

20.714

**ESTUDIO BIOQUÍMICO DE β -1,3-GLUCANASAS DE
Aspergillus nidulans PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE
Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* raza 2**



Oscar Mariano Nuero García

TESIS DOCTORAL



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Madrid, 1995



A mis padres
A mi hermano
A mi abuela

A Carmen

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo se ha realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C., gracias a dos contratos en prácticas en las empresas Norel S.A. y Nature S.A. También ha sido financiado por los proyectos “Sistemas enzimáticos en el control de hongos fitopatógenos” (Plan I+D ref. **AGR91-0014-CO2-O2**) y “Control biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por hiperparasitismo y lisis” (Plan Regional de Investigación de la Comunidad Autónoma de Madrid ref. **C052/91**).

Quiero dar las gracias a todas las personas que han hecho posible esta Tesis y entre ellas me **gustaría** destacar:

A la Dra. Fuensanta Reyes directora de esta Tesis, quisiera agradecerle la dedicación e interés que siempre ha mostrado en la dirección de este trabajo. También su optimismo durante los peores momentos, gracias al cual es fácil continuar trabajando.

A la Dra. **María** Jesús Martínez, por la ayuda prestada cuando ha sido necesaria, sus consejos y el tratarme como si fuera uno más dentro de su grupo de investigación.

Al Dr. Carlos Alfonso, la persona que guió mis primeros pasos en el mundo de la microbiología, quisiera agradecerle sus enseñanzas, apoyo y ayuda en todo momento.

Al Dr. José Luis Copa por la minuciosa revisión de este manuscrito y por los ánimos que de él siempre he recibido.

Al Dr. Manuel Bernabé por la realización e interpretación de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear, por su trato amable y los ánimos recibidos.

Al Dr. Francisco Guillén por sus preguntas complicadas y hacerme recordar una parte de la química que ya tema olvidada.

Al Dr. Juan Antonio Leal y los componentes de su grupo de investigación, Dra. Begoña Gómez, Dra. Alicia Prieto, Jezabel y Oussama por el trato amable y cariñoso que siempre he recibido de ellos. También quisiera agradecerles su colaboración en el fraccionamiento de la pared celular de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 2. Especialmente quisiera agradecer a Alicia la realización e interpretación de los cromatogramas de gases y los espectros infrarrojos.

A la Dra. Pilar Estrada el haberme encaminado hacia el laboratorio de Fuensanta, donde tantas cosas he aprendido acerca de la microbiología y

enzimología.

A la Dra. Carmen Muñoz, le agradezco su apoyo tanto en los momentos malos, como en los buenos durante estos años, espero que a partir de ahora todo nos vaya aún mejor.

Al Dr. Antonio Martín el habernos puesto en contacto con la empresa Norel S.A., sin su ayuda parte de la financiación de este trabajo no hubiera sido posible.

Al Dr. Francisco Santamaría le agradezco su ánimo y ayuda en todo momento.

A los **Dres.** Angel T. Martínez y Gonzalo Almendros su ayuda en la digitalización de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

Al pre-Dr. Raúl García, los buenos y malos momentos vividos durante nuestra convivencia en el grupo de Fuensanta, ahora sólo le deseo que tenga la mejor de las suertes en la realización de su Tesis Doctoral.

A mis compañeros del **CIB**: Ana Gutiérrez, Brigitte Böckle, Elisa Varela, Fernando del Amo, Javier Ruiz, **Lucilia** Caramelo, **Mari Carmen Lahoz**, Mercedes Moreno, Patricia Gilardi, Pilar Marín, **Sovan** Sarkar y Susana Camarero por los buenos momentos pasados durante estos cuatro años.

A Don Enrique de **Pablos**, Director general de la empresa Norel S.A., ya que gracias a él ha sido posible realizar parte de ésta Tesis Doctoral, asimismo me gustaría agradecerle su confianza y el trato amable que recibí durante nuestra colaboración con su empresa.

