enzimáticos extracelulares.

El crecimiento fue medido en este caso con dos variables: la medida del peso seco del micelio cosechado y el dosaje de las proteínas del micelio.

En la figura 14.a. se puede observar que el pico de biomasa coincide en el día 7 teniendo en cuenta cualquiera de las dos variables. Esto confirma la posibilidad de utilizar una u otra variable como estimador del crecimiento, según sea el caso y la necesidad.

En los primeros días, mientras aumenta la biomasa de *A. gamundii*, también aumentan las proteínas de micelio hasta llegar al máximo crecimiento (380 mg. de peso seco por Erlenmeyer ó 359 µg. de proteínas / ml de medio), luego, tanto el peso seco como las proteínas de micelio disminuyen, ya que el cultivo comienza su fase de autólisis (figura 14 a). Esta etapa esta caracterizada por la liberación de proteasas que hidrolizan el micelio. Se observa así, que las proteínas de micelio disminuyen drásticamente, como consecuencia de la acción de las proteasas endógenas. La fase de autólisis esta también caracterizada por presentar un pH elevado en el medio de cultivo (figura 14 b) debido a la liberación al medio de cultivo de productos diversos provenientes del metabolismo autolítico.

Las proteínas del sobrenadante de cultivo aumentan desde un principio, pero es en la etapa de autólisis cuando su tasa aumenta, ya que se suma, a la presencia de las enzimas secretadas, las proteasas y las proteínas propias del micelio que pasan al sobrenadante como consecuencia de la lisis celular.

#### R.1.1.2.- Actividad enzimática.

La actividad enzimática del sistema celulolítico (figura 14 c) en el sobrenadante es baja. Estas pocas unidades enzimáticas detectadas pueden ser consideradas como el nivel basal de enzimas necesario para inducir su síntesis cuando el sustrato indicado esté presente. Es este nivel basal de enzimas el responsable de gatillar el proceso de inducción, ya que se sabe que la celulosa per se es una macromolécula incapaz de penetrar la célula fúngica y por lo tanto difícilmente sea el inductor real del complejo celulolítico . Se propone, como inductor real, un intermediario de menor peso molecular, producto de una hidrólisis parcial, soluble y capaz de penetrar en la célula (Sternberg, 1976; Reese, 1977 ).



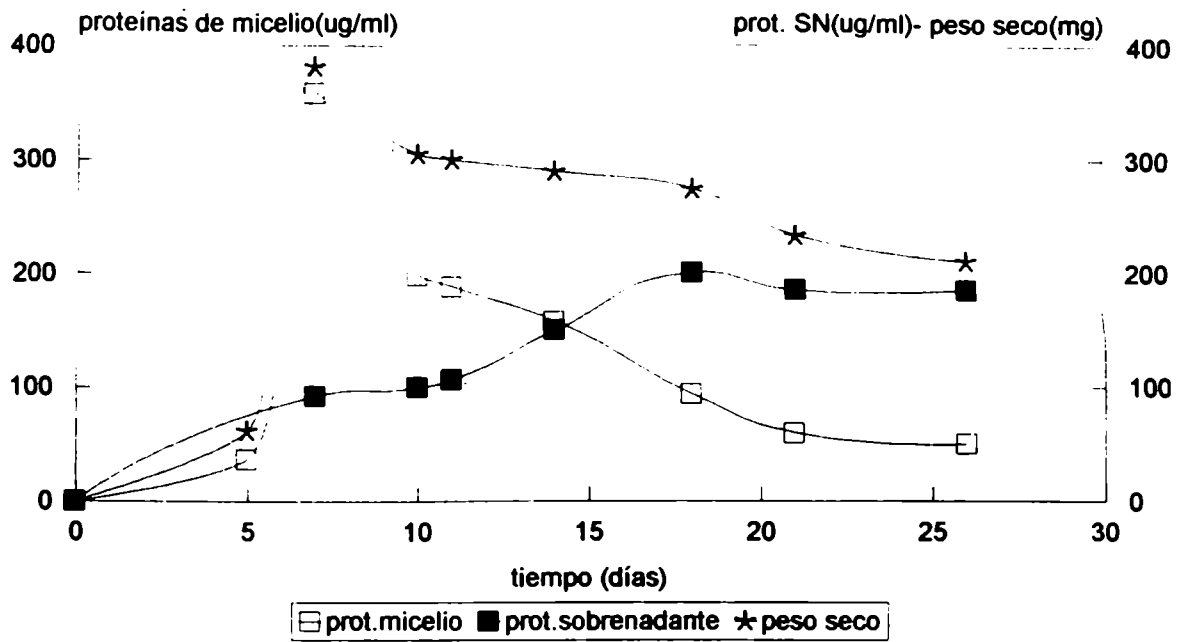


Figura 14 a : Curva de crecimiento en GA.

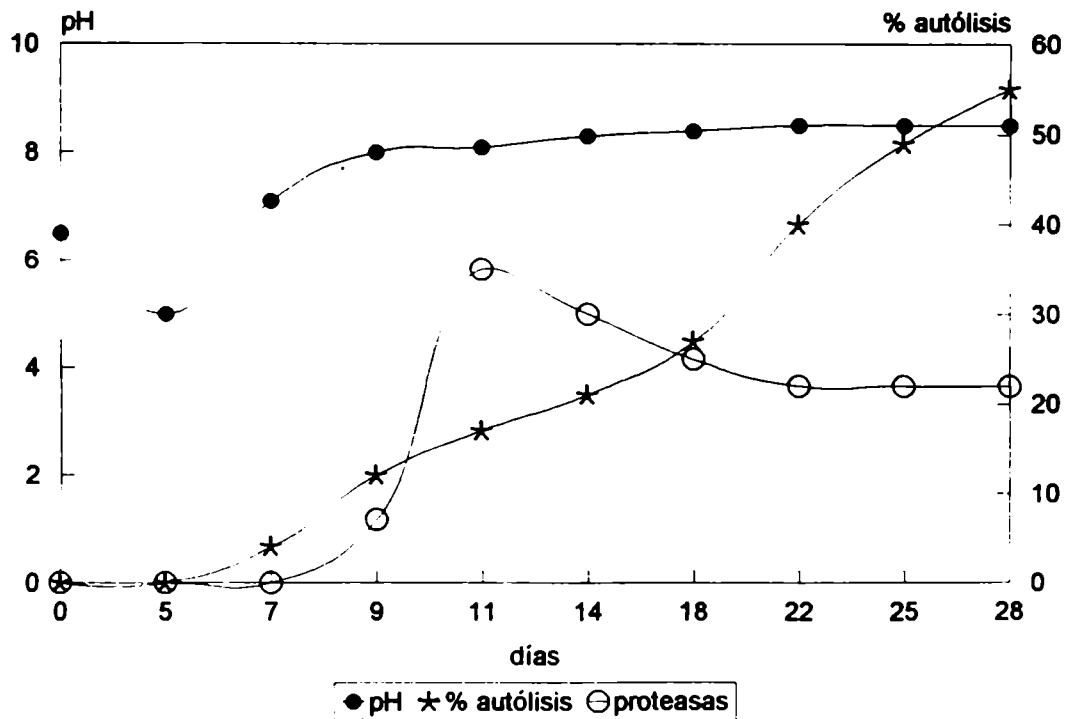


Figura 14 b : Curva de crecimiento en GA.

El mismo caso se presenta para el sistema xilanolítico cuyo nivel basal se muestra en la figura 14 d , tanto para la endo-xilanasa como para la  $\beta$ - xilosidasa. La actividad basal de enzimas hidrolíticas no es un hecho novedoso en hongos, esto ha sido citado ya para otros, como por ejemplo *Heterobasidion annosum* (Maijala y Reilly,1995), que siendo un fitopatógeno, posee un nivel basal de actividad del complejo xilanolítico y del celuloítico.

La actividad del complejo amilolítico (figura 14 d) también se presenta con un nivel basal que aumenta en la fase de autólisis.

Es notable destacar, por lo tanto, que la represión de la expresión de ninguno de los sistemas enzimáticos a estudiar, es total cuando hay glucosa en el medio de cultivo (hasta una concentración de 10 g/l de glucosa en el medio). La falta de represión total para sistemas extracelulares hidrolíticos inducibles ya ha sido citada para otros hongos como *Cephalosporium sp.* (Pitson, et al., 1991) y *Trichoderma reesei* (Chaudhari y Sahai, 1993). La presencia de glucosa en el medio de cultivo impide la inducción de la síntesis de estas enzimas hidrolíticas, tanto por la falta de un inductor adecuado como por la inhibición por producto final, pero no reprime la actividad basal de cada sistema, que a pesar de encontrarse en baja concentración, son suficientes para poder gatillar su síntesis en el momento y condiciones adecuadas. Estas enzimas presentes en baja concentración, no son utilizadas por *A. gamundii*, durante su crecimiento en un medio con glucosa como fuente de carbono, pero le otorgan una gran flexibilidad nutricional al hongo, ya que podrá aprovechar otra fuente carbonada si las condiciones lo requieren, disparando inmediatamente la síntesis de las enzimas hidrolíticas necesarias para subsistir y colonizar el nuevo sustrato.

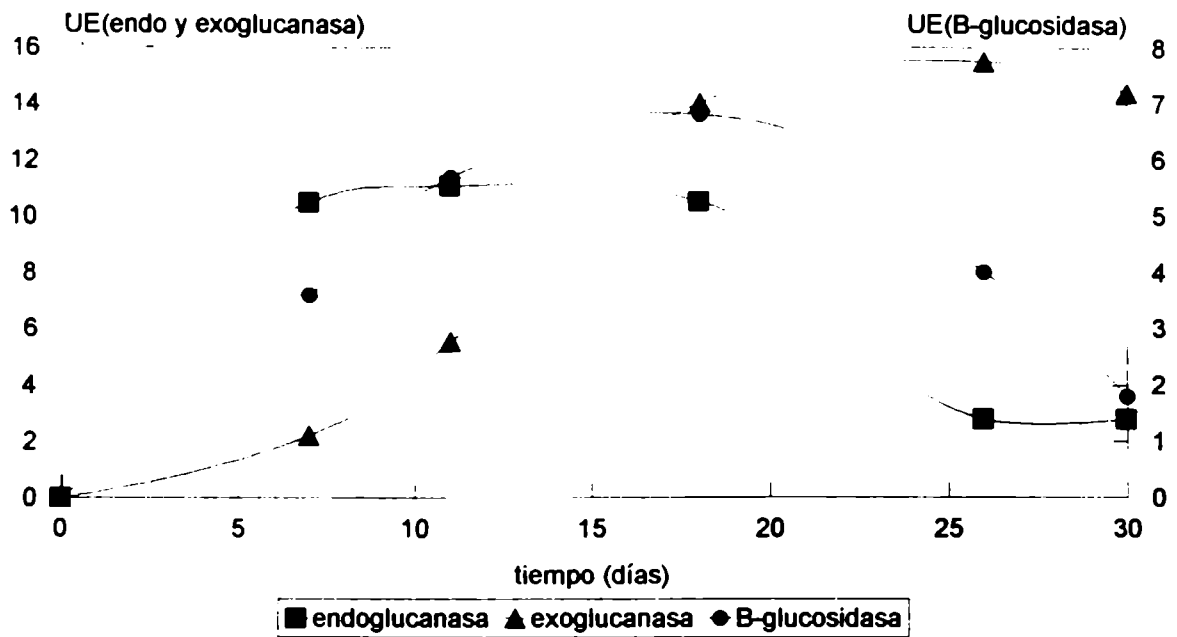


Figura 14 c : Actividad enzimática del sistema celulolítico en GA.

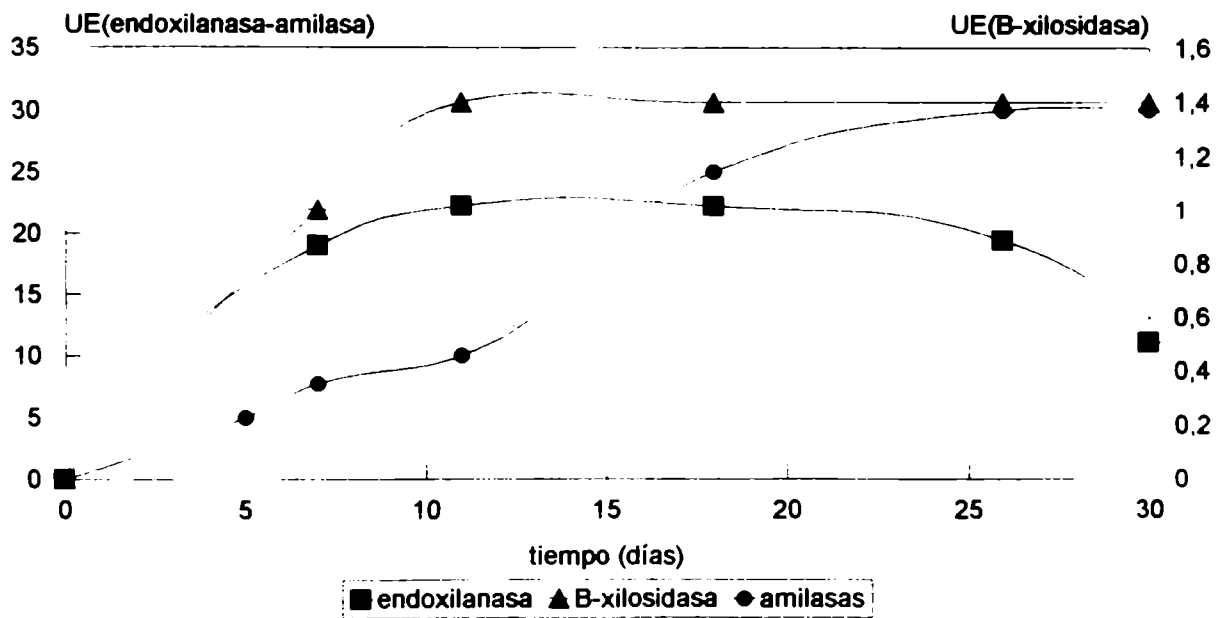


Figura 14 d : Actividad enzimática del sistema xilanolítico y amilolítico en GA.

La presencia de un nivel basal de enzimas (enzimas constitutivas) necesarias para la inducción de los sistemas hidrolíticos coincide con lo expresado en la sección 7.3.5. de la introducción.

#### **R.1.2.-MEDIO CON CELULOSA CRISTALINA.**

##### **R.1.2.1.- Estimadores de crecimiento.**

Para dosar el crecimiento se utilizó la medida de proteína total de micelio por dos razones: 1) la celulosa cristalina es insoluble y por lo tanto forma una suspensión en el medio de cultivo que resulta imposible de separar del micelio, desvirtuando así, la estimación de peso seco y 2) ya ha sido comprobado en la curva de glucosa que es una variable que refleja fielmente la variación de la medida de peso seco del micelio.

El crecimiento en celulosa cristalina se ve retrasado con respecto al obtenido en glucosa, llegando al máximo crecimiento recién el día 14 (figura 15 a). También se observa que la cantidad de proteínas de micelio en ese día es menor que el obtenido en glucosa debido a que la glucosa es una fuente de carbono más fácilmente utilizable y de fácil asimilación. Al tener solamente celulosa cristalina como fuente de carbono, esta debe ser primero hidrolizada para que ingrese al micelio por el nivel basal de enzimas antes mencionadas, luego deben sintetizarse las celulasas de novo para finalmente poder utilizar la celulosa cristalina y promover el crecimiento.

Las proteínas del sobrenadante aumentan en la fase de activo crecimiento, demostrando que se trata de verdaderas enzimas extracelulares, ya que se sintetizan y exportan al medio al mismo tiempo en que se sintetizan las proteínas de micelio. No se trata de proteínas liberadas al medio en la fase tardía de autólisis.

##### **R.1.2.2.- Actividad enzimática.**

La exclusión total de glucosa del medio de cultivo resulta favorable para la inducción del sistema celulolítico (figura 15 b). Tanto la endo- $\beta$ -

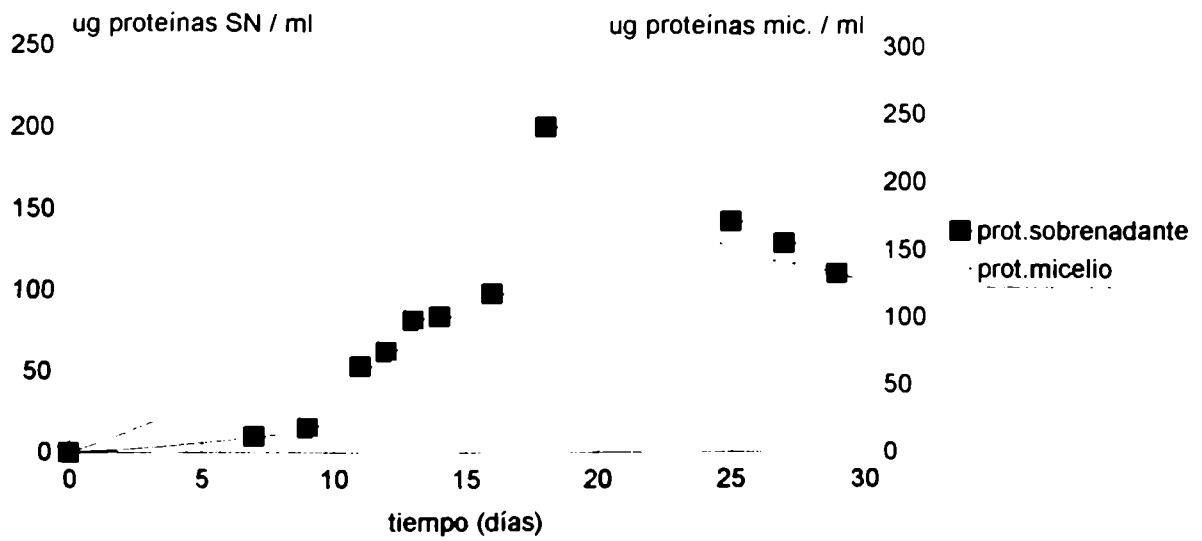


Figura 15 a : Curva de crecimiento en CC.

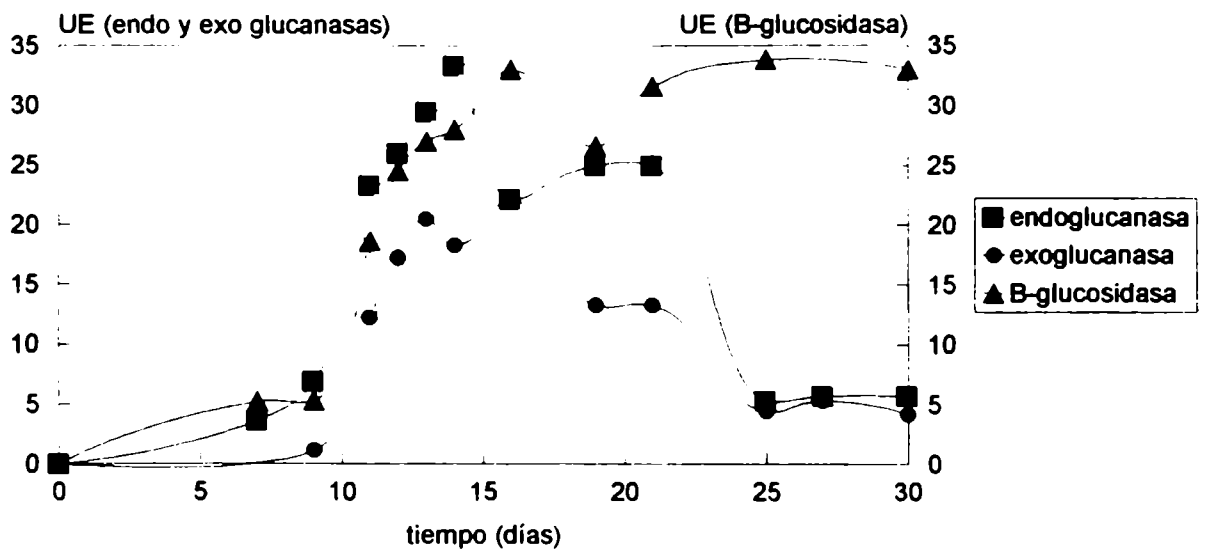


Figura 15 b : Actividad enzimática del sistema celulolítico en CC.

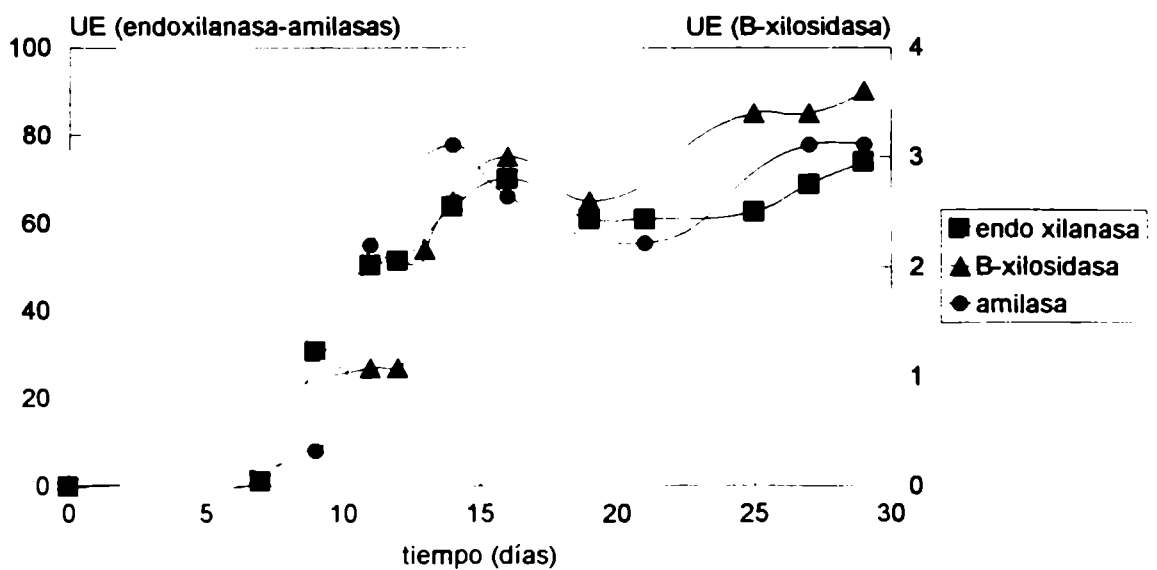


Figura 15 c : Actividad enzimática del sistema xilanolítico y amilolítico en CC.

D-glucanasa como la  $\beta$ - glucosidasa cuadruplican sus actividades (en referencia a la actividad basal en glucosa), mientras que la exo  $\beta$ -D-glucanasa aumenta su actividad pero no en esta proporción. *Gloeophyllum trabeum*, también aumentó, en forma similar su producción enzimática al crecer en un medio con celulosa cristalina, comparándolo con su actividad en glucosa como única fuente de carbono (Cotoras y Agosin,1992).

Otra prueba de la inducción del sistema celulolítico es la cinética de liberación al medio de las enzimas. Aquí se observa un aumento progresivo de la actividad enzimática que coincide con el crecimiento, ya que llegan juntos a un pico, mientras que en el medio con glucosa el nivel de actividad enzimático detectado es fluctuante y no se relaciona con el aumento en biomasa del cultivo. Esto se debe a que en el caso de la glucosa como fuente de carbono el crecimiento no depende de la presencia de enzimas extracelulares hidrolíticas. Si el único sustrato disponible es celulosa cristalina, un polímero complejo incapaz de ingresar a las hifas, la secreción de enzimas hidrolíticas al medio es indispensable para sustentar el crecimiento.

Las fluctuaciones observadas en la actividad enzimática a lo largo del tiempo, pueden deberse a la presencia de las múltiples isoenzimas que caracterizan al sistema celulolítico, que están reguladas por diferentes condiciones en el medio, provocando así pequeños picos al medir la actividad total para cada enzima del sistema (Bisaria y Ghose, 1981; Canevascini et al., 1983; Lyman y Renganathan, 1995).

Dado que un medio determinado puede no solo inducir las enzimas específicas para la degradación de ese sustrato en particular (Alconada, 1992) sino que pueden sintetizarse también otras enzimas hidrolíticas, se procedió a medir la actividad enzimática de los sistemas xilanolítico y amilolítico en este medio. En *Trichoderma reesei*, la celulosa cristalina induce también la síntesis de xilanasas de bajo peso molecular

(Biely, 1985; Wang et al., 1988; Huang et al., 1991; Vincken et al., 1997).

*A. gamundii*, fue capaz de sintetizar xilanasas y amilasas al crecer en celulosa cristalina (figura 15 c). Resultados similares se han citado para *Fusarium oxysporum* (Alconada, 1992) y para *Trichoderma* (Royer y Nakas, 1990) en esta última, la inducción con lactosa indujo la síntesis de ambos complejos enzimáticos. *Schizophyllum commune* (Haltrich et al., 1993) y *Sclerotium rolfsii* también fueron capaces de producir el sistema xilanolítico al crecer en celulosa cristalina como fuente de carbono.

En *A. gamundii*, ambas enzimas del sistema xilanolítico aumentaron su actividad. La endo-xilanasas triplicó su actividad, mientras que la  $\beta$ -xilosidasa duplicó su actividad con respecto a su valoración en el medio con glucosa. La inducción del sistema xilanolítico en celulosa cristalina ya ha sido citado para varios hongos, como *Trichoderma koningi* (Huang et al., 1991), *Aspergillus terreus* (Brustovetskaya et al., 1991 ; Hrmova et al., 1995), *Sporotrichum thermophile* (Sugden y Bhat, 1994), *Aspergillus niger* (Hrmova et al., 1989), *Aspergillus fumigatus* y *Trichoderma reesei* (Tenkanen et al., 1995), donde incluso se comprobó que las xilanasas, así como la mananasa, pueden llegar a presentar en su estructura un sitio de unión a la celulosa (CBD). Se han citado incluso sistemas enzimáticos bacterianos donde se han encontrado xilanasas con sitios específicos de unión a la celulosa (CBD) luego de estudiar y analizar su código genético, tal es el caso de *Thermotoga marítima* ( Winterhalter et al., 1995).

El complejo amilolítico también aumentó tres veces su actividad enzimática con respecto al medio con glucosa.

Para los dos sistemas enzimáticos la actividad aumenta gradualmente y llega a un pico que coincide con el de crecimiento, al igual que en el caso del sistema celulolítico. Luego del pico de actividad enzimática, esta se mantiene en todos los casos.

En este medio no pudo dosarse la actividad de proteasas aún en la etapa tardía de la curva. La ausencia de proteasas puede deberse a que el cultivo no ha entrado en la fase autolítica ya que el crecimiento ha sido retrasado y aún queda celulosa cristalina en el medio. Es un hecho generalizado en hongos que la síntesis de proteasas es inhibida cuando los niveles de elementos que contienen C, N o S llega a ciertos valores límites, propios de cada organismo. Compuestos con azúcares o aminoácidos pueden causar la represión de las proteasas (Cohen y Drucker, 1977).

### R.1.3.- MEDIO CON XILANO.

#### R.1.3.1.- Estimadores de crecimiento.

Al utilizar xilano como fuente de carbono, *A. gamundii*, es capaz de metabolizarlo, lo que se infiere del aumento de las proteínas de micelio, que aumentan exponencialmente hasta el día 10. A partir de este día estas decrecen mientras aumentan en las proteínas extracelulares (figura 16 a).

El máximo crecimiento obtenido es de 200 µg. de proteínas/ml de medio. Este valor es algo menor al obtenido cuando se utilizó celulosa cristalina como fuente de carbono y por supuesto menor aún que el obtenido con glucosa.

Nuevamente se ve que las proteínas de sobrenadante se segregan durante la fase de activo crecimiento, reafirmando su característica de enzimas extracelulares, no se trata de enzimas típicas de la fase autolítica. Este concepto se reafirma ya que al ensayar actividad de proteasas (que estarían indicando una etapa autolítica), estas no pudieron detectarse.



#### R.1.3.2.- Actividad enzimática.

El sistema xilanolítico de *A.gamundii* es inducido al crecer en xilano como fuente de carbono. En presencia de xilano, la actividad xilanasa se ve aumentada 10 veces (figura 16 b).

El pico de actividad enzimática tanto de la endo-xilanasa como de la  $\beta$ -xilosidasa coinciden con el pico de crecimiento. El sistema xilanolítico es muy complejo, su cinética y modo de acción están aún menos claros que los del sistema celulolítico, ya que estas varían según la fuente enzimática. Se han descrito al menos seis tipos diferentes de xilanasas. En *A. gamundii*, luego del pico de mayor actividad, se observa otro pico, lo que confirmaría la posible presencia de diferentes isoenzimas para este complejo.

La presencia de complejos xilanolíticos es frecuente entre los hongos, tal es el caso de *Thermomyces lanuginosus* (Gomez et al.,1993), *Trichoderma reesei* (Gamerith et al., 1992), *Aspergillus awamori* (Kormelink et al., 1993), *A. fumigatus* y *A. oryzae* (Biely et al., 1993) entre otros, donde incluso la detección de actividad xilanolítica está siempre acompañada de cierta actividad celulolítica. Se ha encontrado también para *Trichoderma reesei* cierta actividad cruzada de una endoglucanasa que es capaz de degradar xilano (Biely et al., 1993). También se ha descrito la capacidad de ciertos hongos filamentosos para fermentar D-xilosa a etanol, como es el caso de *Fusarium sp.*, *Mucor sp.* y *Rhizopus sp.* (Coughlan y Hazlewood, 1993).

La actividad  $\beta$ -xilosidasa no fue inducida en la misma proporción que la endo-xilanasa. Esto se debe a la posible adsorción de la  $\beta$ -xilosidasa a las paredes hifales, lo que hace que su detección en el sobrenadante sea particularmente difícil (ver sección 4.1 de resultados).

La excreción al medio de las  $\beta$ -xilosidasas sería mucho menos eficiente para la economía celular del hongo ya que los monómeros liberados como producto de su acción sobre las moléculas de xilobiosa serían más difícilmente incorporados al micelio si se encontraran a distancia. Contrariamente si la  $\beta$ -xilosidasa permanece adsorbida al micelio, la captación de los monómeros resultantes se vería muy favorecida. Entre otros, algunos ejemplos de hongos que presentan la  $\beta$ -xilosidasa adsorbida a las paredes hifales son: *Trametes trogii* (Levin, 1998), *Aspergillus terreus* (Hrmova et al., 1991).

Algunas  $\beta$ -xilosidasas tienen actividad transferasa (Tsao y Chang, 1987), con lo cual solo se detectan utilizando un sustrato receptor del grupo transferido.

Al dosar otras actividades enzimáticas, se ve que la actividad amilolítica también está inducida. Al igual que con las enzimas específicamente inducidas por el sustrato, el pico de actividad enzimática se da junto con el de crecimiento (figura 16 b), ya que son las responsables de la movilización de los nutrientes asimilables por el micelio fúngico.

En cuanto al sistema celulolítico, como ya se mencionó anteriormente para otros hongos, *A.gamundii*, es capaz de inducir la síntesis de celulasas en presencia de xilano como fuente de carbono, incluso a niveles similares a los obtenidos en celulosa cristalina (figura 16 c). Este es el caso de *T. reesei* (Gamerith et al., 1992), *Aspergillus terreus* (Hrmova et al., 1989), *A. fumigatus* (Tenkanen, 1995). Sin embargo, en este caso, hay dos diferencias: 1) el pico de actividad en xilano se da antes que en celulosa cristalina, coincidiendo con el pico de proteínas de micelio que se obtuvo el día 10, mientras que en celulosa cristalina el mismo pico se obtuvo el día 14; 2) en xilano, tanto la

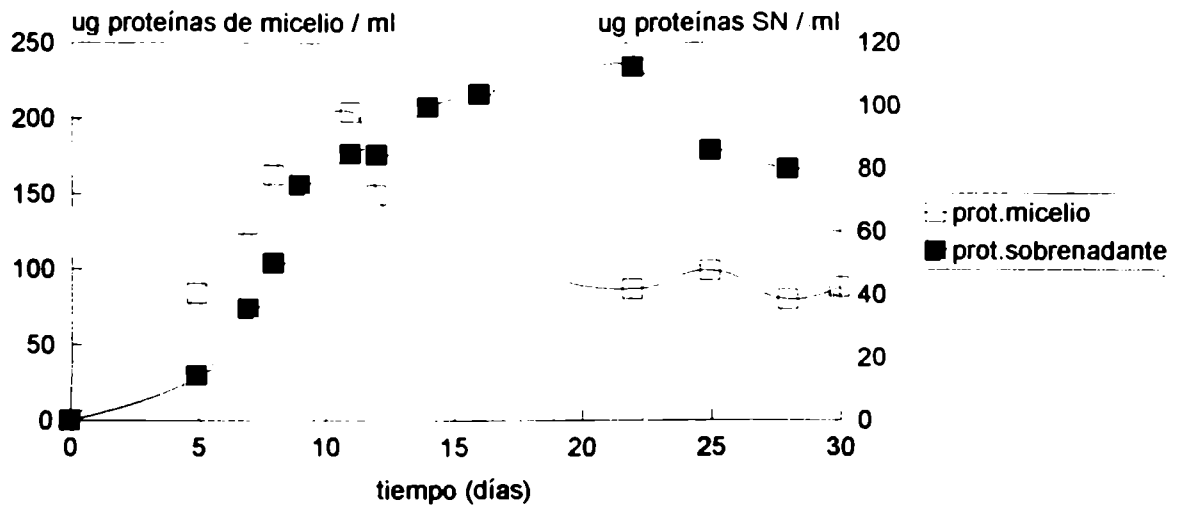


Figura 16 a : Curva de crecimiento en xilano.

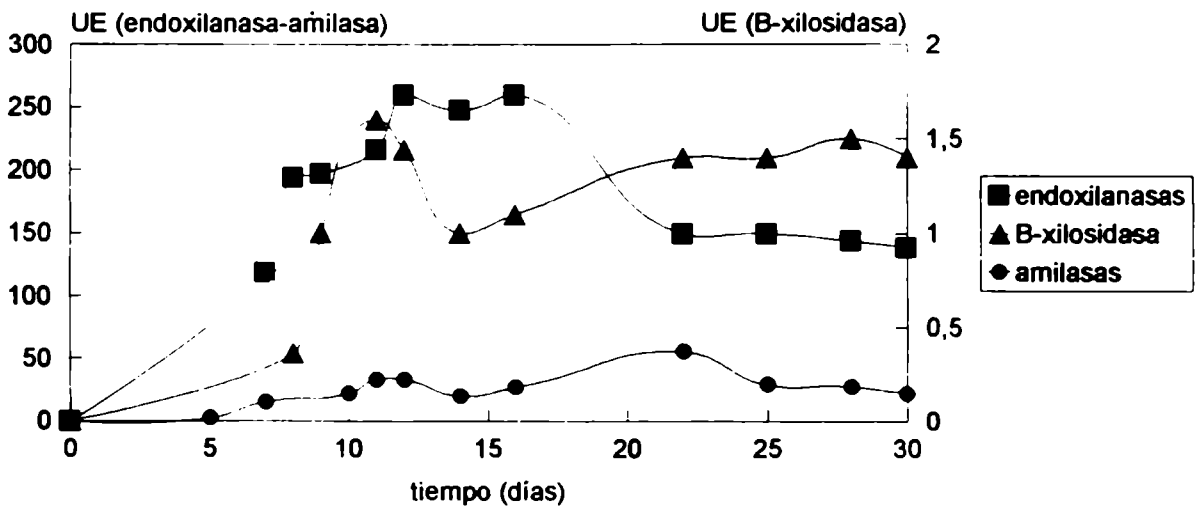


Figura 16 b : Actividad del sistema xilanolítico y amilolítico en xilano.

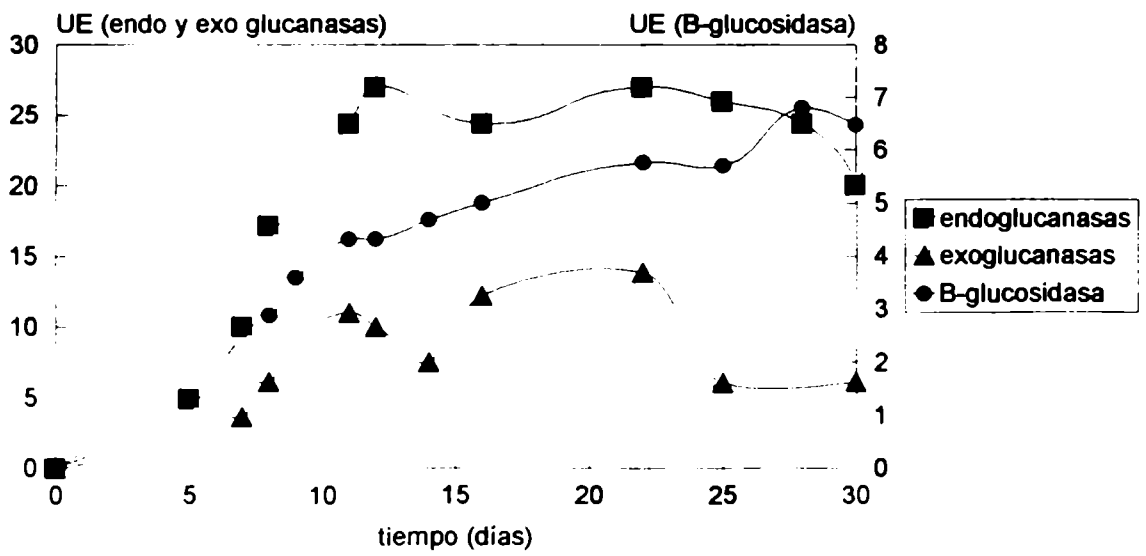


Figura 16 c Actividad del sistema celulolítico en xilano.

actividad endo- $\beta$ -D-glucanasa como la exo- $\beta$ -D-glucanasa fluctúan luego del pico de actividad, tal vez debido a la parcial inhibición producida por la glucosa debido a la alta actividad xilanolítica producida en este medio, así como a la presencia de diferentes isoenzimas del complejo celulolítico.

Al igual que en el caso en que se usó celulosa cristalina, siempre se detectó una actividad mayor de endo- $\beta$ -D-glucanasa que de exo- $\beta$ -D-glucanasa. La actividad de la  $\beta$ -glucosidasa en cambio, no fue inducida, encontrándose valores similares a los obtenidos en el nivel basal.

#### R.1.4.- MEDIO CON ALMIDON.

##### R.1.4.1.- Estimadores de crecimiento.

*Ascobolus gamundii* es capaz de utilizar almidón como única fuente de carbono, promoviendo su crecimiento (figura 17 a). Al igual que en los casos anteriores el pico máximo de crecimiento está retrasado con respecto al crecimiento en glucosa. Esto se debe a que primero se debe gatillar la inducción enzimática (síntesis de novo de las enzimas amilolíticas) para poder luego utilizar estos sustratos de otra forma inaccesibles.

Sin embargo el crecimiento en almidón fue algo menor que el obtenido en celulosa cristalina y en xilano. Al igual que en xilano, al décimo día se alcanza el máximo de biomasa. Luego las proteínas de micelio disminuyeron drásticamente indicando una fase autolítica.

Las proteínas en el sobrenadante, si bien comienzan a sintetizarse y liberarse al medio desde un principio, su tasa de aparición es muy lenta ya que se está gatillando el proceso de inducción enzimática. Luego comienzan a aumentar logarítmicamente hasta llegar a un máximo posterior al pico de crecimiento. En la última etapa los niveles de proteínas extracelulares se mantienen ó decrecen muy suavemente debido a la gran cantidad de enzimas extracelulares liberadas al medio.

Si bien las proteínas de micelio resultaron algo menores que en los casos de crecimiento en celulosa cristalina y en xilano, las proteínas de sobrenadante alcanzan niveles similares a los obtenidos en los otros dos medios mencionados.

#### R.1.4.2.- Actividad enzimática.

Al utilizar almidón como sustrato, *A.gamundii* es eficiente en inducir la síntesis de amilasas (figura 17 b). La actividad amilolítica de *A. gamundii* aumenta 5 veces con respecto a la obtenida en el medio con glucosa como única fuente de carbono.

A diferencia de lo obtenido previamente con otros medios, si bien la detección de actividad coincide con la fase de activo crecimiento, el máximo de actividad enzimática se obtiene luego del pico de biomasa. El hecho de continuar hidrolizando el almidón sin utilizar luego la glucosa obtenida como producto de su hidrólisis con la misma tasa a consecuencia de una inducción muy fuerte, hace que esta se acumule en el sobrenadante, produciendo una inhibición parcial, obteniéndose una meseta en el gráfico a partir del día 15.

Los complejos enzimáticos celulolítico y xilanolítico, también se pudieron dosar en este medio.

El sistema xilanolítico se ve representado por la endo-xilanasas (figura 17 b). La actividad endo-xilanasas aparece desde los primeros días y llega a su pico junto con el máximo de crecimiento el día 10, manteniendo luego su actividad en el tiempo.

La actividad  $\beta$ -xilosidasas no se ve inducida en este medio, detectándose un nivel basal de actividad.

En cuanto al sistema celulolítico, también se ve inducido, particularmente la actividad  $\beta$ -glucosidasas, que da un pico de actividad el día 13 (figura 17 c). La inducción de esta enzima del sistema celulolítico en almidón ya ha sido descrita para *Trichoderma reesei*

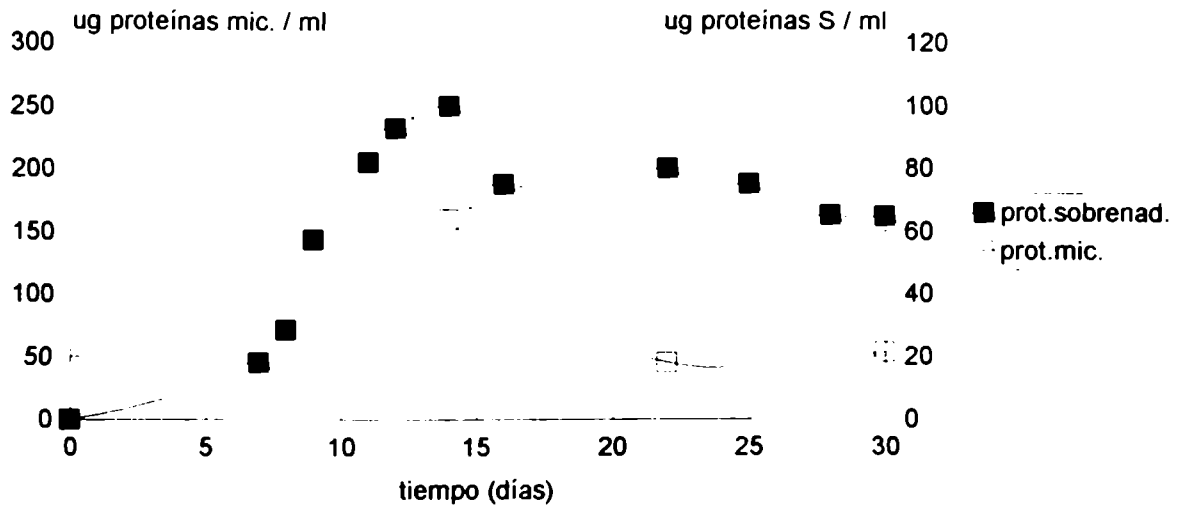


Figura 17 a : Curva de crecimiento en almidon.

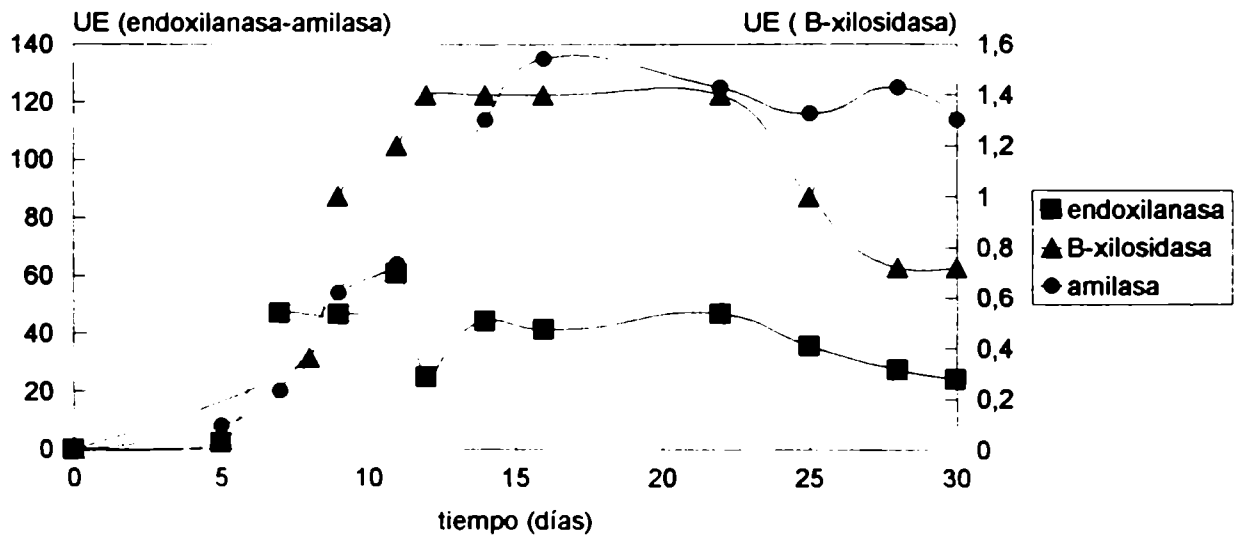


Figura 17 b : Actividad enzimatica del sistema xilanolitico y amilolitico en almidon.

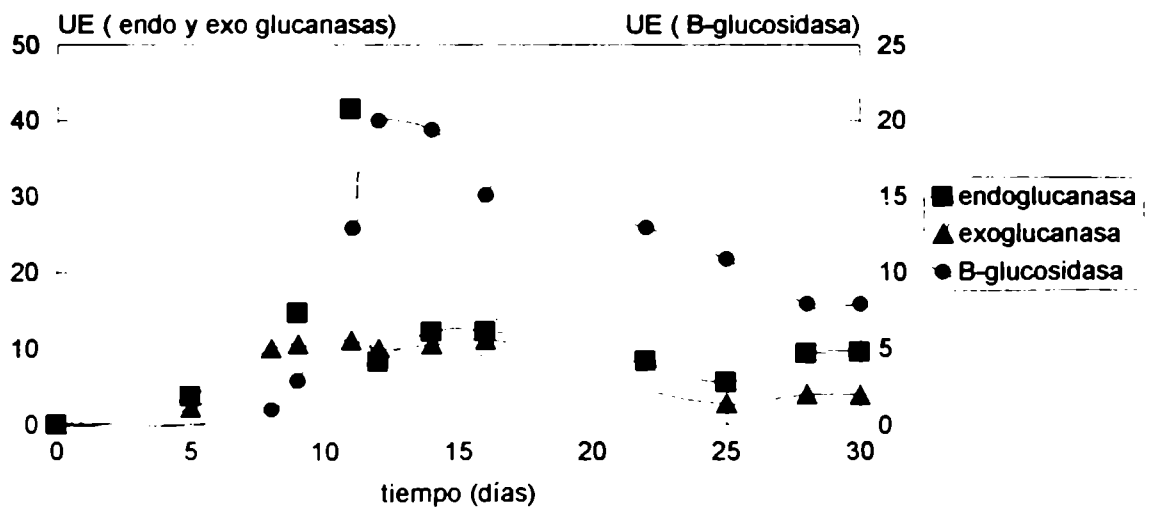


Figura 17 c : Actividad enzimatica del sistema celulolitico en almidon.

(Taj-Aldeen, 1993), donde su actividad se duplicó, aumentando en consecuencia, la sacarificación del almidón.

La actividad endo- $\beta$ -D-glucanasa da un pico junto con el de crecimiento, pero luego sus valores disminuyen, debido a la presencia de glucosa en el medio como consecuencia de la alta actividad amilolítica. La producción del sistema celulolítico en almidón fue ya descrito para el fitopatógeno *Rhizopus oryzae* en cultivos de tubérculos infectados (Amadioha, 1993), así como para *Penicillium brunneum* N<sup>a</sup>24 (Haska y Ohta, 1994).

#### R.1.5.-MEDIO MIXTO CON CELULOSA CRISTALINA / XILANO.

##### R.1.5.1.- Estimadores de crecimiento.

En este medio con una fuente de carbono mixta, el crecimiento fue levemente superior (235  $\mu$ g. de proteínas / ml. de medio) al obtenido con las fuentes usadas individualmente (figura 18 a). El crecimiento es logarítmico hasta el día 7, al igual que la liberación de proteínas al sobrenadante. Estas también fueron liberadas en una mayor concentración que en los medios con una única fuente de carbono. Una vez alcanzado el pico de crecimiento, las proteínas de micelio comienzan a disminuir, mientras que las proteínas del sobrenadante siguen liberándose unos días más. Luego de alcanzar el máximo crecimiento, el medio comienza a alcalinizarse debido a la liberación de productos de metabolismo.

