



## REVISIÓN

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



Ivonne Gutiérrez-Rojas<sup>a,b,\*</sup>, Nubia Moreno-Sarmiento<sup>a,c</sup> y Dolly Montoya<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> 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

<sup>c</sup> 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

$7,2 \times 10^{11}$  toneladas<sup>31</sup>. 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 años<sup>72</sup>, 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 enzimas<sup>72</sup>.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [ivonne.gutierrez@javeriana.edu.co](mailto: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 completamente<sup>5</sup>. 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 patógenos<sup>2</sup>. 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*<sup>35,65</sup>. 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 celulósicos<sup>72</sup>.

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 detergentes<sup>55</sup>. 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 económico<sup>27</sup>. 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 estas<sup>35</sup>, y también es sintetizado por bacterias y una variedad amplia de algas<sup>37</sup>. Está constituida por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -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 cadena<sup>37</sup>. 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 biológica<sup>35</sup>. 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 celulosa<sup>38</sup>. 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 celulolíticas<sup>35</sup>.

## 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<sup>12,73</sup>. 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<sup>7,25</sup>.

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, generalmente<sup>73</sup>. 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 inversión<sup>12</sup>. 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 hidrolizado<sup>73</sup> (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<sup>12,73</sup> (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 aerobios<sup>38</sup>, objeto de esta revisión. De cualquier forma, el sistema de celulasas típico incluye 3 tipos de enzimas: 1) endoglucanasas o 1,4- $\beta$ -D-glucano-4-glucanohidrolasas (EC.3.2.1.4); 2) exoglucanasas, que incluyen 1,4- $\beta$ -D-glucano-glucanohidrolasas (celodextrinasas) (EC 3.2.1.74) y 1,4- $\beta$ -D-glucano-celobiohidrolasas (celobiohidrolasas) (EC.3.2.1.91), y 3)  $\beta$ -glucosidasas o  $\beta$ -glucosidasa hidrolasas (EC.3.2.1.21)<sup>13,35,38</sup>. 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  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan las celodextrinas solubles y la celobiosa a glucosa<sup>35,38</sup>.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3418736>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3418736>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)