A toda mi familia a mi padre, mi madre, mi hermano, mi abuela y demás componentes por su apoyo y comprensión.

A las mejores ayudantes del **CIB**, Carmelina, **Tere** y Angelines.

A Pepe, Ricardo y Victoria por el trabajo fotográfico.

También quisiera darles las gracias a todos mis amigos por su apoyo e interés en todo momento.

ÍNDICE.

	<i>n^o</i> pág.
<u>1. INTRODUCCIÓN.</u>	1
1.1. <u>Control biológico: Antecedentes.</u>	3
1.2. <u>Formas de control biológico: Mecanismos de antagonismo.</u>	5
1.2.1. Antibiosis.	5
1.2.2. Competencia.	5
1.2.3. Explotación.	6
1.2.4. Lisis.	6
1.2.5. Resistencia inducida en el hospedador.	7
1.3. <u>Composición v estructura de la pared celular de hongos filamentosos.</u>	7
1.3.1. Composición química de la pared celular.	8
1.3.2. Estructura de la pared celular.	9
1.4. <u>β-1,3-glucanasas de hongos filamentosos.</u>	11
1.5. <u>Interacción <i>Lycopersicum esculentum</i>-<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>.</u>	14
1.6. <u>Características de <i>A. nidulans</i>.</u>	15
1.7. <u>Objetivos v planteamiento del trabajo.</u>	16
<u>2. MATERIALES Y MÉTODOS.</u>	19
2.1. <u>Microorganismos emoleados.</u>	21
2.2. <u>Mantenimiento de los microorganismos.</u>	21
2.3. <u>Medios de cultivo.</u>	21
2.3.1 Medio agar-patata-dextrosa.	21
2.3.2. Medio de Reyes y Byrde (1973) suplementado con extracto de levadura (Medio basal).	21
2.4. <u>Preparación del inóculo.</u>	21
2.5. <u>Condiciones de cultivo.</u>	21
2.6. <u>Toma de muestra.</u>	22
2.7. <u>Parámetros valorados en las muestras.</u>	22
2.7.1. Grado de autólisis.	22
2.7.2. pH.	22

2.7.3. Conductividad.	22
2.7.4. Sustancias reductoras libres.	22
2.7.4.1. <u>Preparación de reactivos.</u>	22
2.7.4.2. <u>Procedimiento.</u>	23
2.7.5. Glucosamina	23
2.7.5.1. <u>Preparación de reactivos.</u>	23
2.7.5.2. <u>Procedimiento.</u>	23
2.7.6. N-acetilglucosamina.	23
2.7.6.1. <u>Preparación de reactivos.</u>	23
2.7.6.2. <u>Procedimiento.</u>	24
2.7.7. Proteínas.	24
2.7.7.1. <u>Método de Lowry.</u>	24
2.7.7.2. <u>Método de Bradford.</u>	24
2.7.8. Carbohidratos totales.	25
2.7.8.1. <u>Preparación de reactivos.</u>	25
2.7.8.2. <u>Procedimiento.</u>	25
2.8. <u>Preparación de los sustratos enzimáticos.</u>	25
2.8.1. Quitina.	25
2.8.1.1. <u>Preparación de quitina a partir de cutícula de gamba.</u>	25
2.8.1.2. <u>Preparación de quitina coloidal.</u>	25
2.8.2. Xilano.	26
2.8.2.1. <u>Preparación de xilano coloidal.</u>	26
2.8.3. Curva de peso seco de sustratos coloidales.	26
2.8.4. Preparación de laminarina oxidada.	26
2.8.5. Preparación de laminaribiosa y oligómeros de glucosa.	26
2.9. <u>Preparación de disoluciones tampón.</u>	27
2.10. <u>Valoraciones enzimáticas.</u>	27
2.10.1. Actividad β-1,3-glucanasa.	27
2.10.1.1. <u>Susato.</u>	27
2.10.1.2. <u>Procedimiento.</u>	27

