

Estudio del papel de dos efectores *downstream* de la ruta de transducción de señales mediada por Pga1, en la morfología y la producción de feruloil esterasas en *Penicillium rubens* Wis 54-1255.

Presentado por

Débora Elizabeth Hernández Pérez

Para optar por el título de Magister en Biología Molecular y Biotecnología



PROGRAMA DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

PAMPLONA, marzo 1 de 2021

Estudio del papel de dos efectores *downstream* de la ruta de transducción de señales mediada por Pga1, en la morfología y la producción de feruloil esterases en *Penicillium rubens*

*Wis 54-155.*

Presentado por

Débora Elizabeth Hernández Pérez

Microbióloga de la Universidad de Pamplona

Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO)

Trabajo de Grado presentado para optar al título de

Magister en Biología Molecular y Biotecnología.

Director.

Ramón Ovidio García Rico, Ph. D

PhD. Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de León

Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO)

[ramonovidio@gmail.com](mailto:ramonovidio@gmail.com)

PROGRAMA DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

PAMPLONA, marzo 1 de 2021

## **Dedicatoria**

Este trabajo es dedicado al mejor y mas incondicional de los amigos, Mishiku.

Gracias por 18 años de amor y feliz compañía.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por ser mi pilar y guía en la realización de todos los propósitos emprendidos hasta hoy. A mis padres, familia, y Hector por su apoyo siempre incondicional, por darme soporte y ánimo para alcanzar nuevas metas.

Mi gratitud para el Doctor Ramón Ovidio García Rico por su respaldo, confianza y enseñanzas en la guía con éxito para la realización de este posgrado.

A la familia GIMBIO por su compañía, colaboración y por hacer amena cada jornada de trabajo en el laboratorio.

Agradezco Al Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana UAM- Unidad Iztapalapa-México. A los integrantes del Laboratorio de Microbiología Básica y aplicada de la Universidad de Santiago de Chile (USACH), por abrir sus puertas para mi, por las experiencias, y por proporcionar aprendizaje valioso para mi formación durante la realización de este trabajo.

Agradezco a la Gobernación de Norte de Santander, y a Colciencias (Convocatoria 753); por la oportunidad de formación recibida como Joven Investigador.

## INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO

<b>Título:</b> Estudio del papel de dos efectores <i>downstream</i> de la ruta de transducción de señales mediada por Pga1, en la morfología y la producción de feruloil esterasas en <i>Penicillium rubens</i> Wis 54-1255.
<b>Realizado por:</b> Débora Elizabeth Hernández Pérez
<b>Director del proyecto:</b> Ramón Ovidio García Rico
<b>Línea de Investigación:</b> Biotecnología
<b>Área:</b> Biología molecular
<b>Línea estratégica:</b> Transducción de señales
<b>Grupo de Investigación:</b> Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO).
<b>Fuentes de financiación:</b> Universidad de Pamplona y Colciencias (convocatoria 753).
<b>Institución:</b> Universidad de Pamplona
<b>Localización:</b> Pamplona, 1 de marzo de 2021

## RESUMEN

Las proteínas G heterotriméricas son importantes intermediarios moleculares de la señalización celular, investigadas exhaustivamente por sus funciones reguladoras en la morfogénesis, y el desarrollo de hongos filamentosos. Aunque sus mecanismos moleculares no se encuentran completamente dilucidados, se considera además que las proteínas G están involucradas en la regulación de la expresión de diferentes metabolitos secundarios, y exoenzimas de interés industrial y biotecnológico. En este contexto, esta investigación abordó el estudio de dos efectores *downstream* de la ruta de transducción de señales mediada por Pga1 (una subunidad alfa de proteínas G) recientemente identificados, y sus efectos reguladores en la morfología y producción de feruloil esterases en *Penicillium rubens* Wis 54-1255. Mediante el uso de estrategias moleculares, como la ribointerferencia para la represión de la expresión génica, se realizó un análisis comparativo entre las cepas control y transformantes atenuados en la expresión de los efectores en mención, Pc22g05690 (ProPH) y Pc22g17420 (ProANK). Los resultados sugieren que el efector ProPH regula negativamente el crecimiento vegetativo y el proceso germinativo en *P. rubens*; mientras que, ProANK no presenta un efecto significativo sobre estos procesos. Además, ambas proteínas regulan positivamente la conidiación en el hongo, con efectos marcados en medios de cultivo nutricionalmente complejos. A nivel metabólico, los resultados indican que los efectores ProPH y ProANK actúan como reguladores negativos de la actividad xilanasas; pero no presentan efectos significativos sobre la actividad celulasa en el hongo. La proteína ProANK regula negativamente la actividad FAE en *P. rubens*; mientras que ProPH no demarca un efecto significativo sobre dicha actividad enzimática. Adicionalmente, se destaca la participación del gen *creA* como regulador negativo de la actividad feruloil esterasa en este organismo. Por último, se

determinó un efecto positivo del xilano como sustrato inductor de enzimas con actividad feruloil esterasa en *P. rubens* Wis 54-1255; en contraste con la cascarilla de arroz, cuyo uso no resultó funcional para tal fin.

**Palabras clave:** Transducción de señales, efector downstream, morfología, inductor, exoenzimas.

## Tabla de contenidos

1.	INTRODUCCIÓN .....	22
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	25
3.	MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	29
3.1	Proteínas G heterotriméricas: transductores de señalización transmembrana. ....	29
3.1.1.	Ciclo de activación de las proteínas G heterotriméricas. ....	31
3.2	Clasificación de las proteínas G heterotriméricas en hongos. ....	35
3.3	Subunidades alfa del grupo I (G $\alpha$ i): Participación en el programa de desarrollo en hongos filamentosos de la División Ascomycota. ....	35
3.3.1.	Desarrollo morfológico.....	38
3.3.2.	Resistencia al estrés fisiológico .....	40
3.3.3.	Producción de metabolitos secundarios.....	41
3.3.4.	Producción de enzimas extracelulares .....	43
3.4	<i>Penicillium rubens</i> Wis 54-1255.....	44
3.5	Biomasa Lignocelulósica:.....	50
3.6	Feruloil esterasas (FAEs): Bioconversión de material lignocelulósico y liberación de ácidos hidroxicinámicos.....	52
3.6.1.	Clasificación de las FAEs. ....	55
3.6.2.	Aislamiento y producción de FAEs a partir de hongos. ....	56
3.6.3.	Métodos de identificación de actividad feruloil esterasa.....	57
4.	OBJETIVOS .....	59
4.1	Objetivo general.....	59
4.2	Objetivos específicos .....	59
5.	METODOLOGÍA .....	60

5.1	Área de estudio. ....	60
5.2	Microorganismos. ....	60
5.2.1.	Cepas bacterianas:.....	60
5.2.2.	Cepas fúngicas. ....	61
5.3	Medios de cultivo.....	61
5.4	Herramientas de análisis bioinformático. ....	69
5.5	Silenciamiento de los efectores ProPH y ProANK en <i>P. rubens</i> .....	71
5.5.1.	Obtención, selección y confirmación de transformantes de <i>P. rubens</i> . ....	71
5.5.2.	Análisis de expresión de los genes Pc22g05690 y Pc22g17420 en la cepa parental ( <i>P. rubens</i> Wis 54-1255). ....	74
5.6	Determinación de los efectos fenotípicos. ....	78
5.6.1.	Medición de la tasa de extensión apical.....	78
5.6.2.	Medida de la producción de conidios. ....	78
5.6.3.	Evaluación de la cinética de germinación conidial.....	79
5.7	Efecto de la atenuación de los efectores ProPH y ProANK en la producción de enzimas feruloil esterasas.....	79
5.7.1.	Valoración de la actividad celulolítica y xilanolítica en cepas de <i>P. rubens</i> . ....	79
5.7.2.	Valoración de la actividad FAE mediante ensayo en placa. ....	81
5.7.3.	Análisis molecular del efecto diferencial de la cascarilla de arroz y el xilano en la expresión de <i>faeA</i> y <i>faeB</i> en <i>P. rubens</i> Wis 54-1255, por RT-PCR. ....	82
5.8	Análisis de datos. ....	86
6.	CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	86
7.	RESULTADOS.....	88
7.1	Fase preliminar: Silenciamiento de los efectores ProPH (Pc22g05690) y ProANK (Pc22g17420). ....	88

7.2	Análisis bioinformático para identificar los genes Pc22g05690 y Pc22g17420 y caracterizar las proteínas ProPH y ProANK en <i>Penicillium rubens</i> Wisconsin 54-1255. ....	94
7.2.1.	Análisis bioinformático del gen Pc22g05690 y la proteína ProPH. ....	95
7.2.2.	Análisis bioinformático del gen Pc22g17420 y la proteína ProANK. ....	98
7.3	Análisis de expresión de los genes Pc22g05690 y Pc22g17420 en la cepa parental ( <i>P. rubens</i> Wis 54-1255). ....	101
7.4	Efecto de la atenuación de las proteínas efectoras ProPH (Pc22g05690) y ProANK (Pc22g17420), sobre la morfología de <i>P. rubens</i> . ....	103
7.4.1.	Producción conidial. ....	103
7.4.2.	Extensión apical. ....	110
7.5	Evaluación de la cinética de germinación conidial. ....	113
7.6	Efecto de la atenuación de los efectores ProPH y ProANK en la producción de enzimas feruloil esterases. ....	115
7.6.1.	Evaluación de la actividad celulolítica y xilanolítica. ....	116
7.6.2.	Actividad Feruloil esterasa (FAE). ....	118
7.7	Efecto diferencial de la cascarilla de arroz y el xilano sobre la actividad feruloil esterasa en <i>P. rubens</i> Wis 54-1255. ....	120
8.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS. ....	125
8.1	Papel de la señalización de los efectores ProPH y ProANK de la vía mediada por Pga1 sobre la morfología de <i>P. rubens</i> Wis 54-1255. ....	127
8.2	Efecto de la señalización de los efectores ProPH y ProANK de la vía mediada por Pga1, sobre la producción de feruloil esterases en <i>P. rubens</i> Wis 54-1255. ....	133
9.	CONCLUSIONES. ....	142
10.	RECOMENDACIONES. ....	143
11.	BIBLIOGRAFÍA. ....	144

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Efectos reportados de las subunidades Gai sobre los procesos de germinación, crecimiento vegetativo y conidiación, en especies de hongos filamentosos pertenecientes a la división Ascomycota.....	39
<b>Tabla 2.</b> Oligos diseñados para amplificar el fragmento de los genes Pc22g05690 y Pc22g17420 clonados en el plásmido pJL43-RNAi. ....	72
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos empleados en el análisis de los genes codificantes para los efectores ProPH y ProANK mediante RT-PCR. ....	77
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos diseñados para verificar la expresión génica de los genes <i>faeA</i> y <i>faeB</i> . ....	85

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Mecanismo del ciclo de activación de proteínas G heterotriméricas (Offermanns, S. 2003). .....	32
<b>Figura 2.</b> Esquema de regulación en la activación / desactivación del ciclo de proteínas G. <b>GEF:</b> factor de intercambio de nucleótidos de guanina; <b>GDI:</b> inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina; <b>GAP:</b> proteína activadora de la actividad GTPasa; <b>GPCR:</b> Receptor acoplado a proteínas G (Santo e Ishikawa, 2010). .....	33
<b>Figura 3.</b> <b>A.</b> Estructura general de heterotrímero G $\alpha$ i / $\beta\gamma$ . <b>B.</b> Representación superficial del heterotrímero como se muestra en A (Nishimura et al., 2010). .....	34
<b>Figura 4.</b> <i>P. rubens</i> . <b>A.</b> Clasificación taxonómica. <b>B.</b> Macroscopía del hongo crecido por 7 días a 25°C en agar CYA. <b>C.</b> Estructuras microscópicas: <b>1.</b> Conidióforo <b>2.</b> Métula. <b>3.</b> Fialide. <b>4.</b> Conidia (Modificado de Houbraken et al., 2011). .....	45
<b>Figura 5.</b> Resumen esquemático de las aplicaciones industriales de las feruloil esteras. <b>FA=</b> ácido ferúlico, <b>CA=</b> ácido caféico, <b>pCA=</b> ácido p-cumárico, <b>SA =</b> ácido sinapico (Modificado de Benoit, et al., 2008). .....	53
<b>Figura 6.</b> Ácidos cinámicos e hidroxicinámicos. (a) ácido cinámico, (b) ácido cumárico, (c) ácido m-cumárico, (d) ácido p-cumárico, (e) ácido ferúlico, (f) ácido sinapínico, (g) ácido caféico, (h) Ácido clorogénico (Golapan, Net al., 2015). .....	54
<b>Figura 7.</b> Ubicación del ácido ferúlico en la biomasa lignocelulósica (Golapan, et al., 2015). .	54
<b>Figura 8.</b> Mapa del plásmido pJL43-RNAi. Este vector fue construido a partir de los plásmidos pJL43 y pJL43b1, y posee como marcador de selección el gen de resistencia a la fleomicina (ble) (Ullán, et al., 2008); además, de un sitio único de clonación (NcoI) entre los promotores Pgp $\delta$ y Ppcbc, en el cual fue clonado un fragmento de la CDS de los genes Pc22g05690 (ProPH) y Pc22g17420 (ProANK), respectivamente. ....	71
<b>Figura 9.</b> Posición de los oligos dentro del plásmido pJL43-RNAi para la confirmación de los transformantes de <i>P. rubens</i> . .....	74
<b>Figura 10.</b> Construcción de los plásmidos para el silenciamiento de los genes Pc22g05690 y Pc22g17420. <b>A)</b> Mapa del plásmido pPcANK-RNAi (para silenciar el gen Pc22g17420), <b>B).</b> Mapa del plásmido pPcPH-RNAi (para silenciar el gen Pc22g05690). <b>C)</b> Lisis alcalina del plásmido pPcANKRNAi ( <b>a</b> ) y del plásmido pPcPH-RNAi ( <b>c</b> ), digestión con NcoI: pPcANK-RNAi ( <b>b</b> ), pPcPHRNAi ( <b>d</b> ). .....	90

**Figura 11.** Gel de agarosa de los productos de PCR que muestra la integración completa del cassette de silenciamiento de pPcPH-RNAi (silenciamiento del gen Pc22g05690) en los transformantes de *P. rubens*. **Marcador de peso molecular empleado:** Generuler 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Cada línea representa el número de transformantes positivos. .... 92

**Figura 12.** Gel de agarosa de los productos de PCR que muestra la integración completa del cassette de silenciamiento en los transformantes de *P. rubens*, transformados con el plásmido pPcANK-RNAi (silenciamiento del gen Pc22g17420). **Marcador de peso molecular empleado:** Generuler 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Cada línea representa el número de transformantes positivos. .... 93

**Figura 13. Predicción de la estructura secundaria de la proteína ProPH.** Representación obtenida usando el servidor PSIPRED. “Conf”: grado de certeza de los resultados obtenidos representado por un histograma de color azul. “Pred”: predicción de la estructura secundaria: H= hélice alfa, representada por un cilindro rosado, E=lámina beta, representada por un cilindro amarillo, C=giros, representados por una línea negra. “AA”: secuencia aminoacídica de la proteína ProPH. Fuente: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>. .... 97

**Figura 14. Modelo de la estructura tridimensional predicha de la proteína ProPH.** Modelo obtenido usando el servidor Phyre2. Imagen coloreada desde el extremo N al C terminal. Dimensiones del modelo: (Å):**X:10.306 Y:18.819 Z:11.923**. Fuente: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>. .... 98

**Figura 15. Predicción de la estructura secundaria de la proteína ProANK.** Representación obtenida usando el servidor PSIPRED. “Conf”: grado de certeza de los resultados obtenidos representado por un histograma de color azul. “Pred”: predicción de la estructura secundaria: H= hélice alfa, representada por un cilindro rosado, E=lámina beta, representada por un cilindro amarillo, C=giros, representados por una línea negra. “AA”: secuencia aminoacídica de la proteína ProANK. Fuente: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>..... 100

**Figura 16. Modelo de la estructura tridimensional predicha de la proteína ProANK.** Modelo obtenido usando el servidor Phyre2. Imagen coloreada desde el extremo N al C terminal. Dimensiones del modelo: (Å):**X:69.915 Y:82.905 Z:78.576**. Fuente: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>. .... 101

**Figura 17. Análisis de expresión de los genes Pc22g05690 (ProPH) y Pc22g17420 (ProANK) mediante RT-PCR.** Se indican los productos de PCR resueltos en gel de electroforesis. (M):

marcador de peso molecular 1Kb. **(B-)**: Control negativo gen betatubulina. **(B3, B5 y B7)**: expresión betatubulina a los 3, 5 y 7 días; **(B+)**: control positivo gen betatubulina. **(PH-)**: Control negativo gen Pc22g05690. **(PH3, PH5, y PH7)**: expresión Pc22g05690 a los 3,5 y 7 días. **(PH+)**: control positivo gen Pc22g05690. **(ANK-)**: Control negativo gen Pc22g17420. **(ANK3, ANK5 y ANK7)**: expresión Pc22g17420 a los 3,5 y 7 días. **(ANK+)**: control positivo gen Pc22g17420.

..... 102

**Figura 18. Aspecto fenotípico de las cepas analizadas.** Las colonias fueron cultivadas por 7 días a 28°C en los medios Cz (Czapek), Pw (Power), y PDA. Controles: **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255) y **PC-NA** (cepa parental transformada con el vector pJL43-RNAi vacío); **ANK1, ANK2 y ANK3**: transformantes ProANK..... 104

**Figura 19. Aspecto fenotípico de las cepas analizadas.** Las colonias fueron cultivadas por 7 días a 28°C en los medios. Cz (Czapek), Pw (Power), y PDA. Controles: **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255) y **PC-NA** (cepa parental transformada con el vector pJL43-RNAi vacío); **PH1, PH2 Y PH3**: transformantes ProPH. .... 105

**Figura 20. Efecto de la atenuación de ProPH sobre la producción conidial.** Se muestra, de manera comparativa, la producción conidial promedio de las cepas: **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255), **PC-NA** (control), y los transformantes **PH1, PH2 y PH3**. Las cepas se cultivaron en los medios: **A.** Power, **B.** PDA y **C.** Czapek. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ ..... 108

**Figura 21. Efecto de la atenuación de ProANK sobre la producción conidial.** Se muestra, de manera comparativa, la producción conidial promedio de las cepas: **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255), **PC-NA** (control), y los transformantes **ANK1, ANK2 y ANK3**. Las cepas se cultivaron en los medios: **A.** Power, **B.** PDA y **C.** Czapek. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ ..... 109

**Figura 22. Efecto de la atenuación de ProPH sobre el crecimiento apical en medio sólido.** Se muestran las tasas de extensión apical de las cepas: **WT** (cepa parental), **PC-NA** (cepa transformada con el vector pJL43-RNAi vacío), y los transformantes **PH1, PH2 y PH3** (transformantes en ProPH). Los datos fueron tomados durante 7 días a 28°C en los medios de cultivo: Power, PDA, y Czapek. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes cada uno

realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ ..... 111

**Figura 23. Efecto de la atenuación de ProANK sobre el crecimiento apical en medio sólido.**

Se muestran las tasas de extensión apical de las cepas: **WT** (cepa parental), **PC-NA** (cepa transformada con el vector pJL43-RNAi vacío), y los **transformantes ANK1, ANK2 y ANK3** (transformantes en ProANK). Los datos fueron tomados durante 7 días a 28°C en los medios de cultivo: Power, PDA, y Czapek. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ ..... 112

**Figura 24. Efecto de la atenuación de ProPH sobre la germinación conidial.**

Se comparan las cinéticas de germinación en medio MPPY de las cepas **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255), **PC-NA** (control), y los **transformantes PH1, PH2 y PH3**. Los resultados corresponden a la media de 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05$ ..... 114

**Figura 25. La atenuación de ProPH desreguló la germinación conidial.**

Se comparan los porcentajes de germinación a las 6, 8 y 10 horas en MPPY de las cepas **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255), **PC-NA** (control), y los **transformantes PH1, PH2 y PH3**. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ ..... 114

**Figura 26. Efecto de la atenuación de ProANK sobre la germinación conidial.**

Se comparan las cinéticas de germinación en medio MPPY de las cepas **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255), **PC-NA** (control), y los **transformantes ANK1, ANK2 y ANK3**. Los resultados corresponden a la media de 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05$ ..... 115

**Figura 27. Actividad celulasa y Xilanasa.**

Se compara el índice enzimático en medio CMC y MX de las cepas: **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255), **PH1, PH2** (transformantes atenuados en ProPH), **ANK1, ANK2** (transformantes atenuados en ProANK) y **CreA** (cepa atenuada en el gen *creA*). Los resultados se expresan en unidades de IE (Índice Enzimático). Los resultados corresponden a la media de 2 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ ..... 117

**Figura 28. Efecto de la atenuación de ProPH sobre la actividad Feruloil esterasa (FAE).**

compara la potencia de hidrólisis de las cepas: **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255). **PH1, PH2** (transformantes atenuados en ProPH), y **CreA** (cepa atenuada en el gen *creA*). Los resultados se expresan en unidades de IE (Índice Enzimático). Los resultados corresponden a la media de 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$  ..... 119

**Figura 29. Efecto de la atenuación de ProANK sobre la actividad Feruloil esterasa (FAE).**

Se compara la potencia de hidrólisis de las cepas: **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255). **ANK1, ANK2** (transformantes atenuados en ProANK), y **CreA** (cepa atenuada en el gen *creA*). Los resultados se expresan en unidades de IE (Índice Enzimático). Los resultados corresponden a la media de 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$  ..... 119

**Figura 30. Ensayo para la determinación de la actividad FAE en placa.**

Las cepas utilizadas en el ensayo fueron **WT**: *P. rubens* Wis 54- 1255. **PH1, PH2** (transformantes atenuados en ProPH). **ANK1, ANK2** (transformantes atenuados en ProANK); y **CreA** (cepa atenuada en el gen *creA*). Se pueden apreciar los halos de hidrólisis correspondientes a las 168 h del cultivo en medio EF. Como control se indica la cepa de *P. rubens* Wis 54- 1255 en agar EF sin etil ferulato. .... 120

**Figura 31. Actividad FAE de los extractos enzimáticos de P. rubens.**

Se muestran los datos obtenidos para 24 h, 48 h y 72 h de fermentación sumergida en medios XS y RHS. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas de dos experimentos independientes ( $p < 0.05$ ). (U) Unidad: cantidad de enzima que es capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de AF en un tiempo de 1 minuto. .... 122

**Figura 32. Efecto de la cascarilla de arroz y el xilano sobre la transcripción de faeA y faeB en P. rubens.**

**A)** Perfil de expresión de *actA*, *faeA* y *faeB* en cultivo sumergido con cascarilla de arroz como única fuente de carbono. **B)** Perfil de expresión de *actA*, *faeA* y *faeB* en cultivo sumergido en medio Czapek- xilano. En cada caso se indica para cada gen, de izquierda a derecha: un control negativo (C-), expresión del gen a las 24 (1), 48 (2), y 72 (3) horas de cultivo, y un control positivo (C+). El control negativo no contenía ADNc del ensayo y el control positivo consistió en una muestra que en lugar de ADNc contenía ADN genómico de *P. rubens* (Wisconsin 54-1255). .... 123

**Figura 33. Efecto del xilano como fuente de carbono sobre la expresión de faeA y faeB en P. rubens.**

Se muestran los datos obtenidos para las 24, 48 y 72 horas de cultivo sumergido en

Czapeck-xilano. Los niveles de los transcritos de *faeA* y *faeB* fueron cuantificados por densitometría. El gen normalizador fue *actA*. Los cocientes *faeA/actA* y *faeB/actA* fueron expresados como porcentaje (Torren *et al.*, 2017)..... 124

**Figura 34. Modelo de trabajo que muestra los procesos de desarrollo controlados por las proteínas efectoras ProPH y ProANK en *P. rubens* Wis 54-1255.** En las relaciones expuestas el grosor de la línea indica la magnitud del efecto. El modelo incluye efectos inferidos por datos experimentales de este trabajo. .... 133

## Índice de Abreviaturas

ADP

Adenosin- di fosfato.

ADN

Ácido desoxirribonucleico

ADNc

Ácido desoxirribonucleico complementario.

AMPc.

Adenosin-mono fosfato cíclico

ARN

Ácido ribonucleico.

ARNm

ARN mensajero

CA

Ácido caféico

CDS

Secuencia codificante

CMC

Carboximetilcelulosa

*creA*

Gen codificante para el regulador transcripcional CreA .

CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

Sulfato de cobre hepta- hidratado.

EF

Etil ferulato

FA

Ácido ferúlico.

*faeA*

Gen feruloil esterasa A

*faeB*

Gen feruloil esterasa B

FAEs  
Feruloil esterasas

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
Sulfato de hierro hepta-hidratado

G $\alpha$   
Subunidad alfa de proteínas G heterotriméricas

GAPs  
Proteínas activadoras o aceleradoras de la actividad GTPasa

GDI  
Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina

GDP  
Guanosin- di fosfato.

GEF  
Factor de intercambio de nucleótidos

GTP  
Guanosin-trifosfato

GPCRs  
Receptores de membrana acoplados a proteínas G

HPLC  
Cromatografía líquida de alta eficacia.

IE  
Índice enzimático

KCl  
Cloruro de potasio

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
Fosfato ácido di potásico.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
Sulfato di-ácido de potasio.

MAPK  
Proteínas kinasas activadas por mitógenos

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

Sulfato de magnesio hepta-hidratado.

NaCl

Cloruro de sodio.

NaNO<sub>3</sub>

Nitrato de sodio.

NaOH

Hidróxido de sodio.

OMS

Organización mundial de la salud

ORF

Marco abierto de lectura

Pb

Pares de bases

pCA

Ácido p-cumárico

PcFaeA

Proteína feruloil esterasa A de *P. rubens*

PcFaeB

Proteína feruloil esterasa B de *P. rubens*

PCR

Reacción en cadena de la polimerasa.

*pgal*

Gen codificante para subunidad alfa de proteína G heterotrimérica en *P. rubens*

PKAs

Fosfoquinasa A

PH

Homología de plekstrin

RHS

Medio de cultivo cascarilla de arroz-Sakamoto

RNAi  
RNA interferente.

RT-PCR  
Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa.

SA  
Ácido sinápico

XS  
Medio de cultivo xylan-Sakamoto

## 1. INTRODUCCIÓN

*Penicillium rubens* es uno de los microorganismos de mayor valor a nivel industrial y una de las especies más reconocidas por la industria biotecnológica, debido a su versatilidad. La relevancia histórica e industrial de este hongo estriba en su capacidad para producir antibióticos como la penicilina, precursores de antibióticos betalactámicos, y otros metabolitos de interés para la industria farmacéutica y biomédica. (Weber, Bovenberg, y Driessen, 2012; Bohm, *et al.*, 2013). Entre otras aplicaciones con las que este microorganismo se relaciona en la actualidad, sobresalen: su papel en el control biológico frente a enfermedades y plagas ocasionadas por mohos, nematodos y virus en cultivos de importancia agrícola (Zhong, *et al.*, 2015); su desempeño exitoso en procesos de biorremediación (Luo, Ding, Wei, Zheng, y Luo, 2014); su renovado potencial como productor de moléculas con actividad biológica, tales como péptidos con actividad antifúngica (Marx, Binder, Leiter, y Pósci, 2008) y los sorbicilinoideos, metabolitos secundarios que poseen actividad antiviral, antiinflamatoria y antimicrobiana (Guzmán, *et al.*, 2017); así como, su implicación en la transformación y aprovechamiento de residuos agrícolas, a partir de la secreción de enzimas lignocelulolíticas como las feruloil esterasas (FAEs). Estas enzimas pertenecientes a la familia de las hidrolasas, además de facilitar la degradación de la materia vegetal, otorgan un valor añadido a los residuos agroindustriales al catalizar en dicho proceso, la liberación de ácidos difroxicinámicos de interés para la industria biomédica y alimentaria, debido a sus propiedades antioxidantes (Topaka, Vafiadi, y Chistakopoulos, 2007; Koseki, *et al.*, 2009; Cabral, de Freitas, Fanchini, de Alameda, y Cano, 2018; Ullah, *et al.*, 2019).

En años recientes, el hallazgo de nuevos productos metabólicos de *P. rubens* con actividad biológica, ha dado lugar a un número creciente de investigaciones sobre este microorganismo,

enfocadas hacia una mejor comprensión de su fisiología, como vía estratégica para mejorar aquellos procesos de interés industrial y biotecnológico que lo involucran. En este sentido, tiene particular relevancia la comprensión de todos aquellos mecanismos que relacionan la morfogénesis con el metabolismo del hongo, muchos de estos aún desconocidos. Sin embargo, algunos estudios desarrollados en esta área resaltan que estos procesos en *Penicillium* como en otros ascomicetos, se encuentran regulados a través de mecanismos que involucran la transducción de señales (Li, et al., 2007; Valle, et al., 2015).

Las proteínas heterotriméricas de unión a GTP, o proteínas G heterotriméricas, son un ejemplo de transductores de señales, que se encuentran mediando importantes procesos a nivel celular (Shpakov, 2013). Pese a que el conocimiento en torno a la ruta de señalización mediada por proteínas G heterotriméricas, y su rol en hongos filamentosos es aún escaso; algunos estudios apoyados en el análisis comparativo de transformantes con diferentes niveles de actividad de las subunidades  $\alpha$  de proteínas G ( $G\alpha$ ), demuestran el papel que estas desempeñan en la regulación, a nivel global, del programa de desarrollo de *P. rubens* (García RO, y Fierro, 2017). Se ha puesto de manifiesto la participación de la proteína Pga1 (una subunidad  $G\alpha$  de proteínas G), en procesos morfo-fisiológicos como la conidiación, la extensión apical, la germinación, y la respuesta a condiciones de estrés; así como, en la regulación de la producción de metabolitos secundarios como la penicilina, la roquefortina C y la crisogenina en este hongo (García RO, Martín, Fierro, 2011; García RO, et al., 2008). Sin embargo, conocer cuál es el papel de los efectores que se encuentran mediando esta ruta de señalización corriente abajo, constituye uno de los retos de estudio al día de hoy.

Estudios recientes soportados en análisis proteómicos, han aportado información relevante para el entendimiento de la vía de señalización mediada por Pga1 en *P. rubens*. De todos los hallazgos, atrae especial interés la identificación de dos proteínas ProPH y ProANK (códigos Pc22g05690 y Pc22g17420, respectivamente) candidatas para la actividad transductora de señales, como potenciales efectores downstream de la ruta de señalización mediada por Pga1. La proteína ProPH se caracteriza por tener un dominio de Pleckstrin, mientras que ProANK contiene un dominio de repeticiones de Ankyrina. Ambas proteínas hasta ahora no han sido descritas en hongos filamentosos ni a nivel estructural, ni funcional (Carrasco, *et al.*, 2016).

Sustentado en lo anterior, el objetivo fundamental de este trabajo, fue dilucidar la función de los efectores ProPH y ProANK de la ruta de señalización mediada por Pga1 en *P. rubens*, a nivel de sus efectos sobre la morfología, y la producción de feruloil esterasas, en este hongo.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las proteínas G heterotriméricas son importantes intermediarios moleculares de la señalización celular en eucariotas (Valle, *et al.*, 2015). Se ha demostrado que en hongos, las subunidades  $G\alpha$  desempeñan un rol clave en la regulación de procesos biológicos como la producción de factores de virulencia y micotoxinas, determinantes en el grado de patogenicidad de organismos como *Cochliobolus heterostrophus* y *Stagonospora nodorum* (Degani, 2013 y Gummer, *et al.*, 2013); en el desarrollo morfológico y reproductivo de *Monascus ruber* (Yang, *et al.*, 2012); en la recepción de estímulos externos, y la respuesta frente a diferentes condiciones de estrés en *Penicillium roqueforti* (García RO, *et al.*, 2009); así como, en el acceso a diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (Gummer, *et al.*, 2013). Otros estudios relacionan estas vías, con mecanismos que regulan en hongos la síntesis de un amplio rango de metabolitos secundarios (Brodhagen y Keller, 2006; Park, *et al.*, 2012; Garcia RO, *et al.*, 2008), y la biosíntesis de proteínas extracelulares (Emri, *et al.*, 2008; Tan, *et al.*, 2009; Hu, *et al.*, 2013). Se cree que las proteínas G heterotriméricas conservan en todos los hongos su función general, al ejercer un papel central en la regulación del programa de desarrollo morfo-fisiológico, pero mediante cambios en la interacción con otros efectores (García RO y Fierro, 2017).

En *P. rubens* los mecanismos que regulan la respuesta a estímulos, y los aspectos que relacionan la morfología con su actividad metabólica; no están aún bien dilucidados. No obstante, la literatura presenta evidencia formal que destaca el papel de la actividad transductora de señales, en la mediación de estos procesos en dicho microorganismo; en concreto, a través de la subunidad  $G\alpha$  Pga1 a nivel de la membrana celular (García RO, Martín, Fierro, 2011).

Entendiendo, que las vías de transducción de señales como la mediada por Pga1 en *P. rubens*, atienden a la respuesta en cascada de moléculas implicadas en la transmisión de una señal determinada a nivel celular; se vislumbra la importancia que recae en el estudio de la forma en que los efectores de estas vías de señalización se encuentran organizados, y regulan las respuestas celulares (Lafon, *et al.*, 2006). Comprender las bases moleculares de estos mecanismos es de gran importancia, y tiene implicaciones prácticas en *P. rubens*; en función de su trascendencia industrial, medioambiental y clínica. Esto no solo constituye la posibilidad de conocer cómo se encuentran regulados los aspectos que condicionan la morfología, los mecanismos de adaptación y la fisiología del hongo; lo anterior propende a su vez, una vía estratégica para mejorar los procesos industriales que involucran a *P. rubens*, en términos de su estabilidad y funcionabilidad en su cultivo *in vitro* y a gran escala; como los relacionados con la actividad agrícola.

La actividad agrícola constituye el sector económico primario en diferentes países a nivel mundial. En esta, un amplio espectro de cultivos desde la etapa de siembra hasta su comercialización, generan gran cantidad de residuos heterogéneos, en su mayoría biomasa; representando un problema desde el punto de vista ambiental, a causa de la falta de técnicas para su aprovechamiento y re- uso (Gopalan, Madhavan, Szakacs, Parameswaran, y Pandey, 2016). Estos subproductos de la agroindustria, pueden ser tratados e incluso servir para la obtención de productos con valor agregado (Núñez, 2012). Una de las alternativas que despierta actualmente gran interés para el manejo de residuos especialmente para aquellos de tipo vegetal, es el uso de enzimas FAEs; pues permiten además de la bioconversión del material lignocelulósico, la liberación de productos derivados como los ácidos: ferúlico, caféico y sinápico que son de gran utilidad en la industria alimentaria y médica. Adicionalmente, las FAEs en su accionar repercuten

en procesos de importancia económica como lo son la producción de bioetanol durante la etapa de sacarificación, y en el paso de blanqueo en el proceso de elaboración de papel (Fazary, y Ju, 2007; Benoit *et al.*, 2008; Topakas, Vafiadi, y Chistakopoulos, 2007; López, *et al.*, 2012; Kumar, y Pruthi, 2014).

Los hongos filamentosos son los microorganismos más descritos en la literatura para la obtención de FAEs, donde destaca el género *Penicillium*, y entre este *P. rubens* como uno de los hongos más estudiados como productor de estas enzimas (Sakamoto *et al.*, 2005; López *et al.*, 2011; Rodríguez, 2017). No obstante, se ha reportado que las FAEs son producidas en niveles relativamente bajos en organismos nativos, lo que hace excesivamente costosa su producción industrial (López *et al.*, 2011); por lo que lograr niveles altos de expresión de las enzimas resulta necesario. De lo anterior, se deriva el interés en estudiar los mecanismos genéticos que permitan incrementar la producción de estas enzimas y mejorar el proceso de bioconversión de residuos vegetales a partir de FAEs.

Se sabe, que las rutas de transducción de señales gobiernan una amplia gama de funciones celulares, con lo que consiguen afectar además de la producción de metabolitos secundarios, la morfología y respuesta al estrés fisiológico; la producción de exoenzimas en diferentes organismos, en muchos casos incrementándola (Brodhagen y Keller, 2006; García RO, *et al.*, 2009). En consecuencia, estudiar el papel de los efectores downstream ProPH y ProANK de la ruta de transducción de señales mediada por Pga1, en la morfología, y la producción de feruloil esterases en *P. rubens* en este trabajo, persigue desde la ciencia básica ampliar la comprensión que se tiene sobre la función que ejercen los componentes que integran estas vías de señalización

celular sobre el desarrollo morfo-fisiológico de hongos filamentosos, y ahondar en posibles mecanismos asociados con la regulación en la secreción de enzimas xilanolíticas como las FAEs en estos organismos. El papel de las vías de señalización mediadas por proteínas G heterotriméricas en la secreción de enzimas feruloil esterasas no se encuentra documentado hasta la fecha. Por tanto, su investigación representa un aporte en el campo biotecnológico, especialmente, en *P. rubens* en el que la producción de FAEs es promisoría (López, *et al.*, 2011) y cuya aplicación en la degradación de residuos vegetales representa una vía hacia el desarrollo de procesos ambientalmente sostenibles.

### 3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

La capacidad de una célula para percibir las condiciones del entorno, dar respuesta a los cambios del medio ambiente, y adaptarse para proteger la homeostasis; está condicionada por complejas vías de transducción de señales (Landry, *et al.*, 2016). Estas vías constituyen el mecanismo central en el procesamiento de la información celular, y lo hacen a partir de reacciones en cascada que son activadas por estímulos ambientales. En lo anterior, intervienen moléculas que actúan como señales, y que interactúan a su vez químicamente con moléculas remitentes (upstream), y con moléculas receptoras (downstream), subyacentes a la transmisión en curso; lo que a menudo resulta, en alteraciones en el estado transcripcional, y en modificaciones en el comportamiento de la célula en respuesta al estímulo percibido (Uda, y Kuroda, 2016).

En razón de lo anterior, en el presente trabajo serán abordados los conceptos y temática asociada a las proteínas G heterotriméricas, como componentes prominentes de las vías de transducción de señales en hongos filamentosos (Studt, Humpf, y Tudzynsky, 2013).

#### 3.1 **Proteínas G heterotriméricas: transductores de señalización transmembrana.**

Las proteínas G heterotriméricas o proteínas de unión a nucleótidos de guanina, conforman una familia de proteínas reguladoras que participan en la fisiología celular, como mediadores de la transducción de señales (Delgado, *et al.*, 2012). En eucariotas, el procesamiento de señales a través de GTPasas triméricas es uno de los sistemas más utilizados para la transferencia de información, puesto que su actuación es crítica en la transducción de señales que son detectadas por un grupo diverso de receptores de superficie celular; principalmente, por los receptores de

membrana acoplados a proteínas G (GPCRs) (Syrovatkina, *et al.*, 2016). En ello, las proteínas G sirven de interruptores biológicos activando o desactivando la señal en diversas rutas de señalización celular. En esencia, actúan al acoplar los receptores de la membrana citoplasmática, con un extenso número de efectores intracelulares y con ello desencadenan una respuesta celular, frente a un estímulo determinado proveniente del entorno.

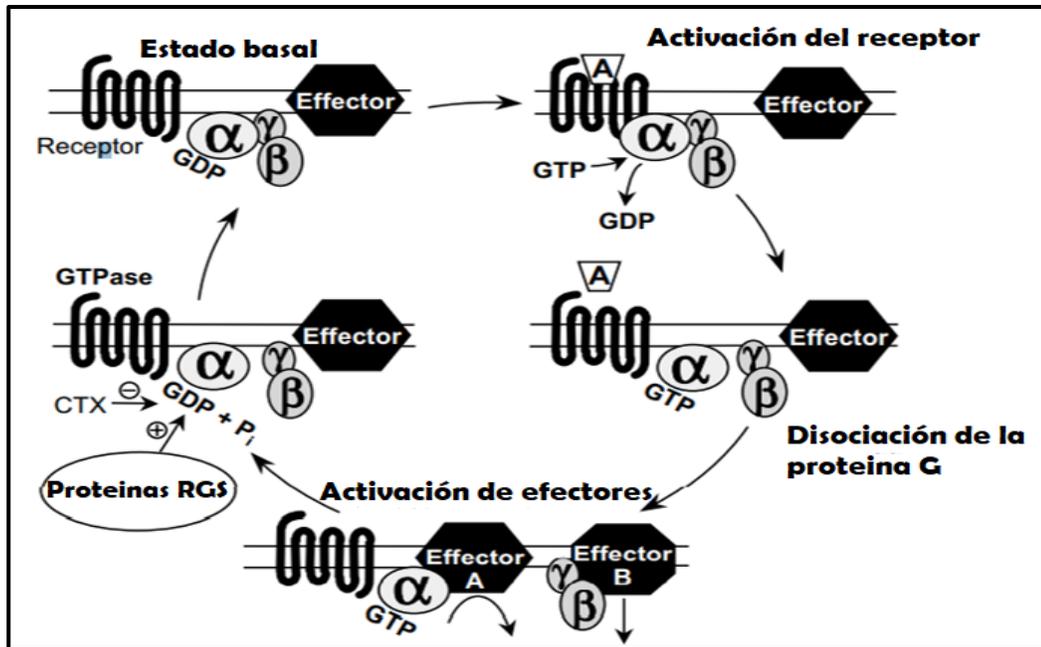
A diferencia de las proteínas G monoméricas (grupo de GTPasas pequeñas ubicadas a nivel del citosól y el nucleoplasma) (Schaafsma, *et al.*, 2008); las proteínas G heterotriméricas constituyen proteínas de gran tamaño, y se encuentran localizadas en la cara interna de la membrana celular (García RO, Martín, Fierro, 2011). Estas proteínas estructuralmente constan de tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ( $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ ), de las cuales la subunidad  $G\alpha$  es el componente de unión a nucleótidos. Dicho complejo proteico se organiza en una estructura altamente conservada; y en su estado inactivo las tres subunidades se mantienen unidas y ancladas a la parte interna de la membrana plasmática (Bolker, 1998).

