

EFFECTO DE CATIONES SOBRE LA PRODUCCION Y ACTIVIDAD DEL SISTEMA CELULASA DE *NECTRIA CATALINENSIS* (FUNGI, ASCOMYCETES)

Por ALEJANDRO G. PARDO* y FLAVIA FORCHIASSIN*

Summary *Effect of cations on cellulase system production and activity of Nectria catalinensis.* (Fungi, Ascomycetes). The effect of Ca^{++} , Mn^{++} , Fe^{+++} and Zn^{++} on cellulolytic enzymes (endoglucanase, exoglucanase, cellobiase and β -glucosidase) production and activity, and cellulose degradation, in *Nectria catalinensis* was assayed. Optimal concentrations of all the cations tested for cellulase system production were achieved. Ca^{++} was the only cation that enhanced the cellulose degradation in this fungus. With respect to the activity of the different types of cellulases, no cofactors were required. Nevertheless, Zn^{++} concentrations higher than 1 mM inhibited cellulase activities. In the same way, Mn^{++} was inhibitory for endoglucanase and exoglucanase activities, in concentrations higher than 1 mM and $1\mu\text{M}$, respectively.

INTRODUCCION

La degradación de celulosa por intermedio de los hongos se lleva a cabo mediante la acción sinérgica de un sistema multienzimático, extracelular, que cataliza la hidrólisis del polímero a unidades de glucosa y está sujeto a inducción y represión catabólica (Sternberg, 1976; Brown, 1983; Ryu y Mandels, 1980; Sternberg y Mandels, 1982), siendo el inductor real un producto soluble de la hidrólisis de celulosa.

Las celulasas fúngicas están constituidas básicamente por tres grupos de enzimas: 1- Endoglucanasas (1,4- β -D-glucan 4-glucanohidrolasas), que producen una disminución en el grado de polimerización de la celulosa, por cortes al azar sobre la cadena glucosídica; 2- Exoglucanasas (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas y 1,4- β -D-glucan glucohidrolasas), que liberan respectivamente celobiosa o glucosa a partir de extremos no reductores; y 3- Celobiasas (β -D glucósido glucohidrolasas), las cuales clivan a la celobiosa en dos unidades de glucosa, y se incluyen dentro del grupo más amplio de las β -glucosidasas. Además, todas las celulasas fúngicas estudiadas hasta el momento presentan isoenzimas (Wood y García Campayo, 1990; Coughlan, 1985), dependiendo el número de éstas de la cepa utilizada y de la forma en que la misma ha sido cultivada (Wood y García Campayo, *op. cit.*). *Nectria catalinensis* es una especie perteneciente al orden

Hypocreales, cuyo hábitat natural son troncos muertos de *Gleditsia triacanthos* (Lima *et al.*, 1988). Estudios previos (Pardo y Forchiassin, 1994) han demostrado la actividad celulolítica de esta especie. El objetivo del presente trabajo fue el de determinar el efecto de ciertos cationes sobre la producción del sistema celulolítico y la biodegradación de celulosa por *Nectria catalinensis*, *in vitro*; así como su efecto sobre la actividad de las distintas enzimas del complejo celulolítico. La presencia de iones metálicos como micro o macronutrientes esenciales y específicos ha sido demostrada para numerosos hongos, como fundamentales para un desarrollo óptimo (Fothergill y Child, 1964; Ross, 1975; Gaunt *et al.*, 1984; Herr, 1973) o para la producción de determinados metabolitos de importancia industrial (Foster y Waksman, 1939) o biológica (White y Johnson, 1971).

MATERIALES Y METODOS

Organismo: Nectria catalinensis Lima. BAFC 30700. Los cultivos se mantuvieron a 5°C en medio APG (agar-papa-glucosado).

Medio de cultivo estándar: SO_4Mg , 7H₂O, 0,5 g; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,5 g; PO_4HK_2 , 0,6 g; Cl_2Ca , 0,11 g; SO_4Cu , 5H₂O, 0,4 mg; Cl_2Mn , 4H₂O, 0,09 mg; BO_3H_3 , 0,07 mg; MoO_4Na_2 , 0,02 mg; Cl_3Fe , 1mg; Cl_2Zn , 10 mg; tiamina, 0,1 mg; tween 80, 2 ml; celulosa cristalina, 10 g; tartrato de amonio, 4,9 g; agua bidestilada, hasta 1 l.

Efecto de cationes sobre la producción del sistema celulolítico

Tratamientos: Se probó el efecto de los cationes Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Fe^{+++} y Zn^{++} , sobre la producción

* Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1428 Buenos Aires, Argentina. A.G.P.: Becario CONICET. F. F.: Investigadora CONICET.

del sistema celulolítico, degradación de celulosa y crecimiento de *Nectria catalinensis*. El diseño experimental para tal fin consistió en cinco series de experimentos, variando en cada uno la concentración de un catión, manteniendo fijas las concentraciones de los demás. El rango de concentraciones para cada catión fue tomado en seis puntos, incluido el control: Ca⁺⁺, 0-444 mg/l (0-3 mM) de Cl₂Ca; Mg⁺⁺, 0-2 g/l (0-8 mM) de SO₄Mg. 7H₂O; Mn⁺⁺, 0-360 µg/l (0-1,8 µM) de Cl₂Mn. 4H₂O; Fe⁺⁺⁺, 0-4 mg/l (0-15 µM) de Cl₃Fe; Zn⁺⁺, 0-40 mg/l (0-0,3 mM) de Cl₂Zn. En todos los casos reemplazando al compuesto en el medio estándar. Las concentraciones fijas de los restantes cationes, fueron las correspondientes al medio estándar. Los medios de cultivo fueron autoclavados a 121°C y 1,2 atm., por 20 min.; excepto la fuente de N y la solución stock de tiamina, las cuales fueron esterilizadas separadamente por filtración; y todos los componentes fueron mezclados en condiciones estériles. Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico. Los cultivos se llevaron a cabo en erlenmeyers de 125 ml, con 50 ml de medio de cultivo. La incubación tuvo lugar en cámara de cultivo New Brunswick G-27 a 23°C y agitación rotativa constante de 125 rpm. La cosecha de los sólidos de cultivo fue realizada el vigésimo día, en embudo Buchner a presión reducida, a través de papel de filtro. Los sólidos de cultivo retenidos fueron lavados con agua bidestilada, secados en estufa a 70°C durante 18 hs., pesados, molidos y guardados a -20°C.

El pH inicial y final de los medios de cultivo fue medido con un pHmetro Photovolt. El pH inicial en todos los casos fue de 6,5.

Estimación del crecimiento

Proteínas de micelio: Se tomaron 100 mg de sólidos de cultivo y fueron hidrolizados por 30 min. a 100°C en NaOH 1N. Las muestras se centrifugaron 20 min. a 1000 x g y las proteínas extraídas fueron dosadas, en el sobrenadante, por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina, 1 mg/ml en NaOH 1N, como estándar. Los resultados se expresan como µg de proteínas/ml de medio de cultivo.

Celulosa consumida

El pellet obtenido luego de la hidrólisis alcalina para determinación de proteínas de micelio fue lavado con agua bidestilada por resuspensión, centrifugado 20 min. a 1000 x g, e hidrolizado durante 40 min. a 90°C con ácido acético glacial: ácido nítrico: agua bidestilada (10: 1: 1). Luego de centrifugar, lavar por resuspensión y centrifugar

nuevamente a 1000 x g, 20 min., el sedimento fue resuspendido en agua bidestilada, filtrado a presión reducida en embudo Buchner a través de papel de filtro, lavado con agua bidestilada, y secado en estufa a 70°C durante 18 hs. El residuo seco que queda en el papel de filtro corresponde, fundamentalmente, a celulosa no consumida en el cultivo (Mercuri, 1987). Los resultados se expresan como mg de celulosa consumida/ml de medio de cultivo.

