



REVISIÓN

Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos



Ivonne Gutiérrez-Rojas^{a,b,*}, Nubia Moreno-Sarmiento^{a,c} y Dolly Montoya^a

^a Grupo de Bioprocesos y Bioprospección, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Edificio Manuel Ancizar, Bogotá, D. C., Colombia

^b Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá, D. C., Colombia

^c Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Bogotá, D. C., Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 29 de enero de 2013

Aceptado el 23 de octubre de 2013

On-line el 7 de marzo de 2014

Palabras clave:

Celulosa

Celulasas

Regulación transcripcional

Expresión de genes

Trichoderma reesei

Aspergillus niger

Aspergillus nidulans

Neurospora crassa

RESUMEN

La celulosa es la fuente de carbono renovable más abundante de la Tierra. Sin embargo, la estructura de este polímero constituye una barrera física y química para acceder al carbono, lo que ha limitado el aprovechamiento del mismo. En la naturaleza, un pequeño porcentaje de microorganismos pueden degradarla a través de la expresión de celulasas. Dentro de estos microorganismos, uno de los grupos más activos y eficientes son los hongos filamentosos. Esta revisión describe las similitudes y diferencias de los mecanismos de acción de las celulasas y los mecanismos de regulación de su expresión para 3 de los modelos de hongos filamentosos celulolíticos más estudiados: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus nidulans*, y para un modelo recientemente descrito, *Neurospora crassa*. Se encontró que los mecanismos de acción enzimática son muy similares en todos los modelos estudiados, no así los mecanismos de regulación génica. Entender las particularidades de cada sistema es fundamental en el desarrollo de estrategias para la mejora de la producción de celulasas, ya sea proporcionando el ambiente óptimo (condiciones de fermentación) o aumentando la expresión en estos microorganismos mediante ingeniería genética.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Mechanisms and regulation of enzymatic hydrolysis of cellulose in filamentous fungi: Classical cases and new models

ABSTRACT

Cellulose is the most abundant renewable carbon source on earth. However, this polymer structure comprises a physical and chemical barrier for carbon access, which has limited its exploitation. In nature, only a few percentage of microorganisms may degrade this polymer by cellulase expression. Filamentous fungi are one of the most active and efficient groups among these microorganisms. This review describes similarities and differences between cellulase activity mechanisms and regulatory mechanisms controlling gene expression for 3 of the most studied cellulolytic filamentous fungi models: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*, and the recently described model *Neurospora crassa*. Unlike gene expression mechanisms, it was found that enzymatic activity mechanisms are similar for all the studied models. Understanding the distinctive elements of each system is essential for the development of strategies for the improvement of cellulase production, either by providing the optimum environment (fermentation conditions) or increasing gene expression in these microorganisms by genetic engineering.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Keywords:

Cellulose

Cellulases

Transcriptional regulation

Gene expression

Trichoderma reesei

Aspergillus niger

Aspergillus nidulans

Neurospora crassa

La celulosa es la fuente de carbono renovable más abundante de la Tierra. Es sintetizada en su mayoría por las plantas a través de la fotosíntesis, con una tasa de producción anual de

$7,2 \times 10^{11}$ toneladas³¹. Sin embargo, este carbono no está disponible fácilmente. Se ha estimado que a pH neutro y en ausencia de enzimas la vida media de la celulosa es de millones de años⁷², indicando que la hidrólisis enzimática es clave en la degradación de este polímero. Aunque se ha reportado que algunos insectos, moluscos, nematodos y protozoos pueden producir celulasas, los microorganismos son los mayores productores de estas enzimas⁷².

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ivonne.gutierrez@javeriana.edu.co (I. Gutiérrez-Rojas).

Se ha encontrado actividad celulolítica en una gran variedad de bacterias y hongos. Sin embargo, no todos son capaces de solubilizar la celulosa completamente⁵. Los hongos son reconocidos como agentes de descomposición de la materia orgánica en general y de la celulosa en particular, para lo cual producen una gran variedad de enzimas hidrolíticas esenciales para soportar su crecimiento, ya sea como saprófitos o como patógenos². La actividad celulolítica está ampliamente distribuida en el reino Fungi; se ha reportado en hongos anaerobios de los géneros *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces* y *Anaeromyces*, y en hongos aerobios de los géneros *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium*, *Neurospora*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Poria*, *Schizophyllum*, *Serpula*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paezilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma*^{35,65}. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los hongos pertenecientes al Phylum Ascomycota dominan, tanto en abundancia como en actividad, la comunidad microbiana responsable de la descomposición de residuos celulósicos⁷².

La conversión de la biomasa celulósica en azúcares fermentables a través de la hidrólisis enzimática ha sido un campo de investigación y desarrollo muy amplio. Las celulasas fúngicas se comercializan desde hace más de 30 años y han demostrado su potencial biotecnológico en varias industrias, entre las que se incluyen la de alimentos, cervecera y vinícola, la agrícola, papelera y textil, y la de detergentes⁵⁵. Sin embargo, el alto coste de producción de estas enzimas y su baja eficiencia han limitado las aplicaciones industriales; es el caso de la producción de etanol a partir de celulosa, donde la hidrólisis enzimática sigue siendo una de las mayores dificultades, tanto en lo técnico como en lo económico²⁷. Es por ello que la industria demanda enzimas más estables, más activas y más económicas. Para dar respuesta a estos requerimientos es necesario entender, entre otras cosas, los mecanismos de acción de estas enzimas, así como la regulación de su expresión en microorganismos celulolíticos. Dentro de este contexto, el presente trabajo de revisión se centra en los mecanismos de acción enzimática, los genes involucrados y los mecanismos de regulación génica para 3 de los modelos de hongos celulolíticos más estudiados: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus nidulans*, y para un modelo recientemente descrito, *Neurospora crassa*.

Estructura de la celulosa

La celulosa es un polisacárido sintetizado en gran cantidad por las plantas, constituye entre el 35 y el 50% del peso seco de estas³⁵, y también es sintetizado por bacterias y una variedad amplia de algas³⁷. Está constituida por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -1,4, y se requieren 8 unidades monoméricas de glucosa para formar un producto insoluble. Dependiendo de la fuente, puede tener entre 8.000 y 15.000 unidades monoméricas por cadena³⁷. El polisacárido está localizado en la pared celular, donde se encuentra como unidades submicroscópicas de forma alargada llamadas micelas. Estas micelas se organizan en estructuras más grandes, las microfibrillas, las cuales se empaquetan formando una estructura cristalina altamente ordenada, en la cual todos los átomos están fijos en posiciones discretas uno con respecto a otro; este empaquetamiento previene la penetración no solo de enzimas, sino de pequeñas moléculas como el agua. Esta estructura se encuentra rodeada por polisacáridos hemicelulósicos que se unen a la celulosa por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes, haciéndola aún más resistente a la hidrólisis química y biológica³⁵. No toda la estructura de la celulosa es cristalina, existen regiones «desordenadas», denominadas regiones amorfas, con una composición heterogénea caracterizada por una variedad de enlaces. Este arreglo asimétrico que caracteriza las regiones

amorfas es crucial para la biodegradación de la celulosa³⁸. Además de estas regiones, las fibras de celulosa contienen varios tipos de irregularidades, como torceduras y espacios, en las cuales se forman microporos y capilares lo suficientemente amplios como para permitir la penetración de moléculas relativamente grandes, incluyendo en algunos casos las enzimas celulolíticas³⁵.

Mecanismos de acción enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa implica la acción secuencial de un grupo de enzimas, conocidas como celulasas, que pertenecen a la superfamilia de las glicosil hidrolasas, llamadas así porque catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico entre 2 o más hidratos de carbono o entre estos y una fracción que no sea un hidrato de carbono. Las glicosil hidrolasas han sido clasificadas en más de 100 familias, y cada una de estas (familia GH) contiene proteínas que están relacionadas por su secuencia, su estructura y, en consecuencia, por su mecanismo catalítico^{12,73}. La arquitectura general deducida para estas enzimas presenta 2 módulos globulares independientes: un dominio catalítico, responsable de la reacción de hidrólisis *per se*, y un módulo de unión a la celulosa, que desempeña 3 funciones generales: la primera es mantener la enzima próxima al sustrato, la segunda es una función de reconocimiento, y, por último, una función disruptiva^{7,25}.

Se han descrito 2 mecanismos de hidrólisis para las glicosil hidrolasas, de conservación y de inversión de la configuración del carbono anomérico. En general, la hidrólisis del enlace glucosídico es catalizada por 2 aminoácidos en el sitio catalítico, uno ácido general (donante de protones) y otro nucleófilo/base, aspartato y glutamato, generalmente⁷³. Dependiendo de la posición espacial de estos aminoácidos la hidrólisis se produce a través de un mecanismo o de otro. Si estos están dispuestos a una distancia de $\approx 5,5 \text{ \AA}$ se da el mecanismo de conservación, si por el contrario esta distancia es de $\approx 10 \text{ \AA}$ sucede el mecanismo de inversión¹². En el mecanismo de conservación, la hidrólisis se da en 2 etapas. En la primera, glucosilación, el nucleófilo ataca el centro anomérico, dando como resultado la formación de una enzima glucosídica intermedia con un carácter ácido provisto por el carboxilato ácido. En la segunda, deglucosilación, el ahora desprotonado carboxilato ácido actúa como base y se une a una molécula de agua nucleofílica para hidrolizar la enzima intermedia, obteniéndose así el producto hidrolizado⁷³ (fig. 1B). Por otro lado, en el mecanismo de inversión, la hidrólisis es alcanzada en una sola etapa, ya que debido a la mayor distancia entre los residuos catalíticos la molécula de agua puede ser acomodada entre la base y el azúcar^{12,73} (fig. 1A).