En la mayoría de organismos estudiados al día de hoy, han sido reportadas múltiples subunidades de proteínas G. Cabe destacar en eucariotas algunos ejemplos entre los que se ubican: el *Homo sapiens*, cuyo genoma posee 17 subunidades  $G\alpha$ , 5  $G\beta$  y 12  $G\gamma$ ; *Drosophila melanogaster* con 11  $G\alpha$ , 3  $G\beta$  y 2  $G\gamma$ , y *Arabidopsis thaliana* que presenta una subunidad  $G\alpha$ , 1  $G\beta$  y 3  $G\gamma$ . En hongos, se tienen datos sobre algunos organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae*, que presenta 2  $G\alpha$ , 1  $G\beta$  y 1  $G\gamma$ ; y *Neurospora crassa* que cuenta con 3  $G\alpha$ , 1  $G\beta$  y 1  $G\gamma$  (Valle, *et al.*, 2015). De manera particular, diferentes estudios reportan que la mayoría de hongos filamentosos pertenecientes a la división Ascomycota, se caracterizan por tener tres subunidades  $G\alpha$ , y una única

subunidad  $G\beta$  y  $G\gamma$ ; lo que les permitiría generar hasta tres proteínas G heterotriméricas distintas (Michkov, *et al.*, 2012).

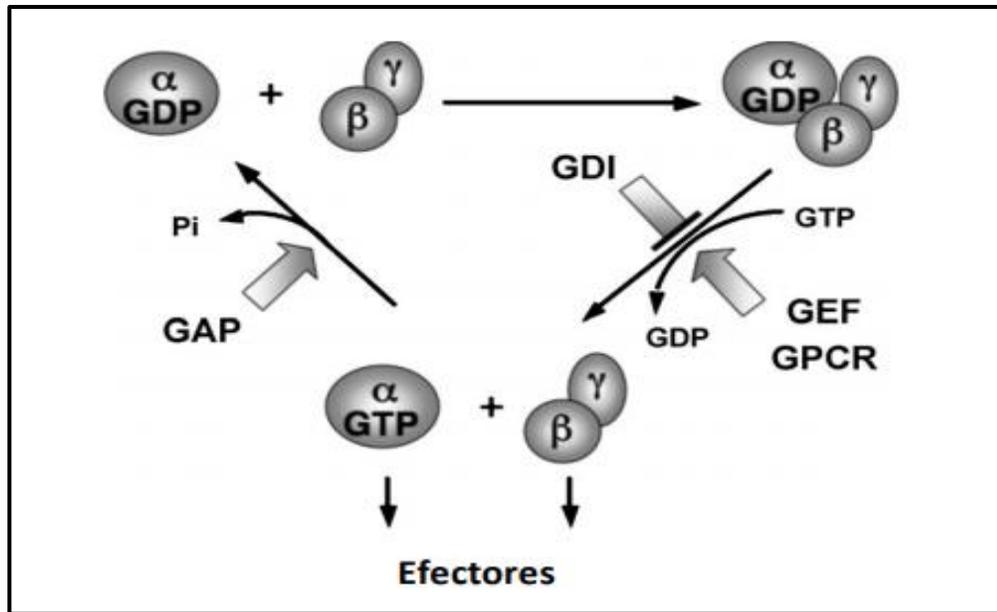
### **3.1.1. Ciclo de activación de las proteínas G heterotriméricas.**

El mecanismo de activación de las proteínas G, sugiere la presencia de un estímulo externo o el reconocimiento de un agonista por parte de receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs). Una vez el GPCR es activado por su ligando, se induce un cambio conformacional en las proteínas G, en el que los GPCRs actúan como factores de intercambio de nucleótidos (GEF). Este proceso cataliza el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$ , lo que conduce a la disociación de la estructura heterotrimérica, en dos complejos funcionales:  $\alpha$ - GTP y el dímero  $G\beta\gamma$  (**Figura 1**). Lo anterior provoca la activación de la señal, y da inicio a toda una cascada de eventos intracelulares. Así pues, tanto la subunidad  $G\alpha$  como el complejo  $G\beta\gamma$ , son capaces de estimular y regular distintas moléculas efectoras corriente abajo (efectores downstream), como: la adenilato ciclasa, la fosfolipasa A2 (Syrovatkina, *et al.*, 2016), las proteínas quinasas; entre otras (Santo, y Ishikawa, 2010).



**Figura 1.** Mecanismo del ciclo de activación de proteínas G heterotriméricas (Offermanns, S. 2003).

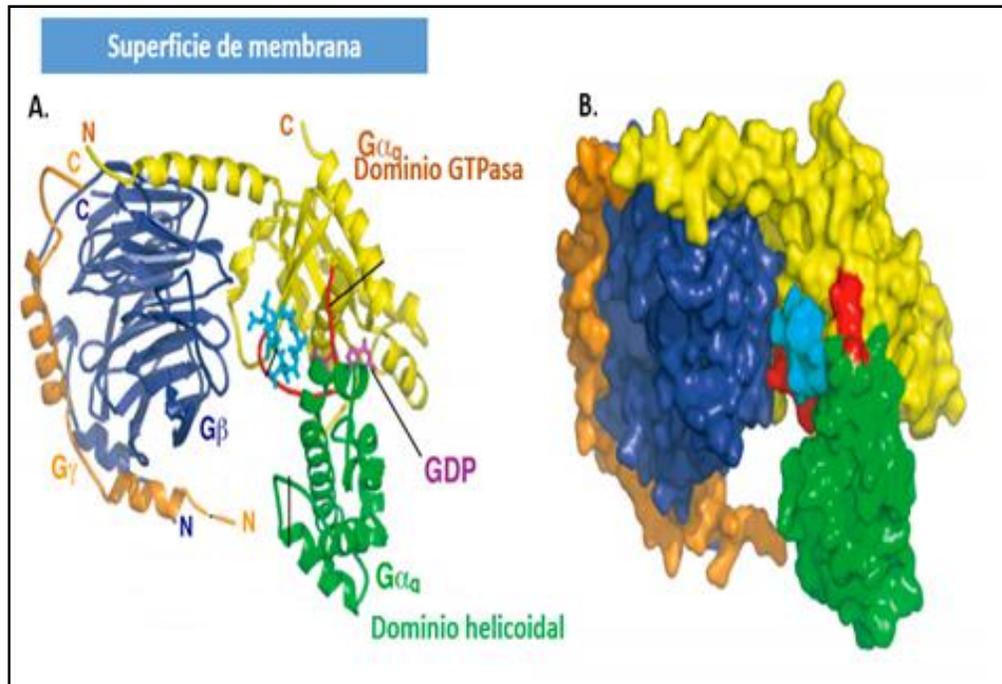
En cuanto a la inactivación de la señal, esta estará condicionada por la actividad GTPasa endógena de  $G\alpha$ , por activación de las proteínas GAP (*Figura 2*). De ocurrir esto, el trímero inicial se re-asociará, y se dará lugar a la inactivación y terminación de las interacciones entre cada uno de los componentes funcionales ( $\alpha$ -GTP y  $G\beta\gamma$ ), y las diferentes moléculas efectoras; cerrando así, el ciclo de este tipo de proteínas. Todo lo anterior, conduce a la regulación de actividades a nivel celular tan trascendentales, como lo es la transcripción de la información genética (Villapun, *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Esquema de regulación en la activación / desactivación del ciclo de proteínas G. **GEF:** factor de intercambio de nucleótidos de guanina; **GDI:** inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina; **GAP:** proteína activadora de la actividad GTPasa; **GPCR:** Receptor acoplado a proteínas G (Santo e Ishikawa, 2010).

### 3.1.1.1. Subunidad $G\alpha$

De las tres subunidades que integran las proteínas G heterotriméricas, la subunidad  $G\alpha$  corresponde a una GTPasa como ya se ha mencionado, y es quien adopta diferentes conformaciones, dependiendo de si se encuentra enlazada a GTP o GDP (Bolker, 1998). Estructuralmente  $G\alpha$  consta de dos dominios: un dominio GTPasa tipo Ras (posee la actividad de hidrólisis de GTP a GDP), y un dominio alfa helicoidal (*Figura 3*); es entre estos dos dominios donde se ubica fuertemente unido el nucleótido de guanina (Syrovatkina, *et al.*, 2016). En su estado inactivo,  $G\alpha$  posee una molécula de GDP unida a ella y se encuentra anclada a la membrana a partir de un grupo miristoilo o palmitoilo en su extremo N- terminal (Minh Duc, Kim, y Chung, 2015).



**Figura 3.** A. Estructura general de heterotrímero  $G\alpha_i / \beta\gamma$ . B. Representación superficial del heterotrímero como se muestra en A (Nishimura *et al.*, 2010).

### 3.1.1.2. Subunidades $G\beta$ y $G\gamma$

Del complejo proteico que integra a las proteínas G heterotriméricas, ha sido demostrada la capacidad del dímero  $G\beta\gamma$ , para inducir una alta afinidad de los receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCR) por la subunidad  $G\alpha$ , participando significativamente en la activación de las proteínas G heterotriméricas (Oldham *et al.*, 2007). En su estado inactivo, las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  se encuentran ancladas a la membrana celular a partir de la prenilación de la subunidad  $G\gamma$  (Sondek *et al.*, 1996); mientras que, tras la disociación del complejo heterotrimérico en el dímero  $G\beta\gamma$  las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  permanecen fuertemente unidas mediante una interacción “coiled-coil”, por lo que actúan como una única unidad funcional durante la actividad transductora de señales (Oldham *et al.*, 2007).

### **3.2 Clasificación de las proteínas G heterotriméricas en hongos.**

La especificidad de las proteínas G, es determinada en función de las secuencias y similitud funcional de las subunidades  $G\alpha$ . En hongos, las proteínas G heterotriméricas se clasifican en tres grupos ( $G\alpha$ I- $G\alpha$ III). Los grupos  $G\alpha$ I y  $G\alpha$ III, se relacionan en términos funcionales con las subunidades  $G\alpha$ i y  $G\alpha$ s en mamíferos; asociados respectivamente, con efectos inhibidores y estimuladores sobre la actividad de la adenilato ciclasa. Por su parte el grupo  $G\alpha$ II, no presenta un equivalente en mamíferos que arroje una idea de su función en hongos; además de ser las más heterogéneas filogenéticamente (Bolker, 1998).

De los tres grupos, las subunidades  $G\alpha$  que pertenecen al grupo I ( $G\alpha$ I), se caracterizan por la presencia de motivos de miristoilación en el extremo N-terminal y de ADP ribosilación por la toxina pertussis en el extremo C-terminal, y son las subunidades objeto de interés para el presente trabajo. Estas subunidades  $G\alpha$ , serían las más conservadas filogenéticamente, con mayores efectos pleiotrópicos en hongos, y las únicas con capacidad de afectar significativamente el metabolismo secundario en estos organismos (Wright, Krystofova, Park, y Borkovich, 2007; García RO y Fierro, 2017).

### **3.3 Subunidades alfa del grupo I ( $G\alpha$ i): Participación en el programa de desarrollo en hongos filamentosos de la División Ascomycota.**

La división Ascomycota constituye el grupo más numeroso y diverso de hongos, e incluye especies de gran importancia médica, agrícola, y biotecnológica (Taylor, Krings, Taylor, 2015). La adaptación al entorno por parte de estos organismos, es fundamental en términos de su

capacidad de propagación, colonización, y competencia exitosa dentro de su habitat natural. En lo anterior, los procesos asociados al desarrollo morfogénico son de elevada trascendencia (García RO, y Fierro, 2017).

El ciclo vital en ascomicetes, presenta un patrón general que se caracteriza por dos modalidades de reproducción: sexual y asexual. De estos, su forma de reproducción más común, se da principalmente a partir de la producción de propágulos asexuales llamados conidios, generados en estructuras microscópicas llamadas conidioforos (Wright, y Park, 2007). Los conidios son esporas asexuales que se desempeñan como estructuras de resistencia al estrés en hongos filamentosos, y les confiere tolerancia a diferentes condiciones ambientales; lo que repercute en las características morfo-genéticas del organismo (Hagiwara, *et al.*, 2014).

La germinación conidial por su parte, consta de tres etapas que corresponden respectivamente, a la activación o interrupción del estado de latencia, al crecimiento isotrópico, y al establecimiento de un estado de crecimiento polarizado (Harispe, *et al.*, 2008; Xie, 2013; Fortwendel, 2015). Esta última conduce a la formación de un tubo germinal, el que, a partir de su elongación, demarca el límite entre la germinación, y el crecimiento vegetativo. En esta fase es conformada una red organizada de hifas que corresponde al micelio. Este se encuentra conformado por células que interactúan entre sí, y participa de procesos como la adquisición de nutrientes, el desarrollo de estructuras reproductivas, y la formación del micelio aéreo, a partir del cual surgen los conidióforos o ramas fértiles como estructuras multicelulares de reproducción asexual, que dan lugar a la generación y desarrollo de nuevos conidios (Greenwald *et al.*, 2010; Park y Yu, 2012). Todos estos procesos del desarrollo en el hongo son de suma importancia, y dependen en gran

medida de las condiciones externas, por lo que se requiere de una maquinaria genética especializada para una reprogramación celular eficaz; lo que resulta crucial cuando estos organismos se encuentran expuestos a condiciones cambiantes y/o estresantes (Hartmann, *et al.*, 2011; Fernández, *et al.*, 2016).

Los hongos han evolucionado en sistemas de señalización celular que conducen a la activación de respuestas biológicas que implican cambios en la expresión génica, y que desempeñan un papel fundamental en su desarrollo y morfogénesis; lo que les permite responder adecuadamente frente a diferentes señales, y sobrevivir en diversos ambientes (Bolker, 1998). Este es el caso, de la transducción de señales mediada por subunidades *Gai*. Diferentes estudios han identificado su implicación en la mediación de importantes procesos en hongos filamentosos de la división Ascomycota.

La actividad de las subunidades  $G\alpha$  se ha visto asociada con aspectos que involucran la reproducción, el grado de patogenicidad, y la regulación del tráfico vesicular en diferentes especies de hongos analizadas (Tisch, Kubicek, y Schmoll, 2011; Hewavitharana, y Wedegaertner, 2012). Otras investigaciones por su parte, demuestran un estrecho vínculo entre las subunidades  $G\alpha$ , el proceso de desarrollo morfológico, la respuesta a diferentes condiciones de estrés (García RO, *et al.*, 2009; García RO, Martín, y Fierro, 2011), y la producción de metabolitos primarios y secundarios en estos organismos (Tan *et al.* 2009; Hu, *et al.*, 2013; Garcia RO, *et al.*, 2017). Lo anterior reflejaría una participación activa de las subunidades  $G\alpha$ , en transiciones morfológicas y fisiológicas estrechamente relacionadas con la detección de estímulos; que condicionan el desarrollo morfológico y la expresión metabólica en ascomicetes (Hu, *et al.*, 2013).

A continuación, son expuestos algunos de los datos relacionados en la literatura, que denotan los efectos reguladores de las subunidades G $\alpha$ i, en el desarrollo morfológico, la respuesta al estrés fisiológico, y en la producción de metabolitos secundarios y exoenzimas en ascomicetes filamentosos.

### **3.3.1. Desarrollo morfológico**

Estudios realizados en torno al desarrollo morfológico en algunos de los ascomicetes filamentosos más representativos, relacionan las subunidades G $\alpha$ i con efectos demostrados, aunque variables entre un organismo y otro, en la modulación de procesos como el crecimiento vegetativo, la germinación conidial, y la conidiación (tabla 1). Esto ha sido posible gracias al desarrollo de alelos modificados que permiten alcanzar una activación constitutiva de las subunidades G $\alpha$ i en estudio; o modificaciones que, por el contrario, conducen a la disminución parcial o total de dicha actividad, facilitando su análisis funcional (García RO, *et al.*, 2011; Tisch, *et al.*, 2011; Hu, *et al.*, 2013).

**Tabla 1.** Efectos reportados de las subunidades G $\alpha$ i sobre los procesos de germinación, crecimiento vegetativo y conidiación, en especies de hongos filamentosos pertenecientes a la división Ascomycota.

Especie	Tipo de subunidad G $\alpha$ : gen	Efecto sobre		
		Germinación conidial	Crecimiento vegetativo	Conidiación
<i>Alternaria alternata</i>	G $\alpha$ I: <i>aga1</i>	?	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	G $\alpha$ I: <i>fadA</i> <sup>a</sup>	nd	+	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	G $\alpha$ I: <i>gpaA</i>	nd	+	-
<i>Aspergillus nidulans</i>	G $\alpha$ I: <i>fadA</i>	nd	+	-
	G $\alpha$ III: <i>ganB</i>	+	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	G $\alpha$ I: <i>aorfadA</i>	nd	-	-
<i>Botrytis cinerea</i> ( <i>Botryotinia fuckeliana</i> )	G $\alpha$ I: <i>bcg1</i>	ns	+	+
	G $\alpha$ II: <i>bcg2</i>	ns	ns	ns
	G $\alpha$ III: <i>bcg3</i>	+	nd	+
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	G $\alpha$ I: <i>cga1</i>	+	+	nd
<i>Colletotrichum graminicola</i>	G $\alpha$ I: <i>cgg1</i>	+	nd	+
<i>Colletotrichum trifolii</i>	G $\alpha$ I: <i>ctg-1</i>	+	nd	nd
<i>Cryphonectria parasitica</i>	G $\alpha$ I: <i>cpg-1</i>	nd	?	-
	G $\alpha$ II: <i>cpg-2</i>	nd	ns	ns
	G $\alpha$ III: <i>cpg-3</i>	nd	nd	nd
<i>Fusarium fujikuroi</i>	G $\alpha$ I: <i>ffg1</i>	nd	ns	nd
	G $\alpha$ II: <i>ffg2</i>	nd	ns	nd
	G $\alpha$ III: <i>ffg3</i>	nd	+	nd
<i>Fusarium graminearum</i> ( <i>Giberella zeae</i> )	G $\alpha$ I: <i>Gzgpa1</i>	nd	ns	nd
<i>Fusarium oxysporum</i>	G $\alpha$ I: <i>fga1</i>	ns	+	+
	G $\alpha$ III: <i>fga2</i>	nd	ns	ns
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	G $\alpha$ I: <i>fadA</i> <sup>a</sup>	nd	-	-
<i>Magnaporthe grisea</i>	G $\alpha$ I: <i>magB</i>	nd	+	+
	G $\alpha$ III: <i>magA</i>	nd	ns	ns
<i>Monascus ruber</i>	G $\alpha$ I: <i>mga1</i>	nd	+	+
<i>Neurospora crassa</i>	G $\alpha$ I: <i>gna1</i>	+	+	-

**nd:** el efecto no fue determinado; **ns:** G $\alpha$  no produce un efecto significativo en la característica analizada; **+**: el efecto es positivo; **-**: el efecto es negativo; **?**: los resultados son contradictorios o poco claros. <sup>a</sup> Se usó un gen heterólogo de una especie relacionada. El gen homólogo no ha sido descrito. (Tomado de García RO y Fierro, 2017).

En las cepas analizadas al día de hoy, se ha observado que G $\alpha$ i regula negativamente la conidiación en hongos filamentosos (Segers y Nuss, 2003). En el caso de la germinación conidial los efectos no parecen claros. Sin embargo, se ha observado que en algunos organismos el silenciamiento de G $\alpha$ i, afecta tanto el crecimiento micelial como conidial (Yu, *et al.*, 2017); mientras que, en otros, se ha demostrado que estimula la germinación de conidias bajo condiciones nutricionales determinadas; entre estas, la ausencia de fuentes de carbono (Garcia RO, *et al.*, 2009). Por su parte en cuanto al crecimiento vegetativo, se ha identificado que las G $\alpha$ i participan de manera clave en la regulación del crecimiento vegetativo, tanto a nivel positivo como negativo en diferentes organismos (Gummer *et al.*, 2012).

### **3.3.2. Resistencia al estrés fisiológico**

El programa de desarrollo en hongos filamentosos, depende de numerosas condiciones externas entre estas: la disponibilidad de nutrientes, oxígeno, luz, agua, pH, temperatura, la osmolaridad, e inclusive de la hidrofobicidad superficial (d'Enfert, 1997). Se ha visto, que la exposición al estrés abiótico (térmico, osmótico, lumínico, oxidativo y/o nutricional) (Hartmann, *et al.*, 2011; Fernandez, *et al.*, 2016) repercute considerablemente en la distribución, persistencia, e incluso en la infectividad de muchos hongos (Jaronski, 2010). Lo anterior se soporta en efectos a nivel del programa de desarrollo de los mismos, que repercuten en procesos como la germinación, el crecimiento vegetativo, y la esporulación (Fang, *et al.*, 2010; Hartmann, *et al.*, 2011); lo que se refleja en cambios morfológicos y metabólicos en el hongo, en respuesta a un ambiente o condición determinada (Rangel, *et al.* 2008). Al respecto, las líneas de regulación o los mecanismos de recepción de estímulos, constituyen un aspecto fundamental (Hartmann, *et al.*, 2011).

Se ha visto que las Gai desempeñan un rol importante en la adaptación de diferentes ascomicetos filamentosos a las condiciones de estrés fisiológico. Algunos estudios relacionan las Gai con un aumento en la sensibilidad térmica de las conidias en ciertos hongos. Este es el caso de *Penicillium camemberti*, un organismo de gran interés para la industria alimentaria, en el que se observó que la expresión dominante de una proteína Gai disminuye la resistencia al estrés térmico e hipertónico (García RO, *et al.*, 2017). No obstante, el papel de Gai en la resistencia al estrés hipertónico es variable, puesto que en algunos organismos como *Neurospora crassa*, procesos como el crecimiento vegetativo se han visto estimulados bajo condiciones hipertónicas (Ivey, Kays, Borkovich, 2002). Se ha demostrado, además, que las Gai median la detección de fuentes de carbono y controlan la germinación en hongos filamentosos en respuesta a la glucosa (García RO, Martín y Fierro, 2011).

Bajo las circunstancias antes expuestas, la capacidad de adaptación a condiciones de estrés térmico, osmótico, nutricional, u otro es crucial; ya que muchos de estos factores abióticos son reportados como factores reguladores del crecimiento, y expresión de genes involucrados en las rutas biosintéticas de metabolitos secundarios de interés industrial (Boudreau, *et al.*, 2013; Lozano, *et al.*, 2013; García RO *et al.*, 2017), así como, de enzimas que derivan del metabolismo primario de estos organismos (Duran, *et al.*, 2010; Zampieri, *et al.*, 2011; Svanström, y Melin,, 2013).

### **3.3.3. Producción de metabolitos secundarios.**

La regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios es compleja en hongos

filamentosos, y suele estar coordinado con el desarrollo de los mismos (Calvo *et al.*, 2002). Se ha demostrado que las vías de señalización mediadas por subunidades G $\alpha$ i, consiguen afectar en ascomicetos la producción secundaria de metabolitos como: micotoxinas, pigmentos, antibióticos, entre otros; aunque probablemente de diferentes maneras (García RO, *et al.*, 2017). En *Aspergillus nidulans* se ha reportado que la subunidad G $\alpha$  (FadA), promueve el crecimiento vegetativo, reprime el desarrollo sexual y asexual, y con ello la producción de esterigmatocistina, un metabolito secundario altamente tóxico. Un efecto similar ha sido observado en *Aspergillus flavus* y en *Aspergillus parasiticus*, en los que por esta vía se ve reprimida la producción de aflatoxinas (Shwaba y Keller, 2008). Sin embargo, en organismos como *Fusarium sporotrichioides*, el resultado en la mutación de alelos de subunidades G $\alpha$ i, ha arrojado por el contrario un incremento en la producción de tricotecenos (Tag. *et al.*, 2000).

En *Pestalotiopsis microspora* ha sido descrito el efecto de una subunidad G $\alpha$ i en la regulación de la biosíntesis de policétidos. En este estudio, la delección en G $\alpha$ i mostró una disminución importante en la producción de estos metabolitos secundarios en la cepa mutante, respecto a la cepa de tipo silvestre (Yu, *et al.*, 2017); efecto similar al observado en *Fusarium fujikuroi* en el que la delección de G $\alpha$ i (ffg1) condujo a una reducción en la biosíntesis de bikavenina (Studt, Humpf, y Tudzynski, 2013). Además, se han observado alteraciones en el metabolismo secundario en mutantes G $\alpha$  de *Botrytis cinerea* (Gronover, Tudzynski, Tudzynski, 2001), *Trichoderma atroviride* (Reithner *et al.*, 2005), *Neurospora crassa* (Yang y Borkovich, 1999), *Penicillium marneffeii* (Zuber, Hynes, y Andrianopoulos, 2002); entre otros.

En lo anterior, el papel de las vías de transducción y como estas afectan la respuesta al estrés fisiológico en hongos filamentosos, se torna fundamental; ya que se ha demostrado que pueden participar como reguladores en la intensificación o atenuación frente a los estímulos ambientales, repercutiendo en una mayor expresión de los productos metabólicos que derivan de estos organismos (García RO. *et al.* 2008; García RO, *et al.* 2009), o por el contrario, en una pérdida en su capacidad para producirlos (Calvo *et al.* 2002; García RO, *et al.*, 2017).

#### **3.3.4. Producción de enzimas extracelulares**

Debido a la importancia de las proteínas G en la mediación de múltiples procesos biológicos en hongos filamentosos, recientemente han sido desarrollados diferentes estudios para la identificación de genes y proteínas afectadas por esta vía. Se tiene evidencia que indica que la producción de enzimas extracelulares en hongos filamentosos, se ve afectada por la señalización de proteínas G heterotriméricas (Bolker, 1998; Yu, 2006). En ascomicetes como *Hypocrea jecorina*, un importante productor industrial de celulasas, se ha demostrado un papel destacado de la subunidad G $\alpha$ i (GNA1) en la apropiación de recursos disponibles a ser utilizados para la formación de biomasa en medio sumergido, y la biosíntesis de enzimas hidrolíticas (Seibel, *et al.*, 2009).

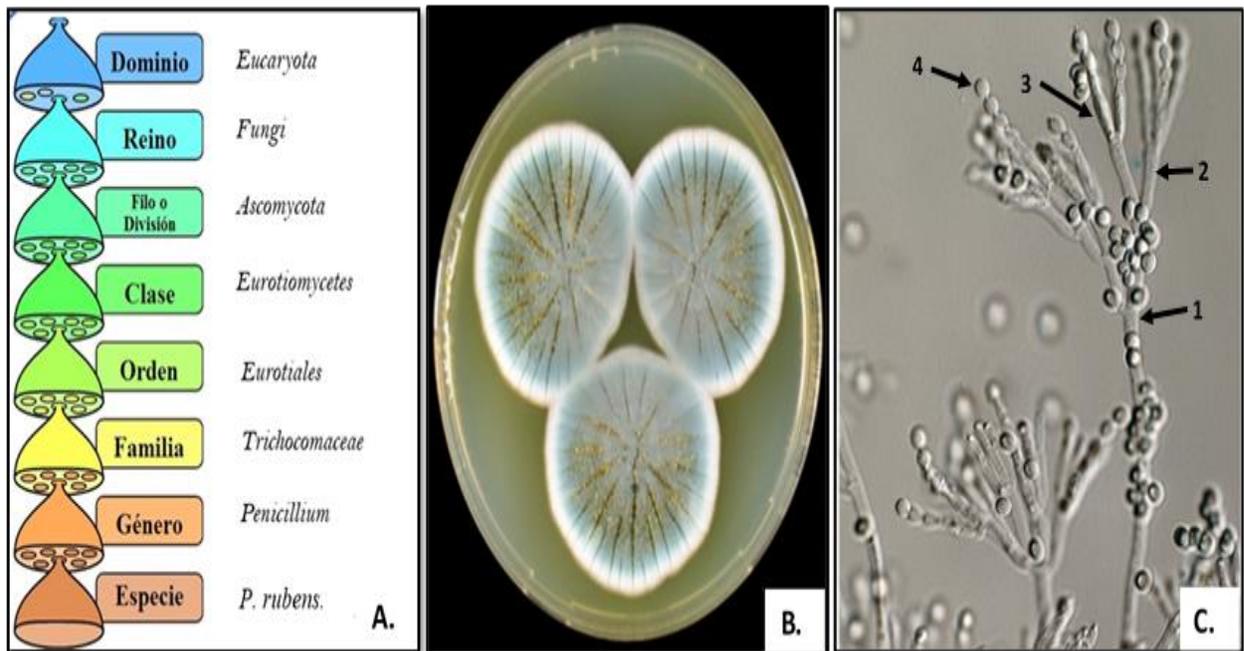
En otros organismos como *Stagonospora nodorum*, el estudio del rol de las G $\alpha$ i ha sido particularmente útil, pues se ha identificado que estas controlan la secreción de proteínas como las despolimerasas, participantes durante su proceso infectivo en plantas de trigo (Tan, *et al.*, 2009). Asimismo, ha sido descrita la participación de las G $\alpha$ i en la regulación de la producción de proteasa extracelular en *P. camemberti* (García, *et al.*, 2017); de proteinasa en *Aspergillus nidulans* (Emri,

y Justyak, 2008); así como de enzimas degradadoras de polisacáridos en *P. decumbens* (Hu, *et al.*, 2013). A la fecha, no se documentan estudios que aborden el rol de las proteínas G heterotriméricas en la regulación de enzimas FAE.

### 3.4 *Penicillium rubens* Wis 54-1255.

El género *Penicillium* perteneciente a la división Ascomycota, expone a un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en la naturaleza, e implicados en gran variedad de actividades humanas. Algunas de sus especies son reconocidas como patógenos oportunistas en humanos y animales (*P. marneffeii* y *P. luteum*) (García RO, Martín, y Fierro, 2007; Oshikata, *et al.*, 2017); otras por su parte, se vinculan con procesos de deterioro en productos alimenticios almacenados, entre otros motivos, al ser importantes productores de micotoxinas (*P. verucosum*) (Cabañes, Bragulat, y Castellá, 2010). No obstante, este género se caracteriza de manera particular, por la presencia de especies de utilidad y beneficio considerables para el desarrollo de diferentes sectores industriales, entre estos: *P. roqueforti*, *P. camemberti*, y *P. rubens* (García RO, *et al.*, 2007; Kalai, Anzala, Bensoussan, y Dantigni, 2017).

La especie *Penicillium rubens* fue descrita por primera vez en 1910 por Charles Thom (Thom, 1910). Su clasificación taxonómica, macroscopía y microscopía se indican en la Figura 4.



**Figura 4.** *P. rubens*. **A.** Clasificación taxonómica. **B.** Macroscopía del hongo crecido por 7 días a 25°C en agar CYA. **C.** Estructuras microscópicas: 1. Conidióforo 2. Métula. 3. Fialide. 4. Conidia (Modificado de Houbraken *et al.*, 2011).

Al igual que las especies de su género, *P. rubens* se encuentra presente en gran variedad de hábitats. Este hongo se caracteriza entre otros aspectos por formar colonias de crecimiento rápido, de aspecto aterciopelado y tonalidad verdosa, con una corona radial ancha y blanca. El reverso de la colonia es pálido o amarillento. A nivel microscópico sobresalen sus hifas septadas hialinas, con conidióforos simples o ramificados de pared lisa, la presencia de ramificaciones secundarias (métulas), y fialides en forma de botella sobre los cuales se ubican los conidios. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25°C, no obstante, tiene la capacidad de crecer entre 5 y 37°C (Pontón, *et al.* 2002). La reproducción en el mismo es principalmente asexual, mediante la formación de conidios a partir del micelio; aunque recientemente ha sido descrita una modalidad de reproducción sexual en *P. rubens* (Bohn, *et al.*, 2013; Dahlmann, *et al.*, 2015).

En relación a la nomenclatura de *P. rubens*, existe gran controversia y diferencia de opiniones. *P. notatum*, especie descubierta por Alexander Fleming como productor de penicilina, y *P. chrysogenum*, han sido descritas como la misma especie frecuentemente, debido a que en su morfología no existen diferencias significativas (Rodríguez, 2017). El estudio filogenético de los aislados mas importantes de *P. chrysogenum* realizado por Houbraken, *et al.*, 2011, asegura que *P. notatum* y *P. chrysogenum* corresponden en realidad a *Penicillium rubens* (Houbraken, *et al.*, 2011). En consecuencia, la cepa original de producción de penicilina reconocida en los ensayos realizados por Fleming, fue re-identificada como *P. rubens* (*P. rubens* Wis 54-1255). En este trabajo se empleará la nomenclatura de *P. rubens*, como resultado de su reciente re-identificación científica.

*P. rubens* es mundialmente reconocido por su capacidad para producir antibióticos ampliamente utilizados como lo son las penicilinas (Santos, *et al.*, 2017). Sin embargo, además de varios tipos de penicilina, este organismo produce otros metabolitos de interés para la industria como el ácido ciclopiazónico, la roquefortina C, xantocilinas, chrisogenina (de Hoog, *et al.*, 2000; Pontón, *et al.*, 2002; Hidalgo, *et al.*, 2014) sorbicilinoïdes con actividad antiviral, antiinflamatoria y antimicrobiana (Guzmán, *et al.*, 2017) y moléculas con actividad biológica, tales como las proteínas con actividad antifúngica (Marx, *et al.*, 2008). También sobresale por su aplicación en biorremediación (Luo, Ding, Wei, Zheng, y Luo, 2014), el control biológico de patógenos en plantas (Zhong, *et al.*, 2015), y en la transformación y aprovechamiento de residuos agrícolas; por lo que es utilizado tanto para la producción de metabolitos secundarios, como para la obtención de enzimas extracelulares entre estas, la oxidasa, la fosfogluconato deshidrogenasa, la glucosa oxidasa, y las FAEs, a las cuales se les atribuye un elevado potencial por su capacidad para

degradar biomasa vegetal (Kobayashi, Horikoshi, y Koki, 1982; Leiter, *et al.*, 2004; Topaka, Vafiadi, y Chistakopoulos, 2007; Koseki *et al.*, 2009; López, *et al.*, 2011; López, 2012).

*P. rubens* es una estupenda fuente de metabolitos secundarios y enzimas de utilidad considerable para áreas industriales tan diversas como: la biomedicina, el biocontrol, la biorremediación, la industria alimentaria; entre otras con gran potencial biotecnológico (Topaka, Vafiadi, y Chistakopoulos, 2007; Koseki *et al.*, 2009; López, 2012; Bohm *et al.*, 2013; Luo, Ding, Wei, Zheng, y Luo, 2014). De lo anterior, se deriva un gran interés en dilucidar las bases moleculares subyacentes a su programa de crecimiento y desarrollo. Al respecto, en *P. rubens* se avanza en la exploración y entendimiento de los mecanismos que regulan dichos procesos; a partir de las vías de transducción de señales mediadas por subunidades G $\alpha$ i.

Estudios como el realizado por García, RO., Martín, y Fierro, F. 2011 demuestran el rol que desempeña Pga1 (una subunidad G $\alpha$ i), en la regulación del programa de desarrollo global de *P. rubens*. Se ha puesto de manifiesto el desempeño de Pga1, en la activación de una vía de señalización que impide procesos tales como la conidiación temprana, y que regula entre otros aspectos el crecimiento vegetativo en *P. rubens* (García RO, Martín, Fierro, 2007). También se ha evidenciado que la activación constitutiva de Pga1 presenta efectos que dan lugar a la germinación de conidios con mayor rapidez, y a la disminución en los requerimientos nutricionales exigidos por el hongo en este proceso; por una vía que se encuentra probablemente mediada por AMPc (García, RO., Martín, y Fierro, F. 2011). A su vez, se destacan algunas consecuencias a nivel fisiológico producto de la inactivación de Pga1, como lo es el aumento de la resistencia de los conidios a condiciones de estrés térmico y osmótico; además, de la identificación de un efecto

considerablemente positivo de Pga1 en la producción de la penicilina, lo que ubica dicho gen como candidato para optimizar la producción de antibióticos y otros fármacos en este organismo (Fierro, Martín, 2008; García RO, Martín, Fierro, 2011).

Recientemente investigaciones soportadas en análisis proteómicos, han aportado información relevante en el entendimiento de la vía de señalización mediada por Pga1 en *P. rubens*. A partir del análisis comparativo de cepas con diferentes niveles de expresión de Pga1 y la modificación de los niveles intracelulares de cAMP, se ha expuesto el rol que desempeña Pga1 en la regulación de la expresión de diferentes proteínas en el hongo, así como su grado de dependencia de cAMP (Carrasco, *et al.*, 2016). Se identificó un número considerable de proteínas que muestran diferencias de abundancia significativa dependientes del nivel de actividad en esta subunidad Gai. Algunas de estas proteínas corresponden a enzimas asociadas con procesos tales como: el plegamiento proteico, la respuesta frente al estrés oxidativo, enzimas participantes en el metabolismo de purinas; además, de algunas proteínas implicadas en el catabolismo de carbohidratos. Esto sugiere que el metabolismo primario en *P. rubens* se ve fuertemente afectado por la señalización mediada por Pga1. La ausencia de este gen, da lugar a una variación en la expresión de proteínas asociadas al metabolismo energético. Sin Pga1 el metabolismo se ralentiza acarreando efectos como la hiperconidiación, lo que a su vez interfiere en la desaceleración del crecimiento apical de las hifas (Carrasco, *et al.*, 2016). Información coincide con resultados previamente documentados, en los que se ha reportado que Pga1 actúa evitando la conidiación prematura en este hongo (García RO, Martín, Fierro, 2011).

La producción de metabolitos secundarios también parece verse afectada a partir de esta vía de señalización. Pga1 estaría regulando un número abundante de enzimas de la vía metabólica primaria como la piruvato kinasa, ATPasa- F1 y la triacetolasa; determinantes en la biosíntesis de compuestos necesarios para la producción de penicilina en altos niveles (ATP, NADH, y cisteína) (Carrasco, *et al.*, 2016). No obstante, de todos estos hallazgos que contribuyen sin duda en el avance y comprensión de los procesos que median la transducción de señales en *P. rubens* por esta vía, el que atrae especial interés consiste en la identificación de dos proteínas ProPH y ProANK (códigos Pc22g05690 y Pc22g17420) que poseen dominios de homología de Pleckstrin y de Ankyrina, respectivamente.

Los dominios de homología de pleckstrin (PH), se encuentran asociados con una amplia gama de funciones. La más reconocida hace referencia a su participación en la unión a lípidos de fosfatidilinositol, el reclutamiento de proteínas a diferentes membranas y su direccionamiento hacia zonas específicas a nivel celular. Se sugiere que el módulo PH, es un dominio orientador o adaptador. Sin embargo, en el transcurso de los años la presencia de este dominio, se ha relacionado con proteínas implicadas en procesos tan relevantes a nivel celular, como la organización del citoesqueleto, la transcripción y reparación del ADN; así como con proteínas modulares en el caso de las proteínas quinasas, implicadas en la señalización intracelular (Xu, *et al.*, 2009). También se ha demostrado que este dominio constituye un módulo diana para proteínas de unión a guanina; importantes reguladores de un gran número de señales de transducción. En relación a lo anterior, los dominios PH median interacciones proteína - proteína; sirviendo de plataforma para ubicar las proteínas activas de unión a guanina (Scheffzek, y Welti, 2012).

En su trabajo Carrasco, y colaboradores (Carrasco, *et al.*, 2016), dieron a conocer que la proteína ProPH que posee el dominio (PH), se encuentra hiperfosforilada in vivo. De un total de once sitios de fosforilación, acerca de 5 corresponderían a dianas de PKAs, activadas posiblemente por cAMP, lo que advierte un alto grado de regulación post-traducciona; una característica particular de las proteínas implicadas en la transducción de señales (Rigbolt y Blagoev, 2012). Por su parte, la proteína ProANK, que contiene el dominio de repeticiones de Ankyrina, presenta un patrón de expresión muy similar a la de la proteína ProPH. Los dominios de repeticiones de Ankyrin consisten en una serie de 30 a 34 residuos de aminoácidos, y se encuentran implicados en la mediación de interacciones proteína-proteína (Li, Mahajan, y Tsai, 2006). Las proteínas que poseen este dominio, participan en procesos como la regulación transcripcional, el control del ciclo celular, la organización del cito esqueleto y la regulación del desarrollo (Khodor, *et al.*, 2010).

Hasta ahora, las proteínas en mención (ProPH y ProANK), no han sido descritas en hongos filamentosos ni a nivel estructural, ni funcional, y son candidatas para la actividad transductora de señales (Carrasco, *et al.*, 2016). Esto abre una puerta hacia el estudio del rol que desempeñan estas proteínas como efectores downstream en la transducción de señales mediada por Pga1, y sus efectos a nivel de la fisiología y producción de metabolitos de importancia biotecnológica en *P. rubens* Wis 54-1255.