Medición de las actividades enzimáticas

En todos los casos la fuente de enzima fue sobrenadante (Sn) proveniente de homogenatos de cultivo. Para ello se homogeneizaron los cultivos en el mismo erlenmeyer, con un homogeneizador Omni 5000, luego de lo cual se centrifugó a 1000 x g durante 20 min.; el pellet fue descartado y el Sn resultante utilizado como fuente de enzima. El contenido proteico de estos Sn fue dosado por el método de Bradford (*op. cit.*) utilizando albúmina sérica bovina (1 mg/ml) como estándar.

Endo-β-D-1,4-glucanasa: Se mezclaron 400 µl de carboximetilcelulosa (CMC) (5 mg/ml en buffer acetato de sodio 0,1 M, pH = 4,8) con 100 µl de Sn y se incubaron 30 min. a 50°C. Se midieron azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952; Nelson, 1944) utilizando glucosa (1 mg/ml) como estándar.

Exo-β-D-1,4-glucanasa: Se mezclaron 800 µl de celulosa cristalina (CC) (10 mg/ml en buffer acetato de sodio 0,1 M, pH = 4,8) con 200 µl de Sn y se incubaron 2 hs. a 38°C. Luego se centrifugaron los tubos a 1000 x g, 20 min., se descartó el pellet de CC y en el Sn se midieron azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson (Somogyi, *op. cit.*; Nelson, *op. cit.*), utilizando glucosa (1 mg/ml) como estándar.

Unidad de actividad: En ambos casos la unidad de actividad enzimática (U) es la cantidad de enzima requerida para liberar, en las condiciones del ensayo, 1 nmol/min. de azúcar reductor, expresado como equivalente de glucosa.

β-glucosidasa: Se mezclaron 900 µl de p-nitrofenil-β-D-1,4-glucopiranosido (0,2 mg/ml en buffer acetato de sodio 0,1 M, pH = 4,8) con 100 µl de Sn y se incubaron 1 h. a 50°C. La reacción se detuvo por el agregado de 2 ml de mezcla alcalina (50 ml de BO₃H₃ 0,1 M en ClK 0,1 M más 40,8 ml de NaOH 0,1 M y agua bidestilada hasta 100 ml, pH = 9,8) y se leyó la absorbancia a 430 nm. Se utilizó como estándar p-nitrofenol (1 mM en buffer acetato de sodio 0,1 M, pH = 4,8).

Unidad de actividad: La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar, en las condiciones del ensayo, 1 nmol de p-nitrofenol/min.

Celobiasa: Se mezclaron 50 μ l de celobiasa (4 mg/ml) con 250 μ l de buffer acetato de sodio 0,1 M pH = 4,8 y se agregaron 200 μ l de Sn. Se incubó a 50°C, 30 min., luego de lo cual se adicionó 1 ml de reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa. Se incubó a 37°C, 30 min., se paró la reacción con 2 ml de ClH 5 N y se midió la absorbancia a 520 nm. Se utilizó como estándar glucosa (1 mg/ml).

Unidad de actividad: La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 2 nmoles de glucosa/min., en las condiciones del ensayo.

Todas las actividades enzimáticas se expresan como unidades enzimáticas (U)/ml de medio de cultivo.

Efecto de cationes sobre la actividad de las enzimas del complejo celulolítico

Se cultivó a *Nectria catalinensis* en medio de cultivo estándar, durante veinte días, para la obtención de sobrenadante de cultivo, utilizando la misma metodología que en los experimentos anteriores. Parte de este sobrenadante (extracto crudo) fue guardado a -20°C y utilizado posteriormente para medir las actividades enzimáticas en distintos tratamientos.

Otra parte de este sobrenadante fue pasado a través de una columna de tamiz molecular Sephadex G-25, utilizando agua bidestilada como solvente de desarrollo. Las fracciones con mayor actividad fueron juntadas, liofilizadas y resuspendidas en un volumen apropiado de agua bidestilada (G-25), guardadas a -20°C y posteriormente utilizadas para la medición de las actividades enzimáticas en distintos tratamientos.

Tratamientos:

Se midieron las actividades endoglucanasa, exoglucanasa, celobiasa y β -glucosidasa, de la misma manera que en los experimentos de producción enzimática, en los siguientes tratamientos:

C: Extracto crudo (control).

C + E: Extracto crudo más EDTA 2 mM.

C + S: Extracto crudo más Cl_2Mn . 4H₂O, 10 mM; SO_4Mg . 7H₂O, 10 mM; Cl_2Ca , 10 mM y Cl_2Zn , 10 mM.

G-25: Eluato de Sephadex G-25.

G-25 + E: Eluato de Sephadex G-25 más EDTA 2 mM.

G-25 + S: Eluato de Sephadex G-25 más Cl_2Mn . 4H₂O, 10 mM; SO_4Mg . 7H₂O, 10 mM; Cl_2Ca , 10 mM y Cl_2Zn , 10 mM.

C + Mn: Extracto crudo más Cl_2Mn . 4H₂O, 10 mM.

C + Zn: Extracto crudo más Cl_2Zn , 10 mM.

C + Ca: Extracto crudo más Cl_2Ca , 10 mM.

C + Mg: Extracto crudo más SO_4Mg . 7H₂O, 10 mM.

Para los casos de inhibición de la actividad de las distintas enzimas, por parte de un determinado catión, se realizaron curvas de inhibición dosis-respuesta, variando la concentración final de la sal correspondiente en el ensayo entre 0 y 100 mM.

En estos experimentos los resultados se expresan como porcentaje de actividad enzimática específica relativa al control (extracto crudo).

Actividad enzimática específica: Se define como unidades enzimáticas (U)/ μ g de proteínas.

Todos los resultados presentados en este trabajo son el promedio de tres experimentos realizados por triplicado. Cada determinación fue realizada tres veces. El error estándar, en todos los casos, fue menor al 5%. Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Calcio

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos respecto del crecimiento y producción enzimática de *Nectria catalinensis* en respuesta a distintas dosis de Ca^{++} . Respecto de la producción del sistema celulolítico, el óptimo para la endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa se alcanzó con 55 mg/l de Cl_2Ca ; mientras que la máxima producción de celobiasa se dio con una concentración de 22-55 mg/l de Cl_2Ca . Los valores más altos de proteínas de micelio se alcanzaron con la concentración más elevada de Ca^{++} ; presentando un plateau en las concentraciones intermedias.

Respecto al consumo de celulosa, se observó un leve aumento con el incremento en la concentración de Ca^{++} , con respecto al control, llegando a un plateau a partir de 110 mg/l de Cl_2Ca .

Se observa también que tanto las proteínas de sobrenadante como el pH final de los medios de cultivo descendieron a medida que se aumentó la concentración de Ca^{++} del medio.

Magnesio

Los resultados se muestran en la figura 2. Puede observarse una marcada variación en cuanto a la concentración de Mg^{++} óptima para la producción de exoglucanasa (2 g/l de SO_4Mg . 7H₂O) respecto de las concentraciones óptimas para el resto de las enzimas celulolíticas, cuyos valores máximos se obtuvieron con concentraciones del catión de entre