En los microorganismos que producen celulasas, estas pueden estar formando complejos unidos a la membrana celular llamadas celulosomas, como en las bacterias anaerobias (especialmente, *Clostridium* spp.) y algunos hongos (de los géneros *Neocallimastix*, *Piromonas* y *Sphaeromonas*), o en un sistema enzimático no en complejo, como es el caso de los hongos aerobios³⁸, objeto de esta revisión. De cualquier forma, el sistema de celulasas típico incluye 3 tipos de enzimas: 1) endoglucanasas o 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasas (EC.3.2.1.4); 2) exoglucanasas, que incluyen 1,4- β -D-glucano-glucanohidrolasas (celodextrinasas) (EC 3.2.1.74) y 1,4- β -D-glucano-celobiohidrolasas (celobiohidrolasas) (EC.3.2.1.91), y 3) β -glucosidasas o β -glucosidasa hidrolasas (EC.3.2.1.21)^{13,35,38}. Las endoglucanasas cortan al azar en el interior de la celulosa amorfa, generando oligosacáridos de varias longitudes y, en consecuencia, nuevos extremos de cadena. Las exoglucanasas actúan de una manera progresiva en los extremos reductores y no reductores de las cadenas del polisacárido, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas). Las β -glucosidasas hidrolizan las celodextrinas solubles y la celobiosa a glucosa^{35,38}.

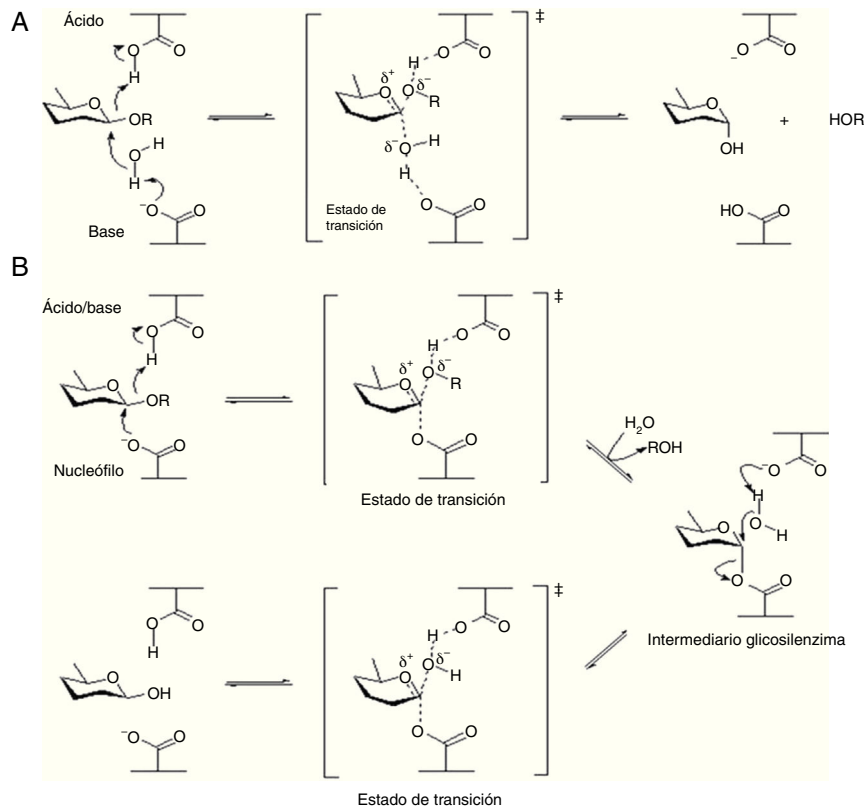


Figura 1. Mecanismos de hidrólisis enzimática de la β -glucosidasa. A. Mecanismo de inversión. B. Mecanismo de conservación. Traducida de Withers y Williams⁷³, reproducida con permiso.

La estructura de la celulosa representa un reto para este sistema enzimático. Las características estructurales que afectan fundamentalmente la hidrólisis enzimática son la cristalinidad y el área de superficie, siendo esta última importante porque el contacto físico entre la enzima y la celulosa es un prerrequisito para la hidrólisis. En cuanto a la cristalinidad, esta afecta en la medida en que disminuye la accesibilidad de las enzimas al sustrato, de manera que la celulosa amorfa es rápidamente degradada y, a medida que aumenta el grado de cristalinidad, la celulosa comienza a ser resistente a la hidrólisis¹⁶. En la [tabla 1](#) se presentan valores reportados de actividad específica de enzimas purificadas obtenidas a partir de *T. reesei* y *Aspergillus* spp. Al comparar los datos presentados, la primera conclusión obvia es la alta variabilidad entre la actividad de las enzimas obtenidas de microorganismos del mismo género y especie, purificadas aparentemente de la misma manera y evaluadas con los mismos sustratos. Esta variabilidad puede deberse a diferencias entre las condiciones de ensayo utilizadas por los investigadores y, probablemente, al uso de preparados con diversos grados de pureza obtenidos usando diferentes protocolos de purificación. A pesar de esta variabilidad, se puede observar una mayor actividad en sustratos con menor grado de cristalinidad (CMC, celulosa amorfa y β -glucano), y una menor actividad en sustratos con mayor grado de cristalinidad (Avicel® y papel de filtro). En estos últimos, la accesibilidad de la enzima al sustrato es el factor limitante para la hidrólisis, mientras que las propiedades de superficie pasan a un segundo plano, ya que su efecto se da únicamente en las fases iniciales de la reacción^{16,22}.

Por otro lado, los sistemas de celulasas no son simplemente una aglomeración de enzimas, ya que todas ellas actúan de manera coordinada y sinérgica para una hidrólisis eficiente. Se han descrito 4 tipos de sinergia: 1) endo-exo sinergia entre endoglucanasas y exoglucanasas; 2) exo-exo sinergia entre exoglucanasas que procesan los extremos reductores y no reductores de la cadena;

3) sinergia entre exoglucanasas y β -glucosidasas que eliminan celobiosa y celodextrinas, y 4) sinergia intramolecular entre los dominios catalíticos y los dominios de unión a la celulosa³⁵. Además, se ha reportado para *T. reesei* la participación en este sistema de proteínas no hidrolíticas similares a las expansinas de las plantas, las cuales debilitan las uniones no covalentes entre las fibras de celulosa sin hidrólisis, aumentando de esta manera la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas al sustrato⁵⁴. Debido a esto, los preparados comerciales de celulasas consisten en cócteles enzimáticos que contienen no solamente endocelulasas, exocelulasas y β -glucosidasas, sino también xilanasas, pectinasas, etc., dependiendo de la composición de la biomasa, a la cual serán aplicadas⁵⁷. La mayoría de estos preparados son producidos a partir de *T. reesei* y *Trichoderma longibrachiatum* ([tabla 2](#))⁵⁷. Sin embargo, debido a que *Trichoderma* tiene baja actividad de β -glucosidasa, algunos de estos preparados consisten en mezclas de enzimas producidas por *Trichoderma* y otros microorganismos como *A. niger* y, más recientemente, especies de *Penicillium*^{23,57}. La eficiencia hidrolítica de estos complejos enzimáticos depende tanto de las propiedades individuales de cada enzima (eficiencia catalítica, estabilidad a temperatura alta y pH ácido), como de su proporción en la mezcla, lo que influye en el tipo de sinergia que se establece^{23,69}.

Genes implicados y regulación de la expresión

Trichoderma reesei como modelo de microorganismo productor de celulasas

T. reesei (anamorfo de *Hypocrea jecorina*) ha sido el modelo de microorganismo celulolítico por excelencia. Fue aislado en las islas Salomón durante la Segunda Guerra Mundial como el agente causal de la infección masiva del material a base de algodón del ejército de los Estados Unidos. Inicialmente fue identificado como

Tabla 1
Actividades específicas de endoglucanasas (EC.3.2.1.4) y exoglucanasas (celobiohidrolasas) (EC.3.2.1.91) reportadas para *Trichoderma reesei* y *Aspergillus* spp.