### 3.5 **Biomasa Lignocelulósica:**

La lignocelulosa o también llamada biomasa lignocelulósica, constituye la materia prima más abundante disponible en el planeta. Su composición consta mayoritariamente de celulosa (35% -35%), hemicelulosa (20%-35%), y en menor proporción de lignina (10%-25%) (Wang, Ma,

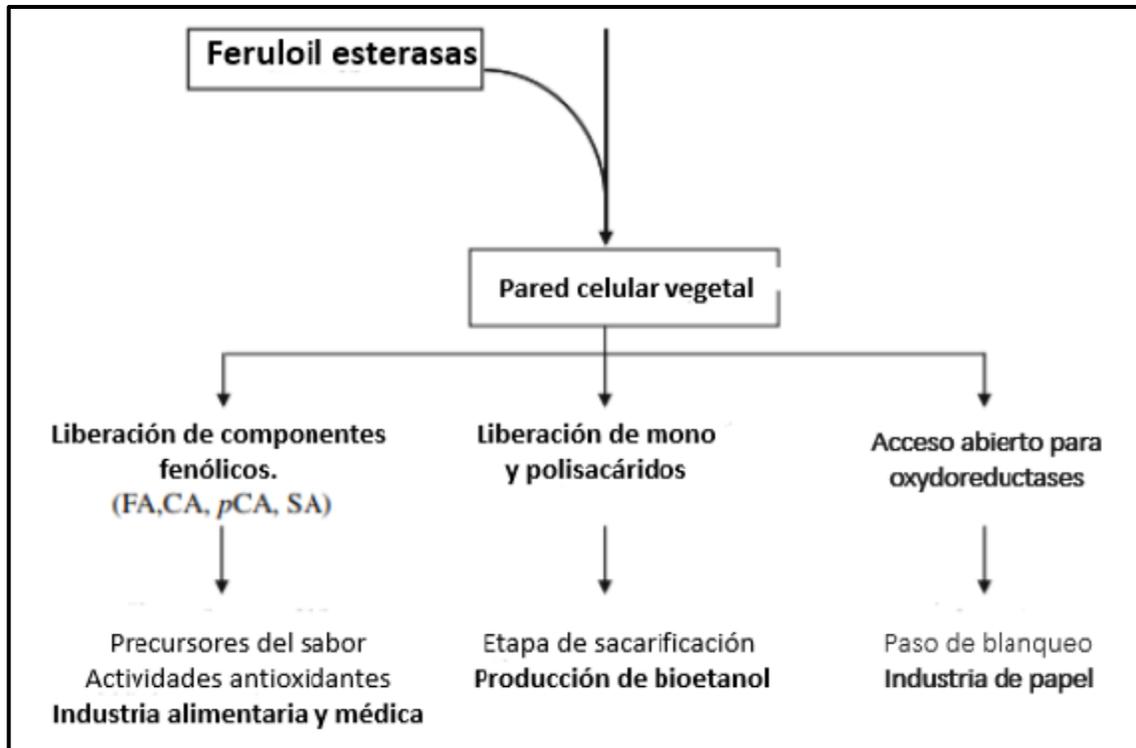
Liu, Luo, Zhao, Wang, 2018). La celulosa consta de unidades de D- glucosa conectadas mediante enlaces 1,4 – glucosídicos. Por su parte, la hemicelulosa constituye un polisacárido compuesto además de glucosa por: xilosa, manosa, arabinosa, entre otras pentosas. A diferencia de la celulosa y la hemicelulosa, la lignina tiene como característica, el ser un polímero aromático con estructura primaria poco definida (Jiping, Song, Xiuquan, Fei, Hong, Jin, Jie, 2019). En este sentido, la degradación de la compleja estructura lignocelulolítica requiere de distintas enzimas que actúan de forma sinérgica, entre estas celulasas, hemicelulasas, y ligninasas (de Souza, 2013).

La degradación de la hemicelulosa como segundo componente más abundante en la lignocelulosa, constituye un paso crucial en la degradación eficiente de la biomasa vegetal (Bohacz, 2016). Debido a la presencia de enlaces covalentes entre la lignina y la hemicelulosa, se considera que esta última es más fácil de degradar, con respecto a la celulosa. Sin embargo, el papel de las enzimas xilanolíticas implicadas en la biodegradación de la lignocelulosa es menos conocido que las enzimas que hacen parte del complejo de enzimas celulasas (Rabemanolontsoa y Saka, 2016). Entre las enzimas que participan de la hidrólisis de la hemicelulosa se encuentran: endoxilanasas, xilosidasas, arabinofuranosidasas, glucoronidasas, y las FAEs (Chavez Bull, Eyzaguirre, 2006). A continuación, se profundiza en las enzimas FAEs, siendo estas enzimas claves en el proceso de biotransformación de la hemicelulosa que integra la biomasa vegetal, y con ello en la obtención de productos con valor industrial a partir de esta materia prima.

### 3.6 Feruloil esterasas (FAEs): Bioconversión de material lignocelulósico y liberación de ácidos hidroxicinámicos.

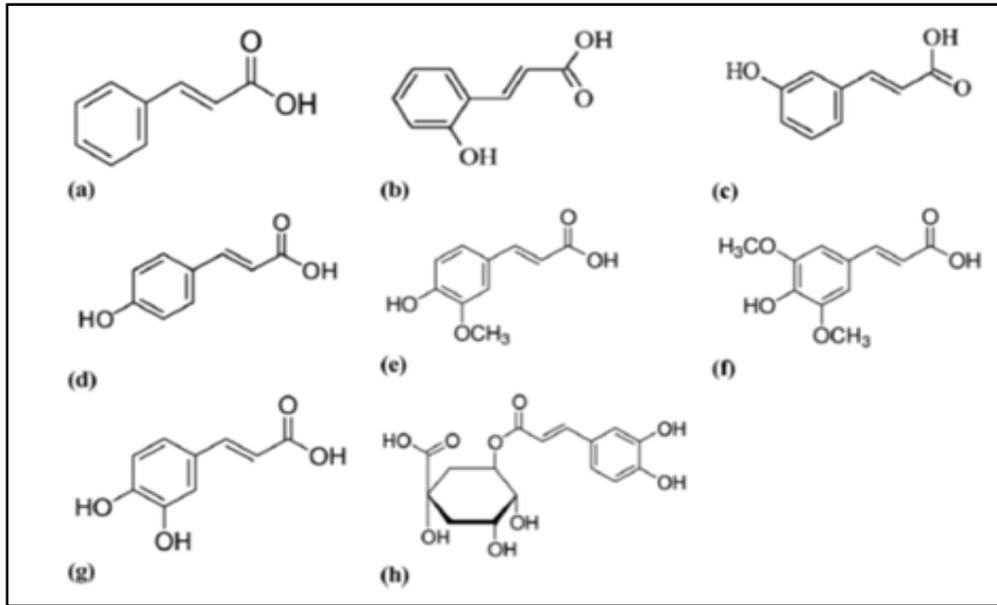
Las feruloil esterasas (EC. 3.1.1.73) también conocidas como esterasas de ácido ferúlico, o por su acrónimo en inglés: FAE (feruloil acid esterases), son un grupo de enzimas de tipo hidrolasa que pertenece a la subclase de las carboxil éster hidrolasas (Benoit, *et al.*, 2008). En general son conocidas por participar en la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica. Las FAE se han identificado como enzimas clave que catalizan la escisión de los enlaces éster entre los ácidos hidroxicinámicos y la galactosa o arabinosilanos en la hemicelulosa (Zhang, *et al.*, 2015). Estas enzimas intervienen en la hidrólisis completa de la hemicelulosa de manera sinérgica con otras enzimas lignocelulolíticas como la endoxilanasas, la  $\beta$ -xilosidasa,  $\alpha$ -L, arabinofuranosidasa, y la  $\alpha$ -d-glucuronidasa (Chavez, Bull y Eyzaguirre, 2006).

La ruptura de los enlaces éster en la pared celular de la planta a partir de FAEs, permite que con mayor facilidad sean liberados de esta, polisacáridos y diferentes compuestos fenólicos como los ácidos hidroxicinámicos (Zhou, *et al.*, 2015). La principal característica de las FAEs, es que son enzimas extracelulares. Dicho de otro modo, son enzimas secretadas al medio extracelular por los microorganismos, las que en su accionar degradan los polisacáridos de la pared celular vegetal, y simultáneamente conducen a la liberación de ácidos hidroxicinámicos. Lo anterior atribuye a estas enzimas un desempeño clave en procesos tales como la deslignificación de las plantas, los procesos de sacarificación, la esterificación de ácidos hidroxicinámicos, y en el aumento de la digestibilidad y bioconversión de los residuos vegetales derivados de la agroindustria; aspectos a partir de los cuales se desprende, un elevado potencial de aplicaciones industriales (*Figura 5*) (Benoit, *et al.*, 2008; Peña y Ezquivel, 2016).

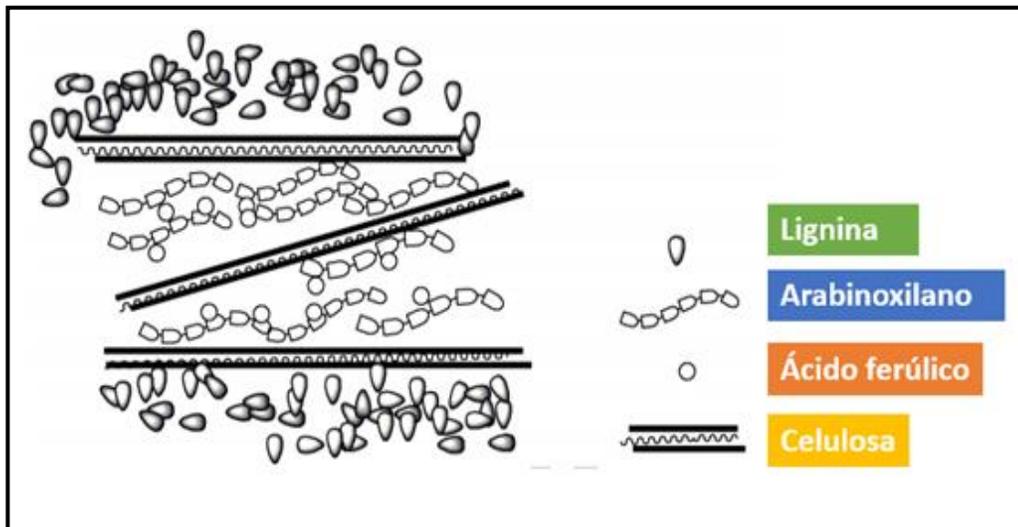


**Figura 5.** Resumen esquemático de las aplicaciones industriales de las feruloil esterasas. **FA**= ácido ferúlico, **CA**= ácido caféico, **pCA**= ácido p-cumárico, **SA** = ácido sinápico (Modificado de Benoit, *et al.*, 2008).

La liberación de compuestos fenólicos como los ácidos hidroxicinámicos, constituye sin lugar a duda uno de los propósitos fundamentales en el uso de las FAEs. Los ácidos hidroxicinámicos como el ácido caféico, el ácido p-cumárico, el ácido sináptico, y el ácido ferúlico, son compuestos que exhiben diferentes actividades biológicas; por lo que son productos químicos de alto valor. Todos estos poseen excelentes propiedades antioxidantes al presentar el grupo parahidroxi sobre el resto del ácido fenólico (Figura 6). Sin embargo, de ellos es el ácido ferúlico el ácido hidroxicinámico más abundante en plantas, encontrándose en diferentes proporciones en el arabinosilano de sustratos vegetales (Figura 7) (Benoit, 2006; Fazary y Ju, 2007).



**Figura 6.** Ácidos cinámicos e hidroxycinámicos. (a) ácido cinámico, (b) ácido cumárico, (c) ácido m-cumárico, (d) ácido p-cumárico, (e) ácido ferúlico, (f) ácido sinapínico, (g) ácido caféico, (h) Ácido clorogénico (Golapan, *Net al.*, 2015).



**Figura 7.** Ubicación del ácido ferúlico en la biomasa lignocelulósica (Golapan, *et al.*, 2015).

El ácido ferúlico puede obtenerse de fuentes naturales en las paredes celulares de las plantas, por fermentación microbiana; o bien, por síntesis química (Fazary, Ju, 2007). Diferentes

estudios realizados en diversas áreas industriales, recogen múltiples aplicaciones del ácido ferúlico en la industria alimentaria, biomédica y farmacéutica, debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, anti carcinogénicas, y antiinflamatorias (Golapan, *et al.*, 2015; Dey Tapati *et al.*, 2016).

### **3.6.1. Clasificación de las FAEs.**

La clasificación de las FAEs aún se encuentra en desarrollo. Una primera clasificación fue realizada en función del sustrato de inducción de las enzimas (Dilokpimol, *et al.*, 2016). Posteriormente surge una nueva clasificación que es hasta el día de hoy la más común, y ampliamente utilizada (Benoit, *et al.*, 2008). Descrita por Crepin *et al.*, 2004, este sistema de clasificación se soporta en los sustratos de inducción y en la homología de secuencias aminoacídicas. Esta clasificación un tanto más compleja que la inicial, establece cuatro grupos de enzimas A-D. Las FAEs que pertenecen al grupo A exhiben preferencia por sustratos cuyos restos fenólicos presentan sustituciones metoxi en la posición meta (ácido ferúlico y sinápico); las del grupo B, muestran preferencia por los sustratos que poseen una o dos sustituciones hidroxilo en el resto fenólico (ácido p- cumárico y caféico); mientras que las FAE que pertenecen a los grupos C y D, son afines a los ésteres sintéticos (sinapato de metilo, el p- cumarato y el cafeato de metilo) (Figura 6).

Pese a que la clasificación propuesta por Crepin *et al.*, 2004 ha resultado útil, se ha puesto en evidencia que esta no resulta suficiente para reflejar la variedad de enzimas existentes. Al respecto, recientemente han sido propuestos nuevos modelos de clasificación sustentados en la homología de secuencias entre diferentes FAEs y su posible origen (Udatha, *et al.*, 2011). A la

fecha la clasificación más actualizada, se encuentra soportada en análisis filogenéticos con un aproximado de 1251 secuencias de FAEs hipotéticas, en el que además se incorporó el análisis de tanasas, acetilxinalo esterasas y lipasas, con el fin de establecer la relación evolutiva de dichas enzimas con las FAEs. De este último sistema de clasificación se proponen 13 subfamilias (Dilokpimol, *et al.*, 2016).

### **3.6.2. Aislamiento y producción de FAEs a partir de hongos.**

La primera FAE se purificó a partir de *Streptomyces olivochromogenes* en 1991 (Faulds, y Williamson, 1991), a partir de ello han sido caracterizadas diferentes feruloil esterasas de bacterias, plantas y en mayor nivel a partir de hongos. Las FAEs son predominantes en la división Ascomycota (Olivares, *et al.*, 2010). Entre los géneros más estudiados en relación a estas enzimas, se encuentran: *Aspergillus spp*; *Fusarium spp*, y *Penicillium spp*. Algunas de las especies analizadas, y sus respectivas FAEs identificadas hasta la fecha, son: *Aspergillus niger* (FaeA y FaeB), *A. nidulans* (FaeB); *Fusarium oxisporum* (FAE-II), *Penicillium expansum* (FE), y *P. funiculosum* (FAEB), *P. brevicompactum* (FE) (Benoit, *et al.*, 2006; Benoit, *et al.*, 2008) y recientemente *P. rubens* (PcFaeA- PcFaeB) (López, *et al.*, 2011; López, *et al.*, 2012; Rodríguez, 2017). En todos estos organismos, varias FAEs han sido descritas con diferentes especificidades de sustrato, propiedades físicas (Topakas, y Vafiadi, 2007; Benoit, *et al.*, 2006; Benoit, I. *et al.*, 2008), y variación en su eficiencia para liberar ácidos fenólicos (Bonnin, *et al.*, 2002.; Xiros, *et al.*, 2009; Damásio, *et al.*, 2013).

La producción de estas enzimas se puede realizar en medio sólido o en cultivo sumergido. Para este fin, son empleados medios de cultivo que contienen usualmente esteres solubles de ácido ferúlico, o residuos industriales de poco valor económico y que son ricos en ácidos hidroxicinámicos; por lo que además de servir como fuente de carbono, constituyen un mecanismo inductor para la producción de las enzimas (Golapan, *et al.*, 2015).

### **3.6.3. Métodos de identificación de actividad feruloil esterasa.**

Para analizar la actividad feruloil esterasa han sido desarrollado diversos métodos, tanto cuantitativos como cualitativos. A nivel cuantitativo regularmente se procede a cuantificar los ácidos hidroxicinámicos liberados como el ácido ferúlico durante la fermentación, a partir de sustratos naturales o artificiales. En relación a lo anterior, son varias las técnicas disponibles. Entre las más habituales se encuentra el uso de HPLC. Esta técnica constituye una herramienta de alta precisión y sensibilidad; no obstante, tiene como inconveniente un elevado costo operacional. Algunas técnicas menos costosas en relación al uso de HPLC, son la electroforesis capilar, y los métodos espectrofotométricos en el rango de 320- 340 nm. Estos son sencillos, y no requieren de equipos costosos (Ramos y Contreras, 2016). Sin embargo, los sustratos empleados por espectrofotometría pueden resultar complejos debido a su baja solubilidad e inestabilidad en el tiempo (Mastihuba, Kremnick, Mastihubov, Willett y Cote, 2002). En paralelo, otros métodos en placa y micro placas, que se fundamentan en el uso de sustratos cromogénicos, fluoróforos, sustratos derivados de esteres, y/o indicadores de pH, han cobrado interés en la actualidad; pues son métodos cualitativos y/o cuantitativos que soportan eficientemente la búsqueda y caracterización de nuevas FAEs, y que permiten alcanzar el máximo número de análisis en el

menor tiempo posible (Gherbovet, *et al.*, 2016; Ramos de la Peña, y Contreras, 2016).

### **3.7. *creA***

La represión por catabolitos de carbono, corresponde a un importante mecanismo empleado en el uso del carbono como fuente de alimento en hongos filamentosos. Dicho mecanismo se precisa para regular tanto el crecimiento, como el desarrollo y producción de metabolitos en estos organismos (Fasoyin *et al.*, 2018). La actividad ejercida mediante represión por catabolitos consta de la regulación de la síntesis de enzimas para el uso de fuentes de carbono secundarias; es decir, de fuentes de carbono menos favorecidas en presencia de fuentes de carbono preferidas y fácilmente utilizadas como la sacarosa y la glucosa (Dowzer y Kelly, 1991). Esta última es la fuente de carbono con más efectos represivos, dado que reprime la mayoría de enzimas indispensables para la degradación de polisacáridos; lo cual a su vez dependerá tanto del tipo como de la concentración de la fuente de carbono. Entre los genes que involucra este mecanismo de regulación se encuentran: *creA*, *creB*, *creC*, y *CreD*, los cuales actúan en conjunto para regularse; siendo *creA* el principal represor transcripcional (Kelly, 2004; Boase y Kelly, 2004). En varios hongos se han identificado homólogos del gen *creA* como lo es el caso de *cre1* en *Trichoderma reesei*, *mig1p* en *Saccharomyces cerevisiae*, *mig1* en *Candida albicans* y *creA* en *A. nidulans*, *A. niger* y *A. fumigatus* y *P. rubens*. (Zaragoza, *et al.*, 2000; Cepeda *et al.*, 2014)

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Estudiar el papel de dos efectores downstream de la ruta de transducción de señales mediada por Pga1, en la morfología, y la producción de feruloil esterasas en *Penicillium rubens* Wis 54-1255.

### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la atenuación vía RNAi de las proteínas efectoras ProPH (Pc22g05690) y ProANK (Pc22g17420) sobre la morfología de *P. rubens*.
- Evaluar la cinética de germinación conidial en transformantes de *P. rubens* atenuados en la expresión de los efectores ProPH y ProANK.
- Evaluar el efecto de la atenuación de los efectores ProPH y ProANK en la producción de feruloil esterasas en *P. rubens*.
- Evaluar el efecto del regulador transcripcional *creA* sobre la actividad de enzimas lignocelulolíticas en *P. rubens*.
- Analizar el efecto de la cascarilla de arroz y el xilano, como únicas fuentes de carbono, sobre la actividad feruloil esterasa en *P. rubens* Wis 54-1255.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Área de estudio.

Las actividades de investigación referentes al desarrollo del presente proyecto, se llevaron a cabo en el Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO) de la Universidad de Pamplona - Colombia. Adicionalmente, su ejecución contó con el respaldo del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana UAM- Unidad Iztapalapa-México, y el Laboratorio de Microbiología Básica y Aplicada de la Universidad de Santiago de Chile; donde se desarrollaron algunas de sus fases experimentales.

### 5.2 Microorganismos.

Las cepas microbianas empleadas en la ejecución de este trabajo se indican a continuación.

#### 5.2.1. Cepas bacterianas:

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , ha sido la cepa de elección en los experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico desarrollados en la fase de silenciamiento de los genes Pc22g17420 (ProANK) y Pc22g05690 (ProANK). Esta cepa como organismo huésped tiene entre otras características durante el ensamblaje de ADN en vivo, una tasa de crecimiento rápida, elevado rendimiento de plásmidos y buena eficiencia en los procesos de transformación (Kostylev, Otwell, Richardson, y Suzuki., 2015).

### 5.2.2. Cepas fúngicas.

- *Penicillium rubens* Wisconsin 54-1255. Cepa referencia de baja producción de penicilina, obtenida por mutación y selección de la cepa *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951 (Luengo, Revilla, Villanueva, y Martín, 1979).
- En los ensayos de actividad enzimática (celulolítica, xilanolítica y feruloil esterasa) se incorporó, además, una cepa de *P. rubens* atenuada en el gen *creA* (cepa denominada: *CreA*) (Cepeda *et al.*, 2014).

### 5.3 Medios de cultivo.

- Medio de cultivo empleado para el mantenimiento y propagación de *E. coli* (Miller, 1972).

<b>Medio Luria-Bertani (LB)</b>	
Bacto- triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	Hasta 1L
Ajustar pH a 7.5 Para conseguir medio sólido se añade un 2 % de agar. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.	

- Medio sólido para la esporulación y mantenimiento de *Penicillium rubens*. Consiste en una fusión de los medios PM1 (López-Nieto *et al.*, 1985) y Czapek-KCl 0.7 M (Cantoral *et al.*, 1987):

<b>Medio Power (PW)</b>	
Sacarosa	25 g
Lactosa	5 g
Peptona	2.5 g
Solidos de maceración de maíz	0.5 g
KCl	26.1 g
NaNO <sub>3</sub>	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25
Sales PW	1 ml
Agua destilada	Hasta 1 L
Se añade agar en una concentración del 2,0 % (p/v). Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.	

**Sales PW:**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 6 g

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.....1 g

FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O.....0,4 g

CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.....0,2 g

Se completa el volumen hasta 200 ml con agua destilada. Se puede almacenar indefinidamente sin esterilizar a 4°C. El precipitado formado se resuspende por agitación antes de su uso.

- Medio mínimo de crecimiento para microorganismos capaces de utilizar el NaNO<sub>3</sub> como única fuente de Nitrógeno (Smith, 1960).

<b>Medio Zcapek</b>	
Sacarosa	30 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
Solución concentrada de Czapek	10 ml
Agua destilada	Hasta 1L
Para conseguir medio sólido se añade un 2 % de agar. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.	

Solución concentrada de Czapek:

NaNO<sub>3</sub>.....30 g  
KCl..... 5 g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O..... 5 g  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O..... 0,1 g

Se completa con agua destilada hasta 100 ml. Esta solución se puede almacenar sin esterilizar a 4°C. Los precipitados ocasionados por el  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  se resuspenden por agitación antes de su uso.

- Medio base para el cultivo de levaduras y hongos filamentosos (Merck Millipore).

<b>Medio PDA (Potato Dextrose Agar)</b>	
Dextrose	20 g
Infusión de patata	200 g
Solución concentrada de Czapek	10 ml
Agua destilada	Hasta 1L
Se resuspende 39 g del preparado en 1 litro de agua destilada. Para conseguir medio sólido se añade un 1.5% de agar. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.	

- Medio líquido de germinación y crecimiento para hongos del género *Penicillium* (Modificación de Anné, 1977).

<b>MPPY</b>	
Glucosa	40 g
$\text{NaNO}_3$	3 g
Extracto de levadura	2 g

KCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
Agua destilada	Hasta 1 L
Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.	

- Medio solido empleado en la determinación de actividad celulolítica fúngica (IGAC, 2006).

<b>Medio CMC</b>	
NaNO <sub>3</sub>	1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.9 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
KCl	0.5 g
Extracto de levadura	0,5 g
Caseína hidrolizada	0,5 g
CMC (Carboximetilcelulosa)	5 g
Agua destilada	Hasta 1 L
Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.	

- Medio sólido empleado en la determinación de actividad xilanolítica en cepas fúngicas (Kalim, y Mazhar, 2016).

<b>Medio Xilano (MX)</b>	
NaNO <sub>3</sub>	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.3 g
NaCl	3.5 g
Agar bacteriológico	20 g
Xilano	0.1 g
Agua destilada	Hasta 1 L
Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.	

- Medio sólido empleado para la determinación de actividad FAE en cepas fúngicas (Donaghy y McKay, 1994; García, 2018).

<b>Medio EF (Etil ferulato)</b>	
<b>Solución A</b>	
Agar bacteriológico	10 g
Agua destilada	Hasta 1 L

<b>Solución B</b>	
Etil ferulato	0.5 g
Etanol Absoluto	0.01 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	Hasta 10 mL

Las soluciones A y B se esterilizan por separado [solución A en autoclave (se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos); solución B por filtración, mediante filtros estériles de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore). Atemperar la solución A a 50 °C y añadir 1,5 mL de solución B estéril por cada 100 mL de solución A. Por cada 1000 ml de medio de cultivo son añadidos 1,5 ml de solución concentrada de púrpura de bromocresol (0.4%), como indicador de pH incorporado al medio. El color del medio debe ser púrpura; si es anaranjado, ajustar el pH con 7,5-15 µL de NaOH 2 N por cada 100 mL de medio. Solución concentrada de púrpura de bromocresol: 0,4 % (p/v) púrpura de bromocresol en agua destilada (García L, 2018).

- Medio líquido de fermentación RHS (cáscarilla de arroz-sakamoto) empleado en la producción de FAEs (Sakamoto *et al.*, 2005).

<b>RHS</b>	
Cascarilla de arroz	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
NaNO <sub>3</sub>	30 g
KCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	5 g

FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.1 g
Agua destilada	Hasta 1 L
<p>La cáscarilla de arroz se somete a un pretratamiento de molienda y cribado para posteriormente ser sometida a solubilización en autoclave mediante tratamiento térmico con vapor. El medio de cultivo ya preparado se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.</p>	

- Medio líquido de fermentación XS (xylan-sakamoto) empleado en la producción de FAEs (Sakamoto *et al.*, 2005).

<b>XS</b>	
Xilano (Xylan aus Buchenholz-Carl Roth).	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
NaNO <sub>3</sub>	30 g
KCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	5 g
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.1 g
Agua destilada	Hasta 1 L
<p>El medio de cultivo se esteriliza en autoclave a 121°C, 15 atm durante 20 minutos.</p>	

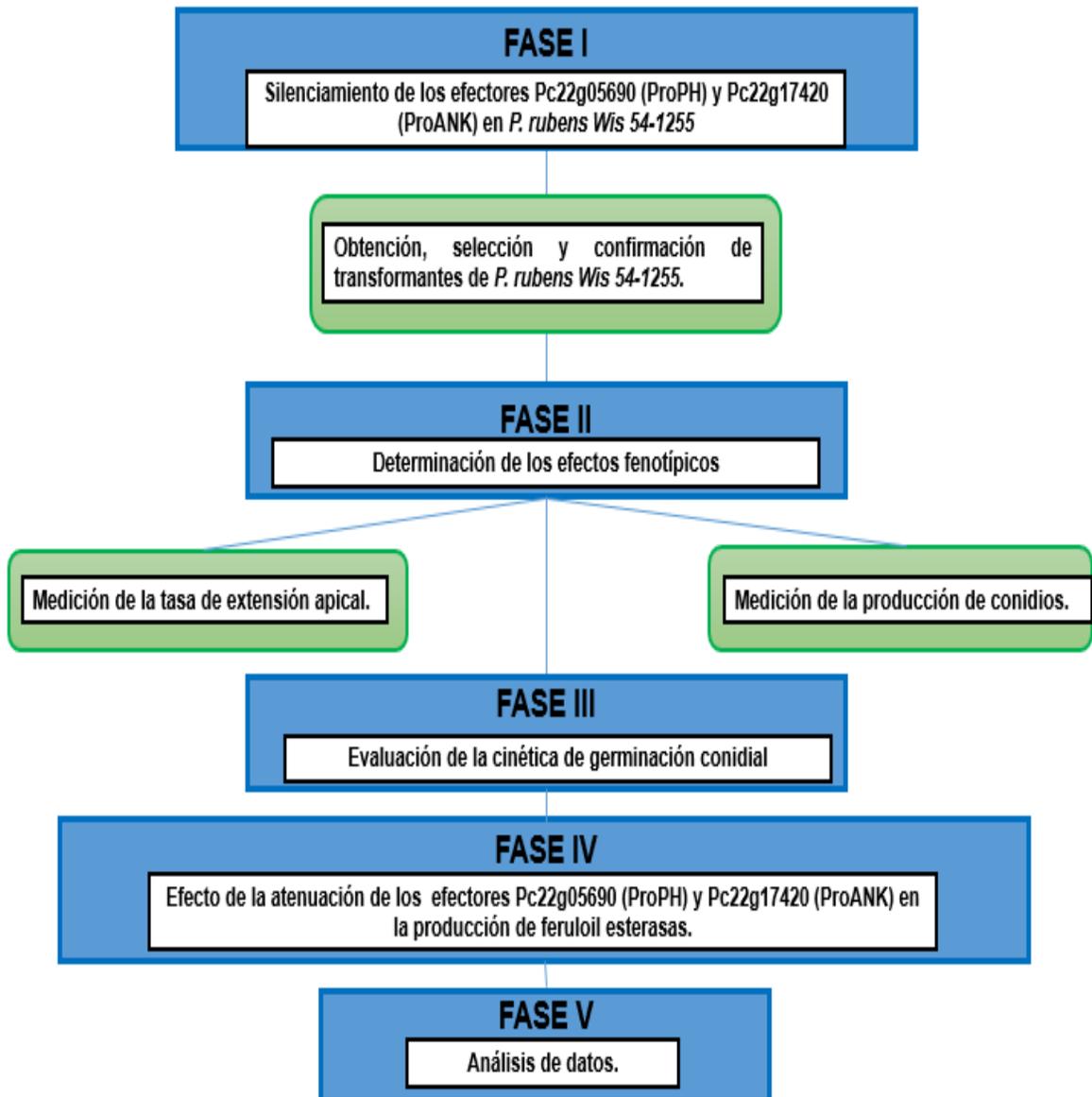
#### 5.4 Herramientas de análisis bioinformático.

El análisis bioinformático desarrollado en este trabajo tuvo como base el uso de las siguientes herramientas informáticas:

- **PubMed:** Motor de búsqueda de información y artículos científicos en MEDLINE, la más amplia base de datos de bibliografía. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*): Programa informático que permite el alineamiento de secuencias de ADN, ARN y proteínas (Altschul *et al.*, 1997). Disponible a través del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) en la página web: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> .
- **SnapGene:** Herramienta molecular para el análisis de secuencias, determinación de marcos de lectura abierto, el diseño de oligos, entre otros.
- **Tm Calculator:** Herramienta on-line de Applied Biosystems que permite calcular la temperatura de hibación de los oligos en la PCR a partir de su secuencia de bases. Está disponible en la página web: [www.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/](http://www.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/) .
- **SignalP:** Servidor on-line del CBS (Dinamarca) que predice la presencia y localización del péptido señal a partir de secuencias de aminoácidos de diferentes microorganismos. [www.cbs.dtu.dk/services/SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)
- **PSIPRED:** Servidor utilizado en la predicción de la estructura secundaria de las proteínas ProPH y ProANK . (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>).
- **Phyre2:** Herramienta para la predicción de la estructura terciaria de las proteínas ProPH y ProANK (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>).

A continuación, se describe la metodología empleada en el estudio de los efectores downstream ProPH y ProANK de la ruta de transducción de señales mediada por Pga1, en la morfología, y la producción de feruloil esterasas en *Penicillium rubens* Wis 54-1255.

### Estrategias de trabajo

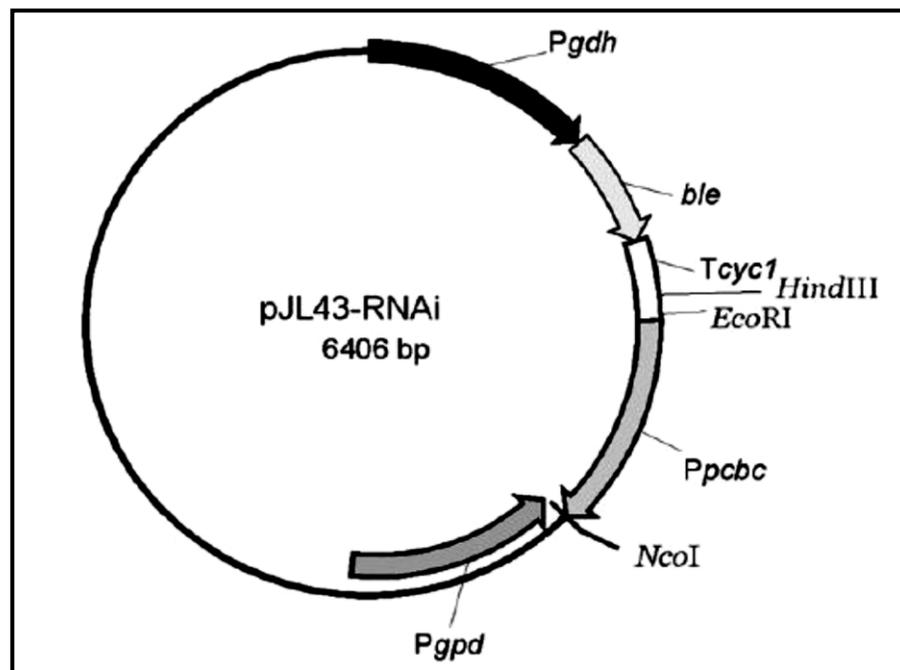


## FASE I

### 5.5 Silenciamiento de los efectores ProPH y ProANK en *P. rubens*.

#### 5.5.1. Obtención, selección y confirmación de transformantes de *P. rubens*.

Para conseguir la atenuación de los genes Pc22g05690 (ProPH) y Pc22g17420 (ProANK), se usó como base el vector pJL43- RNAi desarrollado por el Instituto de Biotecnología de León España (INBIOTEC) (Figura 8). El vector pJL43-RNAi se caracteriza por expresar un ARN de doble cadena de un fragmento del gen a silenciar (Ullán, *et al.*, 2008). Dicho ARN constituye entonces el sustrato para la maquinaria de ribo interferencia de la célula, que permitirá silenciar la expresión del gen de interés.



**Figura 8.** Mapa del plásmido pJL43-RNAi. Este vector fue construido a partir de los plásmidos pJL43 y pJL43b1, y posee como marcador de selección el gen de resistencia a la fleomicina (*ble*) (Ullán, *et al.*, 2008); además, de un sitio único de clonación (*NcoI*) entre los promotores *Pgp* y *Ppbc*, en el cual fue clonado un fragmento de la CDS de los genes Pc22g05690 (ProPH) y Pc22g17420 (ProANK), respectivamente.

**a. Extracción de ADN de *P. rubens***

La extracción de ADN de la cepa parental (*P. rubens* Wis 54-1255) y las cepas transformantes, se efectuó a partir de un equipo Mini-Beadbeater-16 cell disrupter (Biospec), con el cual se llevó a cabo la lisis celular. Posteriormente, el ADN se purificó con el kit "Wizard® Genomic DNA Purification Kit" (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

**b. PCR para la obtención de los fragmentos de los genes Pc22g05690 (ProPH) y Pc22g17420 (ProANK).**

El fragmento del gen a clonar en el plásmido pJL43-RNAi se obtuvo mediante el uso de la enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega). El par de oligos empleados se indican en la Tabla 2. El tamaño del producto de PCR obtenido para el gen Pc22g05690 fue de 461 pb, y de 475 pb para Pc22g17420.

**Tabla 2.** Oligos diseñados para amplificar el fragmento de los genes Pc22g05690 y Pc22g17420 clonados en el plásmido pJL43-RNAi.

<b>Gen diana</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
Pc22g17420	Fw: TCCCATGGTCCTCATCCAGGACGAAGTCAAT Rv: AGCCATGGAACAGACCGGAGCTAACGAGAA	475
Pc22g05690	Fw: TCCCATGGAGAAGAAGGCTGACTCTGACAAC Rv: AGCCATGGAACGACAGAGTGGCGAGGGTAA	461

Los productos de PCR se purificaron con el kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences).

### **c. Generación del constructo: digestión con *NcoI* y ligación.**

El plásmido pJL43-RNAi presenta un sitio de corte único para la enzima *NcoI*, el cual es flanqueado por los promotores Ppbc y Pgp, por lo que para clonar en este plásmido es necesario digerir con la enzima *NcoI*. Los cebadores empleados para obtener el fragmento del gen de interés, se diseñaron con un sitio de corte para esta enzima, de modo que el producto de PCR correspondiente fue digerido con la misma (*NcoI*-Takara, Thermo), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tanto la digestión del plásmido como el producto de PCR, se purificaron con el kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences). Finalmente, la ligación del vector con el inserto se realizó empleando la ligasa "T4 DNA Ligase" (ROCHE Life Science). Los vectores generados para el silenciamiento de los efectores ProPH y ProANK se denominaron pPcPH-RNAi y pPcANK-RNAi, respectivamente.

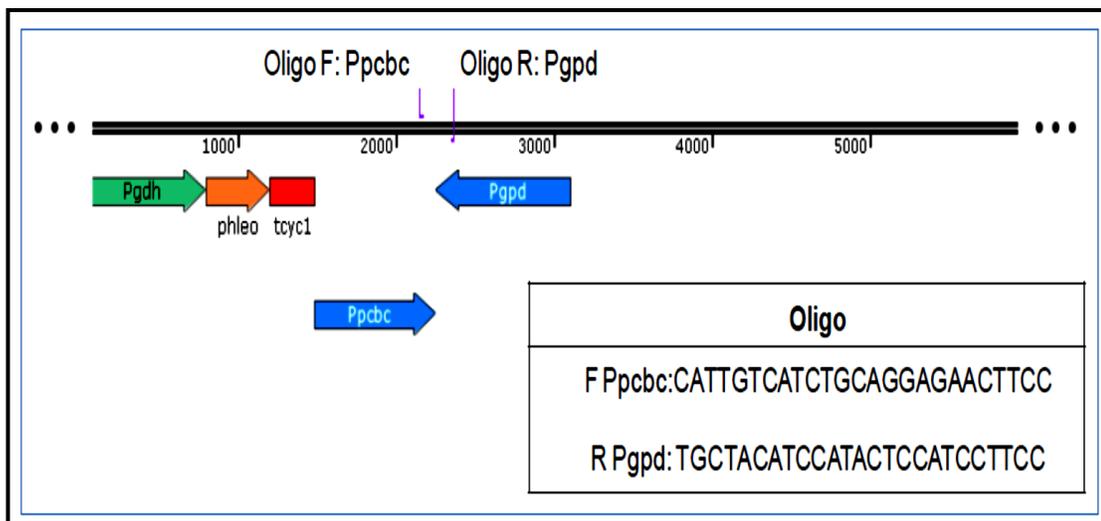
### **d. Obtención de transformantes de *P. rubens* Wis 54-1255.**

Con el constructo así elaborado, se efectuó la transformación de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , empleada como cepa hospedera para la amplificación del ADN plasmídico. Hecho esto, se llevó a cabo la extracción del ADN plasmídico a pequeña y mediana escala empleando el kit comercial QIAGEN® Plasmid Midi Kit, siguiendo las indicaciones del fabricante. Sobre esta base, se procedió a transformar genéticamente protoplastos de *P. rubens* obtenidos por un método quimioenzimático (Fierro, F. *et al.*, 2004). Los transformantes se sembraron luego en medio de cultivo con fleomicina como agente de selección. Posteriormente, las colonias crecidas se transfirieron a un medio para su propagación, manteniendo la presión selectiva. Se hizo una transformación con

el vector pJL43- RNAi vacío, y uno de esos transformantes fue usado como control (cepa control denominada PCNA). Finalmente, los transformantes fueron seleccionados por su estabilidad mitótica, y confirmados mediante una prueba de PCR.

**e. Confirmación de transformantes de *P. rubens*.**

Para determinar la integración del constructo en los transformantes, se diseñó un par de oligos que hibridan en los promotores Ppcbc y Pgpd a una distancia de 97 y 115 pb del sitio *NcoI* del plásmido pJL43-RNAi. De este modo, la reacción de PCR para confirmar los transformantes arrojaría como resultado un fragmento con un aproximado de 700 pb, en caso tal en el cual el ADN presentara el vector de silenciamiento (Figura 9). En lo anterior se hizo uso de la enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific).



**Figura 9.** Posición de los oligos dentro del plásmido pJL43-RNAi para la confirmación de los transformantes de *P. rubens*.

Con el fin de conocer el comportamiento en la expresión de las proteínas en estudio a nivel molecular, se procedió a realizar un análisis de transcripción génica con la cepa parental (*P. rubens* Wis 54-1255) en diferentes momentos del cultivo. En esta actividad se incluyeron controles negativos y positivos apropiados. La metodología empleada se indica a continuación:

**a. Producción de Biomasa: condiciones de cultivo.**

La cepa *P. rubens* Wis 54-1255, se cultivó en medio sólido power a 28°C por 5-6 días. Las conidias producidas en este medio se colectaron y cuantificaron a fin de establecer la concentración del inóculo ( $10^7$  esporas/ml). Con el inóculo en mención, se dio lugar al cultivo en medio líquido PMMY a 28°C y 250 rpm. El cultivo se realizó en matraces de 500 ml con 100 ml de medio de cultivo. El micelio producido a los 3,5 y 7 días del cultivo se recogió mediante filtración con nyltal y se lavó con solución salina 0.9% (Carrasco, *et al.*, 2016).