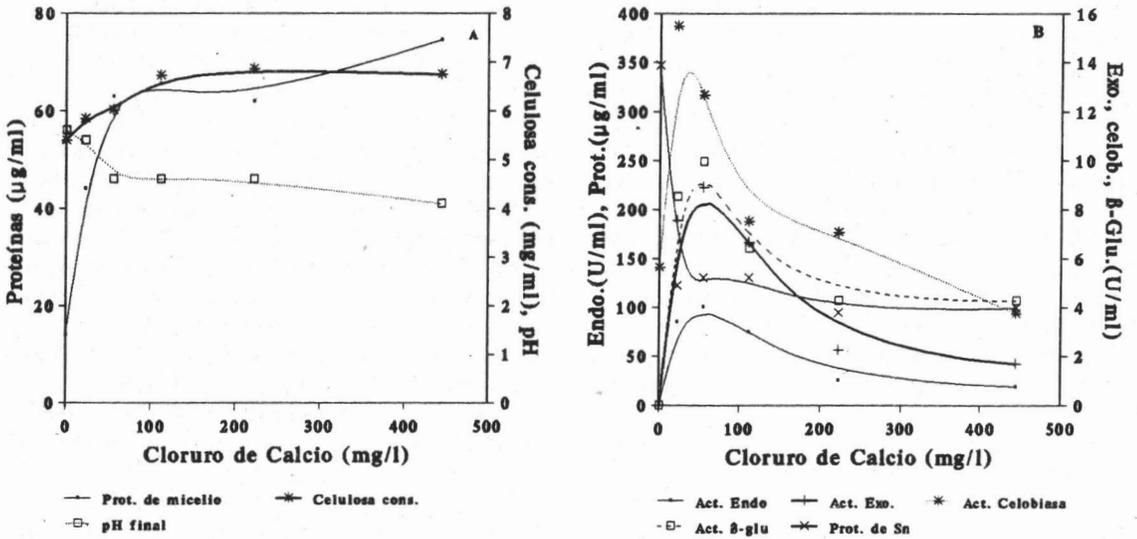


Fig. 1.— A: Crecimiento de *N. catalinensis*, medido como proteínas de micelio; consumo de celulosa y pH final del medio de cultivo; y B: Producción de las enzimas del complejo celulolítico (endoglucanasa, exoglucanasa, celobiasa y β-glucosidasa) y proteínas de sobrenadante; en función de distintas concentraciones de Cl_2Ca en el medio de cultivo.

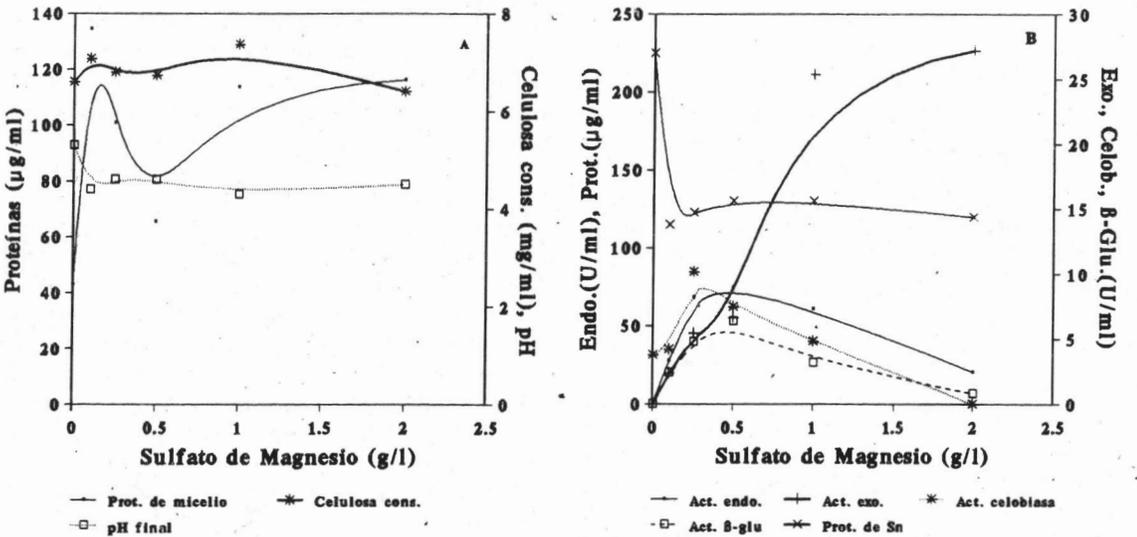


Fig. 2.— A: Crecimiento de *N. catalinensis*, medido como proteínas de micelio; consumo de celulosa y pH final del medio de cultivo; y B: Producción de las enzimas del complejo celulolítico (endoglucanasa, exoglucanasa, celobiasa y β-glucosidasa) y proteínas de sobrenadante; en función de distintas concentraciones de $SO_4Mg \cdot 7H_2O$ en el medio de cultivo.

0,25 y 0,5 g/l de $SO_4Mg \cdot 7H_2O$. No hubo variación en la degradación de celulosa, independientemente de la concentración de Mg^{++} utilizada.

Las proteínas de micelio presentaron un comportamiento fluctuante en función de la dosis de Mg^{++} .

Manganeso

En la figura 3 pueden verse los resultados obtenidos. Se observa que la endoglucanasa, exoglucanasa y β-glucosidasa presentaron un

comportamiento fluctuante, dependiendo de la concentración de Mn^{++} utilizada, obteniéndose las máximas producciones tanto en las concentraciones más bajas como en la mayor, observándose un leve decaimiento para concentraciones intermedias. Sin embargo, la celobiasa presentó un comportamiento totalmente distinto, dando su óptimo con una concentración de entre 90 y 180 $\mu g/l$ de $Cl_2Mn \cdot 4H_2O$. Con respecto a la degradación de celulosa, no se obtuvieron diferencias en función de la dosis de Mn^{++} .

Las proteínas de micelio tampoco presentaron diferencias, independientemente de la concentración de Mn^{++} utilizada.

Por otra parte, el pH final del medio de cultivo no sufrió variaciones entre los distintos tratamientos, mientras que el contenido de proteínas de sobrenadante fue mayor con la mayor concentración de Mn^{++} .

Hierro

Los resultados se muestran en la figura 4. Se incrementó la producción de endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa hasta llegar a un pequeño plateau con las concentraciones intermedias de Fe^{+++} , para luego seguir aumentando con concentraciones mayores del catión. En cambio, la celobiasa presentó un comportamiento diferente,

obteniéndose su máxima producción con una concentración de Cl_3Fe cercana a los 2 mg/l.

Por otra parte, el consumo de celulosa no varió en función de la concentración de Fe^{+++} .

Con respecto a las proteínas de micelio, su contenido fue variable según la dosis del catión, para dar su valor máximo con la concentración de Fe^{+++} más elevada.

Las proteínas de sobrenadante tuvieron valores fluctuantes pero su mayor concentración se dio con la concentración de Fe^{+++} más elevada, en concordancia con las producciones más altas de endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa.

Respecto del pH final de los cultivos, éstos descendieron a medida que se aumentó la concentración de Fe^{+++} hasta 0,5 mg/l de Cl_3Fe , a partir de la cual los valores de pH se mantuvieron constantes, para volver a descender con la máxima concentración de Fe^{+++} .

Zinc

En la figura 5 se presentan los resultados obtenidos. Entre 5 y 10 mg de Cl_2Zn/l fue el rango de concentraciones en el cual se obtuvieron las máximas producciones de endoglucanasa, exoglucanasa y celobiasa; en cambio, la producción más alta de β -glucosidasa se obtuvo con la concentración de

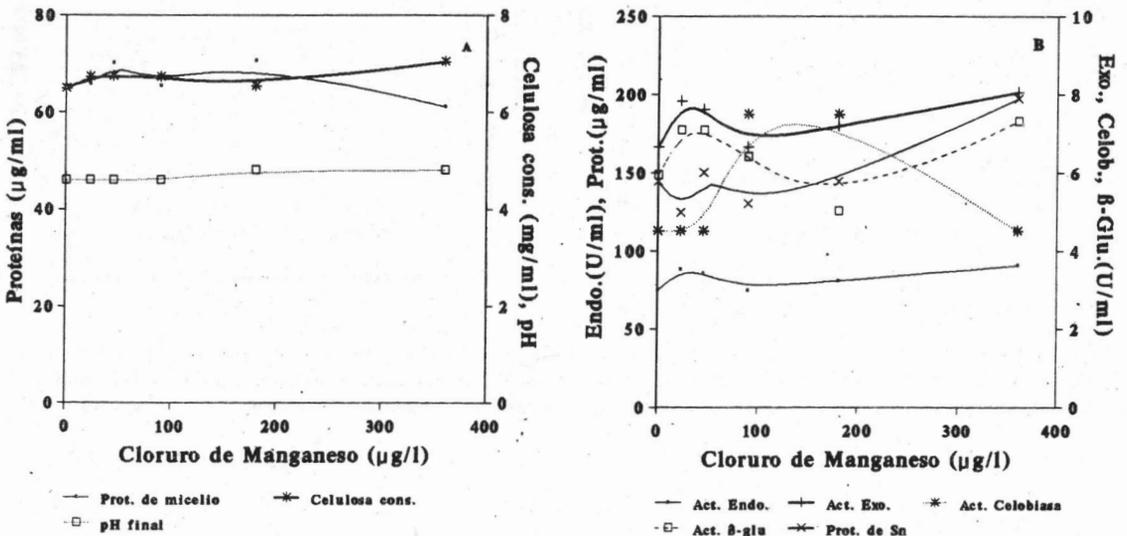


Fig. 3.— A: Crecimiento de *N. catalinensis*, medido como proteínas de micelio; consumo de celulosa y pH final del medio de cultivo; y B: Producción de las enzimas del complejo celulolítico (endoglucanasa, exoglucanasa, celobiasa y β -glucosidasa) y proteínas de sobrenadante; en función de distintas concentraciones de $Cl_2Mn \cdot 4H_2O$ en el medio de cultivo.