##### R.1.5.2.- Actividad enzimática.

Los tres sistemas enzimáticos fueron inducidos en este medio con fuente de carbono mixta como se puede observar en las figuras 18b y c.

El sistema celulolítico comienza a ser detectado ya desde los primeros días en la etapa de activo crecimiento, llegando a su máxima producción el día 10, luego del pico de crecimiento. La actividad endo- $\beta$ -D-glucanasa está tan fuertemente inducida en este medio, que incluso llega a duplicar su producción en celulosa cristalina. Lo mismo ocurre con la actividad de la exo- $\beta$ -D-glucanasa, mientras que la  $\beta$ -glucosidasa llega a valores similares a los obtenidos en su sustrato específico. La producción de esta enzima podría resultar así, un factor limitante para el desarrollo de *Ascobolus gamundii*, ya que las dextrinas producidas por la acción de la endo y exo enzimas juntas, no serían fácilmente asimilables por las células fúngicas al no llegar a clivarse para dar glucosa que sería la forma rápida para ser tomada por el micelio y utilizada en reacciones metabólicas.

El medio con esta fuente de carbono mixta podría reflejar mejor el entorno en el que crece *A. gamundii* en la naturaleza, donde las fuentes de carbono accesibles, nunca son homopolímeros ni de celulosa ni de xilano ni de almidón, sino complejas asociaciones de varios polímeros naturales.

El sistema xilanolítico también está inducido en este medio (figura 18 c). Al, igual que en el caso del sistema celulolítico, la mayor producción del sistema xilanolítico se da el día 10, pero una vez alcanzado este pico de actividad enzimática, el nivel permanece constante por muchos días. La actividad endo-xilanasa supera las 200 UE, un valor levemente superior al obtenido en el medio con xilano solamente. Lo mismo ocurre con la actividad de la  $\beta$ -xilosidasa aunque a niveles menores de actividad.

Se ha obtenido también la producción de los dos sistemas enzimáticos utilizando un medio con heteropolímeros de xilosa y glucosa (2-O- $\beta$ -D-glucopiranosyl D-xilosa), posiblemente presentes en la naturaleza en *Aspergillus terreus* (Hrmova et al., 1991).



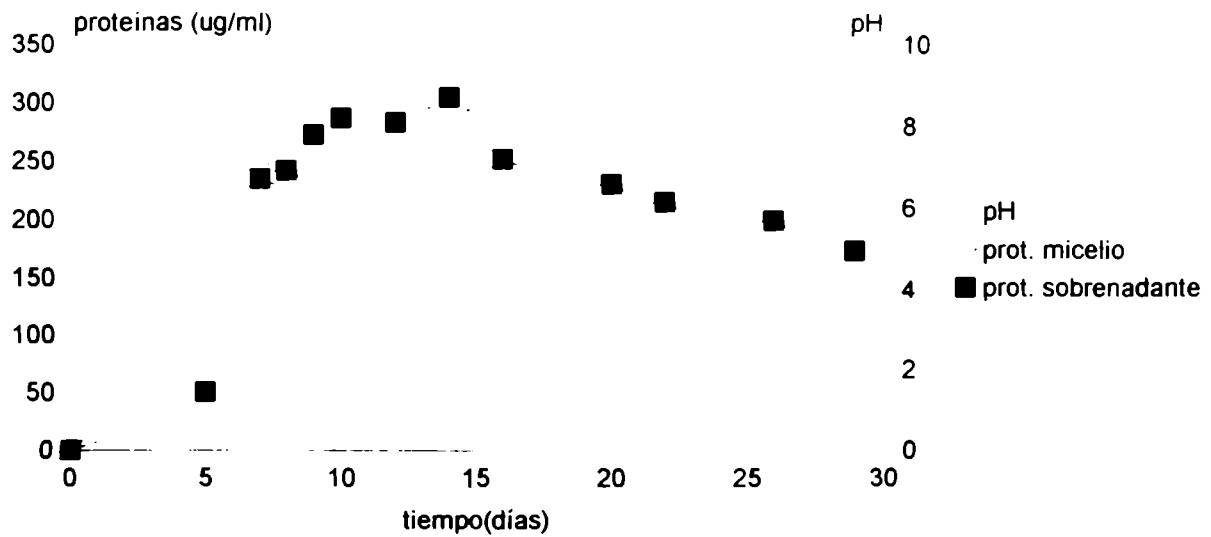


Figura 18 a : Curva de crecimiento en CC/X.

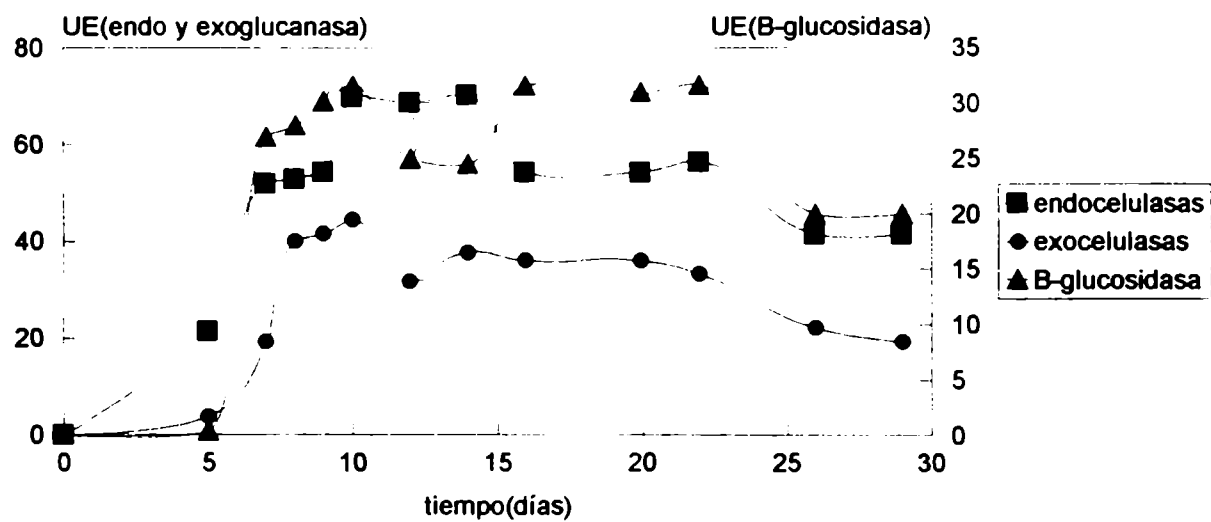


Figura 18 b : Actividad enzimatica del sistema celulolitico en CC/X.

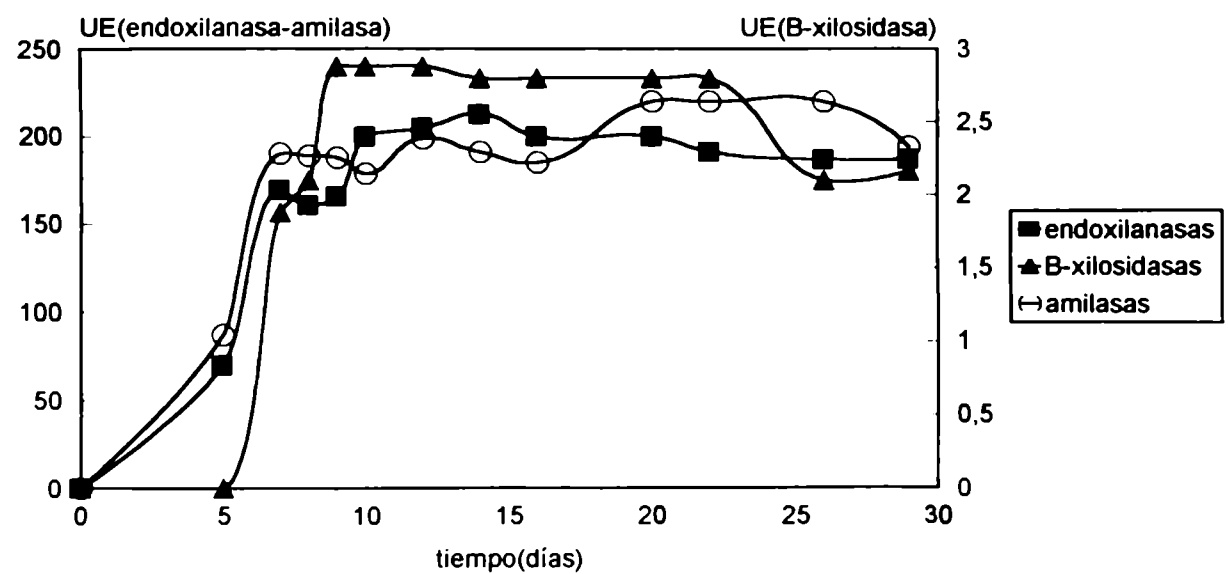


Figura 18 c : Actividad enzimatica del sistema xilanolitico y amilolitico en CC/X.

El sistema amilolítico, al igual que los otros dos sistemas enzimáticos, también está fuertemente inducido, llegando a obtener su máxima actividad enzimática el día 12 (figura 18 c). Después de este pico de actividad la actividad enzimática se mantiene constante a lo largo del tiempo.

## R.2.- OPTIMIZACION DE LA PRODUCCION ENZIMATICA.

### R.2.1.- VARIACION DE LA FUENTE DE CARBONO.

Para poder maximizar la producción enzimática se procedió a variar en el medio de cultivo la fuente de carbono, ya que según lo experimentado en la sección anterior, ésta determina, en gran medida la inducción o no de los diferentes sistemas enzimáticos. Tras evaluar los datos obtenidos de las curvas de crecimiento, se determinó que la cosecha se haría a día fijo. En todos los casos, se filtró el cultivo el día 12.

El crecimiento se midió siempre como proteínas de micelio para tener así, un criterio común en todos los casos, ya que en algunos medios la fuente de carbono forma una suspensión inseparable del micelio.

El crecimiento (figura 19 a) resultó mayor en los medios que contenían glucosa, como era de esperar, y CC como fuente de carbono, seguido por el medio mixto (CC / xilano), con xilano y con almidón. En estos medios, se sintetizan las enzimas necesarias para degradarlos, liberando los nutrientes necesarios para mantener un buen crecimiento. Luego este fue menor en maltosa y menor aún en los medios con las restantes fuentes de carbono. El crecimiento resultó pobre en los medios que contenían celobiosa. En cuanto a la lactosa como única

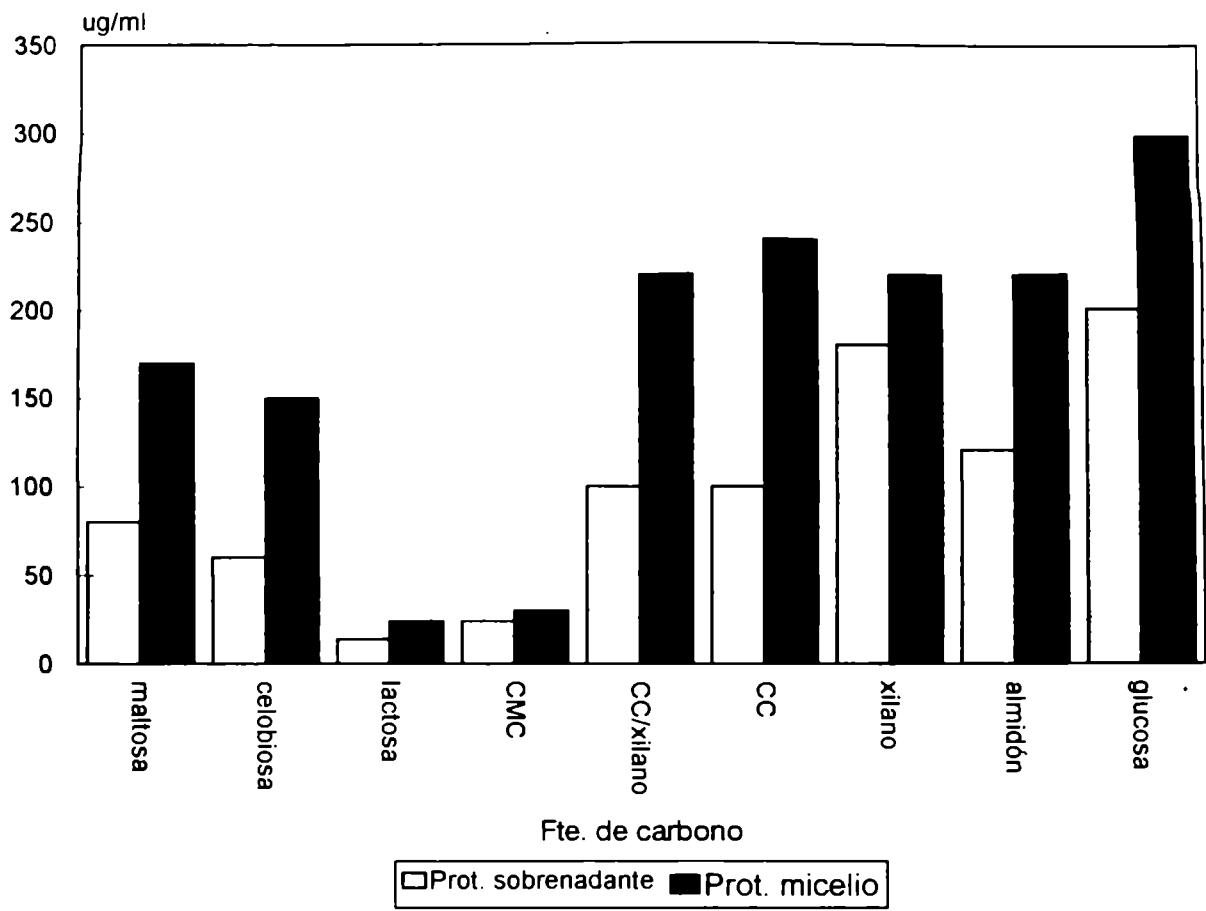


Figura 19 a Crecimiento en diferentes fuentes de carbono.

fuentes de carbono, al igual que otros hongos, *Ascobolus gamundii* no es capaz de utilizarla para sostener su crecimiento.

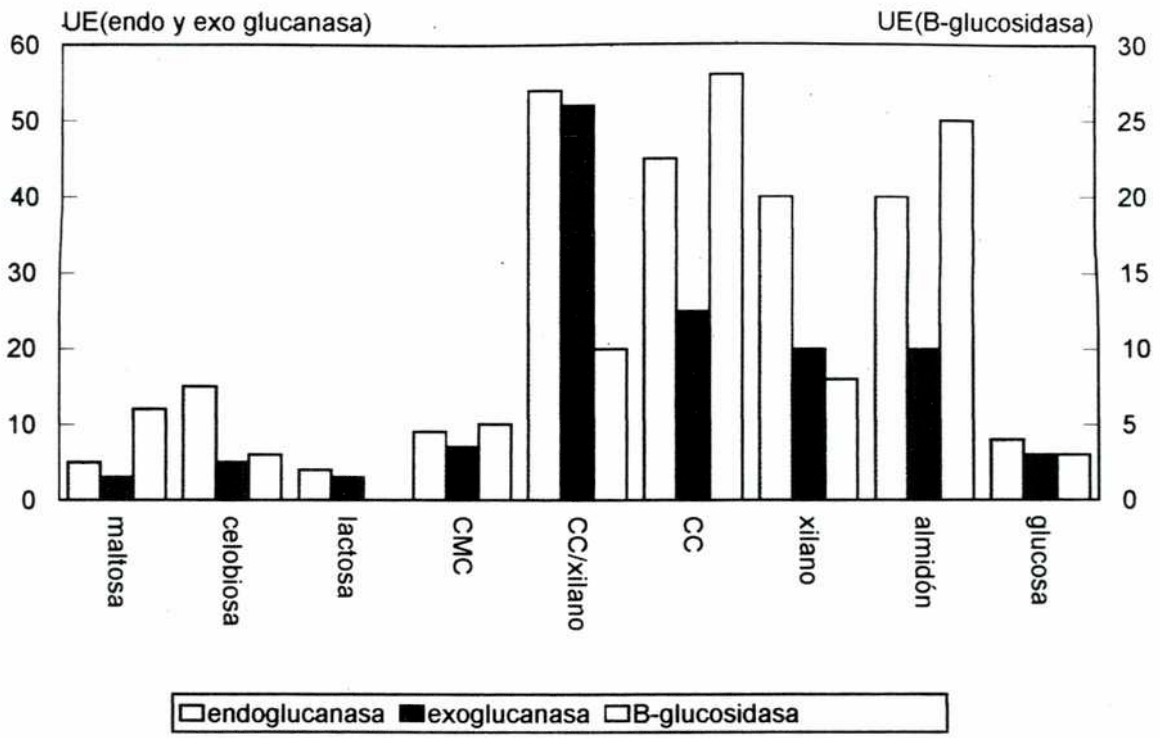
Las proteínas extracelulares dosadas en el sobrenadante, siguen un patrón similar al de las proteínas de micelio. Los medios con CMC y lactosa fueron los que produjeron menor cantidad de proteínas de sobrenadante.

En celulosa cristalina, xilano y en CC / xilano, esta alta concentración de proteínas en el sobrenadante se refleja en una alta actividad enzimática, tanto del sistema celulolítico como del xilanolítico (figura 19 b y c). La actividad  $\beta$ -xilosidasa tampoco fue detectada en esta experiencia, reforzando la hipótesis de su adsorción a las paredes fúngicas, lo que no nos permitiría dosarla en el sobrenadante.

En el medio con CMC no se encontró una buena producción del sistema celulolítico, encontrándose prácticamente solo el nivel basal de enzimas presente. Si bien el CMC resulta inductor del sistema celulolítico para ciertos hongos como *A. japonicus* (Sanyal et al., 1986) y *A. terreus* (Singh et al., 1996) su rol como inductor es muy leve para otros, como es el caso de *Fusarium oxysporum* (Alconada, 1992).

En maltosa, si bien hubo crecimiento y liberación de proteínas al medio, las actividades enzimáticas de los diferentes complejos enzimáticos resultó muy baja. La diferencia de respuesta en maltosa y celobiosa ya fue descrita para un hongo del mismo género, *Ascobolus crenulatus* (Galvagno, 1976), demostrando que el enlace  $\alpha$  1-4 de la maltosa es roto con mayor facilidad que el enlace  $\beta$  1-4 de la celobiosa. La baja actividad enzimática en medios con maltosa ya fue descrita también para *Agaricus bisporus* (Manning y Wood, 1983). También existe la posibilidad de que así como hay evidencia de la existencia de permeasas para dímeros como la celobiosa en ciertos hongos (Freer y Greene, 1989; Fristcher et al., 1990), la maltosa también penetre

(19 b)



(19 c)

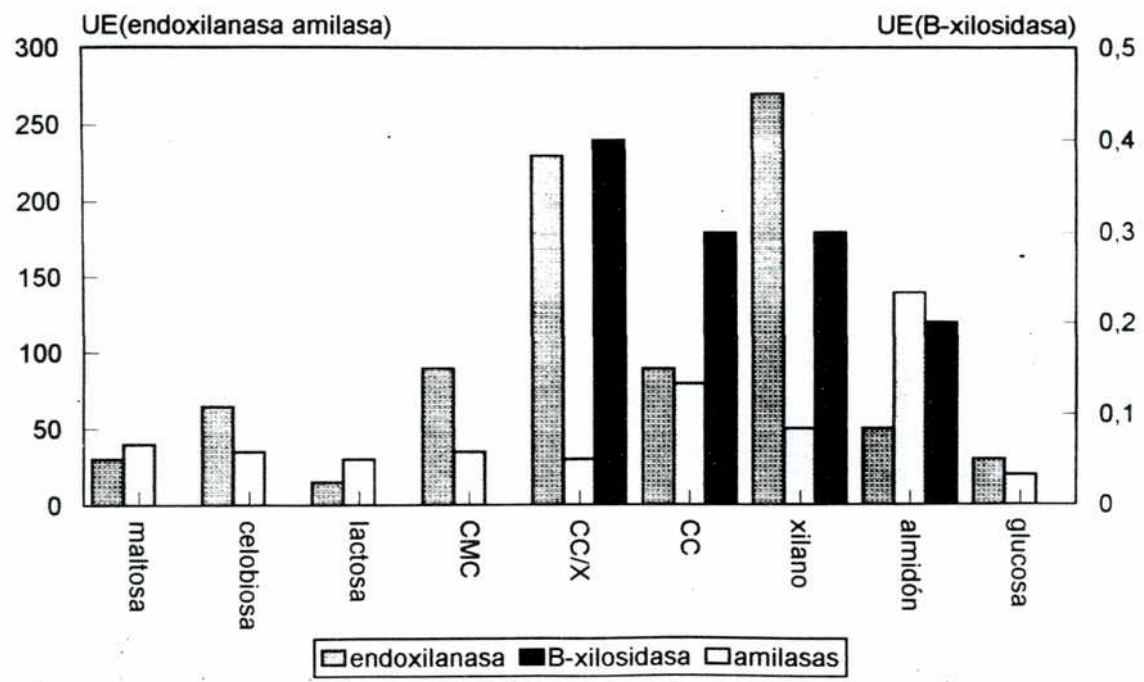


Figura 19 : Actividad enzimática en diferentes fuentes de carbono. (b) Sistema celulolítico; (c) Sistema xilanolítico y amilolítico.

directamente en la célula fúngica sin necesidad de la síntesis de un sistema enzimático extracelular.

En celobiosa, tampoco se indujo ninguno de los sistemas enzimáticos estudiados. La celobiosa tiene un comportamiento particular en su rol como inductor del sistema celulolítico. Dependiendo de su concentración en el medio, puede actuar tanto como inductor (Mandels y Reese, 1960), como de represor del sistema celulolítico (Mandels y Reese, 1960; Whitaker, 1971). Sternberg y Mandels (1982) comprobó que no se sintetizan celulasas cuando *Trichoderma reesei* crece en un medio con celobiosa como única fuente de carbono.

La lactosa resultó ser una fuente de carbono muy pobre para *A. gamundii*. Este hecho es bastante generalizado en hongos, lo que sugiere la posible intervención de una enzima específica que llevaría a cabo su hidrólisis (Lilly y Barnett, 1953). En cuanto a la producción del sistema celulolítico, esta resultó pobre. Para *Agaricus bisporus*, la lactosa no resultó eficiente como inductor (Manning y Wood, 1983). Su rol como inductor es discutido, ya que la lactosa no está normalmente formando parte de estructuras vegetales.

Al determinar en que medio la producción enzimática es mayor con respecto a las proteínas extracelulares (figura 20), se ve que al utilizar un medio con celulosa cristalina ó CMC como fuente de carbono, se obtuvo una mezcla proteica más rica en celulasas respecto de las otras fuentes. Este dato es de utilidad al momento de elegir un medio a partir del cual las enzimas se obtendrán con un paso de purificación previa.

Por esta misma razón, el medio de elección para la producción del sistema xilanolítico sería el medio con xilano, y para las amilasas, tanto el medio con almidón como el que contiene CMC.

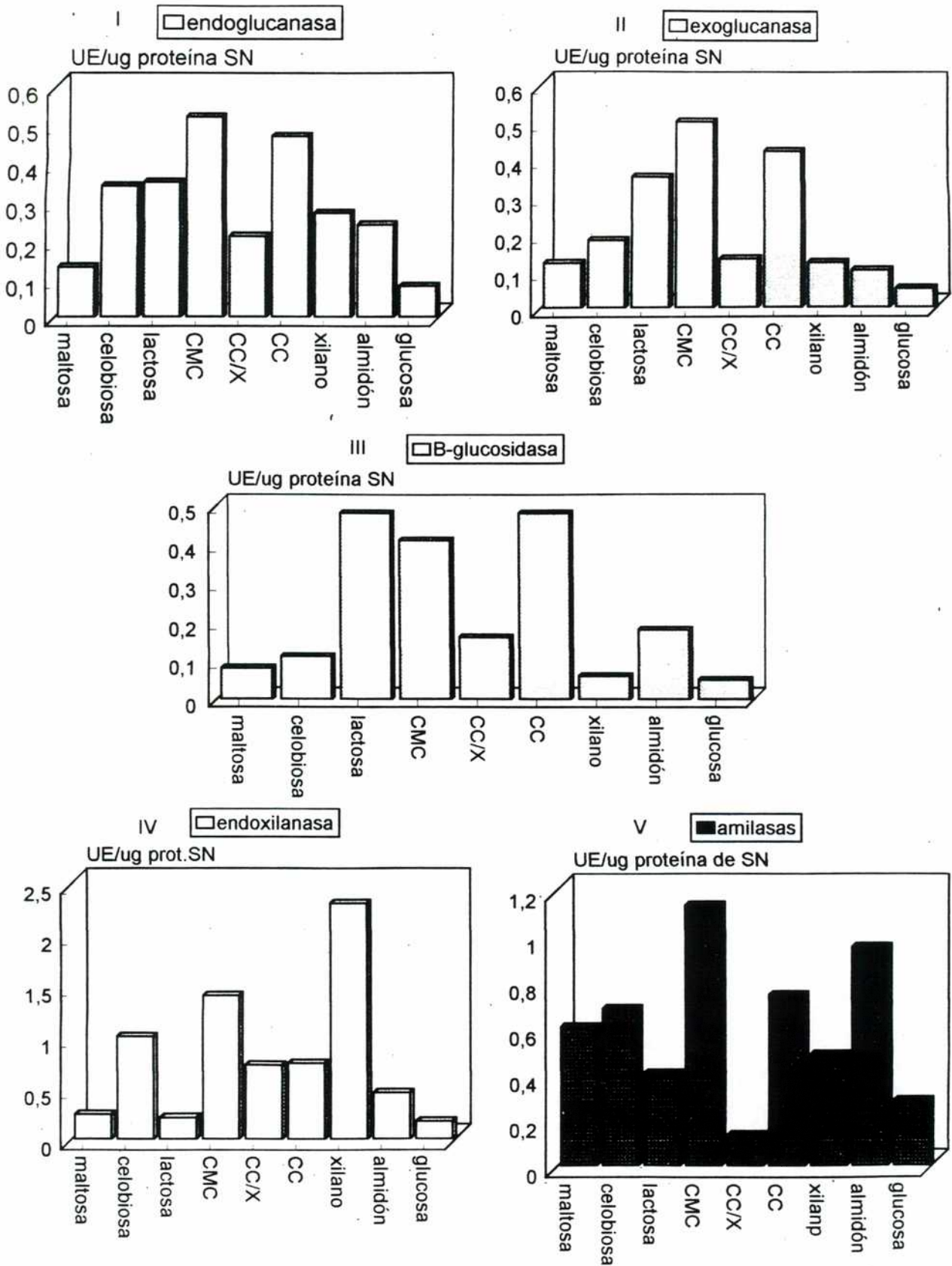


Figura 20 : Actividad enzimática en función de las proteínas de sobrenadante en diferentes fuentes de carbono. (I, II, III) Sistema celulolítico; (IV) Sistema xilanolítico; (V) Sistema amilolítico.

La actividad enzimática específica por unidad de biomasa (figura 21) resultó sin duda mayor en el caso del medio que contiene lactosa como fuente de carbono. Para todos los sistemas enzimáticos estudiados, al igual que para *Trichoderma longibrachiatum* (Sandhu y Kalra, 1985), donde a pesar de que el crecimiento no es el óptimo, la lactosa fue eficiente para inducir el sistema celulolítico. Para *T. longibrachiatum*, incluso resultó el mejor inductor para la endo  $\beta$ -D-1,4-glucanasa y para la  $\beta$ -glucosidasa.

Sin embargo, la inducción por lactosa, no está generalizada en hongos. En casos en que se utilice cultivos de reemplazo, sin duda esta sería la elección del medio inductor, ya que habiendo obtenido un buen crecimiento en un medio rico, la inducción luego en un medio con lactosa sería muy eficiente.

Estos resultados se comprueban en la figura 22, donde se muestran las proteínas extracelulares por unidad de biomasa. Aquí vemos que si bien la lactosa no es eficiente para promover el crecimiento, si resulta muy efectiva al momento de inducir la síntesis de estas enzimas extracelulares.

### R.2.2.- VARIACION DE LA FUENTE DE NITROGENO.

Una fuente nitrogenada es indispensable a tener en cuenta en el momento de diseñar un medio de cultivo, ya que éste es utilizado para la síntesis de una gran variedad de constituyentes celulares tales como aminoácidos, purinas, pirimidinas, glucosamina y varias vitaminas, sin las cuales la supervivencia del hongo sería imposible.



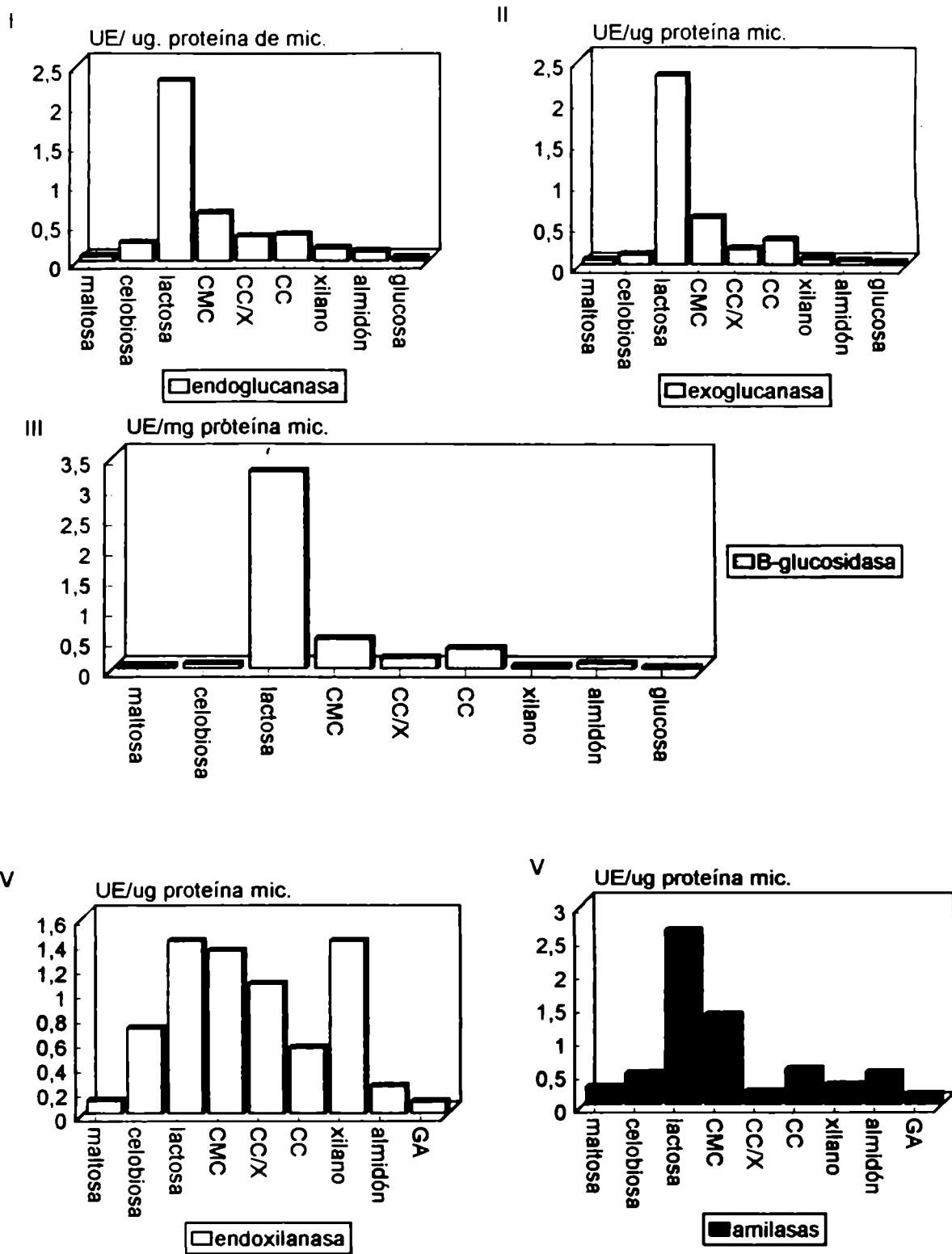


Figura 21 : Actividad enzimática por unidad de biomasa. (I, II, III) Sistema celulolítico; (IV) Sistema xilanolítico; (V) Sistema amilolítico.

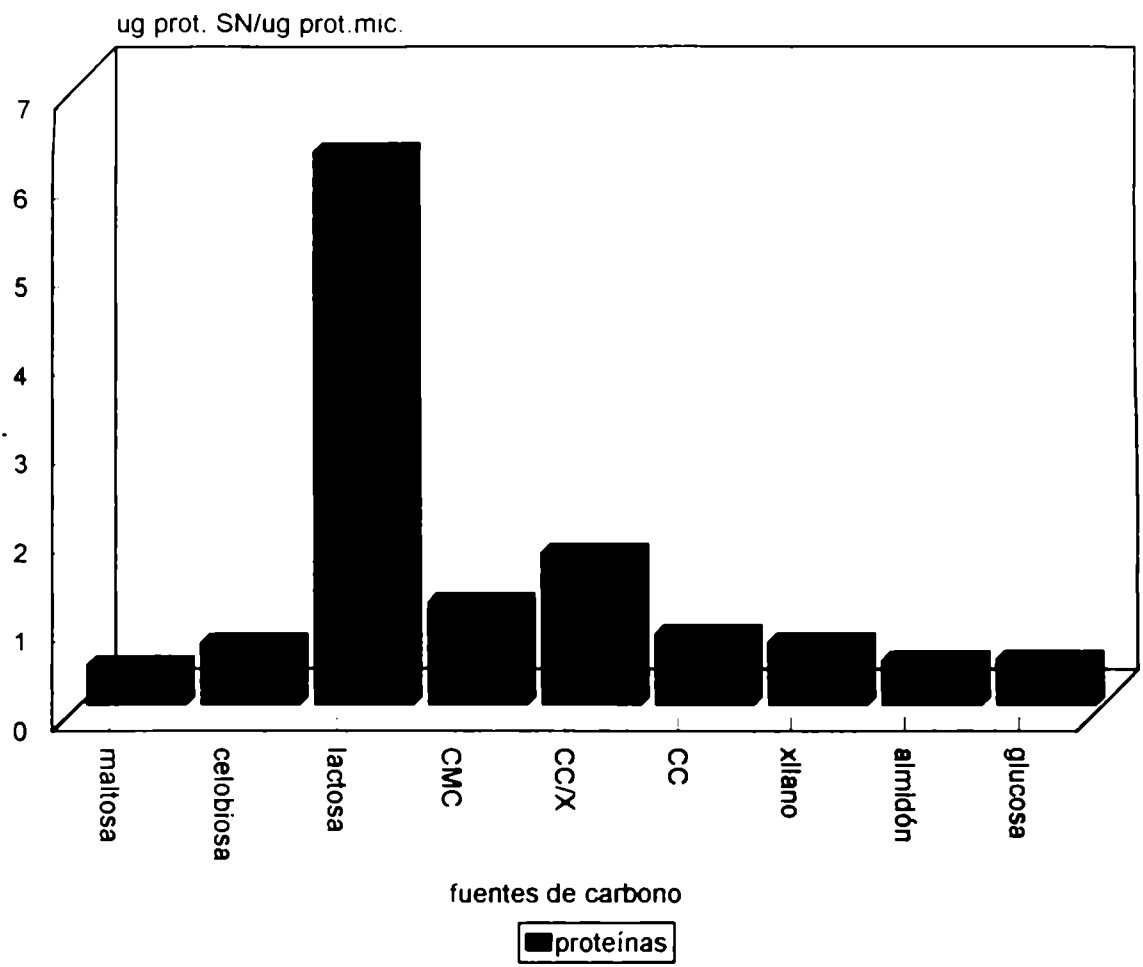


Figura 22 : Proteínas de sobrenadante en función de las proteínas de micelio.

Si bien la mayoría de los hongos son capaces de utilizar fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas para su crecimiento (Roepper y French, 1981; Peeler y Mullins, 1982; Lima y Mercuri, 1984; Rappior et al., 1988; Pardo y Forchiassin, 1993; Ramos, 1994) la utilización de una determinada fuente en particular está genéticamente determinada y además, depende de las condiciones nutricionales y de cultivo en que se desarrolla. Incluso se ha discutido sobre el condicionamiento de la fuente de nitrógeno sobre la utilización de diferentes fuentes de carbono (Lilly y Barnett, 1953; Lima y Mercuri, 1984). Esto cobra especial importancia al tratarse de hongos capaces de utilizar celulosa cristalina (Humphrey et al., 1977, Reese, 1977, Wang et al., 1983).

El condicionamiento de la producción de celulasas por parte de la fuente de nitrógeno ha llevado a desarrollar técnicas tales como cultivo en dos etapas (Ryu et al., 1979), o cultivos retroalimentados utilizando hidróxido de amonio como fuente de nitrógeno.

Los resultados se muestran en las figuras 23 a, b y c. En los medios con fuentes de nitrógeno inorgánicas : nitrato de amonio (NA ), sulfato de amonio (SA) y fosfato de amonio (FA), solo se midió un nivel basal en las actividades enzimáticas de los tres sistemas enzimáticos estudiados. El crecimiento obtenido es también muy pobre, obteniéndose también un pH final muy bajo (inferior a 5) en todos los casos excepto en FA donde se obtuvo un pH=6. El escaso crecimiento obtenido al utilizar sales de ácidos fuertes que provocan un descenso del pH que llega a inhibir el crecimiento también fue descrito para *Ascobolus furfuraceus* (Lima y Mercuri, 1984). El pobre crecimiento, así como escasa actividad celulolítica obtenida al utilizar sales de amonio como fuentes de nitrógeno ha sido descrito también para *Saccobolus saccoboloides*,

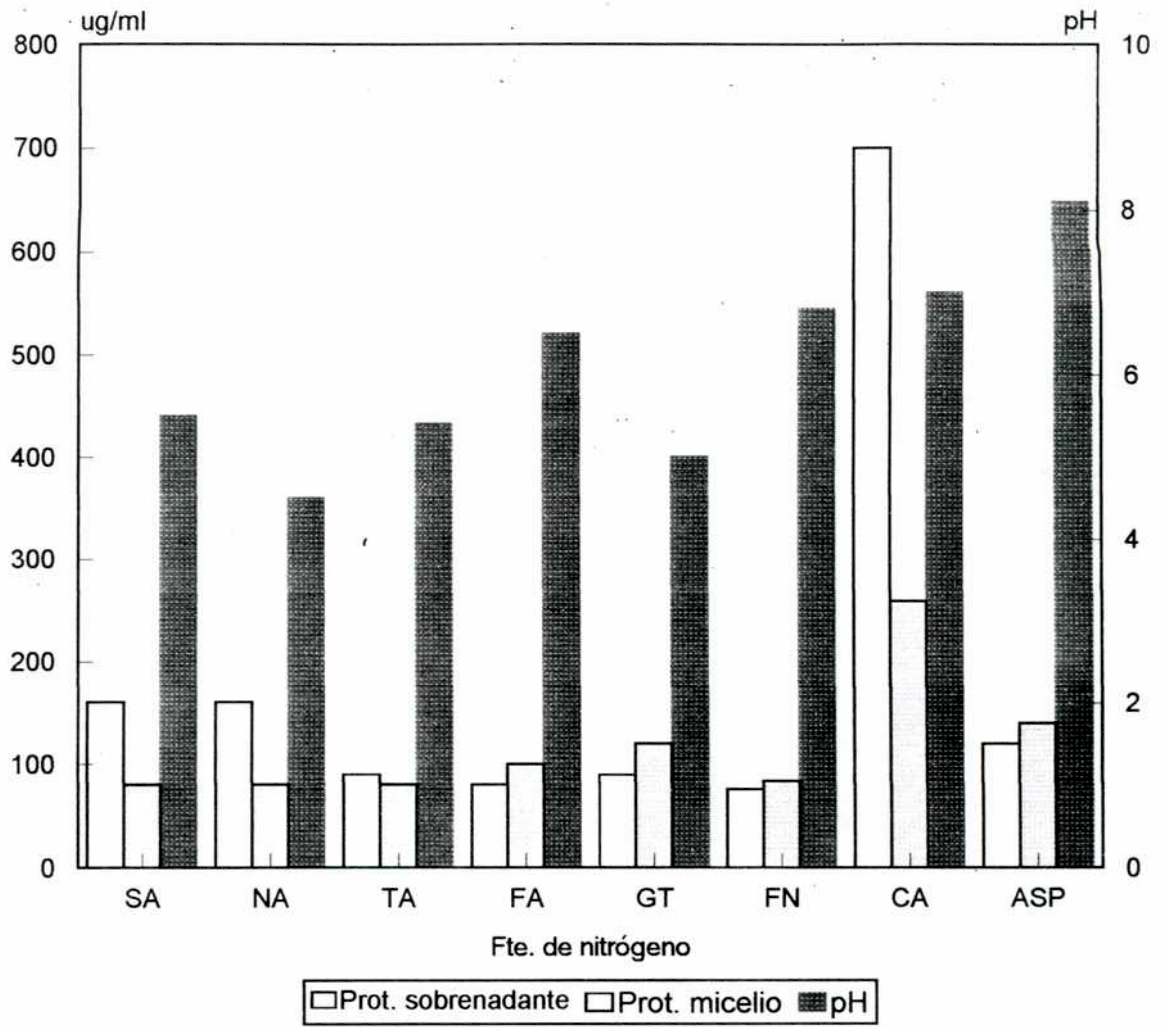
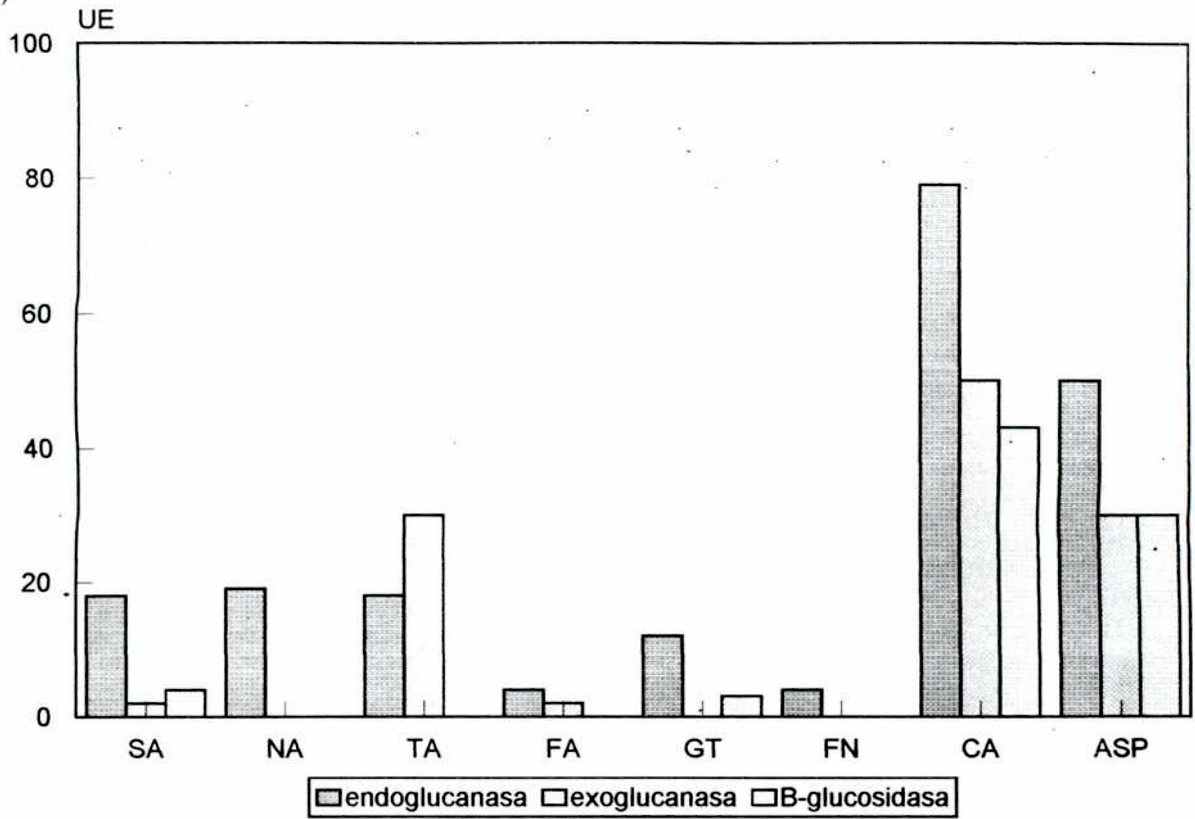


Figura 23 a : Crecimiento y pH en diferentes fuentes de nitrógeno.

(23 b)



(23 c)

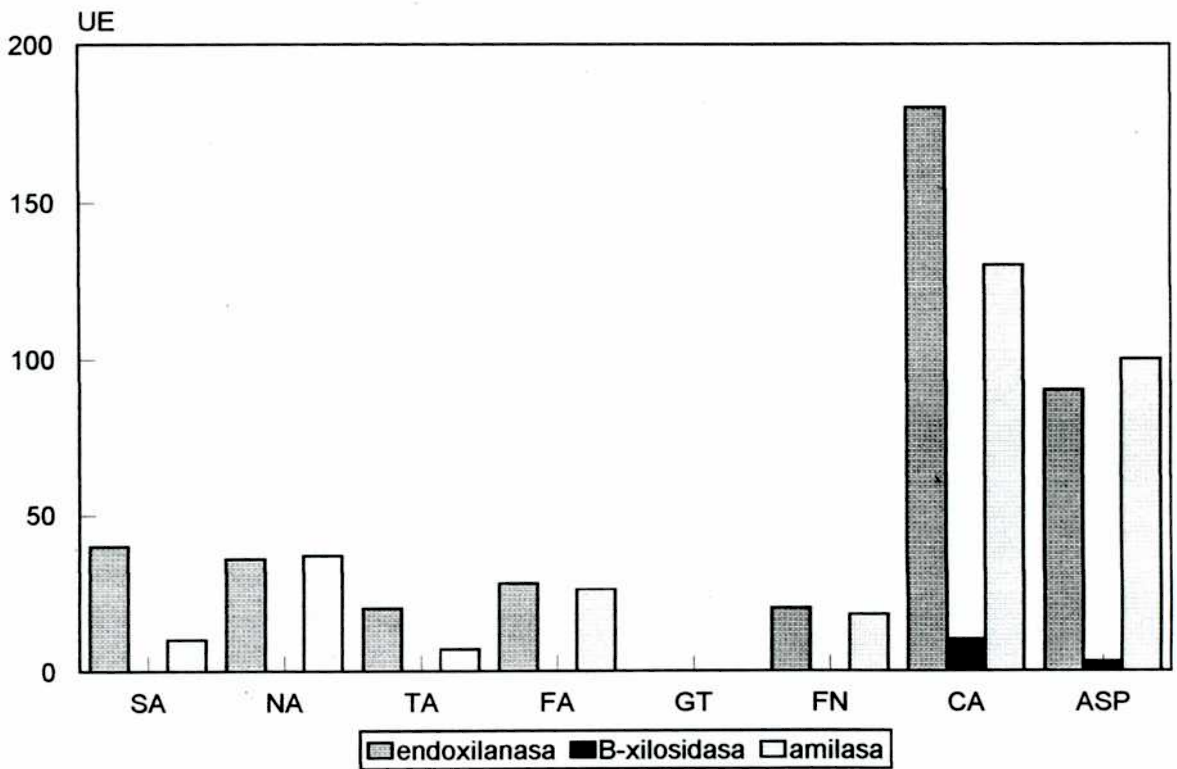


Figura 23 : Actividad enzimatica en diferentes fuentes de nitrogeno. (b) Sistema celulolitico; (c) Sistema xilanolitico y amilolitico.

perteneciente a la familia Ascobolaceae (Magnelli et al., 1996). Sin embargo, para *Nectria catalinensis* (Pardo, 1995) y para *Aspergillus fumigatus* (Stewart y Parry, 1981) estas fuentes inorgánicas fueron las que optimizaron la producción del sistema celulolítico.

En tartrato de amonio (TA) tanto el crecimiento como la actividad enzimática resultaron pobres, obteniéndose un pH final bajo.

Al utilizar casaminoácidos, el crecimiento obtenido fue de 150 mg / ml de medio, con una alta concentración de proteínas en el sobrenadante (figura 23 a). Usando casaminoácidos como fuente de nitrógeno, *Nectria catalinensis* también crece eficientemente; a pesar de que es pobre en la liberación de enzimas extracelulares al medio (Pardo, 1995). El sistema celulolítico de *A. gamundii* fue inducido (figura 23 b) con casaminoácidos. Las actividades de las tres enzimas que componen este complejo fueron las más altas registradas en esta experiencia. Lo mismo se registró para otro hongo de la misma familia *Saccobolus saccoboloides* (Magnelli et al., 1996) así como para un basidiomycete agente de pudrición blanca *Trametes trogii* (Levin y Forchiassin, 1995). En ambos casos la utilización de casaminoácidos fue la fuente de nitrógeno que optimizó, tanto el crecimiento como la producción de la tres enzimas componentes del sistema celulolítico.

La actividad endo-xilanasas (figura 23 c) también fue la mayor en el medio con casaminoácidos. Para la  $\beta$ - xilosidasa, también fue el mejor medio, pero sigue resultando en una baja actividad.