**b. Extracción de ARN total: cuantificación y análisis de integridad.**

A partir del micelio colectado de la cepa, se procedió a secar el mismo con filtros de celulosa estériles, y posteriormente se extrajo el ARN total de cada muestra. El procedimiento de extracción partió por de la lisis celular por medio de la congelación de cada una de las muestras de micelio con nitrógeno líquido, y la maceración de cada una de estas en un mortero con pistilo estériles. A continuación, se dio inicio al protocolo de extracción de ARN total. El kit de extracción empleado fue RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).

El ARN total extraído se cuantificó en un sistema de cuantificación MultiSkan GO empleando una placa  $\mu$ Drop (Thermo Scientific, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad de cada muestra de ARN se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

**c. Tratamiento con DNasa**

Previo al proceso de reversotranscripción y amplificación por PCR, cada una de las muestras de ARN se sometió a un tratamiento con DNasa para eliminar el ADN contaminante. Se empleó la enzima DNase I (Invitrogen). Cada reacción constó de 1  $\mu$ g de ARN en un volumen final de 10  $\mu$ l. El protocolo atendió a las indicaciones propuestas por el fabricante.

**d. Análisis de la expresión de los genes Pc22g05690 y Pc22g17420 mediante RT-PCR.**

El ADNc utilizado para el análisis de expresión de los genes Pc22g05690 y Pc22g17420 mediante RT-PCR, se obtuvo por transcripción reversa de 1  $\mu$ g de ARN utilizando el kit RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific), y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las reacciones se realizaron empleando oligo(dT) (Promega) como cebador para la transcripción inversa de ARN poliadenilados, como lo es el ARNm. La reacción se llevó a cabo en un equipo de PCR Axygen® MaxyGene™ II Thermal Cycler en las siguientes condiciones: 60 min a 42°C y 10 min a 70°C (35 ciclos).

Con el ADNc producto de las reacciones anteriores, se llevó a cabo la amplificación del gen de interés por PCR convencional empleando la enzima GoTaq DNA Polymerase (Promega). Como control se evaluó la expresión del gen de la betatubulina, al ser este un gen de expresión constitutiva. Los oligonucleótidos empleados se relacionan en la Tabla 3. Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo de PCR Axygen® MaxyGene™ II Thermal Cycler en las siguientes condiciones: 35 ciclos de: 4 min a 94°C; 30 seg a 94°C; 30 seg a 54°C; 30 seg a 72°C y 10 min a 72°C. En cada análisis se incorporó un control negativo y uno positivo. El control negativo constó de la preparación de una muestra sin adición de la muestra problema de ADNc correspondiente a cada gen; y el control positivo hizo referencia a una muestra que en lugar de la muestra problema de ADNc, contenía una muestra de ADN genómico de *P. rubens*.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos empleados en el análisis de los genes codificantes para los efectores ProPH y ProANK mediante RT-PCR.

Gen diana	Secuencia (5'-3')
Pc22g05690	Fw: TACTAGCGAGTTCCTTTCA Rv: CCTAGAAGGGTACCGAAGAT
Pc22g17420	Fw: AGAGGGTAATGAGTATGTGC Rv: TGGATCGTAGAGTAAGTCAC
Betatubulina	Fw: GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC Rv: ACCCTCCGTGTAGTGACCCTTGGC

Finalmente, los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 1%. A partir del proceso de obtención, selección, y confirmación, se seleccionaron 3 transformantes cuyas características fueron comparadas con las cepas control PC-NA y WT (cepa silvestre), en el desarrollo de las diferentes fases experimentales que se citan a continuación.

## **FASE II**

### **5.6 Determinación de los efectos fenotípicos.**

#### **5.6.1. Medición de la tasa de extensión apical.**

La velocidad de extensión apical en medio sólido se determinó mediante la medición (cada 24 horas) del diámetro de crecimiento radial de una única colonia crecida en diferentes medios de cultivo sólido (Czapek, PDA, Power) a 28°C. Las mediciones se efectuaron a las 72h, 96h, 120h, 144h y 168h de cultivo. La tasa de extensión apical se obtuvo como función de regresión lineal, del diámetro de la colonia a través del tiempo (Gil-Duran, *et al.*, 2014). Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado en 3 experimentos independientes.

#### **5.6.2. Medida de la producción de conidios.**

La producción conidial se determinó de acuerdo a una variación de la metodología propuesta por García RO, *et al.*, 2007. Se inoculó en superficie un volumen de 100 µl de una suspensión de esporas a una concentración de  $5 \times 10^5$  esporas/ml de cada una de las cepas, en tres medios de cultivo sólido (Czapek, PDA Y Power). A partir de lo anterior, se realizó una siembra masiva, y se procedió a incubar a 28°C. En tres momentos distintos (3, 5 y 7 días), los conidios producidos en cada medio de cultivo, se recogieron y trataron adecuadamente para ser contados en cámara de Neubauer. Los valores producto del conteo se expresaron en número de conidios / mm<sup>2</sup> de superficie. Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por triplicado para cada tiempo definido.

### **FASE III**

#### **5.6.3. Evaluación de la cinética de germinación conidial.**

La cinética de germinación de conidios en los transformantes y en las cepas control, se evaluó tomando como base la metodología propuesta por García, RO. *et al.*, 2009 con leves modificaciones. Una suspensión de conidios de concentración conocida fue inoculada en medio de cultivo líquido MPPY, e incubada por 12 horas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 150 rpm. A partir de las 4 primeras horas de incubación, se tomaron muestras (cada hora) para ser observadas en el microscopio. Con el uso de una cámara de Neubauer para el conteo, se analizó un total de 5 campos ópticos al azar, discriminando el número de conidios germinados y no germinados. Los datos se expresaron como el cociente de los conidios germinados sobre el total de conidios, en términos del porcentaje de germinación en función del tiempo. La cinética germinativa se analizó en tres 3 experimentos independientes.

### **FASE IV.**

#### **5.7 Efecto de la atenuación de los efectores ProPH y ProANK en la producción de enzimas feruloil esterasas.**

##### **5.7.1. Valoración de la actividad celulolítica y xilanolítica en cepas de *P. rubens*.**

Previo a evaluar la actividad feruloil estersasa, la actividad celulolítica y xilanolítica de las diferentes cepas de *P. rubens* fue analizada mediante ensayo en placa de acuerdo a la metodología propuesta por IGAC., 2006 y Kalim, Mazhar ,2016; respectivamente. Los

protocolos empleados se detallan a continuación:

**5.7.1.1. Actividad celulolítica (IGAC., 2006):**

- Sembrar en placas de Petri con medio PW las diferentes cepas de *P. rubens* a analizar mediante bioensayo. Incubar durante 120-168 h a 28 °C, según las condiciones óptimas de cultivo.
- Preparar placas con medio CMC (carboximetilcelulosa) como se indica en el apartado 5.3 (medios de cultivo).
- Emplear un sacabocados estéril para hacer agujeros de 6 mm de diámetro en las placas de medio CMC. Obtener tacos del mismo diámetro, procedentes de placas con micelio esporulado de los hongos a analizar. Transferir dichos tacos a los agujeros preparados en las placas con medio CMC, manteniendo el micelio hacia arriba y evitando la dispersión de conidios. Como control, se emplean placas de cada medio sin el sustrato (carboximetilcelulosa).
- Incubar las placas a 28 °C, manteniendo el medio en la base, durante 168 h.
- Al finalizar el tiempo de incubación, cada caja fue cubierta con solución de Rojo Congo al 0.05%. Al término de 10 minutos, se retiró el Rojo Congo y procedió a cubrir con solución salina 1M. Después de 1 hora, se retiró la solución salina y se cubrió con ácido acético al 2% por 10 segundos. Después de retirar el ácido acético se procedió a medir la amplitud del halo formado alrededor de cada colonia fúngica, como indicativo de la hidrólisis de celulosa.

#### **5.7.1.2. Actividad xilanolítica (Kalim y Mazhar, 2016):**

- Sembrar en placas de Petri con medio PW las diferentes cepas de *P. rubens* a analizar mediante bioensayo. Incubar durante 120-168 h a 28 °C, según las condiciones óptimas de cultivo.
- Preparar placas con medio Xilano como se indica en el apartado 5.3 (medios de cultivo).
- Emplear un sacabocados estéril para hacer agujeros de 6 mm de diámetro en las placas de medio Xilano. Obtener tacos del mismo diámetro, procedentes de placas con micelio esporulado de los hongos a analizar. Transferir dichos tacos a los agujeros preparados en las placas con medio Xilano, manteniendo el micelio hacia arriba y evitando la dispersión de conidios. Como control, se emplean placas de cada medio sin el sustrato (Xilano).
- Incubar las placas a 28 °C, manteniendo el medio en la base, durante 14 días.
- Al finalizar el tiempo de incubación, cada caja fue cubierta con solución de Rojo Congo al 0.5% por media hora. Posteriormente el colorante se retiró con solución de NaCl 1M a temperatura ambiente. Las zonas de aclaramiento fueron observadas como indicativo de actividad xilanasa.

#### **5.7.2. Valoración de la actividad FAE mediante ensayo en placa.**

La actividad FAE fue evaluada en placa mediante la relación entre el diámetro del halo de degradación de un sustrato y el de la colonia (Donaghy y McKay, 1994; García, 2018). El protocolo empleado se detalla a continuación:

- Sembrar en placas de Petri con medio PW las diferentes cepas de *P. rubens* a analizar mediante bioensayo. Incubar durante 120-168 h a 28 °C, según las condiciones óptimas de cultivo.
- Preparar placas con medio EF sobre una superficie lisa y nivelada (apartado 5.3 medios de cultivo).
- Emplear un sacabocados estéril para hacer agujeros de 6 mm de diámetro en cada placa de EF. Obtener tacos del mismo diámetro, procedentes de placas con micelio esporulado de los hongos a analizar. Transferir dichos tacos a los agujeros preparados en la placa con medio EF, manteniendo el micelio hacia arriba y evitando la dispersión de conidios. Como control, se emplean placas de cada medio EF sin etil ferulato.
- Incubar las placas a 28 °C, manteniendo el medio en la base, durante 168h.
- La presencia de actividad FAE da lugar a la formación de halos de degradación de etil ferulato hacia ácido ferúlico, con un descenso de pH en el medio que se observa mediante el viraje del indicador de pH, de color purpura a amarillo.
- La actividad FAE se expresa, a partir de la fórmula del Índice Enzimático (IE) (Braga *et al.*, 2014), como se indica a continuación:

(Ecuación 1) 
$$IE = \frac{\varnothing \text{ de la colonia} + \varnothing \text{ del halo de degradación}}{\varnothing \text{ de la colonia}}$$

### 5.7.3. Análisis molecular del efecto diferencial de la cascarilla de arroz y el xilano en la expresión de *faeA* y *faeB* en *P. rubens* Wis 54-1255, por RT-PCR.

En la cepa parental *P. rubens* (Wis 54-1255) se efectuó, además, la comparación entre el

uso de cascarilla de arroz y xilano como única fuente de carbono, en la transcripción de los genes *faeA* y *faeB* codificantes para las FAEs PcFaeA y PcFaeB en el hongo. Para ello se usó el medio descrito por Sakamoto, *et al.*, 2005, con leves modificaciones (Apartado 5.3 medios de cultivo); el medio se llamó RHS (cáscarilla de arroz-sakamoto). Un Segundo medio de cultivo se denominó XS (xylan-sakamoto), en el cual se reemplazó la cascarilla de arroz por xilano. En este ensayo las fermentaciones se realizaron a 28°C y 250 rpm durante 72h en matraces de 500 ml con 100 ml del medio de cultivo correspondiente, inoculado con micelio de *P. rubens* (Wisconsin 54-1255) obtenido a partir del medio líquido MPPY (apartado 5.3 medios de cultivo), tras 24 horas de incubación. Se tomaron muestras de micelio de cada medio de cultivo (RHS y XS) a las 24, 48 y 72 horas para los análisis de expresión génica por RT-PCR.

**a. Extracción de ADN y ARN total: cuantificación y análisis de integridad.**

Para el aislamiento de ADN, las esporas de cada cepa en estudio, se inocularon en medio MPPY a 28°C durante 48 horas, y 250 rpm en un agitador orbital. El micelio producido se recogió por filtración y se lavó con NaCl al 0.9%. El ADN se aisló a partir de un equipo Mini-Beadbeater-16 cell disrupter (Biospec) con el que se llevó a cabo la lisis celular. Posteriormente, el ADN se purificó con el kit "Wizard® Genomic DNA Purification Kit" (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para el aislamiento de ARN, se colectó el micelio producido por cepa en cada uno de los medios de fermentación en los tiempos definidos. El micelio se recogió por filtración y se lavó con

solución salina estéril al 0.9%. Cada muestra de micelio se congeló luego por separado con nitrógeno líquido mediante contacto directo, y se molió en un mortero con el uso de un pistilo estéril. El ARN total se extrajo con el uso del Minikit RNeasy Plant (Qiagen, Alemania) conforme a las instrucciones del fabricante, y se trató con DNasa I sin RNasa (Invitrogen).

El ARN total se cuantificó en un sistema de cuantificación MultiSkan GO empleando una placa  $\mu$ Drop (Thermo Scientific, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad de cada muestra de ARN se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### **b. Tratamiento con DNasa.**

Previo al proceso de retrotranscripción y amplificación por PCR, cada una de las muestras de ARN se sometió a un tratamiento con DNasa para eliminar el ADN contaminante. Se empleó la enzima DNase I (Invitrogen). Cada reacción constó de un volumen final de 10  $\mu$ l y una concentración de 1  $\mu$ g de ARN. El protocolo atendió a las indicaciones propuestas por el fabricante.

#### **c. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR.**

La transcripción de *faeA*, *faeB* y *actA* (que codifica para la  $\gamma$ -actina) se analizó mediante RT-PCR. El gen *actA* se usó como control al ser un gen de expresión constitutiva. Se utilizó 1  $\mu$ g de ARN total para sintetizar ADNc utilizando RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo

Scientific, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores específicos utilizados, se relacionan en la Tabla 4. La reacción se llevó a cabo en un equipo de PCR Axygen® MaxyGene™ II Thermal Cycler en las siguientes condiciones: 60 min a 42°C y 10 min a 70°C (35 ciclos).

Con el ADNc obtenido se llevó a cabo la amplificación de cada gen por PCR convencional empleando la enzima GoTaq DNA Polymerase (Promega). Cada reacción se realizó en un equipo de PCR Axygen® MaxyGene™ II Thermal Cycler en las siguientes condiciones: 35 ciclos de: 5 min a 94°C; 30 seg a 94°C; 30 seg a 58°C; 30 seg a 72°C y 10 min a 72°C. En cada ensayo de expresión, se incluyó un control negativo y uno positivo. El control negativo constó de la preparación de una muestra sin adición de la muestra problema de ADNc correspondiente a cada gen; y el control positivo hizo referencia a una muestra que en lugar de la muestra problema de ADNc, contenía una muestra de ADN genómico de *P. rubens*. Finalmente, los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos diseñados para verificar la expresión génica de los genes *faeA* y *faeB*.

Gen diana	Secuencia (5'-3')
<i>faeA</i>	Fw: CTCGCTCAATTTGACACCTT Rv: ACAAGTGACTCGACCTGATCT
<i>faeB</i>	Fw: ACCGCCAACCTGAGGTAATC Rv: CTTGTCTGAAGCCCTCCTCAT
<i>actA</i>	Fw: TCCCCATCTACGAGGGTTTCT Rv: CGCTCACGCAGGATCTTCAT

## **FASE V**

### **5.8 Análisis de datos.**

Para el desarrollo de este estudio se recurrió a un diseño experimental de la forma 5X3X3 (para el estudio de cada efector), que implicó el uso de 5 cepas microbianas por cada efector estudiado, ensayadas en tres experimentos independientes, cada uno con tres replicas. A su vez, para dar validez estadística a los resultados obtenidos, se llevó a cabo la comparación de datos, y estimación de los componentes de variación a partir de un análisis de varianza. Los análisis fueron realizados con el software estadístico SPSS vs 21, considerando la distribución de los datos, las medidas de tendencia central y la comparación múltiple de muestras. En relación a la organización y representación gráfica de los resultados, la hoja de cálculo Excel de Microsoft office 2016 fue empleada.

## **6. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Bajo la consciencia del valor intrínseco de la diversidad biológica y de los valores ecológicos, sociales y científicos de la diversidad biológica, el presente trabajo se desarrolló en conformidad con la normatividad vigente a nivel nacional, los parámetros de bioseguridad establecidos por el grupo de investigación GIMBIO de la Universidad de Pamplona, el Laboratorio de Mejoramiento Genético de Microorganismos Industriales de la UAM unidad Iztapalapa- México; y el laboratorio de Microbiología Básica y Aplicada de la Universidad de Santiago de Chile. El marco orientador tomado en cuenta se sustentó en la Decisión 391 de 1996, la Ley 165 de 1994, los Decretos 3570 de 2011, 1376 de 2013, 1375 de 2013 y la Resolución 1348

de 2014; teniendo en cuenta que el uso de recursos biológicos que aplican para este trabajo, se llevó a cabo con fines de investigación científica - no comercial. Adicionalmente, se consideró el marco normativo a nivel nacional sustentado por el Decreto 4525 de 2005. En este trabajo, se especifica un trabajo investigativo en medio confinado, con el uso de un organismo ampliamente distribuido, y de uso comercial no patógeno. En este sentido se aplicaron esquemas pertinentes de bioseguridad, precisando en los sistemas de siembra, almacenamiento, y disposición final; así como, técnicas, medidas y elementos de mitigación para protección del personal, manejo de desechos, y administración de materiales y herramientas empleadas. Todo lo anterior soportado en lineamientos bioéticos que conduzcan a la reducción al mínimo del impacto que pueda derivar de las actividades de investigación.

## 7. RESULTADOS

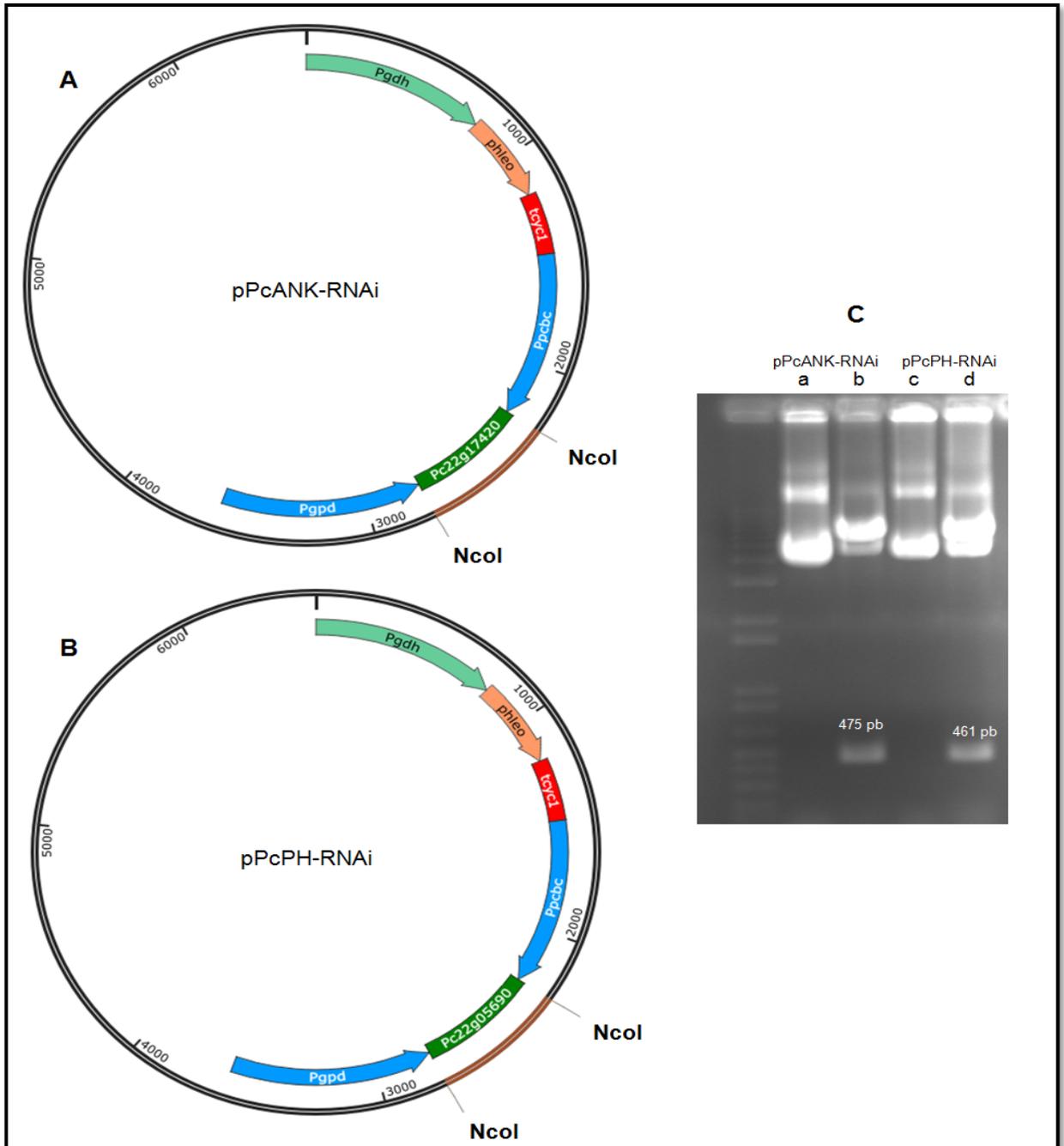
### 7.1 Fase preliminar: Silenciamiento de los efectores ProPH (Pc22g05690) y ProANK (Pc22g17420).

Los resultados descritos en este apartado fundamentan el desarrollo de la presente investigación, y son producto del trabajo realizado por el grupo de investigación del Laboratorio de Mejoramiento Genético de Microorganismos Industriales, liderado por el Dr. Francisco Fierro Fierro, del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa – México.

Se puso en marcha el estudio de las proteínas ProPH (Pc22g05690) y ProANK (Pc22g17420) identificadas en un análisis proteómico previo en el cual las proteínas en mención mostraron estar reguladas por la cascada de señalización mediada por Pga1 (subunidad alfa de proteínas G en *P. rubens*) (Carrasco, Vera, Barkla, Zuñiga, Reyes, *et al.*, 2016). Estas proteínas contienen, además, dominios distintivos de interacción con otras proteínas, ubicándolas como candidatas a ser efectoras de vías de señalización.

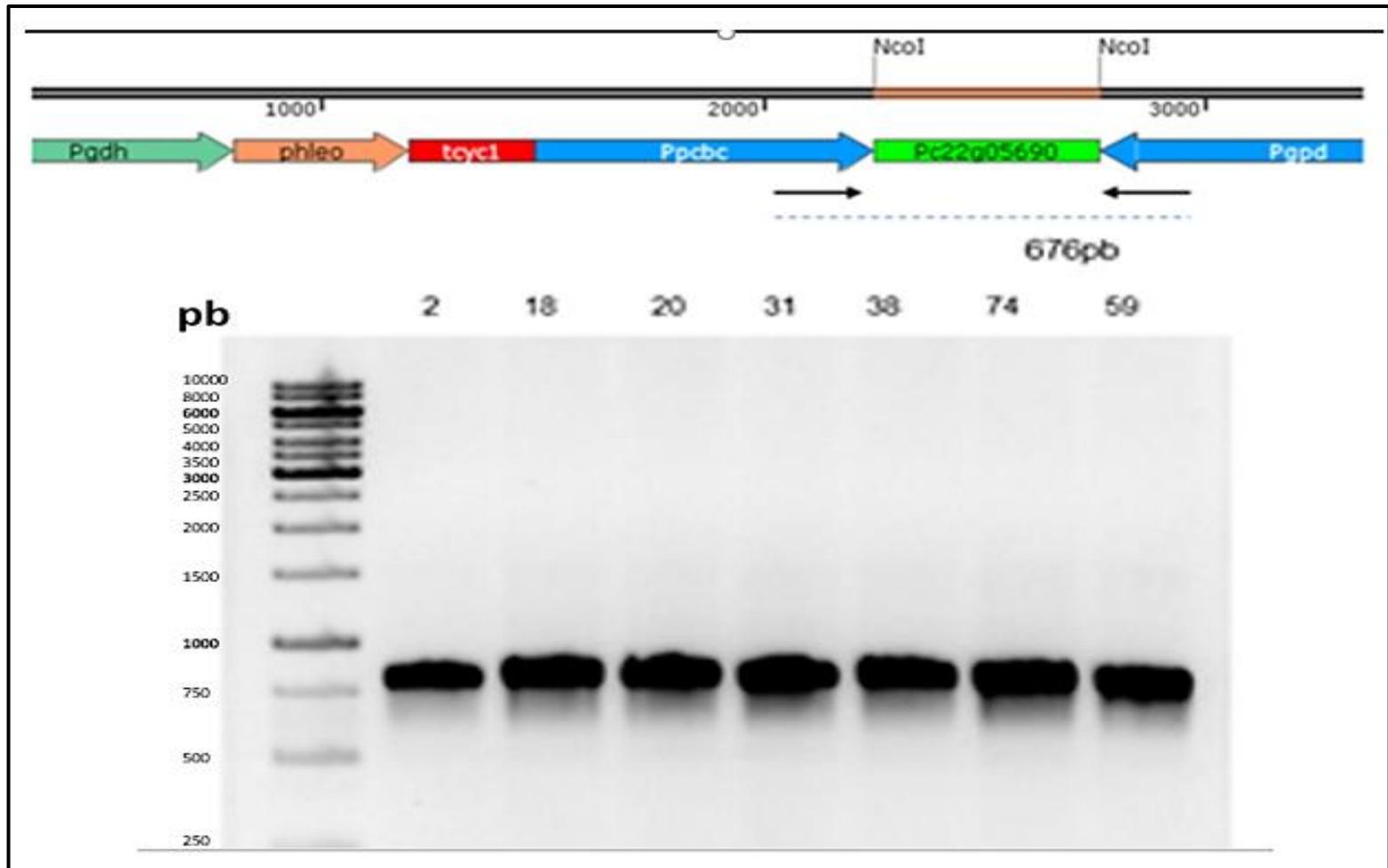
La caracterización de las proteínas ProPH (particular por contener un dominio PH, pleckstrin homology), y ProANK (característica por la presencia de un dominio Ankyrin repeats), se inició con el silenciamiento de los genes que las codifican empleando estrategias de ribo interferencia (vía RNAi); tal y como se ha descrito en el apartado 5.5 *de materiales y métodos*. Con tal propósito se utilizó el plásmido pJL43- RNAi (figura 8), desarrollado por el Instituto de Biotecnología de León España INBIOTEC (Ullán, *et al.*, 2008). Este plásmido, ha sido empleado

en estudios previos para silenciar los genes *pcbC*, *pcrfx1*, *creA* y *pcfkh1* de *P. rubens* (Ullán *et al.*, 2008, Domínguez-Santos *et al.*, 2012, Cepeda-García *et al.*, 2014, Domínguez-Santos *et al.*, 2015). Este vector fue utilizado para la construcción de los plásmidos pPcPH- RNAi y pPcANK- RNAi empleados en este trabajo. Para ello, un fragmento de la CDS de los genes Pc22g05690 (ProPH) y Pc22g17420 (ProANK) se obtuvo por PCR. El tamaño de los productos de PCR obtenidos para clonar los genes Pc22g05690 y Pc22g17420 fue de 461 pb y 475 pb, respectivamente. Cada fragmento por separado fue clonado en el sitio *NcoI* (sitio único de clonación del vector), quedando flanqueado por los promotores P<sub>gpd</sub> y P<sub>pcbC</sub>. Los constructos así generados, se muestran en la figura 10.

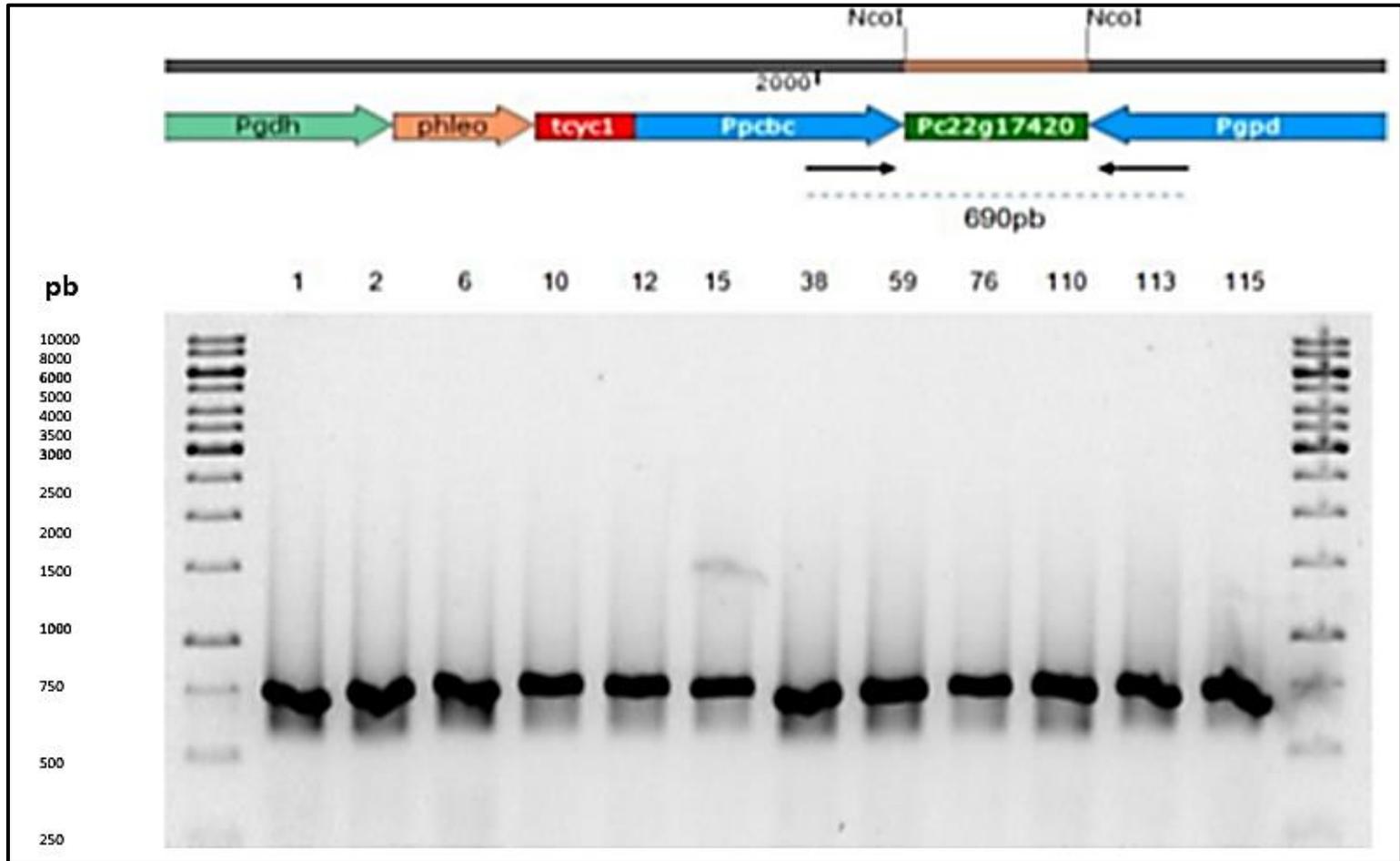


**Figura 10. Construcción de los plásmidos para el silenciamiento de los genes Pc22g05690 y Pc22g17420. A)** Mapa del plásmido pPcANK-RNAi (para silenciar el gen Pc22g17420), **B)** Mapa del plásmido pPcPH-RNAi (para silenciar el gen Pc22g05690). **C)** Lisis alcalina del plásmido pPcANK-RNAi (**a**) y del plásmido pPcPH-RNAi (**c**), digestión con *Nco*I: pPcANK-RNAi (**b**), pPcPH-RNAi (**d**).

Posteriormente, se procedió a transformar protoplastos de *P. rubens* Wis 54-1255 con los plásmidos pPcPH- RNAi y pPcANK- RNAi de manera independiente (transformación de un grupo de protoplastos con pPcPH- RNAi y otro grupo con pPcANK- RNAi). La transformación de *P. rubens* con cada uno de los vectores de silenciamiento produjo transformantes resistentes a fleomicina, que, seleccionados adicionalmente por su estabilidad mitótica, fueron posteriormente analizados por PCR para confirmar la incorporación de los plásmidos pPcPH- RNAi y pPcANK- RNAi en el genoma de las cepas transformantes. Para ello, el ADN genómico de los transformantes seleccionados se extrajo y se llevó a cabo una amplificación por PCR con oligos que hibridan en los promotores *Ppcbc* y *Pgpd*, inmersos en cada uno de los constructos empleados para el silenciamiento. Los fragmentos de PCR obtenidos correspondieron al tamaño esperado con un aproximado de 676 pb para Pc22g05690 y 690 pb para Pc22g17420 (*apartado 5.5.1. de materiales y métodos*). En las figuras 11 y 12 se indican los productos de PCR de los transformantes positivos para Pc22g05690 (efector ProPH) y Pc22g17420 (efector ProANK), respectivamente.



**Figura 11.** Gel de agarosa de los productos de PCR que muestra la integración completa del cassette de silenciamiento de pCpH-RNAi (silenciamiento del gen Pc22g05690) en los transformantes de *P. rubens*. **Marcador de peso molecular empleado:** Generuler 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Cada línea representa el número de transformantes positivos.



**Figura 12.** Gel de agarosa de los productos de PCR que muestra la integración completa del cassette de silenciamiento en los transformantes de *P. rubens*, transformados con el plásmido pPcANK-RNAi (silenciamiento del gen *Pc22g17420*). **Marcador de peso molecular empleado:** Generuler 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Cada línea representa el número de transformantes positivos.

Como resultado de la obtención, selección y confirmación de transformantes exitosos que derivan del proceso de silenciamiento de los efectores ProPH (Pc22g05690) y ProANK (Pc22g17420) en esta fase preliminar, fueron seleccionados 3 transformantes por cada atenuación en estudio, que fueron empleados en cada una de las siguientes etapas experimentales.

Para la presentación de los resultados que a continuación se exponen, los tres transformantes en ProPH seleccionados se denominaron como PH1, PH2 y PH3, conformando así el grupo PH. Por su parte, los transformantes en ProANK se denominaron como ANK1, ANK2, y ANK3 conformando el grupo ANK. Las cepas WT (cepa parental *P. rubens* 54-1255) y PCNA (cepa *P. rubens* 54-1255 transformada con el vector pJI43-RNAi vacío), corresponden a los controles empleados en cada experimento.

## **7.2 Análisis bioinformático para identificar los genes Pc22g05690 y Pc22g17420 y caracterizar las proteínas ProPH y ProANK en *Penicillium rubens* Wisconsin 54-1255.**

Durante el proceso de secuenciación del genoma de *P. rubens* realizado por van den Berg *et al.*, 2008, fue asignado un código informativo a cada ORF (Pc22g05690 y Pc22g17420 en el caso de los genes de interés en este trabajo). En estos dos códigos la información que se proporciona atiende a: **Pc:** corresponde a las siglas de *Penicillium chrysogenum* (actualmente renombrado como *Penicillium rubens*); el número **22** (Pc22) representa el supercontig en el que se incluye cada ORF analizado; finalmente, **g05690 y g17420:** indica la posición en el genoma del ORF dentro del supercontig en el que se incluye (Pc22).

A la fecha la información en torno los genes Pc22g05690 y Pc22g17420 y las proteínas efectoras que estos dos genes codifican (ProPH y ProANK), es nula. Dada la disponibilidad del genoma de la cepa *P. rubens* Wis 54-1255, en este trabajo se realizó un análisis bioinformático preliminar de cada gen.

### **7.2.1. Análisis bioinformático del gen Pc22g05690 y la proteína ProPH.**

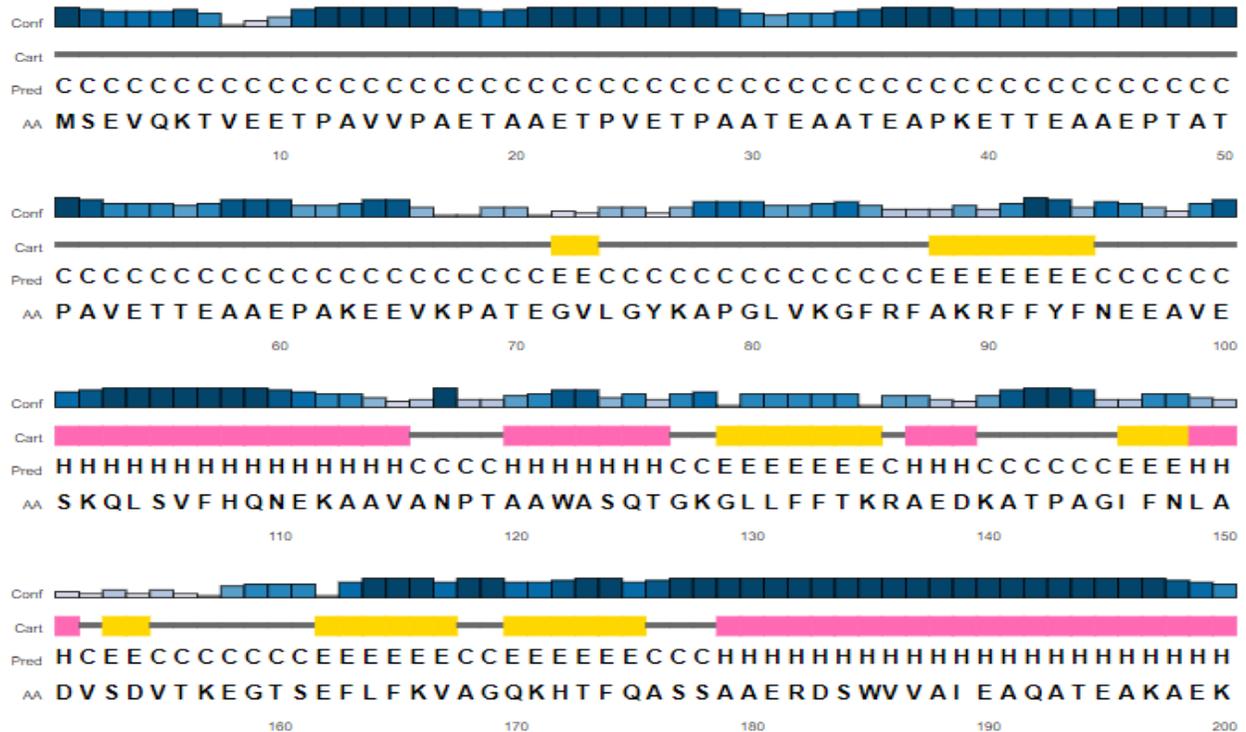
La base de datos del genoma de *P. rubens* Wis 54-1255 indica que el ORF Pc22g05690 posee 1835 pb de longitud. Dicha secuencia está interrumpida por dos intrones, uno de 66 pb y otro de 55 pb. El pre-ARNm correspondiente al gen Pc22g05690, genera un ARN mensajero maduro cuya traducción da lugar a una proteína (CAP97857) que se ha denominado en este trabajo como ProPH.