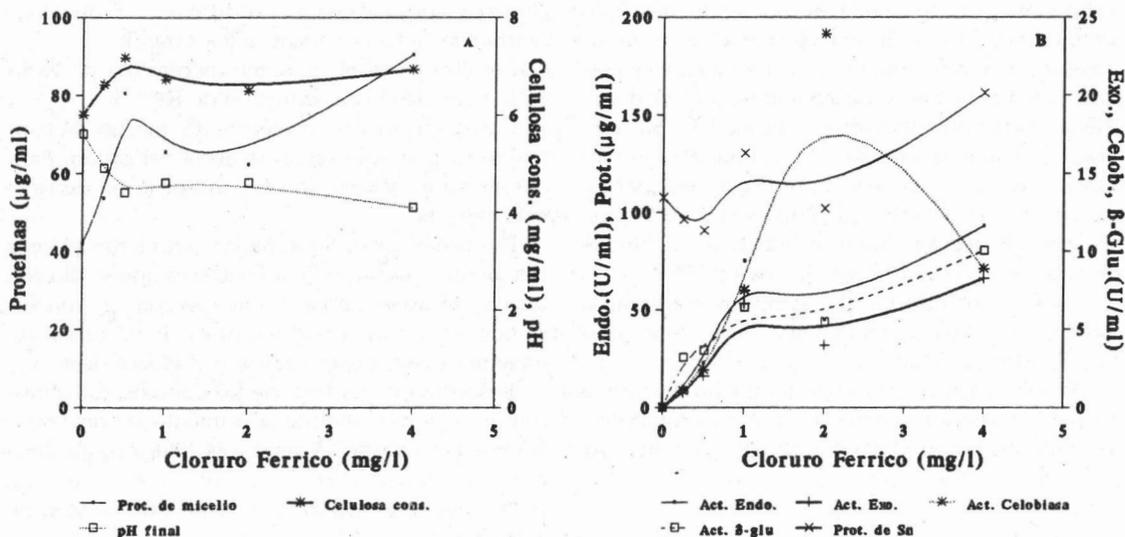


Fig. 4.— A: Crecimiento de *N. catalinensis*, medido como proteínas de micelio; consumo de celulosa y pH final del medio de cultivo; y B: Producción de las enzimas del complejo celulolítico (endoglucanasa, exoglucanasa, celobiasa y β-glucosidas) y proteínas de sobrenadante; en función de distintas concentraciones de Cl₃Fe en el medio de cultivo.

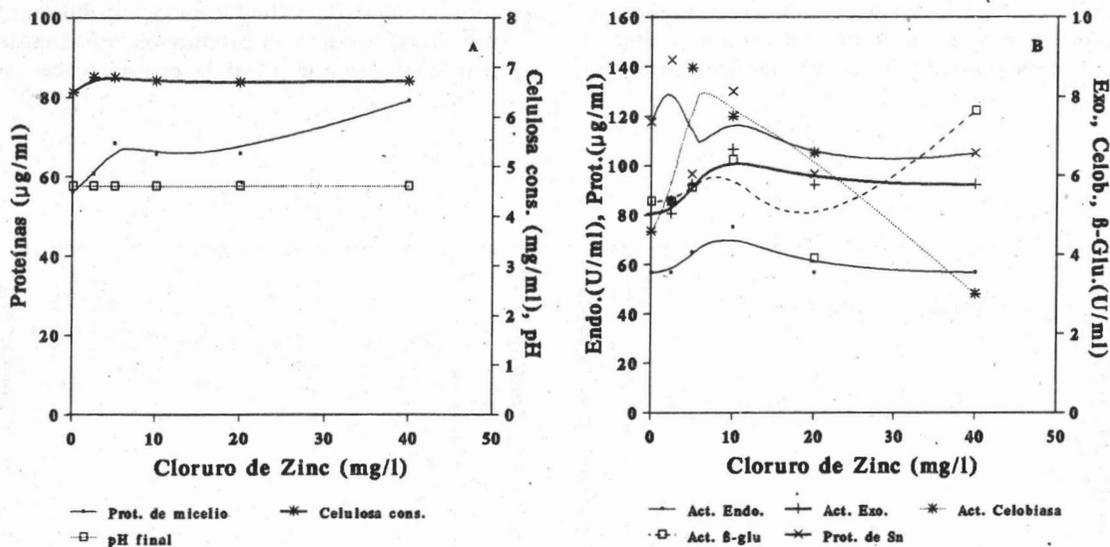


Fig. 5.— A: Crecimiento de *N. catalinensis*, medido como proteínas de micelio; consumo de celulosa y pH final del medio de cultivo; y B: Producción de las enzimas del complejo celulolítico (endoglucanasa, exoglucanasa, celobiasa y β-glucosidas) y proteínas de sobrenadante; en función de distintas concentraciones de Cl₂Zn en el medio de cultivo.

Zn⁺⁺ mayor, luego de producciones variables para concentraciones menores del catión.

En cuanto a los otros parámetros, no se observaron variaciones respecto del consumo de celulosa entre los distintos tratamientos; el valor más alto de proteínas de micelio se obtuvo con la concentra-

ción de Zn⁺⁺ mayor, luego de un plateau en concentraciones intermedias del catión.

Con respecto a las proteínas de sobrenadante, presentaron un comportamiento fluctuante, mientras que el pH final de los medios de cultivo fue el mismo para todos los tratamientos.

Efecto de cationes sobre la actividad de las enzimas celulolíticas

Ninguna de las enzimas del complejo celulolítico de *Nectria catalinensis* requirió de algún catión u otro tipo de cofactor para su activación, ya que el eluato de Sephadex G-25, éste más EDTA 2 mM, o el extracto crudo más EDTA 2 mM, tuvieron la misma actividad específica que el extracto crudo (figs. 6, 7, 8 y 9 (A)). Si las enzimas hubiesen requerido de algún tipo de cofactor para su actividad, éste habría quedado retenido en la columna de Sephadex, ya que las celulasas salen con el volumen muerto de la columna. Los tratamientos C + E (extracto crudo más EDTA 2 mM) y G-25 + E (eluato de Sephadex G-25 más EDTA 2 mM) se

hicieron por si el desalado en la columna de Sephadex hubiera sido ineficiente, suponiendo que algún catión divalente presente en el extracto crudo tuviera efecto sobre la actividad de la enzima; de ser así, habría sido quelado por el EDTA.

En otra serie de experimentos (figs. 6, 7, 8 y 9 (B)) pudo comprobarse que la actividad de todas las celulasas fue inhibida por Zn^{++} , en una concentración 10 mM. La actividad de la endoglucanasa y de la exoglucanasa también fue inhibida por Mn^{++} , en una concentración 10 mM.