	<i>nº pág.</i>
2.10.2. Actividad β-glucosidasa.	27
2.10.2.1. <u>Sustrato.</u>	27
2.10.2.2. <u>Procedimiento.</u>	28
2.10.3. Actividad quitinasa.	28
2.10.3.1. <u>Sustrato.</u>	28
2.10.3.2. <u>Procedimiento.</u>	28
<u>2.11. Estudios de la producción de actividades enzimáticas en diferentes medios suplementados.</u>	28
2.11.1. Sustancias añadidas al medio.	28
2.11.2. Procedimiento.	28
<u>2.12. Estudio de la producción de la actividad β-1,3-glucanasa por FPLC en diferentes medios suplementados.</u>	29
<u>2.13. Métodos de precipitación y concentración de proteínas.</u>	
2.13.1. Precipitación fraccionada con acetona.	29
2.13.2. Precipitación fraccionada con etanol.	29
2.13.3. Precipitación fraccionada con sulfato amónico.	29
2.13.4. Precipitación con ácido tánico.	30
<u>2.14. Técnicas cromatográficas.</u>	30
2.14.1. Cromatografía en capa fii.	30
2.14.2. Cromatografía de exclusión molecular.	30
2.14.2.1. <u>Separación de oligómeros de glucosa en Bio-Gel P-2.</u>	30
2.14.2.2. <u>Purificación de proteínas en Seuhadex G-200.</u>	30
2.14.2.3. <u>Purificación de proteínas en Superosa 12 HR 10/30 FPLC.</u>	31
2.14.3. Cromatografía de intercambio iónico.	31
2.14.3.1. <u>Purificación de proteínas en DEAE Bio-Gel A.</u>	31
2.14.3.2. <u>Purificación de proteínas en Mono Q HR 5/5 FPLC.</u>	32
2.14.4. Análisis de azúcares reductores por cromatografía gas-líquido (GLC).	32
2.14.4.1. <u>Preparación de derivados volátiles.</u>	32
2.14.4.2. <u>Análisis de los derivados mediante cromatografía gas-líquido (GLC).</u>	33

2.15. <u>Técnicas electroforéticas.</u>	33
2.15.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	33
2.15.1.1. <u>Formación de los geles.</u>	34
2.15.1.2. <u>Preparación de las las muestras.</u>	34
2.15.1.3. <u>Procedimiento.</u>	34
2.15.1.4. <u>Determinación de la masa molecular.</u>	34
2.152. Isoelectroenfoque.	35
2.15.2.1. <u>Formación de los geles.</u>	35
2.15.2.2. <u>Preparación de las muestras.</u>	35
2.15.2.3. <u>Procedimiento.</u>	35
2.15.2.4. <u>Determinación del punto isoeléctrico (pI).</u>	35
2.15.3. Tinción de proteínas.	36
2.15.3.1. <u>Tinción de uroteínas con azul de Coomasie R-250.</u>	36
2.15.3.2. <u>Tinción de proteínas con nitrato de plata.</u>	36
2.154. Determinación de actividad β-1,3-glucanasa en geles de electroforesis.	36
2.15.4.1. <u>Preparación de reactivos.</u>	36
2.15.4.2. <u>Procedimiento.</u>	36
2.16. <u>Propiedades físico-Químicas de las enzimas purificadas.</u>	36
2.16.1. pH óptimo.	36
2.16.2. Estabilidad al pH.	37
2.16.3. Temperatura óptima.	37
2.16.4. Estabilidad a la temperatura.	37
2.16.5. Masa molecular.	37
2.16.6. Punto isoeléctrico (pI).	37
2.16.7. Contenido en carbohidratos.	37
2.17. <u>Estudio cinético de las enzimas purificadas.</u>	37
2.17.1. Variación de la actividad con la concentración de enzima.	37
2.17.2. Variación de la actividad con el tiempo de incubación.	38
2.17.3. Variación de la actividad con la concentración de sustrato.	38
K_m y $V_{máx}$.	38