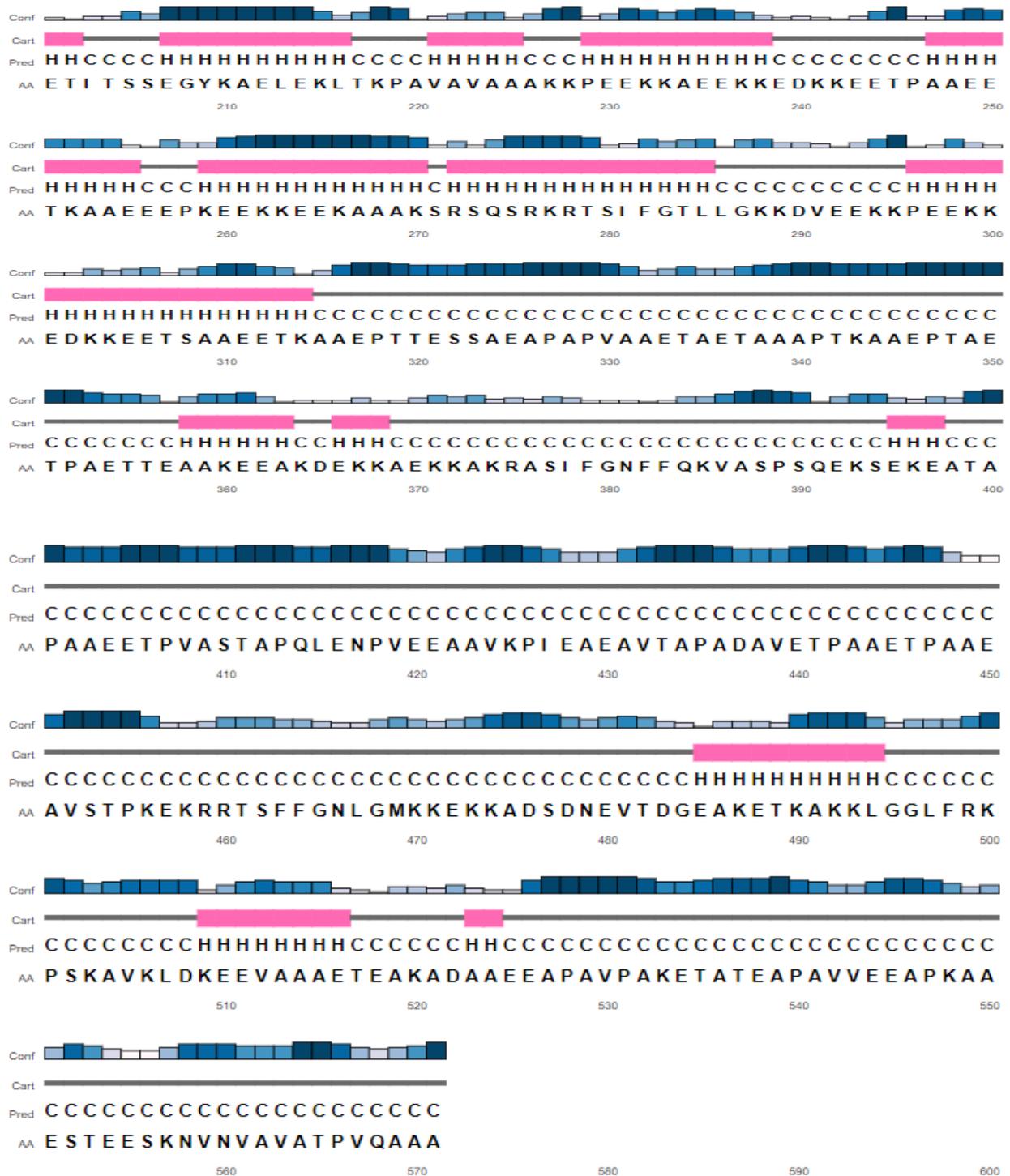
Si se compara la secuencia aminoacídica de la proteína ProPH (CAP97857) con las bases de datos, mediante la herramienta informática Protein BLAST, se obtienen altos porcentajes de identidad (73- 97%) con secuencias de proteínas hipotéticas, todas estas del género *Penicillium*: *P. flavigenum* (97%), *P. nalgiovense* (95%), *P. nordicum* (86%), *P. solitum* (85%), *P. camemberti* (85%), *P. coprophilum* (83%), *P. vulpulum* (81%), *P. roqueforti* (73%); entre otras, con porcentaje de secuencia alineada entre el 97 y el 84%.

La secuencia ORF del gen Pc22g05690 de *P. rubens* Wis 54-1255 codifica para la proteína CAP97857 (ProPH) de 571 aminoácidos. Se analizó la presencia de péptido señal en la proteína, cuyo resultado fue negativo; con ello la predicción indica que la proteína ProPH no corresponde a

una proteína de secreción. Esta predicción se realizó con el uso del programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>).

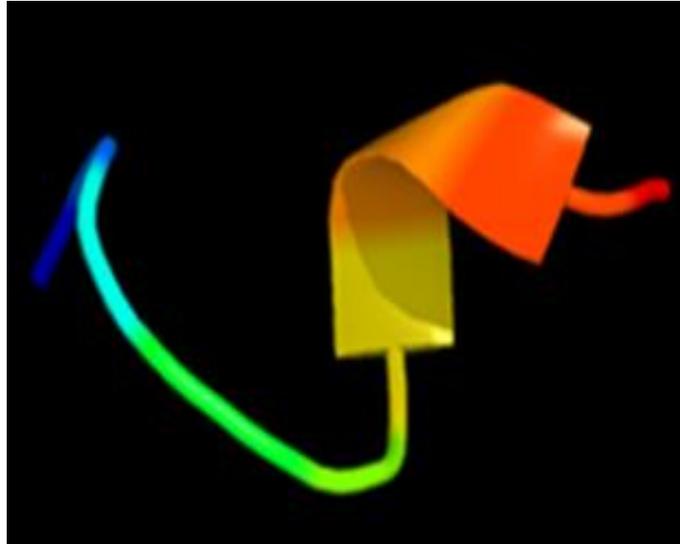
Con el uso del servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) que predice la estructura secundaria de las proteínas, se llevó a cabo además la predicción de la estructura secundaria de la proteína ProPH. El análisis arrojó que la proteína ProPH contendría 19 hélices alfa (cilindros rosados figura 13) y 7 láminas beta (cilindros amarillos en la figura 13).





**Figura 13. Predicción de la estructura secundaria de la proteína ProPH.** Representación obtenida usando el servidor PSIPRED. “Conf”: grado de certeza de los resultados obtenidos representado por un histograma de color azul. “Pred”: predicción de la estructura secundaria: H= hélice alfa, representada por un cilindro rosado, E=lámina beta, representada por un cilindro amarillo, C=giros, representados por una línea negra. “AA”: secuencia aminoacídica de la proteína ProPH. Fuente: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>.

Finalmente, se intentó predecir la estructura terciaria de la proteína ProPH (Figura 14) usando el servidor *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>). Sin embargo, no resultó posible modelar la proteína, puesto que solo se consiguió predecir el 2% de la secuencia aminoacídica (9 residuos).



**Figura 14. Modelo de la estructura tridimensional predicha de la proteína ProPH.** Modelo obtenido usando el servidor Phyre2. Imagen coloreada desde el extremo N al C terminal. Dimensiones del modelo: (Å):**X**:10.306 **Y**:18.819 **Z**:11.923. Fuente: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>.

### 7.2.2. Análisis bioinformático del gen Pc22g17420 y la proteína ProANK.

La base de datos del genoma de *P. rubens* Wis 54-1255 indica que el ORF Pc22g17420 posee 1401 pb de longitud. Dicha secuencia está interrumpida por dos intrones, uno de 57 pb y otro de 56 pb. El pre-ARNm correspondiente al gen Pc22g17420, genera un ARN mensajero maduro cuya traducción da lugar a una proteína (CAP99030) que se ha denominado en este trabajo como ProANK.

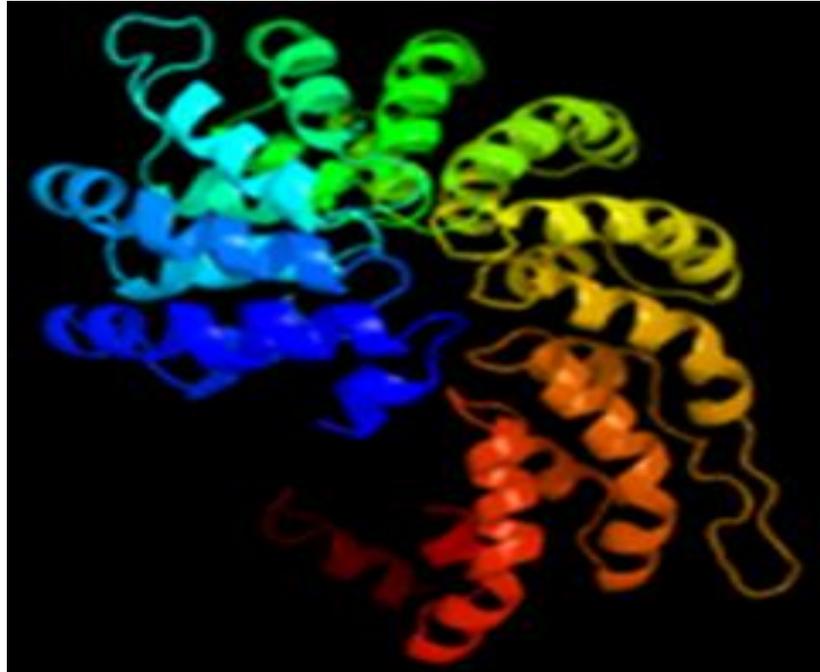
Si se compara la secuencia aminoacídica de la proteína ProANK (CAP99030) con las bases de datos mediante la herramienta informática Protein BLAST, se obtienen altos porcentajes de identidad (73- 80%) con secuencias de proteínas hipotéticas del género *Penicillium*: *P. flavigenum arizonense* (80%), *P. antarcticum* (78%), *P. flavigenum* (78%), *P. roqueforti* (75%), *P. camemberti* (73%), y *P. solitum* (73%), con porcentaje de secuencia alineada entre el 88 y el 84%.

La secuencia ORF del gen Pc22g17420 de *P. rubens* Wis 54-1255 codifica la proteína CAP99030 (ProANK) de 429 aminoácidos. Se analizó la presencia de péptido señal en la proteína, cuyo resultado fue negativo; con ello la predicción indica que la proteína ProANK no corresponde a una proteína de secreción. Esta predicción se realizó con el uso del programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>).

Con el uso del servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) que predice la estructura secundaria de las proteínas, se llevó a cabo, además, la predicción de la estructura secundaria de la proteína ProANK. El análisis arrojó que la proteína ProANK contendría 22 hélices alfa (cilindros rosados figura 15) y 6 laminas beta (cilindros amarillos en la figura 15).



Finalmente, se realizó la predicción de la estructura terciaria de la proteína ProANK (Figura 16) usando el servidor *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>). El 81% de la secuencia (348 residuos) se ha podido modelar con un 100% de confianza para la obtención del modelo tridimensional.



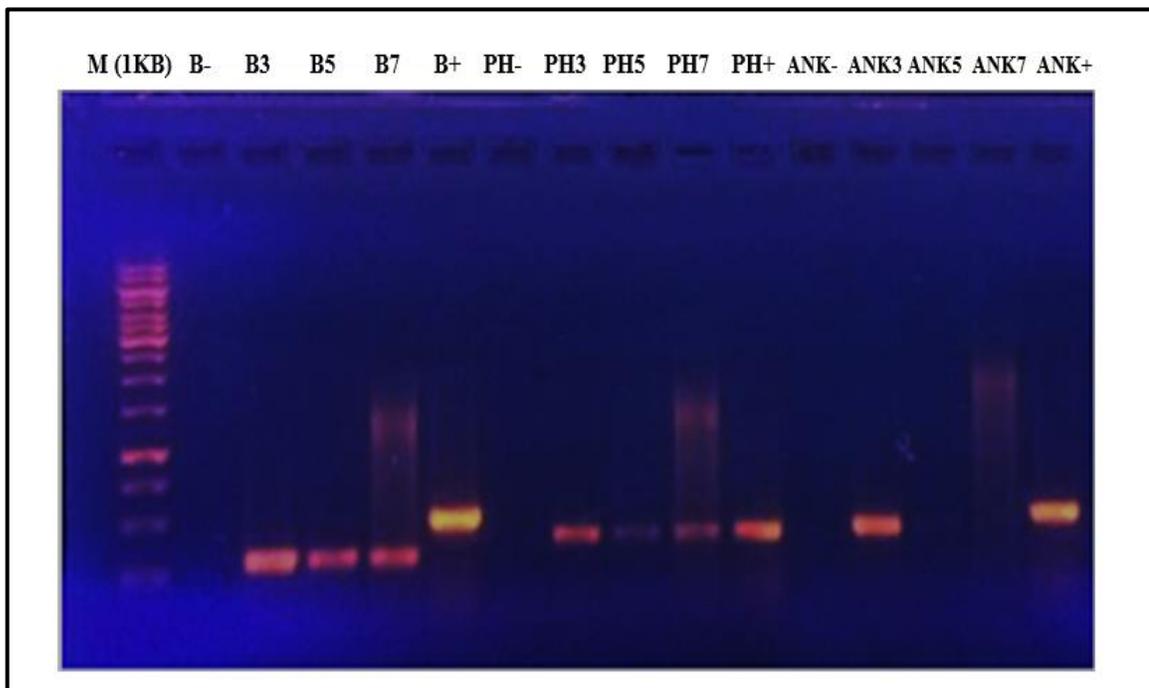
**Figura 16. Modelo de la estructura tridimensional predicha de la proteína ProANK.** Modelo obtenido usando el servidor Phyre2. Imagen coloreada desde el extremo N al C terminal. Dimensiones del modelo: (Å):**X**:69.915 **Y**:82.905 **Z**:78.576. Fuente: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>.

### 7.3 Análisis de expresión de los genes Pc22g05690 y Pc22g17420 en la cepa parental (*P. rubens* Wis 54-1255).

Las proteínas ProPH y ProANK recientemente identificadas a nivel proteómico, son a la fecha desconocidas, tanto a nivel estructural como funcional. Sobre esta base, en este trabajo se

procedió a realizar un primer análisis de la expresión de sus genes codificadores evaluando la misma en diferentes momentos del cultivo (3, 5 y 7 días). Este procedimiento se desarrolló en cultivo sumergido en medio MPPY (descrito en el *apartado 5.3 de materiales y métodos*).

A partir de los análisis de transcripción genética realizados mediante RT-PCR, fue posible identificar que tanto el gen Pc22g05690 (ProPH) como Pc22g17420 (ProANK), presentan un nivel máximo de transcripción a los 3 días del cultivo (Figura 17). No obstante, el comportamiento de ambos genes presentó algunas diferencias.



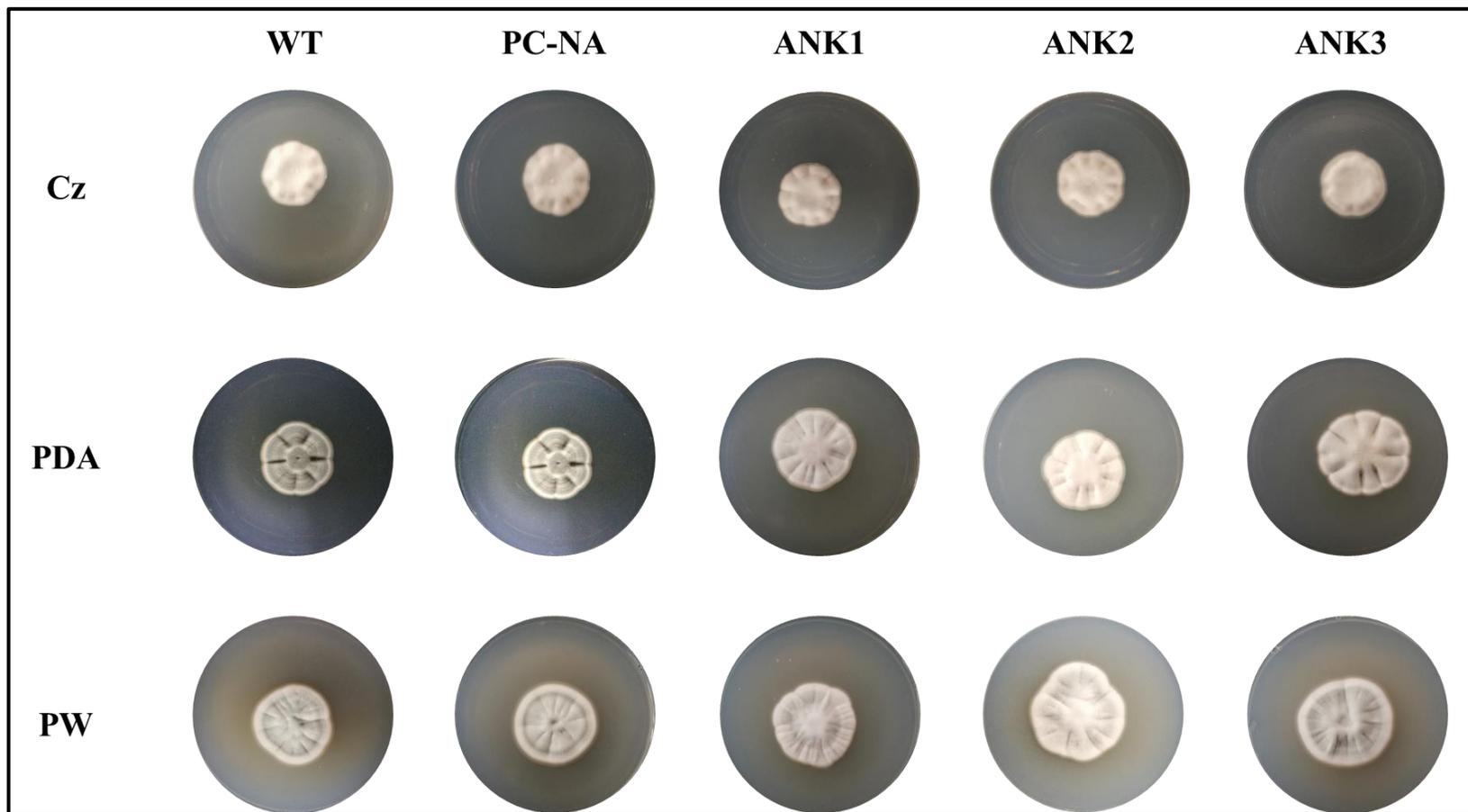
**Figura 17. Análisis de expresión de los genes Pc22g05690 (ProPH) y Pc22g17420 (ProANK) mediante RT-PCR.** Se indican los productos de PCR resueltos en gel de electroforesis. **(M)**: marcador de peso molecular 1Kb. **(B-)**: Control negativo gen betatubulina. **(B3, B5 y B7)**: expresión betatubulina a los 3, 5 y 7 días; **(B+)**: control positivo gen betatubulina. **(PH-)**: Control negativo gen Pc22g05690. **(PH3, PH5, y PH7)**: expresión Pc22g05690 a los 3,5 y 7 días. **(PH+)**: control positivo gen Pc22g05690. **(ANK-)**: Control negativo gen Pc22g17420. **(ANK3, ANK5 y ANK7)**: expresión Pc22g17420 a los 3,5 y 7 días. **(ANK+)**: control positivo gen Pc22g17420.

Los resultados muestran que ProPH Pc22g05690 se expresó a lo largo del análisis (desde el día 3 hasta el día 7 del cultivo). Sin embargo, se evidenció una disminución en el nivel de expresión del gen a los 5 días, y un posterior aumento de la misma hacia el día 7 del cultivo. Por su parte, la expresión de ProANK Pc22g17420 difiere. En este caso solo se registró expresión génica hacia el día 3. Los resultados obtenidos a partir del gen  $\beta$ -tubulina que codifica para la proteína  $\beta$ tubulina empleado en este análisis como control, al tratarse de un gen de expresión constitutiva, respalda la confiabilidad de los resultados obtenidos.

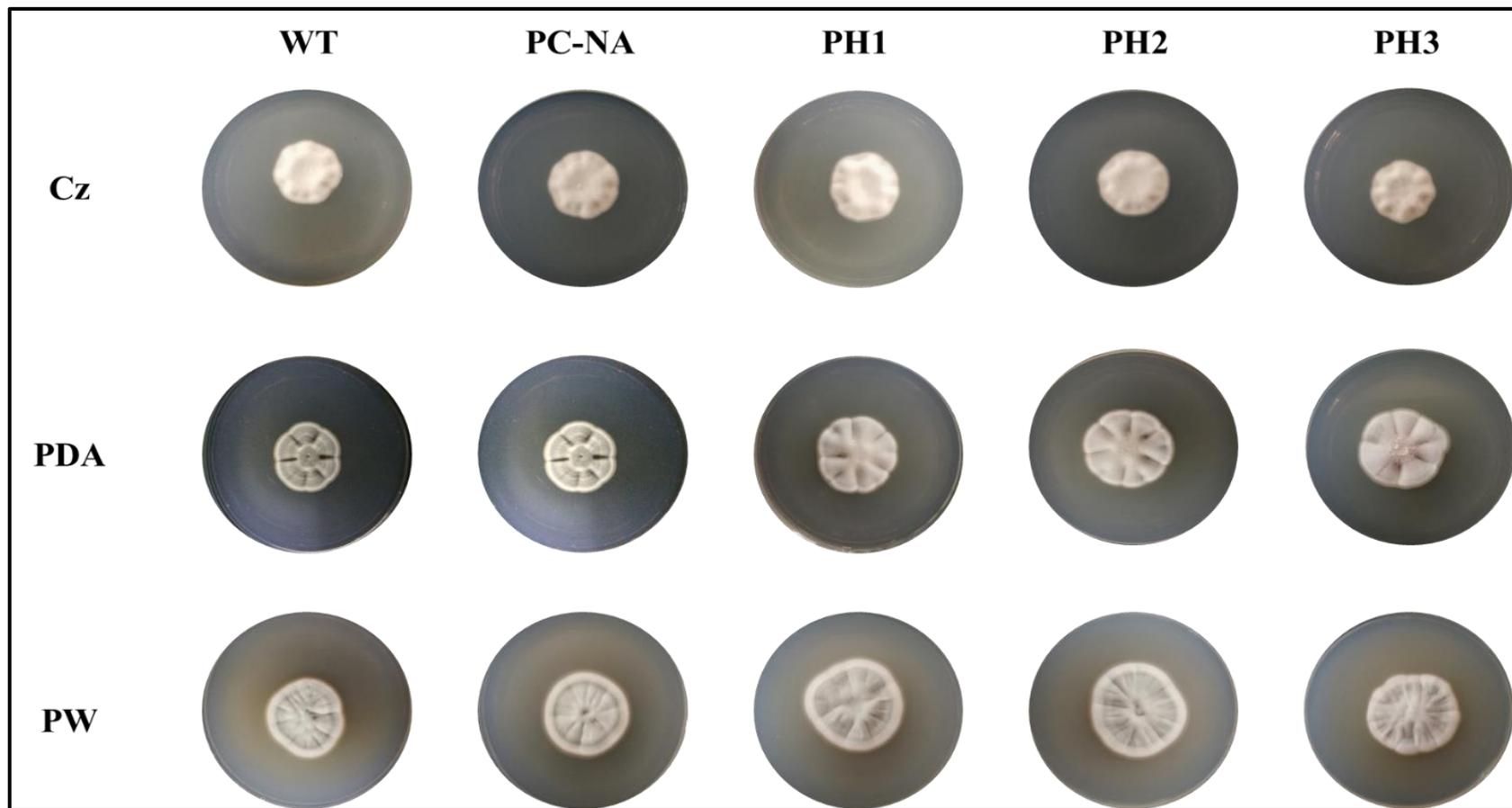
#### **7.4 Efecto de la atenuación de las proteínas efectoras ProPH (Pc22g05690) y ProANK (Pc22g17420), sobre la morfología de *P. rubens*.**

##### **7.4.1. Producción conidial.**

Tanto las cepas transformantes PH como ANK se caracterizaron por generar un fenotipo hipoconidial, respecto a las cepas control. Este efecto perduró a lo largo del cultivo en el medio PDA (Figuras 18 y19), mientras que en el medio PW se apreció claramente durante las primeras 120 h del cultivo, y en menor grado pasado este tiempo. Por el contrario, en medio Czapek no se encontraron diferencias apreciables entre el fenotipo de las cepas transformantes y las cepas control.



**Figura 18. Aspecto fenotípico de las cepas analizadas.** Las colonias fueron cultivadas por 7 días a 28°C en los medios Cz (Czapek), Pw (Power), y PDA. Controles: **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255) y **PC-NA** (cepa parental transformada con el vector pJL43-RNAi vacío); **ANK1**, **ANK2** y **ANK3**: transformantes ProANK.



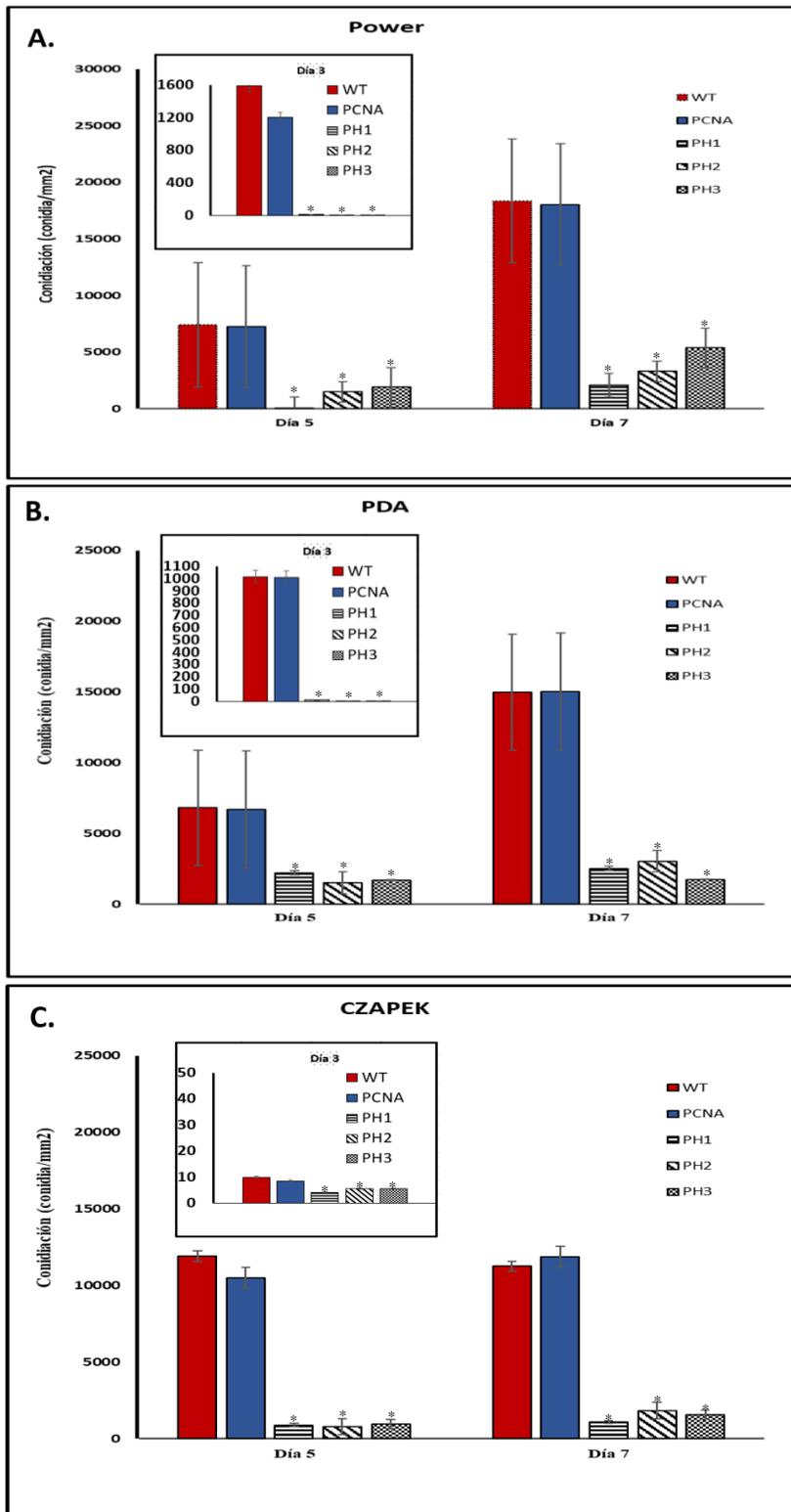
**Figura 19. Aspecto fenotípico de las cepas analizadas.** Las colonias fueron cultivadas por 7 días a 28°C en los medios. Cz (Czapek), Pw (Power), y PDA. Controles: **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255) y **PC-NA** (cepa parental transformada con el vector pJL43-RNAi vacío); **PH1, PH2 Y PH3**: transformantes ProPH.

Lo anterior, sugiere una baja producción de conidias en las cepas transformantes, por lo que se procedió a determinar y comparar cuantitativamente la producción conidial de cada una de las cepas transformantes de los grupos ProPH y ProANK, en contraste con las cepas control WT y PCNA. Con relación a lo anterior, se estimó la medida de producción de conidios por cepa (figuras 20 y 21), y se realizó el análisis de distribución de los datos; además, de las las pruebas de comparaciones múltiples.

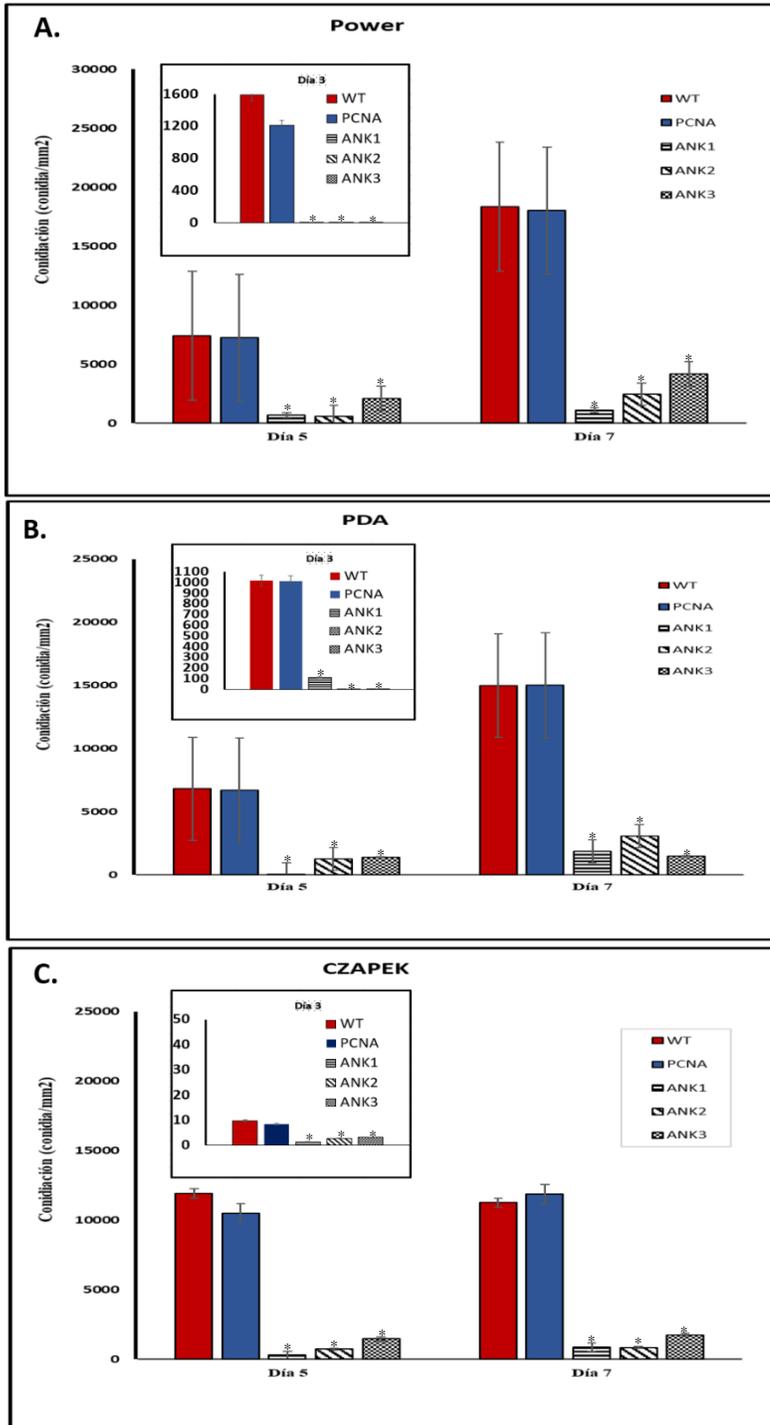
Se observó un efecto contundente en el proceso de conidiación producto de las atenuaciones tanto en el grupo de transformantes ProPH como ProANK. El efecto de las mismas consistió en la reducción drástica de la producción de esporas asexuales en las cepas transformantes de los dos grupos. Tal y como puede observarse en las figuras 20 y 21, se constató que conforme aumentó la complejidad del medio de cultivo, el efecto en la reducción de la conidiación de cada cepa en los grupos ProPH y ProANK resultó ser considerablemente más notorio, en contraste con las cepas control (WT y PCNA). El medio de cultivo en el cual resultó más evidente este efecto fue el medio Power, siendo este el de mayor complejidad nutricional; seguido por el medio PDA, y en menor grado Czapek. El efecto en mención fue particularmente notorio en el día 3 del cultivo.

A los 3 días del cultivo los transformantes ProPH produjeron tan solo el 1% de las conidias producidas por las cepas control en agar Power. En medio PDA la producción de conidios en estos transformantes fue del 4% de la media de esporulación de la cepa silvestre; mientras que, para este momento en medio Czapek los transformantes produjeron un 60% de conidios producidos por las cepas control (Figura 20). En el caso de los transformantes ProANK, el efecto resultó ser más

pronunciado. Para el día 3 las cepas transformantes de este grupo produjeron en agar Power tan solo un 1% de las conidias producidas por las cepas control (Figura 21). En PDA, la producción de conidios en los transformantes fue del 1% de la media de esporulación de la cepa silvestre; mientras que en medio Czapek produjeron un 25% de los conidios producidos por las cepas control.



**Figura 20. Efecto de la atenuación de ProPH sobre la producción conidial.** Se muestra, de manera comparativa, la producción conidial promedio de las cepas: **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255), **PC-NA** (control), y los transformantes **PH1**, **PH2** y **PH3**. Las cepas se cultivaron en los medios: **A. Power**, **B. PDA** y **C. Czapek**. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ .



**Figura 21. Efecto de la atenuación de ProANK sobre la producción conidial.** Se muestra, de manera comparativa, la producción conidial promedio de las cepas: **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255), **PC-NA** (control), y los transformantes **ANK1**, **ANK2** y **ANK3**. Las cepas se cultivaron en los medios: **A. Power**, **B. PDA** y **C. Czapek**. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ .

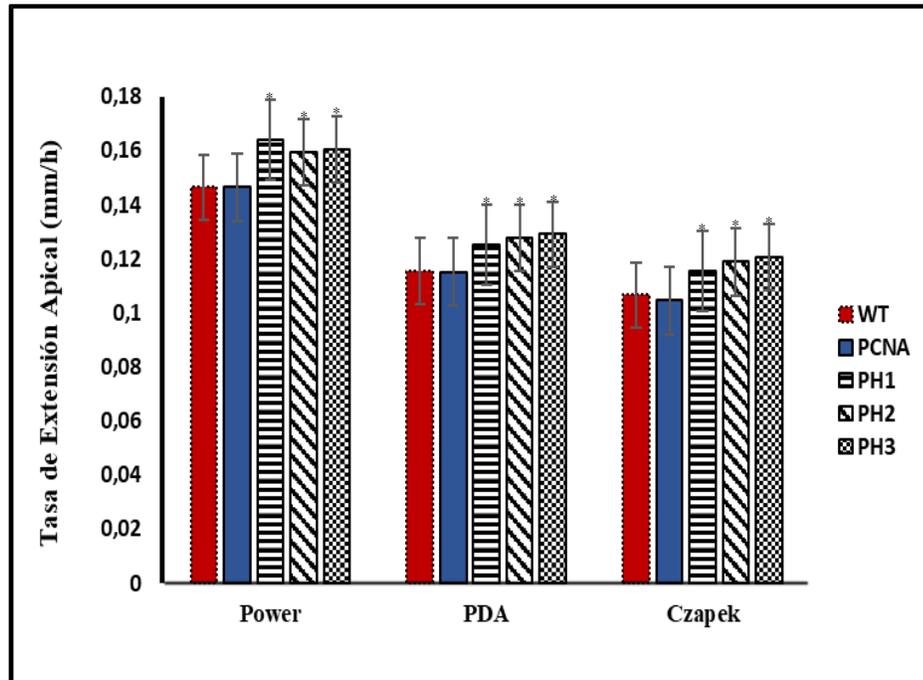
Ha de resaltarse que, pese a que la atenuación en los efectores ProPH y ProANK condujo a efectos especialmente evidentes en la esporulación asexual del hongo hacia el día 3, este efecto fue constante a lo largo del cultivo. A los 7 días del cultivo la producción de conidios en los transformantes ProPH y ProANK fue del 10% y 20% respectivamente, con respecto a las conidias producidas por las cepas control (Figuras 20 y 21). Adicionalmente, en las cepas atenuadas ProANK, se observó que en estas las colonias presentaron un fenotipo de borde irregular cuando el hongo creció en un medio de gran complejidad como lo es el medio Power; además, se percibió la formación de septos distales del centro de las colonias, a diferencia de las cepas control (Figura 19). Los resultados que derivan de estos análisis arrojaron diferencias estadísticamente significativas para el proceso de conidiación con un nivel de confianza del 95%.

#### **7.4.2. Extensión apical.**

La influencia de los efectores ProPH y ProANK sobre el crecimiento vegetativo de *P. rubens* se efectuó mediante el análisis comparativo entre los transformantes atenuados en ProPH (**Grupo PH:** PH1, PH2, y PH3), los transformantes atenuados en ProANK (**Grupo ANK:** ANK1, ANK2, y ANK3), y las cepas control (WT y PCNA). La velocidad de extensión apical en medio sólido se determinó comparando los medios Czapek, PDA y PW, tal y como se describió en la *sección 5.6.1.*

Mediante las pruebas de comparaciones múltiples entre muestras (Test de Tukey), se encontró que los transformantes PH, difieren en su extensión radial de manera estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto a los controles WT y PCNA; lo anterior, en los tres medios de cultivo ensayados. En los tres medios de cultivo evaluados y sin importar la complejidad

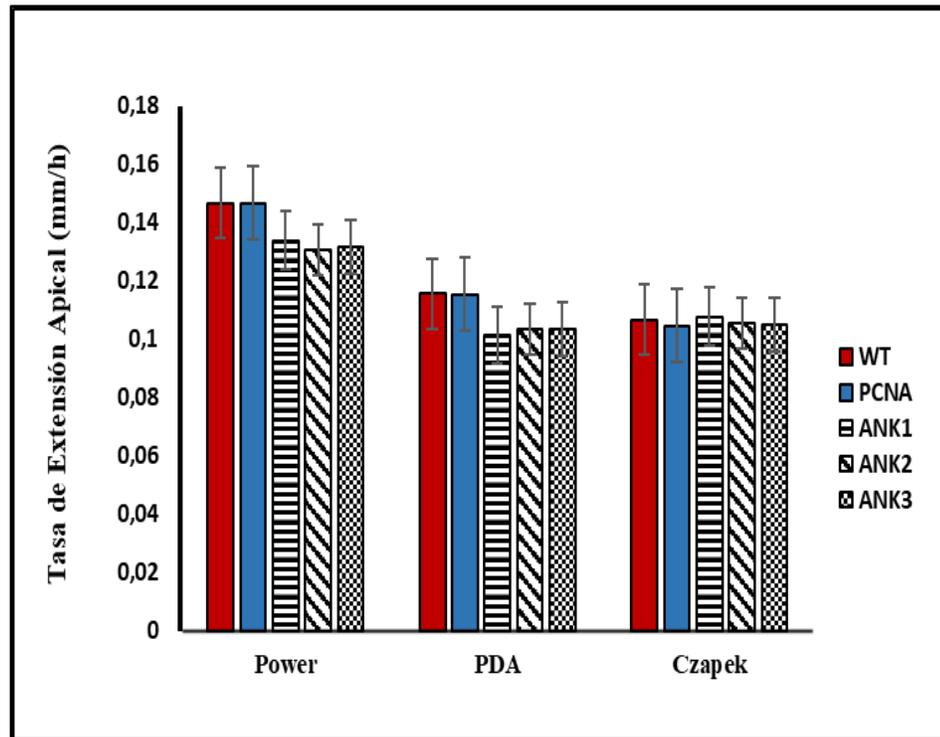
nutricional de los mismos, los transformantes ProPH mostraron una tasa de extensión apical (ligeramente) superior al de las cepas control en alrededor de un 10% (Figura 22). Lo anterior sugiere que la proteína efectora ProPH, participa en los mecanismos de regulación negativa del crecimiento vegetativo, aunque dicha participación, según los datos sea minoritaria.



**Figura 22. Efecto de la atenuación de ProPH sobre el crecimiento apical en medio sólido.** Se muestran las tasas de extensión apical de las cepas: **WT** (cepa parental), **PC-NA** (cepa transformada con el vector pJL43-RNAi vacío), y los **transformantes PH1, PH2 y PH3** (transformantes en ProPH). Los datos fueron tomados durante 7 días a 28°C en los medios de cultivo: Power, PDA, y Czapek. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ .

En el caso de la proteína ProANK, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de extensión apical entre los transformantes y las cepas control en ninguno de los medios de cultivo ensayados (figura 23). Sobre esta base, estadísticamente puede indicarse

que la atenuación del efector ProANK no produjo ningún efecto sobre el crecimiento vegetativo en el hongo.



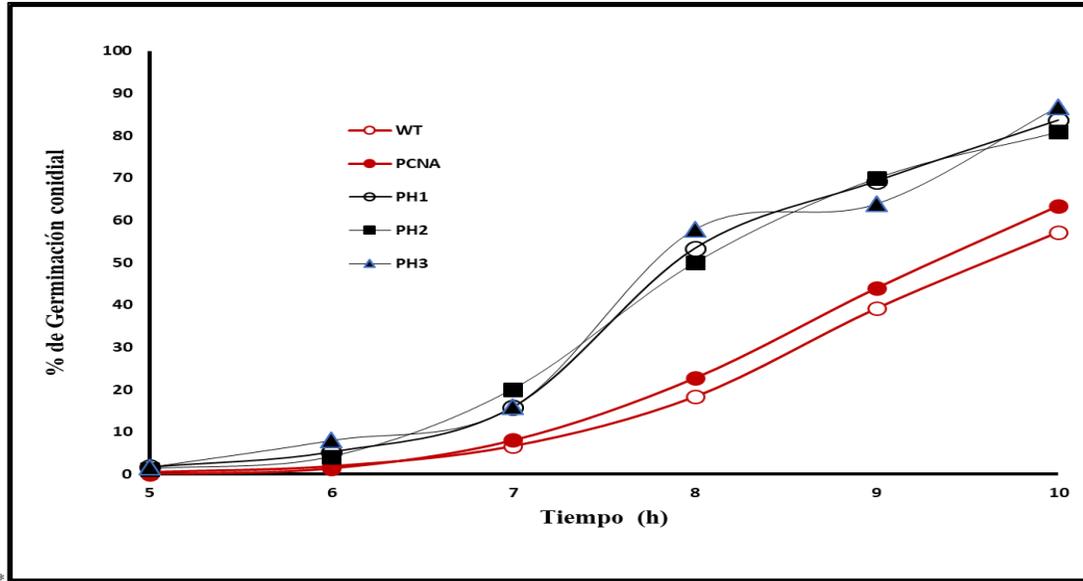
**Figura 23. Efecto de la atenuación de ProANK sobre el crecimiento apical en medio sólido.** Se muestran las tasas de extensión apical de las cepas: **WT** (cepa parental), **PC-NA** (cepa transformada con el vector pJL43-RNAi vacío), y los **transformantes ANK1, ANK2 y ANK3** (transformantes en ProANK). Los datos fueron tomados durante 7 días a 28°C en los medios de cultivo: Power, PDA, y Czapek. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ .

En el caso de la proteína ProANK, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de extensión apical entre los transformantes y las cepas control en ninguno de los medios de cultivo ensayados (figura 23). Sobre esta base, estadísticamente puede indicarse que la atenuación del efector ProANK no produjo ningún efecto sobre el crecimiento vegetativo en el hongo.

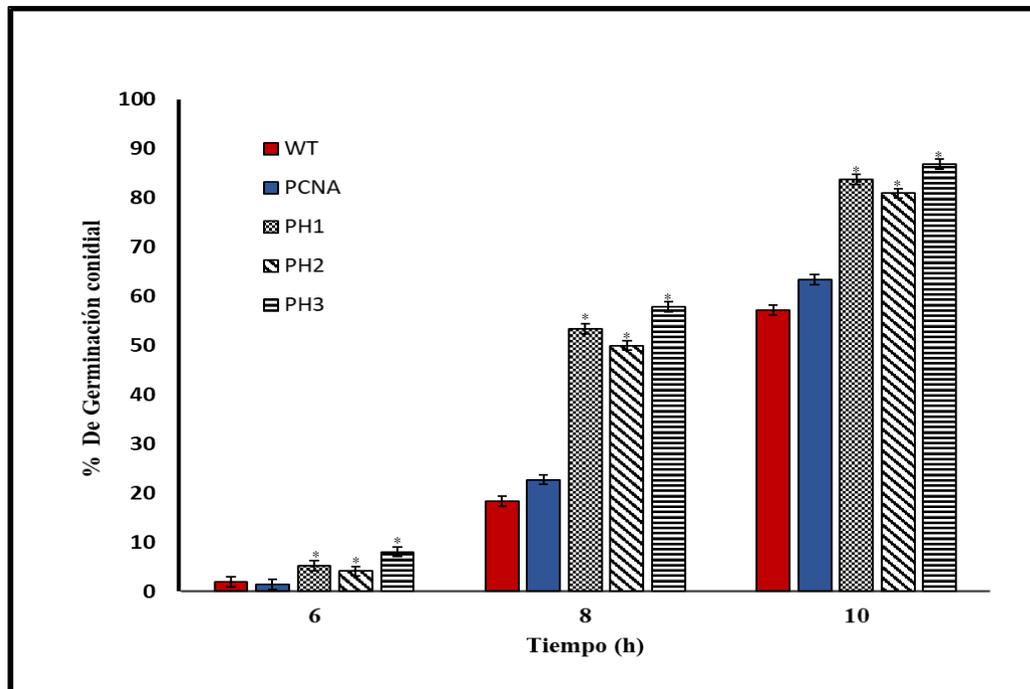
## 7.5 Evaluación de la cinética de germinación conidial.

El efecto de las proteínas ProPH y ProANK sobre la cinética de germinación conidial fue evaluado en cultivo sumergido (medio MPPY), en agitación, por 12 horas tal y como se indica en la *sección 5.6.3 de materiales y métodos*. Al comparar la cinética germinativa del grupo ProPH con las cepas control, se observó un efecto acelerador en la germinación conidial en los transformantes, lo cual fue verificado a partir de las 6 horas de cultivo (Figura 24). Sin embargo, es entre las 8 y 10 horas cuando el efecto es más evidente. A las 8 horas del cultivo el porcentaje de germinación en las cepas transformantes alcanza un 53,7%, mientras que el grupo control se encuentra en un 20,5 %; doblando así, el número de conidios germinados de las cepas WT y PCNA (Figura 25). De otro lado, pese a que a las 10 horas el porcentaje de germinación en el grupo PH ya no duplica al de las cepas control, este sigue superándolo con un 83% del total de conidios germinados; en contraste con un 60% en las cepas control. Los resultados indican que la atenuación en ProPH acelera el proceso de germinación consiguiendo que la mayor parte (83,7 %) de los conidios en los transformantes germinen pasadas las 10 horas, mientras que los controles lo hacen después de las 12 horas del cultivo; de manera que la proteína ProPH ejercería como regulador negativo sobre el proceso germinativo en el hongo.

Con un nivel de confianza del 95% se estableció la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el proceso germinativo de las cepas ensayadas. Las pruebas de comparaciones múltiples entre muestras demuestran que la diferencia de medias es estadísticamente significativa entre las cepas control y las cepas transformantes del grupo ProPH (Figura 25).

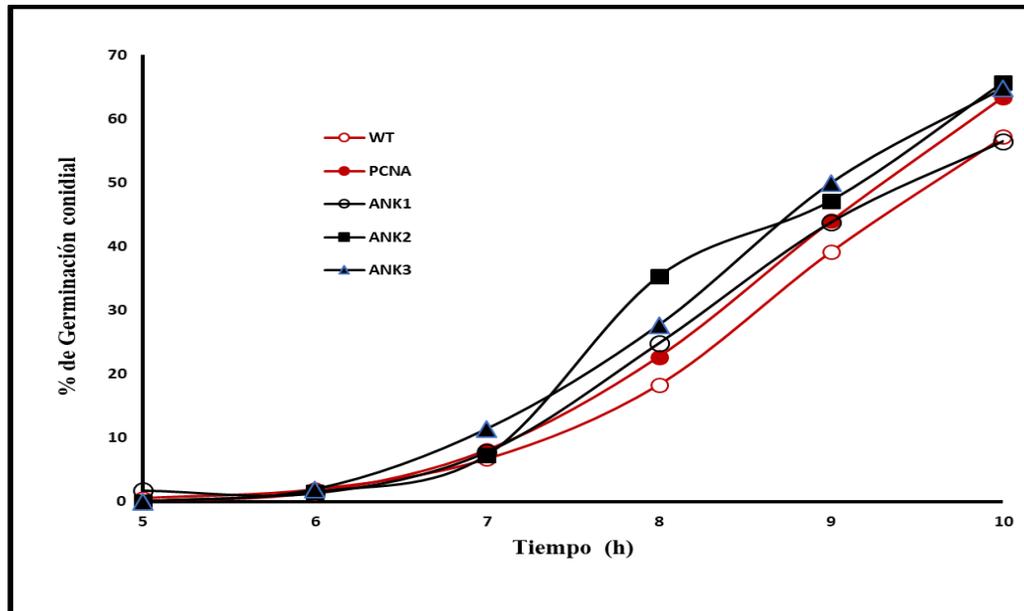


**Figura 24. Efecto de la atenuación de ProPH sobre la germinación conidial.** Se comparan las cinéticas de germinación en medio MPPY de las cepas **WT** (*P. rubens* Wis 54-1255), **PC-NA** (control), y los **transformantes PH1, PH2 y PH3**. Los resultados corresponden a la media de 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05$ .



**Figura 25. La atenuación de ProPH desreguló la germinación conidial.** Se comparan los porcentajes de germinación a las 6, 8 y 10 horas en MPPY de las cepas **WT** (*P. rubens* Wis 54-1255), **PC-NA** (control), y los **transformantes PH1, PH2 y PH3**. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ .

Los resultados obtenidos para el grupo de transformantes ProANK difieren (Figura 26). Tras realizar un análisis de distribución de los datos obtenidos y comparar las medias con un nivel de significancia del 95% se estableció que no hubo un efecto estadísticamente significativo entre las cepas ensayadas en torno a este proceso.



**Figura 26. Efecto de la atenuación de ProANK sobre la germinación conidial.** Se comparan las cinéticas de germinación en medio MPPY de las cepas WT (*P. rubens* Wis 54- 1255), PC-NA (control), y los transformantes ANK1, ANK2 y ANK3. Los resultados corresponden a la media de 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05$ .

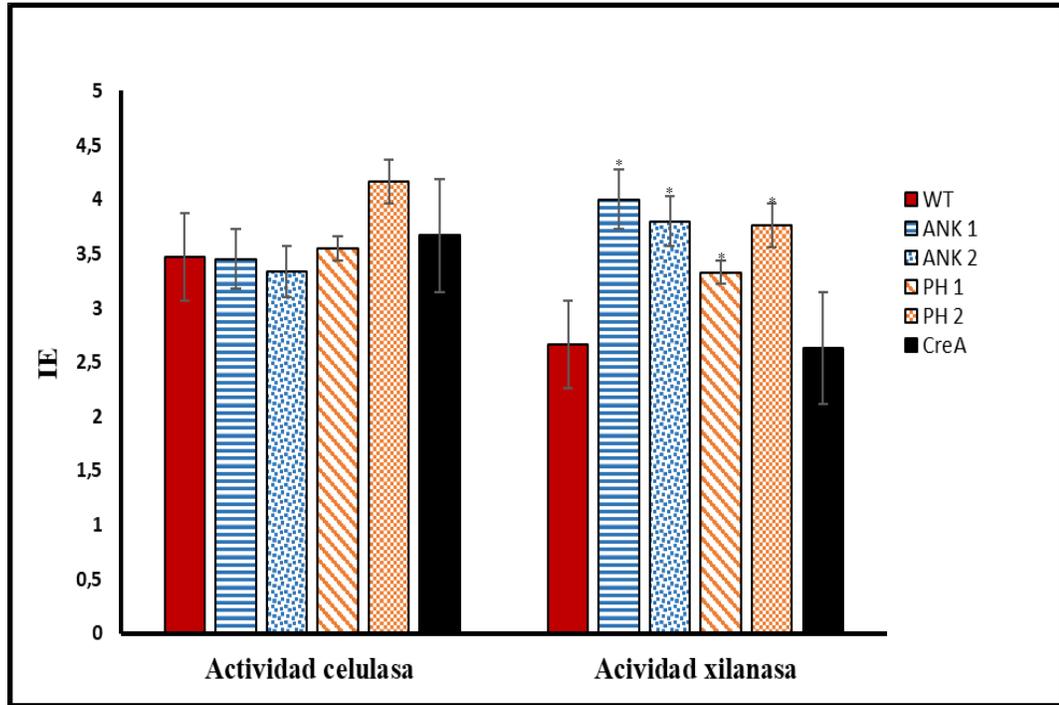
#### 7.6 Efecto de la atenuación de los efectores ProPH y ProANK en la producción de enzimas feruloil esterasas.

La degradación de la biomasa lignocelulósica requiere de una maquinaria enzimática compleja, por lo que en adición al análisis de la actividad feruloil esterasa, en este trabajo se abordó la actividad celulasa y xilanasa en las cepas de *P. rubens* en estudio. Adicionalmente, se incorporó

en esta etapa experimental una cepa de *P. rubens* atenuada en el gen *creA* (Cepeda-García C, *et al.*, 2014), un importante regulador a nivel transcripcional vinculado con la represión por catabolitos de carbono. La literatura ha reportado que los reguladores transcripcionales ejercen un fuerte impacto sobre la actividad de enzimas lignocelulolíticas, fundamentalmente a partir de la represión por catabolitos de carbono en los diferentes medios de cultivo empleados como base para su producción. Conforme lo anterior, se persiguió corroborar si *creA* consigue afectar la actividad de enzimas lignocelulíticas en *P. rubens*, y en este sentido determinar si lo hace positiva o negativamente.

#### **7.6.1. Evaluación de la actividad celulolítica y xilanolítica.**

Los transformantes atenuados en ProPH mostraron una actividad xilanolítica (IE) superior en un 25% respecto a la observada para la cepa silvestre (Figura 27). En lo anterior, se identificó una diferencia estadísticamente significativa entre las medias del grupo ProPH y la cepa parental con un nivel de confianza del 95%. De otra parte, al evaluar la actividad celulolítica los resultados obtenidos no parecen claros, por lo que se tiene previsto realizar estudios posteriores con miras a evaluar el efecto de ProPH sobre dicha actividad enzimática (Figura 27).



**Figura 27. Actividad celulasa y Xilanasa.** Se compara el índice enzimático en medio CMC y MX de las cepas: **WT** (*P. rubens* Wis 54- 1255), **PH1**, **PH2** (transformantes atenuados en ProPH), **ANK1**, **ANK2** (transformantes atenuados en ProANK) y **CreA** (cepa atenuada en el gen *creA*). Los resultados se expresan en unidades de IE (Índice Enzimático). Los resultados corresponden a la media de 2 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ .

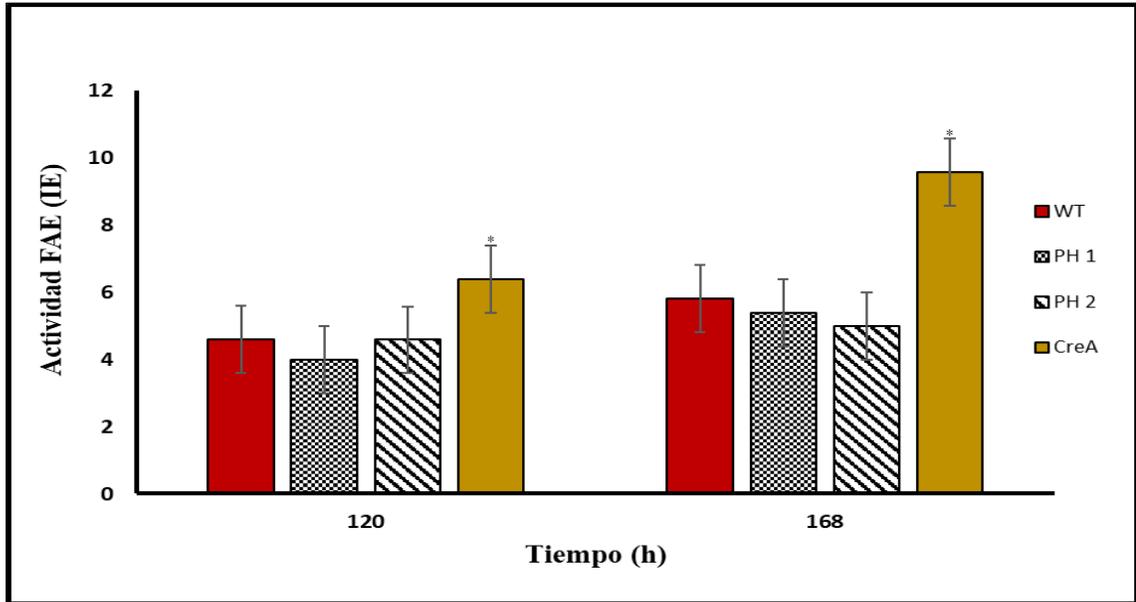
Por su parte, los transformantes ProANK mostraron diferencias estadísticamente significativas en torno a la actividad xilanolítica, superando en un 30% la actividad enzimática de la cepa parental (Figura 27). Sin embargo, al comparar la actividad celulasa del grupo ProANK con la actividad expresada por la cepa silvestre, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 27).

En cuanto a *creA*, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas para las actividades celulasa y xilanasa tras los análisis comparativos realizados (Figura 27). En

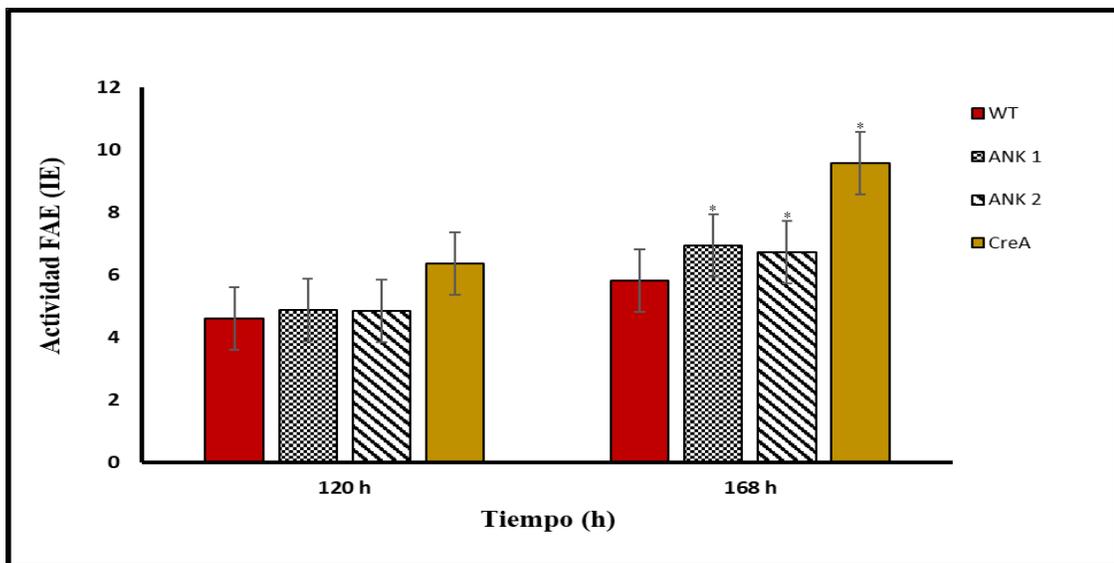
conformidad con los resultados expuestos, las proteínas ProPH y ProANK estarían regulando negativamente la actividad xilanolítica en el hongo; sin efectos significativos sobre la actividad celulasa.

### **7.6.2. Actividad Feruloil esterasa (FAE).**

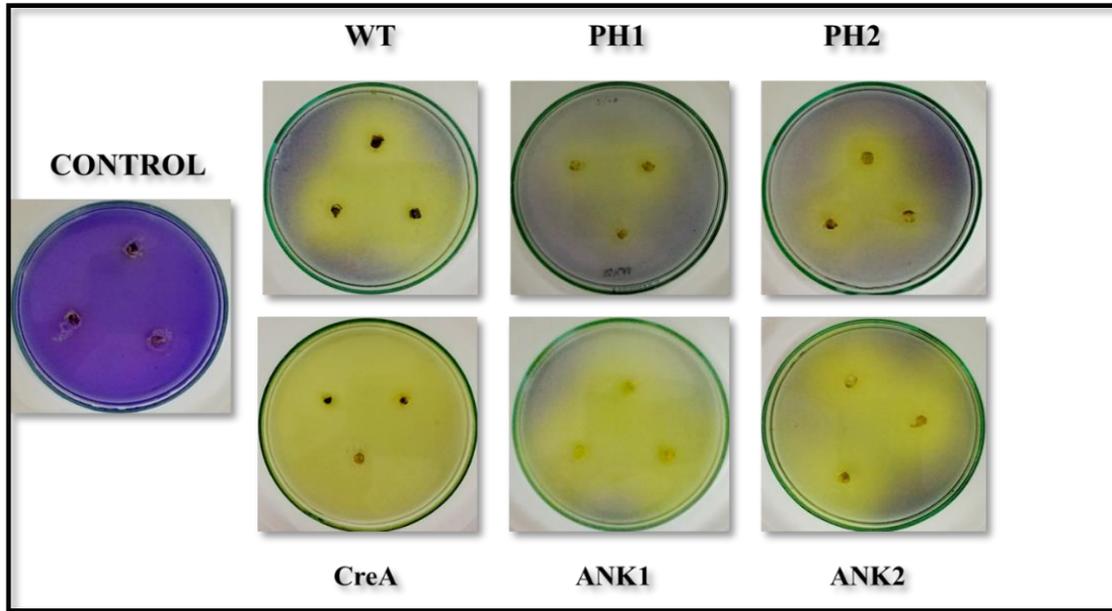
La actividad feruloil esterasa fue analizada en cada una de las cepas en estudio, en cultivo sólido desde las 24 hasta las 168 horas del cultivo, tal y como se describió en la *sección 5.7.2*. En los resultados obtenidos se observó que la secreción de FAEs inicia tarde, siendo particularmente notoria pasadas las 120 horas del cultivo. Al respecto, los análisis realizados no demarcaron un efecto significativo de ProPH sobre la actividad FAE a las 120 y 168 horas del cultivo (Figura 28). En contraste con lo anterior, las cepas atenuadas en ProANK no exhibieron diferencias significativas a las 120 horas del cultivo, pero si lo hicieron hacía las 168 horas del cultivo. Para este momento las cepas transformantes ProANK mostraron un aumento estadísticamente significativo en la actividad FAE en un 15%, con relación a la cepa silvestre (Figura 29 y 30).



**Figura 28. Efecto de la atenuación de ProPH sobre la actividad Feruloil esterasa (FAE).** Se compara la potencia de hidrólisis de las cepas: **WT** (*P. rubens* Wis 54-1255). **PH1, PH2** (transformantes atenuados en ProPH), y **CreA** (cepa atenuada en el gen *creA*). Los resultados se expresan en unidades de IE (Índice Enzimático). Los resultados corresponden a la media de 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$



**Figura 29. Efecto de la atenuación de ProANK sobre la actividad Feruloil esterasa (FAE).** Se compara la potencia de hidrólisis de las cepas: **WT** (*P. rubens* Wis 54-1255). **ANK1, ANK2** (transformantes atenuados en ProANK), y **CreA** (cepa atenuada en el gen *creA*). Los resultados se expresan en unidades de IE (Índice Enzimático). Los resultados corresponden a la media de 3 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba ANOVA con un nivel de significancia  $P < 0.05^*$ .



**Figura 30. Ensayo para la determinación de la actividad FAE en placa.** Las cepas utilizadas en el ensayo fueron **WT**: *P. rubens* Wis 54- 1255. **PH1, PH2** (transformantes atenuados en ProPH). **ANK1.ANK2** (transformantes atenuados en ProANK); y **CreA** (cepa atenuada en el gen *creA*). Se pueden apreciar los halos de hidrólisis correspondientes a las 168 h del cultivo en medio EF. Como control se indica la cepa de *P. rubens* Wis 54- 1255 en agar EF sin etil ferulato.

De otro lado, un hallazgo importante se dio en torno a la cepa CreA. Los resultados arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la cepa CreA y la cepa silvestre. CreA mostró una actividad FAE un 40% superior a la de la cepa silvestre hacia las 168h de cultivo (Figuras 29 y 30). Lo anterior, reflejaría un papel como regulador negativo para *creA*.

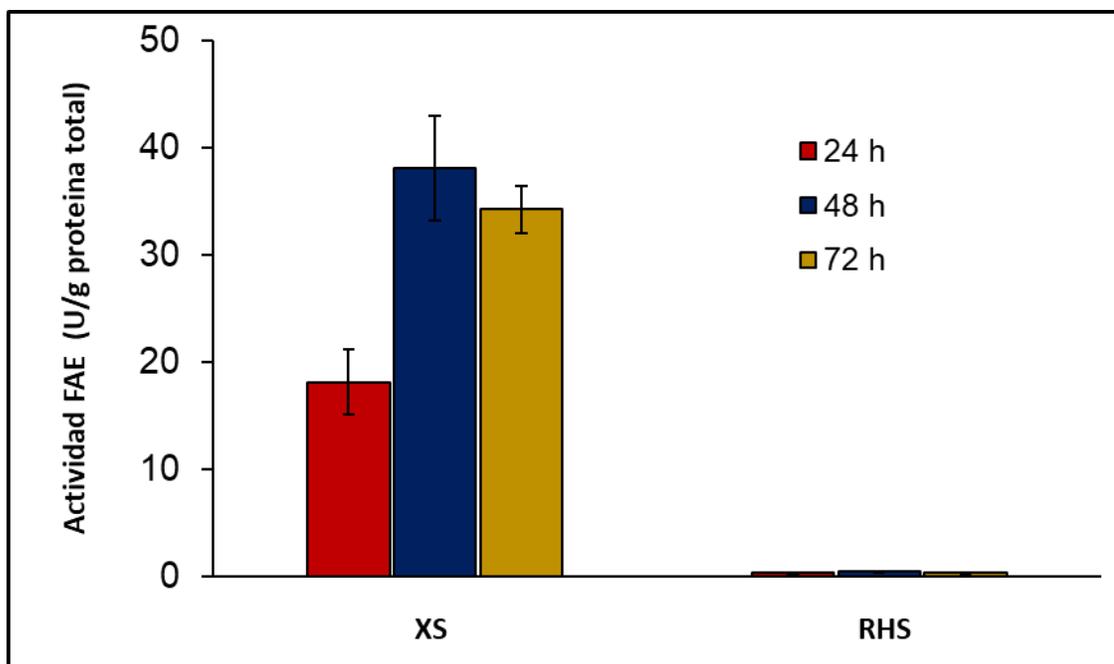
### 7.7 Efecto diferencial de la cascarilla de arroz y el xilano sobre la actividad feruloil esterasa en *P. rubens* Wis 54-1255.

Las FAEs actualmente se constituyen en una alternativa biotecnológica para la bioconversión y recuperación de residuos lignocelulósicos que se producen como consecuencia de la actividad agrícola local. Teniendo en cuenta que la cáscara es uno de los subproductos

infravalorados generados en gran cantidad durante la producción de arroz y rica en hemicelulosas y compuestos fenólicos, se consideró evaluar su uso como sustrato en la producción de enzimas FAE por *P. rubens* (Wisconsin 54-1255).

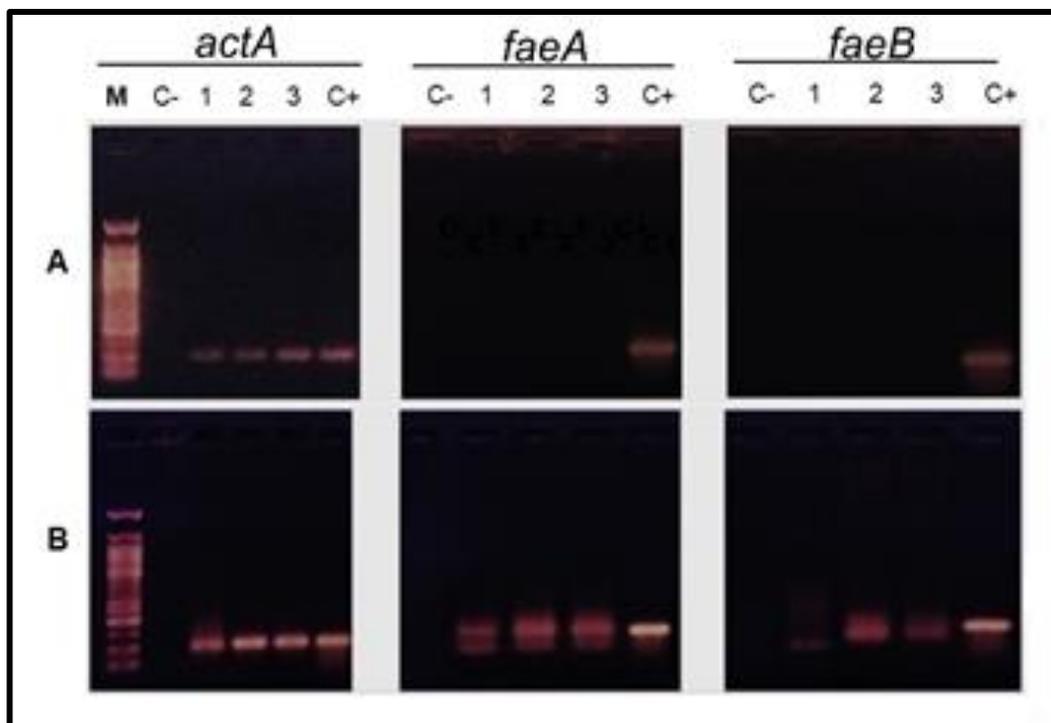
En condiciones de fermentación sumergida se persiguió analizar el efecto de la cáscara de arroz sobre la actividad enzimática feruloil esterasa y sobre la transcripción de los genes codificadores para las FAEs PrFaeA y PrFaeB de *P. rubens*, en comparación con el uso del xilano (uno de los constituyentes mayoritarios de la hemicelulosa presente en la pared celular de la biomasa vegetal). En dichos análisis el medio de cultivo descrito por Sakamoto *et al.*, 2005, con modificaciones fue tomado en cuenta. El medio de cultivo con cáscara de arroz como única fuente de carbono se denominó RHS (cáscara de arroz-sakamoto); mientras que el medio a base de xilano fue llamado XS (xilano-sakamoto), tal y como se describe en los *apartados 5.3 y 5.7.3 de materiales y métodos*.

El análisis de la actividad enzimática (actividad FAE) de los medios de cultivo líquido RHS (Cascarilla de arroz Sakamoto) y XS (Xilano Sakamoto), produjo resultados que contrastan entre sí. Por un lado, se observó que la actividad de FAE en el medio RHS es nula, mientras que en el medio XS se detectó actividad enzimática en todo momento (24-74 h). El uso de xilano como única fuente de carbono indujo una actividad FAE cuyo punto de máxima actividad se observó a las 48 h, momento en el cual se duplicó la actividad detectada a las 24 h (Figura 31). La actividad enzimática a las 72 h osciló alrededor del 90% de lo observado a las 48 h.



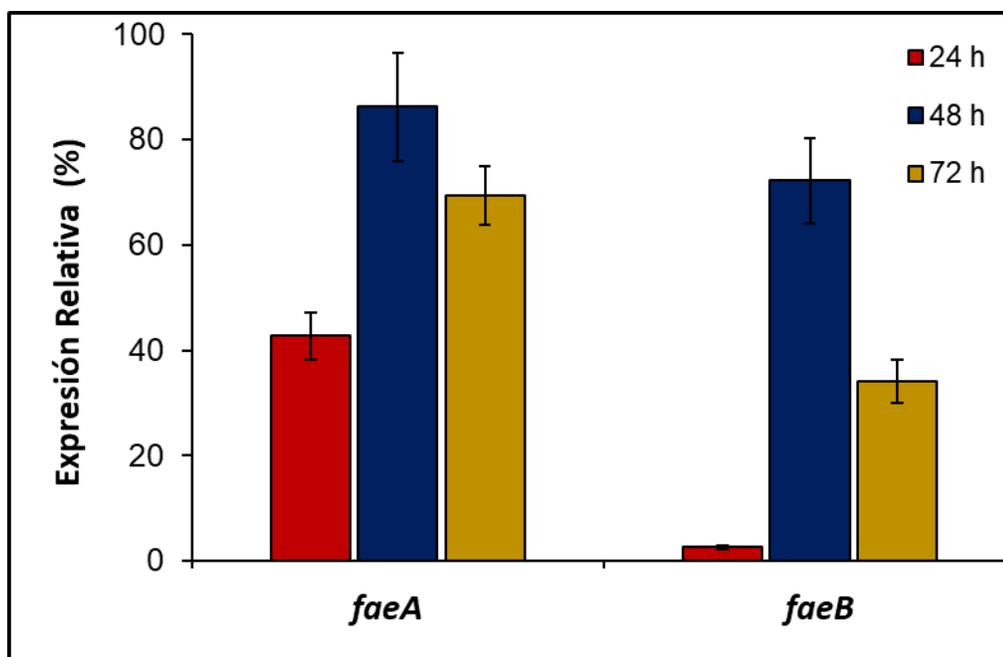
**Figura 31. Actividad FAE de los extractos enzimáticos de *P. rubens*.** Se muestran los datos obtenidos para 24 h, 48 h y 72 h de fermentación sumergida en medios XS y RHS. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas de dos experimentos independientes ( $p < 0.05$ ). (U) Unidad: cantidad de enzima que es capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de AF en un tiempo de 1 minuto.

Al llevar a cabo el análisis de expresión génica, se observó que el uso de xilano mostró un efecto inductor sobre la expresión génica de *faeA* y *faeB* (genes codificantes para las proteínas feruloil esterasa PrFaeA y PrFaeB, respectivamente). En el caso de *faeA*, se detectó actividad transcripcional desde las 24 h hasta las 72 h de fermentación (Figura 32).



**Figura 32. Efecto de la cascarilla de arroz y el xilano sobre la transcripción de *faeA* y *faeB* en *P. rubens*.** **A)** Perfil de expresión de *actA*, *faeA* y *faeB* en cultivo sumergido con cascarilla de arroz como única fuente de carbono. **B)** Perfil de expresión de *actA*, *faeA* y *faeB* en cultivo sumergido en medio Czapek- xilano. En cada caso se indica para cada gen, de izquierda a derecha: un control negativo (**C-**), expresión del gen a las 24 (**1**), 48 (**2**), y 72 (**3**) horas de cultivo, y un control positivo (**C+**). El control negativo no contenía ADNc del ensayo y el control positivo consistió en una muestra que en lugar de ADNc contenía ADN genómico de *P. rubens* (Wisconsin 54-1255).

El análisis por densitometría mostró que *faeA* alcanzó su nivel máximo de expresión a las 48 h (Figura 33). A las 72 h, el nivel relativo de transcripción en el micelio permaneció alrededor del 70% en comparación con los niveles de transcripción de *actA*, utilizado como gen normalizador debido a su carácter constitutivo.



**Figura 33. Efecto del xilano como fuente de carbono sobre la expresión de *faeA* y *faeB* en *P. rubens*.** Se muestran los datos obtenidos para las 24, 48 y 72 horas de cultivo sumergido en Czapeck-xilano. Los niveles de los transcritos de *faeA* y *faeB* fueron cuantificados por densitometría. El gen normalizador fue *actA*. Los cocientes *faeA/actA* y *faeB/actA* fueron expresados como porcentaje (Torren *et al.*, 2017).

A diferencia de *faeA*, la expresión de *faeB* no se detectó a las 24 h. Sin embargo, la mayor actividad transcripcional se observó a las 48 h. Después de 72 h, la expresión relativa de *faeB* disminuyó a menos de la mitad de lo que se observó a las 48 h (Figura 33). Para ambos genes, los niveles más altos de expresión se detectaron a las 48 h de fermentación, lo que concuerda con lo que se observó en las pruebas de actividad enzimática. Por otro lado, la cáscara de arroz produjo resultados opuestos (Figura 32). No se detectó actividad transcripcional en los tiempos probados para ninguno de los dos genes. Por lo tanto, el medio Sakamoto modificado con cáscara de arroz no funcionó como inductor de la actividad feruloil esterasa en *P. rubens*.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las proteínas G heterotriméricas son importantes intermediarios moleculares de la señalización celular, investigadas ampliamente por sus funciones reguladoras en hongos filamentosos. Aunque sus mecanismos moleculares no se encuentran completamente dilucidados, la actividad de las subunidades alfa de proteínas G del grupo I, se ha visto asociada con la morfogénesis y el desarrollo de estos organismos (Wright, Krystofova, Park, y Borkovich, 2007; García RO, Y Fierro, 2017).

Dilucidar las bases moleculares subyacentes al programa de crecimiento y desarrollo en microorganismos de importancia biotecnológica cobra gran interés. El análisis de Pga1 (subunidad Gai) en *P. rubens*, se ha vinculado con el programa de desarrollo global en el hongo, en aspectos que involucran el crecimiento vegetativo, la esporulación, la germinación de conidios, la resistencia al estrés fisiológico, y el metabolismo secundario (García RO, Martín, Fierro, 2011; García RO, *et al.*, 2008). Sin embargo, el abordaje íntegro de la cascada de señalización mediada por Pga1 en *P. rubens*, sigue siendo en su mayoría desconocido.

Un enfoque proteómico ha permitido la identificación de nuevos efectores partícipes de esta vía de transducción de señales. De esta manera, el trabajo presentado por Carrasco, *et al.*, 2016 ha permitido la identificación de un aproximado de 30 proteínas en *P. rubens* que muestran cambios significativos en su abundancia de forma dependiente de la ruta de señalización mediada por Pga1; entre estas, sobresalen las proteínas ProPH (Pc22g05690) y ProANK (Pc22g17420). La expresión de estas proteínas parece estar regulada positivamente por Pga1 de forma independiente

de cAMP, y negativamente por altas concentraciones de cAMP (Carrasco, *et al.*, 2016). En cuanto a ProPH, este efector posee un dominio de homología de pleckstrin (PH). Las proteínas que presentan este dominio se asocian con la transducción de señales. Además, se ha demostrado que las quinasas receptoras acopladas a proteínas G pueden interactuar con los dímeros G $\beta\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas a través de su dominio PH, lo que incrementa la fosforilación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Wang, Shaw, Winkelmann, Shaw, 1994; Scheffzek y Welti, 2012). ProPH se encuentra hiperfosforilada *in vivo*; de ello que presenta un alto grado de regulación postraduccional, lo cual es típico en proteínas partícipes de la transducción de señales. Esta proteína cuenta con 11 sitios de fosforilación de los cuales 5 corresponden a dianas para PKA activadas por AMPc, y hacen parte de la vía de señalización por proteínas G heterotriméricas. Los sitios restantes corresponden a dianas para otras proteínas quinasas (Carrasco, *et al.*, 2016). En el caso de ProANK, esta proteína muestra un patrón de expresión muy similar a ProPH (Carrasco, *et al.*, 2016). Los dominios de Ankirin repeats como el que contiene ProANK, se vinculan con el control del ciclo celular y la organización del citoesqueleto (Khodor, *et al.*, 2010). Sin embargo, ambos dominios (PH y Ankyrin repeats) tienen como función principal mediar interacciones proteína- proteína, y participar de aspectos ligados al proceso transcripcional (Carrasco, *et al.*, 2016; García-Torres, *et al.*, 2020).

La información acerca de estas proteínas recientemente identificadas, es escasa. Sin embargo, de su análisis bioinformático se infiere que las proteínas ProPH y ProANK codifican secuencias aminoacídicas de tamaño medio (571 a.a y 429 a.a, respectivamente). Además, se hallaron altos porcentajes de identidad en ambos casos con proteínas hipotéticas del mismo género (*Penicillium*). Estas dos proteínas estarían vinculadas con procesos a nivel intracelular. La

presencia de péptidos señal condiciona que las proteínas sean transportadas durante la traducción hacia el sistema endomembranoso, o hacía el exterior de la célula. En este trabajo se determinó a partir de los análisis bioinformáticos realizados, que las proteínas ProPH y ProANK carecen de esta etiqueta. Lo anterior, sugiere que las proteínas en mención deberían localizarse a nivel del citosol de forma indefinida o ser enviadas a otros destinos ajenos al sistema endomembranoso luego de la traducción, pero no son secretadas. A nivel estructural, pese a que no resultó factible modelar la conformación tridimensional de ProPH; esto si se consiguió con ProANK con la predicción del 81% de la misma. ProANK resulta estructuralmente semejante a otras proteínas ankirina entre estas, la ankirina humana; proteína asociada a las proteínas de membrana plasmática y del citoesqueleto (Krittikorn, Surasak, Suganya, y Thanat, 2011).

### **8.1 Papel de la señalización de los efectores ProPH y ProANK de la vía mediada por Pga1 sobre la morfología de *P. rubens* Wis 54-1255.**

En esta investigación la atenuación de los efectores downstream ProPH y ProANK de la ruta mediada por Pga1 en *P. rubens* Wis 54-1255 condujo a una variación en la morfología de los transformantes respecto a la cepa silvestre. Inicialmente el fenómeno observado producto del silenciamiento de las dos proteínas afectoras, se caracterizó por una disminución drástica en la producción de conidias. Este efecto fenotípico, resultó particularmente contundente a las 72 h del cultivo, lo que coincide con los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica realizado para cada efector en la cepa parental; teniendo en cuenta que para este momento del cultivo se registró el máximo nivel de expresión en ambas proteínas. Sobre esta base, el análisis funcional de ProPH y ProANK sugiere que las dos proteínas efectoras obran como reguladores positivos de la conidiación en *P. rubens*.

Una investigación previa, abordó la participación de Pga1 en la regulación del proceso de conidiación en *P. rubens* Wis 54-1255 (García RO, Fierro, y Martín, 2008). En esta se analizó cepas mutantes delecionadas en Pga1, y cepas con la señal Gai constitutivamente activa. Las cepas delecionadas en Pga1 exhibieron un fenotipo hiperconidiante; caso opuesto a lo observado en los transformantes constitutivamente activos en la subunidad  $\alpha$ ; en los que se apreció una reducción del 95% de los conidios producidos respecto a la cepa silvestre. Este mismo efecto se observó en los hongos filamentosos *A. nidulans*, *N. crassa*, *P. marneffeii*, y *P. roqueforti*, en los que la activación constitutiva de sus respectivas *Gai* produjo fenotipos con escasa a nula producción de conidios (Shimizu, y Keller, 2001; Zuber, Hynes, y Andrianopoulos, 2002; García RO, Fierro, y Martín, 2008). En el trabajo realizado por Garcia RO y colaboradores en 2008 se analizó, además, el nivel de cAMP intracelular en las cepas mutantes (cepas delecionadas y constitutivamente activas en Pga1) y en la cepa parental de *P. rubens*. Se demostró que los niveles de cAMP disminuyen hasta en un 50% en ausencia de Pga1, mientras que cuando se incrementa la actividad de Pga1, lo hacen también los niveles de cAMP como segundo mensajero. Lo dicho se ha visto también en *Aspergillus parasiticus* y *A. nidulans* (Roze *et al.*, 2004). Todo lo anterior, indica que Pga1 ejerce un importante papel como regulador negativo de la conidigénesis en *P. rubens*, y que tanto Pga1 como otras subunidades Gai estudiadas, regulan positivamente los niveles intracelulares de cAMP afectando directa o indirectamente la actividad de la adenilato ciclasa, lo que genera la activación de rutas dependientes de cAMP en hongos filamentosos (García RO, Fierro, y Martín, 2008).