Se determinó, en cada caso, la concentración mínima inhibitoria; comprobándose que el Zn^{++} fue inhibitorio en concentraciones mayores a 1 mM, para las cuatro enzimas estudiadas (figs. 6, 7, 8 y 9 (C)); mientras que el Mn^{++} inhibió la actividad de la

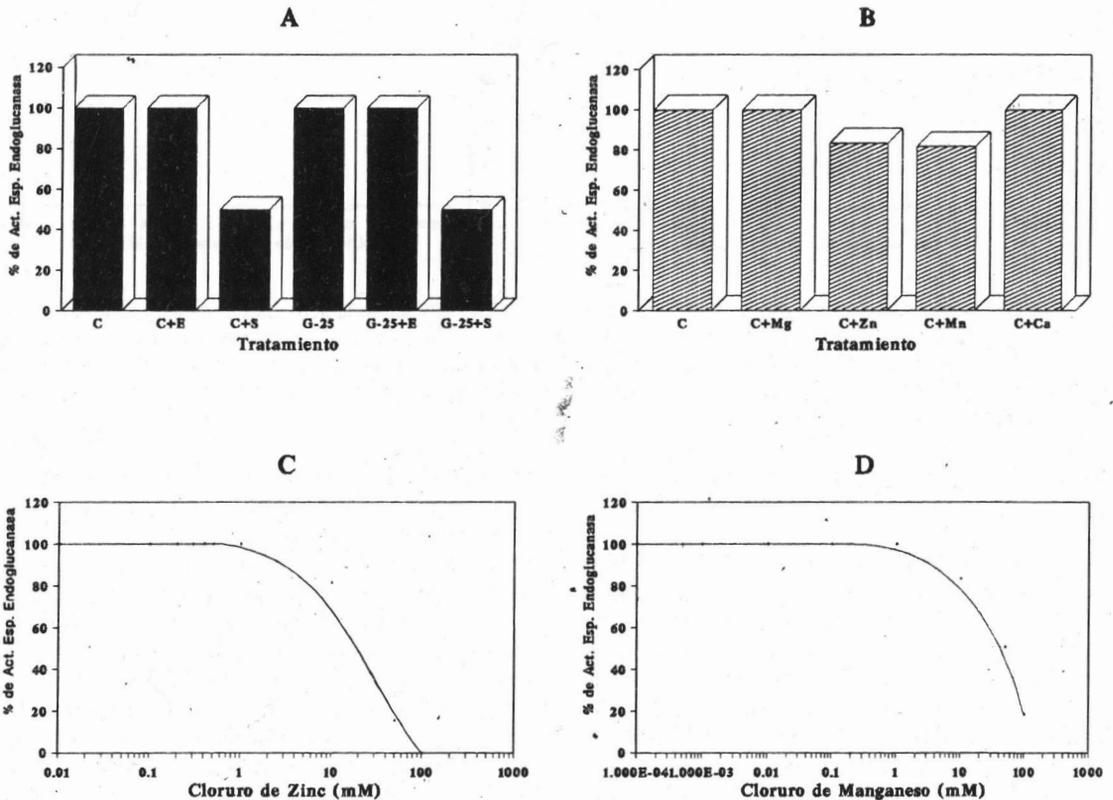


Fig. 6.— (A): Efecto de cationes y EDTA sobre la actividad de la endoglucanasa de *N. catalinensis*. C: Extracto crudo; C + E: Extracto crudo más EDTA 2 mM; C + S: Extracto crudo más Mn^{++} 10 mM, Zn^{++} 10 mM, Ca^{++} 10 mM y Mg^{++} 10 mM; G-25: Eluato de Sephadex G-25; G-25 + E: Eluato de Sephadex G-25 más EDTA 2 mM y G-25 + S: Eluato de Sephadex G-25 más Mn^{++} 10 mM, Zn^{++} 10 mM, Ca^{++} 10 mM y Mg^{++} 10 mM. (B): Efecto del Mn^{++} , Zn^{++} , Ca^{++} y Mg^{++} , sobre la actividad de la endoglucanasa de *N. catalinensis*. C: Extracto crudo, C + Mn: Extracto crudo más Mn^{++} 10 mM, C + Zn: Extracto crudo más Zn^{++} 10 mM, C + Ca: Extracto crudo más Ca^{++} 10 mM y C + Mg: Extracto crudo más Mg^{++} 10 mM. (C): Curva de inhibición de Cl_2Zn sobre la actividad de la endoglucanasa de *N. catalinensis*. (D): Curva de inhibición de $Cl_2Mn \cdot 4H_2O$ sobre la actividad de la endoglucanasa de *N. catalinensis*. Los resultados se expresan como % de actividad específica de endoglucanasa relativa al control (extracto crudo).

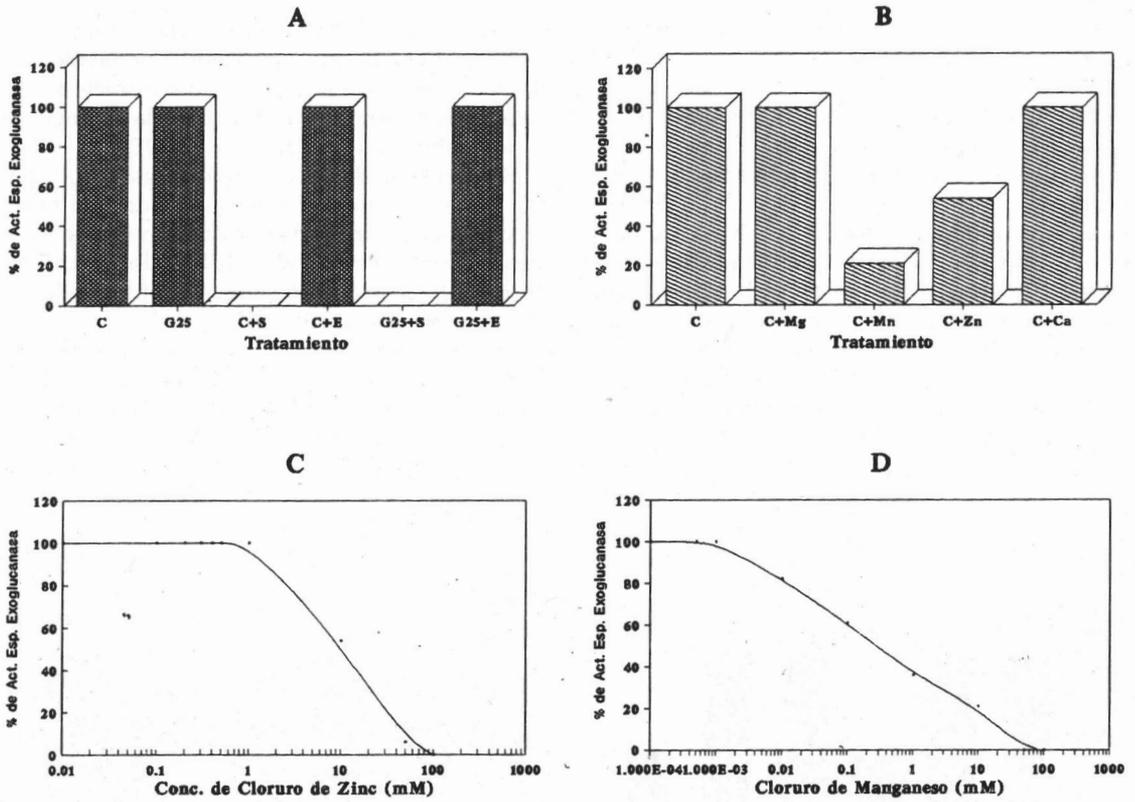


Fig. 7.— Efecto de cationes y EDTA (A) y de Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} (B), sobre la actividad de la exoglucanasa de *N. catalinensis*. C: Curva de inhibición de Cl_2Zn sobre la actividad de la exoglucanasa de *N. catalinensis*. D: Curva de inhibición de $Cl_2Mn \cdot 4H_2O$ sobre la actividad de la exoglucanasa de *N. catalinensis*. Los distintos tratamientos son los mismos que en el caso de la endoglucanasa. Los resultados se expresan como % de actividad específica de exoglucanasa relativa al control (extracto crudo).

endoglucanasa en concentraciones mayores a 1 mM (fig. 6 D) y a la exoglucanasa en concentraciones mayores a 1 μ M (fig. 7 D).