Microorganismo	Preparación de la enzima	Enzima	Sustrato, condiciones de ensayo, producto	Actividad específica (μmol de producto/min/mg)	Referencia
<i>Trichoderma reesei</i> , QM9414	Purificadas por cromatografía	CBH-I	Avicel [®] , 50 °C 3 h, AR	0,0014	Tomme et al. ⁶⁶
<i>Trichoderma reesei</i> , RUT-C30	Purificadas por cromatografía	CBH-II		0,0027	El-Gogary et al. ¹⁵
		EG-I	CMC, 40 °C, AR	87,0	
		EG-II	Avicel [®] , 40 °C, AR	0,2	
			CMC, 40 °C, AR	137,0	
		CBH-I	Avicel [®] , 40 °C, AR	0,4	
			CMC, 40 °C, AR	0,23	
<i>Trichoderma reesei</i>	Purificadas por cromatografía	CBH-II	Avicel [®] , 40 °C, AR	0,26	Kim y Kim ²⁹
			CMC, 40 °C, AR	2,0	
		EG-I	Avicel [®] , 40 °C, AR	0,48	
			Avicel [®] , 30 °C 20 h, AR	19,4	
		EG-II	CMC, 40 °C 10 min, AR	17,0	
			Celulosa amorfa, 40 °C 2 h, AR	24,0	
			Avicel [®] , 30 °C 20 h, AR	0,6	
			CMC, 40 °C 10 min, AR	2,5	
			Celulosa amorfa, 40 °C 2 h, AR	1,2	
			Avicel [®] , 30 °C 20 h, AR	2,3	
EG-III	CMC, 40 °C 10 min, AR	1,2			
	Celulosa amorfa, 40 °C 2 h, AR	1,6			
	Avicel [®] , 30 °C 20 h, AR	1,7			
	CMC, 40 °C 10 min, AR	1,0			
<i>Trichoderma reesei</i> , MCG 77	Purificadas por cromatografía	EG-I	Celulosa amorfa, 40 °C 2 h, AR	2,6	Nidetzky et al. ⁴⁵
			Papel de filtro, 50 °C, AR	1,20	
<i>Aspergillus terreus</i> , M11	Purificada por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía	CBH-I		0,22	Gao et al. ²⁰
		CBH-II		0,36	
<i>Aspergillus niger</i>	Purificadas por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía	EG	CMC, 30 min, AR	67,0	Hasper et al. ²⁴
			EG-A ^a	CMC, 40 °C 10 min, AR	
		EG-B ^a	β -glucano, 40 °C 10 min, AR	59,0	
			Xiloglucano, 40 °C 10 min, AR	0,0	
			CMC, 40 °C 10 min, AR	8,0	
		EG-C	β -glucano, 40 °C 10 min, AR	22,0	
			Xiloglucano, 40 °C 10 min, AR	0,0	
<i>Aspergillus niger</i>	Purificadas por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía	EG	CMC, 40 °C 10 min, AR	1,0	Ali y Saad El-Dein ¹
			β -glucano, 40 °C 10 min, AR	1,0	
			Xiloglucano, 40 °C 10 min, AR	19,0	
<i>Aspergillus nidulans</i>	Purificadas por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía	EG	CMC, AR	55,29	Ali y Saad El-Dein ¹
		CBH	Avicel [®] , AR	42,22	
		EG	CMC, AR	65,66	
		CBH	Avicel [®] , AR	58,71	

AR: azúcares reductores; CBH: celobiohidrolasa o exoglucanasa; CMC: carboximetilcelulosa; EG: endoglucanasa.

^a Clonadas y expresadas en *Kluyveromyces lactis*.

Trichoderma viride, codificado como QM6a y conservado en el Centro de Investigación y Desarrollo del Ejército de los Estados Unidos en Natick, Massachusetts^{32,48}. Su potencial como productor de celulasas fue reconocido por Mandels y Reese en 1957⁴¹, más tarde fue clasificado como una nueva especie y renombrado como *T. reesei* en honor al investigador del laboratorio de Natick, Elwyn T. Reese⁴⁸. Desde entonces, este microorganismo ha sido objeto de numerosas investigaciones. En Japón, por ejemplo, la obtención de mutantes hiperproductores de celulasas es parte de un proyecto nacional para la generación de combustibles alternativos al petróleo desde 1970⁴⁶. Como resultado de este proyecto se han obtenido 2 mutantes importantes producto de una mutagénesis clásica, KDG-12 y PC3-7, que muestran una alta productividad de celulasas,

resistencia a la represión catabólica por glucosa y alta inducibilidad por sorbosa²⁸. Otro mutante hiperproductor de celulasas muy utilizado es RUT-C30, obtenido en la Universidad Rutgers, en Nueva Jersey, en 1977. Esta cepa fue generada mediante la combinación de mutagénesis clásica y radiación UV, y es capaz de producir de 15 a 20 veces más celulasas que QM6a, además de evitar la represión catabólica por glucosa⁴⁸. Estos mutantes no solo han servido para la producción de enzimas celulolíticas a escala industrial, sino que también han sido utilizados como modelos para entender la regulación de la expresión de estas enzimas en *T. reesei*.

El genoma de *T. reesei* tiene un contenido de guanina-citosina del 52%, un tamaño de 33,9 Mb y 9.129 genes que corresponden al 40,4% codificante. La longitud promedio de un gen es de 1.793 pb,

Tabla 2

Celulasas comerciales, compañías que las producen, microorganismos fuente y actividad enzimática reportada

Nombre comercial	Casa comercial	Microorganismo fuente	Actividad de celulasas (FPAsas/mL) ^a
Celluclast®	Novozymes (Dinamarca)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Aspergillus niger</i>	56
Novozymes® 188	Novozymes	<i>Aspergillus niger</i>	<5
Cellulase® 2000L	Rhodia-Danisco (Francia)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	10
Rohament® CL	AB-Enzymes (Finlandia)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	50
Viscostar® 150L	Dyadic (EE. UU.)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	33
Multifect® CL	Genencor (EE. UU.)	<i>Trichoderma reesei</i>	64
Bio-feed beta® L	Novozymes	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	<5
Energex® L	Novozymes	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	<5
Ultraflo® L	Novozymes	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	<5
Viscozyme® L	Novozymes	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	<5
Cellulyve®	50L Lyven (Francia)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	24
GC® 440	Genencor-Danisco (EE. UU.)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	<5
GC® 880	Genencor	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	<5
Specyme® CP	Genencor	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	49
GC® 220	Genencor	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	116
Cellulase® AP30K	Amano Enzyme	<i>Aspergillus niger</i>	0,17
Cellulase® TRL	Solvay Enzymes (EE. UU.)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	95
Econase® CE	Alko-EDC (EEUU)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	40
Cellulase® TAP106	Amano Enzyme	<i>Trichoderma viride</i>	0,42
Biocellulase® TRI	Quest Intl. (EE. UU.)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	68
Biocellulase® A	Quest Intl	<i>Aspergillus niger</i>	0,29
Ultra-low microbial®	logen (Canadá)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	88

Modificada de Singhania et al. (2010)⁵⁷.^a Unidades de papel de filtro determinadas de acuerdo con el método IUPAC: pH 5,0 y 50 °C.

con 3,1 exones por gen (longitud promedio del exón, 508 pb; longitud promedio del intrón, 120 pb). Dentro de este genoma se han identificado 200 genes que codifican para glicosil hidrolasas⁴², de los cuales 2 codifican para celobiohidrolasas (EC.3.2.1.91), 7 para endoglucanasas (EC.3.2.1.4) y 15 para β -glucosidasas (EC.3.2.1.21) (tabla 3), cuya expresión es dirigida simultáneamente por inductores específicos, como la celulosa o subproductos de esta, y reprimidos simultáneamente por altos niveles de glucosa^{17,42,46}.

Inducción de la síntesis de celulasas en *Trichoderma reesei*

Encontrar la respuesta a la pregunta: «¿Cómo la celulosa, siendo un sustrato insoluble, es capaz de inducir la expresión de enzimas celulolíticas?» ha sido objeto de numerosas investigaciones. La primera hipótesis sobre la que se trabajó es que la baja expresión basal de celulasas hace que se libere glucosa y celobiosa y que estos subproductos solubles actúan como inductores de la actividad enzimática. Al respecto, Mandels y Reese encontraron en 1960 que la glucosa no es un inductor, muy al contrario, actúa como un inhibidor, y que la celobiosa, aunque induce, lo hace muy pobremente⁴⁰. Estos mismos investigadores, en 1962 reportaron que la soforosa (β -D-glucosa-[1,2]-D-glucosa), una impureza de la glucosa obtenida de la hidrólisis ácida del almidón, induce 2.500 veces más la expresión de celulasas comparada con la celobiosa, que parecía ser el inductor natural lógico³⁹. Esta observación fue confirmada por Sternberg y Mandels, quienes estudiaron, además, los factores

que afectan la inducción, encontrando que la cinética, así como el efecto del pH y la temperatura sobre este, son muy similares a lo encontrado cuando la inducción se realiza con celulosa, evidenciando que la soforosa podría ser el inductor natural⁵⁸. Esto último se confirmó en estudios posteriores, en los que se demostró la formación de soforosa *in vitro* en suspensión de células lisadas de *T. reesei*⁶⁸ y la presencia de una β -glucosidasa constitutiva localizada en la membrana plasmática, que podría ser la responsable de dicha formación⁵⁷.

Aunque se había identificado la soforosa como el inductor natural de la síntesis de celulasas, seguía sin respuesta la pregunta de cómo se induce esta síntesis. En 1987, Kubicek estudió la inducción de endoglucanasas en conidios, micelio y protoplastos de *T. reesei* y encontró que la celulosa induce la síntesis de endoglucanasas solamente en conidios, mientras que otros celooligosacáridos son capaces de inducir esta síntesis en micelio, conidios y protoplastos. Además, Kubicek encontró que cuando se inhibe la β -glucosidasa localizada en la membrana plasmática, se bloquea la síntesis de endoglucanasas cuando se utiliza celulosa o celooligosacáridos como inductores, para conidios o protoplastos y micelio, respectivamente, mientras que la inducción por soforosa no se ve afectada³⁰. Este mismo investigador, en 1988 reportó la presencia de celobiohidrolasas unidas a la superficie de los conidios, concluyendo así que estos expresan todas las enzimas del complejo celulolítico³³. Recientemente, estudios de expresión génica mediante microarrays permitieron comparar la expresión de

Tabla 3Número de genes que codifican para enzimas celulolíticas en *Trichoderma reesei* y en otros modelos

Familia	Función	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Neurospora crassa</i> ^a
GH6	Celulasa	1	2	2	3
GH7	Celulasa	2	2	3	5
GH12	Celulasa	2	4	1	1
GH45	Celulasa	1	0	1	1
GH61	Celulasa	3	7	9	14
GH1	β -glucosidasa	2	3	3	1
GH3	β -glucosidasa	13	17	20	9
Total		24	35	39	34

Fuente: Kubicek³¹.^a Función predicha *in silico*; no ha sido comprobada *in vivo* en todos los casos¹¹.