En el trabajo realizado por Carrasco *et al.*, 2016 se vio que Pga1 regula positivamente a los efectores ProPH y ProANK. Lo opuesto ocurrió en presencia de cAMP, el cual tiene un notable

efecto represor sobre estos dos efectores. En estas condiciones, tal y como se ha indicado (subunidad Pga1 naturalmente activa e incremento de los niveles de cAMP), se pasa de un efecto positivo a una regulación negativa de ambas proteínas. En consecuencia, tanto ProPH como ProANK se ven reprimidas y por tanto su papel positivo sobre la esporulación en *P. rubens* también desaparece. En este trabajo se observó que la atenuación de los efectores ProPH y ProANK ocasionaron una reducción en la producción conidial o, en su defecto, un retraso en el proceso de esporulación. Estos resultados se asemejan a los obtenidos al incrementar los niveles intracelulares de cAMP tal y como se evidenció en el estudio realizado por García RO, Fierro, y Martín, 2008 en transformantes con la señal de Pga1 constitutivamente activa. De este modo el efecto represor de la conidiación que es mediado por cAMP descrito en *P. rubens* está ejecutándose mediante la atenuación de los efectores ProPH y ProANK. Para el caso de ProPH, es probable que esta proteína sea regulada por PKA, ya que de los once sitios de fosforilación con que cuenta, cinco de estos serían para esta proteína; tal y como se mencionó previamente (Carrasco, *et al.*, 2016).

Interesantemente, el efecto producto de las dos atenuaciones sobre el proceso conidigénico, fue más drástico cuando *P. rubens* creció en medios de cultivo nutricionalmente complejos. En este sentido, resulta evidente que la reducción de la producción conidial mediada por ProPH y ProANK está condicionada por las características nutricionales del medio de cultivo empleado. Lo anterior, fue observado previamente en *P. rubens* y *P. roquefort* mediante la caracterización de sus subunidades Gai (García RO, Chávez, Fierro, y Martín, 2009). En este sentido, se plantea que la conidiogénesis es estimulada o reprimida por factores medioambientales que implican otras vías de señalización independientes de las subunidades Gai. Sin embargo, la ruta mediada por subunidades alfa como Pga1 en *P. rubens* resulta relevante al conseguir una disminución

significativa en la producción de conidios, aun cuando su participación dependa del entorno nutricional del hongo.

Sumado a lo anterior, se evidenció que en la atenuación de ProPH, la baja producción de conidios se vio acompañada de un leve efecto positivo sobre la tasa de extensión apical en el hongo. En este sentido y aunque su relevancia sea menor, podemos proponer que ProPH ejerce un papel como regulador negativo del crecimiento vegetativo; mientras que, ProANK no participa de este proceso. Estos resultados son acordes con lo reportado en la literatura; pues se ha visto que el desarrollo de conidios, puede interrumpir o disminuir la tasa de extensión apical o viceversa (Krijgheld, *et al.*, 2013; Yu, 2006). Este efecto se ha visto entre otros, en *Aspergillus fumigatus* por una vía mediada por una subunidad alfa de proteínas G (Mah y Yu, 2006) y en *A. nidulans* en el que la activación constitutiva de la señal mediada por la subunidad G $\alpha$ I dio lugar a un fenotipo fluffy (Calvo, *et al.*, 2002).

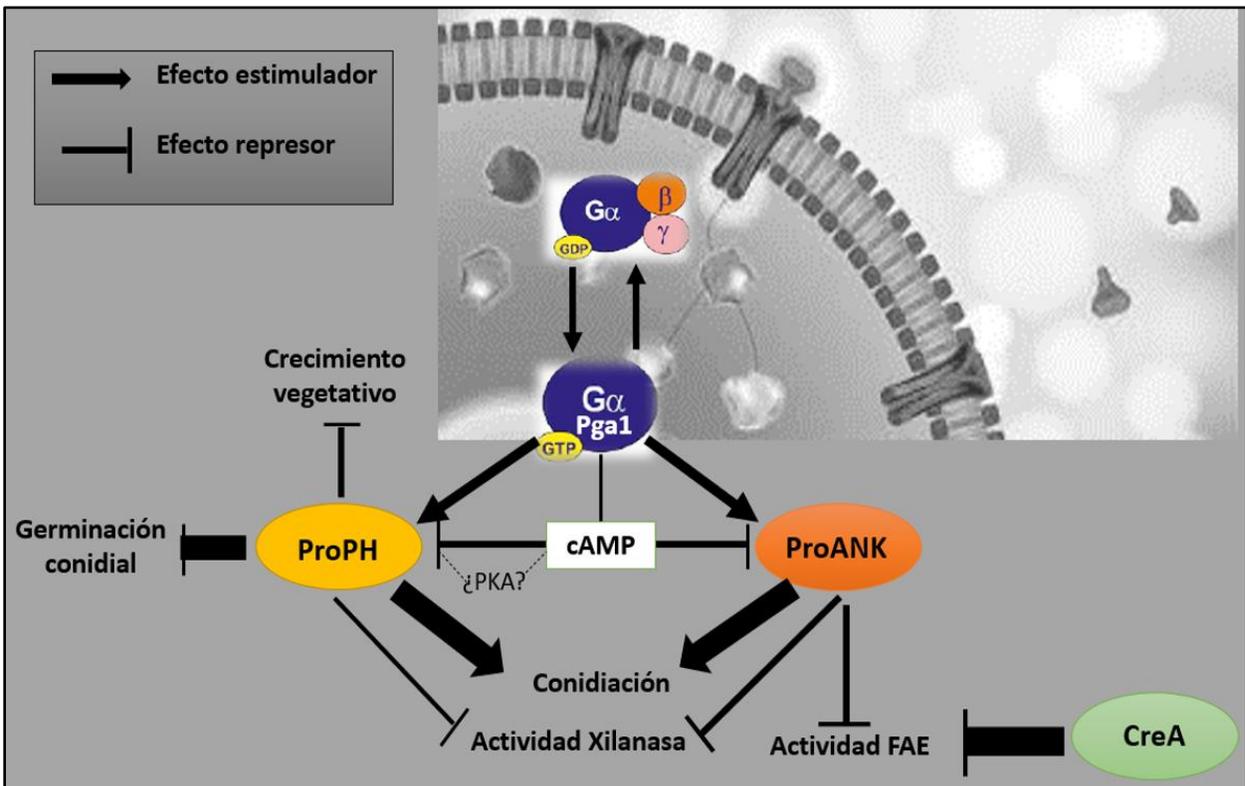
Aunque en la mayoría de especies de hongos estudiados hasta ahora, el efecto de las subunidades G $\alpha$  sobre el crecimiento vegetativo es variable, en *P. rubens* Wis 54-1255 la regulación de Pgal en este proceso es positiva (García RO, Martín, Fierro, 2007; Fierro, Martín, 2008; García RO, Martín, Fierro, 2011). En contraste, se ha demostrado que en esta cepa (*P. rubens* Wis 54-1255) el incremento en los niveles de cAMP conduce a una disminución de la tasa de extensión apical en el hongo. Se considera que la actividad de las subunidades G $\alpha$ i se precisa para mantener una tasa de crecimiento normal (García RO y Fierro, 2017). Esta función se realiza por medio de la regulación de los niveles de cAMP, el cual estimula la acción de una proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PkaA) y con ello, promueve el crecimiento vegetativo en

medio sólido (Shimizu y Keller, 2001). Conforme los resultados expuestos, bajo la actividad natural de Pga1, el cAMP como segundo mensajero de la ruta de señalización obra reprimiendo el efector ProPH y este último participa en el control del crecimiento vegetativo en *P. rubens* Wis 54-1255.

Otro de los efectos observados al atenuar ProPH atendió a la estimulación del proceso germinativo. De lo anterior, se infiere que esta proteína, también actúa como regulador negativo de la germinación de conidios en *P. rubens* Wis 54-1255. La germinación conidial es un proceso secuencial en hongos filamentosos que consta de cuatro etapas: interrupción del estado de latencia, crecimiento isotrópico, establecimiento de un crecimiento polarizado, y alargamiento del tubo germinativo (Wendland, 2001). Este proceso está condicionado entre otros por la presencia de oxígeno, agua, y fuentes de carbono (d" Enfert, 1997). La detección de estas condiciones importantes en la germinación de conidios, se transmite mediante las vías de transducción de señales. En *P. rubens* se ha demostrado que la subunidad del grupo I Pga1 regula positivamente este proceso, y está implicada en un mecanismo sensor temprano que induce la germinación conidial (García RO, Martín y Fierro, 2011). Sin embargo, el accionar de Pga1 no resulta indispensable, lo que implica que vías alternas simultáneamente pueden complementar los efectos de Pga1; pues se ha visto que en cepas delecionadas en Pga1 si bien la germinación se torna más lenta, el proceso germinativo no se encuentra completamente bloqueado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en *A. nidulans* con el estudio de la subunidad GanB del grupo III (Chang *et al.*, 2004). Otros ascomicetos en los cuales las subunidades G $\alpha$  ejercen un efecto positivo sobre la germinación de conidios son: *Penicillium roqueforti*, *Neurospora crassa*, y *Talaromyces marneffeii* (García RO y Fierro, F. 2017). También se ha visto que la señalización de

cAMP participa de manera importante en la germinación de conidias en *A. nidulans*. La ausencia del adenilato ciclasa dio lugar a un retraso evidente en el inicio de la germinación de conidias en este hongo, pese a que no resultó crucial para el desarrollo de este proceso. Sin embargo, en *P. rubens* se desconoce cómo repercute el cAMP sobre la germinación dadas las dificultades experimentales planteadas por algunos autores al inducir el aumento del cAMP intracelular debido a la impermeabilidad de sus conidios a la teofilina (García RO, Martín y Fierro, 2011).

De todo lo anterior, los resultados han demostrado un efecto múltiple del efector ProPH al repercutir en los tres aspectos claves del desarrollo de *P. rubens* que fueron abordados en este trabajo: la conidiación, el crecimiento vegetativo y la germinación conidial. A diferencia de la proteína efectora ProANK, cuyo rol desde la óptica evaluada solo resultaría crucial como modulador del proceso conidiogénico. Todo lo anterior, cuando la subunidad G $\alpha$ i Pga1 se encuentra activa. A través de la figura 34 se esquematiza el rol de ProPH y ProANK en cada uno de los procesos antes mencionados, soportado en efectos inferidos por datos experimentales de este trabajo.



**Figura 34. Modelo de trabajo que muestra los procesos de desarrollo controlados por las proteínas efectoras ProPH y ProANK en *P. rubens* Wis 54-1255.** En las relaciones expuestas el grosor de la línea indica la magnitud del efecto. El modelo incluye efectos inferidos por datos experimentales de este trabajo.

## 8.2 Efecto de la señalización de los efectores ProPH y ProANK de la vía mediada por Pga1, sobre la producción de feruloil esterases en *P. rubens* Wis 54-1255.

Los hongos filamentosos sobresalen como productores de exoenzimas, principalmente enzimas que degradan la pared celular vegetal, entre las que se encuentran: celulasas, xilanasas, y FAEs (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011). Se sabe que la acción sinérgica de todas estas enzimas promueve la degradación completa de la estructura de la pared celular vegetal.

La obtención de FAEs a partir de microorganismos y su aplicación en la bioconversión y valorización de residuos vegetales, ha sido ampliamente estudiada en los últimos años por numerosos autores. La primera de estas enzimas se purificó a partir de la bacteria *Streptomyces olivochromogenes* en 1991 (Faulds, y Williamson, 1991), y desde entonces han sido aisladas y caracterizadas diferentes FAEs de bacterias, plantas, y en mayor grado a partir de hongos. En hongos las FAE predominan en la división Ascomycota (Olivares, *et al.*, 2010). Entre los géneros más estudiados se ubican: *Aspergillus*, *Fusarium*, y *Penicillium*. Algunas de las especies analizadas, y sus respectivas FAE identificadas a la fecha, son: *Aspergillus niger* (FaeA y FaeB), *A. nidulans* (FaeB), *Fusarium oxisporum* (FAE-II), *Penicillium expansum* (FE), y *P. funiculosum* (FAEB), *P. brevicompactum* (FE) (Benoit, I. *et al.*, 2006; Benoit, I. *et al.*, 2008) y *P. rubens* (PcFaeA- PcFaeB). Este último, sobresale como uno de los microorganismos de mayor valor para la industria biotecnológica, y es un reconocido productor de enzimas xilanolíticas (Chavez, Bull y Eyzaguirre, 2006).

Los sistemas de señalización celular más conocidos involucran proteínas sensoras, conocidas como receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Son estos los encargados de detectar señales extracelulares y transmitirlos a las proteínas G, las que, a su vez, regulan los niveles de AMPc por la adenilato ciclasa, y con ello la actividad de proteínas kinasas dependientes de AMPc; así como, de proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK), o la fosfolipasa C (Gutkind, 1998; Ansari *et al.*, 1999; Chen y Thorner, 2007; Rispaill *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2013; Ma y Li, 2013). Las proteínas de senseo detectan una amplia variedad de moléculas, incluidas entre estas moléculas de azúcar y material celulósico (Maller, 2003). Estas señales son transmitidas a las proteínas G heterotriméricas, y conducen a la comunicación de cascadas corriente abajo en

respuesta a los diferentes ligandos, y estimulan diferentes respuestas fisiológicas y / o transcripcionales. Sin embargo, los procesos de señalización que desencadenan las proteínas G son poco conocidas, puesto que no hay reportes claros sobre como estas impactan concretamente la expresión de genes asociados al metabolismo primario y secundario en hongos filamentosos.

Pese a que la información es aún escasa, se tiene evidencia sobre la participación de las proteínas G heterotriméricas en la producción de enzimas extracelulares en hongos filamentosos (Bolker, 1998; Yu, 2006). En *Hypocrea jecorina*, un importante productor industrial de celulasas, se ha demostrado un papel destacado de la subunidad G $\alpha$ i (GNA1) en la apropiación de recursos disponibles a ser utilizados para la formación de biomasa en medio sumergido, y la biosíntesis de enzimas hidrolíticas (Seibel, *et al.*, 2009). En otros organismos como *Stagonospora nodorum*, el estudio del rol de las G $\alpha$ i ha sido particularmente útil, pues se ha identificado que éstas controlan la secreción de proteínas como las despolimerasas, participantes durante su proceso infectivo en plantas de trigo (Tan, *et al.*, 2009). Asimismo, ha sido descrita la participación de las G $\alpha$ i en la regulación de la producción de proteasas extracelulares en *P. camemberti* (García RO, *et al.*, 2017); de proteinasa en *Aspergillus nidulans* (Emri, Szilagyi y Justyak, 2008); así como de enzimas degradadoras de polisacáridos en *P. decumbens* (Hu, *et al.*, 2013).

En este trabajo, a diferencia de los reportes descritos anteriormente, se abordó el papel de efectores que se hallarían aguas abajo en la cascada de señalización mediada por la subunidad alfa de proteínas G (Pga1), en *P. rubens*. En relación a la actividad de las enzimas ligninolíticas ensayadas, los resultados que derivaron de esta investigación mostraron la participación del efector downstream ProPH como regulador negativo de la actividad xilanasa; mientras que ProANK

participa como regulador negativo, tanto de la actividad xilanasa como de la actividad FAE. En el trabajo realizado por Carrasco y colaboradores en 2016 en el que fueron identificados los efectores ProPH y ProANK, se indicó que ProPH se encontraba hiperfosforilada in vivo con cerca de 5 dianas de PKAs activadas posiblemente por AMPc, de un total de once sitios de fosforilación, cerca de 5 corresponderían a dianas de PKAs (Rigbolt y Blagoev, 2012). La proteína ProANK por su parte, presentó un patrón de expresión muy similar a la de la proteína ProPH. Es bien sabido que la fosforilación postraducciona de proteínas puede regular la función de la proteína, el recambio, las interacciones y la transducción de señales intracelulares. En organismos como *Trichoderma reesei* en condiciones de inducción con soforosa se han encontrado hasta 1721 sitios de fosforilación, y las proteínas fosforiladas se involucran principalmente en la transducción de señales (Nguyen *et al.*, 2016). En otros casos, las proteínas en diferentes vías de señalización celular se fosforilan en medios de inducción con polisacáridos como la celulasa, incluidos la adenilato ciclasa, y los componentes proteicos relacionados con las vías de señalización MAPK que desempeñan un rol clave en la transmisión de señales extracelulares. Se ha visto en *T. reesei* que proteínas G pueden detectar y regular la señal inductora del entorno extracelular, mediando la modificación de factores reguladores a través de la vía de PKA aguas abajo, lo que a su vez regula la expresión de genes de celulasa (Zhang *et al.*, 2012). Conforme a los resultados obtenidos, es probable que Pgal en esta ruta regule positivamente los efectores downstream ProPH y ProANK, y que estos a su vez, participen de la regulación negativa de factores de transcripción cruciales en la expresión de los genes xilanasa; y de los genes FAE en el caso de ProANK en *P. rubens*.

Sobresalen los resultados obtenidos para la cepa de *P. rubens* Wis 54-1255 atenuada en el gen *creA* en relación a la actividad FAE. Pese a que este gen no afectó significativamente las

actividades celulasa y xilanasas; sí lo hizo con la actividad FAE, y de manera considerable. Se observó que el silenciamiento del gen *creA* en *P. rubens* provocó un aumento en la actividad FAE hasta en un 40% a las 168 horas del cultivo con relación a la cepa parental. Estos resultados indican que el gen *creA* participa como regulador negativo de la actividad FAE en *P. rubens*. Se ha documentado el rol del gen *creA* como represor por catabolitos de carbono, en hongos filamentosos como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus nidulans*, y *Aspergillus oryzae* (Setälä, *et al.*, 2009; Tamayo, *et al.*, 2008; Ichinose, Tanaka, Shintani y Gomi, 2018). Entre sus funciones, *creA* se destaca como regulador en la expresión de enzimas que derivan del metabolismo de la lignocelulosa. Se ha demostrado una participación importante de *creA* como mediador del gen regulador *xlnR* que controla la producción de enzimas xilanolíticas en *Aspergillus nidulans* (Tamayo, *et al.*, 2008); así como, en *Aspergillus niger* al regular los genes implicados en la degradación del xilano (De Vries, Visser, y De Graaff, 1999). XlnR corresponde a un regulador transcripcional de genes xilanasas, celulasa, y también regula la vía catabólica de la D-xilosa (Hasper *et al.*, 2000; Wagner, *et al.*, 2013). Se sugiere que probablemente el efector ProANK al igual que *creA* podrían mediar como reguladores de XlnR en la producción de enzimas xilanolíticas. Por tanto, a partir de los resultados obtenidos en esta investigación, se propone plantear futuros estudios que conduzcan a verificar el efecto represor de ProANK sobre *xlnR*.

En otros estudios, se ha descrito un estrecho vínculo entre la actividad FAE, los efectos reguladores de *creA*, y la degradación de fuentes de carbono. A altas concentraciones de fuentes de carbono como la xilosa un componente prominente de la lignocelulosa, la expresión de *creA* conduce a efectos represores sobre la expresión de genes feruloil esterasa en *A. niger* (De Vries y Visser, 1999; De Vries *et al.*, 1999). Estudios recientes, han puesto en evidencia que la delección

de los genes *creA* y *creB* implicados en la represión por catabolitos de carbono en *Aspergillus oryzae*, condujo en cepas mutantes a un incremento de hasta 100 veces en la producción de enzimas vinculadas con la degradación de biomasa (alfa amilasas, celulasas, y xilanasas), con respecto a la cepa silvestre (Ichinose, Tanaka, Shintani, y Gomi, 2018). Sin embargo, resulta interesante que los transformantes silenciados en *creA* muestran un incremento en la actividad FAE desde las 120 horas del cultivo, en contraste con los transformantes en ProANK, en los cuales el aumento en la actividad FAE es significativa pasadas las 168 horas del cultivo. Sin embargo, se ha demostrado que la expresión de *xlnR* no resulta suficiente para inducir los genes que conforman en complejo xilanolítico. Al respecto, se tiene evidencia de que el represor por catabolitos de carbono *creA* ejerce un efecto represor indirecto en la transcripción de genes xilanolíticos a través de la represión de *xlnR*. Bajo este contexto, se ha visto que la presencia de moléculas fácilmente asimilables como la glucosa, la cual deriva del metabolismo de fuentes de carbono complejas, tienden a reprimir el promotor del gen *xlnR*. Sin embargo, en cepas mutantes que carecen de la expresión de *creA*, la represión de *xlnR* en estas condiciones es abolida (Tamayo *et al.*, 2008). De lo anterior que *creA* y *xlnR* conforman una cascada transcripcional de regulación para genes xilanolíticos. En consecuencia, resulta probable que, en los transformantes en *creA* abordados en este trabajo, la expresión de genes FAE inicie antes, y estos superen con ventaja los efectos represores ejercidos por este regulador, en contraste con los transformantes en ProANK en los cuales *creA* se halla naturalmente activo.

Por último, es posible que los efectos represores de *creA*, no hallan resultado evidentes frente a la actividad celulasa y xilanasas con las técnicas experimentales empleadas, teniendo en cuenta que los medios de fermentación en sólido utilizados, solo constaban de carboximetil

celulosa y xilano respectivamente, como fuentes de carbono, y carecían de fuentes de carbono fácilmente disponibles como la glucosa, que pudiesen modular las actividades celulasa y xilanas a partir de *creA*, tal y como se ha identificado en algunos casos (Ilyes *et al.*, 2004; Mogensen, Nielsen, Hofmann, Nielsen, 2006).

En este trabajo los resultados para las actividades celulasa, xilanas, y FAE indican que estas estarían siendo reguladas de manera independiente, pese al vínculo en el accionar sinérgico de este tipo de enzimas en la decostrucción de la biomasa ligninolítica. Sin embargo, los hallazgos que derivan de este trabajo investigativo, sugieren la posibilidad de incrementar la expresión génica, y con ello la producción biotecnológica de hemicelulasas como las FAE y las xilanas, mediante el silenciamiento de genes como los codificantes para CreA, los efectores ProPH y ProANK en *P. rubens* Wis 54-1255, de acuerdo con su papel como reguladores negativos en la secreción de las mismas.

### **3.1. Efecto diferencial de la cascarilla de arroz y el xilano sobre la actividad feruloil esterasa en *P. rubens* Wis 54-1255.**

En los hongos filamentosos, los genes que codifican FAEs están regulados por la represión de catabolitos. Este control negativo está mediado por *creA* que reprime a XlnR, un activador transcripcional de genes xilanolíticos (Aro, Pakula, Penttila. 2005; Calero, Hera, Pietro, Orejas, Roncero, 2008; Tamayo *et al.*, 2008). Nuestros resultados mostraron que xilano tuvo un mayor efecto inductor en *faeA* que en *faeB*, durante toda la fermentación. Esta diferencia fue importante a las 24 h. En *Aspergillus niger*, los azúcares como la xilosa y la arabinosa indujeron

diferencialmente la expresión de *faeA* en detrimento de *faeB*, después de unas pocas horas de cultivo (De Vries, Vankuyk, Kester, Visser, 2002). Lo anterior concuerda con lo observado en *P. rubens*, especialmente si consideramos que el producto principal de la hidrólisis de xilano es la xilosa. Además, la concentración de xilosa tiene un impacto en la expresión génica. A bajas concentraciones, la xilosa funciona como inductor y a altas concentraciones como represor, en un mecanismo mediado por *creA* (De Vries, y Visser, 1999; De Vries, Visser, Graaff. 1999). Este comportamiento explicaría la disminución que se observó en la transcripción de *faeA* después de 48 h, ya que podría obedecer al aumento de xilosa, debido a la actividad hidrolítica. Por su parte, el gen *faeB* es inducido por la presencia de compuestos aromáticos como el ácido ferúlico, en *A. niger* (Dilokpimol *et al.*, 2017). Por lo tanto, en presencia de polisacáridos complejos, la expresión del gen *faeA* condujo a la liberación de estos compuestos aromáticos específicos, estimulando la expresión de *faeB*.

En este trabajo adicionalmente, informamos el efecto nulo de la cáscara de arroz en la transcripción de genes que codifican enzimas feruloil esterasa. En sustratos naturales, las hemicelulosas son químicamente muy variables. En particular, los arabinoxilanos de las cáscaras de cereales se describen como los más lignificados, con mayor diversidad de cadenas laterales y, en ocasiones, insolubles en agua (Saulnier, Sado, Branlard, Charmet, Guillon, 2007; Bastos, Coelho, Coimbra, 2018). Esto permite suponer que algunos componentes como el xilano y el ácido ferúlico pueden ser inaccesibles para operar como inductores en la expresión génica. Finalmente, se debe considerar la posible generación de compuestos inhibidores durante el pretratamiento de la cáscara de arroz. En el pretratamiento con vapor, la degradación parcial de la hemicelulosa puede conducir a la generación de compuestos tóxicos como los derivados del furano (furfural y

5-hidroxiacetilfurfural) que afectan la actividad enzimática (Palmqvist, Hahn, 2000; Alvira, Pejón, Ballesteros, 2010).

Soportado en este estudio y en los resultados que derivan del mismo, se cuenta con nuevos conocimientos que dan lugar a ampliar la comprensión sobre la forma en que los efectores participes de las vías de señalización mediadas por proteínas G heterotriméricas repercuten sobre importantes procesos del desarrollo morfo-fisiológico en hongos filamentosos. En particular, en *P. rubens* estos hallazgos contribuyen a mejorar su desempeño y viabilidad en importantes procesos de interés industrial y biotecnológico, en los que el conocimiento a profundidad de los aspectos asociados con su crecimiento y desarrollo, resultan cruciales para aumentar su desempeño in vitro y a gran escala. De manera especial, este estudio constituye un aporte para el área biotecnológica, en la que el papel de las vías de señalización en la secreción de enzimas de gran interés industrial como las FAEs, no se encontraba documentado hasta hoy. De este modo, se abre paso a la posibilidad de implementar nuevas estrategias desde el ámbito de la biología molecular, que conduzcan a producir con mayor eficiencia estos metabolitos.

## 9. CONCLUSIONES

Las proteínas efectoras ProPH y ProANK regulan positivamente la conidiación en *P. rubens*; con efectos marcados en medios nutricionalmente complejos.

La proteína ProPH participa en la regulación negativa del proceso germinativo y del crecimiento vegetativo en *P. rubens*.

Los efectores ProPH y ProANK actúan como reguladores negativos de la actividad xilanasas; pero no presentan efectos significativos sobre la actividad celulasa en *P. rubens*.

La proteína efectora ProANK regula negativamente la actividad FAE en *P. rubens* pasadas las 168 horas del cultivo; mientras que ProPH no presenta un efecto significativo sobre dicha actividad enzimática.

El modulador transcripcional *creA*, regula negativamente la actividad FAE. Sin embargo, no ejerce un efecto significativo sobre las actividades celulasa y xilanasas en *P. rubens*.

El xilano como sustrato presenta un efecto inductor sobre la expresión de los genes feruloil esterasa *faeA* y *faeB*. Entre tanto, la cascarilla de arroz como sustrato no resultó funcional como inductor de la actividad FAE en *P. rubens* Wis 54-1255.

## 10. RECOMENDACIONES

Las rutas de transducción de señales de las proteínas G heterotriméricas, implican diversos mediadores (efectores y reguladores) y factores de transcripción que aún permanecen desconocidos en *P. rubens*. En esta investigación se ha avanzado, y se proporciona información sobre la función de dos efectores downstream de la ruta de transducción mediada por Pga1 y sus efectos reguladores sobre la morfología y la producción de metabolitos de interés biotecnológico como son las enzimas ligninolíticas. Sobre esta base, los resultados obtenidos, constituyen alternativas que bien pueden conducir a mejorar en mayor escala, la producción de celulasas, xilanasas y FAEs; considerando además en este proceso la participación de reguladores transcripcionales como el gen *creA* en *P. rubens*. Sobre esta base, explorar la posibilidad de aumentar la producción de estas enzimas lignocelulolíticas a través del silenciamiento dirigido de estos genes constituye una posibilidad promisoría para la producción de estas enzimas con resultados mejorados.

Finalmente, estudiar los efectos morfofisiológicos de transformantes silenciados simultáneamente en Pga1 y en los efectores ProPH y ProANK respectivamente; conducirán a comprender en mayor grado, la regulación de cada uno de éstos en la cascada de señalización que deriva de las proteínas G heterotriméricas en *P. rubens*.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
- Alvira, E. Pejón T, M. Ballesteros, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology.* 101: 4851–4861.
- Anné, J. (1977). Somatic hybridization between *Penicillium chrysogenum* species after induced fusion of their protoplasts. *Agricultura.* 1–17.
- Ansari, K., Martin, S., Farkasovsky, M., Ehbrecht, I.M., Kuntzel, H., (1999). Phospholipase C binds to the receptor-like GPR1 protein and controls pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274: 30052–30058.
- Aro N, Pakula T, Penttila M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews.* 29: 719–739.
- Bastos R, Coelho E, Coimbra M. (2018). Arabinoxylans from cereal by-products: Insights into structural features, recovery, and applications. *Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products.* 227-251.
- Benoit, I. *et al.* (2006). Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydrate Research.* 341: 1820–1827.
- Benoit, I. *et al.* (2008). Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnology Letters.* 30: 387–396.
- Boase, N. y Kelly, J. (2004). A role for *creD*, a carbon catabolite repression gene from *A. nidulans*,

- in ubiquitination, *Mol. Microbiol.* 53: 929-940.
- Bohacz, J. (2016). Lignocellulose-degrading enzymes, free-radical transformations during composting of lignocellulosic waste and biothermal phases in small-scale reactors. *Sci Total Environ.* STOTEN-21542; 11.
- Böhm J, Hoff B, O'Gorman CM, Wolfers S, Klix V, Binger D, Zadra I,... Kück U\_(2013). Sexual reproduction and mating-type- mediated strain development in the penicillin- producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 1476- 1481.
- Bohn, J. *et al.*, (2013). Sexual reproduction and mating-type- mediated strain development in the penicillin- producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 110: 1476- 1481.
- Bolker, M. (1998). Sex and Crime: Heterotrimeric G Proteins in Fungal Mating and Pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology.* 25:143–156.
- Bonnin, E. *et al.* (2002). Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger* I-1472. *Enzyme and Microbial Technology.* 31: 1000–1005.
- Boudreau, B.; Larson, T.; Brown, D.; Busman, M; Roberts, E.; Kendra, D.; Mcquade, K. (2013). Impact of temperature stress and validamycin A on compatible solutes and fumonisin production in *F. verticillioides*: Role of trehalose-6-phosphate synthase. *Fungal Genetics and Biology.* 57: 1–10.
- Braga CMP, Delabona P da S, Lima DJ da S, Paixão DAA, Pradella JG da C y Farinas CS. (2014). Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site improves sugarcane bagasse hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 170: 316-324.

- Brodhagen, M y Keller, N. (2006). Signalling oathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Molecular Plant Pathology*. 7: 285-301.
- Cabañes, F. Bragulat, Y M. Castellá. (2010). Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins*. 2: 1111-1120.
- Cabral, C., deFreitas, C., Fanchini, C., de Almeida, A., y Cano, E. (2018). Agroindustrial biomass for xylanase production by *Penicillium chrysogenum*: Purification, biochemical properties and hydrolysis of hemicelluloses. *Electronic Journal of Biotechnology*. 33: 39-45.
- Calero F, Hera C, Pietro AD, Orejas M, Roncero MIG. (2008). Regulatory elements mediating expression of xylanase genes in *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol*. 45: 28-34.
- Calvo A Wilson R; Bok J; y Keller N. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66:447-459.
- Calvo, Am; Wilson, Ra; Bok, Jw Y Keller Np. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66: 447-459.
- Cantoral, J.M., Díez, B., Barredo, J.L., Alvarez, E., and Martín, J.F. (1987). High-Frequency Transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Nat. Biotechnol*. 5: 494-497.
- Carrasco, U; Vera, R; Barkla, B; Zuñiga, E; Reyes, H; Fernandez, F; y Fierro, F. (2016). Proteomic analysis of the signaling pathway mediated by the heterotrimeric Ga protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum*. *Microbial Cell Factories*. 16: 173.
- Carrasco, U; Vera, R; Barkla, B; Zuñiga, E; Reyes, H; Fernandez, F; Y Fierro, F. (2016). Proteomic analysis of the signaling pathway mediated by the heterotrimeric Ga protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum*. *Microbial Cell Factories*. 16:173.
- Cepeda-García C, Domínguez-Santos R, García-Rico R, García-Estrada C, Cajiao A, *et al.*, (2014).

- Direct involvement of the CreA transcription factor in penicillin biosynthesis and expression of the *pcbAB* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98:7113-7124.
- Cepeda-García C, Domínguez-Santos R, García-Rico RO, García-Estrada C, Cajiao A, Fierro F, Martín JF. (2014). Direct involvement of the CreA transcription factor in penicillin biosynthesis and expression of the *pcbAB* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 7113–7124.
- Chavez R, Bull P, Eyzaguirre J. (2006). The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *J. Biotechnol.* 123: 413–433.
- Crepin, V. Faulds, C. Y Connerton, I. (2004). Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 63: 647-652.
- d'enfert. C. (1997). Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology.* 21: 163.172.
- Dahlmann, T., Bohm, J., Becker, K., Y Kuck, U. (2015). Sexual recombination as a tool for engineering industrial *Penicillium chrysogenum* strains. *Current Genetics.* 61: 679- 683.
- Damásio, A.R.L., Braga, C.M.P., Brenelli, L.B., Citadini, A.P., Mandelli, F., Cota, J., De Almeida, R.F., Salvador, V.H., *et al.*, (2013). Biomass-to-bio-products application of feruloyl esterase from *Aspergillus clavatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 97: 6759–6767.
- De Vries R, Vankuyk P, Kester H, Visser J. (1999). The *Aspergillus niger* *faeB* gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *Biochem. J.* 363: 377–386.
- De Vries R, Vankuyk P, Kester H, Visser J. (2002). The *Aspergillus niger* *faeB* gene encodes a

- second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *Biochem. J.* 363: 377–386.
- De Vries R, Visser J, Graaff L. (1999). CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res. Microbiol.* 150: 281–285.
- Degani, O. (2013). *Cochliobolus heterostrophus* G-Protein Alpha and Beta Subunit Double Mutant Reveals Shared and Distinct Roles in Development and Virulence. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 82: 35-45.
- Delgado, M. *et al.* (2012). Arabidopsis Heterotrimeric G protein regulates cell wall defense and resistance to necrotrophic fungi. *Molecular plant.* 5: 98-114.
- Dey, Tapati *et al.*, (2016). Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends in food science and Technology.* 53: 60-74.
- Dilokpimol A, Mäkelä M, Mansouri S, Belova O, Waterstraat M, Bunzel M, et al. (2017). Expanding the feruloyl esterase gene family of *Aspergillus niger* by characterization of a feruloyl esterase, FaeC. *N Biotechnol.* 37:200-209.
- Dilokpimol, A. *et al.* (2016). Diversity of fungal feruloyl esterases: updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications. *Biotechnology for Biofuels.* 9:231.
- Domínguez-Santos R, García-Estrada C, Kosalková K, Prieto C, Santamarta I, Martín JF. (2015). PcFKH1, a novel regulatory factor from the forkhead family, controls the biosynthesis of penicillin in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie.* 115:162-176.
- Domínguez-Santos R, Martín JF, Kosalková K, Prieto C, Ullán RV, García-Estrada C. (2012). The regulatory factor PcRFX1 controls the expression of the three genes of  $\beta$ -lactam biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet Biol.* 49(11):866-81.

- Donaghy, J.A., and McKay, A.M. (1994). Novel screening assay for the detection of phenolic acid esterases. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 41–44.
- Dowzer, C. y Kelly, J.M. (1991). Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*, *Mol. Cell. Biol.* 11: 5701-5709.
- Duran, R; Cary, J. Y Calvo, A. (2010). Role of the Osmotic Stress Regulatory Pathway in Morphogenesis and Secondary Metabolism in Filamentous Fungi. *Toxins.* 2: 367-381.
- Emri, T; Szilagyi, M; Justy, A; y Pocsi, (2008). I. Heterotrimeric G protein mediated regulation of proteinase production in *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiologica e Immunologica Hungarica.* 55: 111- 117.
- Emri, T; Szilagyi, M; Justy, A; Y Pocsi, I. (2008). Heterotrimeric G protein mediated regulation of proteinase production in *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiologica e Immunologica Hungarica.* 55: 111- 117.
- Faulds, C. Y Williamson, G. (1991). The purification and characterization of 4- hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*. *Journal of General Microbiology.* 137: 2339- 2345.
- Faulds, C. Y Williamson, G. (1991). The purification and characterization of 4- hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*. *Journal of General Microbiology.* 137: 2339- 2345.
- Fazary, A. y Ju, Y. (2007). Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives. En: *Acta Biochim. Biophys.* 39: 811-828.
- Fazary, A. Y Ju, Yi-Hsu. (2008). The large- scale use of feruloyl esterases in industry. En: *Biotechnology and Molecular Biology Reviews.* 3: 95-110.
- Fierro F, Laicha F, García, R, Martín F. (2004). High efficiency transformation of *Penicillium*

- nalgiovense* with integrative and autonomously replicating plasmids. *International Journal of Food Microbiology*. 90: 237 – 248.
- Fortwendel, JR. (2015). Orchestration of morphogenesis in filamentous fungi: Conserved roles for ras signaling networks. *Fungal Biology Reviews*. 29: 54–62.
- García L. (2018). Búsqueda de nuevas feruloil esterasas fúngicas con aplicaciones biotecnológicas. Universidad de León.
- García, R.O, Martín, J., y Fierro, F. (2011). Heterotrimeric G $\alpha$  protein Pga1 from *Penicillium chrysogenum* triggers germination in response to carbon sources and affects negatively resistance to different stress conditions. *Fungal Genetics and Biology*. 48: 641–649.
- García, R.O. Chávez, R. Fierro, F; y Martín, J. (2009). Effect of a heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunit on *Conidia* Germination, Stress Response, and Roquefortine C Production in *Penicillium roqueforti*. *International Mycology*. 12: 123-129.
- García, R.O. *et al.* (2017). Heterotrimeric G protein alpha subunit controls growth, stress response, extracellular protease activity, and cyclopiazonic acid production in *Penicillium camemberti*. En: *Fungal biology*. 121: 754 -762.
- García, R.O. y Fierro, F. (2017). Papel de las subunidades alfa de proteínas G en los procesos morfogénicos de hongos filamentosos de la división Ascomycota. En: *Revista Iberoamericana de Micología*. 34: 1–9.
- García, RO. *et al.* (2008). The heterotrimeric G alpha protein pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. En: *Microbiology*. 154: 3567-3578.
- García, Ro., Martín, J., Fierro, F. (2007). The pga1 gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development.

- Research in Microbiology. 158: 437- 446.
- García-Torres, I., Cervantes-López, M., Ortega-Arellano, A., Hernández-Alcántara, G., Flores-López, L., De la Mora-De la Mora, J., *et al.*, (2020). Proteínas con repeticiones de anquirina: estructura, función y retos bioquímicos. *Mens. Bioquim.* 44: 38-53.
- Gil-Duran, C *et al.* (2014). The *pcz1* Gene, which Encodes a Zn (II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>Protein, Is Involved in the Control of Growth, Conidiation, and Conidial Germination in the Filamentous Fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS One.* 10: 1-17.
- Golapan N, Rodríguez D, Saucedo G, Nampoothiri KM. (2015). Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresour Technol.* 193: 534-44.
- Golapan, N. *et al.* (2016). Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresource Technology.* 193: 534–544.
- Goufo P, Ferreirab L, Trindadea H, Rosa E. (2015). Distribution of antioxidant compounds in the grain of the Mediterranean rice variety ‘Ariete’. *CyTA - Journal of Food.* 13:140–150.
- Greenwald CJ. *et al.* (2010). Temporal and spatial regulation of gene expression during asexual development of *Neurospora crassa*. *Genetics.* 186: 1217–30.
- Gronover, S; Tudzynski, P; Tudzynski, B. (2001). The role of G protein alpha subunit in the infection process of the of the gray mold fungus *Botrytis cinérea*. *MPMI.* 149: 1293-1302.
- Gummer, J. *et al.* (2012). A comparative analysis of the heterotrimeric G- protein Ga, Gb, and Gy subunits in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *BMC Microbiology.* 12: 131.
- Gummer, J. *et al.* (2012). A comparative analysis of the heterotrimeric G- protein Ga, Gb, and Gy subunits in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *BMC Microbiology.* 12: 131.
- Gutkind, J.S., (1998). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through

- divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 273: 1839–1842.
- Guzman, C. *et al.*, (2017). Mechanism and regulation of sorbicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *Microbial Biotechnology.* 10: 958-968.
- Guzmán, F, Salo O, Nygård Y, Lankhorst PP, Bovenberg RAL, Driessen AJM. (2017). Mechanism and regulation of sorbicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *Microbial Biotechnology.* 10: 958-968.
- Hagiwara, D; Suzuki, S; Kamei, K; Gonoï, T; Kawamoto. (2014). The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology.* 73: 138–149.
- Harispe L, Portela C, Scazzocchio C, Penalva MA, y Gorfinkiel L. (2008). Ras GTPase-activating protein regulation of actin cytoskeleton and hyphal polarity in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell.* 7: 141–53.
- Hartmann, T. *et al.* (2011). Shaping the fungal adaptome – Stress responses of *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Medical Microbiology.* 30: 408–416.
- Hasper A, Visser J. y de Graaff L. (2000). The *Aspergillus niger* transcriptional activator XlnR which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose also regulates D-xylose reductase gene expresión. *Mol Microbiol.* 36:193-200.
- Hewavitharana, T. y Wedegaertner, P. (2012). Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins. *Cellular Signalling.* 24: 25–34.
- Hidalgo, P. *et al.*, (2014). Molecular characterization of the PR- toxin gen cluster in *Penicillium roqueforti* y *Penicillium chrysogenum*: cross talk of secondary metabolite pathways. *Fungal Genetics and Biology.* 62: 11-24.
- Houbraken, J. *et al.* (2011). Fleming’s penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum*

- but *P. rubens*. IMA Fungus. 2: 87–95.
- HU, Y *et al.* (2013). G protein-cAMP signaling pathway mediated by PGA3 plays different roles in regulating the expressions of amylases and cellulases in *Penicillium decumbens*. Fungal Genetics and Biology. 58–59: 62–70.
- Hu, Y *et al.* (2013). G protein-cAMP signaling pathway mediated by PGA3 plays different roles in regulating the expressions of amylases and cellulases in *Penicillium decumbens*. Fungal Genetics and Biology. 58–59: 62–70.
- Ichinose, S. Tanaka, M. Shintani, T. y Gomi K. (2018). Increased production of biomass-degrading enzymes by double deletion of creA and creB genes involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus oryzae*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 125: 141-147.
- IGAC (Instituto Geográfico Agustín Codazzi). (2006). Métodos analíticos de laboratorio de suelos. Sexta edición. Imprenta Nacional de Colombia. Bogotá. 648 p.
- Ilyes H, Fekete E, Karaffa L, Fekete E, Sandor E, Szentirmai A, Kubicek C. (2004). CreA-mediated carbon catabolite repression of b-galactosidase formation in *Aspergillus nidulans* is growth rate dependent. FEMS Microbiology Letters. 235:147–151.
- Ivey, FD; Kays, AM; Borkovich, K. (2002). Shared and independent roles for a Gai protein and adenylyl cyclase in regulating development and stress responses in *Neurospora crassa*. Eukaryotic Cell. 1: 634-642.
- Jaronski, S.T., (2010). Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. Biocontrol 55: 159–185.
- Jiping M, Song S, Xiuquan J, Fei X, Hong M, Jin G, Jie X. (2019). Advances in catalytic conversion of lignocellulose to chemicals and liquid fuels. J. Energy Chem. 36: 74-86.