	n ^o pág.
2.17.4. Inhibición por glucono- δ -lactona. K_i .	38
2.17.5. Actividad enzimática en presencia de diferentes iones.	38
2.17.6. Estudio de la hidrólisis por las enzimas purificadas de laminarina y distintos disacáridos por cromatografía en capa fina.	38
2.17.6.1. <u>Estudio de la hidrólisis de laminarina.</u>	38
2.17.6.2. <u>Estudio de la hidrólisis de diferentes disacáridos.</u>	38
2.17.7. Análisis de los azúcares reductores liberados en la hidrólisis de laminarina con las enzimas purificadas por cromatografía gas-líquido (GLC).	39
2.17.8. Estudio del modo de acción de las enzimas purificadas en la hidrólisis de la laminarina por Resonancia Magnética Nuclear (¹ H-RMN).	39
2.17.8.1. <u>Deuteración de las enzimas v sustrato.</u>	39
2.17.8.2. <u>Procedimiento.</u>	39
2.18. <u>Especificidad de sustrato.</u>	40
2.19. <u>Degradación de paredes celulares de <i>F. oxysporum lycopersici</i> raza 2 y fracciones de las mismas por el crudo enzimático de <i>A. nidulans</i>.</u>	40
2.19.1. Obtención del crudo enzimático de <i>A. nidulans</i> .	40
2.19.2. Obtención de paredes celulares de <i>F. oxysporum lycopersici</i> raza 2 y fraccionamiento de las mismas.	40
2.19.2.1. <u>Obtención de paredes celulares.</u>	40
2.19.2.2. <u>Fraccionamiento de las paredes celulares.</u>	41
2.19.3. Degradación de las paredes celulares de <i>F. oxysporum lycopersici</i> raza 2.	41
2.19.4. Degradación de fracciones de la pared celular de <i>F. oxysporum lycopersici</i> raza 2.	42
2.19.4.1. <u>Degradación de la fracción soluble (F1S).</u>	42
2.19.4.2. <u>Degradación de la fracción insoluble (F4).</u>	42
2.20. <u>Degradación de paredes de <i>F. oxysporum lycopersici</i> raza 2 y fracciones de las mismas por las β-1,3-glucanasas de <i>A. nidulans</i> purificadas.</u>	42

<u>3. RESULTADOS.</u>	43
<u>3.1. Parámetros valorados en el líquido de cultivo de <i>A. nidulans</i>.</u>	45
3.1.1. Peso seco de micelio.	45
3.1.2. Grado de autólisis.	45
3.1.3. pH.	46
3.1.4. Conductividad.	46
3.1.5. Sustancias reductoras libres.	46
3.1.6. Carbohidratos totales.	48
3.1.7. Concentración de proteínas.	48
3.1.8. Valoración de actividades enzimáticas.	48
3.1.8.1. <u>Actividad β-1,3-glucanasa.</u>	48
3.1.8.2. <u>Actividad quitinasa.</u>	51
<u>3.2. Estudio de la producción de la actividad β-1,3-glucanasa por FPLC en diferentes medios suplementados.</u>	51
<u>3.3. Preparación de laminaribiosa v oligómeros de glucosa.</u>	54
<u>3.4. Purificación de las actividades β-1,3-glucanasas producidas durante la autólisis de <i>A. nidulans</i>.</u>	55
3.4.1. Selección del material de partida.	56
3.4.2. Selección de un método de precipitación de proteínas.	57
3.4.3. Separación mediante cromatografía líquida.	57
3.4.3.1. <u>Separación en DEAE Bio-Gel A.</u>	57
3.4.3.2. <u>Separación en Sephadex G-200.</u>	59
3.4.3.3. <u>Separación en Mono Q HR 5/5 de las proteínas I y II.</u>	59
3.4.3.4. <u>Separación en Mono Q HR 5/5 de la proteína III.</u>	59
3.4.3.5. <u>Separación en Superosa 12 HR 12/30.</u>	62
3.4.4. Electroforesis de las proteínas 1, II y III purificadas.	63
3.4.5. Rendimiento en la purificación.	65
<u>3.5. Propiedades físico-químicas de las β-1,3-glucanasas purificadas.</u>	66
3.5.1. pH óptimo.	66
3.5.2. Estabilidad al pH.	66
3.5.3. Temperatura óptima.	66