900 genes durante la transición de hifa a conidio, encontrándose aumentada en este último la transcripción de los genes involucrados en transporte, síntesis de metabolitos secundarios, lipasas, proteasas y, particularmente, celulasas y hemicelulasas, confirmando de esta manera el papel de los conidios en la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa⁴³.

Lo anteriormente expuesto se puede resumir en el modelo propuesto por Suto y Tomita en 2001, que comprende 6 etapas: primera, los conidios entran en contacto con la celulosa y las celulasas en su superficie la degradan a celooligosacáridos, que son luego hidrolizados a glucosa y transglucosilados a soforosa por una β -glucosidasa constitutiva; segunda, los conidios germinan y la glucosa como fuente de carbono y la soforosa como inductor entran en la célula. La β -glucosidasa, unida a la membrana plasmática, convierte los celooligosacáridos en soforosa y glucosa; tercera, la soforosa induce la síntesis de celulasas que son secretadas fuera de la célula; cuarta, las celulasas secretadas degradan la celulosa causando un aumento en la cantidad de celooligosacáridos y de glucosa; quinta, la glucosa es asimilada, los celooligosacáridos son hidrolizados a glucosa y transglucosilados para formar soforosa; y sexta, el ciclo continúa hasta que el sustrato se agota⁶⁴ o el sistema es reprimido por represión catabólica, como se explicará más adelante (fig. 2).

Regulación en *Trichoderma reesei*

Aunque ya se ha contestado parte de la pregunta inicial, aún no se ha respondido cómo es regulado este sistema. A este respecto, la presencia obligatoria de un inductor (en este caso, soforosa) para la expresión de estas enzimas implica una regulación a nivel de promotor. Hasta la fecha se han identificado 4 activadores transcripcionales (*Xyr1*, *Ace2*, *Bgl1* y el complejo HAP2/3/5) y 2 represores (*Ace1* y el represor catabólico por carbono *Cre1*)^{32,46} (tabla 4).

Xyr1 es una proteína de unión al ADN con un cluster binuclear de cinc que se encuentra exclusivamente en hongos. Esta proteína se une al motivo GGCTA ubicado como una repetición invertida separada por 10 pb (5'-GGCTAAATGCGACATCTTAGCC-3') en la región promotora⁵⁰. Inicialmente fue identificado como inductor de xilanas; sin embargo, Stricker et al., en 2006, demostraron que la delección de *xyr1* en *T. reesei* no solamente restringe fuertemente la utilización del xilano, sino que también elimina la inducción de celulasas por celulosa y soforosa, indicando que *Xyr1* es un activador general y esencial de la transcripción, que gobierna la expresión del sistema enzimático celulolítico (*cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *bgl1*) y participa en la regulación del sistema xilanolítico (*xyn1* y *xyn2*) en *T. reesei*^{36,61}. Aro et al., en 2001, aislaron un segundo activador de la expresión de celulasas, *Ace2*. Al igual que *Xyr1*, es una proteína de unión a ADN con un cluster binuclear de cinc, se une a la secuencia 5'-GGCTAATAA-3' del promotor del gen *cbh1* y regula los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2*. La delección de *ace2* lleva a una disminución en la cantidad de ARNm de las celobiohidrolasas I y II y de las endoglucanasas I y II, y a una disminución en la actividad de celulasas totales, entre el 30 y 70%. Al contrario de lo que podría esperarse, la inducción de celulasas por soforosa no se ve afectada por la delección de *ace2*, lo que indica que para la inducción por celulosa y soforosa se emplean al menos parcialmente diferentes mecanismos moleculares⁴. Recientemente se describió otro activador transcripcional, denominado *Bgl1*, con la misma estructura mencionada para los 2 anteriores. *Bgl1* regula la transcripción temprana de genes específicos que codifican para β -glucosidasas⁴⁶. Por otro lado, Zeilinger et al. (1988 y 2001) encontraron que la expresión del promotor *cbh2* depende de la unión del complejo proteico HAP2/3/5 a la caja CCAAT, un elemento *cis* encontrado en las regiones promotoras de un gran número de genes eucariotas. Al parecer,

el complejo proteico se encarga de la desestabilización de la cromatina necesaria para la activación de la transcripción^{74,75}.

Los 2 reguladores negativos descritos hasta ahora son *Cre1* y *Ace1*. *Cre1* fue descrito por primera vez en 1995 por Strauss y et al. como una proteína de unión a ADN con la estructura típica de «dedo de cinc»; Cys₂His₂, y algunas regiones ricas en prolina y aminoácidos básicos que pueden estar involucradas en la interacción con otras proteínas. *Cre1* se une a la secuencia 5'-GCGGAG-3', probablemente como un complejo proteico⁶⁰, y se ha determinado que la fosforilación de la serina de la posición 241 es fundamental para la unión de *Cre1* a la secuencia blanco¹⁰. La dinámica de represión catabólica de *Cre1* ha sido mejor comprendida gracias al estudio del mutante RUT-C30, en el cual *cre1* aparece truncado y solo codifica para una de las 2 regiones de «dedos de cinc» de la proteína *Cre1*. De esta manera, *T. reesei* RUT-C30 produce celulasas y hemicelulasas en un medio que contiene glucosa, y cuando se complementa la mutación con el gen *cre1* de la cepa silvestre se restaura el fenotipo de represión por glucosa²⁶. Nakari-Setälä et al. (2009) encontraron que el papel de *Cre1* va más allá de la «simple» desrepresión por glucosa al demostrar que la delección de *cre1* en una cepa silvestre lleva al incremento tanto en la actividad como en la cantidad de ARNm de celulasas en un medio con glucosa, resultado esperado por la liberación de la represión catabólica. Sin embargo, también observaron que la producción de celulasas en el medio con glucosa fue mucho más baja que en un medio con celulosa para la cepa deficiente en *cre1*, así como un gran aumento en la producción de proteínas en el medio con celulosa, evidenciando que *cre1* juega un papel en la modulación de la expresión de genes de celulasas bajo condiciones de inducción⁴⁴.

Saloheimo et al., en 2000, aislaron un gen que codifica para otro factor de transcripción de genes de celulasas, al que denominaron *Ace1*. Esta proteína contiene 3 motivos «dedo de cinc» del tipo Cys₂His₂, y establecieron que *in vitro* se une al promotor *cbh1*⁵³. Posteriores estudios mostraron que la delección de este gen aumenta de 2 a 30 veces la transcripción de los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2* y, en consecuencia, aumenta la habilidad del hongo para degradar la celulosa, indicando que *Ace1* es un regulador negativo y que este mecanismo es independiente de *Cre1*³.

Con el advenimiento de las «ómicas», se han realizado nuevos estudios sobre estos «viejos modelos» intentando dar una visión más holística. En 2011, Portnoy et al. demostraron que el papel regulatorio de *Cre1* es mucho más complejo de lo que se había reportado hasta la fecha. Estos investigadores identificaron 207 genes regulados por *Cre1*, de los cuales 118 son regulados negativamente por este. Dentro de este grupo, un alto porcentaje corresponde a genes que codifican para permeasas de membrana, lo que indica que la represión catabólica actúa preferencialmente en la entrada de sustratos a la célula y constituye un mecanismo por el que los hongos pueden recuperar incluso trazas de fuentes de carbono a una velocidad alta. También encontraron que las permeasas que transportan compuestos de nitrógeno son reguladas por *Cre1*, hecho que evidencia que las proteínas y sus productos de degradación son sustratos preferidos para un metabolismo rápido de los hidratos de carbono⁴⁹. Estudios del secretoma de *T. reesei* cultivado en celulosa como fuente de carbono han permitido identificar, además de celulasas y hemicelulasas, lacasas, glioxal oxidasas (una metaloenzima importante en la degradación de lignina), peptidasas y amidasas, lo que lleva a especular que el rompimiento de la celulosa por *T. reesei* puede ser asistido por oxidasas³¹, hecho que debe ser probado y que cambiaría el paradigma de los mecanismos de hidrólisis de la celulosa. Otro dato interesante es la detección de enzimas intracelulares (tales como deshidrogenasas) en los filtrados de los cultivos, indicando que la secreción de estas enzimas está acompañada de autólisis o fragmentación del micelio, si bien estos hallazgos aún carecen de mayor evidencia experimental³¹.

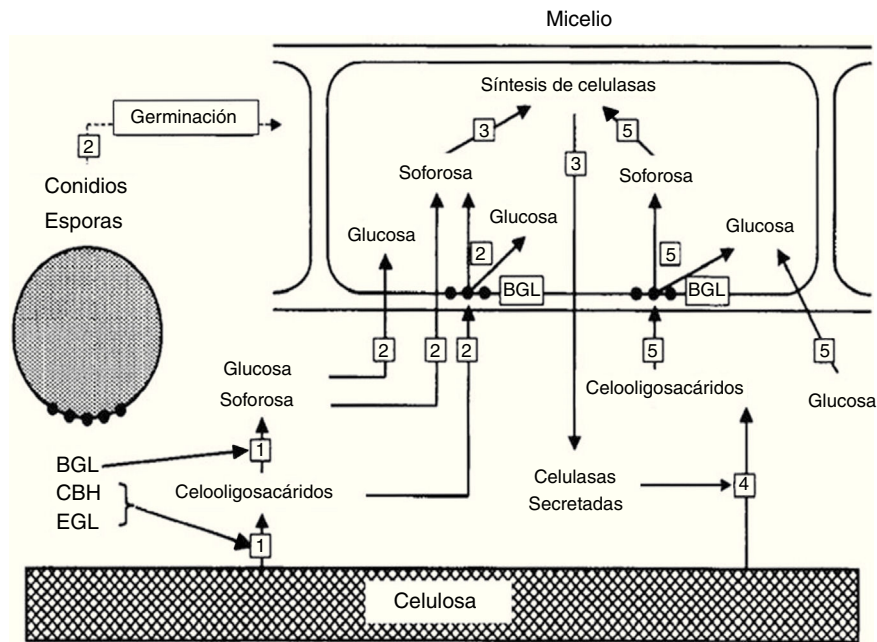


Figura 2. Modelo de inducción de celulasas en *Trichoderma reesei*. Los números se corresponden con los usados en la explicación en el texto. BGL: β -glucosidasa; CBH: 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa; EGL: endo-1,4- β -D-glucanasa. Traducida de Suto y Tomita⁶⁴, reproducida con permiso.