- Kalai, S. Anzala, L; Bensoussan, M. Y Dantigny, P. (2017). Modelling the effect of temperatura, pH, Water activity, and organic acids on the germination time of *Penicill.*; Europe PMC plus. 240: 124-130.
- Kalim, B y Mazhar, N., (2016). Optimization of fermentation media and growth conditions for microbial xylanase production. 3 Biotech, 6:122.
- Kelly, J.M. (2004). The regulation of carbon metabolism in filamentous fungi, in: R. Brambl and G.A. Marzulf (Eds.), *Mycota III*, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlagpp, pp 385-401.
- Khan, S.M., Sleno, R., Gora, S., Zylbergold, P., Laverdure, J.-P., Labbe, J.-C., et al., (2013). The expanding roles of G $\beta\gamma$  subunits in G protein-coupled receptor signalling and drug action. *Pharmacol. Rev.* 65: 545–577.
- Khodor, S. *et al.* (2010). Ankyrin-repeat containing proteins of microbes: a conserved structure with functional diversity. *Trends in Microbiology.* 18: 132–139.
- Kobayashi, Y. Horikoshi, Y. (1982). Purification and characterization of extracellular porlyamine oxidase produced by *Penicillium sp.* *Biochimica et Biophysica Acta.* 1.
- Koseki, T., Fushinobu, S., Ardiansyah; Shirakawa, H; y Komai, M. (2009). Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 84: 803–810.
- Kostylev, Otwell, Richardson, y Suzuki., (2015). Cloning Should Be Simple: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. 8;10(9): e0137466.
- Krijgheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology,* 74(1): 1–29.
- Krittikorn, K., Surasak J, Suganya Y, y Thanat Chookajorn., (2011). Characterization of band 3-

- ankyrin-Protein 4.2 complex by biochemical and mass spectrometry approaches. *Biochem Biophys Res Commun.* 406(3):332-5.
- Lafon, A; Hoon, K; Seo, J; Yu, J; y Enfert, C. (2006). G-protein and cAMP-mediated signaling in *Aspergilli*: A genomic perspective. *Fungal Genetics and Biology.* 43: 490–502.
- Landry, B; Clarke, D y Lee, M. (2016). Studying Cellular Signal Transduction with OMIC Technologies. *Journal of Molecular Biology.* 427: 3416–3440.
- Leiter, E. *et al.*, (2004). *Penicillium chrysogenum* glucose oxidase- a study on its antifungal effects. *Journal of Applied Microbiology.* 97: 1201-1209.
- Li L; Wright SJ; Krystofova S; Park, y Borkovich KA. (2007). Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. En: *Annual Review of Microbiology.* 61: 423–52.
- Li, J; Mahajan, A; Y Tsai, Md. (2006). Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry.* 26: 15168-78.
- López, A. Ramirez, L. Rivero, L. Zapata, T. Y Ullán, V. (2011). Aplicación de una nueva FAE en la liberación químico- enzimática de ácido ferúlico a partir de pulpa de remolacha. *Revista de Investigaciones de la facultad de Ciencias Agrarias.* 19: 21-25.
- López, K. (2012). Caracterización de la actividad feruloil esterasa en cepas de *Penicillium chrysogenum* y escalado semi-industrial de la producción en el instituto de biotecnología de León (INBIOTEC), España. Trabajo de grado (Microbiología). Universidad de Pamplona.
- Lozano, O. Rodríguez, D. Bernáldez, V; Córdoba, J; Rodríguez, M. (2013). Influence of temperature and substrate conditions on the omt-1 gene expression of *Aspergillus parasiticus* in relation to its aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology.* 166: 263–269.

- Luengo, J.M., Revilla, G., Villanueva, J.R., and Martín, J.F. (1979). Lysine regulation of penicillin biosynthesis in low-producing and industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.* 115: 207–211.
- Luo, J., Ding, J., Wei, G., Zheng, T., Y Luo, Z. (2014). Characterization of a formaldehyde degrading fungus *Penicillium chrysogenum* DY-F2 isolated from deep sea sediment. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 89: 45-49.
- Luo, J., Ding, J., Wei, G., Zheng, T., Y Luo, Z. (2014). Characterization of a formaldehyde degrading fungus *Penicillium chrysogenum* DY-F2 isolated from deep sea sediment. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 89: 45-49.
- M. Wang, J.P. Ma, H.F. Liu, N.C. Luo, Z.T. Zhao, F. Wang. (2018). Sustainable Productions of Organic Acids and Their Derivatives from Biomass via Selective Oxidative Cleavage of C–C Bond. *ACS Catal.* 8(3): 2129–2165.
- Ma, D., Li, R., (2013). Current understanding of HOG-MAPK pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia.* 175: 13–23.
- Mah, J. H., & Yu, J. H. (2006). Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 5(10): 1585–1595.
- Maller, J.L., (2003). Signal transduction. Fishing at the cell surface. *Science.* 300: 594–595.
- Marx F, Binder U, Leiter E, y Pócsi I. (2008). The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 65: 445-54.
- Marx, F. *et al.*, (2008). *The Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 65: 445-54.

- Matishuba, V; Kremnický L, Mastihubová M, Willett, J y Cote G. (2002). A spectrophotometric assay for feruloyl esterases. *Analytical Biochemistry*. 309: 96–101.
- Michkov, W. *et al.* (2012). Genetic and physical interactions between G $\alpha$  subunits and components of the G $\beta\gamma$  dimer of heterotrimeric G proteins in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*. 11: 1239–48.
- Miller, L. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor; New York. ISBN 10: 0879691069.
- Minh D, N; Kim, H. y Chung, KA. (2015). Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *En: European Journal of Pharmacology*. 763: 214–222.
- Mogensen J, Nielsen B, Hofmann G, Nielsen J. (2006). Transcription analysis using high-density micro-arrays of *Aspergillus nidulans* wild-type and creA mutant during growth on glucose or ethanol. *Fungal Genetics and Biology*. 43:593–603.
- Nguyen, E.V., Imanishi, S.Y., Haapaniemi, P., Yadav, A., Saloheimo, M., Corthals, G.L., Pakula, T., (2016). Quantitative site-specific phosphoproteomics of *Trichoderma reesei* signaling pathways upon induction of hydrolytic enzyme production. *J. Proteome Res.* 15 (2): 457–467.
- Nishimura A1, Kitano K, Takasaki J, Taniguchi M, Mizuno N, Tago K, Hakoshima T, *et al.*, (2010). Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci.*107(31), 13666-71.
- Núñez, D. (2012). Uso de residuos agrícolas para la producción de biocombustibles en el departamento del Meta. *Tecnura*. 16: 142-156.
- Offermanns S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol*. 83(2): 101-30.

- Oldham *et al.* (2007). Allosteric connections from the receptor to the nucleotide binding pocket of heterotrimeric G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 7927-7932.
- Oldham *et al.* (2007). Allosteric connections from the receptor to the nucleotide binding pocket of heterotrimeric G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 7927-7932.
- Olivares, H. *et al.* (2010). Combining substrate specificity analysis with support vector classifiers reveals feruloyl esterase as a phylogenetically informative protein group. *PLoS ONE*. 5: e12781.
- Oliveira, D. *et al.*, (2019). Feruloyl esterases: Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production of bioactive compounds. *Bioresource Technology*. 278: 408–423.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2005. *Manual De Bioseguridad En El Laboratorio*. Tercera edición. ISBN 92 4 354650 3.
- Oshikata, C. *et al.* (2017). Allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Penicillium luteum*. *Medical Mycology Case Reports*. 15: 9-11.
- Palmqvist, E., Hahn, H B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74: 25–33.
- Park, H; y Yu H. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*. 15: 669–77.
- Peña A, y Contreras-Esquivel Juan Carlos. (2016). Methods and substrates for feruloyl esterase activity detection, a review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 130: 74-87.
- Pontón, J. Quindós, G., Morangues, M., Gené, J., Y Guarro, J. (2002). Hongos y Actinomicetos alérgicos. *Revista Iberoamericana de Micología*. Bilbao.

- Quiroz-Castañeda, R.E., and Folch-Mallol, J.L. (2011). Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. *Biotechnol. Appl.* 28: 205–215.
- Rabemanolontsoa, H., Saka, S. (2016). Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresour. Technol.* 199: 83–91.
- Reithner B, Brunner K, Schuhmacher R, Peissl I, Seidl V, *et al.* (2005). The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genetics and Biology.* 42: 749–760.
- Rigbolt, Kt, Y Blagoev, B. (2012). Quantitative phosphoproteomics to characterize signaling networks. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 23: 863-871.
- Rispail, N., Soanes, D.M., Ant, C., Czajkowski, R., Grunler, A., Huguet, R., *et al.*, (2009). Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* 46: 287–298.
- Rodríguez, R. (2017). Identificación y caracterización de las enzimas feruloil esterasas PcFaeA y PcFaeB de *Penicillium chrysogenum* para la valoración de residuos agroindustriales. Scalado y análisis proteómico de la producción de extractor enzimático enriquecidos en PcFaeB. León España. Universidad de León- Instituto de Biotecnología de León.
- Sakamoto T, Nishimura S, Kato T, Sunagawa Y, Tsuchiyama M, Kawasaki H. (2005). Efficient Extraction of Ferulic Acid from Sugar Beet Pulp Using the Culture Supernatant of *Penicillium chrysogenum*. *J. Appl Glycosci.* 52:115-120.
- Santo, M Y Ishikawa, Y. (2010). Accessory proteins for heterotrimeric G-protein: Implication in the cardiovascular system. *Pathophysiology.* 17: 89–99.
- Santos, R. *et al.* (2017). Casein phosphopeptides and CIC12 increase penicillim production and cause an increment in microbody/ peroxisime proteins in *Penicillium chrysogenum*.

- Journal of proteomics. 156: 52-62.
- Saulnier, L., Sado, P.-E., Branlard, G., Charmet, G., Guillon, F. (2007). Wheat arabinoxylans: exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *J Cereal Sci.* 46: 261-281.
- Schaafsma, D. *et al.* (2008). Monomeric G-proteins as signal transducers in airway physiology and pathophysiology. *Cellular Signalling.* 20: 1705–1714.
- Scheffzek, K., y Weltl, S. (2012). Pleckstrin homology (PH) like domains – versatile modules in protein–protein interaction platforms. *FEBS Letters.* 586: 2662–2673.
- Segers, GC. y Nuss, DL. (2003). Constitutively activated Ga negatively regulates virulence, reproduction and hydrophobin gene expression in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genetics and Biology.* 38: 198-208.
- Seibel, C. *et al.* (2009). Light- dependent roles of the G-protein  $\alpha$  subunit GNA1 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*). *BMC Biology.* 7:58.
- Setälä, T. *et al.* (2009). Genetic Modification of Carbon Catabolite Repression in *Trichoderma reesei* for Improved Protein Production. *Applied and Environmental Microbiology.* 75: 4853–4860.
- Shimizu K y Keller N., (2001). Genetic involvement of a Camp – DEPENDENT Protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 157:591-600.
- Shpakov, O. (2013). Heterotrimeric G Proteins. *Brenner's Encyclopedia of Genetics; Second Edition,* 454-456.
- Shwab, E. Y Keller, N. (2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research.* 112: 225-230.

- Smith, G. (1960). An introduction to industrial mycology. Edward Arnold Ltd; London.  
B001SJLPK6.
- Sondek, J. *et al.* (1996). Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature*. 25: 369-374.
- Studt, L. Humpf, H. y Tudzynski, B. (2013). Signaling Governed by G Proteins and cAMP Is Crucial for Growth, Secondary Metabolism and Sexual Development in *Fusarium fujikuroi*. *PLOS ONE*. 8, e58185.
- Svanström, A. Y Melin, P. (2013). Intracellular trehalase activity is required for development, germination and heat-stress resistance of *Aspergillus niger* conidia. *Research in Microbiology*, 164: 91-99.
- Syrovatkina, V. *et al.* (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of Molecular Biology*. 428: 3850–3868.
- Tag, A; Hicks, J; Garifullina, G; Ake, C; Phillips, D; Beremand, M; Y Keller, N. (2000). G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Molecular Microbiology*. 38: 658-665.
- Tamayo EN, Villanueva A, Hasper AA, de Graaff LH, Ramón D, Orejas M. (2008). CreA mediates repression of the regulatory gene xlnR which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*. 45:984-93.
- Tan, K; Heazlewood, J; Millar, A.; Oliver, R.; Solomon, P. (2009). Proteomic Identification of Extracellular Proteins Regulated by the Gna1 Gα Subunit in *Stagonospora nodorum*. *Mycological Search*. 113: 523–531.
- Tan, K; Heazlewood, J; Millar, A.; Oliver, R.; Solomon, P. (2009). Proteomic Identification of Extracellular Proteins Regulated by the Gna1 Gα Subunit in *Stagonospora nodorum*.

- Mycological Search. 113: 523–531.
- Taylor, T; Krings, M; y Taylor, E. (2015). Ascomycota. Fossil Fungi. 129-171.
- Tisch, D; Kubicek, C; y Schmoll, M. (2011). New insights into the mechanism of light modulated signaling by heterotrimeric G-proteins: ENVOY acts on *gna1* and *gna3* and adjusts cAMP levels in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). Fungal Genetics and Biology. 48: 631–640.
- Topaka, E. Vafiadi, C. Y Chistakopoulos, P. (2007). Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochemistry*. 42: 497–509.
- Uda, S y Kuroda, S. (2016). Analysis of cellular signal transduction from an information theoretic approach. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 51: 24–31.
- Udatha, D *et al.*, (2011). The interplay of descriptor- based computational analysis with pharmacophore modeling builds the basis for a novel classification scheme for feruloyl esterases. *Biotechnology Advances*. 29: 94-110.
- Ullah S, Souza A, Hamann P, Ticona A, Oliveira G, Barbosa J, Freitas S, y Noronha E. (2019). Structural and functional characterisation of xylanase purified from *Penicillium chrysogenum* produced in response to raw agricultural waste. *International Journal of Biological Macromolecules*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 127: (15), 385-395
- Ullan, R. *et al.* RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: Validation studies using  $\beta$ -lactam genes expression. (2008). *RNA Journal of Microbiological Methods*. 75: 209–218.
- Valle, M *et al.* (2015). Phylogenetic analysis of fungal heterotrimeric G protein-encoding genes and their expression during dimorphism in *Mucor circinelloides*. *Fungal biology*. 119:

1179 – 1193.

- Villapun, P. Solano, R. Sierra, y C. Sanchez, M. (2005). Importancia de las proteínas G heterotriméricas en la biología molecular del cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas*. 29: 948-954.
- Wagner Rodrigo de Souza *et al.*, (2013). The influence of *Aspergillus niger* transcription factors AraR and XlnR in the gene expression during growth in D-xylose, L-arabinose and steam-exploded sugarcane bagasse. *Fungal Genetics and Biology*. 60: 29-45.
- Wang DS, Shaw R, Winkelmann JC, Shaw G (1994). Binding of PH domains of beta-adrenergic receptor kinase and beta-spectrin to WD40/beta-transducin repeat containing regions of the beta-subunit of trimeric G-proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 203:29–35.
- Weber, S.S., Bovenberg, R, y Driessen, A. (2012). Biosynthetic concepts for the production of B-lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology Journal*. 7: 225-236.
- Wright, S Y Park, G. (2007). Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous Fungi. *Annual Review of Microbiology*. 61: 423-452.
- Xie, X-Q. Guan, Y. Ying, S-H. y Feng, M-G. (2013). Differentiated functions of Ras1 and Ras2 proteins in regulating the germination, growth, conidiation, multi-stress tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*. 15: 447–62.
- Xiros, C., Moukouli, M., Topakas, E., Christakopoulos, P. (2009). Factors affecting ferulic acid release from Brewer's spent grain by *Fusarium oxysporum* enzymatic system. *Bioresource Technology*. 100: 5917–5921.
- Xu, Q. *et al.* (2009). Bacterial Pleckstrin Homology Domains: A Prokaryotic Origin for the PH Domain. *Journal of Molecular Biology*. 396: 31–46.
- Yang, Q; Y Borkovich, Ka. (1999). Mutational activation of a Gai causes uncontrolled proliferation

- of aerial hyphae and increased sensitivity to heat and oxidative stress in *Neurospora crassa*. *Genetics*. 151: 107–117.
- Yang, Y; Li, X; Shao, Y; Chen, F. (2012). *mrflbA*, encoding a Putative FlbA, is Involved in Aerial Hyphal Development and Secondary Metabolite Production in *Monascus ruber* M-7. *Fungal Biology*. 116: 225-233.
- Yu, J. Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. (2006). *Journal of Microbiology*. 44: 145-154
- YU, Xi. *et al.* (2017). The Ga1- Camp signaling pathway controls conidiation, development and secondary metabolism in the taxol- producing fungus *Pestalotiopsis microspora*. *Microbiological Research*. 203: 2939.
- Zampieri, E; Balestrini, R. Kohler, A. Abbà, S; Martin, F; Y Bonfante, P. (2011). The Perigord black truffle responds to cold temperature with an extensive reprogramming of its transcriptional activity. *Fungal Genetics and Biology*. 48: 585–591.
- Zaragoza, O.; Rodriguez, C.; y Gancedo, C. (2000). Isolation of the MIG1 gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. *J. Bacteriol.* 182: 320–6.
- Zhang, J.W., Zhang, Y.M., Zhong, Y.H., Qu, Y.B., Wang, T.H., (2012). Ras GTPases modulate morphogenesis, sporulation and cellulase gene expression in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *PLoS One*. 7 (11): 48786.
- Zhang, S. *et al.*, (2015). Expression of feruloyl esterase A from *Aspergillus terreus* and its application in biomass degradation. *Protein Expression and Purification*. 115:153-157.
- Zhong, Y., Peng, J., Chen, Z., Xie, H., Luo, D., Dai, J., Yan, F., *et al* (2015). Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* activates defense responses and restricts the spread of Tobacco Mosaic Virus in tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 92: 28- 37.

Zhou, M. *et al.*, (2015). Construction and expression of two-copy engineered yeast of feruloyl esterase. *Electronic Journal of Biotechnology*. 18: 338–342.

Zuber, S. Hynes, Mj. Andrianopoulos, A. (2002). G-protein signaling mediates asexual development at 25 degrees C but has no effect on yeast-like growth at 37 degrees C in the dimorphic fungus *Penicillium marneffe*. *Eukaryotic Cell*. 1: 440–447.

Original

# Effect of xylan and rice husk on feruloyl esterase activity in *Penicillium rubens*

Débora E. Hernández-Pérez<sup>1</sup>  B.Sc; Carlos Gil-Durán<sup>2</sup>  Ph.D;  
Renato Chávez-Rosales<sup>2</sup>  Ph.D; Ramón O. García-Rico<sup>1\*</sup>  Ph.D.

<sup>1</sup>Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología. Grupo GIMBIO. Ciudadela Universitaria Km 1 Vía Bucaramanga, Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia.

<sup>2</sup>Universidad de Santiago de Chile. Departamento de Biología, Facultad de Química y Biología. Avenida Libertador General Bernardo O'Higgins 3363, Universidad de Santiago de Chile. Santiago, Chile.

\*Correspondencia: [rovigar@hotmail.com](mailto:rovigar@hotmail.com)

Received: March 2020; Accepted: August 2020; Published: November 2020.

## ABSTRACT

**Objective.** Analyzed the effect of xylan and rice husk as sole sources of carbon on the FAE activity and expression of *faeA* and *faeB* genes of *Penicillium rubens* (Wisconsin 54-1255), in submerged fermentation. **Materials and methods.** The fermentations were carried out for 24, 48, and 72 h (28°C/250 rpm), in flasks with a modified Sakamoto medium. FAE activity was determined using the synthetic substrate Ethyl 4-hydroxy-3-methoxycinnamate. The transcription of *faeA* and *faeB* was analyzed by RT-PCR. The PCR products were resolved by electrophoresis and analyzed by densitometry. **Results.** The analysis of gene expression showed that the use of xylan had a positive effect on the expression of both genes. The highest transcriptional activity of both *faeA* and *faeB* was detected at 48 h. On the other hand, rice husk showed negative results. The data obtained when the FAE activity was determined, supported the results observed in the gene expression analysis. **Conclusion.** Different from xylan the rice husk did not demonstrate an inducer effect on the feruloyl esterase activity in *P. rubens*.

**Keywords:** Catabolite repression; enzyme activity; gene expression; fermentation; *Penicillium*; transcriptional activation (*Sources: MeSH, NLM, CAB*).

## RESUMEN

**Objetivo.** Analizar el efecto del xilano y la cascarilla de arroz como únicas fuentes de carbono, sobre la actividad feruloil esterasa y la expresión de los genes *faeA* y *faeB* de *Penicillium rubens* (Wisconsin 54-1255), en fermentación sumergida. **Materiales y métodos.** Las fermentaciones se realizaron durante 24, 48 y 72 h (28°C/250 rpm), en matraces con medio Sakamoto modificado. La actividad FAE se determinó usando el sustrato sintético Etil 4-hidroxi-3-metoxicinamato. La transcripción de *faeA* y *faeB* fue determinada por RT-PCR. Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en gel y se analizaron por densitometría. **Resultados.** El análisis de la expresión génica evidenció que el uso del xilano tuvo un efecto positivo en la expresión de ambos genes. La mayor actividad transcripcional, tanto de *faeA* como de *faeB*, se observó a las 48 h. Por su parte, la cascarilla de

### How to cite (Vancouver).

Hernández-Pérez DE, Gil-Durán C, Chávez-Rosales R, García-Rico RO. Effect of xylan and rice husk on feruloyl esterase activity in *Penicillium rubens*. Rev MVZ Córdoba. 2021; 26(1):e1959. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1959>



©The Author(s), Journal MVZ Córdoba 2020. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), lets others remix, tweak, and build upon your work non-commercially, as long as they credit you and license their new creations under the identical terms.

arroz produjo resultados negativos. Los datos obtenidos al determinar la actividad feruloil esterasa, respaldaron los resultados observados en el análisis de expresión génica. **Conclusión.** A diferencia del xilano, la cascarilla de arroz no demostró un efecto inductor sobre la actividad feruloil esterasa en *P. rubens*.

**Palabras clave:** Represión catabólica; actividad enzimática; expresión génica; fermentación; *Penicillium*; activación transcripcional (*Fuentes: MeSH, NLM, CAB*).

## INTRODUCTION

Feruloyl esterases (EC. 3.1.1.73) belong to the carboxylic ester hydrolases and are the key enzymes in the ester bonds excision between the hydroxycinnamic acid and the galactose or arabinoxylans in hemicellulose. This group of esterases is also known for its acronym: FAE (Ferulic acid esterases). The hydrolysis of the ester bonds in plant cell walls using FAE enzymes, allows polysaccharides and different phenolic compounds such as hydroxycinnamic acids to be released easily (1). Hydroxycinnamic acids are high-value chemicals due to their various biological properties, of which ferulic acid is the most abundant and widely distributed (2). Many studies have reported on the applications of ferulic acid in the food, biomedical, and pharmaceutical industries due to their antioxidant, antimicrobial, antiviral, anticarcinogenic, and anti-inflammatory properties (2,3). Thus, the use of FAEs enzymes is very important in different biotechnological processes such as enzymatic hydrolysis for the bioethanol production, the biological delignification of plants for the paper production, the hydroxycinnamic acid esterification as well as the digestibility and recovery increase of vegetable residues derived from agroindustry (1,3).

The feruloyl esterase production from microorganisms and its biotechnology application has been an object of investigation in the last years. Currently, filamentous fungi are the microorganism group most employed in the searching and production of these enzymes. However, the amount of fungal sequences deposited in the databases is still small (4). In some cases, the enzymatic activity is reported and even the enzymes are purified without knowing the sequences of the genes that encode them. This is the *Penicillium rubens* situation (classified before as *P. chrysogenum*) one of the most valuable fungi for the biotechnology industry (5). Fortunately, the public character of the fungal genomes has facilitated the search for coding sequences of feruloyl esterases through genome mining. After having a search based

on similarity in the *P. rubens* (Wisconsin 54-1255) genome, two coding sequences feruloyl esterases were found and denominated *faeA* and *faeB*. It was found that *faeA* contains an open reading frame (ORF-Pc20g07010) of 933 bp, with a single intron (89 bp), which codes for a 280 amino acids protein called PrFaeA (CAP86030). On the other hand, *faeB* includes an open reading frame (ORF-Pc12g08300) of 1643 pb, with a 58 pb intron, that encodes for a 527 amino acids protein denominated PrFaeB (CAP80457). Both fungal proteins were bioinformatically verified, determining that they belong to type A and B FAEs, respectively.

Taking into account that the husk is one of the by-products generated in a large quantity during the rice production and rich in hemicelluloses and phenolic compounds (6) it has been considered to evaluate its use as a substrate in the production of FAEs enzymes by *P. rubens* (Wisconsin 54-1255) under submerged fermentation conditions. Thus, this work aimed to analyze the rice husk effect on the enzymatic activity feruloyl esterase and the transcription of the coding genes for feruloyl esterases PrFaeA and PrFaeB, in comparison with the xylan use as an only carbon source.

## MATERIALS AND METHODS

**Fermentation.** The culture medium described by Sakamoto et al (10), with modifications (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 2 gl<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 gl<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O: 0.5 gl<sup>-1</sup>; KCl: 0.5 gl<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub>: 0.01 gl<sup>-1</sup>; Soybean peptone: 1 gl<sup>-1</sup>; rice husk: 20 gl<sup>-1</sup>; distilled water) was taken into account. The rice husk was subjected to a grinding and screening pretreatment to be subsequently subjected to autoclave solubilization by thermal steam treatment. The medium was called RHS (rice-husk-sakamoto). To prepare the second culture medium, the rice husk was replaced by xylan (2%). This medium was denominated XS (xylan-sakamoto). For the determination of enzymatic activity, the fermentations were carried out for

24, 48, and 72 h, at 28°C and 250 rpm, in 250 ml flasks with 50 ml of medium. In order to obtain the enzyme extracts, the content of each flask was processed as described by Sakamoto et al (7). The amount of protein present in each extract was measured using the Bradford method. The FAE activity was determined by using the synthetic substrate Ethyl 4-hydroxy-3-methoxycinnamate (Sigma-Aldrich) following the procedure suggested by Sakamoto et al (7). For these experiments, U is described as the amount of enzyme that is capable of releasing 1 µmol of AF in a time of 1 minute.

**Analysis of gene expression.** Fermentations were carried out for 72 h, to 28°C and 250 rpm, in 500 ml flasks with 100 ml of medium. Mycelium samples were taken from each medium at the 24 h, 48 h, and 72 h. The DNA and RNA extractions were performed as indicated by Gil-Durán et al (8). The transcription of *faeA*, *faeB*, and *actA* was analyzed by RT-PCR. The cDNA synthesis was carried out as indicated by García-Rico et al (9). The PCR amplification was done following these conditions: 5 min at 94°C; 30 s at 94°C; 30 s at 58°C; 30 s at 72°C (35 cycles) and 10 min at 72°C. The oligonucleotides used are listed in Table 1. The PCR products were resolved by electrophoresis. Taking into account the size of the amplicons, the GeneRuler 50 bp DNA Ladder (ThermoFisher) was used as a molecular weight marker. For the positive control, *P. rubens* genomic DNA was used as a template, while for the negative control no template was used. The densitometry analysis was performed using the "MYImageAnalysis" software (ThermoFischer) as indicated by Torrent et al (10). The normalizing gene was *actA*.

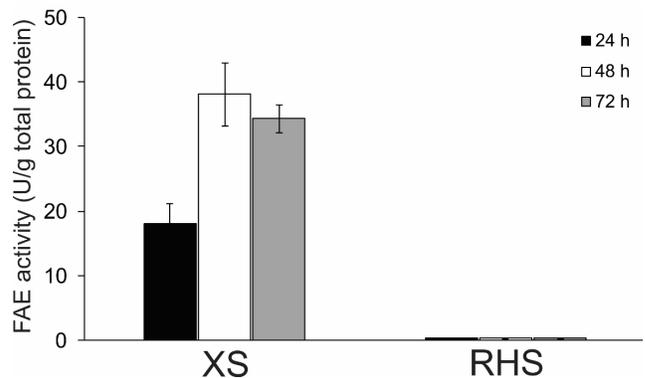
**Table 1.** Primers used in RT-PCR analysis.

Target gene	Primer name	Sequence (5'→3')	Length (pb)
<i>faeA</i>	FaeA-Fw	CTCGCTCCATTTGACACCTT	100
	FaeA-Rv	ACAAGTGACTCGACCTGATCT	
<i>faeB</i>	FaeB-Fw	ACCGCCAACCTGAGGTAATC	101
	FaeB-Rv	CTTGTCGAAGCCCTCCTCAT	
<i>actA</i>	ActA-Fw	TCCCCATCTACGAGGGTTTCT	100
	ActA-Rv	CGTCCACGCAGGATCTTCAT	

## RESULTS

The analysis of enzymatic activity (FAE activity) from the culture media RHS and XS, produced results that contrast each other. On the one

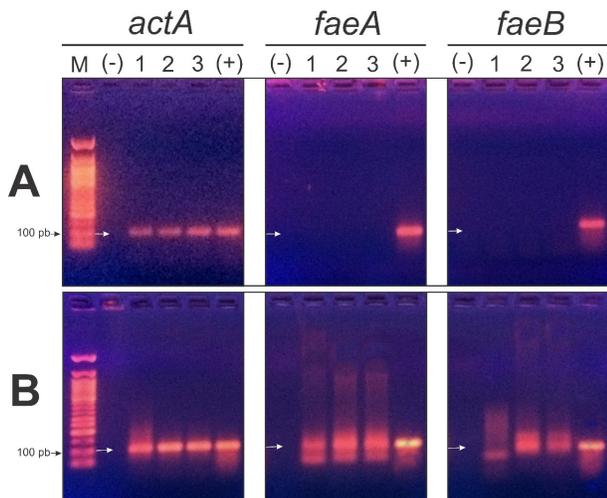
hand, it was observed that FAE activity in the RHS medium was null, while in the XS medium enzymatic activity was detected at all times tested. The use of xylan as the sole source of carbon induced an FAE activity whose point of the maximum activity was observed at 48 h, at which time it doubled the activity detected at 24 h (Figure 1). Enzymatic activity at 72 h ranged around 90% of what was observed at 48 h.



**Figure 1.** FAE activity of *P. rubens* enzyme extracts. The data obtained for 24 h, 48 h, and 72 h of submerged fermentation in XS and RHS media are shown. Error bars represent the standard deviation of two replicas from two independent experiments ( $p < 0.05$ ). (U) Unit: the amount of enzyme that is capable of releasing 1 µmol of AF in a time of 1 minute.

Similarly, the gene expression analysis indicated that, unlike rice husk, the use of xylan showed an inductor effect on gene expression of *faeA* and *faeB*. When the products of RT-PCR were resolved by electrophoresis, the amplicon of the expected size (100 bp) was only observed in the fermentation with XS medium (Figure 2). In the XS medium, the transcriptional activity of *faeA* was detected from 24 h to 72 h of fermentation, while for *faeB* the expression was clearly observed only after 48 h of culture (Figure 2B).

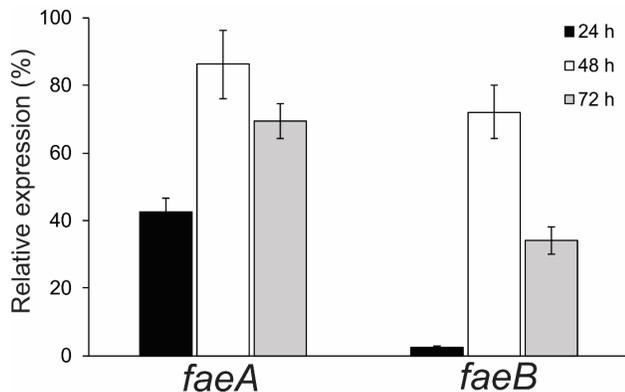
Analysis by densitometry showed that *faeA* reached its maximum expression level at 48 h (Figure 3). At 72 h, the relative transcription level in the mycelium remained around 70% in comparison with the transcription levels of *actA*, used as a normalizing gene due to its constitutive character. Different from *faeA*, the *faeB* expression was not detected at 24 h. However, the highest transcriptional activity was observed at 48 h. After 72 h, the *faeB* relative expression decreased to less than half of what was observed at 48 h (Figure 3).



**Figure 2.** Profile expression of *faeA* and *faeB* with xylan and rice husk as only sources of carbon.

The RT-PCR products resolved in agarose gel (2%) are shown. **A:** Sakamoto medium modified with rice husk (RHS). **B:** Medium with xylan (XS). It is pointed for each gene, from left to right: negative control (-), 24 h (1), 48 h (2), 72 h (3), and positive control (+). M: molecular weight marker (GeneRuler 50 bp DNA Ladder). The arrow indicates the amplification of a 100 bp fragment. Positive control: the template was genomic DNA. Negative control: no template was used.

For both genes, the highest levels of expression were detected at 48 h fermentation, in accordance with what was observed in the enzyme activity tests. On the other hand, the rice husk produced opposite results (Figures 1 and 2). No transcriptional activity was detected in tested times for either of the two genes. Thus, the modified Sakamoto medium with rice husk did not work as an inducer of feruloyl esterase activity in *P. rubens*.



**Figure 3.** Effect of xylan as carbon source on transcription of *faeA* and *faeB* in *P. rubens*.

In the figure 3, shows the data obtained for 24 h, 48 h, and 72 h of submerged fermentation in XS medium is shown. The levels of *faeA* and *faeB* transcripts were quantified by densitometry. The normalizing gene was *actA*. The *faeA/actA* and *faeB/actA* ratios were expressed as a percentage (10).

## DISCUSSION

In filamentous fungi, genes encoding feruloyl esterases are regulated by catabolite repression. This negative control is mediated by *CreA* through repression of *XlnR*, a transcriptional activator of xylanolytic genes (11). Our results showed that xylan had a greater inductor effect on *faeA* than on *faeB*, during the whole fermentation. This difference was important at 24 h (Figure. 2). In *Aspergillus niger*, sugars such as xylose and arabinose differentially induced the expression of *faeA* instead *faeB*, after a few hours of growth (12). The above agrees with what was observed in *P. rubens*, especially if we consider that the main product of the hydrolysis of xylan is xylose. Additionally, the xylose concentration has an impact on gene expression. At low concentrations the xylose work as an inducer and at high concentrations as a repressor, in a mechanism *CreA*-mediated (13). This behavior would explain the decrease that was observed in *faeA* transcription after 48 h since it could obey the increase xylose, due to hydrolytic activity. Moreover, the *faeB* gene is induced by the presence of aromatic compounds such as ferulic acid, in *A. niger* (4). Thus, in the presence of complex polysaccharides, the expression of *faeA* gene led to the release of these specific aromatic compounds, stimulating the *faeB* expression. Furthermore, in this work, we report the null effect of rice husk on the transcription of genes coding for feruloyl esterase enzymes. In natural substrates, the hemicelluloses are chemically very variable. In particular, arabinoxylans from cereal husks are described as the most lignified, with the greatest diversity of side chains, and sometimes insoluble in water (14). Therefore, it can be assumed that some components such as xylan and ferulic acid may be inaccessible to operate as inducers on gene expression. Finally, the possible generation of inhibitor compounds during the rice husk pretreatment should be considered. In steam pretreatment, the partial degradation of hemicellulose can lead to the generation of toxic compounds such as furan derivatives (such as furfural and 5-hydroxymethylfurfural) affecting enzyme activity (15).

## Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Acknowledgments

GIMBIO research group (University of Pamplona) and the Laboratory of Basic and Applied Microbiology (University of Santiago de Chile). Hernández, E. thanks COLCIENCIAS (Call 753), Chávez, R. to DICYT-USACH and Gil-Durán, C. to CONICYT-PFCHA / Doctorate National / 2014-63140056.

## REFERENCES

1. Golapan N, Rodríguez D, Saucedo G, Nampoothiri KM. Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresour Technol.* 2015; 193:534-44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.117>
2. Taofiq O, González AM, Barreiro MF, Ferreira IC. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules.* 2017; 22(2):281. <https://doi.org/10.3390/molecules22020281>
3. De Oliveira DM, Mota T, Oliva B, Segato F, Marchiosi, Ferrarese O, et al. Feruloyl esterases: Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production of bioactive compounds. *Bioresour Technol.* 2019; 278:408-423. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.064>
4. Dilokpimol A, Mäkelä M, Mansouri S, Belova O, Waterstraat M, Bunzel M, et al. Expanding the feruloyl esterase gene family of *Aspergillus niger* by characterization of a feruloyl esterase, FaeC. *N Biotechnol.* 2017; 37 (Part B):200-209. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.02.007>
5. Guzmán-Chávez F, Zwahlen RD, Bovenberg RAL, Driessen AJM. Engineering of the Filamentous Fungus *Penicillium chrysogenum* as Cell Factory for Natural Products. *Front Microbiol.* 2018; 9:2768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02768>
6. Goufo P, Ferreirab L, Trindadea H, Rosa E. Distribution of antioxidant compounds in the grain of the Mediterranean rice variety 'Ariete'. *CyTA - Journal of Food.* 2015. 13:140-150. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.923941>
7. Sakamoto T, Nishimura S, Kato T, Sunagawa Y, Tsuchiyama M, Kawasaki H. Efficient Extraction of Ferulic Acid from Sugar Beet Pulp Using the Culture Supernatant of *Penicillium chrysogenum*. *J Appl Glycosci.* 2005; 52:115-120. <https://doi.org/10.5458/jag.52.115>
8. Gil-Durán C, Rojas J, Medina E, Vaca I, García-Rico R, Villagrán S, et al. The *pcz1* Gene, which Encodes a Zn(II)2Cys6 Protein, Is Involved in the Control of Growth, Conidiation, and Conidial Germination in the Filamentous Fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS One.* 2015; 10(3):e0120740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120740>
9. García-Rico RO, Gil-Durán C, Rojas JF, Vaca I, Figueroa L, Levicán G, et al. Heterotrimeric G protein alpha subunit controls growth, stress response, extracellular protease activity, and cyclopiazonic acid production in *Penicillium camemberti*. *Fungal Biol.* 2017; 121(9):754-762. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.05.007>
10. Torrent C, Gil-Durán C, Rojas JF, Medina E, Vaca I, Castro P, et al. Role of *sfk1* Gene in the Filamentous Fungus *Penicillium roqueforti*. *Front Microbiol.* 2017; 8:2424. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02424>

11. Tamayo E, Villanueva A, Hasper AA, de Graaff LH, Ramón D, Orejas M. CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol. 2008; 45:984-93. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.03.002>
12. De Vries R, Vankuyk P, Kester H, Visser J. The *Aspergillus niger faeB* gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. Biochem. J. 2002; 363: 377–386. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3630377>
13. De Vries R, Visser J, Graaff L. CreA modulates the *XlnR*-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. Res. Microbiol. 1999; 150(4):281-285. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80053-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80053-9)
14. Bastos R, Coelho E, Coimbra M. Arabinoxylans from cereal by-products: Insights into structural features, recovery, and applications. Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products. 1st ed. (United Kingdom): Elsevier Ltd; 2018.
15. Alvira, E. Pejó T, M. Ballesteros, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology. 2010; 101: 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>