No pudo ser probado el efecto del Fe^{3+} sobre la actividad de las enzimas celulolíticas en una concentración tan elevada como la de los otros cationes, porque éste interfiere en los métodos de medición de celulasas utilizados en este trabajo. Por lo tanto, se probó el efecto del Fe^{3+} sobre la actividad de las diferentes enzimas, en una concentración igual a la mayor concentración utilizada en los experimentos de producción de celulasas (15 μ M). A esa concentración, el Fe^{3+} no tuvo efecto alguno sobre la actividad de las distintas enzimas.

DISCUSION

Si bien se ha podido establecer para muchos hongos las concentraciones de cationes óptimas para el crecimiento, suele ser más importante el balance o concentraciones relativas entre ellos en el medio de cultivo (Fothergill y Child, *op. cit.*; Ross,

op. cit.; Fothergill y Hide, 1962); hecho que se puede explicar por interacciones específicas de amplificación o antagonismos (Sastry *et al.*, 1962; Adiga *et al.*, 1961; Starkey, 1973). Esto puede aplicarse al caso de *Nectria catalinensis* tanto para su crecimiento, medido como proteínas de micelio; como para las actividades endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa, así como para las proteínas de sobrenadante; ya que en todos los experimentos uno o varios de estos parámetros presentaron un comportamiento fluctuante en función de la concentración del catión utilizado; como por ejemplo en el caso de la variación en la concentración de Mn^{2+} , donde las actividades de endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa fueron máximas tanto a bajas como a altas concentraciones del catión. Este no fue el caso para la celobiasa, para la cual, se observó un óptimo entre 100-200 μ g/l de Mn^{2+} para la producción de la enzima.

En los hongos, tal como en otros eucariontes, el calcio está involucrado en diversas funciones y ocupa un papel fundamental, a través de proteínas

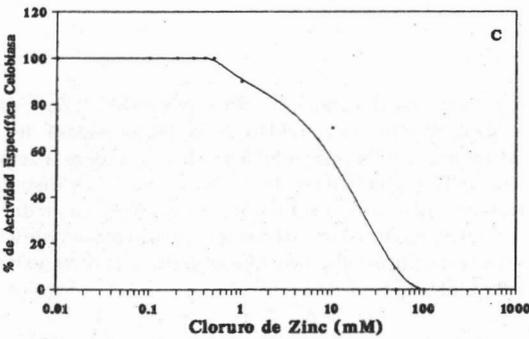
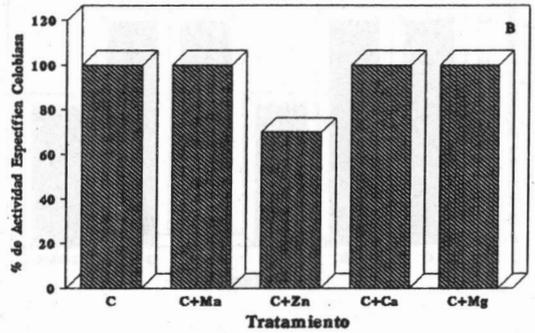
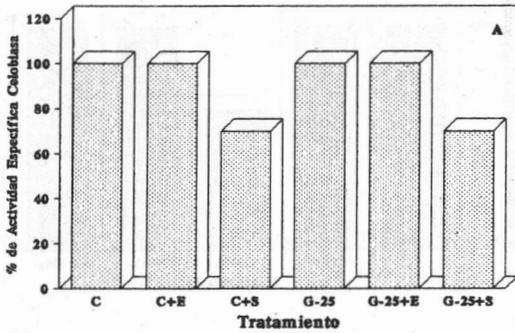


Fig. 8.— Efecto de cationes y EDTA, A, y de Mn^{++} , Zn^{++} , Ca^{++} y Mg^{++} , B, sobre la actividad de la celobiasa de *N. catalinensis*. C: Curva de inhibición de Cl_2Zn sobre la actividad de la celobiasa de *N. catalinensis*. Los tratamientos son los mismos que en el caso de la endoglucanasa. Los resultados se expresan como % de actividad específica de celobiasa relativa al control (extracto crudo).

ligadoras de Ca^{++} , como la calmodulina, presente en diversos grupos de hongos (Gomes *et al.*, 1979; Cox *et al.*, 1982; Hubbard *et al.*, 1982; Grand *et al.*, 1980). Los principales efectos del Ca^{++} en metabolismo y morfogénesis se basan en el control de fenómenos tales como la permeabilidad de membrana, el transporte de otros iones (Cuppoletti y Segel, 1975; Le John *et al.*, 1974), y el transporte de azúcares y aminoácidos (Mercuri, *op. cit.*).

En el caso de *Nectria catalinensis* la presencia de Ca^{++} en el medio de cultivo provocó una disminución en el contenido de proteínas totales de sobrenadante, no correlacionado con la producción de celulasas. El Ca^{++} estimularía la producción de estas enzimas, sin afectar la actividad de las mismas.

Respecto del Fe^{+++} , se ha demostrado que, además de formar parte de los grupos hemo de numerosas proteínas, actúa como determinante del aprovechamiento de la fuente de N (Cuppert y Lilly, 1973), como efector de algunas enzimas (Healy *et al.*, 1955), o dependiendo de los niveles del medio,

como promotor (Herr, *op. cit.*: Shigo, 1974) o inhibidor del crecimiento (Kurovski y Pirth, 1971).

El Mg^{++} y el Mn^{++} son requeridos por todos los hongos, ya que participan en un gran número de procesos metabólicos, como por ejemplo en todas las reacciones que involucran la transferencia de grupos fosfato.

La producción de determinados metabolitos es influenciada por Mn^{++} ; éste es indispensable para la producción de terpenos en *Neurospora crassa* (Bobowski *et al.*, 1977), promueve la síntesis de escualeno en *Rhizopus arrhizus* y de malformina en especies de *Aspergillus* (Garraway y Evans, 1984).

El Zn^{++} es un componente funcional de una gran variedad de enzimas fúngicas, que van desde aquellas involucradas en el metabolismo intermedio hasta la síntesis de ADN y ARN; además afecta la producción de una gran variedad de metabolitos de importancia biológica e industrial (Garraway y Evans, *op. cit.*). De acuerdo con distintas experiencias, parece evidente un efecto competitivo entre Mg^{++} y Zn^{++} (Sastry *et al.*, *op. cit.*; Abelson y Aldous,

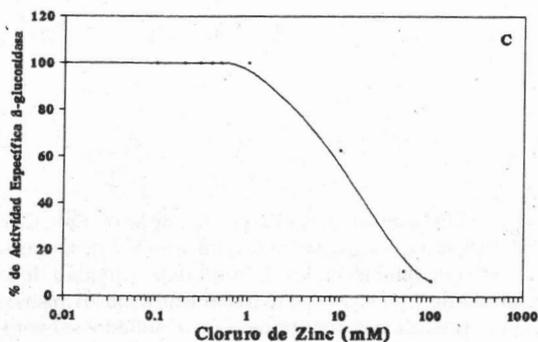
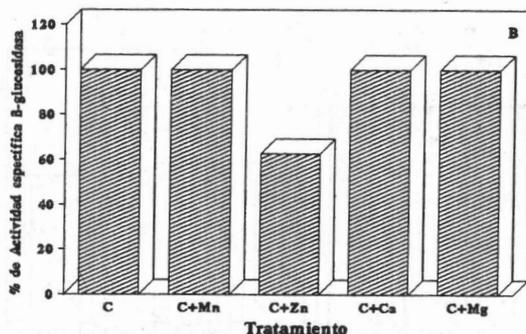
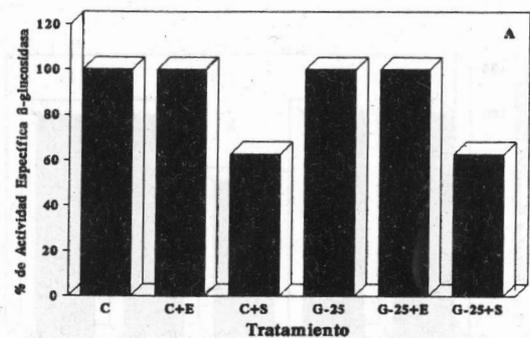


Fig. 9.—Efecto de cationes y EDTA, A, y de Mn^{++} , Zn^{++} , Ca^{++} y Mg^{++} , B, sobre la actividad de la β -glucosidasa de *N. catalinensis*. C: Curva de inhibición de Cl_2Zn sobre la actividad de la β -glucosidasa de *N. catalinensis*. Los distintos tratamientos son los mismos que en el caso de la endoglucanasa. Los resultados se expresan como % de actividad específica de β -glucosidasa relativa al control (extracto crudo).

op. cit.; Fuhrman y Rothstein, 1968); según otras, el Mg^{++} podría ser un cofactor en la incorporación de Zn^{++} (Patton y Budd, 1972).