Regulación en otros modelos

Aspergillus niger, *Aspergillus nidulans*

A. niger es un microorganismo muy utilizado en biotecnología dada su habilidad de secretar grandes cantidades de una gran variedad de ácidos orgánicos y de enzimas necesarias para la hidrólisis de biopolímeros, entre ellas, celulasas. El genoma de *A. niger* está organizado en 8 cromosomas, con un tamaño total de 33,9 Mb, un contenido de guanina-citosina del 50,4% y 14.165 genes que codifican para proteínas, de los cuales 35 codifican para celulasas (tabla 3). Cada gen tiene una longitud promedio de 1.572 pb y 2,57 intrones (tamaño promedio de un intrón: 97 pb; tamaño promedio de un exón: 370 pb)⁴⁷. *A. nidulans* es considerado un microorganismo modelo y ha sido utilizado en el estudio de la fisiología celular en eucariotas en temas tales como regulación del metabolismo, desarrollo, control del ciclo celular, estructura de la cromatina y función del citoesqueleto, entre otros. Al igual que en *A. niger*, el genoma de *A. nidulans* está organizado en 8 cromosomas, tiene un tamaño total de 30,1 Mb, un contenido de guanina-citosina del 50% y 9.541 genes que codifican para proteínas, de los cuales 39 codifican para celulasas (tabla 3), cada gen con una longitud promedio de 1.547 pb y 3,6 exones (longitud promedio de un intrón: 97 pb; longitud promedio de un exón: 370 pb)¹⁹.

El primer reporte de un activador transcripcional de enzimas extracelulares en hongos filamentosos fue hecho para *A. niger*. En 1998, Van Peij et al. identificaron una proteína de 875 aminoácidos con un cluster binuclear de cinc que se une a la secuencia 5'-GGCTAAA-3' que aparece por triplicado en el promotor *xlnA*, a la que denominaron *XlnR*. Esta proteína activa la transcripción de los genes del sistema xilanolítico *xlnA*, *xlnB*, *xlnC*, *xlnD* y *axeA*, así como también la transcripción de genes que codifican para endoglucanasas, *eglA* y *eglB*, y celobiohidrolasas, *egl1A* y *egl1B*; indicando una posible coordinación en la regulación de las xilanasas y celulasas^{21,70,71}. Aunque el gen *xlnR* es ortólogo de *xyr1* de *T. reesei*, el mecanismo de regulación es diferente, mientras que en *T. reesei* *Xyr1* induce la expresión de celulasas y algunas xilanasas a través de la inducción por soforosa^{39,40,58}, en *A. niger* la transcripción de *eglA*, *eglB*, *cbhA* y *cbhB* es dirigida por *XlnR* por inducción de D-xilosa y no por soforosa u otro producto de degradación de la celulosa²¹. Al igual que en *T. reesei*, en este modelo se asume que una limitación por carbono lleva a una condición de desrepresión por el catabolito, y en este estado los azúcares monoméricos, D-xilosa para *A. niger*, o sus derivados, y soforosa para *T. reesei*, pueden actuar como inductores; la naturaleza de este azúcar monomérico determina el sistema enzimático que es inducido⁶². En *A. niger* el activador es expresado en presencia de xilano y lleva a una constitución de la celulosa; en ausencia de xilano este sistema podría

Tabla 4

Genes reportados como reguladores (positivos o negativos) de enzimas celulolíticas en *Trichoderma reesei* y en otros modelos

Gen	Función en <i>Trichoderma reesei</i>	Genes ortólogos reportados en otros modelos
<i>xyr1</i>	Activador de transcripción de <i>xyn1</i> , <i>xyn2</i> , <i>bxl1</i> , <i>cbh1</i> , <i>cbh2</i> , <i>egl1</i> , and <i>bgl1</i> ^{36,50,61}	<i>Aspergillus niger/nidulans</i> <i>xlnR</i> ^{70,71}
<i>ace2</i>	Activador de transcripción de <i>cbh1</i> , <i>cbh2</i> , <i>egl1</i> y <i>egl2</i> ⁴	
<i>bgl1</i>	Activador de transcripción temprana de genes de β -glucosidasas ⁴⁶	
<i>ace1</i>	Regulador negativo ^{3,53}	
<i>cre1</i>	Regulador negativo ^{10,26,44,60}	<i>creA</i> ^{14,52}
<i>cre2</i>		<i>creB</i> ³⁴
<i>cre3</i>		<i>creC</i> ³⁴
		<i>creD</i> ⁵
		<i>Neurospora crassa</i> <i>cre1</i> ⁶³
		<i>clr2</i> ⁸
		<i>clr1</i> ⁸

no ser activado o serlo pobremente, lo que conlleva un crecimiento reducido cuando la celulosa es la única fuente de carbono⁹.

En *A. niger*, la expresión de genes xilanolíticos y celulolíticos es fuertemente reprimida por glucosa, fructosa y D-xilosa. Esta represión es mediada fundamentalmente por *creA*, que es el ortólogo de *cre1* en *T. reesei*^{14,52}. Ahora bien, si la D-xilosa es el inductor, ¿cómo puede ser al mismo tiempo el represor? De Vries et al. (1999) evaluaron esta dinámica comparando la expresión de genes xilanolíticos en una cepa silvestre y una mutante para *creA* y encontraron que el nivel de expresión de estos genes depende del balance entre la inducción por XlnR y la represión por CreA. La D-xilosa es liberada gradualmente del xilano, lo que lleva a una baja concentración de D-xilosa en el medio. Bajo estas condiciones la represión por D-xilosa mediada por CreA es baja y se detectan niveles altos de expresión. Cuando los niveles de D-xilosa en el medio alcanzan concentraciones de 70 mM, la represión a través de CreA juega un papel más importante, resultando en una disminución de los niveles de expresión¹⁴. El mecanismo de represión mediado por CreA ha sido estudiado más detalladamente en *A. nidulans*, en el cual se han encontrado al menos 3 mecanismos involucrados: 1) la activación de la expresión del gen *creA* dependiente de monosacáridos; 2) autorrepresión del gen *creA*, dependiente de la formación de glucosa-6-P, y 3) regulación de la función de CreA por modificaciones traduccionales o postraduccionales^{11,59}, las cuales pueden ser dadas por un mecanismo de ubiquitinación-desubiquitinación. Respecto a este mecanismo, los genes *creB*, *creC*³⁴ y *creD*⁶ se han aislado en *A. nidulans*. El primero codifica para una enzima desubiquitinante que forma un complejo *in vivo* con la proteína codificada por *creC*. Se ha propuesto que este complejo elimina la ubiquitina de CreA, modificando o estabilizando la proteína³⁴, de manera que cumpla su función; de este hecho se deduce que mutaciones en los genes *creB* y *creC* llevan a una parcial desregulación de la represión por carbono³². Por otra parte, CreD contiene dominios arrestina y motivos PY altamente similares a las proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* Rod1p y Ros3p, las cuales interactúan con la ubiquitina ligasa Rsp5p, indicando el posible rol de CreD en la ubiquitinación de CreA⁶.

Neurospora crassa

N. crassa fue aislado por primera vez en 1843 como un contaminante en una cervecería en París, y desde 1940 ha sido un microorganismo modelo para estudios genéticos, bioquímicos y de biología de hongos⁵¹. Aunque su capacidad de degradar celulosa se conoce desde hace unos 30 años⁶⁵, relativamente pocos estudios se han publicado respecto a la regulación de este sistema, por lo que se puede considerar un «nuevo modelo» en este tema específico. *N. crassa* tiene 7 cromosomas y las características más importantes de su genoma son: contenido de guanina-citosina del 50%, un tamaño de 38,7 Mb y 10.082 genes que corresponden al 38,5% codificante. La longitud promedio de un gen es de 1.673 pb, con un promedio de 1,7 intrones por gen (longitud promedio de un intrón: 134 nucleótidos)¹⁸. Se ha predicho que el genoma de *N. crassa* contiene 171 genes que codifican para glucosilhidrolasas, un 15,5% menos que *T. reesei*; sin embargo, de estos genes, 34 codifican para celulasas (tabla 3), un 42% más que *T. reesei*.

A diferencia de los 2 modelos presentados hasta ahora (*T. reesei* y *A. niger*/*A. nidulans*), poco se conoce acerca de la inducción y regulación de celulasas en *N. crassa*. El primer reporte fue hecho por Tian et al. en 2009, quienes mediante el uso de microarrays identificaron 114 genes, predominantemente involucrados en el metabolismo del carbono, que mostraron diferencias en la expresión cuando *N. crassa* fue cultivada sobre un sustrato lignocelulósico (*Miscanthus*) y sobre celulosa cristalina (Avicel®), en comparación con el crecimiento sobre sacarosa. Adicionalmente, fueron identificadas 22 proteínas, entre estas 9 de las 24 celulasas predichas,

5 hemicelulasas, 5 proteínas con actividad predicha sobre hidratos de carbono y 2 proteínas con función desconocida⁶⁵. El hecho de que se expresen hemicelulasas sobre celulosa induce a especular que la celulosa podría ser el inductor primario, así como en *T. reesei*, en el que la inducción por celulosa induce también la expresión de hemicelulasas y xilanasas^{36,61}. Sin embargo, esta hipótesis necesita ser comprobada. Por otra parte, en dicho estudio se identificó la celobiohidrolasa 1 como la proteína extracelular producida mayormente durante el crecimiento en Avicel® y en *Miscanthus*, y que la delección del gen *cbh1* causa deficiencias severas en el crecimiento sobre estos sustratos⁶⁵, a diferencia de *T. reesei*, en el que el fenotipo más severo es causado por la delección de *cbh2*⁵⁶.