El complejo amilolítico, también es inducido en el medio con CAS como fuente de nitrógeno (figura 23 c).

La eficiencia en la inducción y secreción de enzimas extracelulares por parte de fuentes de nitrógeno orgánicas ya ha sido descrito por varios autores (Joglekar y Karanth, 1984; Lachke et al., 1986).

Se ensayaron tres aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Tanto la fenilalanina (FN) como la glutamina (GT) resultaron pobres para promover tanto el crecimiento como la actividad enzimática de cualquiera de los sistemas enzimáticos estudiados, mientras que la asparagina (AS) resultó una buena fuente.

Tanto en asparagina como en el medio con casaminoácidos, se obtuvo buen crecimiento, con un pH final cercano a 8. En estos dos medios se indujo la actividad de los tres sistemas estudiados.

La actividad enzimática específica referida a las proteínas extracelulares (figura 24) resulta útil al momento de elegir un medio de cultivo para producir enzimas que posteriormente serán sometidas a un esquema de purificación.

En la figura 24 se graficó la actividad enzimática registrada para las diferentes enzimas por unidad de proteína de sobrenadante. Se puede observar que no se podría determinar que fuente favorece la producción de todas las enzimas al ser referidas a las proteínas de sobrenadante. Si nosotros además observamos la figura 23 a, b y c; podremos observar que solamente en los medios con asparagina y casaminoácidos obtuvimos un buen crecimiento y producción enzimática. De aquí deducimos dos cosas: la alta actividad específica de las enzimas celulolíticas en medios con tartrato de amonio está sustentada con un crecimiento muy pobre, mientras que la actividad específica de las mismas en medio con casaminoácidos y asparagina, si bien es algo menor, implicó un gran crecimiento y liberación de enzimas.

Es decir que para decidir que fuente de nitrógeno se va a utilizar debo tener en cuenta que si elijo el medio con tartrato de amonio deberé elegir además otro método de cultivo en el que se asegure, como primer paso, una mayor liberación de proteínas al sobrenadante, para así obtener una buena cantidad de enzimas.

Si se utiliza el medio con asparagina o casaminoácidos, se obtendrá un mayor crecimiento (sin necesidad de cultivos previos) y producción

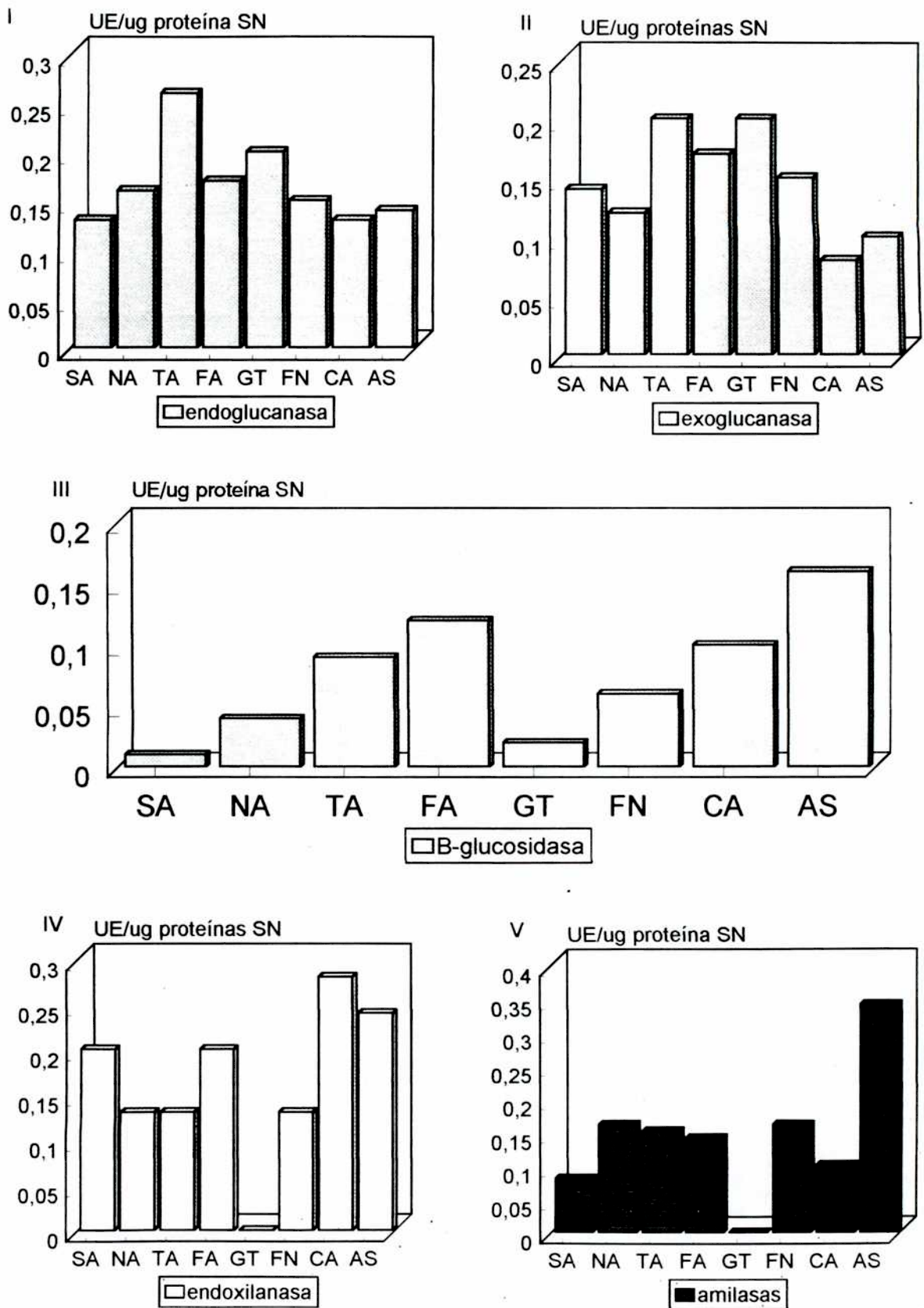


Figura 24 : Actividad enzimática específica. (I, II, III) Sistema celulolítico; (IV) Sistema xilanolítico; (V) Sistema amilolítico.



de enzimas. Resta evaluar luego, según el objetivo, que fuente será la conveniente a utilizar.

Para la producción de endoxilanasas y de amilasas, los medios con casaminoácidos o asparagina son sin duda la mejor elección, ya que producen la actividad específica más alta (asegurando purificaciones más sencillas) con altos valores de actividad enzimática totales.

La actividad enzimática específica referida a las proteínas de micelio da idea de la productividad enzimática por unidad de biomasa. Estos parámetros son de utilidad en los casos de producción enzimática a partir de cultivos precrecidos inicialmente en un medio rico que favorece la obtención de biomasa y que luego son transferidos a medios inductivos para la producción enzimática.

Como se ve en la figura 25 para *A. gamundii* el medio que promueve la máxima productividad enzimática por unidad de biomasa (sin tener en cuenta su efecto sobre el crecimiento) es, para los sistemas enzimáticos estudiados el medio que contiene casaminoácidos como fuente de nitrógeno, salvo para los casos de la endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa y la exo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa. En estos dos casos el medio con tartrato de amonio supera su producción por unidad de biomasa. No debe dejarse de tener en cuenta en estos casos que la producción de biomasa es especialmente baja.

Estos resultados se ven reflejados en la figura 26, donde se ve que en el medio con casaminoácidos como fuente de nitrógeno se obtienen los valores más elevados de proteínas extracelulares por unidad de biomasa.

#### R.2.2.1.- OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DE LA FUENTE NITROGENADA.

Dado que de la experiencia anterior se concluyó que la mejor fuente de nitrógeno para el crecimiento y producción de enzimas extracelulares fueron los casaminoácidos, se decidió valorar cual era la

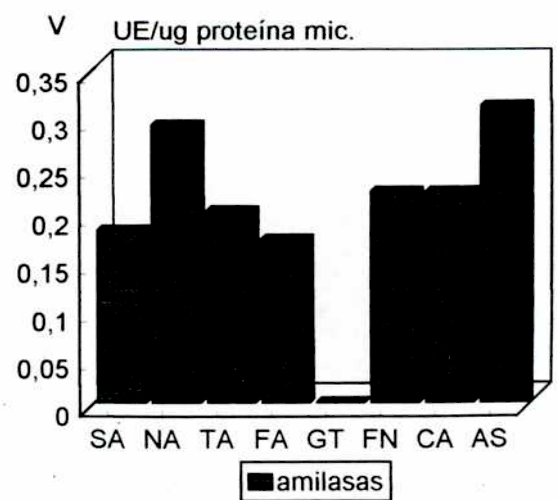
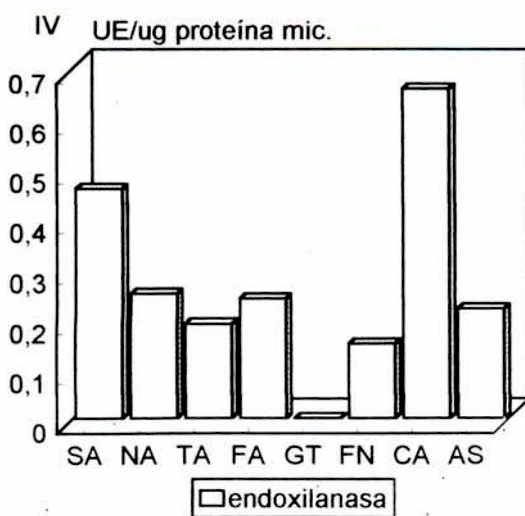
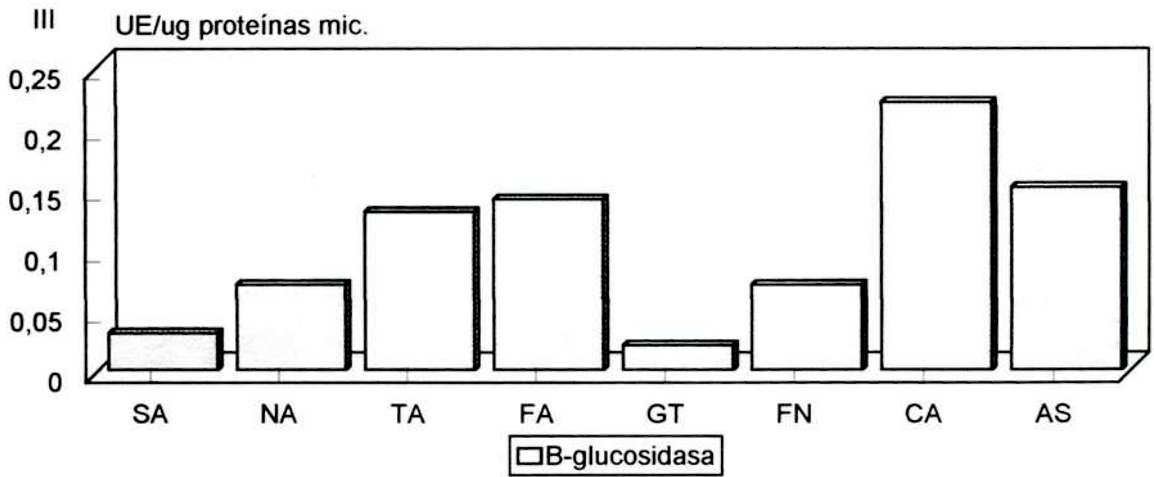
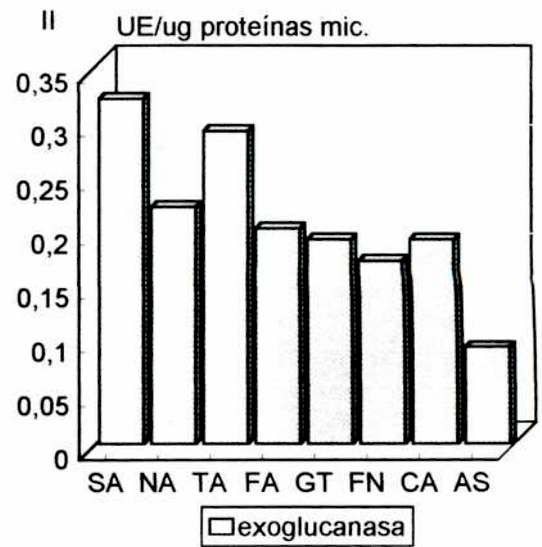
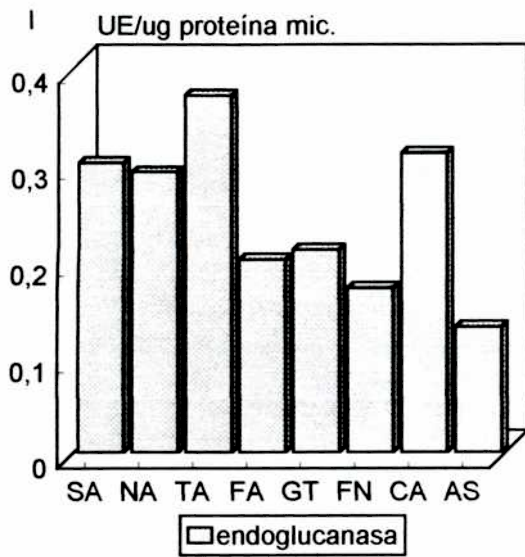


Figura 25 : Actividad enzimática por unidad de biomasa. (I, II, III) Sistema celulolítico; (IV) Sistema xilanolítico; (V) Sistema amilolítico.

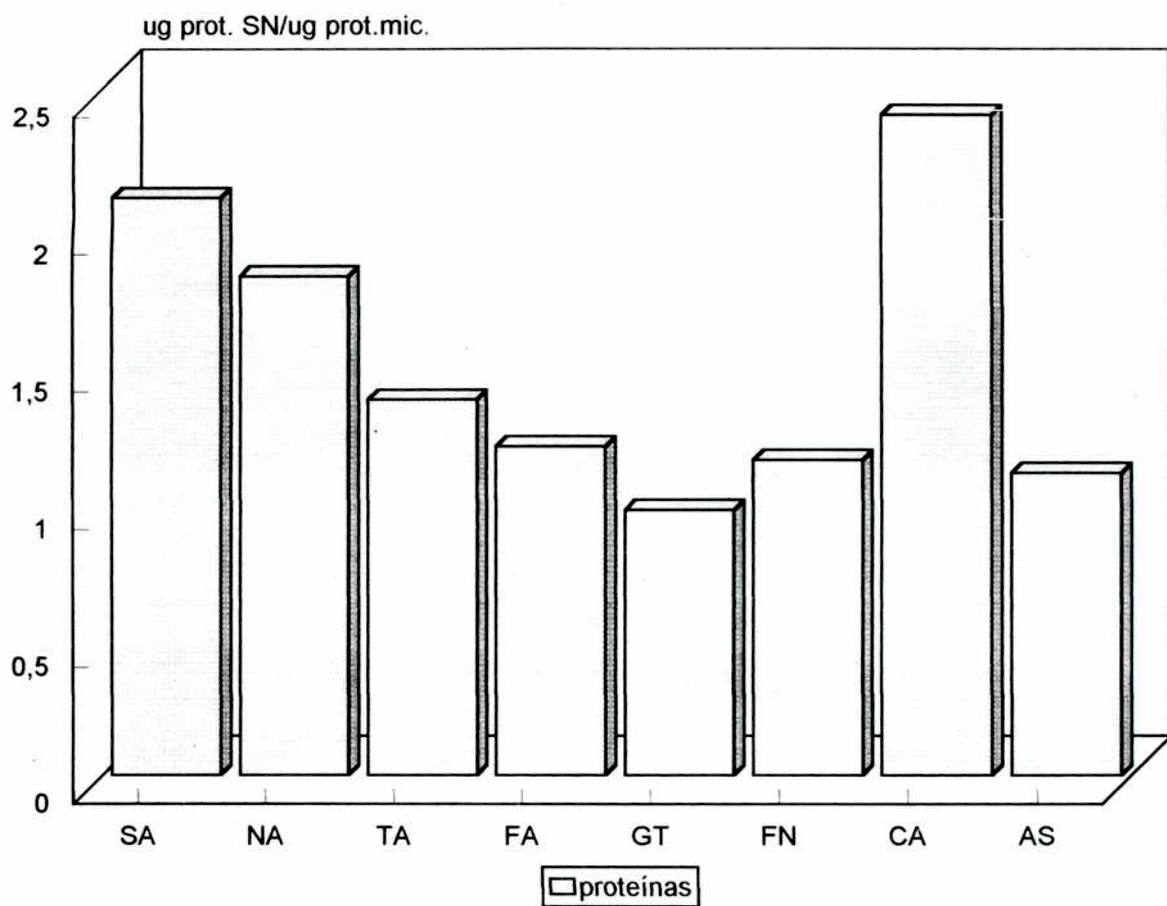


Figura 26 : Proteínas de sobrenadante en relación con las proteínas de micelio en diferentes fuentes de nitrógeno.

concentración óptima para lograr la mejor inducción enzimática. Para ello, se utilizó siempre como fuente de carbono celulosa cristalina (10 g/l) y se varió la concentración de casaminoácidos entre 0.25 g de N/l y 3 g de N/l. La cosecha se hizo el día 12, al igual que en la experiencia anterior.

El crecimiento de *Ascobolus gamundii* aumenta al incrementarse la concentración de casaminoácidos hasta los 1.5 g/l. de nitrógeno en el medio (0.75 g. de casaminoácidos / 50 ml de medio) según se ve en la figura 27. Luego, a pesar de que se siguió aumentando la concentración de nitrógeno, el crecimiento, medido como proteínas de micelio no fue mayor, sino que se mantuvo e incluso resultó algo menor.

Las proteínas del sobrenadante se incrementan con el aumento de la concentración de nitrógeno hasta los 2 g/l de N y luego se mantienen a pesar del aumento en la concentración de nitrógeno en el medio.

Si se desea optimizar el crecimiento para *Ascobolus gamundii*, se requerirá una concentración de 1.5 g/l de N (0.75 g. de casaminoácidos / 50 ml de medio), mientras que para optimizar la producción de proteínas de sobrenadante se requerirán 2 g/l de N (1 g. De casaminoácidos/50 ml de medio de cultivo).

En cuanto a la inducción del sistema celulolítico (figura 28), podemos ver que la producción enzimática de las tres enzimas componentes del complejo aumentan al aumentar la concentración de nitrógeno en el medio.

La actividad endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa aumenta con la concentración de nitrógeno hasta llegar a un máximo de actividad con una concentración final de 1.75 g/l de N (0.875 g. de casaminoácidos / 50 ml de medio). Al seguir aumentando la concentración de nitrógeno en el medio la actividad enzimática disminuye. Este efecto podría deberse a la propia inhibición del sistema celulolítico debido a la

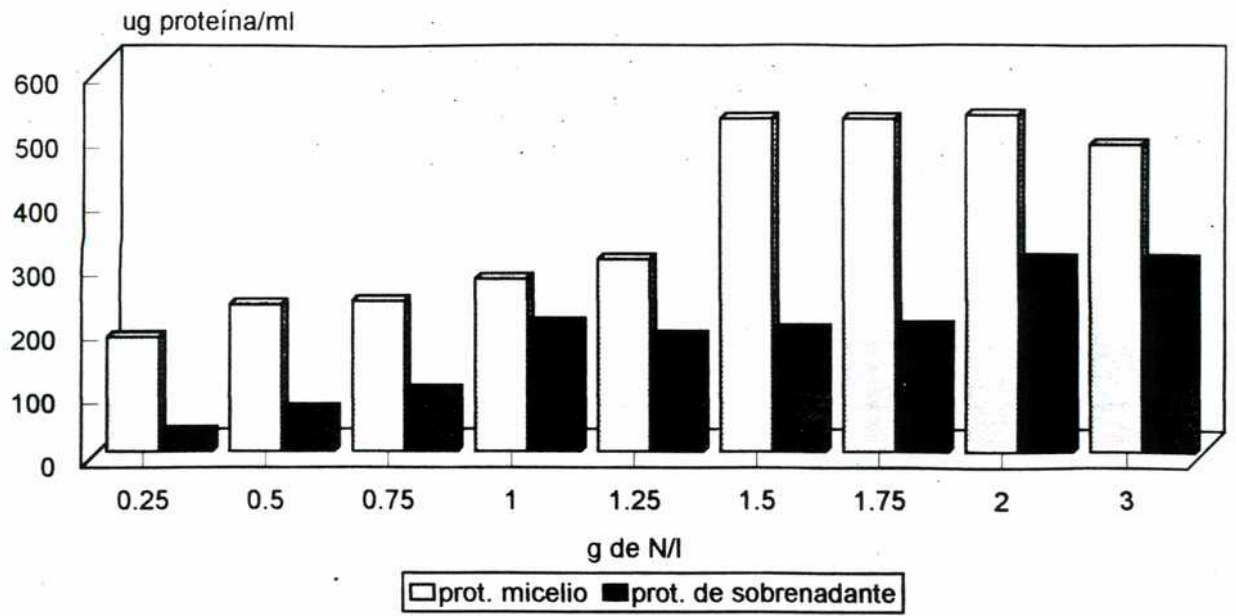


Figura 27 : Crecimiento en función de la concentración de nitrógeno en el medio.

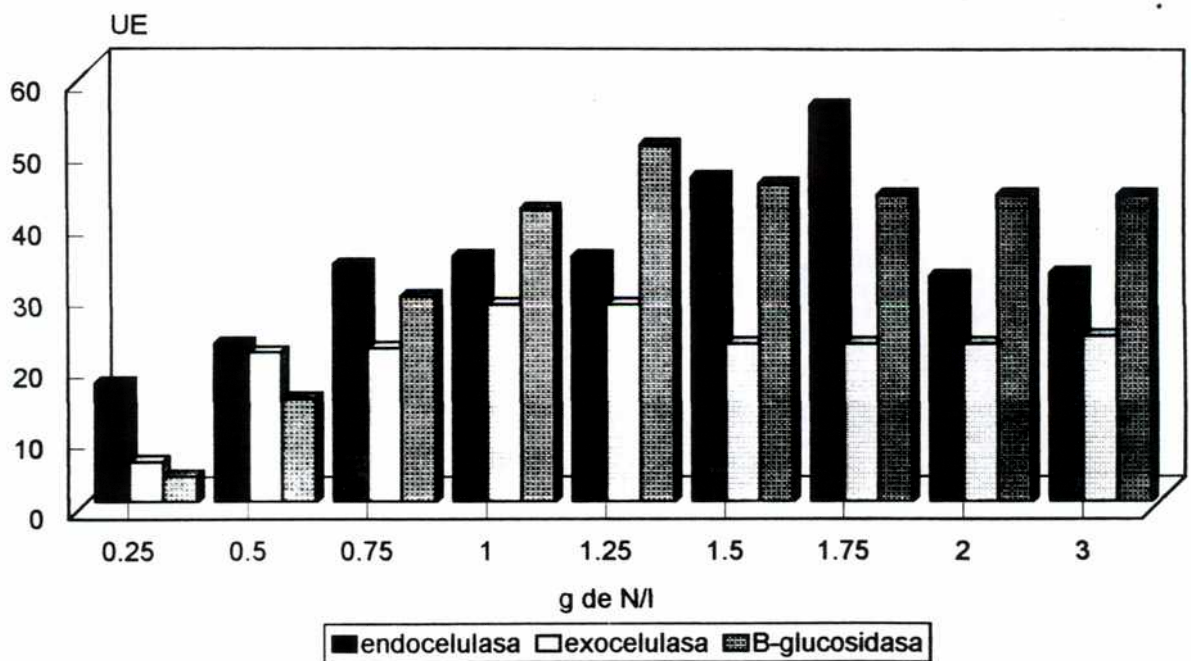


Figura 28 : Actividad enzimática del sistema celolítico en función de la concentración de nitrógeno.

utilización de algún aminoácido de la mezcla como fuente de carbono, ya que estos están en muy alta concentración.

La actividad de la exo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa, así como la de la  $\beta$ -glucosidasa, es también inducida, y se obtiene la mayor actividad enzimática a una concentración menor de nitrógeno en el medio. La concentración óptima en este caso es de 1.25 g/l de N (0.625 g. de casaminoácidos / 50 ml de medio). Al igual que en el caso anterior, al aumentar la concentración de casaminoácidos en el medio la actividad enzimática disminuye levemente.

Las concentraciones de nitrógeno que optimizan tanto el crecimiento como la producción enzimática varían según la especie estudiada. Para *Nectia catalinensis* la concentración óptima fue de 0.75 g/l de N (Pardo, 1995), mientras que para *Trametes trogii* se necesita una concentración mayor a los 1.3 g de N/l (Levin y Forchiassin, 1995).

Estas concentraciones, son siempre mucho mayores a la que los hongos encuentran en la naturaleza, donde la relación C:N normalmente es mayor a 100. Es por ello que la falta de nitrógeno, junto con la asociación de la celulosa a otros sustratos difícilmente degradables como la lignina constituye uno de los principales factores que disminuyen el grado de descomposición de la celulosa en la naturaleza (Markham y Bazin, 1991).

Tabla 6 : concentración óptima de nitrógeno para crecimiento y producción enzimática.

	CONC. OPTIMA DE N (g/l)
Crecimiento	2
Actividad endo $\beta$ -D 1,4 celulasa	1.75
Actividad Exo $\beta$ -D 1,4 celulasa	1.25
Actividad $\beta$ -glucosidasa	1.25

### R.2.3.- INFLUENCIA DE SURFACTANTES EN LA PRODUCCION DE ENZIMAS EXTRACELULARES.

La influencia de surfactantes en el medio de cultivo se llevó a cabo utilizando el medio de cultivo basal, con una fuente de carbono única (celulosa cristalina, xilano o almidón) y asparagina como fuente de nitrógeno.

Los surfactantes ensayados fueron:

Tween 80 → detergente no iónico.

Carbopol → polímero aniónico de carboxipolimetileno.

El efecto de diferentes surfactantes ha sido ampliamente estudiado y los resultados son diversos, dependiendo del surfactante, del organismo y del objetivo en cuestión. En esta experiencia, los cultivos fueron cosechados el día 12, día de mayor actividad enzimática.

Tanto el crecimiento como la producción enzimática se ven notoriamente afectados por la adición, tanto de Tween 80 como de Carbopol al medio de cultivo.

Mientras que en el medio de cultivo sin surfactante alguno se obtiene un crecimiento normal (figura 29 a), al agregar cualquiera de los dos compuestos, el crecimiento se hace casi nulo. En el caso del Carbopol el efecto inhibitorio es aún mayor que el del Tween 80 en cuanto al crecimiento y la actividad enzimática.

El Carbopol se pega a las hifas y puede influenciar el metabolismo celular, así como la permeabilidad de la membrana a sustratos y productos (Morrin & Ward, 1989). La adición de Carbopol ha sido citada como inhibitoria también para la producción de ácido fumárico por *Rhizopus arrhizus* (Morrin & Ward, 1990).

Al utilizar Tween 80 *Ascobolus gamundii* también se ve negativamente afectado, tanto en el crecimiento, como en la producción enzimática (figura 29 b).

Más allá de que el crecimiento es escaso, se observa una modificación morfológica del crecimiento miceliano. Se observó que al agregar Tween 80, el crecimiento se modifica ya que se forman pequeñas bolitas de micelio que concentran en su interior la celulosa cristalina, dejando el medio límpido y claro. Cuando no se agregó Tween 80 el crecimiento resultaba más difuso y las esferas, esta vez de aspecto plumoso dejaban parte de la celulosa cristalina en suspensión. Este efecto puede deberse a una modificación a nivel de membrana, y también a la falta de oxígeno disponible (Yazdi et al., 1990).

El agregado de Tween 80 a los medios de cultivo, ha sido citado como beneficioso para la producción de enzimas extracelulares de varios hongos como *Fusarium oxysporium* (Kuhad et. al., 1994) , *Nectria catalinensis* (Pardo, 1995) y varias especies de *Apergillus* (Sternberg et al., 1977), dado que se sugirió que este provocaría un aumento de permeabilidad en la membrana celular, y por lo tanto, una mayor exportación de celulasas al medio de cultivo (Reese, 1960). También se sugirió la posibilidad de que el Tween 80 promoviera la liberación (o desadsorción) de las enzimas celulolíticas unidas a las hifas.

Se ensayaron entonces, diferentes concentraciones de Tween 80 en el medio de cultivo (0.05 % hasta 0.8%) para comprobar cual era el verdadero efecto sobre la producción enzimática en *Ascobolus gamundii*.

En la tabla 7 se ve que la inhibición tanto del crecimiento como de la actividad enzimática fue fuerte con cualquiera de las concentraciones de Tween 80 utilizadas, demostrando que el Tween 80,



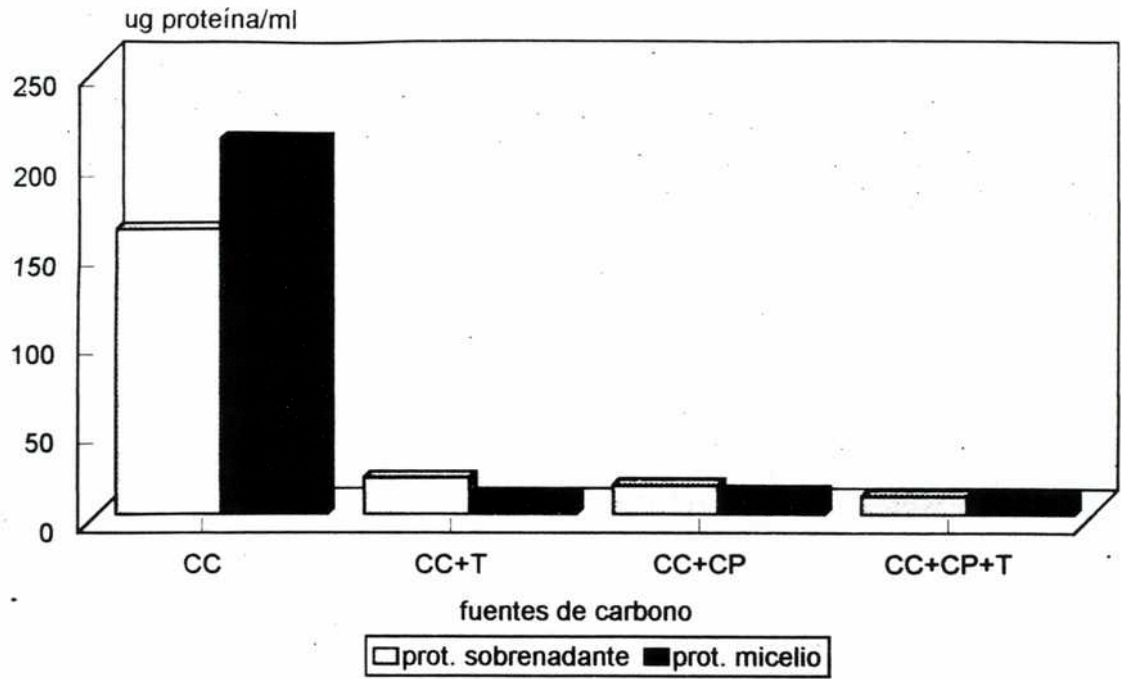


Figura 29 a : Crecimiento en medios con y sin surfactantes.

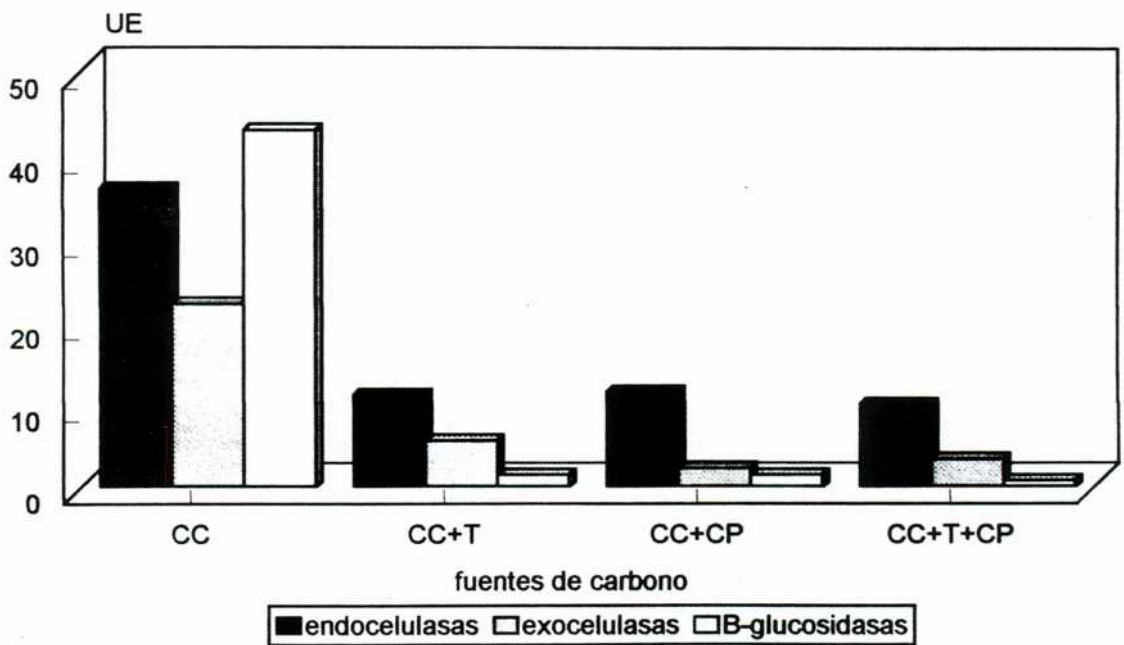


Figura 29 b : Actividad enzimática del sistema celulolítico en medios con y sin surfactantes.

en cualquier concentración tiene un efecto negativo sobre la producción enzimática de *A. gamundii*, tal vez producto de tan escaso crecimiento.

Tabla 7: Ensayos con diferentes concentraciones de Tween 80.

% TWEEN 80	Proteínas de micelio (ug / ml)	Act. Endocelulasas UE
0	213	38
0.05	66	5
0.5	50	1.5
0.8	76	1.4

Efectos negativos en la producción enzimática al agregar Tween 80 al medio también fue registrado para *Agaricus bisporus* (Shewale & Sadana, 1978) y para *Trichoderma reesei* (Taj-Aldeen, 1993) cuando las concentraciones de Tween 80 superaron el 0.1 %.

Este efecto negativo, tanto sobre el crecimiento como sobre la producción de enzimas extracelulares, también se comprobó para la producción de la endoxilanasas y para la producción de amilasas (figura 30 a y b).

Tanto la adición de carbopol como de Tween 80 redujo el crecimiento y la producción enzimática comparando con el medio control, sin adición alguna.

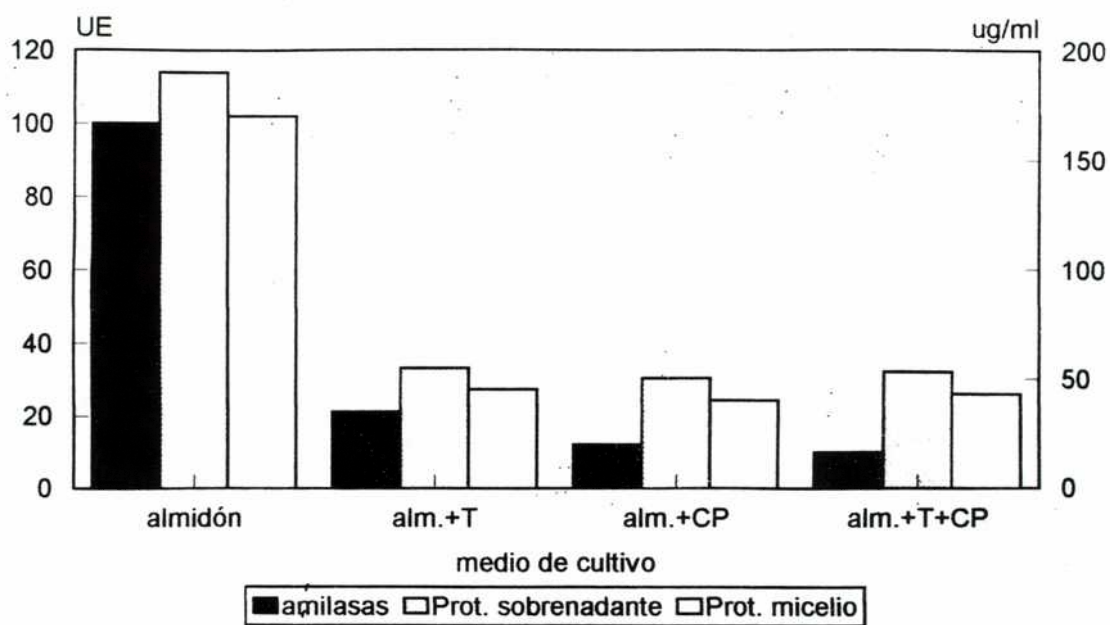


Figura 30 a : Crecimiento y actividad enzimatica del sistema amilolítico en medios con y sin surfactantes.

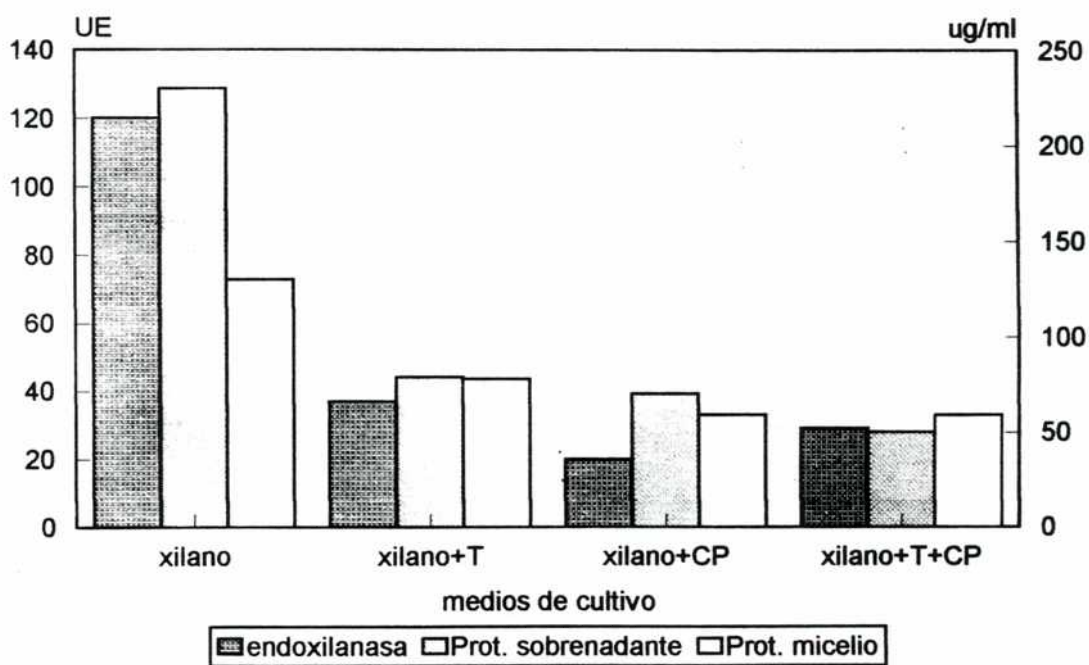


Figura 30 b : Crecimiento y actividad enzimatica del sistema xilanolitico en medios de cultivo con y sin surfactantes.

### R.3.- REGULACION DE LA PRODUCCION ENZIMATICA.

#### R.3.1.- EXPERIENCIAS DE INDUCCION ENZIMATICA.

En las experiencias de inducción, las actividades enzimáticas no se pudieron dosar con el método de Somogyi - Nelson, porque los inductores utilizados interferían en la reacción ya que poseen un extremo reductor propio, ocasionando que la lectura de los blancos de sobrenadante fuera excesivamente alta. La actividad enzimática fue dosada para los tres sistemas estudiados (celulolítico, xilanolítico y amilolítico) en placa (ver materiales y métodos pto.5.4).

La posibilidad de dializar el sobrenadante fue descartada ya que se comprobó que este sistema disminuye la actividad enzimática registrada debido a la adsorción de las enzimas celulolíticas a la membrana de diálisis que es de celulosa.

##### R.3.1.1.- SISTEMA CELULOLITICO.

Para el sistema celulolítico, la celulosa cristalina ha sido reconocida como un buen inductor para muchos microorganismos celulolíticos tales como *A. piromyces* (Morrison et al., 1990), *Neocallimastix frontalis EB 188* (Calza, 1991), ambos habitantes del rumen de herbívoros; *Trichoderma reesei* (Schafner y Toledo, 1991; Messner y Kubicek, 1991), *Nectria catalinensis* (Pardo, 1995) y *Saccobolus saccoboloides* (Magnelli y Forchiassin, 1999) entre otros.

Su alto potencial inductor ha sido atribuido a la lentitud con que la misma es metabolizada en comparación a otros azúcares de rápida asimilación, descartando así la posibilidad de una represión catabólica.

Para *A. gamundii* con celulosa cristalina como inductor, los halos de degradación comienzan a detectarse antes que con cualquier otro inductor utilizado ( ver tabla 8 ). A las 4 horas de trasladar el micelio al medio inductor con celulosa cristalina comienza a aparecer un halo de degradación, indicando que hay actividad celulolítica presente. Los halos aumentaron de área con el tiempo, a medida que se sintetizan más enzimas. Estos halos llegan a ser los más grandes producidos en estas experiencias.

La concentración del inductor, en este caso, es importante, ya que se observa que a medida que aumenta la concentración de celulosa cristalina, aumenta el área de los halos de degradación obtenidos.

Se observa también una relación entre la concentración del inductor y el tiempo lag, o de síntesis de novo de las enzimas. A las 4 horas, solo cuando se utilizó la mayor concentración de celulosa cristalina (2%) pudo observarse un halo de degradación.

El CMC también indujo el sistema celulolítico, pero las enzimas se detectaron recién a las 8 horas luego de pasar el micelio al medio inductor. Los halos de hidrólisis formados fueron siempre menores a los obtenidos con celulosa cristalina, lo que indica que la actividad enzimática es menor. El CMC resultó ser un pobre inductor del sistema celulolítico para *A. gamundii*, así como también para otros hongos tales como *Chaetomium thermophile* (Banju et al., 1990) y *Humicola sp.* (Chaves et al., 1989).



Al utilizar bajas concentraciones de CMC (0.05%) la inducción no resulta tan efectiva ya que el primer halo de degradación se detecta recién a las 12 horas. Estos halos de degradación no aumentan con el tiempo y demuestran que la actividad enzimática relacionada es baja.

Al utilizar concentraciones más altas (0.1% y 2%) la inducción es semejante hasta las 48 horas. A las 72 horas hay el doble de actividad con CMC 2% que con CMC 0.1%.

El xilano también indujo la síntesis del complejo celulolítico, como ocurrió también para *Trichoderma harzianum* E 58 (Senior et al., 1989) pero, también al igual que para *A. gamundii*, su actividad es mucho menor que la actividad endoxilanasas producida (según lo demostrado en la sección 1.3.2.- de esta sección). Al utilizar xilano, los halos de degradación recién aparecen a las 12 horas del traslado del micelio. En este caso el aumento en la concentración del inductor no parece llevar a una mayor inducción enzimática. La concentración óptima de xilano para inducir el sistema celulolítico es de 0.1%, resultando las otras dos concentraciones menos eficientes. A bajas concentraciones, el xilano presente puede encontrarse en concentraciones subóptimas para gatillar la síntesis de celulasas. Al encontrarse en altas concentraciones se podrían poner en marcha los sistemas de represión celulares, produciendo en consecuencia halos de degradación de áreas menores (indicando que la actividad enzimática es menor).

El efecto inductor del xilano, puede ser también indirecto, ya que se sabe que este sustrato puede contener pequeñas cantidades de celulosa como impurezas propias del sustrato, que podrían ser las responsables de la inducción del sistema celulolítico y ocasionar así errores al valorar las actividades enzimáticas.

Se han citado varios hongos que producen simultáneamente xilanasas y celulasas. Su regulación parece estar fuertemente relacionada. En *Aspergillus niger*, se secuenciaron dos genes de celobiohidrolasas que requerían xilosa para lograr expresarse (Gielkens et al., 1999).

Con almidón como inductor, al igual que en *A. piromyces* (Morrison et al., 1990) la inducción del complejo celulolítico resulta menos eficiente.

Como ya se observó en esta misma sección en el pto. 1.4.2.- al crecer en almidón, como única fuente de carbono *A. gamundii* es capaz de producir una alta concentración de  $\beta$ -glucosidasas al igual que *Trichoderma reesei* (Taj- Aldeen, 1993), pero no de endo  $\beta$ -D-1,4-glucanasa ni de exo  $\beta$ -D-1,4-glucanasas. Al revelar la actividad celulolítica con el método del Rojo Congo (ver pto.5.4.1. de materiales y métodos), se valora el complejo en su totalidad, por lo tanto la presencia de un solo componente del sistema no es suficiente para que se produzcan los halos de degradación.

Estudiando la inducción por almidón, Chen Shu y Wayman (1992), vieron que si bien el almidón no era un buen inductor naturalmente, luego de ser sometido a una hidrólisis ácida si lo era, reforzando la teoría de que el verdadero inductor del sistema es un producto soluble, producto de la hidrólisis de los polisacáridos.

Para *Ascobolus gamundii* la inducción por almidón resulta pobre y muy lenta. El primer halo de degradación aparece recién a las 24 horas y con las mayores concentraciones (0.1% y 2%). Al utilizar la menor concentración (0.05%) *A. gamundii* no logra producir una cantidad significativa de celulasas.



De los disacáridos utilizados, la lactosa resultó ser el mejor inductor del sistema celulolítico. Ya a fines de los años cincuenta (Reese, 1959) se reportó la eficiencia de la lactosa como inductor del sistema celulolítico.

La estructura molecular de la lactosa es muy similar a la celobiosa, inductor natural propuesto del sistema celulolítico. La única diferencia está en la configuración del C(4) de la unión glucosídica del disacárido. Esta diferencia hace que la lactosa resulte una pobre fuente de carbono para promover el crecimiento (ver pto. 2.1.- de esta sección), pero de todos modos pueda ser muy eficiente para inducir el sistema celulolítico. Esto ha sido confirmado para otros hongos como *Trichoderma reesei* (Chaudhari y Sahai, 1993; Messner y Kubicek, 1991) y para *T. longibrachiatum* (Royer y Nakas, 1989), entre otros.

Ya a las 8 horas de comenzada la inducción, se detectaron halos de degradación con las tres concentraciones de lactosa utilizadas.

La concentración de lactosa utilizada solo tiene relevancia en las primeras horas, ya que a partir de las 24 horas los halos de degradación obtenidos con las diferentes concentraciones son similares. Esto se relaciona con el hecho de que, al ser un azúcar de lento metabolismo, y poseer una configuración química adecuada, la lactosa no permitiría que se desencadenen sistemas de represión celulares. A las 24 horas, tan solo con 0.05% de lactosa en el medio se logra la misma inducción que al utilizar 2%.

Las diferentes concentraciones solo tienen influencia en las primeras horas en la cantidad de enzimas detectadas, pero no en el tiempo de detección de las mismas.

La fructosa, así como otros azúcares que permiten un rápido crecimiento, no resultó un buen inductor. Esto ha sido descrito ya para *T. reesei* (Messner y Kubicek, 1991).

Los halos de degradación obtenidos resultaron pequeños. No se obtuvo degradación alguna en 72 horas con las concentraciones de 0.05% ni 2%. Solo se obtuvieron halos con la concentración intermedia, que resultaron pequeños, e incluso se redujo a las 72 horas, a causa de una inhibición por producto.

Al utilizar sorbitol, solo se obtuvo una leve inducción del sistema celulolítico utilizando la máxima concentración (2%). Los halos se detectan recién a las 12 horas y resultan muy pequeños.

La celobiosa como inductor en las concentraciones utilizadas resultó pobre por dos motivos. Los halos de degradación aparecen recién a las 24 horas, lo que implica un tiempo considerable para gatillar la síntesis de enzimas. Además, el área de los halos de degradación es menor que la obtenida tanto con celulosa cristalina como con lactosa (otro disacárido) en cualquiera de las concentraciones utilizadas.

La celobiosa ha sido propuesta históricamente, como el real inductor del sistema celulolítico, dado que es un producto soluble de la hidrólisis de la celulosa, capaz de penetrar en el micelio y gatillar así la síntesis de novo de las enzimas (Sternberg y Mandels, 1982). Sin embargo, su rol como tal es discutido ya que, dependiendo de la concentración en la que se encuentre, también ha sido descrito como represor del sistema (Reese, 1960).

Para *A. gamundii*, así como para otros hongos como *Termitomyces clypeatus* (Sengupta, 1990), *T. reesei* (Mandels y Reese, 1960; Fritscher et al., 1990; Chaudhari y Tauro, 1990) la celobiosa no resultó un buen inductor, determinándose que su ineficiencia se encuentra solapada por efectos de represión catabólica.

Al utilizar 0.05% de celobiosa la inducción es la menos eficiente. Con 0.1% y 2% los halos producidos son mayores pero solo después de 24 horas de inducción.