La influencia de diversos cationes sobre la actividad de las enzimas celulolíticas ha sido estudiada por Alconada Magliano (1992) en *Fusarium oxysporum*. Encontró que el Mn^{++} fue levemente estimulador de la actividad de la β -glucosidasa; Zn^{++} , Hg^{++} y Cu^{++} inhibieron en parte de la actividad de esta enzima; mientras que EDTA, Ca^{++} , Ba^{++} , Co^{++} , Mg^{++} y Na^+ , no tuvieron efecto alguno.

También en *Fusarium oxysporum*, Soni y Bhatia (1979) encontraron que el Hg^{++} inhibió completamente la actividad de la endoglucanasa, el Cu^{++} produjo una marcada inhibición de esta enzima, mientras que los iones Ni^{++} , Zn^{++} , Co^{++} y Ba^{++} fueron inhibitorios pero en menor grado.

En *Aspergillus fumigatus* (Kitpreechavanich et al., 1986), EDTA, Li^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Mn^{++} , Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} , Sn^{++} y Ba^{++} , no tuvieron influencia significativa sobre la actividad de la β -glucosidasa; mientras que Fe^{+++} , Hg^{++} y Cu^{++} inhibieron la actividad de esta enzima. En *Fusarium avenaceum* Hg^{++} , Cu^{++} y Fe^{+++} inhibieron parcialmente la actividad de la endoglucanasa de esta especie (Zalewska-Sobezak y Urbanek, 1981).

Para *Nectria catalinensis* hemos demostrado que las distintas enzimas del complejo celulolítico no requieren ningún catión ni otro tipo de cofactor para su activación, ya que, tanto el eluato de Sephadex G-25, como éste o el extracto crudo más EDTA 2 mM tuvieron la misma actividad específica que los controles, para todas las actividades enzimáticas. Altas concentraciones de ciertos cationes (superiores a las utilizadas en los distintos medios de cultivo para producción) tuvieron un efecto inhibitorio sobre la actividad de las distintas celulasas: Zn^{++} , para todas las enzimas del complejo celulolítico, y Mn^{++} , sobre la actividad de la endoglucanasa. Para el caso de la exoglucanasa, la actividad de esta enzima fue inhibida por concentraciones de Mn^{++} superiores a 1 μM . En los experimentos realizados para producción, la concentración de Mn^{++} más elevada fue de 1,8 μM ; la cual fue óptima. Por lo tanto, concentraciones de Mn^{++} superiores a 1 μM tendrían un efecto dual; por un lado, estimularían la síntesis de la enzima, y por otro, inhibirían su actividad.

Si bien la medición de la actividad β -glucosidasa puede ser indicativa de la capacidad del sistema de hidrolizar celobiosa, es incorrecto asumir, aunque frecuente de encontrar en la bibliografía, que la

hidrólisis de un aril- β -glucósido, como el p-nitrofenil- β -D-1,4-glucopiranosido, es una medida de la capacidad del sistema para hidrolizar celobiosa a glucosa, ya que se han reconocido tres tipos diferentes de β -glucosidasas: 1- celobiasas sensu stricto, que clivan exclusivamente celobiosa y no tienen ninguna acción sobre aril- β -glucósidos; 2- β -glucósido hidrolasas, las cuales poseen una amplia especificidad en relación al aglicón, y 3- aril- β -glucosidasas, las cuales clivan sólo β -glucósidos en los cuales el aglicón es un aril alcohol (ej. fenol, p-nitrofenol, saligenina, 6-bromo-2-naftol) (Sharrock, 1988). Nosotros observamos un comportamiento diferente del sistema, dependiendo de la utilización de celobiosa o del análogo como sustratos. El hecho de que se haya podido medir actividad enzimática utilizando los dos sustratos y que se obtengan distintas respuestas (forma y óptimos de las curvas), indicarían que *Nectria catalinensis* produjo al menos dos tipos de β -glucosidasas (celobiasa sensu stricto y aril- β -glucosidasas) en cultivo y que la actividad y/o síntesis de éstas se vieron afectadas de manera distinta, excepto para el caso de Mg^{++} , por las concentraciones de iones ensayadas.

Se cree que algunas células fúngicas se encuentran unidas a la pared hifal o encerradas en una matriz o vaina de polisacáridos, en estrecha asociación con las hifas (Markham y Bazin, 1991). Esto último ha sido sugerido para el caso de hongos de pudrición blanca y hongos de pudrición blanda, los cuales degradan la celulosa dentro de la madera sólo a una distancia limitada de sus hifas (Markham y Bazin, *op. cit.*); por ejemplo, se ha demostrado que la β -glucosidasa de *Sporotrichum pulverulentum* (Eriksson, 1978) y la de *Trichoderma reesei* (Jackson y Talburt, 1988) se encuentran unidas a la pared hifal. Esto aparentemente sucede en el caso de las enzimas del complejo celulolítico de *Nectria catalinensis* ya que en sobrenadantes directos de cultivo muchas veces se obtuvo menor actividad que la esperada, debido a que parte de las enzimas quedaban retenidas en los sólidos de cultivo (datos no mostrados). Además, el patrón macromorfológico de crecimiento de *N. catalinensis* en cultivos con celulosa cristalina es plumoso y las hifas se encuentran en estrecha relación con las partículas de celulosa. Fue por este motivo que se decidió utilizar sobrenadantes provenientes de homogenatos de cultivo, para asegurarnos de medir toda la enzima producida.

En este trabajo fue posible establecer la/s concentración/es óptima/s de cationes para la producción de las distintas enzimas del complejo celulolítico. El consumo de celulosa por parte de *N. catalinensis* sólo fue estimulado por el Ca^{++} . Este

resultado, junto con estudios previos (Pardo y Forchiassin, 1993), indican que el Ca^{++} no es indispensable para el crecimiento de *N. catalinensis*, pero su presencia en el medio de cultivo lo estimula.

En los tratamientos sin Ca^{++} , sin Fe^{++} y sin Mg^{++} , el consumo de celulosa fue del 54%, 60% y 66% del agregado, respectivamente. Sin embargo, al día de cosecha, los niveles de todas las enzimas del sistema fueron cero para el caso del tratamiento sin Fe^{++} .

En los casos de los tratamientos sin Ca^{++} y sin Mg^{++} , excepto la celobiasa, el nivel del resto de las enzimas fue también cero. Esto puede deberse a distintas cinéticas de crecimiento entre los tratamientos con diferentes dosis de cationes; por lo tanto, en los casos citados anteriormente, el hongo podría estar en fase de autólisis, y por esto, no encontrarse celulasas en ese estadio del cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Lic. Susana B. Rulli por su ayuda en el diseño de los gráficos de este trabajo.