Sun y Glass, en 2011, evaluaron el nivel de expresión de genes y la actividad de celulasas en un mutante para el ortólogo de *cre1/creA* en *N. crassa*. Cuando este mutante se sembró en un medio con celulosa cristalina (Avicel®) como única fuente de carbono, mostró una mayor velocidad en el consumo del sustrato en comparación con la cepa silvestre (3-4 frente a 5-6 días), el 30% más de proteínas secretadas al medio y el aumento del 50% en la actividad de endoglucasas, lo que indica el rol de *cre1* en la represión de la expresión de celulasas⁶³, al igual que sus ortólogos en *T. reesei*^{10,26,44,60} y en *A. niger*^{14,52}. En este mismo estudio se identificaron 9 genes, blancos directos de Cre1, entre los que se encuentran el ortólogo de *amyA* de *Aspergillus oryzae*, involucrado en la degradación del almidón, el gen *cbh1*, 2 genes que codifican para xilanasas, un gen que codifica para una glucosidasa y un gen para un transportador de monosacáridos, lo que evidencia que Cre1 puede regular directamente algunos genes involucrados en el transporte de azúcares, además de genes que codifican para enzimas asociadas a la utilización de diversas fuentes de carbono⁶³.

Recientemente se reportaron 2 nuevos factores de transcripción en *N. crassa*, requeridos para el crecimiento y la actividad enzimática sobre celulosa, pero no requeridos sobre hemicelulosa o xilano. Estos son *clr1* y *clr2*, que codifican para factores de transcripción de la superfamilia del cluster binuclear de cinc específicos de hongos. Estos fueron identificados mediante la selección de mutantes con crecimiento deficiente en celulosa cristalina (Avicel®). Estos investigadores evaluaron 269 mutantes de *N. crassa*, cada uno de ellos con delección de un gen para un posible factor de transcripción, incluyendo los ortólogos de *xlnR/xyr1*, *ace1* y *hap2*, los cuales, en contra de lo que se esperaba, no mostraron ninguna diferencia en el crecimiento sobre Avicel® en comparación con la cepa silvestre⁸. De estos resultados se puede inferir que el homólogo de XlnR/Xyr1 no es necesario para la expresión de genes de celulasas en *N. crassa*, como sí lo es para *A. niger*^{21,70,71} y *T. reesei*^{36,61}, lo que evidencia que las diferentes especies de hongos han desarrollado mecanismos diferentes en respuesta a distintos inductores, provenientes de fuentes complejas como la celulosa o la hemicelulosa. Por otra parte, Clr1 promueve la expresión de genes de celulasas, específicamente β-glucosidasas, y otros necesarios para la utilización de la celobiosa, así como la expresión de *clr2*, mientras que Clr2 induce la expresión de genes de otras celulasas y hemicelulasas, posiblemente formando un heterocomplejo con la molécula activa de Clr1⁸.

Similar a lo publicado por Portnoy et al. (2011) para *T. reesei*⁴⁹, la delección de *clr1* y *clr2* en *N. crassa* tiene efecto sobre un gran número de genes, indicando lo complejo de estos sistemas. Trescientos treinta y tres genes presentan expresión diferencial en estos mutantes, de los cuales 212 presentaron expresión aumentada en Avicel®, entre los que se encuentran 17 de 24 celulasas predichas, 11 de 19 hemicelulasas predichas, 22 de enzimas con actividad sobre polisacáridos, 56 de proteínas de la vía secretoria, 13 transportadores, 3 componentes del complejo de traslocación del retículo endoplasmático, 2 retículo endoplasmático disulfuro isomerasas, 2 proteínas chaperonas (HSP70, calreticulina), 7 enzimas citosólicas con actividad sobre disacáridos y un homólogo a *xyr1*⁸. Se observa para

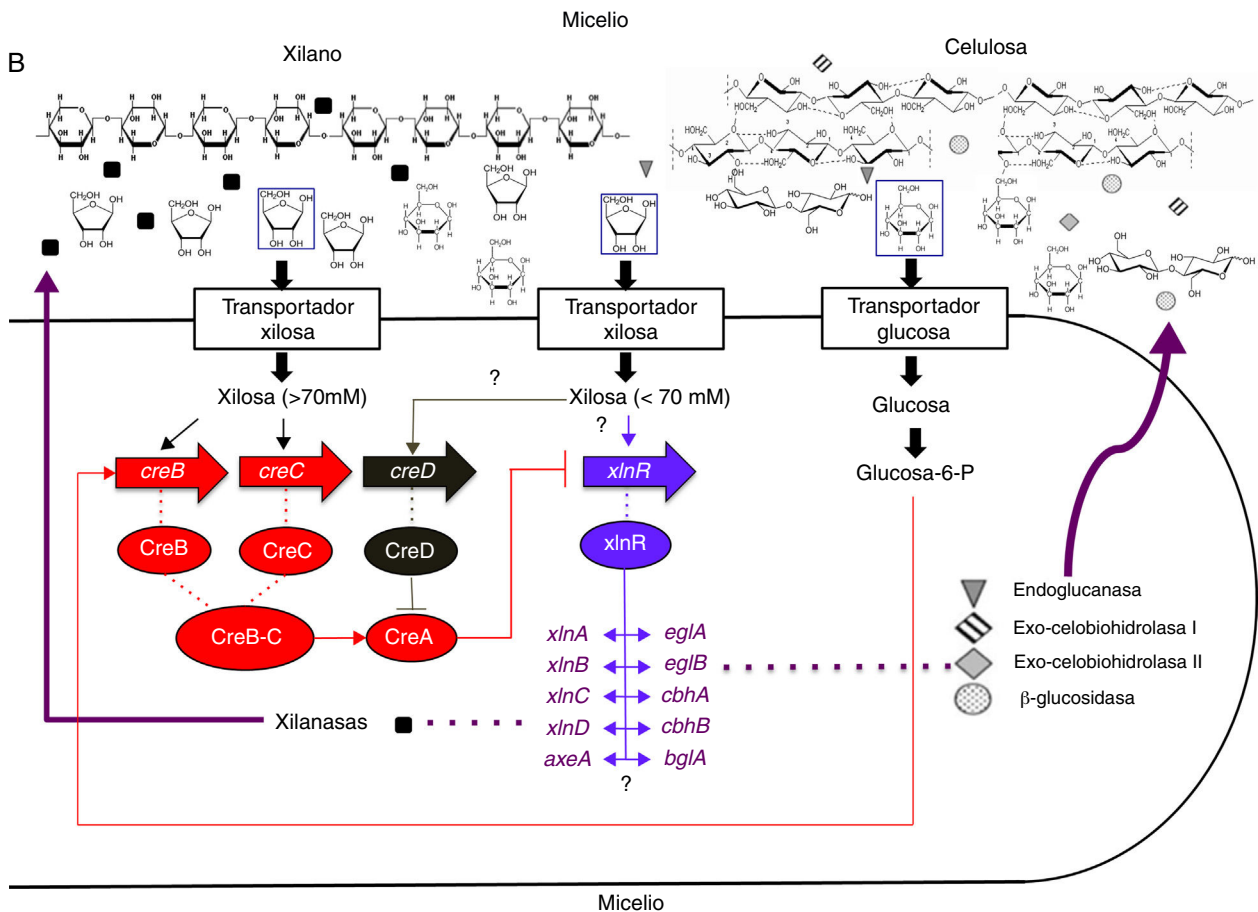
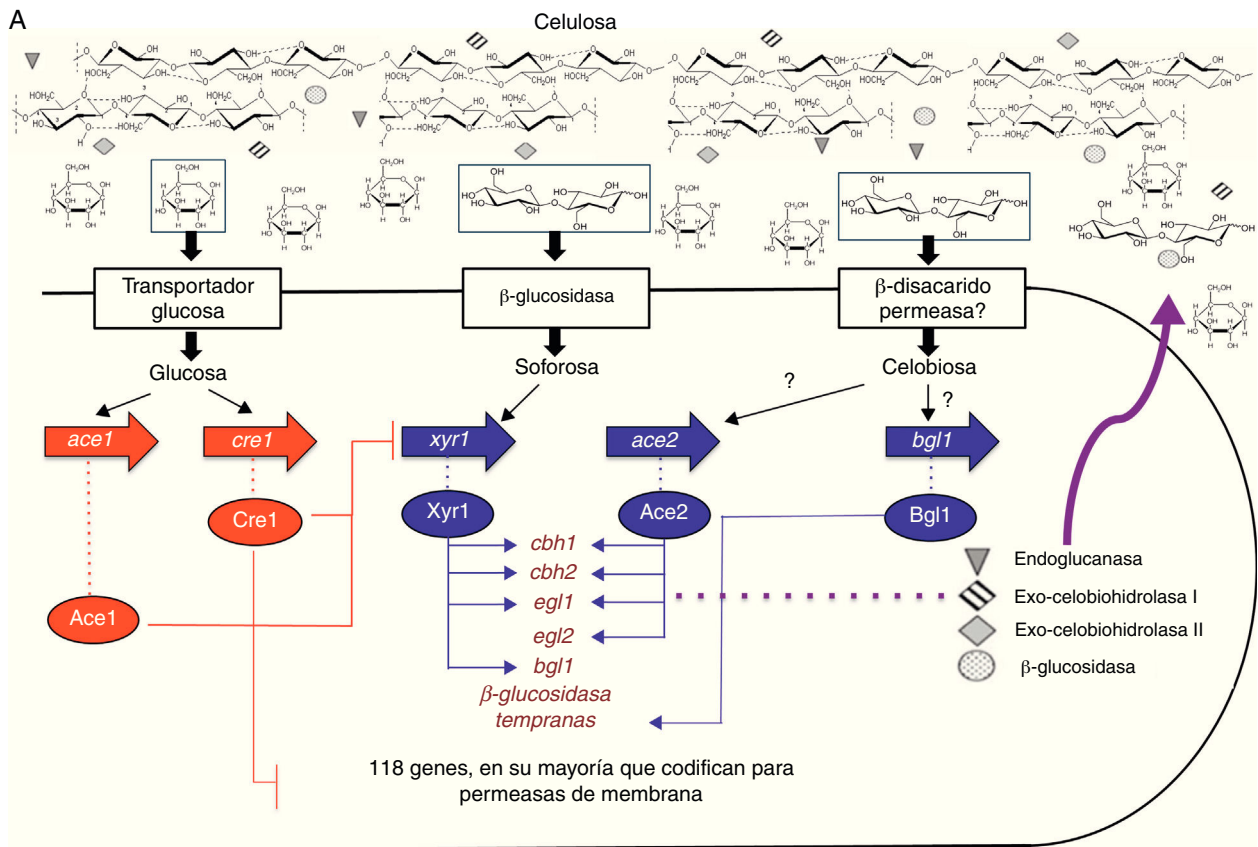