	<i>nº</i> pág.
3.5.4. Estabilidad a la temperatura.	66
3.5.5. Masa molecular.	70
3.5.6. Punto isoeléctrico (<i>pI</i>).	70
3.5.7. Porcentaje de carbohidratos.	70
3.6. <u>Estudio cinético de las enzimas purificadas.</u>	74
3.6.1. Variación de la actividad con la concentración de enzima.	74
3.6.2. Variación de la actividad con el tiempo de incubación.	74
3.6.3. Variación de la actividad con la concentración de sustrato. K_m Y $V_{máx}$.	74
3.6.4. Inhibición por glucono- δ -lactona. K_i .	75
3.6.5. Actividad enzimática en presencia de diferentes iones.	80
3.6.6. Estudio de la hidrólisis de diferentes sustratos por las enzimas purificadas por cromatografía en capa fina (TLC).	81
3.6.6.1. <u>Estudio de la hidrólisis de laminarina.</u>	81
3.6.6.2. <u>Estudio de la hidrólisis de diferentes disacáridos.</u>	81
3.6.7. Análisis por cromatografía gas-liquido (GLC) de azúcares reductores liberados en la hidrólisis de laminarina por las enzimas purificadas.	84
3.6.8. Estudio del modo de acción de las enzimas purificadas en la hidrólisis de la laminarina por Resonancia Magnética Nuclear (1H -RMN).	84
3.7. <u>Especificidad de sustrato.</u>	89
3.8. <u>Degradación de paredes celulares v sus fracciones por enzimas líticas de <i>A. nidulans</i>.</u>	90
3.8.1. Obtención de paredes celulares de <i>F. oxysporum lycopersici</i> raza 2 y fraccionamiento de las mismas.	90
3.8.1.1. <u>Obtención de paredes celulares.</u>	90
3.8.1.2. <u>Fraccionamiento de las paredes celulares.</u>	90
3.8.2. Degradación de paredes celulares de <i>F. oxysporum lycopersici</i> raza 2.	91
3.8.3. Degradación de fracciones de la pared celular de <i>F. oxysporum lycopersici</i> raza 2.	91
3.8.3.1. <u>Degradación de la fracción soluble (F1S).</u>	91

3.8.3.2. <u>Degradación de la fracción insoluble (F4).</u>	91
3.8.4. <u>Análisis por cromatografía gas-líquido (GLC) de los azúcares reductores liberados en la hidrólisis de las paredes celulares y las fracciones F1S y F4 por el crudo enzimático de <i>A. nidulans</i>.</u>	93
3.9. <u>Degradación de paredes de <i>F. oxysporum lycopersici</i> raza 2 y fracciones de las mismas por las β-1,3-glucanasas de <i>A. nidulans</i> purificadas.</u>	93
<u>4. DISCUSIÓN.</u>	95
4.1. <u>Introducción.</u>	97
4.2. <u>Crecimiento y autólisis de <i>A. nidulans</i> en medio líquido.</u>	97
4.3. <u>Estudio de la producción de la actividad β-1,3-glucanasa y quitinasa, durante la autólisis de <i>A. nidulans</i>, en diferentes medios suplementados.</u>	98
4.4. <u>Estudio de la producción, durante la autólisis de <i>A. nidulans</i>, de las enzimas responsables de la actividad β-1,3-glucanasa en diferentes medios suplementados.</u>	99
4.5. <u>Método de purificación de las β-1,3-glucanasas de <i>A. nidulans</i>.</u>	99
4.6. <u>Propiedades físico-químicas de las β-1,3-glucanasas purificadas.</u>	102
4.7. <u>Estudio cinético, especificidad y modo de acción de las β-1,3-glucanasas purificadas.</u>	105
4.8. <u>Funciones de las β-1,3-glucanasas purificadas, durante la autólisis de <i>A. nidulans</i>.</u>	110
4.9. <u>Degradación de paredes celulares de <i>F. oxysporum lycopersici</i> raza 2 y fracciones de las mismas por las enzimas líticas de <i>A. nidulans</i>.</u>	112
<u>5. CONCLUSIONES.</u>	115
<u>6. BIBLIOGRAFÍA.</u>	119