En 1960 Mandels y Reese observaron que la celobiosa era poco eficiente para inducir la síntesis de celulasas en *T. viridae* y en *Sporotrichum prionusum*, pero que ésta era consumida rápidamente. Esto producía una caída de la actividad celulolítica que solo se recuperaba cuando la celobiosa había sido consumida o quedaba en muy baja concentración. Es por ello, lógico que los halos de degradación de *A. gamundii* solo se detecten tardíamente en este ensayo.

La maltosa y la xilosa resultaron los peores inductores del sistema celulolítico tanto en tiempos para inducir como en cantidad de enzimas producidas.

Al utilizar la maltosa como inductor recién se producen halos de degradación a las 48 horas y solo con las dos mayores concentraciones (0.1% y 2%), resultando la mayor concentración levemente mejor ya que produjo mayores halos. Con la concentración de 0.05% nunca se lograron detectar halos (en las 72 horas de esta experiencia).

La xilosa también produjo halos de degradación recién a las 48 horas, que resultaron muy pequeños en las tres concentraciones utilizadas por igual. Esto sugiere que independientemente de la concentración utilizada no resultó un buen inductor del sistema celulolítico para *A. gamundii*. Lo mismo ocurrió para otros hongos como *T. longibrachiatum* (Royer y Nakas, 1989) y para *T. reesei* (Schaffner y Toledo, 1991).

### R.3.1.2.- SISTEMA XILANOLITICO.

Como se puede ver en la tabla 9, de los polímeros utilizados, el xilano resultó el mejor inductor para este sistema enzimático. Los halos de

degradación se produjeron ya a las 4 horas de comenzada la inducción. El área de los mismos aumenta con el tiempo, a medida que progresa la inducción. La concentración del inductor es importante en este caso, ya que a menor concentración el área del halo producida es menor para cualquier tiempo dado. Los halos casi duplican su área al duplicar la concentración del inductor.

El xilano ya ha sido reconocido como buen inductor del sistema xilanolítico en varios hongos como *Trichoderma longibrachiatum* (Royer y Nakas, 1989) y *Aspergillus awamori* (Kormelink y Huang, 1993), entre otros.

**Tabla 9: Inducción del sistema xilanolítico.**

Area de los halos de degradación obtenidos con los diferentes inductores ensayados.

inductor (%)	hs.	xilano mm <sup>2</sup>	CMC mm <sup>2</sup>	xilosa mm <sup>2</sup>	lactosa mm <sup>2</sup>	almidón mm <sup>2</sup>
0.05	4	18.84	-	-	-	-
0.1		30.63	-	-	-	-
2		ND	-	-	-	-
0.05	8	18.84	-	-	8.63	-
0.1		43.98	-	-	8.63	-
2		ND	-	-	8.63	-
0.05	12	18.84	-	-	58.9	-
0.1		52.74	-	-	58.9	-
2		ND	-	-	58.9	-
0.05	24	30.63	-	-	75.39	-
0.1		58.9	-	3.3	113	-
2		ND	-	3.3	95	-
0.05	48	30.63	-	8.63	75.3	-
0.1		75.4	-	8.63	113	-
2		ND	-	8.63	113	-

ND: no determinados.

Los otros polisacáridos ensayados (CMC y almidón) no lograron inducir el sistema xilanolítico, al menos de manera tal como para ser detectados con este sistema de revelado. En las 48 horas que duró este ensayo no se produjeron halos de degradación con ninguna de las concentraciones de CMC ó almidón utilizadas.

Sin embargo, no se puede descartar la producción de estas enzimas en estos medios. Como se demostró anteriormente (sección 1 - curvas de crecimiento-), se obtuvo una inducción, aunque bastante débil y muy lenta al realizar los estudios de cinética de crecimiento y producción enzimática. En estos casos, se obtuvo una diferencia de actividad enzimática, al compararla con el medio sin inductor (GA), que se tomó como nivel basal de enzimas extracelulares.

Es necesario tener en cuenta que en la sección 1 la actividad enzimática fue detectada por otro método, mas sensible.

Al utilizar xilosa como inductor, tampoco se obtuvieron halos de degradación hasta las 24 hs de comenzada la inducción que demostraran la inducción del sistema. Esta escasa y muy pobre inducción del sistema no parece depender de la concentración de xilosa utilizada, ya que con las tres concentraciones se obtuvieron resultados similares para los distintos tiempos ensayados. La xilosa es un azúcar resultante de la hidrólisis del xilano, por lo tanto, es muy probable que los sistemas enzimáticos correspondientes se encuentren inhibidos por producto final.

La lactosa, en cambio, es un buen inductor del sistema xilanolítico. A pesar de que requiere mayor tiempo para lograr efectivamente la inducción, al lograrlo, esta parece ser inclusive más eficiente que con xilano (los halos de degradación obtenidos con lactosa resultaron de mayor área que los obtenidos con xilano).

El tiempo lag requerido para comprobar que la inducción es efectiva, se debe a que justamente, si bien la lactosa es la molécula que nosotros incluimos como inductora, ésta debe ser modificada (transglicosilada) para actuar como verdadero inductor del sistema enzimático. Este mecanismo de transglicosidación ha sido ya propuesto para la inducción del sistema celulolítico por parte de la soforosa.

La concentración del inductor, no parece tener mayor influencia sobre la inducción en un principio, pero hacia el final del ensayo, se detecta que con la menor concentración la inducción resulta menos eficiente, e incluso parece arrestarse, tal vez por falta de inductor en el medio.

#### R.3.1.3.- SISTEMA AMIOLITICO.

Para el sistema amilolítico, el mejor inductor fue sin duda el almidón, en cualquiera de las concentraciones utilizadas (ver tabla 10).

Ya a las 4 horas de haber pasado el micelio al medio con almidón como inductor, se formaron halos de degradación en las placas. A las 4 horas de inducción se detectó menor actividad enzimática al utilizar la menor concentración de almidón (0.05%), es decir halos de menor área. A las 8 horas las diferencias disminuyeron, y para las 12 horas las pequeñas diferencias entre los halos obtenidos con las diferentes concentraciones no resultaron significativas.

Con almidón como inductor, el tiempo lag de síntesis de novo de las enzimas es el menor, ya que se detecta actividad del sistema a las 4 horas. La concentración del inductor solo influye en las primeras horas de la inducción, diluyéndose luego este efecto.

Al utilizar maltosa (disacárido) como inductor, también hay una inducción del sistema, pero en menor medida que con el polisacárido, ya que los halos de degradación obtenidos son mucho menores.

Los primeros halos de degradación se obtienen también a las 4 horas, al igual que con almidón, pero estos resultan menores para las tres concentraciones utilizadas. Los halos van aumentando de área con el tiempo, pero siempre resultaron menores que los obtenidos con almidón. Siempre se observa que los halos obtenidos con la menor concentración de maltosa resultaron más pequeños, aunque al igual que en el caso con almidón, estas diferencias no son significativas.

**Tabla 10: Inducción del sistema amilolítico.**

Area de los halos de degradación obtenidos con los diferentes inductores.

inductor (%)	hs.	almidón mm <sup>2</sup>	cel.crist. mm <sup>2</sup>	CMC mm <sup>2</sup>	maltosa mm <sup>2</sup>	lactosa mm <sup>2</sup>	sorbitol mm <sup>2</sup>
0.05	4	18.85	-	-	3.26	-	-
0.1		30.63	-	-	6.78	-	-
2		30.63	-	-	6.78	-	-
0.05	8	43.98	-	5	5	-	-
0.1		43.98	-	5	8.63	-	3.26
2		75.29	-	5.35	8.63	3.26	5
0.05	12	75.39	8.64	5.35	18.85	3.26	3.26
0.1		75.39	8.64	5	21.08	3.26	8.63
2		75.39	8.64	5.88	25.73	5	8.63
0.05	24	75.39	9.02	6.78	43.98	8.63	8.63
0.1		93.46	9.2	6.98	46.84	10.75	10.77
2		93.46	9.2	7.33	46.84	12.53	10.77
0.05	48	82.43	9.02	7.15	58.9	14.57	8.63
0.1		93.46	9.6	7.7	58.9	18.85	8.63
2		97.26	10.55	8.64	58.9	21.08	8.63
0.05	72	93.46	9.15	7.7	58.9	18.85	8.63
0.1		101.13	9.6	7.7	65.32	18.85	8.63
2		105.05	10.94	8.64	65.32	18.85	8.63

La celulosa cristalina, resulta un muy pobre inductor del sistema amilolítico, ya que los primeros halos de degradación aparecen recién a las 12 horas y con un área muy pequeña, lo que sugiere que la actividad enzimática es muy baja. La concentración del inductor, tampoco tiene mayor influencia ya que los pequeños halos producidos no variaron significativamente con las diferentes concentraciones utilizadas en los distintos tiempos. Para el final de la experiencia, los halos de degradación siguen siendo mínimos, incluso menores que los obtenidos a las 4 horas con almidón.

Esta lenta y pobre inducción del sistema amilolítico, puede deberse a que las uniones glucosídicas de la celulosa son  $\beta$ -1,4 y no  $\alpha$ -1,4 como lo son las del almidón.

Al igual que en el caso anterior (inducción de xilanasas por almidón) al utilizar un polímero no específico, se sintetizan enzimas, ya que se encuentra siempre una diferencia entre el nivel basal de enzimas producidas en un medio sin inductor (GA) y un medio con cualquier polisacárido (ver sección 1- cinética de crecimiento y producción enzimática-)

Algo similar ocurre cuando se utilizó CMC como inductor. A pesar de que se obtuvieron halos de degradación antes (a las 8 horas), éstos siempre resultaron más pequeños. Los halos obtenidos con CMC fueron los más chicos de esta experiencia.

Con lactosa, la inducción del sistema amilolítico también fue pobre ya que el área de los halos obtenidos a las 72 horas es solo el 20% del área de los obtenidos con almidón como inductor si bien estos fueron creciendo con el tiempo. La concentración del inductor, aquí tampoco parece tener efecto sobre la inducción, ya que no hubo diferencias significativas en los halos de degradación para cada tiempo analizado.



La lactosa es un dímero de glucosa - galactosa con uniones  $\alpha$ -1,4 . Obviamente el hecho de poseer el mismo tipo de unión química no resulta suficiente para que una sustancia actúe como buen inductor de un dado sistema enzimático.

El sorbitol, por último, no indujo efectivamente el sistema amilolítico, al igual que ocurrió con el sistema celulólitico, ya que los halos obtenidos son pequeños y de aparición tardía. Tampoco parece tener influencia alguna la concentración de sorbitol utilizada como inductor.

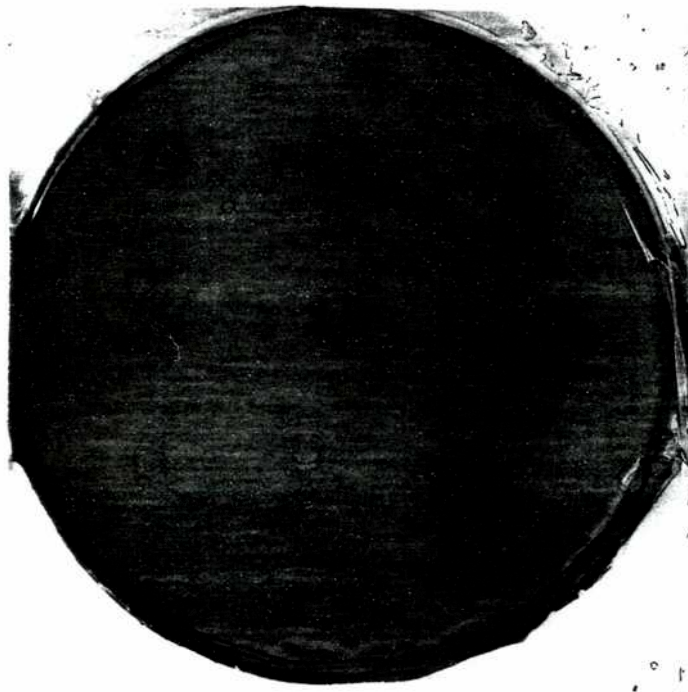


Figura 31: Revelado en placa.

Inductor: celulosa cristalina.

- Primer fila: sobrenadante de 24 hs. de inducción.  
Segunda fila: sobrenadante de 48 hs. de inducción  
Tercer fila: sobrenadante de 72 hs. de inducción.
- Primer columna: 2% celulosa cristalina.  
Segunda columna: 0.1% celulosa cristalina.  
Tercer columna: 0.05% celulosa cristalina.

### R.3.2.- EXPERIENCIAS DE REPRESION ENZIMATICA.

#### AGREGADO DEL REPRESOR AL MEDIO DE CULTIVO.

##### R.3.2.1.- SISTEMA CELULOLITICO.

A los cultivos de *Ascobolus gamundii* creciendo en un medio con celulosa cristalina como fuente de carbono se les agregó estérilmente glucosa ó celobiosa en diferentes concentraciones. Se eligieron estos dos compuestos como posibles represores, ya que no indujeron la síntesis del complejo, y al ser productos de la hidrólisis de la celulosa cristalina, se quiso verificar su posible rol como represores del sistema enzimático.

En la figura 32 a. se observa que la actividad endo  $\beta$ -D 1,4-glucanasa se ve reprimida durante la fase exponencial de producción enzimática tanto por la glucosa como por la celobiosa. Estos dos azúcares ya han sido descritos como represores del sistema celulolítico para otros hongos como *Agaricus bisporus* (Manning y Wood, 1983) y *T. reesei* (Holtzapfle et al., 1990).

La glucosa al 0.1% es la que menos reprime a la endo  $\beta$ -D 1,4-glucanasa. Con celobiosa 1% se logró la máxima represión .

Con respecto a la exo  $\beta$ -D -1,4-glucanasa (figura 32 b), se ve que la represión ocurre de manera similar: la adición de glucosa 0.1% no afecta demasiado la actividad enzimática mientras que la celobiosa en las tres concentraciones utilizadas la reprimen mejor.

Tanto con la glucosa como con la celobiosa la represión parece ceder ó no resultar tan efectiva hacia el final de la experiencia (día 21), lo que coincidiría con el consumo de estos azúcares de rápida utilización. La excepción es el caso de la celobiosa 0.5% que comienza a reprimir más tarde al sistema.

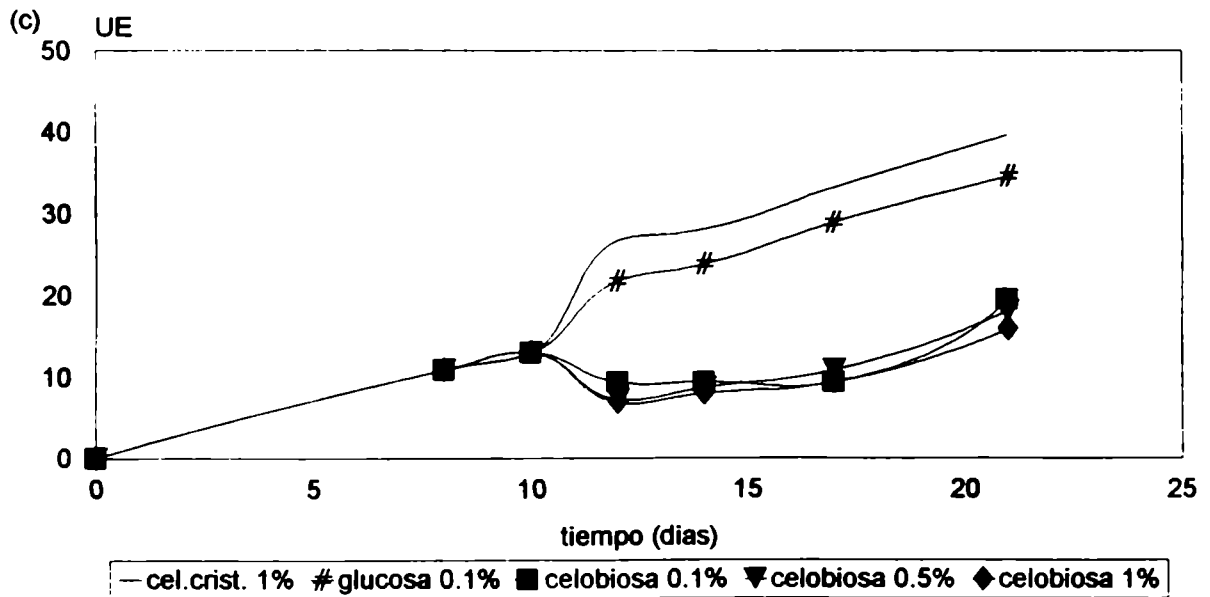
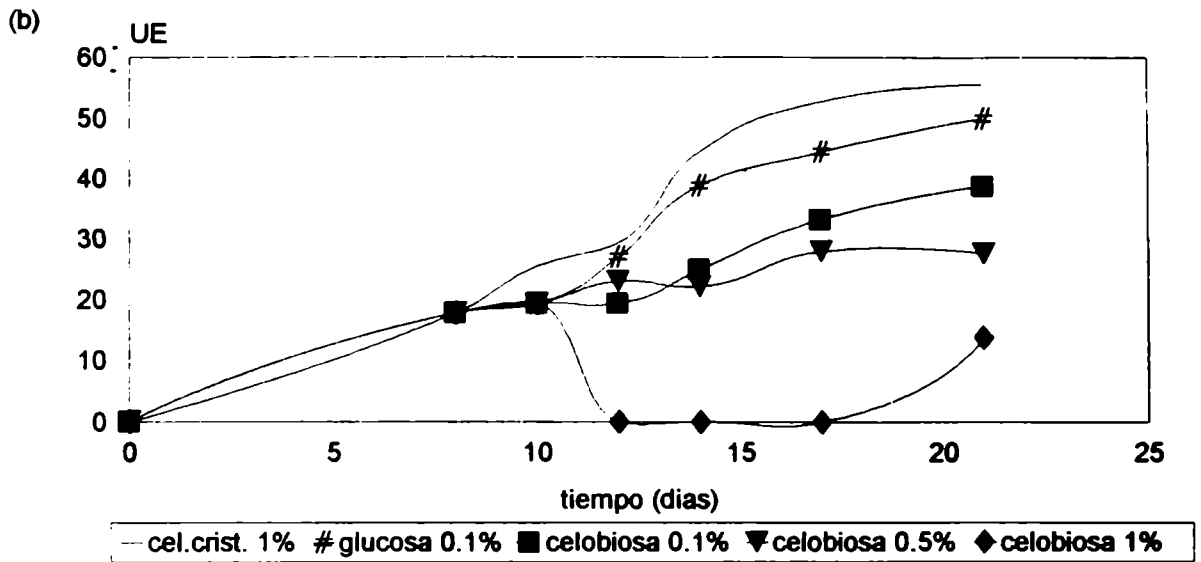
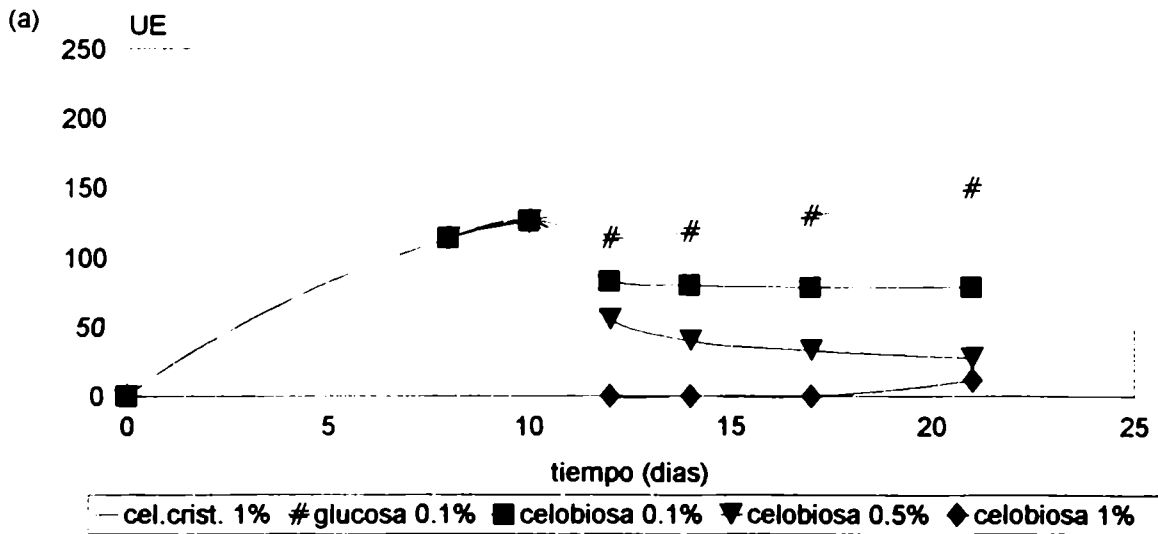


Figura 32 : Actividad enzimática del sistema celulolítico en experiencias de adición de represores. (a) Endoglucanasa; (b) exoglucanasa; (c) B-glucosidasa.

La  $\beta$ -glucosidasa (figura 32 c), sigue un patrón similar en cuanto a su represión. Se ve que la concentración de glucosa de 0.1% no es suficiente para reprimirla. En realidad el efecto que la glucosa tiene en esta concentración es poco significativo.

En cambio, la celobiosa, en cualquiera de las concentraciones utilizadas tiene un efecto más drástico sobre la regulación de la actividad enzimática.

La concentración utilizada de celobiosa no parece tener mayor importancia en la represión de la enzima ya que el efecto logrado es el mismo con las tres concentraciones (0.1%, 0.5% y 1%).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la sección 3.1.1. (inducción del sistema celulolítico), donde se vio que la celobiosa era un muy pobre inductor del sistema. Incluso cuando se registró actividad enzimática (con la aparición de halos de degradación en las placas), esta resultó muy baja. Como se observa en esta experiencia, la celobiosa en las concentraciones utilizadas no llega a reprimir la actividad celulolítica por completo, pero sin embargo, la actividad residual luego de añadir la celobiosa al medio es mucho más baja.

En la figura 33 se observa que las proteínas de sobrenadante varían acorde a lo sucedido con la regulación de las enzimas celulolíticas hasta aquí analizadas.

#### R.3.2.2.- SISTEMA XILANOLITICO.

En el caso del sistema xilanolítico, los represores utilizados fueron, la glucosa y la xilosa, por los mismos motivos ya explicados en el punto anterior.

En la figura 34 a. se observa el efecto producido por la adición de glucosa al medio que contenía xilano como única fuente de carbono. En los tres casos la glucosa reprime la actividad de la endoxilanasas.

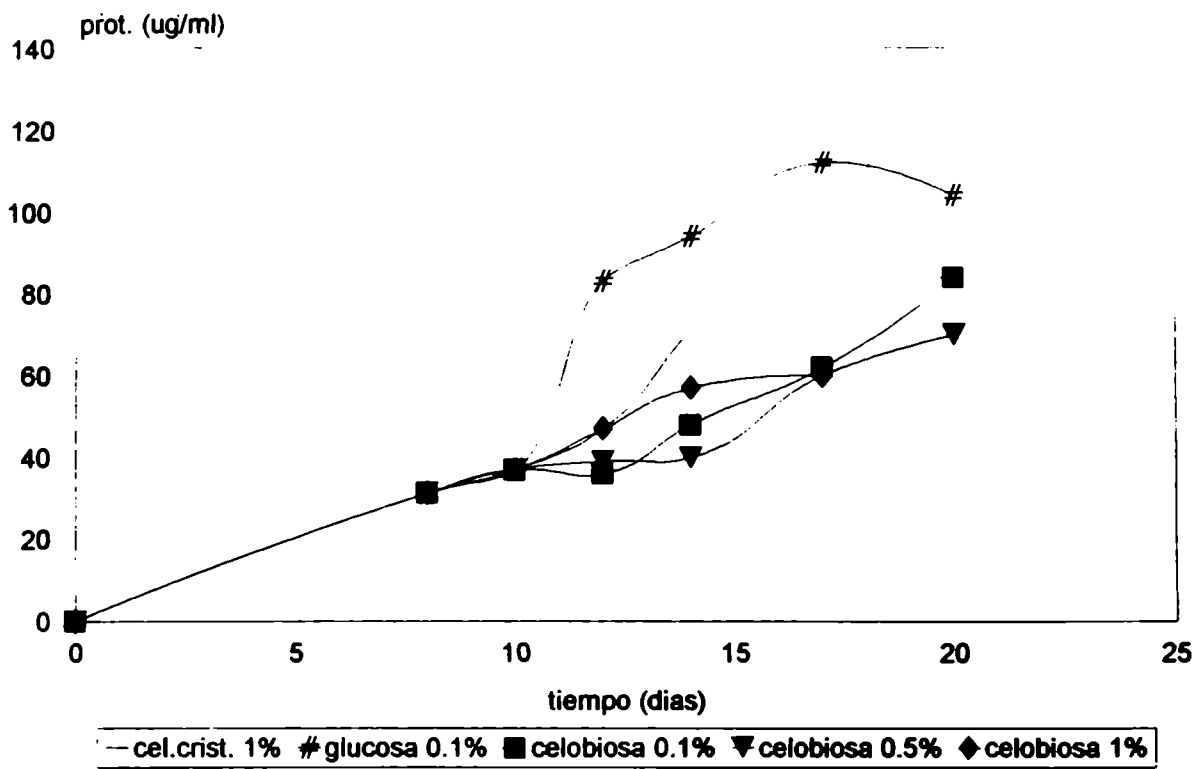


Figura 33 : Dosaje de las proteínas de sobrenadante en experiencias de adición de represores.

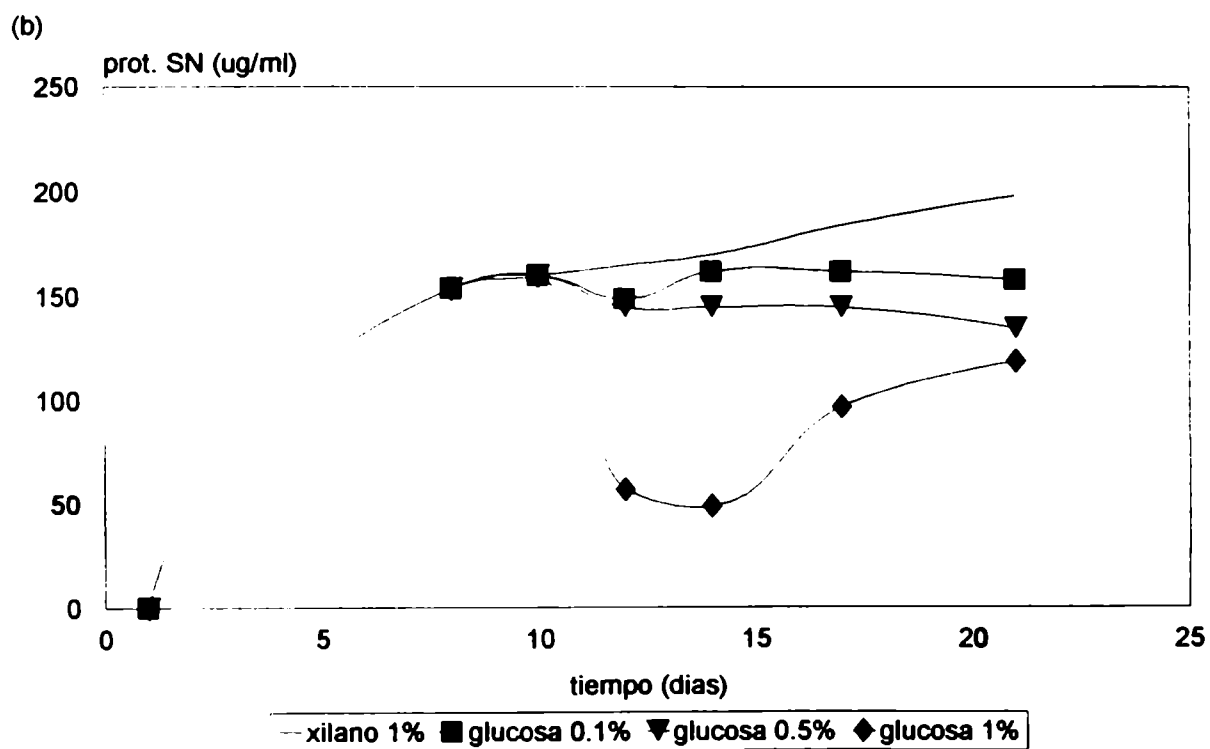
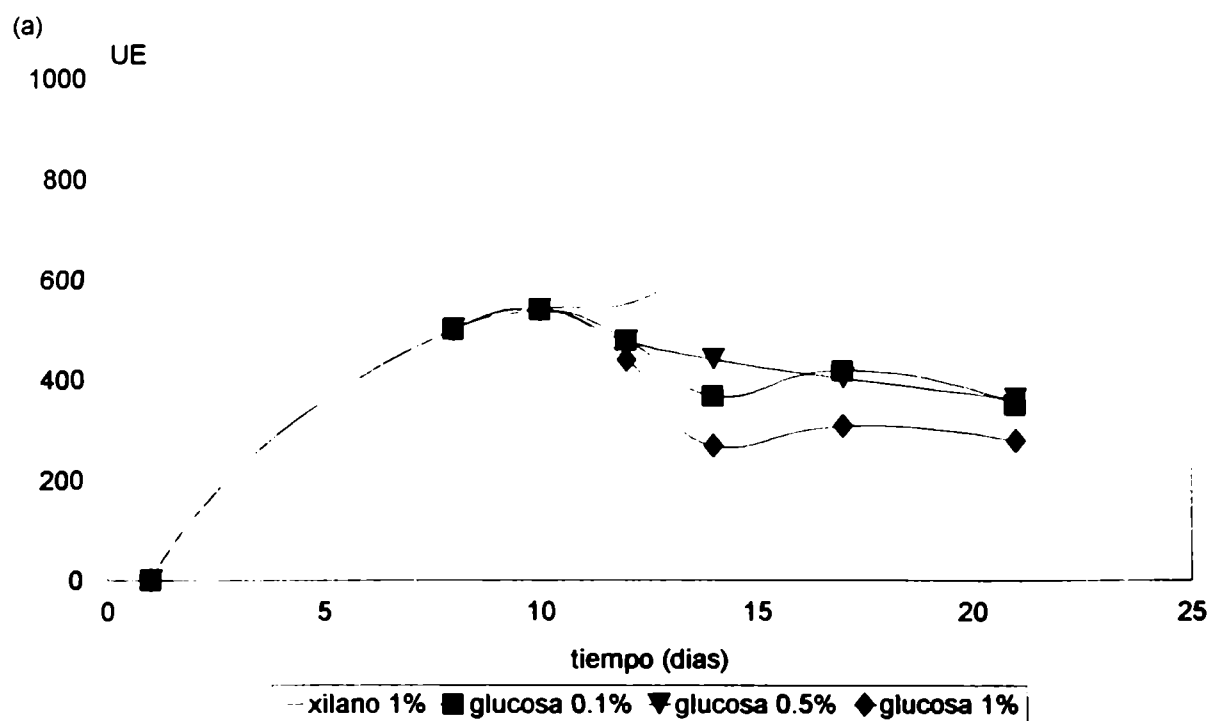


Figura 34 : Experiencia de represión utilizando diferentes concentraciones de glucosa. (a) Actividad enzimática del sistema xilanolítico; (b) Proteínas de sobrenadante en el medio de cultivo.

Tanto al usar glucosa 0.1% como 1% la represión inicialmente es mayor que al utilizar glucosa 0.5%. Con glucosa al 0.5% la represión es algo más tardía, pero una vez que se produce rápidamente decae la actividad enzimática que luego se mantiene constante. Con las otras dos concentraciones de glucosa (0.1% y 1%) la represión es más rápida, pero finalmente, con las tres concentraciones de glucosa se llega a actividades enzimáticas similares, siendo mayor la represión por glucosa 1%.

Las proteínas de sobrenadante (figura 34 b) reflejan el mismo patrón. La mayor inhibición se produce al agregar 1% de glucosa al medio de cultivo.

Cuando se utilizó xilosa como represor (figura 35 a), se vio que esta reprimió la actividad enzimática de manera creciente al aumentar la concentración de xilosa utilizada.

Los niveles de actividad enzimática luego de la represión con xilosa fueron similares a los obtenidos al utilizar glucosa. Estos resultados resultan lógicos si se tiene en cuenta que tanto la glucosa como la xilosa son monómeros de rápida utilización metabólica y que penetran en el micelio fúngico constitutivamente.

En la experiencia de inducción del sistema xilanolítico (sección 3.1.2), se observó, al igual que en esta experiencia que el agregado de xilosa al medio, en cualquiera de las concentraciones utilizadas, no parecía inducir eficazmente la síntesis de novo de las enzimas de este sistema enzimático. Solamente se detectó una muy baja actividad del sistema xilanolítico (como medida de su inducción) a las 24 horas de haber trasladado el micelio al medio inductor con xilosa.

En la figura 35 b se observa que la liberación de las proteínas al sobrenadante son afectadas por el agregado de xilosa. La concentración de las proteínas de sobrenadante en este caso, también, al igual que lo que sucede con la actividad enzimática, resulta similar a las obtenidas al

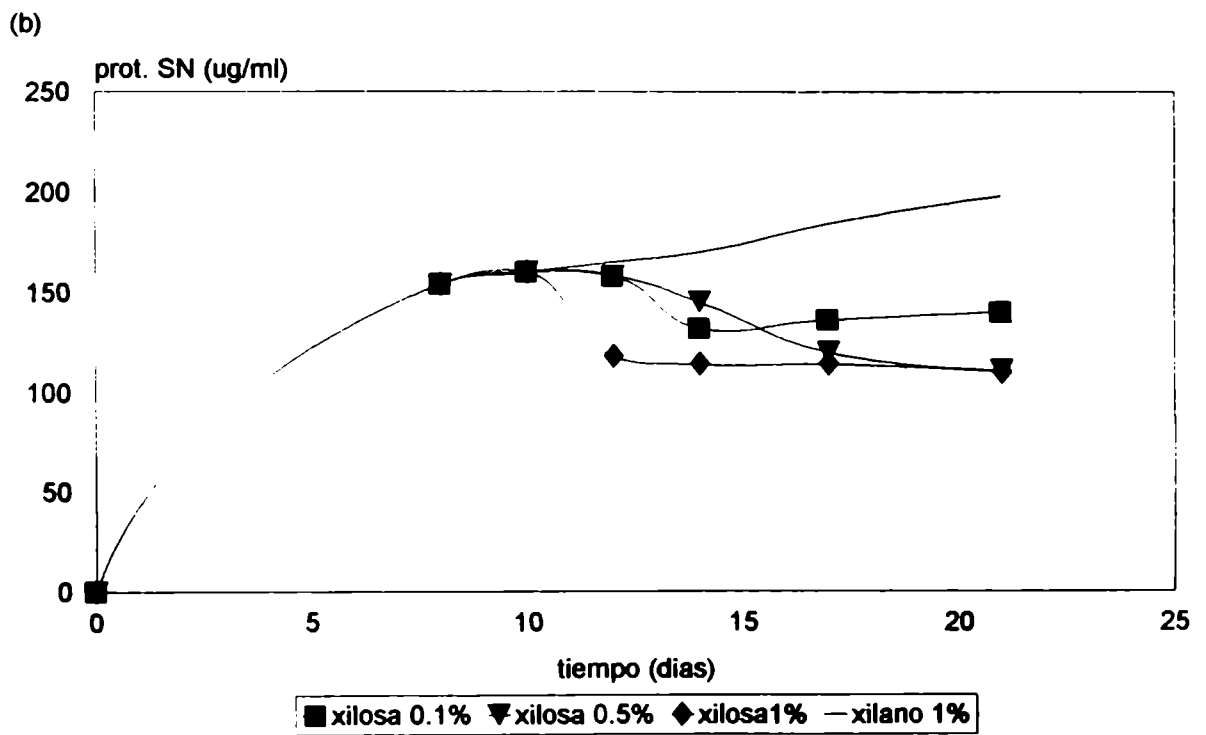
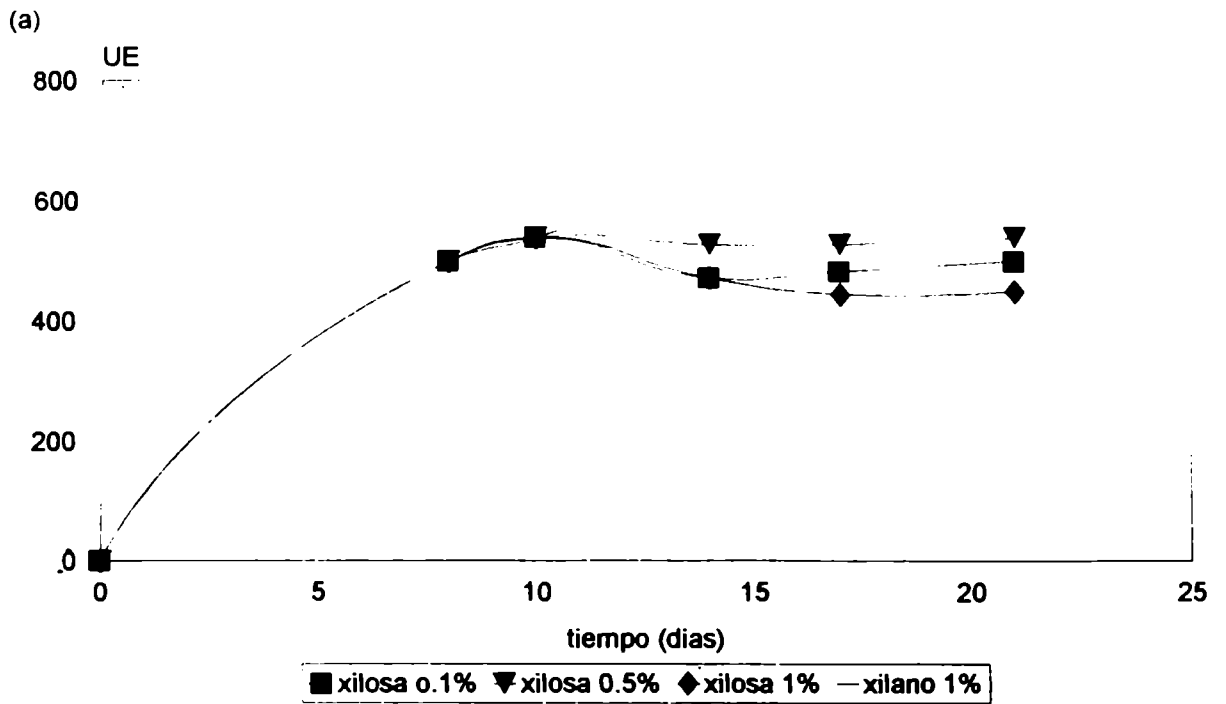


Figura 35 : Experiencia de represion utilizando diferentes concentraciones de xilosa. (a) Actividad enzimática del sistema xilanolitico; (b) Proteinas de sobrenadante en el medio de cultivo.



agregar glucosa al medio de cultivo, salvo para el caso de glucosa 1%, donde la represión fue mayor.

#### R.3.2.3.-SISTEMA AMIOLITICO.

En el caso del sistema amilolítico, se utilizaron como represores la glucosa y la maltosa, por las mismas razones que en los casos anteriores.

La actividad enzimática del sistema amilolítico se puede observar en la figura 36 a.

El agregado de glucosa al medio de cultivo que contenía almidón como única fuente de carbono, en cualquiera de las concentraciones utilizadas resulta más represivo que el agregado de maltosa.

La falta de represión severa por parte de la maltosa, coincide con los resultados obtenidos en el pto. 3.1.3. (inducción del sistema amilolítico) donde se vió que como inductora, la maltosa era pobre, pero se detectaban halos de degradación en la placa de revelado. A pesar de que estos halos resultaron mucho más pequeños que los obtenidos con almidón como inductor, se pudo detectar cierta actividad enzimática, corroborando que la represión no es total con las concentraciones utilizadas en este ensayo.

Con la mayor concentración de maltosa, (2%) en la experiencia de inducción, no se observó que resultara mejor inductor que la concentración menor (0.5%) en esa misma experiencia. Aquí se corrobora este resultado ya que se observa que la represión con las dos concentraciones utilizadas es muy pareja.

Los efectos de la glucosa son similares también, ya que estas concentraciones no parecen ejercer efectos muy variados. Los niveles de represión obtenidos con glucosa 0.1% y 1% son similares, pero siempre mayores a los obtenidos con maltosa.

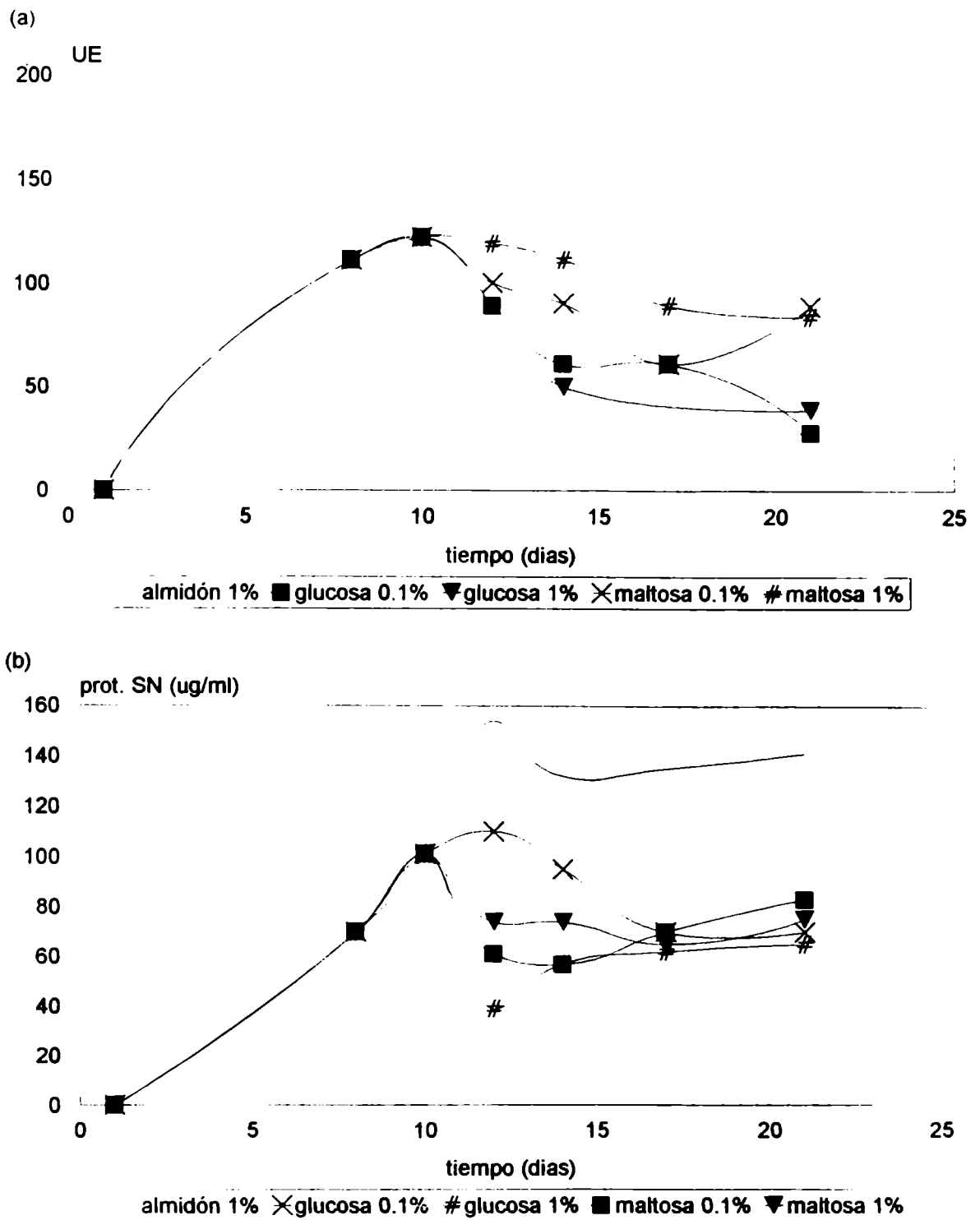


Figura 36 : Experiencia de represión utilizando diferentes concentraciones de glucosa y maltosa. (a) Actividad enzimática del sistema amilolítico.; (b) Proteínas de sobrenadante en el medio.

La represión obtenida en ningún caso es total.

El efecto sobre las proteínas de sobrenadante (figura 36 b), es el mismo efecto que se observó sobre las actividades enzimáticas. Se observa claramente que a este sistema enzimático lo afecta más el agregado de glucosa que el de maltosa.

Este efecto represor mayor de la glucosa puede deberse al uso preferencial del monómero de glucosa, desencadenando así más rápidamente los mecanismos de represión .

### R.3.3.- EFECTO DE LA CELOBIOSA.

La celobiosa ha sido históricamente propuesta como el real inductor del sistema celulolítico. Sin embargo, no faltan citas bibliográficas en donde se la contempla como un represor del sistema. Este rol dual de la celobiosa se atribuye a la concentración a la cual se encontraba en las diferentes experiencias .

Según su concentración, la celobiosa puede actuar tanto de represora como de inductora del sistema celulolítico .

Para *A. gamundii* se hicieron estudios, tanto de inducción (sección 3.1.1) como de represión (sección 3.2.1.1) utilizando celobiosa en distintas concentraciones.

De los estudios de inducción, se observó que no resultaba un buen inductor, ya que siempre se obtuvieron actividades enzimáticas menores a las obtenidas con celulosa cristalina.

Por otro lado, de los ensayos de represión, se observó que la celobiosa resultó ser un mejor represor que la glucosa.

Por este motivo se procedió a realizar cultivos de *A. gamundii* utilizando celobiosa como única fuente de carbono, en distintas

concentraciones (0.05% - 0.5% - 1%), que se cosecharon y procesaron a diferentes intervalos de tiempo.

En la figura 37 se puede observar que el peso seco y las proteínas de micelio resultaron buenos estimadores del crecimiento, ya que ambos siguen la misma cinética para las diferentes concentraciones de celobiosa utilizadas.

Para la menor concentración de celobiosa, el crecimiento es pobre, y aumenta durante toda la experiencia muy lentamente llegando a valores muy bajos.

Para la mayor concentración de celobiosa, sin embargo, se llega a un pico de biomasa el día 14, en el que se obtiene un buen crecimiento fúngico con cualquiera de las dos variables utilizadas (peso seco - proteínas de micelio).

Al utilizar la concentración intermedia de celobiosa (0.5%) la biomasa obtenida es también intermedia y el pico de crecimiento se obtiene antes, el día 10, probablemente por agotamiento de la fuente de carbono que quizás resulte insuficiente para llegar a alcanzar una fase de crecimiento exponencial sostenida.

Tanto con la concentración de 0.5% como con la de 1%, se llega a un pico de crecimiento seguido por una muy leve caída en el crecimiento, es decir a una autólisis incipiente, que no ocurre al utilizar 0.05% de celobiosa.

Al medir la actividad enzimática, se observa algo muy interesante (figuras 38 a y b). Cuando los niveles de celobiosa son elevados en el medio, la actividad enzimática de cualquiera de las dos enzimas aquí ensayadas (endocelulasa y  $\beta$ -glucosidasa) no existe ó es muy baja, mientras que al consumirse la celobiosa en el medio (y encontrarse por ende en baja concentración en el medio), la actividad enzimática de las dos enzimas comienza a aumentar rápidamente.