Figura 3. Modelo para la regulación de la expresión de celulasas en: A. *Trichoderma reesei*, B. *Aspergillus niger/nidulans*, C. *Neurospora crassa*.

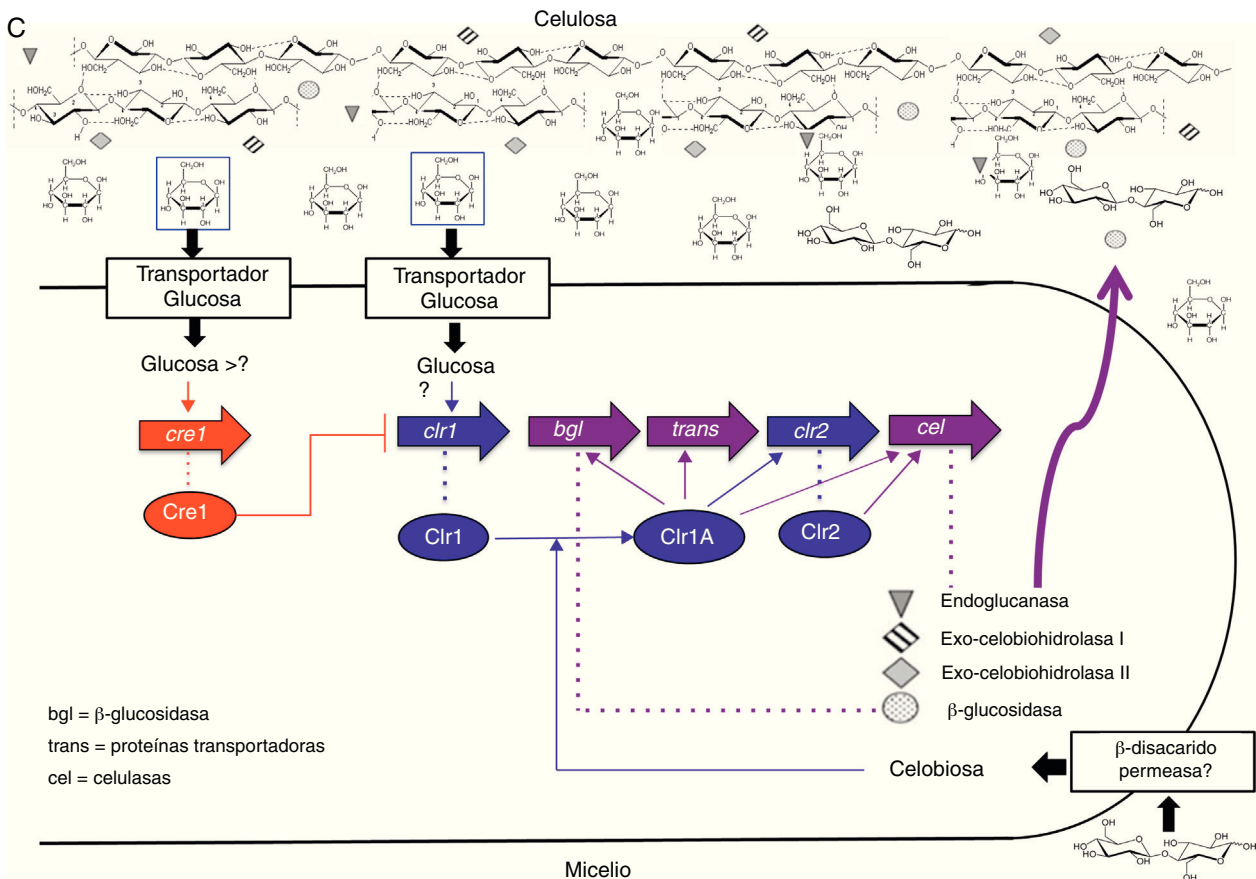


Figura 3. (Continuación).

N. crassa, al igual que para *T. reesei*, un gran número de genes que codifican para proteínas con funciones de secreción; ello evidencia que la modificación de estas vías es requerida para el incremento de la secreción de proteínas que acompañan el metabolismo de la celulosa.

Conclusiones y perspectivas

A pesar de la abundancia de la celulosa, solamente un pequeño porcentaje de microorganismos son capaces de degradarla completamente; uno de los más importantes grupos corresponde a los hongos filamentosos. Dentro de este grupo, *T. reesei*, *A. niger*, *A. nidulans* y, recientemente, *N. crassa* han sido extensamente estudiados con el fin de comprender no solamente los mecanismos de hidrólisis enzimática, sino también la regulación de la expresión de los genes que codifican para estas enzimas. Los resultados de estas investigaciones muestran que los mecanismos de hidrólisis enzimática son muy similares en estos microorganismos, no así los mecanismos de regulación, en los que se encuentran similitudes y diferencias. Una de las mayores similitudes entre *T. reesei* y *A. niger/A. nidulans* es la presencia de un factor transcripcional general (*Xyr1/XlnR*) responsable de la activación de la transcripción del sistema bajo condiciones de inducción. Sin embargo, esta condición de inducción es diferente: mientras que en *Aspergillus* la mayoría de celulasas son correguladas con las xilanasas a partir de una sola molécula inductora (D-xilosa), en *T. reesei* la inducción se da por soforosa o celobiosa de una manera independiente de las xilanasas. Además, en *T. reesei* se han identificado otros reguladores positivos, *Ace2* y *Bgl1*, cuyos ortólogos no han sido reportados en *Aspergillus* (fig. 3A y B). Por otra parte, el ortólogo de *xyr1/xlnR* en *N. crassa* no es necesario para la expresión de celulasas en este

microorganismo (fig. 3C), lo que demuestra que las especies de hongos han desarrollado diferentes mecanismos en respuesta a los mismos inductores.

Otra característica en común en estos sistemas es el fenómeno de represión catabólica, en donde el producto final de la hidrólisis enzimática es el directo responsable de la regulación negativa a nivel transcripcional. Este mecanismo evita que el hongo sintetice una cantidad excesiva de celulasas cuando existe disponibilidad de otras fuentes más fácilmente asimilables. En los 3 modelos estudiados, *T. reesei*, *A. niger/A. nidulans* y *N. crassa*, los genes ortólogos *cre1/creA* son los responsables de dicha regulación (fig. 3A, B y C). Aún no está del todo claro el mecanismo por el cual se activa este sistema. A este respecto, el modelo más estudiado es *A. nidulans*, en el que se encontró que dicha activación se da a través de una cascada de regulación que involucra ubiquitinación-desubiquitinación.

Por otro lado, los estudios más recientes que utilizan las nuevas tecnologías disponibles han demostrado que la función regulatoria de estos genes, ya sean reguladores positivos o negativos, es mucho más compleja de lo que se conocía, implicando la activación, la modulación y la represión de muchos otros genes, además de las celulasas, a través de redes complejas de regulación génica. Dilucidar los mecanismos de regulación de estos sistemas es fundamental, no solamente para el avance del conocimiento básico, sino desde un punto de vista biotecnológico para controlar de una manera más eficiente las condiciones tanto externas (medio ambiente) como internas (regulación de la expresión en el microorganismo), necesarias para la hidrólisis eficiente de la celulosa, de manera que esta reserva renovable de carbono pueda ser utilizada como una alternativa real, factible técnica y económicamente, a las fuentes de carbono no renovables.

Conflicto de intereses

Las autoras declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia y a BIOCULTIVOS S. A, por la financiación del proyecto «Desarrollo de un bioinoculante para la incorporación de residuos de cosecha mediante su descomposición *in situ* empleando microorganismos lignocelulolíticos», dentro del cual se enmarca este trabajo. Y a todos aquellos que contribuyeron con sus observaciones a la redacción de este manuscrito.