1. INTRODUCCIÓN.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Control biológico: Antecedentes.

El término control biológico fue utilizado por primera vez por von Tubeuf en 1914 con relación a patógenos de plantas (Baker, 1987). Este consiste en disminuir el número de células viables o la actividad patogénica del organismo causante de la enfermedad, mediante la acción directa de uno o más organismos sobre el patógeno o indirecta a través de su efecto sobre el hospedador o el ambiente (Mukerji y Grag, 1988).

Una buena definición del concepto de control biológico es la que utilizan Garret (1970) y Deacon (1983), según la cual el control biológico es el proceso por el que los efectos perjudiciales producidos por un organismo son reducidos a través de la mediación de otro organismo que no es ni el hospedador, ni el patógeno, ni el hombre.

En el tratamiento de enfermedades de plantas se han empleado productos químicos, pero debido a los problemas originados por su utilización, como la aparición de cepas resistentes del patógeno (Dekker y Georgopoulos, 1982; Jenkyn y White, 1988) y sus efectos perjudiciales sobre el medio ambiente (Zehr, 1989) hacen que el control biológico sea una alternativa de alto interés.

La base del biocontrol es la acción sobre alguno de los factores participantes en la interrelación hospedador-patógeno-ambiente. De esta manera se trata de reducir la enfermedad afectando a los siguientes puntos (Baker y Cook, 1974; Papavizas y Lumsden, 1980; Cook y Baker, 1983):

- a) Viabilidad de los propágulos y eliminación de las estructuras de supervivencia.
- b) Infección del hospedador por el patógeno.
- c) Gravedad del ataque por el patógeno.

En los últimos años los métodos químicos han alcanzado un mayor nivel de desarrollo que los métodos de control biológico. En la actualidad, se tiende al empleo de un control integrado combinando dos o más tipos de control (químico, biológico, cultural, etc...).

La FAO define en 1968 el control integrado como un mecanismo de lucha contra enfermedades, manteniéndolas a niveles a los cuales los danos económicos no son importantes, compatibilizando todas las técnicas y métodos de control posibles, manteniendo el equilibrio del ecosistema y teniendo en cuenta la dinámica de las poblaciones que en él se encuentran.

La aplicación de múltiples procedimientos para el control de una enfermedad ha sido utilizada desde antaño. Como ejemplos de control integrado se pueden citar, la aplicación de *Trichoderma viride* conjuntamente a la fumigación con sulfuro de carbono, para controlar la podredumbre producida por *Armillaria mellea* en cítricos (Baker, 1987) y la aplicación en el suelo de dosis de bromuro de metilo más bajas que las habituales junto a la aplicación de *Trichoderma* spp para controlar otros hongos (Chet y Elad, 1982; Chet, 1987).

Actualmente los métodos de biocontrol puestos en práctica y la investigación en este campo se centran en enfermedades producidas por patógenos del suelo (Baker, 1968; Baker y Snyder, 1970; Baker y Cook, 1974; Cook y Baker, 1983; Campbell, 1990 a y b). Esto es debido precisamente a la escasez y alto coste de los productos químicos empleados para combatir estos patógenos. No obstante, el control biológico de las enfermedades que afectan a las partes aéreas de las plantas ha cobrado recientemente una alta importancia, debido a la ausencia de los efectos secundarios y a que su coste puede ser competitivo frente al uso de fungicidas (Blakeman y Fokkema, 1982).