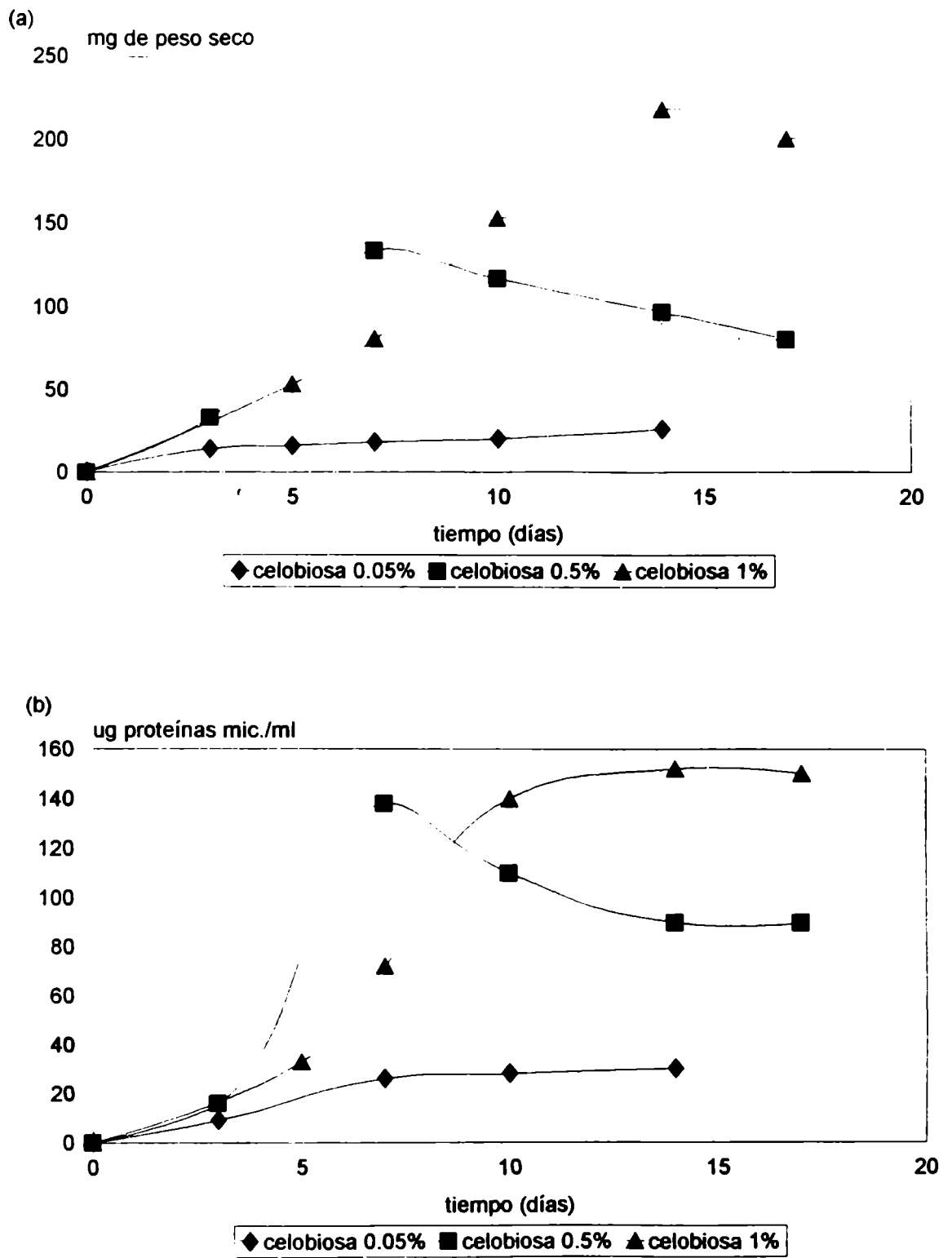


Figura 37 : Crecimiento en diferentes concentraciones de celobiosa. (a) Peso seco; (b) Proteínas de micelio.

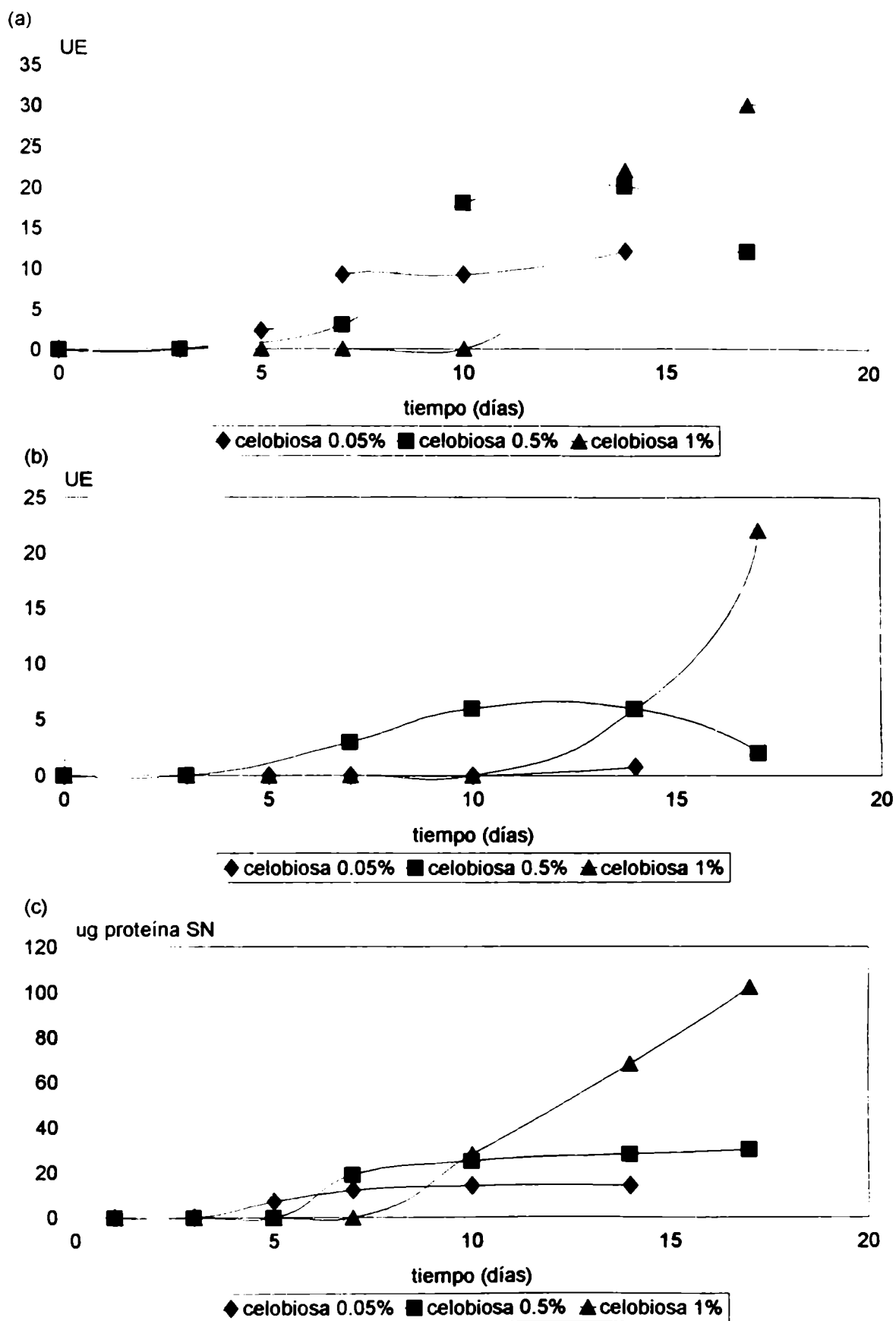


Figura 38 : Actividad enzimática del sistema celulolítico en diferentes concentraciones de celobiososa. (a) Actividad endoglucanasa; (b) Actividad B-glucosidasa; (c) Proteínas de sobrenadante.

En el medio con 0.05% de celobiosa, la actividad enzimática resulta siempre muy baja tanto para la endocelulasa como para la  $\beta$ -glucosidasa. Esta concentración de celobiosa parece ser muy baja como para gatillar la síntesis del sistema así como resultó escasa para promover el crecimiento.

Al utilizar 1% de celobiosa, sin embargo, la actividad enzimática se detectó en el sobrenadante recién después del día 10, en que seguramente la mayor cantidad de celobiosa ya había sido consumida. Solamente, luego de que los procesos de represión por producto final dejaron de funcionar (por encontrarse la celobiosa en muy baja concentración), comenzó a inducirse el sistema celulolítico.

Una vez disparada esta inducción, esta es mucho más eficiente que la obtenida con 0.05% de celobiosa. En este caso, para el día 10, tenemos una cantidad mucho mayor de micelio con celobiosa 1% que con celobiosa 0.05%, a parte, seguramente se encuentra en la concentración óptima para actuar como inductora sin reprimir.

En el caso en que se utilizó 0.5% de celobiosa, al igual que lo reflejado por el crecimiento, resultó un caso intermedio entre los dos casos recién mencionados. La síntesis del sistema enzimático se da antes que con 1 % de celobiosa ya que su consumo es obviamente también anterior, pero los niveles de inducción alcanzados son menores .

Las proteínas de sobrenadante reflejan perfectamente esta variación en las diferentes actividades enzimáticas, según se fue variando la concentración de celobiosa en el medio, como puede observarse en la figura 38 c.

#### R.4.- LOCALIZACION ENZIMATICA.

##### FRACCIONAMIENTO CELULAR.

Los complejos enzimáticos que degradan sustratos como la celulosa, hemicelulosas y/o almidón, están compuestos por enzimas extracelulares, ya que dichos sustratos son polímeros naturales de alto peso molecular y no pueden penetrar en la célula para ser degradados.

Estas enzimas extracelulares, pueden quedar adsorbidas al micelio, como en el caso de *Chaetomium termophile* (Luis y Beker, 1973), *Trichoderma koningii* (Halliwell y Lovelady, 1981), *Microbispora bispora* (Warldon et al., 1986) y varias especies de *Aspergillus* (Sternberg et al., 1977) ; ó difundir libremente al medio de cultivo como en el caso de *A. niveus* (Taj-Aldeen y Alkenany, 1992) y *T. reesei* (Taj-Aldeen, 1993).

Para poder estudiar la localización y actividad de las enzimas extracelulares de *Ascobolus gamundii* y resolver así si estas enzimas quedan ó no adsorbidas al micelio fúngico, se ensayó su actividad en el sobrenadante, en el citosol y en una fracción compuesta por restos de membranas y paredes celulares (cell debris). Estas fracciones (tabla 11) se obtuvieron como se indica en el punto 6 de materiales y métodos, con los cultivos provenientes de los tres medios inductores específicos para cada sistema enzimático (celulosa cristalina, xilano y almidón).

La actividad se expresa como unidades enzimáticas por µg de proteína de micelio.

A pesar de que tradicionalmente se consideró a la β-glucosidasa como una enzima completamente extracelular, que difundía libremente al medio de cultivo, datos recientes citan varios ejemplos de adsorción de esta enzima a las hifas micelianas, especialmente en especies de *Trichoderma* (Cai et al., 1998).



En los casos en que no difunde completamente al medio de cultivo, la  $\beta$ -glucosidasa queda retenida en las paredes de las hifas formando un escudo. En *T. reesei*, esta fracción que queda retenida en las paredes hifales, estaría fuertemente asociada a un polisacárido de pared (Cai et al., 1999).

TABLA 11: Actividad enzimática en las diferentes fracciones celulares.

Enzimas	Sobrenadante UE /ug prot.	Citosol UE /ug prot.	Cell debris UE /ug prot.
ENDÓGLUCANASA	0.175	0.105	0.005
EXOGLUCANASA	0.1	0.03	0.003
$\beta$ -GLUCOSIDASA	0.15	0.022	0.015
ENDOXILANASA	1.25	0.28	0.012
$\beta$ -XILOSIDASA	0.0075	0.0054	0.003
AMILASAS	1.40	0.77	0.044

*Nota: Las actividades enzimáticas fueron tomadas el día de máxima actividad para cada sistema.*

En el caso de *A. gamundii*, como se observa en la tabla 11, la mayor actividad de endoglucanasa y exoglucanasa, así como de endoxilanasas y amilasa se encuentra en la fracción de sobrenadante. Resulta casi despreciable la actividad asociada al micelio, y aquella

encontrada en el citosol, se debe a la fracción enzimática que aún no ha sido secretada al medio de cultivo.

Para la actividad  $\beta$ -glucosidasa, estas diferencias no son tan marcadas, por lo que se puede sugerir que si bien se sintetiza y parte es exportada fuera de la célula fúngica difundiendo al medio, parte de su actividad queda retenida en las paredes hifales.

La actividad  $\beta$ -xilosidasa, resultó muy pobre en cualquiera de las fracciones ensayadas. La baja actividad encontrada por lo tanto, nos sugiere más bien que *A. gamundii* no sintetiza esta enzima en la misma proporción que el resto de las celulasas y/o xilanasas.

Sin embargo, al crecer en un medio con xilano como única fuente de carbono, *A. gamundii* crece bien, logrando un desarrollo miceliano comparable al obtenido al utilizar celulosa cristalina como única fuente de carbono, sugiriendo que la xilobiosa puede ser ingresada por las hifas.

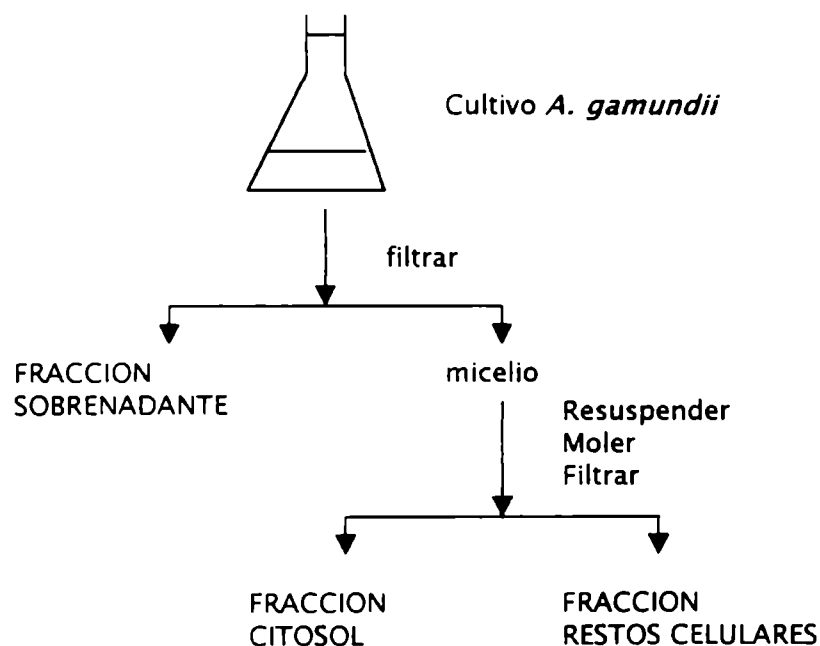


Figura 39: Obtención de las diferentes fracciones para el estudio de localización enzimática.

## R.5.- CARACTERIZACION BIOQUIMICA.

### R.5.1.- COMPLEJO CELULOLITICO.

#### R.5.1.1.- EFECTO DE CATIONES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Se ha establecido, que si bien se pueden fijar concentraciones óptimas de diferentes iones para el crecimiento de los hongos, suele ser más importante el balance entre ellos o sus concentraciones relativas (Ross, 1975) dadas las interacciones específicas de amplificación o antagonismo entre ellos.

La estabilidad y actividad enzimática, se ven generalmente influenciadas por el entorno, adecuado o no, en el que se encuentran las enzimas. Dentro de la célula, por ejemplo, el calcio esta involucrado en diversas funciones y ocupa un papel fundamental, a través de proteínas ligadoras de calcio, como la calmodulina, presente en diversos grupos de hongos (Hubbard et al., 1982). También resulta imprescindible en el control de permeabilidad de membranas, transporte de iones, azúcares y aminoácidos.

El manganeso, es requerido en las reacciones que involucran la transferencia de grupos fosfato, mientras que el zinc, es un componente funcional de una gran variedad de enzimas fúngicas, además de afectar la producción de una gran variedad de metabolitos de importancia biológica e industrial (Garraway y Evans, 1984).

Para determinar la posible influencia de diversos cationes sobre la actividad enzimática, se realizó una primera experiencia en la que se verificó si la actividad enzimática era afectada por la ausencia de cationes, o por la adición de varios de ellos en conjunto ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ). Para lograr la fuente enzimática carente de cationes se utilizó el quelante

EDTA en una concentración 10 mM. Estos dos tratamientos fueron siempre cotejados con un control, que consistió siempre en el sobrenadante de cultivo tal cual era recogido. luego de ser cosechado el cultivo, el día de máxima actividad enzimática.

Para la endo  $\beta$ -D 1,4 -glucanasa, como se puede observar en la figura 40, la ausencia de cationes afecta marcadamente la actividad enzimática. Con el agregado de EDTA, la actividad enzimática disminuye un 70%. Al agregar los cationes en conjunto, la actividad enzimática también disminuye, pero solamente un 30%.

Lo mismo sucede con las otras dos enzimas del complejo celulolítico. Tanto la exo  $\beta$ -D 1,4 glucanasa como para la  $\beta$ -glucosidasa, son afectadas tanto por la adición como por la falta de cationes del medio.

La exo  $\beta$ -D 1,4 glucanasa, al igual que la endoglucanasa se ve más afectada por la ausencia de cationes, mientras que la actividad  $\beta$ -glucosidasa, presenta menor actividad residual al adicionar los cationes al crudo enzimático, es decir con altas concentraciones de éstos.

Para *Fusarium oxysporum var. melonis* (Alconada, 1992), la actividad del sistema celulolítico se vió afectada al experimentar la influencia de diferentes iones. El manganeso fue levemente estimulador para la actividad  $\beta$ -glucosidasa. El zinc, el mercurio y el cobre, inhibieron, en parte la actividad del sistema, mientras que los tratamientos con EDTA, calcio, magnesio y sodio, no tuvieron ningún efecto.

Al estudiar luego, en una segunda experiencia el efecto de los cationes por separado sobre la actividad enzimática, se observó que para la endo glucanasa, los cationes que inhibieron su actividad fueron el  $Mn^{2+}$  y el  $Zn^{2+}$  (figura 41). Por el contrario, al agregar  $Ca^{2+}$  ó  $Mg^{2+}$ , la actividad residual obtenida alcanza casi el 100%, solo levemente inferior a la actividad obtenida con el control (sin agregado alguno).

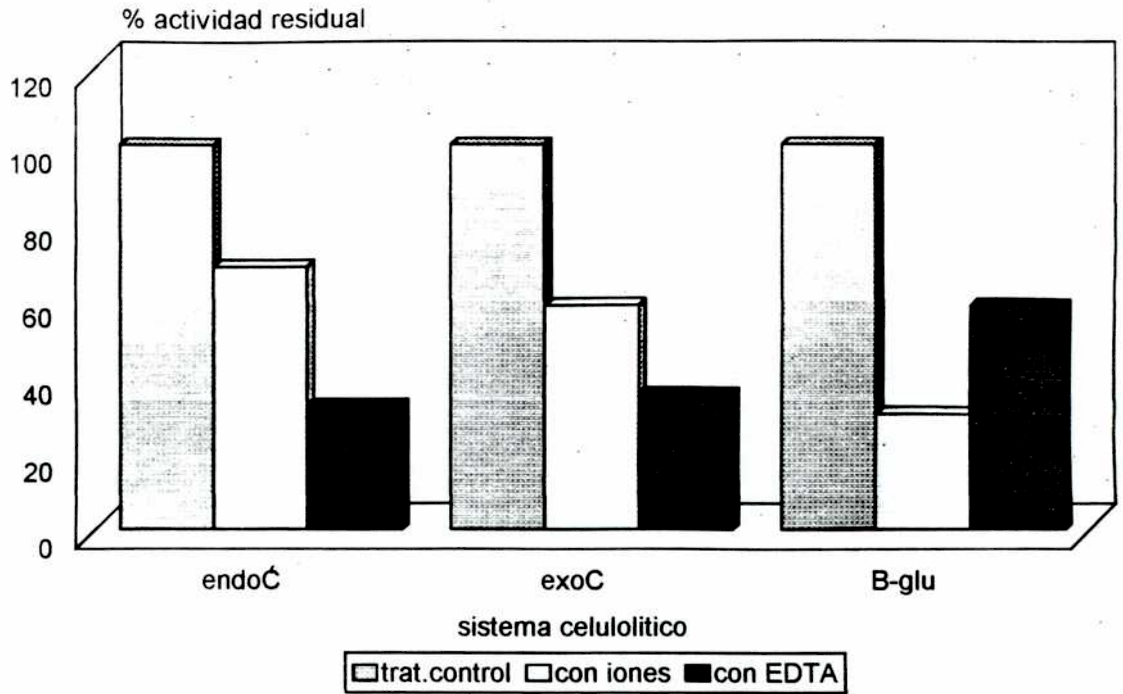


Figura 40 : Actividad enzimática del sistema celulolítico en tratamientos con y sin iones en el medio.

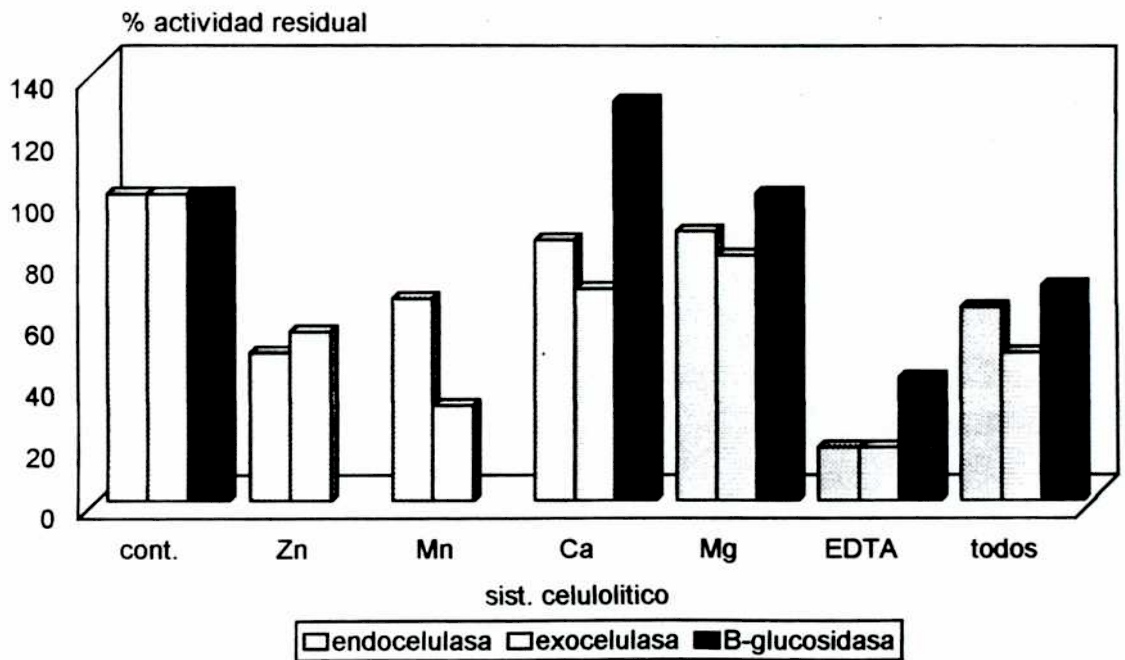


Figura 41 : Efecto de iones sobre la actividad enzimática del sistema celulolítico.

Para la actividad  $\beta$ -glucosidasa, se observó también un efecto negativo tanto del  $Mn^{2+}$  como del  $Zn^{2+}$ , estos dos cationes suprimieron por completo la actividad de esta enzima. Sin embargo al adicionar  $Ca^{2+}$  la actividad enzimática encontrada fue inclusive mayor que la del control. Al agregar  $Mg^{2+}$ , la actividad residual se mantuvo en los niveles del control (sin agregado). El efecto del calcio puede deberse a que este es un agente estabilizador de enzimas y el magnesio puede ser requerido como cofactor para que la enzima se mantenga activa. Como era de esperar, al agregar EDTA, que elimina los cationes del medio, la actividad enzimática disminuyó considerablemente, al igual que al agregar todos los cationes en conjunto como ya había sido observado anteriormente.

La enzima exoglucanasa, se comporta de manera similar a la endoglucanasa, es afectada negativamente por el  $Mn^{2+}$  y el  $Zn^{2+}$ , y mucho menos drásticamente por el  $Ca^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$ . La diferencia se encuentra, en que para la exoglucanasa, el  $Mn^{2+}$  disminuye más que el  $Zn^{2+}$  la actividad enzimática (lo contrario sucede con la endoglucanasa).

Para *Nectria catalinensis* (Pardo y Forchiassin, 1995) el sistema celulolítico producido, no requiere de la presencia de ningún ión, pero que al estar estos en altas concentraciones (superiores a las utilizadas en los medios de cultivo regulares para la producción enzimática) el efecto resultó ser inhibitorio.

#### R.5.1.2.- EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Para la actividad endo  $\beta$ -D 1,4 glucanasa, el pH óptimo de reacción es 5. Al aumentar el pH, la alcalinización del medio la afecta levemente ya que a pH 10 ésta retiene un 67% de su actividad original (ver figura 42 a).

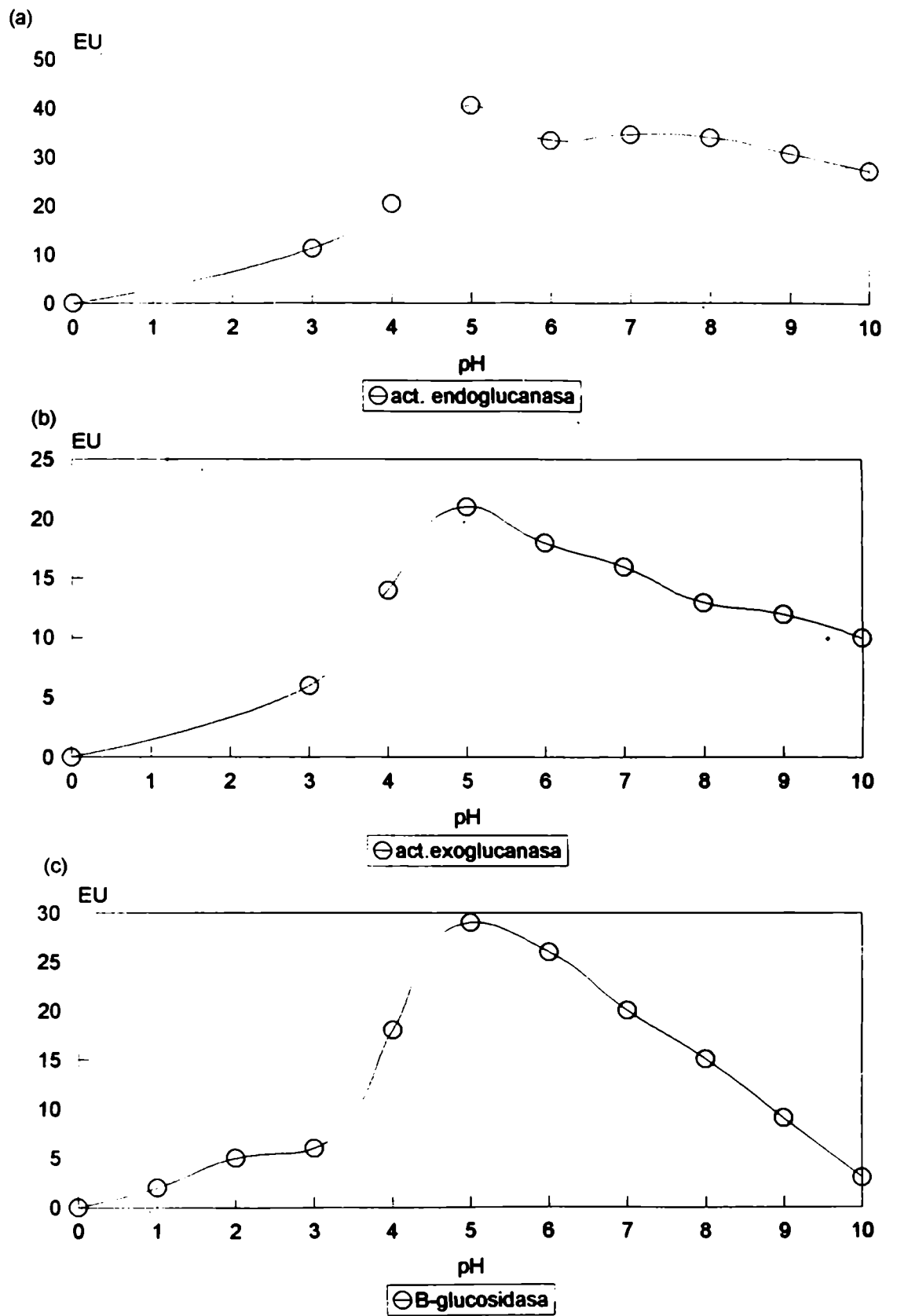


Figura 42 : pH óptimo. del sistema celulolítico(a) endoglucanasa; (b) exoglucanasa; (c) B-glucosidasa.

Al igual que para la endoglucanasa, para la exo  $\beta$ -D 1,4 glucanasa el pH óptimo de reacción resultó ser 5 como se puede observar en la figura 42 b. Su actividad se mantiene, decayendo en el rango de pH entre 5 y 10.

En el caso de la  $\beta$ - glucosidasa, el pH óptimo de reacción también resultó ser 5 (ver figura 42 c), al igual que para *Aspergillus niveus* (Saad et al., 1993; Ortega, 1985; McHale y Coughlan, 1981) y para el resto de los componentes del sistema celulolítico de *Ascobolus gamundii*.

Es bastante generalizado, para los componentes del sistema celulolítico, que el pH óptimo para estas enzimas sea alrededor de 5. Podemos encontrar en la bibliografía, varios ejemplos que así lo demuestran. Tal es el caso de *Neurospora crassa* (Yazdi et al., 1990), *Aspergillus nidulans* (Bagga et al., 1990), *Nectria catalinensis* (Pardo y Forchiassin, 1999 a y b), entre otros.

### R.5.1.3.- EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

#### R.5.1.3.1.- TEMPERATURA ÓPTIMA.

La temperatura óptima para la endo  $\beta$ -D 1,4 glucanasa es de 50 °C (ver figura 43 a). Sin embargo, a los 70 °C ésta sólo pierde un 30% de actividad, demostrando que las altas temperaturas que debe soportar en la naturaleza no logran inactivarla por completo. Esta alta temperatura óptima es característica de enzimas extracelulares, y ya han sido encontradas para otros hongos como es el caso de *Aspergillus candidus* (Ortega, 1985).

Para la exo  $\beta$ -D 1,4 glucanasa, la temperatura óptima también resultó ser de 50 °C, al igual que para la endoglucanasa (ver figura 43 b). También en este caso se observa una tendencia a la resistencia térmica (exigida



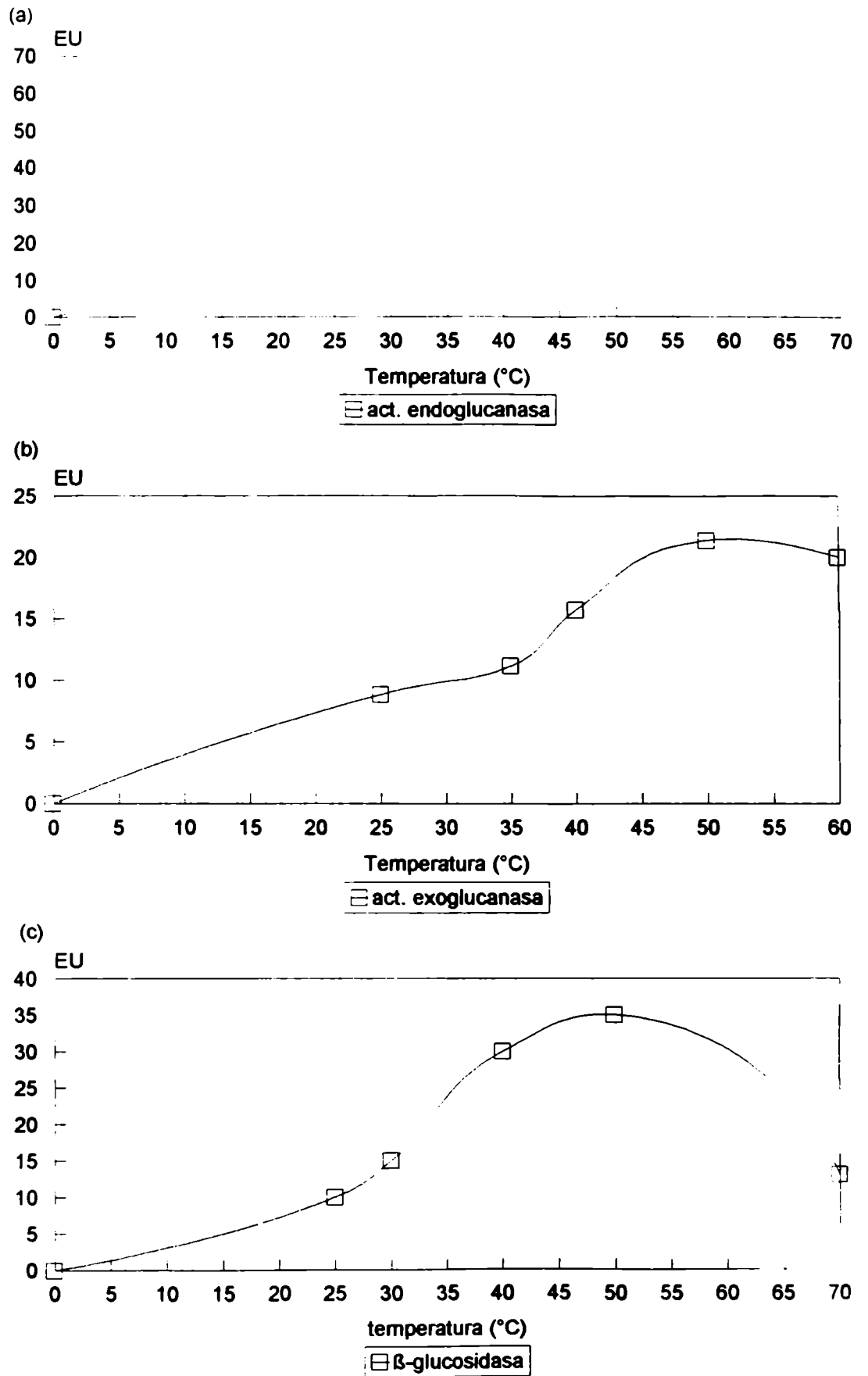


Figura 43 : Temperatura optima del sistema celulolitico. (a) endoglucanasa; (b) exoglucanasa; (c) B-glucosidasa.

seguramente por la naturaleza) ya que a 60 °C la actividad enzimática sólo disminuyó un 7%.

Como era de esperar, la temperatura óptima para la  $\beta$ -glucosidasa, también resultó ser de 50 °C como se observa en la figura 43 c. A diferencia de los casos anteriores, para la  $\beta$ -glucosidasa, la actividad enzimática si disminuye bastante al medirla a 70 °C.

Entre hongos productores de complejos enzimáticos extracelulares, se ha encontrado que para el sistema celulolítico, en varios casos la temperatura óptima de reacción es de 50 °C. Tal es el caso de *Fusarium oxysporum* (Alconada, 1992) y *N. crassa* (Yazdi et al., 1990), entre otros.

#### R.5.1.3.2.- TERMOESTABILIDAD.

Para la endo  $\beta$ -D 1,4 glucanasa, se puede decir que globalmente, en el crudo enzimático su actividad es relativamente estable durante 24 horas a temperaturas de hasta 50 °C conservando más de un 30% de su actividad como se puede observar en la figura 44 a. Sin embargo a 60 °C ésta pierde más rápidamente su actividad.

A temperatura ambiente, la actividad de la endoglucanasa es muy estable ya que a las 24 horas de incubación a 25 °C retiene más de un 50% de su actividad.

A la temperatura óptima para la reacción enzimática (50 °C), a las seis horas de incubación solo pierde un 40% de actividad enzimática. Recién a los 60 °C se ve afectada su actividad enzimática, ya que en sólo 10 minutos pierde el 60% de su actividad.

La exoglucanasa (figura 44 b) resultó ser la enzima más estable del sistema celulolítico. Retiene un 40% de su actividad a las 24 horas de incubación a 50°C y un 80% de actividad en el mismo tiempo de incubación a 40°C.

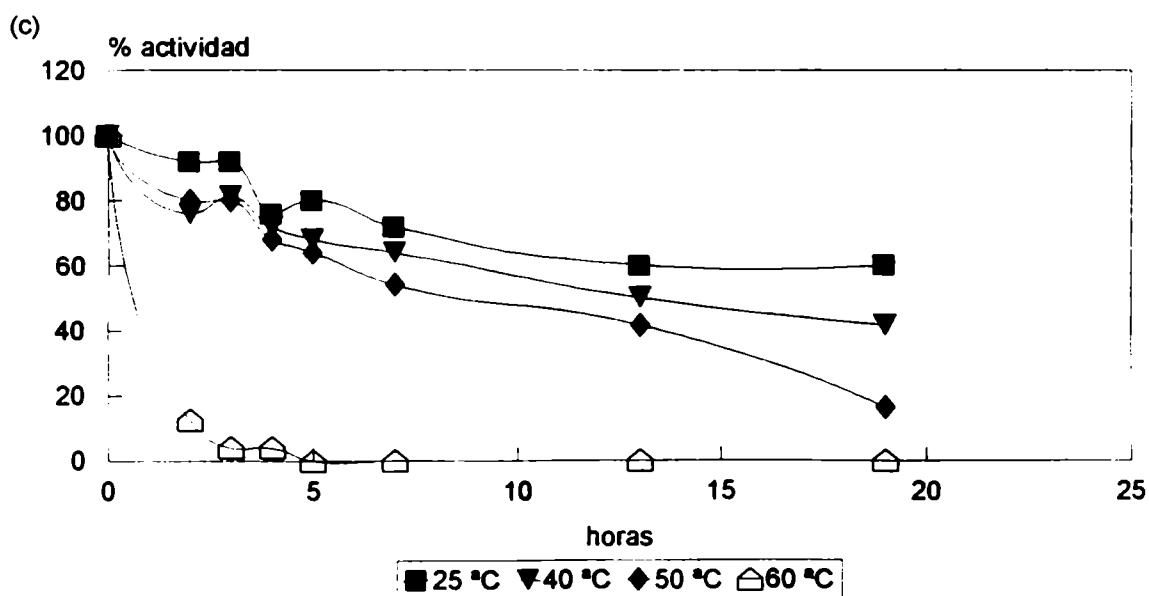
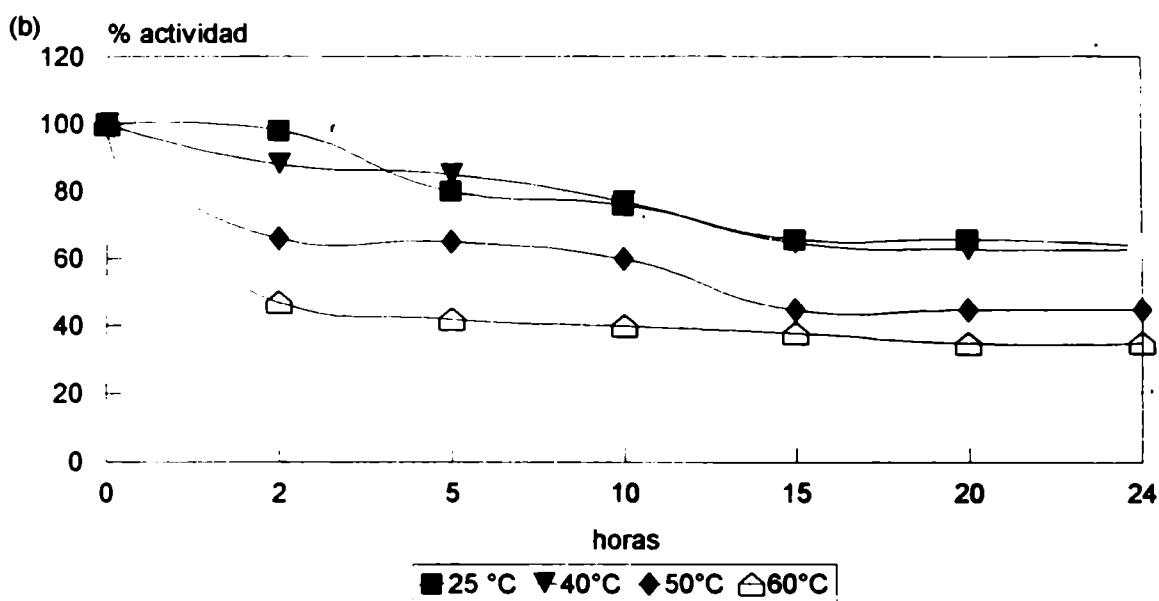
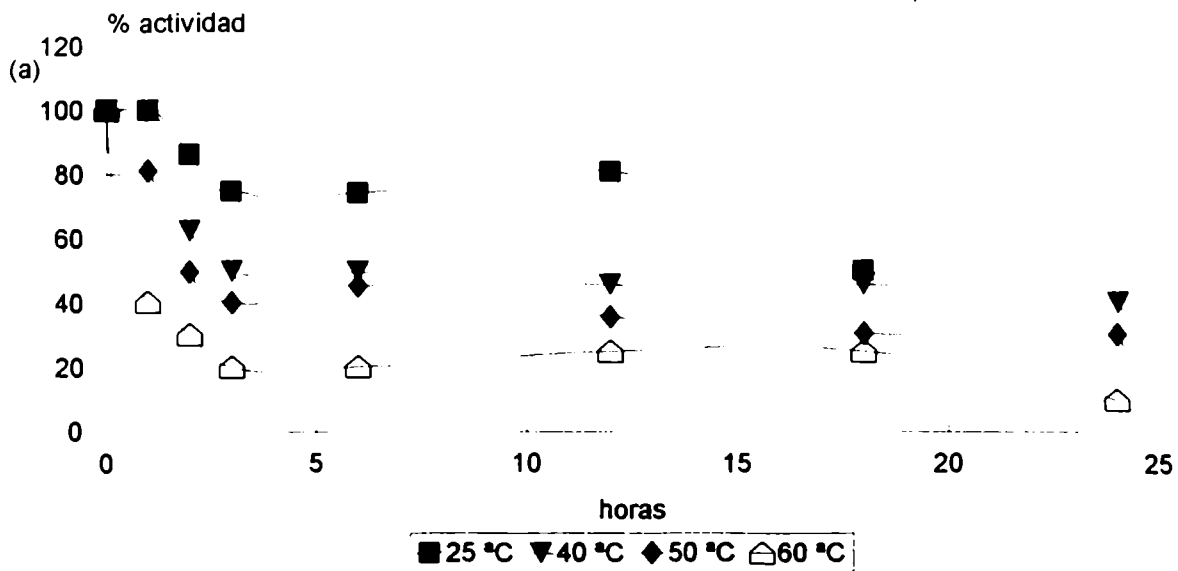


Figura 44 : Termorresistencia del sistema celulolítico. (a) endoglucanasa; (b) exoglucanasa; (c) B-glucosidasa.

La estabilidad de estas enzimas para resistir la inactivación térmica, es característica de las enzimas extracelulares que como se mencionó anteriormente deben permanecer activas en las condiciones del medio natural, desprotegidas del medio intracelular en que se encuentran otras enzimas que obviamente resultan más sensibles a estos parámetros físicos.

Para la  $\beta$ -glucosidasa, como se ve en la figura 44 c, su actividad enzimática se ve severamente afectada a los 60 °C. A los 10 minutos de permanecer a 60 °C, pierde un 87% de su actividad enzimática y para las tres horas ya no se detecta actividad enzimática alguna.

Sin embargo, a temperaturas menores, su actividad si resulta estable por unas 12 horas. A 50 °C su resistencia es mucho mayor que a los 60°C, ya que a las tres horas de incubación retiene un 64% de actividad.

A temperatura ambiente (25 °C) es capaz de mantener hasta un 47% de su actividad enzimática a las 24 horas.

La baja resistencia térmica a 60°C, a pesar de tener una temperatura óptima de reacción alta, también se registró para *Neurospora crassa* (Yazdi et al., 1990) y para *S. saccoboloides* (Magnelli et al., 1996).

Sin embargo, existen también, ejemplos de hongos cuya actividad  $\beta$ -glucosidasa resultó ser muy termoestable, tornando dicho organismo importante desde el punto de vista comercial. Tal es el caso de la cepa RMF 7883 de *Aspergillus niveus* (Taj-Aldeen y Alkenany, 1992).

#### **R.5.1.4.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.**

##### **R.5.1.4.a.- SATURACION POR SUSTRATO.**

En la figura 45 se muestra, la pérdida de la linealidad en las reacciones enzimáticas del complejo celulolítico al variar la concentración del sustrato y los tiempos de incubación.

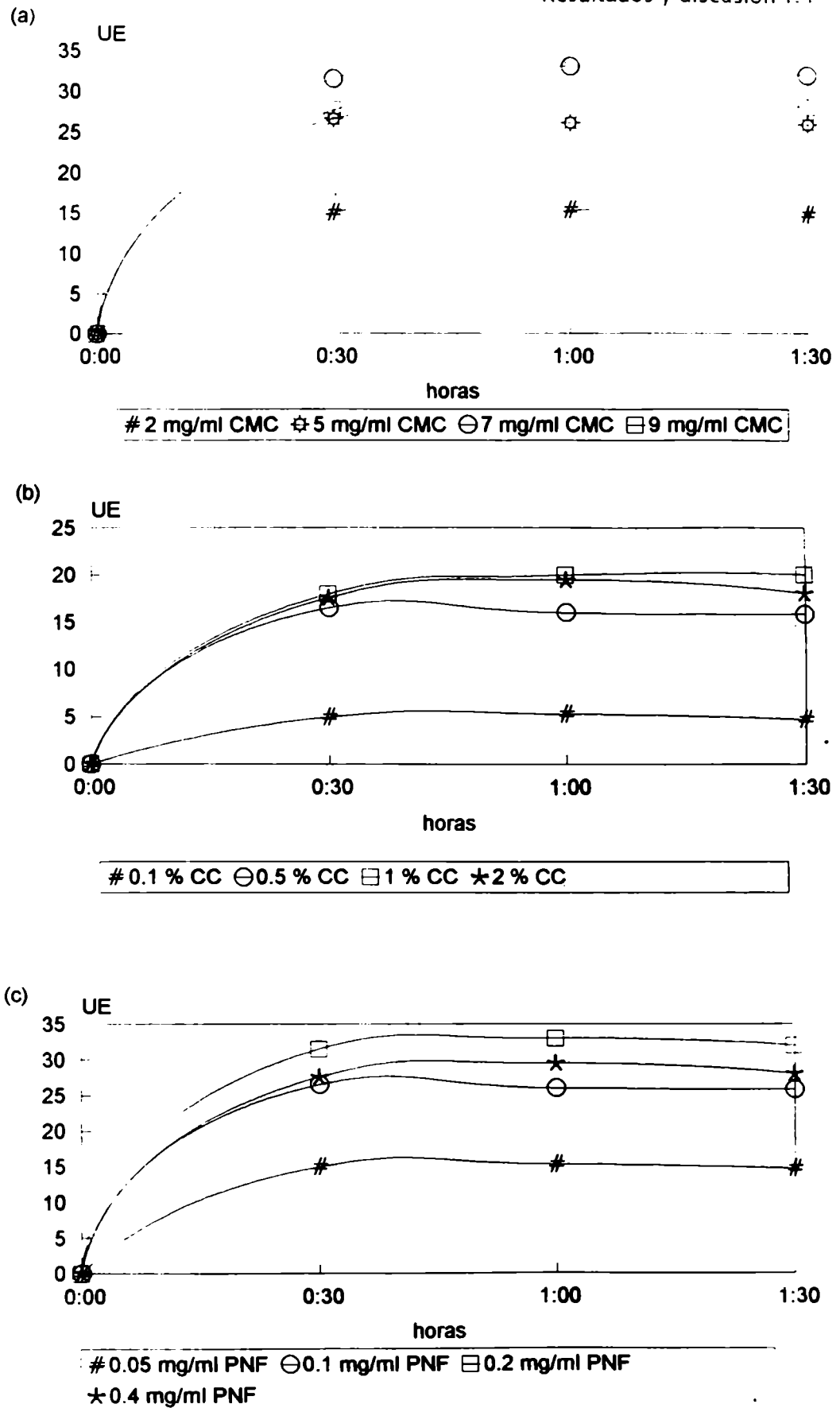


Figura 45 : Actividad del sistema celulolítico en función de la concentración de sustrato. (a) actividad endoglucanasa; (b) actividad exoglucanasa; (c) actividad B-glucosidasa.

Para la endoglucanasa, la reacción pierde linealidad a los 30 minutos de incubación. Este dato es importante al medir actividad enzimática ya que en reacciones con incubaciones de más tiempo podemos tener un dato con un error por defecto. La concentración a la que se logró una saturación fue de 5 mg CMC/ml, al utilizar 9 mg CMC/ml no hubo un aumento en la actividad enzimática, por lo tanto esta concentración es la que se tomó, por lo tanto para realizar su determinación en los diferentes crudos a ensayar.

Para la exoglucanasa, la reacción mantiene su linealidad hasta los 30 minutos, con lo cual, esta reacción puede ser medida a tiempos más largos. La saturación por sustrato se logró con 1% CC (figura 45 b).

Finalmente, para la  $\beta$ -glucosidasa, el tiempo elegido para realizar las reacciones fue de 30 minutos (figura 45 c). 0,1 mg p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido/ml resultó ser la concentración de sustrato que satura esta actividad para *A. gamundii* cuando crece en celulosa cristalina como fuente de carbono.

#### R.5.1.4.b.- CONSTANTE DE MICHAELIS MENTEN ( $K_m$ ) y VEL. $_{max}$ .

Al graficar la inversa de los valores de la actividad enzimática de la endoglucanasa en función de la inversa de la concentración de sustrato (carboximetil-celulosa), se obtuvo una  $K_m$  de 7.14 mg/ml por el método de dobles recíprocas de Lineweaver-Burk. Con este mismo método se calculó una velocidad máxima de 0.4  $\mu$ mol glu/min.mg de prot., como se muestra en la figura 46 ai.

Estos mismos parámetros fueron calculados por el método de Eadie-Hofstee, siendo los valores obtenidos 7.22 mg/ml y 0.4  $\mu$ mol glu/min.mg. de prot. respectivamente ( ver figura 46 aii).