Bibliografía

- Ali UF, Saad El-Dein HS. Production and partial purification of cellulase complex by *Aspergillus niger* and *A. nidulans* grown on water hyacinth blend. *J Appl Sci Res*. 2008;4:875–91.
- Archer DB, Wood DA. Fungal exoenzymes. En: Gow NAR, Gadd GM, editores. *The growing fungus*. London: Chapman & Hall; 1994. p. 473.
- Aro N, Ilmén M, Saloheimo A, Penttilä M. ACE1 of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:56–65.
- Aro N, Saloheimo A, Ilmén M, Penttilä M. ACE1, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem*. 2001;276:24309–14.
- Bhat M, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol Adv*. 1997;15:583–620.
- Boase NA, Kelly JM. A role for creD, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination. *Mol Microbiol*. 2004;53:929–40.
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ. Carbohydrate-binding modules: Fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J*. 2004;382:769–81.
- Coradetti ST, Craig JP, Xiong Y, Shock T, Tian C, Glass NL. Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109:7397–402.
- Coutinho PM, Andersen MR, Kolenova K, vanKuyk PA, Benoit I, Gruben BS, et al. Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol*. 2009;46 Suppl 1:S161–9.
- Cziferszky A, Mach RL, Kubicek CP. Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *J Biol Chem*. 2002;277:14688–94.
- David H, Krogh AM, Roca C, Akesson M, Nielsen J. CreA influences the metabolic fluxes of *Aspergillus nidulans* during growth on glucose and xylose. *Microbiology*. 2005;151 Pt 7:2209–21.
- Davies G, Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 1995;3:853–9.
- De Vries R, Visser J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65:497–522.
- De Vries RP, Visser J, de Graaff LH. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res Microbiol*. 1999;150:281–5.
- El-Gogary S, Leite A, Crivellaro O, Eveleigh DE, El-Dorry H. Mechanism by which cellulase triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:6138–41.
- Fan L, Lee Y, Beardmor D. The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng*. 1981;23:419–24.
- Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn-Coleman NS, et al. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem*. 2003;278:31988–97.
- Galagan J, Calvo S, Borkovich K, Selker E, Read N, Jaffe D, et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 2003;422:859–68.
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*. 2005;438:1105–15.
- Gao J, Weng H, Xi Y, Zhu D, Han S. Purification and characterization of a novel endo- β -1,4-glucanase from the thermoacidophilic *Aspergillus terreus*. *Biotechnol Lett*. 2007;30:323–7.
- Gielkens M, Dekkers E, Visser J, de Graaff LH. Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:4340–5.
- Gupta R, Lee YY. Mechanism of cellulase reaction on pure cellulosic substrates. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102:1570–81.
- Gusakov AV, Salanovich TN, Antonov AI, Ustinov BB, Okunev ON, Burlingame R, et al. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol Bioeng*. 2007;97:1028–38.
- Hasper AA, Dekkers E, van Mil M, van de Vondervoort PJJ, de Graaff LH. EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:1556–60.
- Henrissat B, Davi GJ. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol*. 2000;124:1515–9.
- Ilmén M, Thrane C, Penttilä M. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: Isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol Gen Genet*. 1996;251:451–60.
- Karmakar M, Ray R. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Res J Microbiol*. 2011;6:41–53.
- Kawamori M, Morikawa Y, Shinsha Y, Takayama K, Takasawa S. Preparation of mutants resistant to catabolite repression of *Trichoderma reesei*. *Agric Biol Chem*. 1985;49:2875–9.
- Kim DW, Kim TS. Purification of cellulase from *Trichoderma viride* and properties of its component enzymes. *Bull Korean Chem Soc*. 1994;15:719–24.
- Kubicek CP. Involvement of a conidial endoglucanase and a plasma-membrane-bound P-glucosidase in the induction of endoglucanase synthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. *J Gen Microbiol*. 1987;133:1481–7.
- Kubicek CP. Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. *J Biotechnol*. 2012;163:133–42 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.020>
- Kubicek CP, Mikus M, Schuster A, Schmol M, Seiboth B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Biofuels*. 2009;2:1–14.
- Kubicek CP, Muhlbauer I, Klotz M, Jhon E, Kubicek-Pranz EM. Properties of a conidial-bound cellulase enzyme system from *Trichoderma reesei*. *J Gen Microbiol*. 1988;134:1215–22.
- Lockington RA, Kelly JM. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* involves deubiquitination. *Mol Microbiol*. 2001;40:1311–21.
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66:506–77.
- Mach-Aigner A, Pucher M, Steiger M, Bauer G, Preis S, Mach RL. Transcriptional regulation of *xyl1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:6554–62.
- Malcolm Brown Jr R. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *J Polym Sci A1*. 2004;42:487–95.
- Malherbe S, Cloete T. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2002;1:105–14.
- Mandels M, Parrish FW, Reese ET. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *J Bacteriol*. 1962;83:400–8.
- Mandels M, Reese ET. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J Bacteriol*. 1960;79:816–26.
- Mandels M, Reese ET. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J Bacteriol*. 1957;73:269–78.
- Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol*. 2008;26:553–60.
- Metz B, Seidl-Seiboth V, Haarmann T, Kopchinskiy A, Lorenz P, Seiboth B, et al. Expression of biomass-degrading enzymes is a major event during conidium development in *Trichoderma reesei*. *Eukaryot Cell*. 2011;10:1527–35.
- Nakari-Setälä T, Paloheimo M, Kallio J, Vehmaanperä J, Penttilä M, Saloheimo M. Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:4853–60.
- Nidetzky B, Steiner W, Hayn M, Claeysens M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: A new model for synergistic interaction. *Biochem J*. 1994;298:705–10.
- Nitta M, Furukawa T, Shida Y, Mori K, Kuhara S, Morikawa Y, et al. A new Zn(II)2Cys6-type transcription factor BglR regulates β -glucosidase expression in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol*. 2012;49:388–97 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.02.009>
- Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol*. 2007;25:221–31.
- Peterson R, Nevalainen H. *Trichoderma reesei* RUT-C30—Thirty years of strain improvement. *Microbiology*. 2012;158 Pt 1:58–68.
- Portnoy T, Margeot A, Linke R, Atanasova L, Fekete EB, Sándor E, et al. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: A master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics*. 2011;12:269.
- Rauscher R, Wurleitner E, Wacenovskiy E, Aro N, Stricker AR, Zeilinger S, et al. Transcriptional regulation of *xyn1*, encoding Xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell*. 2006;5:447–56.
- Rowland HD, Perkins DD. *Neurospora*: A model of model microbes. *Nat Rev Genet*. 2002;3:7–13.
- Ruijter GJ, Visser J. Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;151:103–14.
- Saloheimo A, Aro N, Ilmén M, Penttilä M. Isolation of the ace1 gene encoding a Cys2-His2 transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem*. 2000;275:5817–25.
- Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, Pere J, Swanson B, Nyyssönen E, et al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur J Biochem*. 2002;269:4202–11.
- Schneider T, Keiblinger KM, Schmid E, Sterflinger-Gleixner K, Eilersdorfer G, Roschitzki B, et al. Who is who in litter decomposition? Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions. *ISME J*. 2012;6:1749–62.
- Seiboth B, Hakola S, Mach RL, Suominen P, Kubicek CP. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. *J Bacteriol*. 1997;179:5318–20.

57. Singhanian RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, Pandey A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb Technol.* 2010;46:541–9.
58. Sternberg D, Mandels GR. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J Bacteriol.* 1979;139:761–9.
59. Strauss J, Horvath HK, Abdallah BM, Kindermann J, Mach RL, Kubicek CP. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Mol Microbiol.* 1999;32:169–78.
60. Strauss J, Mach RL, Zeilinger S, Hartler G, Stöffler G, Wolschek M, et al. CreI, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett.* 1995;376:103–7.
61. Stricker AR, Grosstessner-Hain K, Würleitner E, Mach RL. Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell.* 2006;5:2128–37.
62. Stricker AR, Mach RL, de Graaff LH. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;78:211–20.
63. Sun J, Glass NL. Identification of the CRE-1 cellulolytic regulon in *Neurospora crassa*. *PLoS One.* 2011;6:25654.
64. Suto M, Tomita F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *J Biosci Bioeng.* 2001;92:305–11.
65. Tian C, Beeson WT, Lavarone AT, Sun J, Marletta MA, Cate JHD, et al. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:22157–62.
66. Tomme P, Tilbeurgh H, Pettersson G, Damme J, Vandekerckhove J, Knowles J, et al. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. *Eur J Biochem.* 1988;170:575–81.
67. Umile C, Kubicek CP. A constitutive, plasma membrane-bound β -glucosidase in *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol Lett.* 1986;34:291–5.
68. Vaherim P, Leisolam P, Kaupinnen V. Transglycosylation products of the cellulase system of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Lett.* 1979;1:1–46.
69. Van Dyk JS, Pletschke BI. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol Adv.* 2012;30:1458–80.
70. Van Peij NN, Gielkens MM, de Vries RP, Visser J, de Graaff LH. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:3615–9.
71. Van Peij NN, Visser J, de Graaff LH. Isolation and analysis of *xlnR*, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Mol Microbiol.* 1998;27:131–42.
72. Wilson DB. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14:259–63.
73. CAZypedia. Withers S, Williams S. Glycoside hydrolases [consultado 24 Sep 2013]. Disponible en: <http://www.cazypedia.org/>
74. Zeilinger S, Ebner A, Marosits T, Mach RL, Kubicek CP. The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the *cbh2* (cellobiohydrolase II-gene) activating element. *Mol Genet Genomics.* 2001;266:56–63.
75. Zeilinger S, Mach RL, Kubicek CP. Two adjacent protein binding motifs in the *cbh2* (cellobiohydrolase II-encoding) promoter of the fungus *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cooperate in the induction by cellulose. *J Biol Chem.* 1998;273:34463–71.