Al CONICET por la financiación parcial de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- ADIGA, P. R., K. S. SASTRY, V. VENKATASUBRAMANYAM & P. S. SARMA. 1961. Interrelationships in trace element metabolism in *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* 81: 545-550.
- ALCONADAMAGLIANO, T. M. 1992. Enzimas de *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* involucradas en la degradación de la pared celular de plantas superiores. Tesis Doctoral, FCEN, UBA. 231 págs.
- BOBOWSKI, G. S., W. C. BARKER & R. E. SUBDEN. 1977. The conversion of ($2-^{14}C$)-mevalonic acid into triterpenes by cell-free extracts of a *Neurospora crassa* albino mutant. *Can. J. Bot.* 55: 2137-2141.
- BRADFORD, M. N. 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.
- BROWN, D. E. 1983. Lignocellulose hydrolysis. *Phil. Trans. Royal. Soc. London* 300: 305-322.
- COUGHLAN, M. P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Genet. Eng. Revs.* 3: 39-109.
- COX, J. A., C. FERRAX, G. DEMAILLE, R. O. PEREZ, D. VAN TUINEN & D. MARME. 1982. Calmodulin from *Neurospora crassa*, general properties and conformational changes. *J. Biol. Chem.* 257: 10694-10700.
- CUPPET, V. M. & V. G. LILLY. 1973. Ferrous iron and the growth of twenty isolates of *Phytophthora infestans* in synthetic media. *Mycologia* 65: 67-77.
- CUPPOLETTI, J. & I. H. SEGEL. 1975. Kinetics of sulphate transport by *Penicillium notatum*. Interactions of sulphate, protons, and calcium. *Biochemistry* 14: 4712-4718.
- ERIKSON, K. E. 1978. Enzyme mechanism involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biotech. Bioeng.* 20: 317-318.

- FOTHERGILL, P. G. & J. H. CHILD. 1964. Comparative studies of the mineral nutrition of three species of *Phytophthora*. *J. Gen. Microbiol.* 36: 67-78.
- FOTHERGILL, P. G. & D. HIDE. 1962. Comparative nutritional studies of *Phytium* species. *J. Gen. Microbiol.* 29: 325-333.
- FOSTER, J. W. & S. A. WAKSMAN. 1939. The specific effect of zinc and other heavy metals on growth and fumaric acid production by *Rhizopus*. *J. Bacteriol.* 37: 599-617.
- FUHRMAN, G. F. & A. ROTHSTEIN. 1968. Transport of zinc, cobalt and nickel into yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 163: 325-330.
- GARRAWAY, M. O. & R. C. EVANS. 1984. *Fungal nutrition and physiology*. Willey & Sons (eds.), N. Y., 401 págs.
- GAUNT, D. M., A. P. J. TRINCI & J. M. LYNCH. 1984. Metal ion composition and physiology of *Trichoderma reesei*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83: 575-581.
- GOMES, S. L., L. MENNUCCI & J. C. C. MAIA. 1979. A calcium dependent protein activator of mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Blatocladiella emersonii*. *FEBS Lett.* 99: 39-42.
- GRAND, R. J. A., A. C. NAIRN & S. V. PERRY. 1980. The preparation of calmodulins from barley (*Hordeum sp.*) and basidiomycete fungi. *Biochem. J.* 185: 755-760.
- HEALY, W. B., S. CHENG & W. D. McELROY. 1955. Metal toxicity and iron deficiency effects on enzymes in *Neurospora*. *Arch. Biochem. Biophys.* 54: 206-214.
- HERR, L. J. 1973. Growth of *Aphanomyces cochlioides* in synthetic media as effected by carbon, nitrogen, methionine and trace elements. *Can. J. Bot.* 51: 2495-2503.
- HUBBARD, M., H. BRADLEY, P. SULLIVAN, M. SHEPHERD & I. FORRESTER. 1982. Evidence of occurrence of calmodulin in the yeast *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 317: 85-88.
- JACKSON, M. A. & D. E. TALBURT. 1988. Mechanism for β -glucosidase release into cellulose-grown *Trichoderma reesei* culture supernatants. *Exp. Mycol.* 12: 203-216.
- KITPREECHAVANICH, V., M. HAYASHI & S. NAGAI. 1986. Purification and characterization of extracellular β -xylosidase and β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Agr. Biol. Chem.* 50 (7): 1703-1713.
- KUROWSKI, W. M. & S. J. PIRTH. 1971. The iron requirement of *Agrobacterium tumefaciens* for growth and 3-keto sucrose production. *J. Gen. Microbiol.* 68: 65-69.
- LEJOHN, H. B., L. E. CAMERON, R. M. STEVENSON & R. V. MEUSER. 1974. Influence of cytokinins and sulphhydryl group-reacting agents on calcium transport in fungi. *J. Biol. Chem.* 249: 4016-4020.
- LIMA, C. E., F. FORCHIASSIN & M. E. RANALLI. 1988. Systematic and biological study of *Hypocreales* of Argentina. IV. *Nectria catalinensis* sp. nov. *Nova Hedwigia* 46: 149-156.
- MARKHAM, P. & M. J. BAZIN. 1991. Decomposition of cellulose by fungi. In *Handbook of Applied Mycology*. Arora, D. K., B. Rai, K. G. Mukerji & G. R. Knudsen (eds.). Marcel Dekker Inc. Vol. 1: 379-424.
- MERCURI, O. A. 1987. Degradación biológica de celulosa por *Ascospora furfuraceus*. Tesis Doctoral, FCEN, UBA. 303 págs.
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biochem.* 153: 375-380.
- PARDO, A. G. y F. FORCHIASSIN. 1993. Aspectos nutricionales de *Nectria catalinensis*. (Fungi, Ascomycetes). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 29 (3-4): 191-195.
- PARDO, A. G. y F. FORCHIASSIN. 1994. Inducción-represión de la actividad celulolítica en *Nectria catalinensis* (Ascomycotina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 30 (1-2): 43-49.
- PATTON, W. H. N. & K. BUDD. 1972. Zinc uptake in *Neocosmospora vasinfecta*. *J. Gen. Microbiol.* 72: 173-184.
- ROSS, I. S. 1975. Some effects of heavy metals of fungal cells. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 64: 175-193.
- RYU, D. D. Y. & M. MANDELS. 1980. Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 91-102.
- SASTRY, S. K., P. R. ADIGA, V. VENKATASUBRAMANYAM & P. S. SARMA. 1962. Interrelationships in trace element metabolism in metal toxicities in *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* 85: 486-491.
- SHARROCK, K. R. 1988. Cellulase assay methods: a review. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 17: 81-106.
- SHIGO, A. L. 1974. Effects of manganese, calcium, zinc and iron on growth and pigmentation of *Trichocladium canadense*, *Phialophora melinii*, *Hypoxyylon rubiginosum*, *Daldinia concentrica* and *Cytospora decipiens*. *Mycologia* 66: 339-341.
- SOMOGLYI, M. 1952. Notes on sugar determinations. *J. Biol. Chem.* 159: 19-23.
- SONI, G. L. & I. S. BHATIA. 1979. Studies on the extracellular cellulase (C_x) from *Fusarium oxysporum*. *Indian J. Biochem. Biophys.* 16: 223-226.
- STARKEY, R. L. 1973. Effect of pH on toxicity of copper to *Scytalidium sp.*, a copper tolerant fungus, and some other fungi. *J. Gen. Microbiol.* 78: 217-225.
- STERNBERG, D. 1976. Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 35-53.
- & G. R. MANDELS. 1982. β -glucosidase induction and repression in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Exp. Mycol.* 6: 115-124.
- WHITE, J. P. & G. T. JOHNSON. 1971. Zinc effects on growth and cynodontin production of *Helminthosporium cynodontis*. *Mycologia* 63: 548-561.
- WOOD, T. M. & V. GARCIA-CAMPAYO. 1990. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1: 147-161.
- ZALEWSKA-SOBEZAK, J. & H. URBANEK. 1981. Cellulose and xylan degrading enzymes of *Fusarium avenaceum*. *Arch. Microbiol.* 129: 247-250.