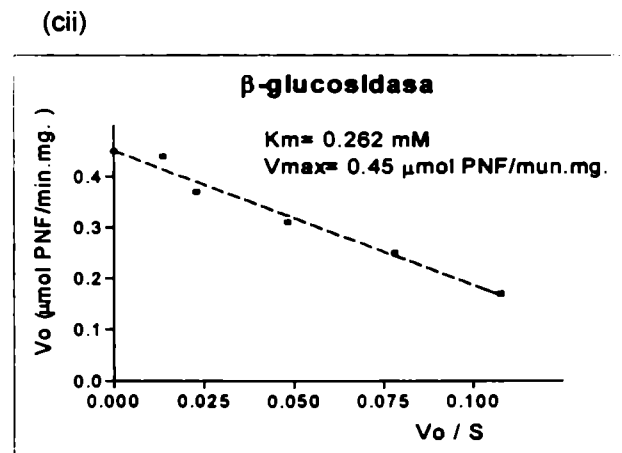
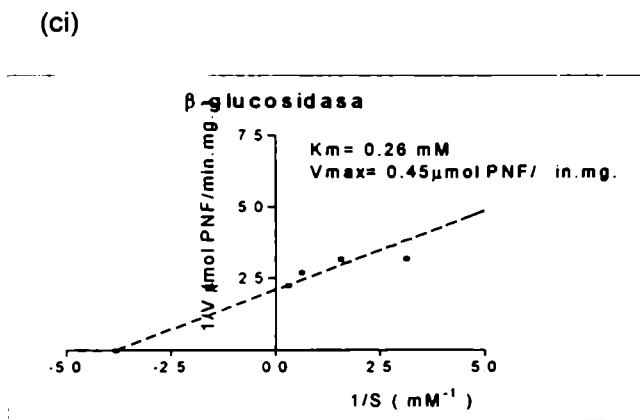
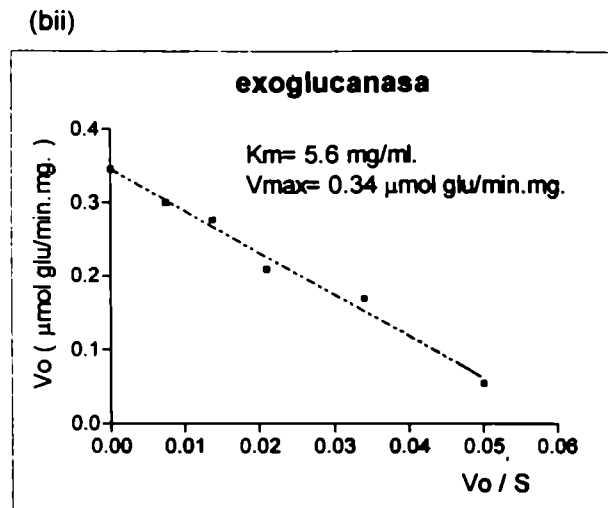
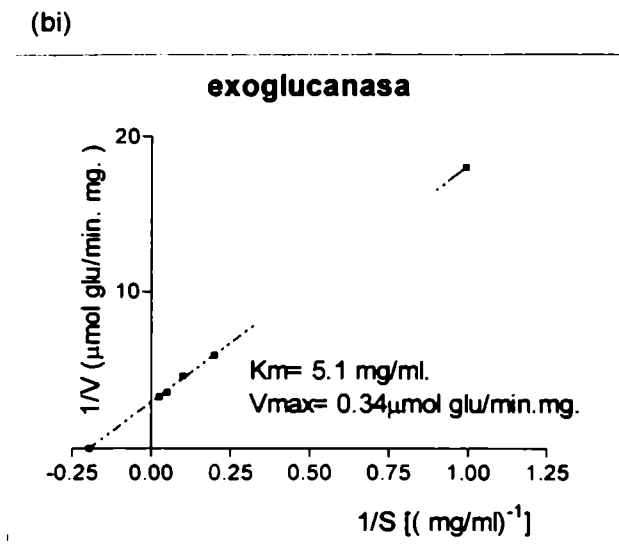
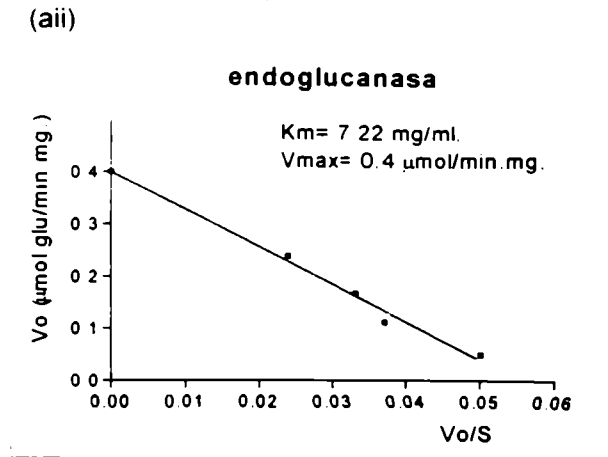
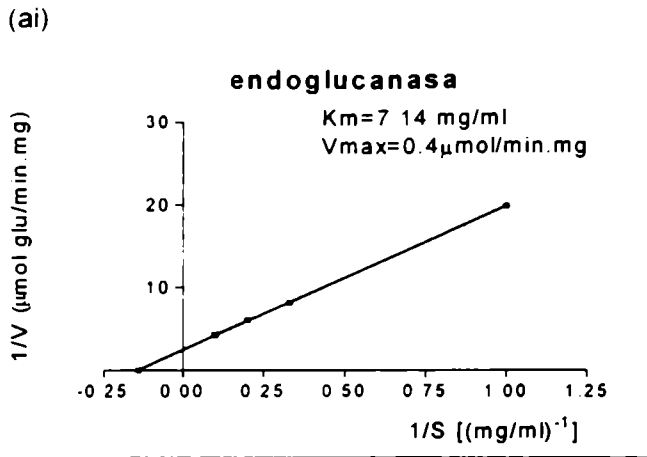


Figura 46: Determinación de  $K_m$  y velocidad máxima de reacción. (a) Actividad endoglucanasa; (b) actividad exoglucanasa; (c) actividad  $\beta$ -glucosidasa. (i) Determinación por el método Lineweaver-Burk; (ii) Determinación por el método de Eadie-Hofstee.

El valor de  $K_m$  resultó mayor que los encontrados para *Nectria catalinensis* (1.73 mg/ml), *Aspergillus candidus* (2.3 mg/ml) y *Arthrotrrys oligospora* (5.04 mg/ml), (Pardo y Forchiassin, 1999b). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este caso, estos parámetros fueron determinados en el crudo enzimático, sin ningún paso de purificación previo. Habiéndose obtenido un  $K_m$  mayor, resultó lógico el valor de  $V_{max}$  menor obtenido para *A. gamundii*, ya que el de *N. catalinensis* fue de 0.47  $\mu\text{mol glu/min.mg. de prot.}$  (Pardo y Forchiassin, 1999b).

Para la exoglucanasa, como se muestra en la figura 46 bi, los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  calculados por el método de Lineweaver-Burk fueron 5.1 mg CC/ml y 0.34  $\mu\text{mol glu/min.mg. de prot.}$  respectivamente. Al calcular nuevamente estos parámetros por el método Eadie-Hofstee, los resultados fueron 5.6 mg CC/ml y 0.34  $\mu\text{mol glu/min.mg. de prot.}$  Respectivamente (figura 46 bii).

Para la  $\beta$ -glucosidasa, por el método de las dobles recíprocas los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  que se muestran en la figura 48 a, son 0.26 nM PNF/ml. y 0.45  $\mu\text{mol PNF/min.mg. de prot.}$  respectivamente. Los mismos valores fueron obtenidos al utilizar el método de Eadie-Hofstee (figura 46 ci y ii).

El valor de  $K_m$  obtenido así como la  $V_{max}$  resultó similar al obtenido para otros hongos como *Neurospora sitophila* (0.28mM y 0.6  $\mu\text{mol PNF/min.mg}$ ) (Oguntimein y Moo Young, 1991) y *N. catalinensis* (0.26 mM y 0.24  $\mu\text{mol PNF/min.mg}$ ) (Pardo y Forchiassin, 1999a).

Se registraron también valores mayores de  $K_m$  para varios hongos como *T. reseei* 2,5 mM (Gong et al., 1977), *A. terreus* 0.78 mM (Wokman



y Day, 1982), *A. niger*, 1.03 mM (Dekker, 1986) y *A. fumigatus*; 0.59 mM (Waste et al., 1985).

Sin embargo, se determinaron valores menores de  $K_m$  para *T. emersoni* 0.14 mM (McHale y Coughlan, 1981) y para *Fusarium oxysporum* 0.19 (Alconada, 1992). En el caso de *T. emersoni*, la  $V_{el_{max}}$  obtenida resultó, lógicamente mayor (35.4  $\mu\text{mol PNF}/\text{min. mg}$ ), indicando que estas enzimas tienen mayor afinidad por el sustrato que la de *A. gamundii*.

#### R.5.2.- COMPLEJO XILANOLITICO.

##### R.5.2.1.- EFECTO DE CATIONES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

El 100% de actividad enzimática sólo se obtuvo con el crudo enzimático no tratado. Tanto al agregar EDTA como la mezcla de cationes en conjunto, la actividad enzimática se ve disminuida (ver figura 47).

Al ensayar los efectos de los cationes por separado sobre la actividad enzimática de la endoxilanasas (ver figura 48), se confirma al igual que en la experiencia anterior que el agregado de EDTA es el que inhibe con mayor contundencia la actividad enzimática.

Al agregar  $\text{Mg}^{2+}$ , la actividad enzimática es casi igual a la del tratamiento control. Luego, con los otros cationes la actividad enzimática va disminuyendo. Tanto con  $\text{Ca}^{2+}$  como con  $\text{Mn}^{2+}$  la actividad residual es de 75%, mientras que con  $\text{Zn}^{2+}$  disminuye a un 61%. Es de destacar que ninguno de los cationes que disminuyen la actividad enzimática de la endoxilanasas lo hacen muy drásticamente ya que con los cationes individualmente la menor actividad obtenida fue de un 60%.

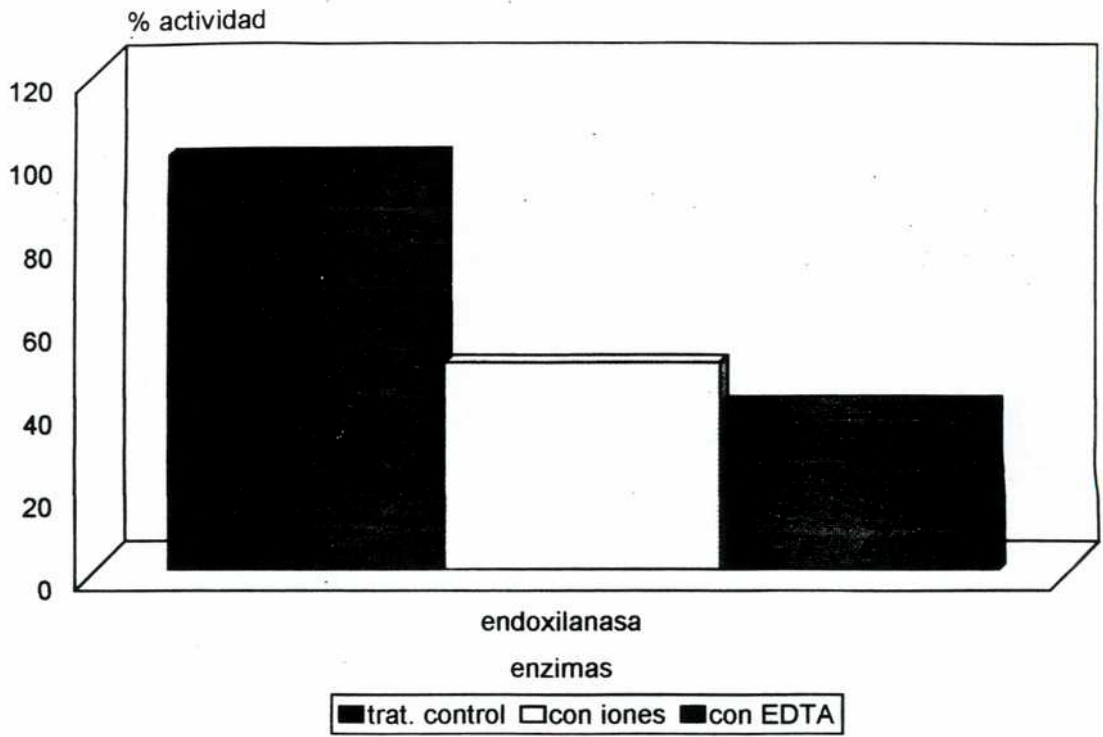


Figura 47 : Actividad enzimática de la endoxilanas en tratamientos con y sin iones en el medio de cultivo.

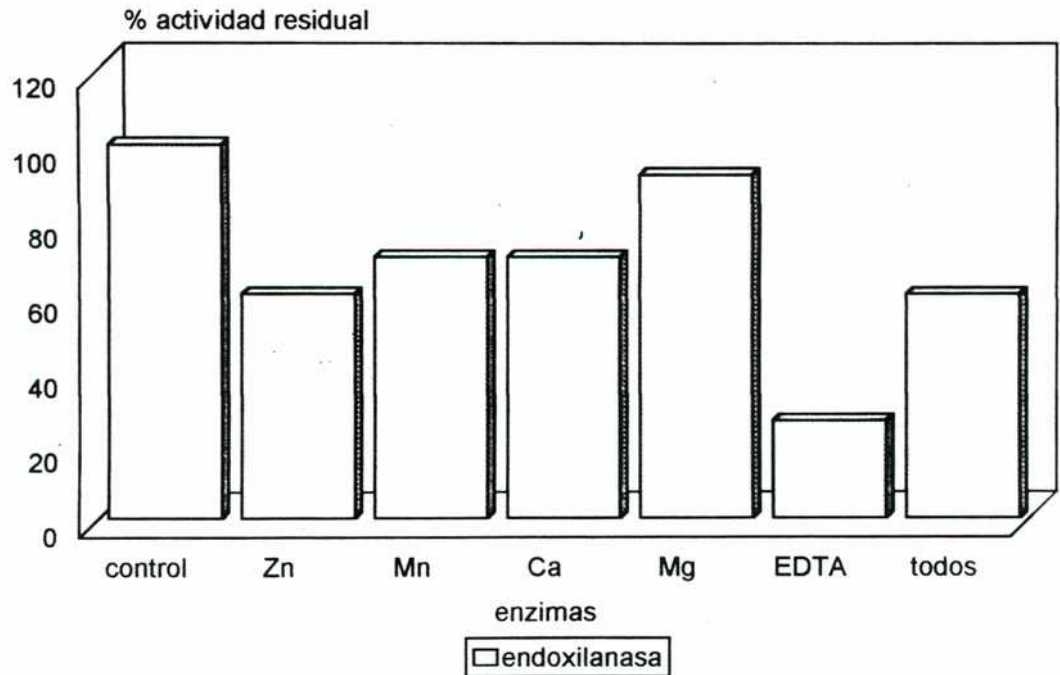


Figura 48 : Efecto de iones sobre la actividad enzimática de la endoxilanas

#### R.5.2.2.- EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Para la endoxilanasas, representante del sistema xilanolítico, el pH óptimo de reacción es 5, según se puede observar en la figura 49 a. Este coincide con el pH óptimo encontrado para las enzimas componentes del sistema celulolítico, y es de esperar ya que en la naturaleza ambos complejos se liberan al medio en condiciones tanto físicas como ambientales similares, debido a que los sustratos, siendo complejos, contienen tanto celulosa como hemicelulosas en íntima relación. Este mismo pH óptimo fue registrado para *Trichoderma longibrachiatum* (Chen et al.,1997).

El complejo xilanolítico extracelular está mayoritariamente representado por la actividad endoxilanasas, ya que como se probó en el punto 4 de esta sección, la actividad extracelular de la  $\beta$ - xilosidasa es muy pobre.

Al medir su actividad a diferentes pH, para encontrar el óptimo, se registró un nivel muy bajo de actividad (0.2 UE) que no mostró variaciones con los cambios de pH.

Al ensayar luego, las diferentes temperaturas de reacción, los resultados fueron igualmente pobres, por lo que se decidió conveniente no proseguir con el estudio de los parámetros cinéticos de esta enzima.

#### R.5.2.3.-EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

##### R.5.2.3.1.- TEMPERATURA OPTIMA.

Para la actividad de la endoxilanasas, la temperatura óptima de reacción, también resultó ser de 50 °C, al igual que para el sistema celulolítico (ver figura 49 b). Sin embargo, para esta enzima, la actividad enzimática registrada a 60 °C y 70 °C resultó mucho menor.

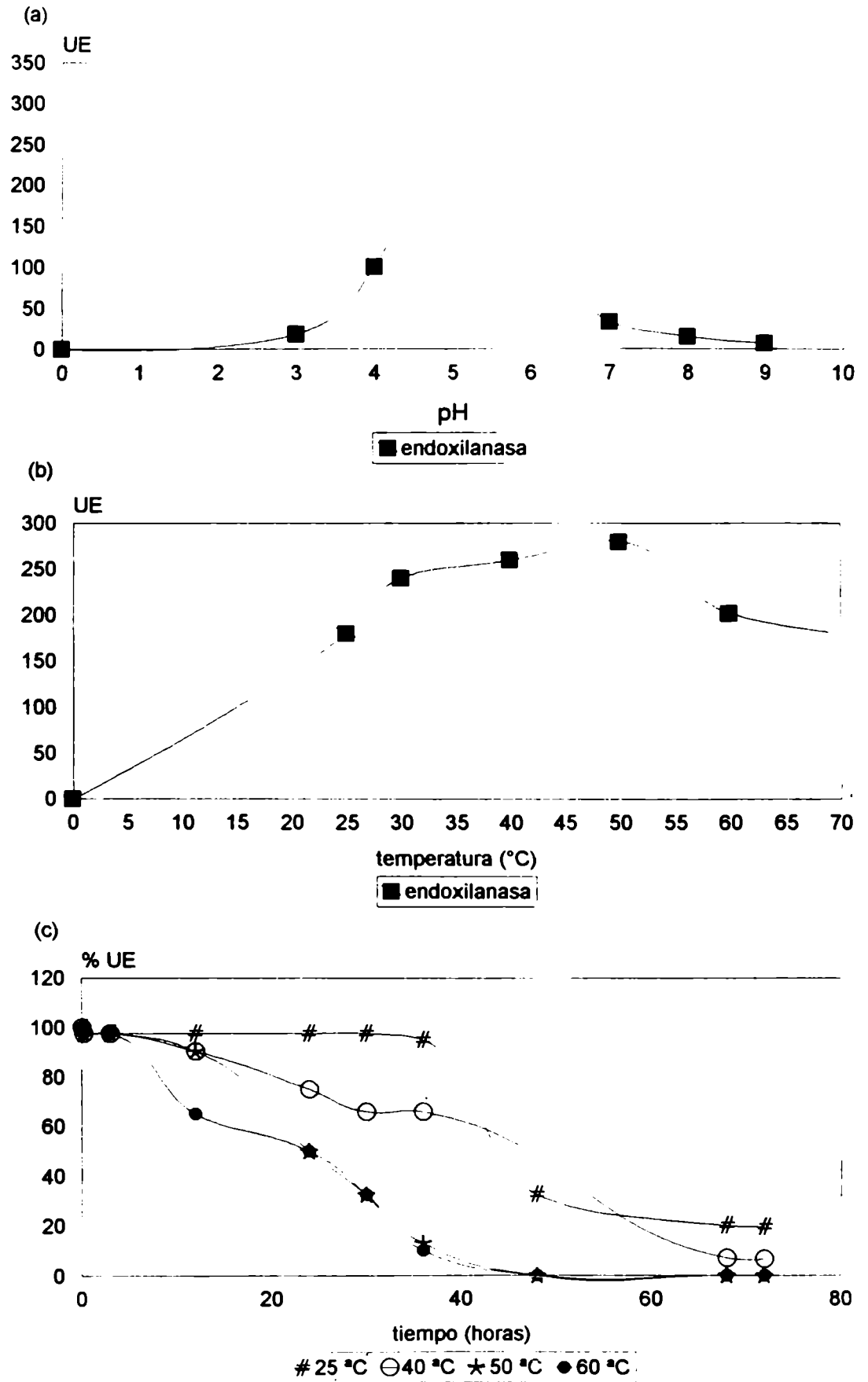


Figura 49 : Caracterización de la endoxilanas. (a) pH óptimo; (b) Temperatura óptima; (c) Termoestabilidad.

#### R.5.2.3.2.- TERMOESTABILIDAD.

La actividad enzimática de la endoxilanasas, luego de los diferentes tratamientos térmicos, resultó la más elevada de los tres complejos enzimáticos estudiados como se ve en la figura 49 c.

A temperatura ambiente (25 °C), esta enzima retuvo un 95% de su actividad enzimática luego de 36 horas de incubación; y un 66% en el mismo tiempo a 40 °C.

A temperaturas mayores la actividad enzimática se va perdiendo lentamente, pero aún se puede registrar algo de actividad a las 36 horas de mantener el crudo enzimático a 60 °C.

A la temperatura óptima para la reacción enzimática (50 °C) se pudo registrar un 90% de actividad residual a las 12 horas de incubación.

A las 72 horas de incubación, sólo se detectó actividad enzimática a los 25 °C y 40 °C de temperatura.

#### R.5.2.4.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

##### R.5.2.4.a.- SATURACION POR SUSTRATO.

Como se puede observar en la figura 50 la actividad de la endoxilanasas para *A. gamundii* se satura a los 2 mg xilano/ml, luego de lo cual se llega a un plateau donde no varía más la actividad enzimática.

La reacción se mantiene lineal solo por 15 minutos, luego de lo cual la velocidad empieza a decaer. Medir esta actividad incubando la reacción a tiempos mayores nos daría un error por defecto.

##### R.5.2.4.b.- CONSTANTE DE MICHAELIS MENTEN ( Km ) Y VEL. MAX.

Para la endoxilanasas, el cálculo de la constante de Michaelis Menthen (Km) según el método de las dobles inversas de Lineweaver-Burk dió un

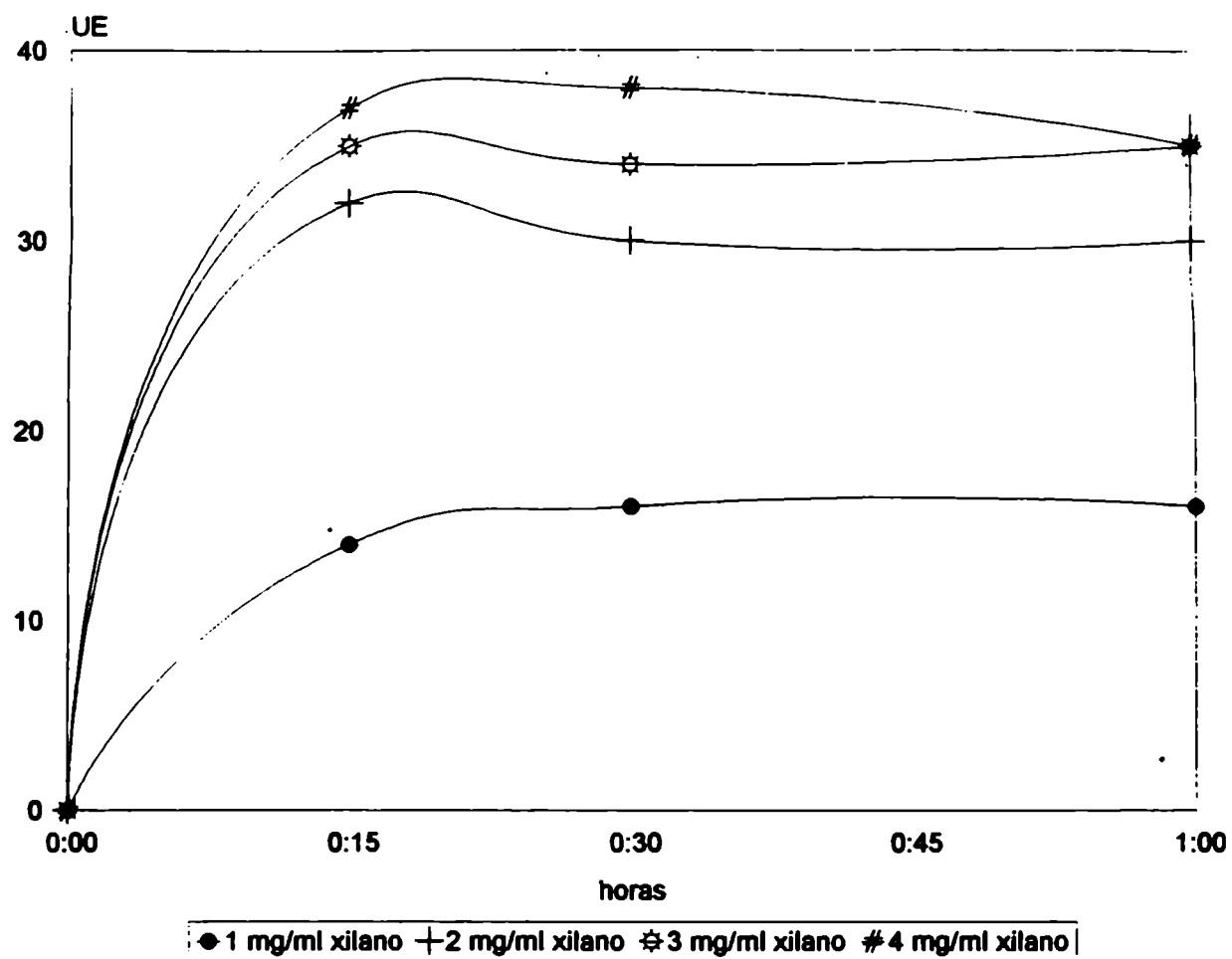


Figura 50 : Actividad endoxilanasa en funcion de la concentracion de sustrato.

valor de 3.95 mg de xilano/ml, según se muestra en la figura 51 a, con una velocidad máxima de reacción de 0.78  $\mu$ moles glu./min.mg. de proteínas. Al calcular las mismas variables según el método de Eadie-Hofstee, se obtuvo un Km de 3.23 mg./ml y una velocidad máxima de reacción de 0.65  $\mu$ moles glu./min. mg. de proteínas. como se muestra en la figura 51 b.

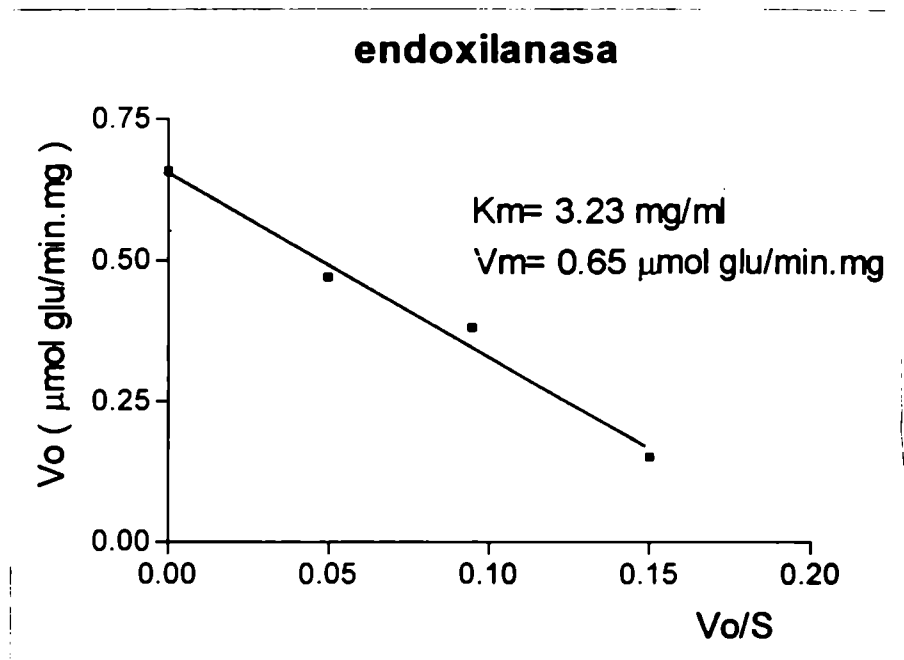
El valor de Km obtenido para *A. gamundii* para la endoxilanasasa se encuentra dentro del rango de valores de Km encontrados para otros hongos. Para *Talaromyces emersonii* este valor se encuentra entre 0.4mg/ml y 13.3 mg/ml (Tuohy et al., 1994). Es un valor inferior al del Km encontrado para *Trichoderma reesei* que resultó entre 14.8 y 22.3mg/ml según la fuente de xilano que se utilizara (Tenkanen y Ohno, 1992); y mayor al de *Trichoderma koningii* que posee un Km de 0.7mg/ml (Huang et al., 1991).

### R.5.3.- COMPLEJO AMIOLITICO.

#### R.5.3.1.- EFECTO DE CATIONES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

El sistema amilolítico se monitoreó, a través de la actividad global del sistema, sin hacer distinciones entre las enzimas componenetes del sistema ( $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa principalmente). La actividad del complejo no se ve fuertemente afectada por la adición del coctel de cationes (figura 52 a). Al agregar EDTA, en la concentración utilizada en esta experiencia, la actividad enzimática se inhibió totalmente. Este efecto inhibitorio del EDTA sobre la actividad amilolítica ha sido reportado también para *Mucor sp.* (Mohapatra et al., 1998). Esta inhibición puede deberse a que la enzima  $\alpha$ -amilasa, componente del sistema, es una

(a)



(b)

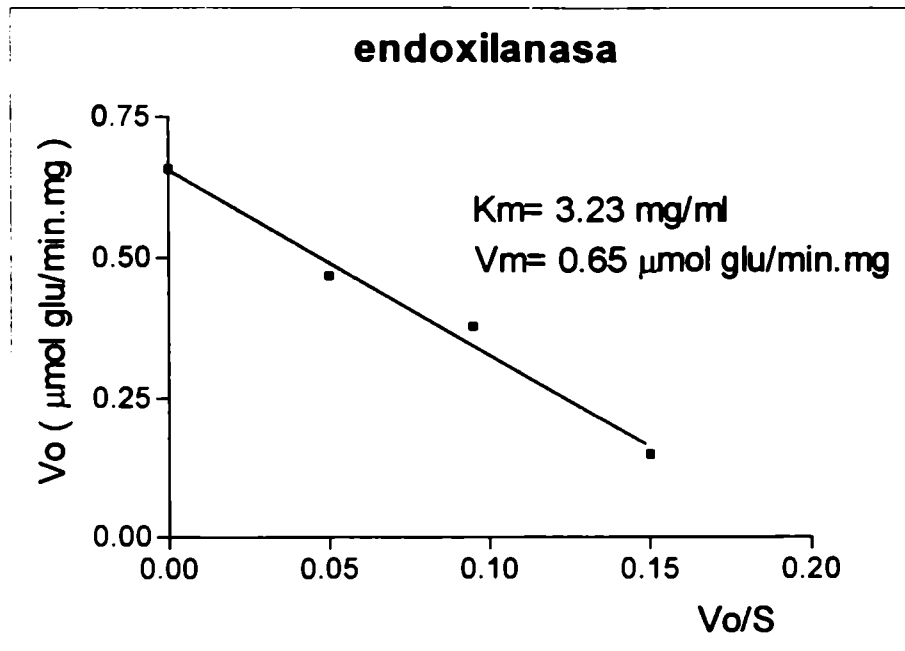


Figura 51: Determinación de  $K_m$  y velocidad máxima de reacción para la actividad endoxilanasas. (a) método de Lineweaver-Burk; (b) método de Eadie-Hofstee.



enzima dependiente del calcio para su actividad. Al quelarse el calcio que ésta necesita, su actividad es fuertemente disminuída, ocasionando una fuerte caída en la actividad global del complejo enzimático.

Al agregar el resto de los cationes por separado, la actividad enzimática no fue negativamente afectada por ninguno del ellos (figura 52 b). En todos los casos, las actividades enzimáticas valoradas resultaron igual o incluso mayores que las obtenidas con el control.

Se han registrado aumentos en la actividad enzimática de las amilasas de *Aspergillus flavus* en la presencia de  $K^+$  (Aboud Zeid, 1997). Sin embargo esta misma enzima presenta una menor actividad enzimática en presencia de  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , y  $Fe^{2+}$ .

#### R.5.3.2.– EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Al medir la actividad enzimática del sistema amilolítico con el método de Somogyi - Nelson, se detecta en el sobrenadante la presencia de azúcares reductores. De esta manera, no se puede diferenciar entre las diferentes enzimas componentes de dicho sistema. De esta manera, como se ve en la figura 53 a, para el sistema amilolítico así medido, el pH óptimo resulta ser 6.

Luego de haber detectado la presencia de  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas como componentes del complejo amilolítico, se decidió estudiar los parámetros cinéticos en cada una de ellas independientemente.

Para la actividad  $\alpha$ -amilasa, el pH óptimo resultó ser 6 (igual que el obtenido para el complejo en general) como se ve en la figura 53 b. Lo mismo ocurrió con el pH óptimo de la glucoamilasa que también produjo la mayor actividad enzimática a las 6 unidades (figura 53 c).

En general los registros de pH óptimos para la actividad amilolítica, tanto de  $\alpha$ -amilasas como de glucoamilasas se encuentra en el rango entre

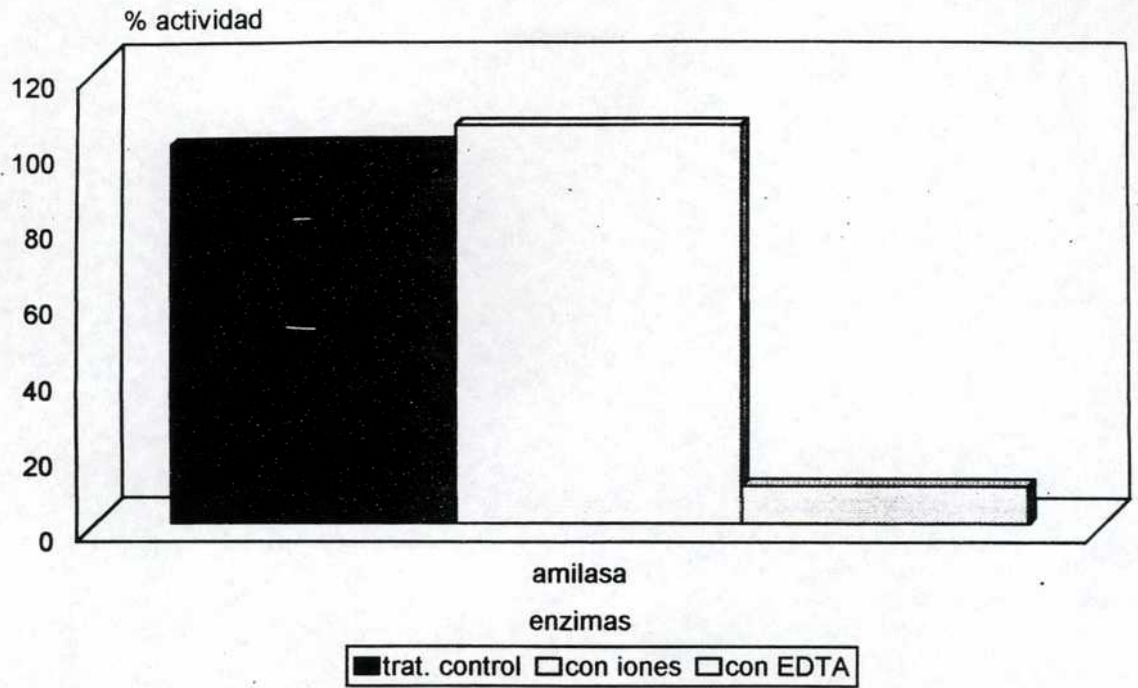


Figura 52 (a) : Actividad enzimatica de las amilasas en tratamientos con y sin iones en el medio de cultivo.

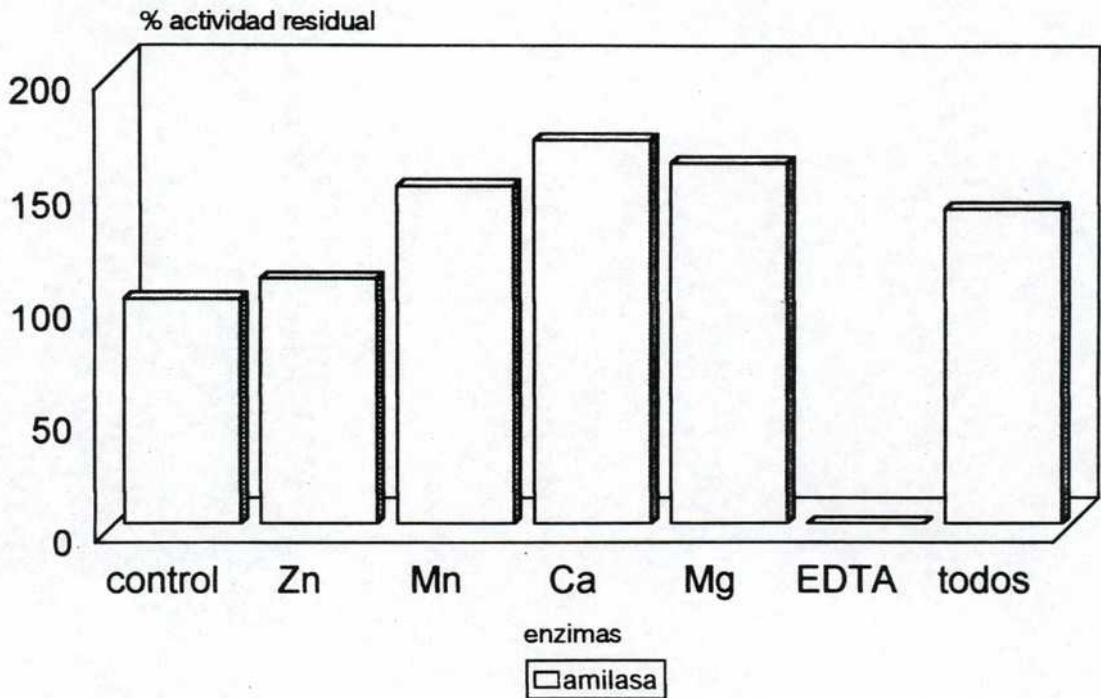


Figura 52 (b) : Efecto de iones sobre la actividad enzimatica de las amilasas.

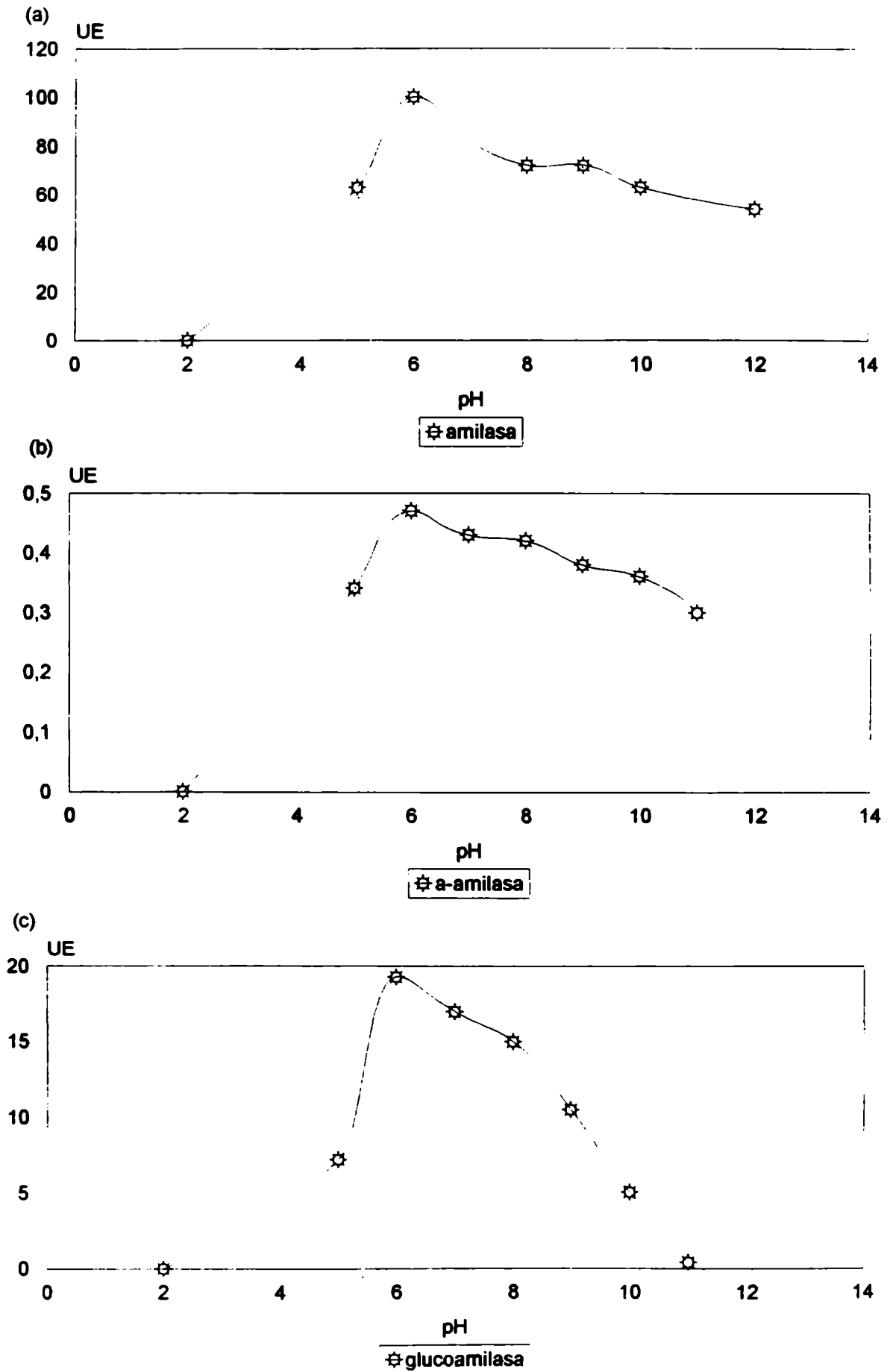


Figura 53 : pH óptimo. (a) amilasas, medidas por azúcares reductores.; (b) Actividad  $\alpha$ -amilasa; (c) Actividad glucoamilasa.

5 y 6 de pH ( Khoo et al.,1994; Mishra et al.,1996; Olasupo et al., 1996; Mohapatra et al., 1998).

### **R.5.3.3.- EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.**

#### **R.5.3.3.1.- TEMPERATURA OPTIMA.**

Al determinar la temperatura óptima de reacción del sistema amilolítico, sin diferenciar entre las diferentes enzimas componentes del sistema, se ve (figura 54 a) que su actividad aumenta al aumentar la temperatura hasta alcanzar su mayor actividad enzimática a los 60 °C. Esta temperatura óptima resultó mayor que las encontradas tanto para el sistema celulolítico como para el sistema xilanolítico.

Al verificar la temperatura óptima para la actividad glucoamilasa, esta coincidió en los 60 °C, con la del complejo en general (ver figura 54 c). Sin embargo al medir la temperatura óptima de la actividad  $\alpha$ -amilasa, esta fue menor. La  $\alpha$ -amilasa llega a su mayor actividad enzimática a los 50 °C (ver figura 54 b), al igual que los complejos celulolíticos y xilanolíticos.

#### **R.5.3.3.2.- TERMOESTABILIDAD.**

Al estudiar la estabilidad del complejo frente a la temperatura, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 55 a.

Hasta las 12 primeras horas de incubación del crudo enzimático, el complejo amilolítico se mantuvo estable. A las temperaturas menores (25 °C y 40 °C), se mantuvo una actividad residual de un 80% de la original. A temperaturas mayores (50 °C y 60 °C), sólo se perdió un 50% de dicha actividad enzimática. Se vuelven a reflejar aquí, las características típicas de resistencia de las enzimas extracelulares producidas por los hongos.

Como se puede ver en la figura 55 c, para la glucoamilasa, se observa que su actividad se mantiene estable a bajas temperaturas (25 °C) hasta las 48 horas posteriores a su incubación, reteniendo hasta un 50% de

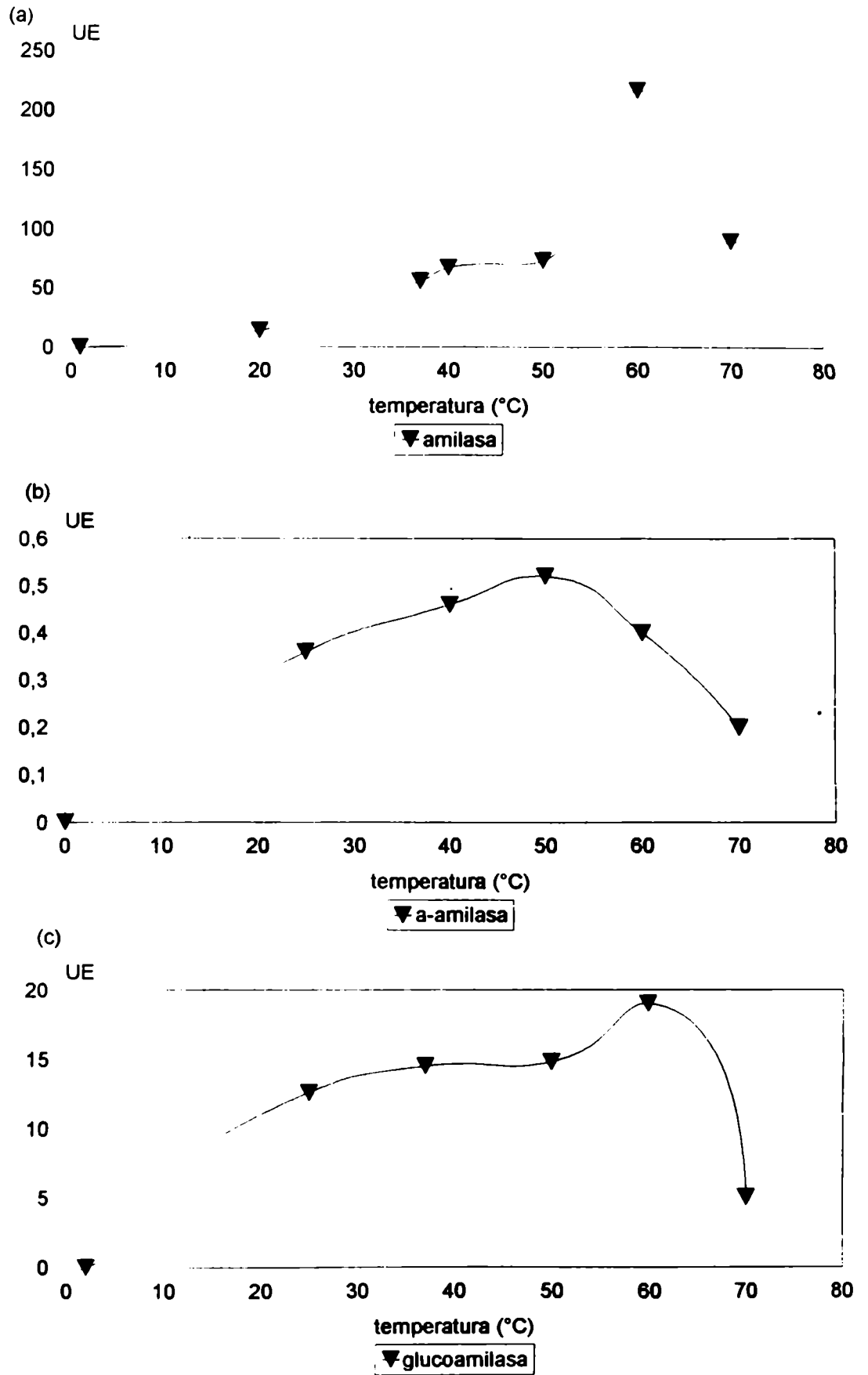


Figura 54: Temperatura óptima. (a) Amilasas medida por azúcares reductores; (b) a-amilasa; (c) glucoamilasa.

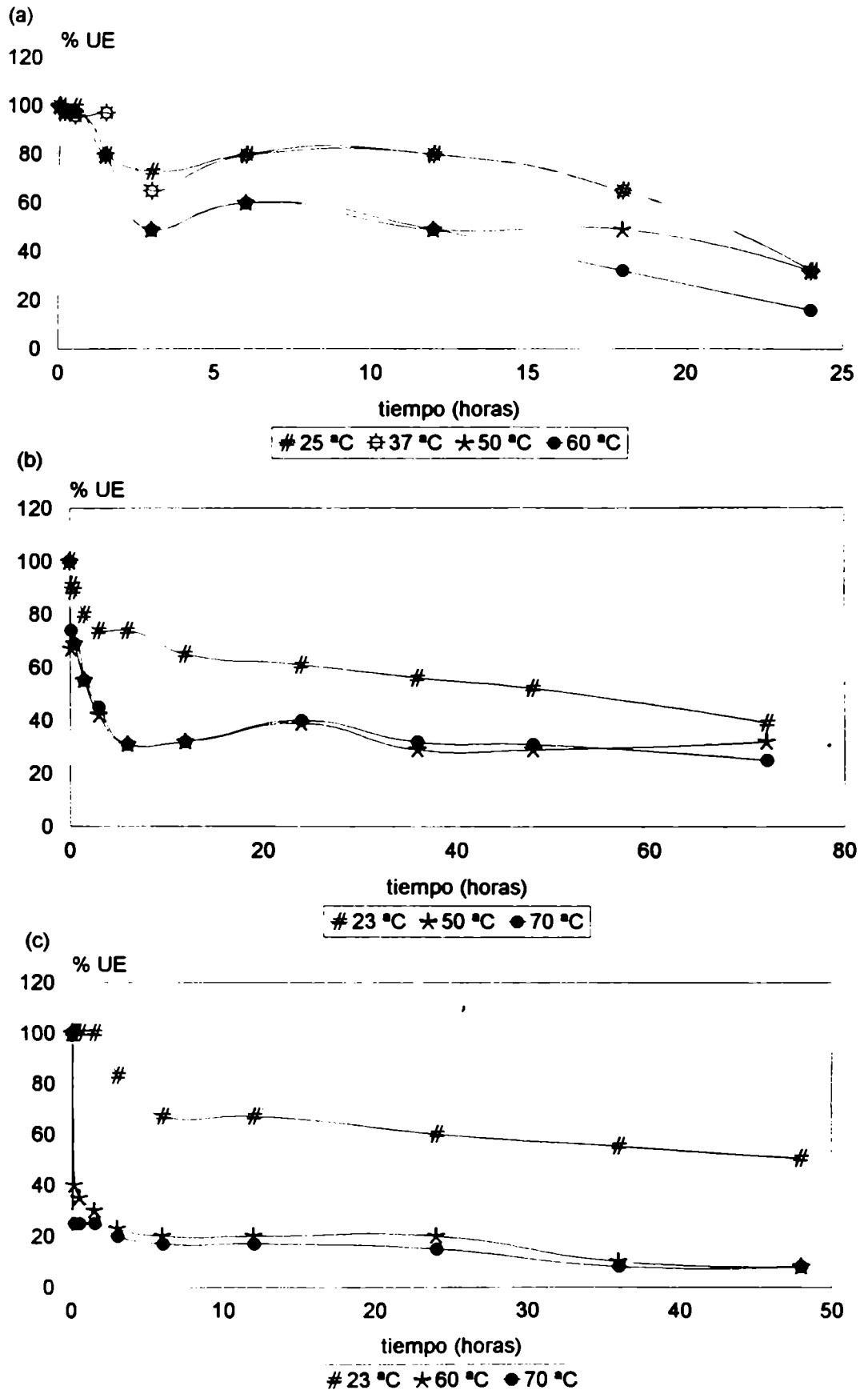


Figura 55 : Termoestabilidad. (a) Amilasas medidas por azúcares reductores; (b) Actividad  $\alpha$ -amilasa; (c) Actividad glucoamilasa.

actividad. A esta temperatura, la actividad se mantiene intacta durante la primera hora y media y recién entonces comienza a disminuir lentamente.

Sin embargo, a 60 °C y 70 °C, la actividad enzimática decae ya rápidamente a partir de los 10 minutos de permanecer a estas altas temperaturas.

En la figura 55 b, se puede observar la respuesta de la actividad  $\alpha$ -amilasa a la incubación a las diferentes temperaturas.

La actividad  $\alpha$ -amilasa resultó más estable que la glucoamilasa, ya que se obtuvo una actividad enzimática residual del 40% para las tres temperaturas ensayadas en esta experiencia (23 °C, 50 °C y 70 °C), al cabo de 72 horas de incubación.

#### R.5.3.4.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

##### R.5.3.4.a.- SATURACION POR SUSTRATO.

El complejo amilolítico fue caracterizado según sus dos componentes enzimáticos, la glucoamilasa y la  $\alpha$ -amilasa también en estas experiencias.

Para el sistema amilolítico en general, la actividad enzimática se saturó a los 20 g/l de almidón y la reacción perdió linealidad a los 15 minutos de incubación (figura 56 a). Para la  $\alpha$ -amilasa (figura 56 b), se obtuvo una saturación de la actividad enzimática con 0.25 mg almidón/ml, al igual que con la glucoamilasa. Sin embargo, la linealidad se pierde antes con la  $\alpha$ -amilasa. La linealidad de la reacción para la glucoamilasa (figura 56 c) se mantiene hasta los 30 minutos mientras que en el caso de la  $\alpha$ -amilasa, solo se mantiene por 15 minutos.

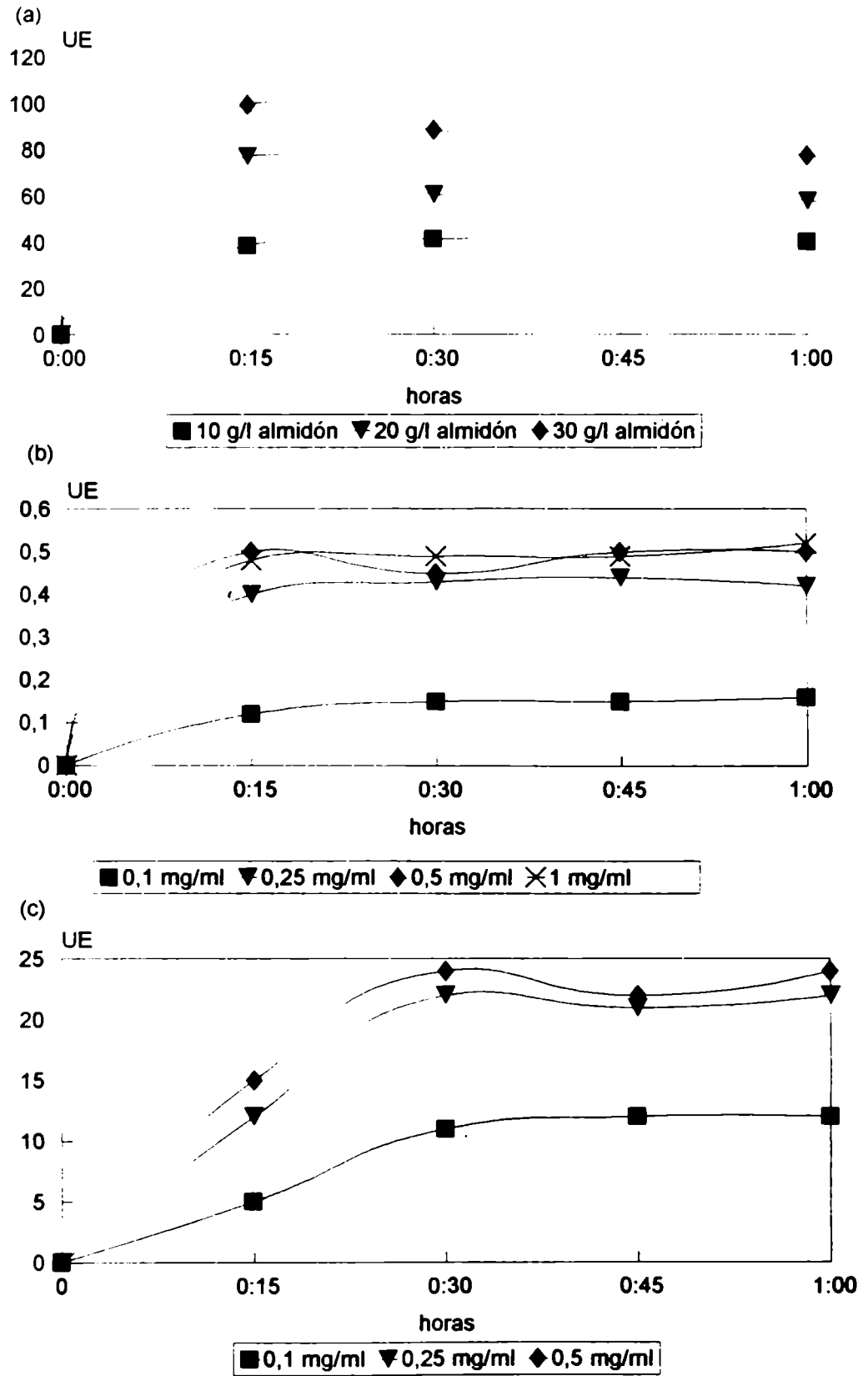


Figura 56 : Actividad de las amilasas en función de la concentración de sustrato. (a) amilasas medidas por azúcares reductores; (b) α-amilasas; (c) glucoamilasas.



**R.5.3.4.b.- CONSTANTE DE MICHAELIS MENTEN ( KM ) Y VEL. MAX.**

En la figura 57 ai, se muestra la representación de las dobles recíprocas de Lineweaver-Burk para la  $\alpha$ -amilasa, de donde se obtiene un Km de 0.62 mg/ml y una velocidad máxima de 2.12 UE/mg. de proteínas.

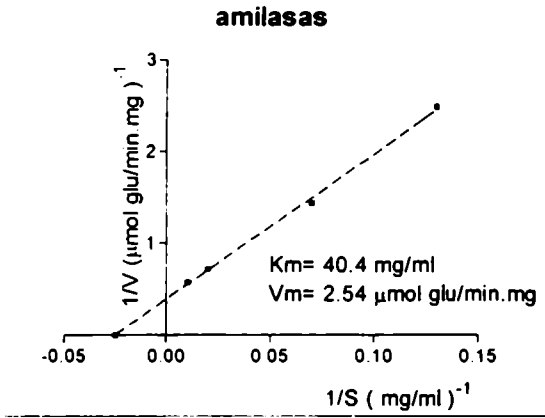
Según el método de Eadie-Hofstee (figura 57 aii) el Km obtenido fue de 0.6 mg/ml y la velocidad máxima de reacción de 2.16 UE/mg. de proteína.

Los valores de Km registrados para la  $\alpha$ -amilasa de origen animal, vegetal y microbiano (incluyendo hongos y bacterias) se encuentran en un rango aproximado entre  $1.8 \times 10^6$  y  $6.5 \times 10^{-2}$  mg/ml (Manning y Campbell, 1961). Para una  $\alpha$ -amilasa purificada a partir de un cultivo de *Aspergillus flavus* (Khoo et al., 1994) el Km resultó de 0.5mg/ml de almidón.

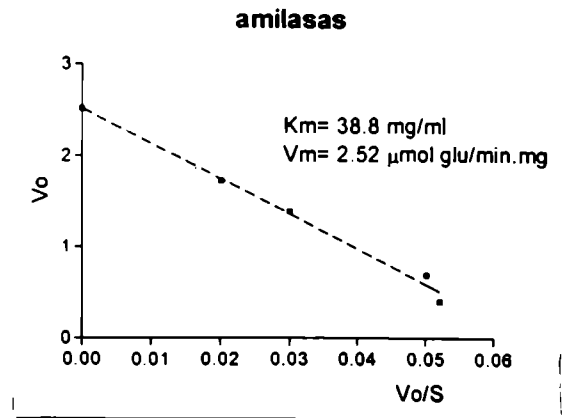
Para la glucoamilasa el Km resultó de 0.014 mg/ml con los dos métodos empleados para calcular dicha variable (figura 57 b i y ii). La velocidad máxima de reacción obtenida según el método de Lineweaver-Burk fue de 1.23 umol glu./min.mg de proteínas y de 1.28  $\mu$ moles glu./min.mg de proteínas según el método de Eadie-Hofstee.

Para *Fusidium sp. BX-1*, un imperfecto, el Km obtenido para la glucoamilasa producida resultó de 0.044 % almidón soluble, creciendo en un medio con glicerol (Ohno et al., 1992) y para *Thermomyces lanuginosus* el Km obtenido fue de 0.04 mg/ml (Mishra et al., 1996).

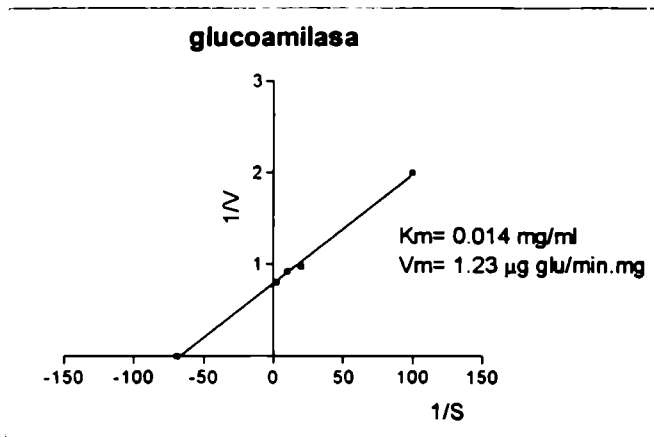
(ai)



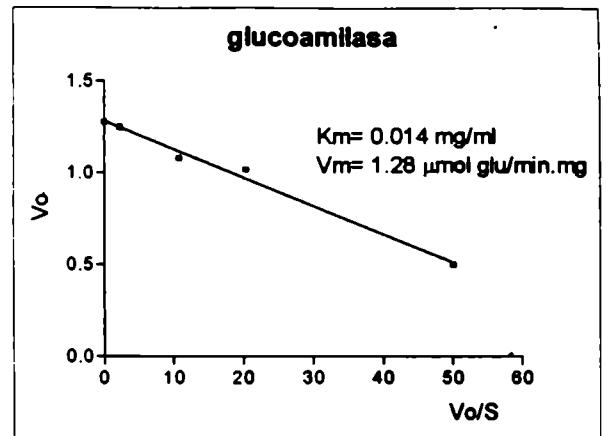
(aai)



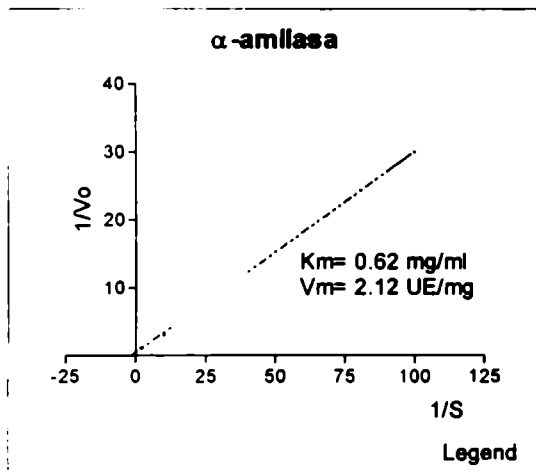
(bi)



(bii)



(ci)



(cii)

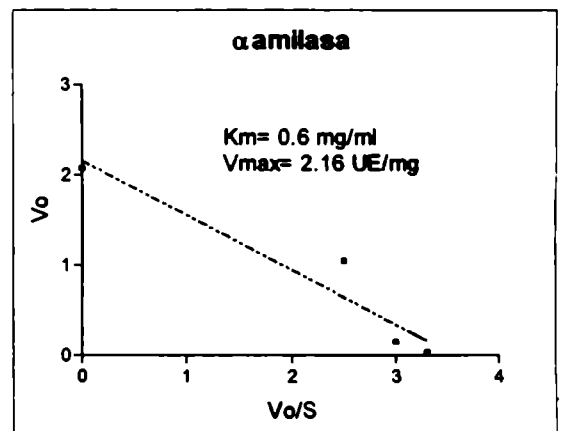


Figura 57: Determinación de  $K_m$  y velocidad máxima de reacción. (a) amilasas (determinadas por azúcares reductores); (b) glucoamilasa; (c)  $\alpha$ -amilasa. (i) método de Lineweaver-Burk; (ii) método de Eadie-Hofstee.

## R.6.- ISOENZIMAS

Las técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida tienen como objetivo detectar, si es que existen, las múltiples formas enzimáticas que componen los diferentes complejos enzimáticos estudiados.

### R.6.1.- SISTEMA CELULOLITICO

#### R.6.1.1.- FUENTE DE CARBONO: celulosa cristalina.

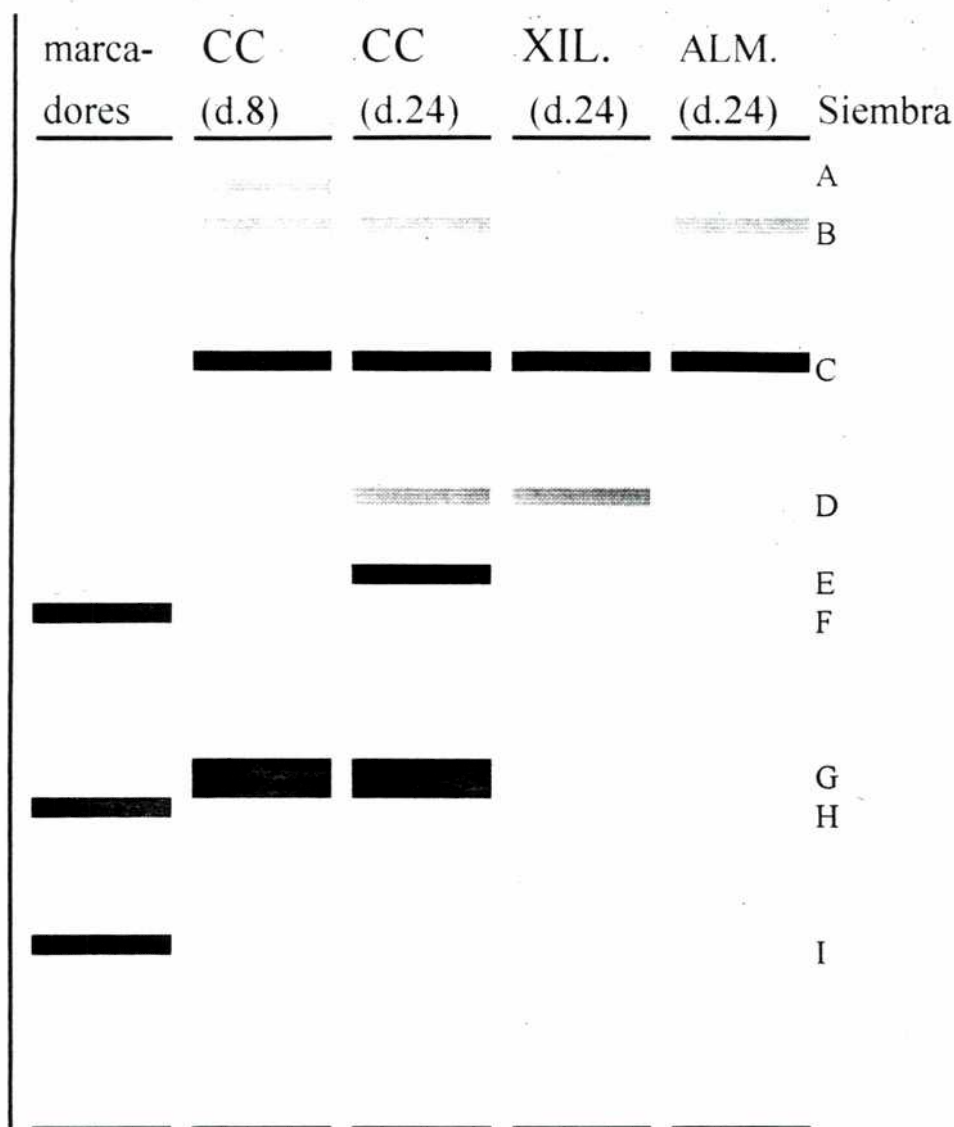
Para revelar la actividad de la  $\beta$ -D 1,4 endoglucanasa los sobrenadantes elegidos se corrieron en las condiciones detalladas en la sección 10 de materiales y métodos, utilizando un gel de poliacrilamida de poro 8%, los resultados se muestran en la figura 58.

Se sembraron los sobrenadantes provenientes de un medio con celulosa cristalina como fuente de carbono de los días 8 y 24 de cultivo.

Se detectaron cuatro isoenzimas para el día 8 y cinco para el día 24. Tres de las isoenzimas que aparecen son las mismas. El día 8 aparece una isoenzima característica de Rf 7.2 ; mientras que el día 24 se encuentran otras dos bandas propias de este día de Rf 36 y Rf 44. Este patrón de evolución de isoenzimas en función del tiempo, en el que a medida que este transcurre aparecen mayor cantidad de formas enzimáticas, ya ha sido reportado para otro hongo de la familia, *Saccobolus saccoboloides* (Magnelli, 1998), sugiriéndose que las nuevas isoenzimas fueran modificaciones de las sintetizadas en un inicio.

Las diferentes isoenzimas detectadas para la  $\beta$ -D1,4 endoglucanasa a los 8 y 24 días de incubación coinciden con diferencias en el medio de cultivo entre estos dos días. El día 8 *Ascobolus gamundii* se encuentra en la etapa de crecimiento exponencial, con un pH en el medio de 6.8,

## ZIMOGRAMA ENDOGLUCANASA.



Fte. de corrida

Figura 58: Electroforesis en gel de poliacrilamida 8% con SDS.

Overlay- CMC 0.1%- Tinción para endoglucanasa.

*Calle 1:* Marcadores de peso molecular. Tinción Coomasie.

F: seroalbúmina bovina (66.000) Rf: 48; H: albúmina-chiken egg-(45.000)

Rf: 68.00; I: anhidrasa carbónica (29.000) Rf: 81.6

*Calle 2:* Sobrenadante de CC día 8. A: Rf 7.2; B: Rf 8.56; C: Rf 20.8; G: Rf 64.8.*Calle 3:* Sobrenadante de CC día 24. B: Rf 8.56; C: Rf 20.8; D: Rf 36; E: Rf 44; G: Rf 64.8.*Calle 4:* Sobrenadante de xilano día 24. C: Rf 20.8; D: Rf 36.*Calle 5:* Sobrenadante de almidón día 24. B: Rf 8.56; C: Rf 20.8

mientras que para el día 24, ya ha comenzado la etapa de autólisis, en la que se liberan al medio productos de metabolismo celular que alcalinizan el medio (pH 10). Esta diferencia de pH, podría estar regulando las formas enzimáticas que se sintetizan en presencia del sustrato inductor, para llevar a cabo la hidrólisis más efectiva de dicho sustrato. Este tipo de regulación de las formas isoenzimáticas extracelulares ya ha sido descrito para *Talaromyces emersonii* (McHale & Coughlan, 1981).

La falta de una banda no debe tomarse como la ausencia absoluta de esa forma enzimática, ya que puede ser que esta se encuentre pero en muy baja concentración, o que este adsorbida al sustrato insoluble, de manera tal que no pueda ser detectada por el método de revelado.

La validez de los zimogramas reside en aquellas bandas que si aparecen o aparecen con diferente intensidad (siempre y cuando se utilice un método cuantitativo de siembra), indicando que existe una regulación en la producción de dicha forma enzimática. La alteración en el patrón de bandas de actividad enzimática durante los diferentes estadios de crecimiento puede deberse a diferentes factores : i) cambios en el pH que pueden causar la inactivación de ciertas formas enzimáticas y/o estimular la secreción al medio de otras, ii) acción parcial proteolítica de una forma enzimática preexistente, iii) liberación de formas enzimáticas diferentes que se encontraban adsorbidas al sustrato o al micelio y que al acabarse este, fueran liberadas (Labudova y Farkas, 1983).

La actividad  $\beta$ -glucosidasa fue detectada solo en geles de menor poro ya que al tener un mayor peso molecular requerían un gel de poro más laxo. Al ser sembradas en un gel de poro mayor (8%), la actividad enzimática revelada luego, quedaba siempre en el origen de siembra.

Dado que el poro de los geles era menor (5%), al revelar la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa los resultados fueron menos nítidos (figura

59). En este gel de poro tan laxo la actividad enzimática tiende a difundir por el gel, obteniéndose una banda final demasiado ancha. Esto no descarta la existencia de más de una forma enzimática. En otras especies se han detectado varias isoformas para la actividad  $\beta$ -glucosidasa, como ser en *Sporotrichum termophile* ( Bhat et al., 1993), *Trichoderma reesei* (Mach et al., 1995) y *Aspergillus terreus* ( Singh et al., 1996), por ejemplo.

Para *Ascobolus gamundii* al crecer con celulosa cristalina como fuente de carbono, el sistema celulolítico esta compuesto por al menos seis formas de la  $\beta$ -D1,4 endoglucanasa de peso molecular mayor a 45000KD y por al menos una forma enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa de mayor peso molecular aún.

#### R.6.1.2.- OTRAS FUENTES DE CARBONO: xilano y almidón.

Dado que se comprobó la síntesis de  $\beta$ -D1,4 endoglucanasas en medios con diferentes fuentes de carbono ( sección 1 y 2.1 de resultados), aún cuando esta no fuera el sustrato específico propuesto para esta enzima, se decidió estudiar qué formas enzimáticas se sintetizaban en cada caso. Para ello se sembró en los geles sobrenadantes provenientes de diferentes medios de cultivo y se procedió a revelar el gel como se muestra en la figura 58 ( revelando actividad de endoglucanasa).

Para ambos medios, tanto con xilano como con almidón, las isoenzimas detectadas se correspondieron a isoenzimas ya detectadas al sembrar los sobrenadantes provenientes de celulosa cristalina. La diferencia radicó en el número de isoenzimas presentes en estos medios. Este resultado nos indica que si bien estas fuentes de carbono pueden

ZIMOGRAMA  $\beta$ -GLUCOSIDASA.

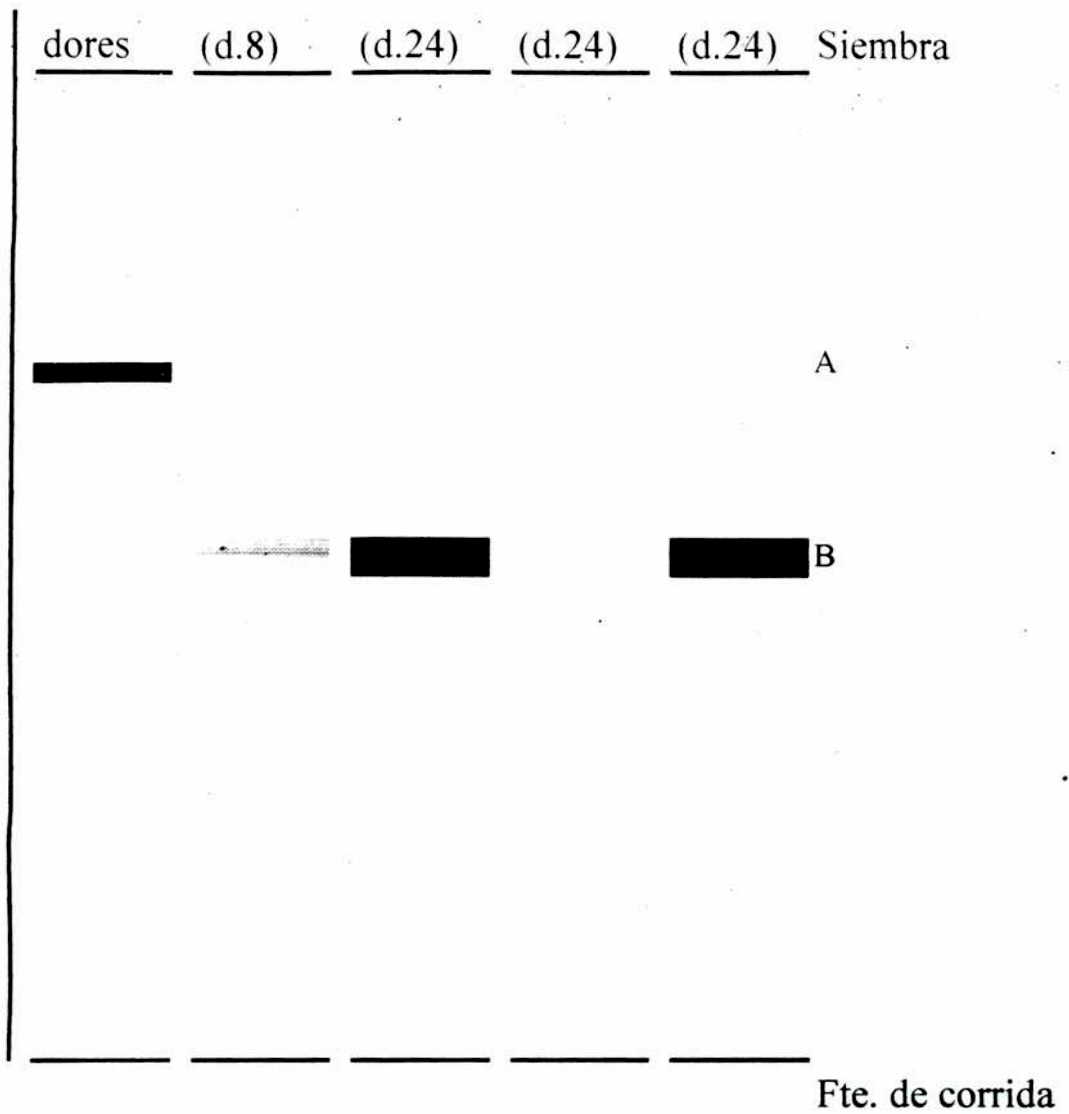


Figura 59: Electroforesis en gel de poliacrilamida 5% con SDS.  
Tinción para revelar actividad  $\beta$ -glucosidasa.

*Calle 1:* Marcadores de peso molecular. Tinción Coomasie.

B: ureasa (110000) Rf 29.6

*Calle 2:* Sobrenadante de CC día 8. B: Rf 48.27.

*Calle 3:* Sobrenadante de CC día 24. B: Rf 48.27

*Calle 4:* Sobrenadante de xilano día 24.

*Calle 5:* Sobrenadante de almidón día 24. B: Rf 48.27.

inducir el sistema celulolítico, no imitan por completo la presencia del inductor natural, la celulosa.

Para el sobrenadante proveniente de xilano del día 24 de cultivo, se detectaron dos isoenzimas para la  $\beta$ -D1,4 endoglucanasa con Rf 20.8 y Rf 36 respectivamente.

Para el sobrenadante proveniente del medio con almidón, también del día 24, las isoenzimas detectadas fueron las de Rf 8.56 y Rf 20.8. Esta última banda es común a todos los inductores.

Como se puede ver, en estos medios se sintetizaron un menor número de isoenzimas para la  $\beta$ -D1,4 endoglucanasa, lo que concuerda con una menor actividad enzimática en los sobrenadantes utilizados (recordemos que la mayor actividad se obtuvo en el medio con celulosa cristalina como fuente de carbono).

Otros factores que pueden influenciar la síntesis diferencial isoenzimas en diferentes medios de cultivo, podrían ser los productos de hidrólisis que serían diferentes en cada caso particular. Obviamente en estos casos los productos de hidrólisis de estos polímeros difieren de los producidos a partir de celulosa, con lo cual, es razonable que existan diferencias en la inducción del sistema enzimático.

La regulación del sistema celulolítico esta aún hoy en día en estudio y se proponen diferentes hipótesis para explicarla. Si bien se sabe que es inducible, la naturaleza del verdadero inductor sigue siendo una incógnita. Se ha reportado la síntesis de celulasas utilizando diferentes fuentes de carbono como polímeros (celulosa, manano, xilano), disacáridos producto de la hidrólisis de los anteriores (celobiosa, manobiosa, xilosa), así como otros disacáridos no relacionados (sorbosa, lactosa, maltosa). Más aún la inducción del sistema celulolítico está en estos casos asociada a la inducción del sistema xilanolítico (Sachslehner et al., 1998). Para



*A. gamundii*, si bien las celulasas son inducidas en otros medios, las isoenzimas sintetizadas son las mismas que se sintetizan al utilizar celulosa cristalina como inductor.

Para la actividad  $\beta$ -glucosidasa también se sembraron geles de poliacrilamida con sobrenadantes provenientes de diferentes medios de cultivo. Como se puede observar en la figura 59, solamente se detectó actividad enzimática en uno de los sobrenadantes provenientes del medio con almidón. Esto concuerda con los datos obtenidos en las curvas de crecimiento (sección 1.3 de resultados), donde se veía que en este medio la actividad  $\beta$ -glucosidasa estaba muy inducida.

Al igual que en el caso anterior, la banda obtenida al revelar esta enzima fue muy ancha como para detectar formas enzimáticas independientes, pero de todos modos, coincidió con la obtenida en el caso del sobrenadante con celulosa cristalina como fuente de carbono.

## R.6.2.- SISTEMA XILANOLITICO.

### R.6.2.1. FUENTE DE CARBONO: xilano.

Como representante del sistema xilanolítico se eligió a la endoxilanasas por dos razones :

- 1) esta se encuentra con una alta actividad en el sobrenadante de cultivo.
- 2) al encontrarse en el sobrenadante de cultivo, es mejor para obtener geles con buena resolución. La  $\beta$ -xilosidasa se encuentra en muy baja concentración.

En el sobrenadante del día 10 de un cultivo de *A. gamundii* creciendo en un medio con xilano como fuente de carbono, utilizando un gel de poro

## ZIMOGRAMA ENDO XILANASA

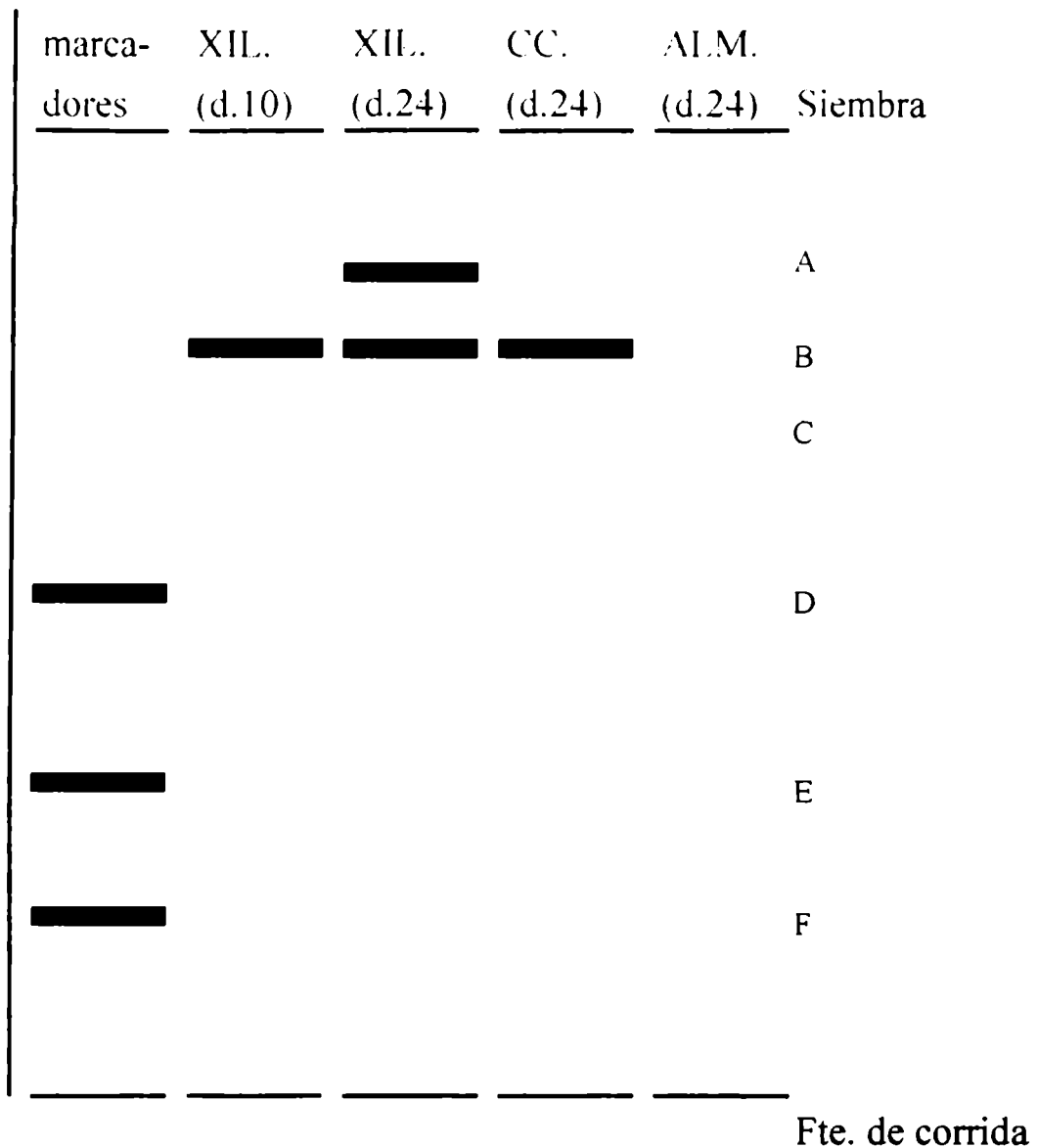


Figura 60: Electroforesis en gel de poliacrilamida 8% con SDS.

Overlay- xilano 0.1%- Tinción para endoxilanasas.

*Calle 1:* Marcadores de peso molecular. Tinción Coomasie.

D: seroalbúmina bovina (66.000) Rf 48; E: albúmina-chiken egg-(45.000)Rf 68;

F: anhidrasa carbónica(29.000) Rf 81.6.

*Calle 2:* Sobrenadante de xilano día 10. B: Rf 22.5.

*Calle 3:* Sobrenadante de xilano día 24. A: Rf 13.7; B: Rf 22.5; C: Rf 29.4.

*Calle 4:* Sobrenadante de CC día 24. B: Rf 22.5; C: Rf 29.4.

*Calle 5:* Sobrenadante de almidón día 24. B: Rf 22.5.

8% aparece una sola banda de Rf 22.5 de peso molecular bastante mayor que 66000 KD como lo demuestran los marcadores de peso molecular utilizados en esta corrida ( ver figura 60).

Nuevamente, al igual que en el caso de la  $\beta$ -D1,4 endoglucanasa, en los últimos días de cultivo, se detecta un mayor número de isoenzimas, ya que para el sobrenadante del día 24 de cultivo se encontraron tres isoenzimas. La aparición de nuevas formas enzimáticas en los últimos días de cultivo, ya ha sido reportado también para la endoxilánasa para *Saccobolus saccoboloides* (Magnelli, 1998) y para *Humicola insolens* (Dürsterhoft et al., 1997) así como para *Aspergillus nidulans* (MacCabe et al., 1997).

En este caso, también se puede sugerir que las nuevas formas enzimáticas, resulten de modificaciones post traduccionales de las primeras formas sintetizadas.

#### R.6.2.2. OTRAS FUENTES DE CARBONO: celulosa cristalina y almidón.

Al sembrar el sobrenadante proveniente de celulosa cristalina del día 24 de cultivo, se encontraron dos bandas de actividad endoxilánasa (figura 60). Estas bandas también resultaron ser las mismas que las obtenidas cuando *A. gamundii* creció en xilano, las de Rf 22.5; Rf 29.4.

Con el sobrenadante proveniente de un cultivo creciendo en almidón, como era de esperar, al haber menor inducción, solo se detectó una banda muy tenue de Rf 22.5.

Al igual que para el sistema celulolítico, cuando se logró la inducción del sistema enzimático por una fuente de carbono diferente a la específica, el número de isoenzimas producidas es menor que las reveladas en el caso de la inducción específica.

### R.6.3.- SISTEMA AMIOLITICO.

#### R.6.3.1.- FUENTE DE CARBONO : almidón.

Para el sistema amilolítico se tomó como sistema de revelado el de la  $\alpha$ -amilasa. Se eligió un gel de poro 5% ( trama laxa) ya que al utilizar uno de poro 8% toda la actividad quedó en el origen, debido al alto peso molecular que poseen estas enzimas.

Al sembrar los sobrenadantes provenientes de un cultivo con almidón como fuente de carbono en un gel de poro 5% se detectó, para los dos días ensayados ( 10 y 24) un misma banda muy ancha y de baja resolución, con un Rf 12 como se ve en la figura 61.

Nuevamente, al igual que en el caso de la  $\beta$ - glucosidasa, debido a la difusión enzimática en el gel, la banda de actividad enzimática se ve deformada y no permite una resolución suficiente como para detectar posibles isoenzimas con Rf cercanos.

#### R.6.3.2.-OTRAS FUENTES DE CARBONO : celulosa cristalina y xilano.

Al sembrar el sobrenadante del cultivo creciendo en celulosa cristalina del día 24, se detectó solamente una banda muy débil de Rf 12.

Cuando se sembró el sobrenadante proveniente de un cultivo con xilano del día 24, no se obtuvo actividad enzimática alguna al revelar para la actividad  $\alpha$ -amilasa (figura 61). La falta de detección de bandas en este caso, concuerda con la baja concentración de esta enzima en este medio de cultivo en los últimos estadios de crecimiento (ver sección 1.4.2. de resultados).

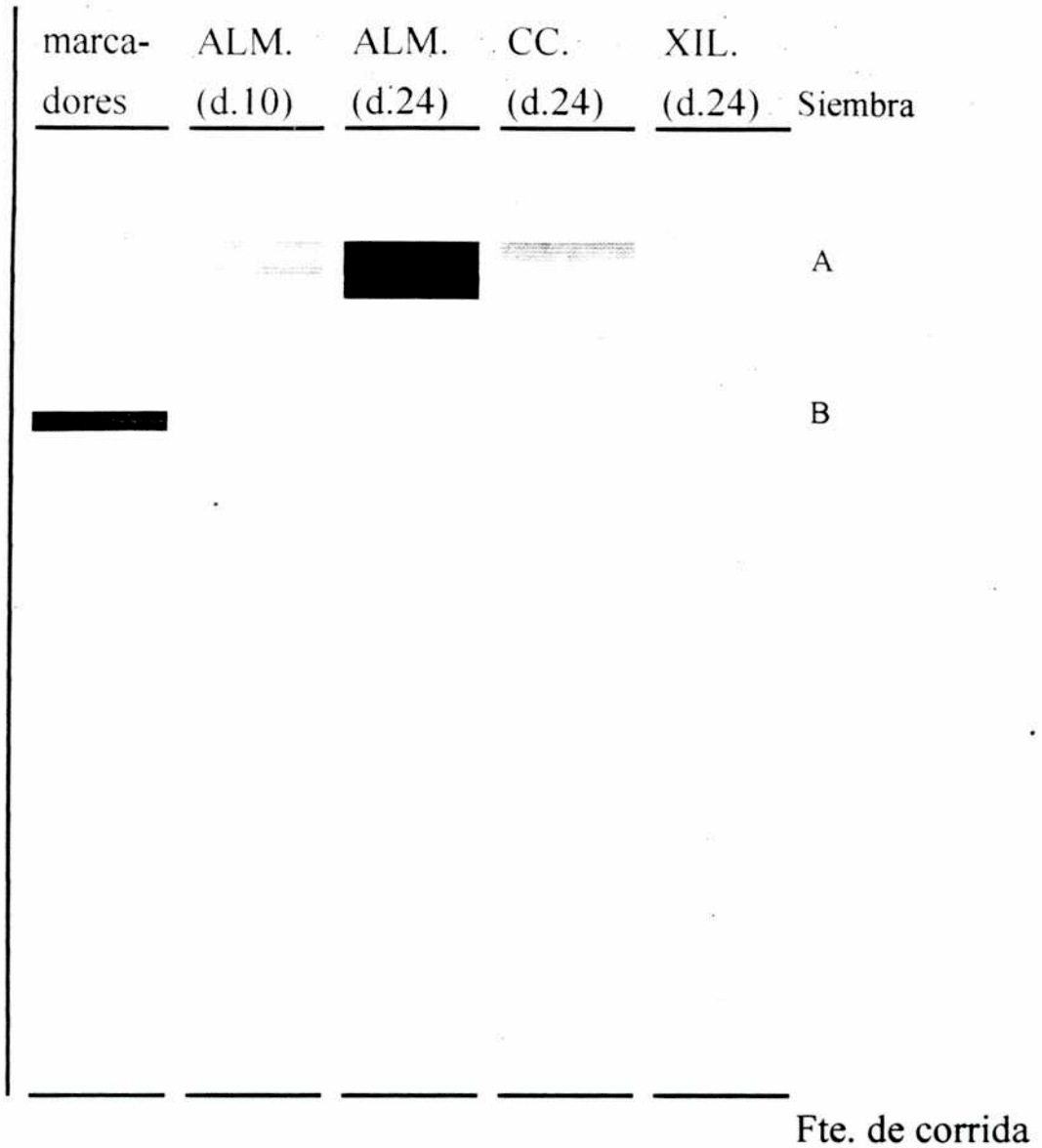
ZIMOGRAMA  $\alpha$ -AMILASA.

Figura 61: Electroforesis en gel de poliacrilamida 5% con SDS.

*Calle 1:* Marcadores de peso molecular. Tinción Coomasie.

B: ureasa (110000) Rf 29.6.

*Calle 2:* Sobrenadante de almidón día 10. A: Rf 12.

*Calle 3:* Sobrenadante de almidón día 24. A: Rf 12.

*Calle 4:* Sobrenadante de CC día 24: A: Rf 12.

*Calle 5:* Sobrenadante de xilano día 24.

## *Conclusiones*

---

### C.1.- CONCLUSIONES.

*Ascobolus gamundii* es un organismo coprófilo efectivo en el reciclaje de los residuos celulósicos y hemicelulósicos del estiércol en el que habita.

Se ha probado "in vitro" que es capaz de sintetizar el complejo celulolítico completo ( $\beta$ -D 1,4 endoglucanasa,  $\beta$ -D 1,4 exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa), ciertas enzimas del complejo xilanolítico (endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasa) y amilasas ( $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas).

Todas las enzimas extracelulares degradativas son inducidas ya que cuando *A. gamundii* crece en un medio con un sustrato complejo (cel. cristalina, xilano, almidón, etc.) como fuente de carbono, su crecimiento se ve retrasado al compararlo con el crecimiento en glucosa (asimilación rápida). Esto se debe a que debe transcurrir cierto tiempo para que las enzimas degradativas se sinteticen "de novo" ante la presencia del inductor.

Todas las enzimas degradativas son inducidas por el sustrato. La inducción de estas enzimas no resultó específica. Basta con la presencia de un sustrato de alto peso molecular como puede ser la celulosa cristalina, el xilano ó el almidón, para que se induzcan las enzimas específicas del sustrato en cuestión así como otras enzimas degradativas, aunque en menor proporción.

Esta inducción generalizada podría ser consecuencia de una adaptación de estos organismos al medio, ya que en la naturaleza tanto la

celulosa, como la hemicelulosa aparecen estrechamente relacionadas formando parte de los desechos vegetales.

Si bien la glucosa es un inhibidor universal por producto de las enzimas degradativas (celulasas, xilanasas, amilasas), en *A. gamundii*, esta inhibición es parcial, ya que existe siempre un nivel basal de dichas enzimas. Este nivel basal de enzimas es el que hace posible la inducción asegurándose de producir el real inductor soluble capaz de penetrar la hifa ante la presencia del sustrato complejo e insoluble.

El sistema celulolítico es inducido preferencialmente cuando en el medio hay celulosa cristalina. Las tres enzimas componentes de este sistema se sintetizan y son liberadas al medio de cultivo. Al crecer en xilano, también son liberadas al medio, pero en menor proporción, especialmente la  $\beta$ -glucosidasa, que casi no es inducida en este medio, pero si es liberada al tener almidón como sustrato.

Las amilasas siguen una cinética similar, ya que en presencia de almidón son fuertemente inducidas. Al crecer en celulosa cristalina o xilano, también se ven inducidas pero en menor proporción.

El sistema xilanolítico es también fuertemente inducido ante la presencia de xilano y en menor proporción frente a celulosa cristalina y almidón.

En los medio con xilano, le endoxilanasas estuvo siempre presente en grandes concentraciones en el medio, mientras que la  $\beta$ -xilosidasa no. La posibilidad de que se encontrara adsorbidas a las paredes de las hifas fue



descartada ya que al ensayar su actividad en diferentes fracciones celulares, el resultado fue siempre muy pobre. Se concluye, por lo tanto, que *A. gamundii* posee una muy baja producción de  $\beta$ -xilosidasa. En la naturaleza, esto podría ser un factor limitante para que pudiera prosperar, ya que limitaría la eficiencia de utilización de sustratos hemicelulósicos, abundantes en el medio en el que vive. Sin embargo, no hay que olvidar que estas enzimas son extracelulares y difunden en el medio, y si bien *A. gamundii* produce muy poca  $\beta$ -xilosidasa, otro organismo colonizador del mismo sustrato podría estar produciéndola, permitiendo que *A. gamundii* prospere. Una segunda posibilidad sería que *A. gamundii* tuviera una permeasa para la xilobiosa, teniendo en cuenta que en los cultivos "in vitro" con xilano como única fuente de carbono, su crecimiento resultó bueno.

En el caso de las enzimas celulolíticas, estas son de ubicación extracelular. Ninguna se encuentra adsorbida a las paredes de las hifas. Se trata de enzimas extracelulares que son exportadas al medio de cultivo fuera de la hifa y luego difunden hacia el sustrato, haciendo efectiva la degradación del sustrato en el que viven.

El crecimiento fue mayor al crecer con glucosa en el medio de cultivo, lógicamente por ser esta la fuente más fácilmente utilizable. Al usar cualquiera de los sustratos complejos el crecimiento, medido como proteínas de micelio, es menor. Este patrón de crecimiento en estos sustratos (menor y retrasado en el tiempo) es muestra del proceso de

adaptación, inducción y síntesis de las enzimas necesarias para utilizar estos sustratos.

La presencia de los sustratos complejos también inhibió la liberación de proteasas al medio al retrasar la fase autolítica. La presencia tardía de glucosa en el medio (producto de la hidrólisis de la celulosa cristalina, xilano, almidón, etc.) retrasa también la autodegradación.

Al elegir un inductor para producir un determinado sistema enzimático, debemos primero aclarar cual es nuestro objetivo final, para luego elegir el que mejor se adapte a nuestro requerimiento.

Si queremos obtener un buen crecimiento y producción enzimática en un mismo paso, deberíamos elegir para *A. gamundii* un medio con celulosa cristalina o el medio combinado. En estos medios, el crecimiento se desarrolla muy bien y se produce una buena inducción enzimática. Este sistema es muy sencillo, pero el problema en este caso, es que el crecimiento se ve retrasado, siendo este el factor limitante.

Si queremos acelerar los tiempos, podemos utilizar cultivos de reemplazo. Crecer el hongo en un medio de crecimiento rápido y una vez obtenida la masa miceliana transferirla a un medio inductor adecuado. En este punto se presentan también dos opciones: i) alta producción de enzimas extracelulares ó ii) baja producción de enzimas extracelulares. En el caso i), tendremos mayores pasos de purificación en el caso de querer extractos puros, una mayor cantidad de enzimas, pero con actividad específica menor. Si este es el caso, el inductor elegido sería el CMC. Si

optamos por la segunda opción, tendremos menor cantidad de proteínas extracelulares, menos pasos de purificaciones y una mayor actividad específica. Esto lo lograríamos utilizando lactosa como inductor.

Utilizando el medio combinado (CC/xilano) los resultados superaron lo esperado ya que tanto el crecimiento como la inducción enzimática superaron los obtenidos en los medios por separado. Estos resultados sugieren que existe una interrelación en la inducción del sistema celulolítico y xilanolítico, que resultaría lógico ya que en la naturaleza la celulosa y el xilano se encuentran en íntima relación formando parte de las estructuras vegetales presentes en el habitat en el que crece *A. gamundii*.

Al variar la fuente de nitrógeno, una fuente de nitrógeno orgánica fue la más eficiente. Los casaminoácidos resultaron ser la mejor opción tanto para la producción de celulasas, como la de xilanasas y amilasas.

La concentración óptima para la inducción del sistema celulolítico es de 1.75 g/l para la endoglucanasa, y de 1.25 g/l para inducir la exoglucanasa y la  $\beta$ -glucosidasa. El máximo crecimiento se obtuvo con 2 g/l en el medio de cultivo. Nuevamente, el diseño del medio de cultivo deberá formularse según el objetivo que uno se proponga alcanzar.

Utilizando asparagina como fuente de nitrógeno se obtuvo una buena inducción, mientras que con las sales de amonio los resultados fueron muy pobres.

La utilización de surfactantes en el medio de cultivo, como el Tween 80 o el carbopol, resulta perjudicial tanto para el crecimiento como para la

producción enzimática de *A. gamundii*. El carbopol inhibe el crecimiento, con la consecuente falta de producción enzimática. El Tween 80, recomendado en otros casos, resulta poco eficiente para *A. gamundii*. Este podría interferir a nivel de membrana, alterando su fluidez y produciendo algún desequilibrio metabólico. Este efecto se produce con cualquier al utilizar cualquier concentración de Tween 80.

Los tres sistema enzimáticos estudiados requieren de la presencia de iones para su funcionamiento. Al tratarse con EDTA, la actividad enzimática de los tres sistemas se ve disminuida. Al adicionarse cationes en exceso, también disminuye la actividad enzimática, así como con el agregado de zinc y manganeso. El calcio favorece la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa y de las amilasas y el magnesio favorece la actividad de la endoxilanasas y las amilasas.

Resumiendo, para formular un medio de cultivo para *A. gamundii*, debemos primero detallar nuestro objetivo y luego comenzar a fijar cada componente según lo aquí estudiado.

Para lograr optimizar las condiciones de reacción de las enzimas estudiadas, se llevó a cabo una caracterización parcial de estas enzimas en el crudo enzimático. Se decidió realizar estas experiencias en el crudo, ya que al no ser *A. gamundii* un sobreproductor de estas enzimas degradativas, su purificación resultaría muy costosa para cualquier uso posible, siendo mucho más efectivo, si se deseara utilizar, tomar el crudo y elegir un medio adecuado de inducción enzimática. Por otra parte dicho

análisis en el crudo enzimático nos daría una mejor idea de cómo se comportan estas enzimas en la naturaleza al actuar "in vivo" sobre su sustrato natural.

Para el sistema celulolítico, las tres enzimas componentes del sistema tienen un pH óptimo de 5 y una temperatura óptima de 50°C y las tres enzimas soportan al menos 10 horas a 50°C, reteniendo un 50% de actividad. Los valores de  $K_m$  y  $V_{el. max.}$  obtenidas están dentro del rango hallado para otros hongos, lo que verifica que si bien no son sobreproductores, su afinidad por el sustrato es similar a las de otros hongos ya estudiados.

Para el sistema xilanolítico, se caracterizó sólo la endoxilanasas. Su pH óptimo resultó ser también 5 y 50°C su temperatura óptima. Esta enzima resultó retener hasta un 50% de actividad enzimática al incubarse hasta 22 horas a 60°C. Su afinidad por el sustrato cae en los valores ya registrados para otros hongos.

Finalmente, para el sistema amilolítico, se caracterizaron sus dos enzimas, la  $\alpha$ -amilasa y la amiloglucosidasa. Para la  $\alpha$ -amilasa, el pH óptimo fue de 6 y la temperatura óptima de 50°C. Esta enzima no resultó ser muy estable a altas temperaturas, ya que perdió 50% de actividad a la hora de incubación a 50°C. Para la glucoamilasa, el pH óptimo fue de 6 y 60°C su temperatura óptima. Esta amilasa tampoco resultó ser termoestable, ya que perdió 50% de actividad al ser incubada solamente

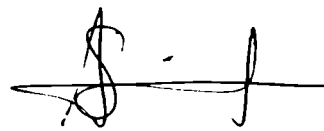
durante 15 minutos a 60°C. Los Km y Vel.max. obtenidos para estas dos enzimas, también caen dentro de los ya reportados para otros hongos.

Los tres sistemas enzimáticos estudiados producen varias isoenzimas para cada componente enzimático en el sistema.

Cada enzima de cada sistema presenta bandas propias características, bien definidas que no se superponen con bandas pertenecientes a otra actividad enzimática. Esto verifica que se trata de enzimas diferentes. La intensidad y cantidad de isoenzimas presentes al inducirse un sistema con un sustrato no específico, (por ejemplo, inducción del sistema celulolítico con xilano), es menor, lo que concuerda con una actividad enzimática medida menor. Por lo tanto, teniendo en cuenta, que las enzimas celulolíticas y las xilanolíticas no comparten bandas electroforéticas y que en medios con menor inducción hay menor intensidad y menor número de bandas, es posible que estas enzimas no presenten actividad enzimática cruzada, es decir que se trataría de enzimas con alta especificidad por su sustrato (recordemos que su Km es el esperado para estas enzimas), rechazándose la posibilidad de que las enzimas celulolíticas presenten actividad xilanolíticas o viceversa.

En cuanto a su regulación, si bien no se ha podido confirmar en este trabajo, para *A. gamundii*, los sistemas enzimáticos extracelulares se pueden inducir, tanto con el polímero específico, como con otros, así como con ciertos dímeros. Esta inducción no específica es generalmente menor a la específica. Con estos datos, pareciera que estos sistemas enzimáticos

tienen, no solo algún producto de hidrólisis en común, sino que estarían regulados de forma sincrónica. Esta apreciación no resulta sorprendente, si tenemos en cuenta que el habitat de *A. gamundii* es el estiércol de herbívoros, donde los residuos vegetales (principalmente restos de paredes vegetales), que son su principal fuente de carbono, contienen celulosas y hemicelulosas en íntima relación. La degradación de la celulosa no sería la máxima si este hongo no pudiera sintetizar a la vez enzimas hemicelulolíticas.



LIC. ANDREA SIVORI



*Bibliografia*

---



**B.1.- BIBLIOGRAFIA**

- ◆ ABOUT ZEID, A. M. 1997. Production, purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*. Microbios 89(358): 55-56.
- ◆ ALBERSHEIM, P. 1976. The primary cell wall. En: Plant biochemistry. Bonner & Vanner (Eds). Academic Press, NY.
- ◆ ALCONADA MAGLIANO, M. T. 1992. Enzimas de *Fusarium oxysporum fsp. Melonis* involucradas en la degradación de la pared celular de las plantas superiores. Tesis doctoral- F.C.E.N. U.B.A.
- ◆ ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. 1996. Introductory mycology. Wiley Eds. USA.
- ◆ AMADIOHA, A. C. 1993. Production of cellulolytic enzymes by *Rhizopus oryzae* in culture and *Rhizopus*-infected tissues of potatoe tubers. Mycologia 85: 574-578.
- ◆ AKIBA, S.; KIMURA, Y.; YAMAMOTO, K.; KUMAGAI, H. 1995. Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. J.Ferment.Bioeng. 79(2): 125-130.
- ◆ ANTRANIKIAN, G.1992. Microbial degradation of starch. En: Microbial degradation of natural products. Winkelmann (Ed). Eeiheim, Germany.
- ◆ BAGGA, P.,S.; SANDHU, D., K.; SHARMA, S. 1990. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. J. Appl. Bacteriol. 68:61-68.
- ◆ BAJPAI, P. 1997. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. Adv.Appl.Microbiol. 43:141-194.
- ◆ BANJU, R.K. ; VITHAYATHIL, P. J. ; MURTHY, S. K. 1990. Factors influencing production of cellulases by *Chaetomium thermophile var. Coprophile*. Indian J. Exper. Biol. 28(3) :250-264.
- ◆ BAO, W.; USHA, S. N.; RENGANATHAN, V. 1993. Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel hemoflavoenzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Arch.Biochem.Biophys. 300: 705-713.
- ◆ BEGUIN, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. Ann.Rev.Microbiol. 44: 219-248.
- ◆ BHAT, K. M.; GAIKWAD, J. S.; MAHESHWARI, R. 1993. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* and its influence on cellulase activity. J. Gen. Microbiol. 139: 2825-2832.
- ◆ BIELY, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends. Biotechnol. 3:286-290.

- ◆ BIELY, P. 1993. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. En: Hemicellulose and hemicellulases. pp.29-52. Coughland & Hazlewood (Eds). Portland Press, London.
- ◆ BLACKWELL, J. 1982. The macromolecular organization of cellulose and chitin. En: Cellulose and other natural polymer systems. Biogenesis, structure and degradation. Brown(Ed). Plenum Press, NY.
- ◆ BISARIA, B., S.; GHOSE, T., K. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Biotechnol.* 3:90-104.
- ◆ 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.; BUSWELL, J.; CHANG, S. 1998.  $\beta$ -glucosidase component of the cellulolytic system of the eadible mushroom *Volvariella volvacea*. *Enz. Microb. Technol.* 22: 122-129.
- ◆ CAI, Y.; CHAPMAN, S.; BUSWELL, J. 1999. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase and  $\beta$ -glucosidase components of the celluloytic system of *Volvariella volvacea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2): 553-559.
- ◆ CALZA, R. E. 1991. Carbon source, cyclic nucleotids and protein inhibitor effects on protein and cellulase secretions in *Neocallimastix frontalis EB188*. *Curr. Microbiol.* 22(4): 213-219.
- ◆ CANEVASCINI, G.; FRACHEBOUD, D.; MEIER, H. 1983. Fractionation and identification of cellulases and other extracellular enzymes produced on *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile* during growth on cellulose or cellobiose. *Can. J. Microbiol.* 29: 1071-1080.
- ◆ CANEVASCINI, G. ; GATTLEN, C. 1981. A comparative investigation of various cellulase assay procedureds. *Biotechnol. Bioeng.* 23 :1573-1590.
- ◆ CARLILE, M. J. 1995. The success of the hyphae and mycelium. En: The growing fungus. Grow & Gadd (Eds). Chapman & Hall, London.
- ◆ CHARNEY, J. ; TOMARELLI, R. M. 1947. A colorimetric method for the determination of proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.* 171 :501-505.
- ◆ CHAUDHARI, K. ; SAHAI, V. 1993. Production of cellulase enzyme from lactose in batch and continuous cultures by a partially constitutive strain of *Trichoderma reesei*. *Enz. Microbiol. Technol.* 15(6) :513-518.
- ◆ CHAUDHARI, K. ; TAURO, P. 1990. Comparative studies on growth and cellulase synthesis in *Trichoderma viride* strains. *Environ. Ecol.* 8(3) :984-988.

- ◆ CHAVEZ, V. M. G. ; SILVA, D. O. ; BRUNES, W. ; MOREIRA, M. A. 1989. Cellulolytic activity of *Humicola sp.* Rev. Microbiol. 20(4) :460-465.
- ◆ CHEN, C. ; CHEN, J. L.; LIN, T., Y. 1997. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosacchride production. Enzyme Microbial Technol. 21(2):91-96.
- ◆ CHEN S ; WAYMAN, N. 1992. Novel inducers derived from starch for cellulase production by *Trichoderma reesei*. Process Biochem. 27(6) :327-334.
- ◆ COHEN, B. L. ; DRUCKER, H. 1977. Regulation of exocellular protease in *Neurospora crassa* : induction and repression under conditions of N-starvation. Arch. Biochem. Biol. 182 :601-613.
- ◆ CONRAD, D. ;NOETHEN, W. 1984. Hydrolysis of xylodextrins (DP2-6) by xylanolytic enzymes of *Aspergillus niger*. Proc. 3<sup>rd</sup> Eur. Cong. Biotechnol. Vol. 2 Verlag Chemie, Weinheim pp.169-177.
- ◆ COOPER, R. M. ; WOOD, R. K. S. 1973. Induction of synthesis of extracellular wall degrading enzymes in vascular wilt fungi. Nature 246 :309-311.
- ◆ COTORAS, M. ; AGOSIN, E. 1992. Regulatory aspects of endoglucanase production by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. Exp. Mycol. 16 :253-360.
- ◆ COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. 1993.  $\beta$ -1,4-D-xylan degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. Biotechnol. Appl. Biochem. 17: 259-289.
- ◆ COUGHLAN, M., P.; LJUNGDAHL, L., G. 1988. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. En: Biochemistry and genetics of cellulose degradation.43<sup>o</sup> FEMS Symposium. Aubert, Beguin y Millet (Eds), AP, NY.
- ◆ DEKKER, R. F. H. 1986. Induction localization and characterization of  $\beta$ -glucosidases produced by a species of *Aspergillus niger*. J. Gen. Microbiol. 127:177-184.
- ◆ DENNISON, D. A.; KOHEN, R. D. 1978. Cellulase activity of *Poria oedipus*. Mycologia 69: 592-603.
- ◆ DOCKMETZIAN, D.; RANALLI, M. E. 1995. Estudio sistemático y biológico de les Ascobolaceas de la Argentina. XV. Dos nuevas especies de Ascobolus. Physis Secc. C. 50(118-119):1-10.
- ◆ DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. Biores.Technol.55:1-33.
- ◆ DURSTERHOFT, E., M.; LINSSEN, V.; VORAGEN, A.; BELDMAN, G. 1997. Purification, characterization and properties of two xylanases from *Humicola insolens*. Enzyme and Microbial Techn. 20(6): 437-445.

- ◆ ERIKSSON, K. E.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood componenets. Springer-Verlag, NY.
- ◆ ERIKSSON, K. E.; HABU, N.; SAMEJIMA, M. 1993. Recent advances in fungal cellobiose oxidoreductase. J. Ferment. Bioeng. 75(6): 399-404
- ◆ ESAU, K. 1977. Anatomy of seed plants. J. Wiley & Sons (Eds). NY.
- ◆ FOGART, W.; KELLY, C. 1979 . Starch degrading enzymes of microbial origin. Progress in industrial microbiol. 15: 87-102.
- ◆ FORCHIASSIN, F; DIORIO, L.. A. 1994. Crecimiento y pérdida de fertilidad en *Saccobolus platensis*. Physis (B.A) Sec.C, 49(116-117): 61-66.
- ◆ FREER, S.; GREENE, R. 1989. Transport of glucose and cellobiose by *Candida wickerhami* and *Clavispora lusitaniae*. J. Biol. Chem. 265:12864-12868.
- ◆ FREY WYSSLING. A. 1976. The plant cell wall. En: Handbuch der planzenanatomic(3). Gebrüder Borntrager, Berlin.:
- ◆ FRITSCHER, C. ; MESSNER, R. ; KUBICEK. C. P. 1990. Cellobiose metabolism and cellobiohydrolase I biosynthesis by *Trichoderma reesei*. Exp. Mycol. 14(4) :405-415.
- ◆ FUHRAM, G. F. ; ROTHSTAIN, A. 1968. Transport on Zinc, cobal and nickel into yeasts cells. Biochem. Biophys. Acta 163 : 325-330.
- ◆ GALVAGNO, M. A. 1976. Ensayos de nutrición en *Ascobolus crenulatus*. P. Karst (Fungi : Ascomyucetes). Bol. De la Soc. Arg. De Bot. 17(1-2)95-118.
- ◆ GAMERITH, G., R.; GROICHER, R.; HERZOG, S.; KUBICEK, C., P. 1992. Cellulases-poor xylanases produced by *Trichoderma reesei* RUT C30 on hemicellulase substrates. Appl. Microbiol. Technol. 38:315-322.
- ◆ GARRAWAY, M. O. ; EVANS, R. C. 1984. Fungal nutrition and physiology. Willey & sons (Eds.) N. Y. 401 pp.
- ◆ GIELKENS, M., M.,C.; DEKKERS, E.; VISSER, J.; GRAAF, L., H. 1999. Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XIn R for their expression. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4340-4345.
- ◆ GOMEZ, D. J.; STEINER, W. 1993. Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurianticus* and partial characterization of the enzyme. J. Biotechnol. 37:11-22.
- ◆ GONG, G.; SAVCHENKO, C.; SHUI, T. 1977. Cellulase system of *Trichoderma reesei*. Acta Microbiol. 15: 355-367.

- ◆ GONG, G.; VIEILLE, C.; SAVCHENKO, A.; ZEIKUS, J. 1997. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding extracellular alpha-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9):3569-3576.
- ◆ GRIFFIN, D. H. 1966. Effect of electriles in differentiation in *Achlya sp.* *Plant Physiol.* Willey & sons (Eds.) N. Y. 383 pp.
- ◆ GRIFFIN, D. H. 1981. *Fungal physiology.* Willey & sons (Eds.) N. Y. 383 pp.
- ◆ HALLIWELL, G. ; LOVELADY, J. 1981. Utilization of carboxymethylcellulose and enzyme synthesis by *Trichoderma koningii*. *J. Microbiol.* 126 :211-217.
- ◆ HALTRICH, D.; PREISS, M.; STEINER, W. 1993. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum comune*. *Enzyme Microb. Technol.* 15:854.860.
- ◆ HASKA, N.; OHTA, Y. 1994. Purification and properties of the raw starch digesting amylase from *Penicillium brunneum N°24*. *Starch* 46(12):480-485.
- ◆ HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on aminoacid sequence similarities. *Biochem.J.* 293: 781-788.
- ◆ HOLTZAPPLE, M. ; KOGNATA, M. ; SHU-YUANCAI ; HENDRICKSON, C. 1990. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulases by sugars and solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 36(3) :275-287.
- ◆ HONDA, H.;KUDO, T.; HORIKOSHI, K. 1985. Fugal exozymes. *J.Bacteriol.* 161: 784-790.
- ◆ HRMOVA, M.; BIELY, P.; VRSANKA, M. 1989. Cellulose and xylan degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* 11:610-616.
- ◆ HRMOVA, M.; BIELY, P.; VRSANKA, M. 1995. Specificity of cellulase and B-xylanase induction in *Trichoderma reesei QM9414*. *Arch. Microbiol.* 144: 307-311.
- ◆ HRMOVA, M.; PETRAKOVA, E.; BIELY, P. 1991. Induction of cellulose and xylan degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo and hetero-disaccharides composed of glucose and xylose. *J. Gen. Microbiol.* 137:541-547.
- ◆ HUANG, L.; HSEU, T., H.; WEY, T.,T. 1991. Purification and characterization of an endoxylanase from *Trichoderma koningii G-39*. *Biochem. J.* 278: 329-333.
- ◆ HUBBARD, M. M.; BRADLEY, P.; SULLIVAN, M.; SHEPHERD, I.; FORRESTER, L. 1982. Evidence of the occurrence of calmodulin in yeasts *Candida albicans* and *Saccharomyces cereviceae*. *FEBS Lett.* 317:85-88.

- ◆ HUMPHREY, A. E.; MOREIRA, A.; ARMINGER, W.; ZABRISKIE, D. 1977. Production of single cell protein from cellulose waste. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 7:45-64
- ◆ JENNINGS, D. H. 1995. Carbon polymer utilization (Chapter 5C). En: *The physiology of fungal nutrition*. Cambridge Univ. Press..
- ◆ JOGLEKAR, A. U. ; KARANTH, N. G. 1984. Studies on cellulase production by the mutant *Penicillium funiculosum UU-49*. *Biotechnol. Bioeng.* 26 : 11079-1084.
- ◆ JOHN, M.; SCHMIDT, J. 1988. Xylanases and  $\beta$ -xylosidases from *Trichoderma lignorum*. *Methods in Enzym.* 160:663-671.
- ◆ JOSELEAU, J. P.; RUEL, K. 1994. Wood polysaccharides and their degradation by fungi. En: *Host wall alterations by parasitic fungi*. Pp.45-65. Petrini & Ouelette (Eds). APS Press, Minnesota.
- ◆ KHOO, S. L.; AMIRUL, A. A.; KAMARUZAMAN, M.; AZIZAN, M. N. 1994. Purification and characterization of  $\alpha$ amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia microbiológica* 39(5): 392-398.
- ◆ KIRK, T. K. 1983. Degradation and conversion of lignocelluloses. En: *The filamentous fungi*. Pp.266-295. Smith, Berry&Kristiansen (Eds). London.
- ◆ KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. 1987. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:465-505.
- ◆ KLEMAN LEYER, K,; AGOSIN, E.; CONNER, A. H.; KIRK, T. K. 1992. Changes in molecular size distribution of cellulose during attack of white-rot fungi and brown-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1266-1270.
- ◆ KORMELINK D.; HUANG, T. S. 1993. Degradation of hemicelluloses by filamentous fungi. *Acta Microbiol.* 45: 798-812.
- ◆ KUBICEK, C. P. ; MESSNER, R. ; GRUBER, F. ; MANDELS, M. ; PRANZ, E. M. 1993. Triggering of cellulase biosynthesis by *Trichoderma reesei*. Involvement of a constitutive, sophorose inducible, glucose inhibited  $\beta$ -D-glucosyl permease. *Journal Biol. Chem.* 268(26) 19364-19368.
- ◆ KUHAD, R. C.; KUMAR, M.; SINGH, S. 1994. An hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Letts. Appl. Microbiol.* 19(5): 397-400.
- ◆ LABUDOVA, I.; FARKAS, V. 1983. Multiple enzyme forms in the cellulase system of *Trichoderma reesei* during its growth on cellulose. *Biochem. Biophys. Acta* 744: 135-140.
- ◆ LACHKE, A. H. 1986. Isolation of hypercellulolytic mutant CU-1 of *Penicillium funiculosum*. *Enzyme Microbiol, Technol.* 8: 105-108.

- ◆ LAYMON, R. A.; ADNEY, W.; MOHAGHEGHI, A.; HIMMEL, M.; THOMAS, S. R. 1996. Cloning and expression of full length *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I cDNA's in *Escherichia coli*. Appl.Biochem.Biotechnol. 57-58: 389-397.
- ◆ LEVIN, L. N. 1998. Biodegradación de materiales lignocelulósicos por *Trametes trogii* (Aphyllophorales, Basidiomycetes). Tesis Doctoral. FCEN, Universidad de Bs. As.
- ◆ LEVIN, L., N.; 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.; FORCHIASSIN, F. 1998. Influence of growth conditions on the production of xylanolytic enzymes by *Trametes trogii*. World Journ. of Microbiol. & Biotechnol. 14: 443-446.
- ◆ LEVIN, L N.; SIVORI, A. S.; PARDO, A. G. 1996. Actividad celulolítica de hongos coprófilos. Rev.Arg. Microbiol. 28: 132-138.
- ◆ LINDBERG, B. ; ROSSEL, K. G. ; SVENSSON, S. 1973. Positions of O-acetyl groups i birch xylan. Svensk Papperslidn 76 :30-32.
- ◆ LILLY, V. G. ; BARNETT, H. L. 1953. The utilization of sugars by fungi. W. Va. Univ. Agr. Expt. Sta. Bull 362T 58 pp.
- ◆ LIMA, C.E. ; MERCURI, O. A. 1984. Ensayos de nutrición en *Ascobolus furfuraceus*. Fuentes de nitrógeno. Rev. Arg. Microbiol. 6 (4) : 233-244
- ◆ LODHA, B. C. 1974. Decomposition of digested litter. In: Dickinson, C. H.& Pugh, G. F. H. (Eds) Biology of plant litter decomposition. A. P. NY.
- ◆ LUSIS, A. J. ; BECKER, R. R. 1973.  $\beta$ -glucosidase from *Chaetomium thermophile*. Biochimica et Biophysica Acta 329 :5-16.
- ◆ LYMAR, E. S.; RENAGATHAN, V. 1995. Purification and characterization of a cellulose binding  $\beta$ -glucosidase from cellulose degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 61(8): 2976-2980.
- ◆ MacCABE, A., P.; OREJAS, M.; PEREZ GONZALEZ, A.; RAMON, D. 1997. Journal of Bacteriol. 180(5): 1331-1333.
- ◆ MACH, R.; SEIBOTH, L.; MYASNIKOV, A.; GONZALEZ, R.; STRAUSS, J.; HARKKI,S.; KUBICEK,C. P. 1995. The bgl1 gene of *Trichoderma reesei* QM9414 encodes an extracellular, cellulose inducing  $\beta$ -glucosidase involved in induction by sophorose. Mol. Microbiol 16(4): 687-697.
- ◆ MAGASAMK, B. 1961. Catabolite repression. Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology. 26 : 249-256.
- ◆ MAGNELLI, P. E. 1998. Regulación de la producción del sistema celulolítico por *Saccobolus saccoboloides*. Tesis Doctoral de la FCEN- UBA.

- ◆ MAGNELLI, P. E.; FORCHIASSIN, F. 1999. Regulation of cellulase complex production by *Saccobolus saccoboloides*: induction and repression by carbohydrates. *Mycologia* 91: 359-364.
- ◆ MAGNELLI, P. E.; MARTINEZ, A.; MERCURI, O. A. 1997. Método simple para determinar actividad celulolítica en hongos. *Rev. Arg. Microbiol.* 29: 210-214.
- ◆ MAGNELLI, P. E.; RAMOS, A. M.; FORCHIASSIN, F. 1996. Factors influencing cellulase production by *Saccobolus saccoboloides*. *Mycologia* 88: 249-255.
- ◆ MAIJALA, S. T.; REILLY, G. S. 1995. Characterisation and expression of cellulases from *Trichoderma reesei*. *J. Bacteriol.* 345:55-68.
- ◆ MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6:21-33.
- ◆ MANDELS, M. ; REESE, E. T. 1957. Induction of cellulases in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *Journal Bacteriol.* 73 :269-278.
- ◆ MANDELS, M. REESE, E. T. 1960. Induction of cellulases in fungi by cellobiose. *Journal Bacteriol.* 114 : 1-7.
- ◆ MANDELS, M. ; WEBER, J. 1969. The production of cellulases. In cellulases and their applications, R. F. Gould (Ed.) *Adv. Chem. Ser.* 95 Am. Chem. Soc. Washington DC pp391-414.
- ◆ MANNING, K. ; WOOD, D. A. 1983. Production and regulation of extracellular endocellulases by *Agaricus bisporus*. *Journal of Gral. Microbiol.* 129 : 1839-1847.
- ◆ MANJUNATH, P. ; SHENOY, B. C. ; RAGHAVENDRA RAO, M. R. 1983. Fungal glucoamylases. *Journal of Applied Biochem.* 5 :235-260.
- ◆ MARKHAM, P.; BAZIN, M. J. 1991. Decomposition of cellulose by fungi. En: *Handbook of applied mycology.* Vol.1. pp.379-424. Arora, Rai, Mujerki & Knudsen (Eds). M. Dekker Inc., NY.
- ◆ McHALE, A. ; COUGHLAN, M.P. 1981. The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*. Identification of various components produced during growth on cellulosic media. *Biochim. et Biophys. Acta* 662 : 145-161.
- ◆ MERCURI, O. A. 1987. Degradación biológica de celulosa por *Ascobolus furfuraceus*. Tesis Doctoral F.C.E.N. - U.B.A.
- ◆ MERCURI, O. A. 1996a. Efecto del ión bicarbonato sobre la degradación de celulosa por *Ascobolus furfuraceus* (Fungi,Ascomycotina). *Rev.Arg.Microbiol.* 31: 221-224.
- ◆ MERCURI, O. A. 1996b. Cinética de crecimiento y degradación de celulosa por *Ascobolus furfuraceus* (Fungi,Ascomycotina). *Rev.Arg.Microbiol.* 31: 173-175.



- ◆ MERCURI, O. A. 1996 c. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la degradación de celulosa cristalina por *Ascobolus furfuraceus* (Fungi,Ascomycotina). Physis secc.C 52: 1-6.
- ◆ MERCURI, O. A.; DIORIO, L. A. 1995. Evaluación de la capacidad celulolítica de *Ascobolus furfuraceus* (Fungi,Ascomycotina). Rev.Arg.Microbiol. 27: 130-138.
- ◆ MESSNER, R. ; KUBICEK, C. P. 1991. Carbon source control of cellobiohydrolase I and II by *Trichoderma reesei*. Appl. Environ. Microbiol. 57(3) : 630-635.
- ◆ MICLETZBY, B.; STEINER, W.; CLAEYSSENS, M. 1994. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *T. reesei*: adsorption of two cellobiohydrolasas, two endocellulasas and their core proteins. Journal of Biochem. 303: 817-823.
- ◆ MISHRA, R. S.; MAHESHWARI, R. 1996. Amylases of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Their purification, properties, action on starch and response to heat. J. of Biosciences (Bangalore) 21(5): 653-672.
- ◆ MISHRA, R. S.; RAO, S.; DEB, J. K. 1989. Isolation and characterization of a mutant of *Trichoderma reesei* showing reduced levels of extracellular  $\beta$ -glucosidase. J.Gen.Microbiol. 135: 3459-3465.
- ◆ MOHAPATRA, B. R.; BANERJEE, U. C.; BAPUJI. M. 1998. Characterization of a fungal amylase from *Mucor sp.* associated with the marine sponge *Spirastrella sp.* J. of Biotechnol. 60(1-2): 113-117.
- ◆ MORRIN, M.; WARD, O. P. 1990.. Relationship between fungal growth, morphology and fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus*. Mycol. Res. 94: 505-510.
- ◆ MORRISON ,M. ; MACKIE, R. I. ; KISTNER, A. 1990. Evidence that cellulolysis by anaerobic rumial fungus is catabolite regulated by glucose, cellobiose and soluble starch. Appl. Environ. Microbiol. 56(10) : 3227-3229.
- ◆ MURAI, T.; UEDA, M.; ATOMI, H.; SHIBASAKI, Y.; KAMASAWA, N.; OSUMI, N.; KAWAGUCHI, T.; ARAI, M.; TANAKA, A. 1997. Genetic immobilization of cellulase on the cell surface of *Saccharomyces cereviceae*. Appl.Microbiol.Biotechnol 48: 499-503.
- ◆ NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biochem. 153: 375-380.
- ◆ NISIZAWA, T. ; SUZUKI, H. ; NISIZAWA, K. 1972. Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. Journal of Biochem. 71 : 999-1007.
- ◆ OGUNTMEIN, G. B.; MOO-YOUNG, M. 1991. Production and properties of  $\beta$ -glucosidases by *Neurospora sitophila*. World J. Microbiol. Biotechnol. 7:4-11

- ◆ OHNO, N.; IJUN, T.; SONG, S.; UCHIJAMA, S.; SHINOYAMA, H.; ANDO, A.; FUYI, T. 1992. Purification and properties of amylases extracellularly produced by an imperfect fungus *Fusidium* sp. in a glycerol medium. *Biotechnol. Biochem.* 56(3): 465-471.
- ◆ OKADA, H.; TADA, K.; SEKIYA, T.; et al. 1998. Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular-mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414. *Applied and Environm. Microbiol.* 64(2): 555-563.
- ◆ OKOSHI, A.; KUDO, T.; MASE, T.; HORIKOSHI, K. 1985. Production, isolation and partial purification of xylanases from *Trichoderma* sp. *Agric. Biol. Chem.* 49: 3037.-3043.
- ◆ OLASUPO, N. A.; TENIOLA, O. D.; OKOSUN, R.; OLATOPE, S. O. 1996. Studies on an amylolytic starin of *Saccharomyces cereviceae* isolated from yam tuber. *J. of basic Microbiol* 36/4): 283-288.
- ◆ ORTEGA, J. 1985. Some characteristics of the cellulases of *Aspergillus candidus*. *Biotechnol. Lettres* 7(2) : 109-112.
- ◆ OSAGIE, I. J. ; OBUEKWE, C. O. 1991. Extracellular hydrolytic enzyme production by pathogenic strains of *Fusarium oxysporus* f sp. *elaeidis*. *Mycol. Res.* 95(1) : 116-122.
- ◆ PARDO, A. G. 1995 Estudio fisiológico sobre la producción del sistema celulolítico de *Nectria catalinensis* in vitro. Tesis Doctoral. FCEN. Universidad de Bs. As.
- ◆ PARDO, A. G.; FORCHIASSIN, F. 1993. Estudios nutricionales en *Ascobolus biguttulatus*. Crecimiento vegetativo. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 29: 233-239.
- ◆ PARDO, A. G. ; FORCHIASSIN, F. 1995. Efecto de los cationes sobre la producción y la actividad del sistema celulolítico de *Nectria catalinensis* (fuga : Ascomycetes). *Bol. Soc. Arg. Bot.* 30(3-4) : 137-148.
- ◆ PARDO, A., G.; FORCHIASSIN, F. 1998. Influence of different cultural conditions on cellulase production by *Nectria catalinensis*. *Rev. Arg. Microbiol.* 30:20-29.
- ◆ PARDO, A., G.; FORCHIASSIN, F. 1999 a. Factors influencing  $\beta$ -glucosidase production, activity and stability in *Nectria catalinensis*. *Folia Microbiol.* 44(1):71-76.
- ◆ PARDO, A. G; FORCHIASSIN, F. 1999 b. Influence of temperature and pH on cellulase activity and stability in *Nectria catalinensis*. *Rev. Arg. Microbiol.* 31: 31-35.
- ◆ PARDO, A. G.; SIVORI, A. S.; RANALLI, M. E. 1997. Comparative study of cellulolytic enzyme zymograms of species of *Thecotheus* and *Iodophanus* ( Pezizales-Ascomycetes). *Mycotaxon* 63: 269-286.
- ◆ PEELER, T. C.; MULLINS, J. 1982. Nitrogen nutrition in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Mycologia.* 74: 334-337.

- ◆ PITT, D. M. ; UGALDE, V. O. 1983. Morphology and calcium induced conidiation of *Penicillium cyclopium* in submerged cultures. Trans. Br. Mycol. Soc. 80 :319-325.
- ◆ POUTANEN, K.; PULS, J. 1989. Mechanisms of enzymatic hydrolysis of hemicellulases (xylans) and procedures for determination of the enzyme activities involved.. En Enzyme systems for lignocellulose degradation. Pp. 151-157. Coughlan Ed. London.
- ◆ PULS, J.; SCHUSEIL, J. 1993. Chemistry of hemicellulose: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. En: Hemicellulose and hemicellulases. pp1-28. Coughlan & Hazlewood (Eds). Portland Press, London.
- ◆ RAMOS, A. M. 1994. Desarrollo de *Saccobolus longevisorus* (Fungi, Ascomycete) con distintas fuentes de nitrógeno. Bol. Soc. Arg. Bot. 30(1-2): 71-76.
- ◆ RAMOS A. M.; FORCHIASSIN F. 1996 a. Producción de amilasas en cuatro especies del género *Saccobolus* (Fungi, ascomicetes). Bol.Soc.Arg.Bot. 31(3-4): 217-220.
- ◆ RAMOS, A.M.; FORCHJASSIN, F. 1996 b. Producción de endoglucanasas en cuatro especies del género *Saccobolus*. Rev.Arg.Microbiol. 28: 55-62.
- ◆ RAY, R., R.; CHAKRAVERTY, R. 1998. Extracellular  $\beta$ -amylase from *Syncephalastrum racemosum*. Mycol. Res, 102(12): 1563-1567.
- ◆ REESE, E. T. 1960. Degradation of polimeric carbohydrates by microbial enzymes; Recent advances in Phytochem.11 :311-365.
- ◆ REESE, E. T. 1977. Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. Rec. Adv. Phytochem. 11: 311-365.
- ◆ RHO, D. ; DESROCHERS, M. ; JURASEK, L. ; DRIGUEZ, H. ; DEFAYE, J. 1982. Induction of cellulases in *Schizophyllum comune*: thiocellobiose as a new inducer. J. Bacteriol. 149 : 47-53.
- ◆ ROBYT, J. F. 1984. Enzymes in the hydrolysis and synthesis of starch. In Starch, Chapter 4, 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, London.
- ◆ ROEPER, R. A.; FRENCH, J. R. 1981. Growth of the ambrosia fungus *Ambrosiella hartigii* on various nitrogen sources. Mycologia 73: 202-204.
- ◆ ROSS, I. 1975. Some effects of heavy metals on fungal cells. Trans. Br. Mycol. Soc. 64: 175-193.
- ◆ ROY, B. P.; PAICE, M. G.; ARCHIBALD, F. S.; MISRA, S. K.; MISIAK, L. E. 1994. Creation of metal-complexing agents, reduction of manganese dioxide and promotion of manganese peroxidase mediated Mn(III) production by cellobiose: quinone oxidoreductase from *Trametes versicolor*. J.Biol.Chem. 269: 19745-19750.

- ◆ ROYER, J. C. ; NAKAS, J. P. 1989. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. Enzyme Microbiol. Technol. 11(7) :405-410.
- ◆ ROYER, J. C.; NAKAS, J. P. 1990. Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2535- 2539.
- ◆ RYU, D., D., Y.; MANDELS, M. 1979. Cellulase: biosynthesis and applications. Enzyme Microbiol. Technol. 2:91-101.
- ◆ SAAD, J. ; TAJ - ALDEEN. 1993. Effect of starch on the induction of  $\beta$ -glucosidase in *Trichoderma reesei*. Mycol. Res. 97(3) :318-320.
- ◆ SACHLEHNER, A.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.; HALTRICH, D. 1998. Induction of mannanase, xylanase and endoglucanase activities in *Sclerotium rolfii*. Appl. Environ. Microbiol. 64(2): 594-600.
- ◆ SALOHEIMO, M.; NAKARI-SETALA, T.; TENKANEM, M.; 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.
- ◆ SANDHU, D., K.; KALRA, M., K. 1985. Effect of cultural conditions on production of cellulases by *Trichoderma longibrachiatum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 84:251-258.
- ◆ SANYAL, A.; KUNDU, R., K.; SINHA, S., N.; DUBE. D., K. 1988. Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus*: effect of different carbon sources. Enzyme Microbiol. Technol. 10:85-90.
- ◆ SASTRY, S. K. ; ADIGA, V. ; VENKATSUBRA - MANYAM, SAUMA, P.S. 1962. Interrelationships in trace elements and metabolism and metal toxicities in *Neurospora crassa*. J. Biochem. 85 : 486-491.
- ◆ SCHAFFNER, D. W. ; TOLEDO, R. T. 1991. Cellulase production by *Trichoderma reesei* when cultured on xylose based media supplemented with sorbose. Biotechnol. Bioeng. 37(1) :12-16.
- ◆ SCHULEIN, M. 1997. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. J. Biotechnol. 57 (1-3): 71-81.
- ◆ SENGUPTA, S. 1990. Regulation by aminoacids of  $\alpha$ -amilase and endo  $\beta$  1-4 glucanase induction in mycelial culture of the mushroom *Termytomyces clypeatus*. Can. J. Microbiol. 36 (9) : 617-624.
- ◆ SENIOR, D. J. ; MAYERS, P. R. ; SADDLER, J. N. 1989. Xylanase induction by *Trichoderma harzianum* E58. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32(2) :137-142.
- ◆ SHARROCK, K. R. 1988. Cellulase assay methods : a review. J. Biochem. Biophys. Methods. 17 :81-106.

- ◆ SHEWALE, J. G. ; SADANA, J. C. 1978. Cellulase and  $\beta$ -glucosidase production by a basidiomycete species. *Can. J. Microbiol.* 24 : 1204-1216.
- ◆ SINGH, S.; BRAR, J. K.; SANDHU, D. K.; KAUR, A. 1996. Isozyme polymorphism of cellulases in *Aspergillus terreus*: *J. Basic Microbiol.* 36(4): 289-296.
- ◆ SIVORI, A. S.; MERCURI, O. A.; FORCHIASSIN, F. 1996. Cinética de producción de xilanasas y celulasas por *Ascobolus gamundii* (Fungi, Ascomycotina). *Rev.Arg.Microbiol.*28: 9-15.
- ◆ SJÖSTRÖM, E. 1993. Wood chemistry. Fundamentals and applications. Academic Press, NY.
- ◆ SMILEY, K. L. ; HENSLEY, D. E. ; SMILEY, M. J. ; GASDORF, M. J. 1971. *Arch. Biochem. Biophys.* 144 : 694-699.
- ◆ SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195:19-23.
- ◆ SPREY, B.; LAMBERT, C. 1983. Tritation curves of cellulases from *Trichoderma reesei*: demonstration of a cellulase-xylanase- $\beta$ -glucosidase containing complex. *FEMS Microbiol.Lett.* 18: 217-222.
- ◆ SRISODSUK, M.; REINIKAINENT, T.; PENTTILA, M.; 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.; LETHIO, .; LINDER, M.; MARGOLLES, C. E.; REINIKAINENT, T.; TEERI, T. T. 1997. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I with an endoglucanase-binding domain: action on bacterial microcrystalline cellulose. *J.Biotechnol.* 57: 49-57.
- ◆ STERNBERG, D. 1976. Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6:35-53.
- ◆ STERNBERG, D. ; MANDELS, G. R. 1979. Induction of cellulolytic enzymes i *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* 139 : 761-769.
- ◆ STERNBERG, D. ; MANDELS, G. R. 1982.  $\beta$ -glucosidase induction and repression in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Exper. Mycol.* 6 : 115-124.
- ◆ STERNBERG, D. ; VIJAYAKUMAR, P. ; REESE, E. T. 1977.  $\beta$ -glucosidase : microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can. J. Microbiol.* 23 : 139-147.
- ◆ STEWART, J. C. ; PARRY, J. B. 1981. Factors influencing the production of cellulase by *Aspergillus fumigatus* (*Fresenius*). *J. Gen. Microbiol.*125 : 33-39.
- ◆ SUGDEN, T.; BHAT, K. M. 1994. Induction and regulation of cellulases. *Folia Microbiol.* 43:67-78.

- ◆ TAJ-ALDEEN, S. J. 1993. Effect of starch in the induction of  $\beta$ -glucosidase in *Trichoderma reesei*. Mycol. Res. 97(3) : 318-320.
- ◆ TAJ-ALDEEN, S. J.; AL-HABBEH, E. K.; ABDULAH, S. K. 1990. Cellulolytic activity of coprophilous fungi. Crypt. Bot. 2: 25-29.
- ◆ TAJ-ALDEEN, S. J. ; ALKENANY, K. I. 1992. Properties of the cellulolytic system of *Aspergillus niveus* Mycol. Res. 96(1) : 222-231.
- ◆ TAKAHASHI, T. ; INOKUCHI, N. ; IRIE, M. 1981. Production of amylases by *Aspergillus*. J. Biochem. 89 : 125-130.
- ◆ TENKANEN, T.; OHNO, W. 1992. The cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* . Biotechnol. Lett. 35:446-457.
- ◆ TENKANEN, T.; DRUCKER, H. 1995. Effect of various cultural conditions on cellulase production. Rev. Microbiol. 23(3):189-193.
- ◆ TORRONEN, A.; MARCH, R. L.; MESSNER, R. 1992. The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes. Biotechnology (10):1461-1464.
- ◆ TSAO, G. T. ; CHANG, L. C. 1987. Cellulose and hemicellulose technology. In Filamentous fungi, chapter 12.
- ◆ TSUJIBO, T.; TUAHI, M. G.; LAFFEY, C. D. 1990. Characterization of individual components of the xylanolytic enzymes of *Talaromyces emersonii*. Bioresource Technol. 50(1): 37-42.
- ◆ TUOHY, W. G.; WOO, T. 1994. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 888-899.
- ◆ UEMURA, S.; ISHIHARA, S.; JELLISON, J. 1993. Differential responses of wood-rot fungi cellulases towards polyclonal antibodies against *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 788-794.
- ◆ VAN RENSBURG, P.; VAN ZYL, W.; PRETORIUS, I. S. 1998. Engineering yeast for efficient cellulose degradation. Yeast 14: 67-76.
- ◆ VINCKEN, T.; KERSTIN, S. 1997. Comparison of intra and extracellular isozymes of *Fusarium sp.* Mycol. Res. 102(8):997-1013.
- ◆ WARLDON, C. R. Jr. ; BECKER-VALLONE, C. A. ; EVELEGH, D. E. 1986. Isolation and characterization of a cellulolytic actinomycete *Microbispora bispora*. Applied Microbiol. Biotechnol. 24 : 477-486.
- ◆ WANG, D. I. C.; AVGERINOS, G. C.; BIOCIC, I.; WANG, S. D.; FANG, H. Y. 1983. Ethanol from cellulosic biomass. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 300:323-333.

- ◆ WANG, D.; GAO, P. 1988. Regulation of cellulases synthesis in mycelial fungi. *Biotechnol. Lett.* 17:593-598.
- ◆ WASTE, L.; SAHAI, V. 1985. Characterisation of the cellulase system produced by *Aspergillus fumigatus* growing on cellulose. *FEBS. Lett.* 302(1): 77-83.
- ◆ WHITE, A. R. 1983. Visualization of cellulases and cellulose degradation. In *Cellulose and other natural polymer systems. Biogenesis, structure and degradation.* Chapter 23 R. M. Brown (Eds.), Plenum Press, N. Y.
- ◆ WHITAKER, D., R. 1971. Cellulases. En: *The Enzymes.* Vol.1 cap. 9 Boyer Ed. ,Plenum Press, NY.
- ◆ WICKLOW D. T.; 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, U. L.; YAGUCHI, M.; DESROCHES, M. 1984. Extracellular proteins secreted by the basidiomycete *Schizophyllum commune* i response to carbon sources. *J. of Bacteriology* 159: 194-299.
- ◆ WINTERHALTER, C.; HEINRICH, P.; CANDUSSIO, A.; WICH, G.; LIEB, W. 1995. Identification of a novel cellulose binding domain within the multidomain 120 kDa xylanase XynA of the hyperthermophilic bacterium *Thermothoga maritima*. *Molecular Microbiol.* 15(3): 431-444.
- ◆ WOKMAN, T.; DAY, S. 1982. Production and characterization of  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus terreus*. *J. Basic Microbiol.* 34(5): 323-328.
- ◆ WONG, K.; TAN, L.; SADDLER, J.; YAGUCHI, M. 1986. Characterization of two xylanases of *Trichoderma harzianum*. *Can.J.Microbiol.* 32: 570-585.
- ◆ WONG, K. K. Y. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4 xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol.Rev.* 52: 305-317.
- ◆ WOOD, T. M. 1971. Properties and mode of action of cellulases. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 5 : 111-137.
- ◆ WOOD, T. M. ; MAHALINGESHWARA BHAT, K. 1988. Methods for measuring cellulase activity. *Methods in enzymology* 160 : 87-112.
- ◆ WOOD, T. M. ; GARCIA CAMPAYO, V. 1990. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1 : 147-161.
- ◆ WOOD. T. M.; McRAE, S. I.; 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.
- ◆ YAZDI, M. T. ; WOODWARD, J. R. ; RADFORD, A. 1990. The cellulase complex of *Neurospora crassa* : activity, stability and release. *J. Gen. Microbiol.* 136 : 1313-1319.

- ♦ ZABEL, R. A.; MORREL, J. J. 1992. Wood microbiology. Decay and its prevention. Academic Press, California.
- ♦ ZARRA, I.; REVILLA, G. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. Azcón-Bieto & Talon (Eds). Interamericana, España.
- ♦ ZHU, Y.; WU, Y.; CHAN, W.; TAN, C.; GAO, J.; FEI, J.; SHIH, C. 1982. Enzyme Microbiol.Technol. 4: 1-15.