A la hora del desarrollo de un método de control biológico o integrado, la microflora presente en la planta o en el suelo constituye una fuente idónea de microorganismos con un potencial antagonismo frente a patógenos, que pueden ser empleados como agentes de control (Blakeman y Fokkema, 1982; Cook y Baker, 1983).

La invasión de la planta por **parásitos** débiles previene la invasión por los patógenos. Mc Kirmey en 1929 descubrió que las plantas inoculadas con un virus no patógeno quedaban protegidas frente a la infección por un virus patógeno (Baker, 1987).

En 1987, Baker hizo un estudio sobre biocontrol en el que considera un primer período que abarca hasta 1965, en el que se van realizando los primeros estudios, y a partir de este año un segundo período de unificación y profundización sobre ellos. Posteriormente, aumentaron los estudios sobre antagonistas de patógenos de plantas, como las publicaciones de Weindling sobre parasitismo y antibiosis de *Trichoderma viride* sobre *Rhizoctonia solani* (Baker, 1987).

La práctica de los cultivos alternativos para incrementar la producción de las cosechas ha sido un método utilizado desde siempre, que también sirve para disminuir las enfermedades de las plantas a través del control biológico del patógeno que queda en la tierra. Los estudios llevados a cabo en la “rizosfera” (zona de gran actividad biológica que está alrededor de las raíces de las plantas) demuestran que las sustancias exudadas por éstas favorecen el crecimiento de multitud de microorganismos. La inhibición del crecimiento de las esporas existentes en el suelo, bajo condiciones en las cuales es improbable su crecimiento o bien, es probable el ataque por antagonistas, puede ser de gran importancia en los procesos de biocontrol. En uno de los primeros estudios sobre las enfermedades de las raíces Bancroft en 1912 demostró que el micelio del patógeno requería una base nutritiva para extenderse a través del suelo e infectar las raíces (Baker, 1987). Los patógenos sensibles al calor han sido controlados tratando los suelos con vapor a 60 °C. De todo esto se deduce que la primera fase a desarrollar en la defensa y protección de la planta frente al patógeno es el uso de suelos, semillas o plántulas libres de patógenos. También se han encontrado casos de hipovirulencia por el desarrollo, en un patógeno, de una enfermedad transmisible.

Todos estos hechos no fueron considerados por los patólogos de plantas más que como hechos aislados, y hasta el **año** 1965 no se sentaron las bases del biocontrol unificándose los métodos y profundizando en su estudio. En esta época se comenzó el estudio en profundidad de todos estos fenómenos y se comenzaron a manipular genéticamente tanto plantas como microorganismos, desarrollándose numerosas formas de biocontrol.

El estudio del control biológico de hongos fitopatógenos por hongos no patógenos, presentes en el ecosistema, es un campo a desarrollar de sumo interés, dada la importancia de las enfermedades causadas por hongos.

1.2. Formas de control biológico: Mecanismos de antagonismo.

Los microorganismos antagonistas pueden presentar cinco mecanismos de acción: antibiosis, competencia, explotación, lisis y resistencia inducida en el hospedador.

1.2.1. Antibiosis.

En este caso la acción de una sustancia producida por un organismo inhibe el crecimiento o reduce la actividad metabólica de otro organismo (Gottlieb y Shaw, 1970).

En este mecanismo no es necesario un contacto directo **antagonista-patógeno** y el antibiótico puede permanecer en el medio incluso **después** de la muerte del antagonista.

La obtención de mutantes incapaces de producir antibióticos, que no muestran control sobre el patógeno, han dejado clara la idea de que la responsable del control es la molécula de antibiótico (Fravel, 1988).

Como ejemplo de este tipo de control se puede citar la inhibición del crecimiento de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, patógeno de **trigo**, por bacterias productoras del antibiótico fenacina (Thomashow *et al.*, 1986; Thomashow y Weller, 1987). El hecho de la obtención de mutantes no productores de fenacina incapaces de inhibir el crecimiento de *G. graminis* var. *tritici* (Thomashow *et al.*, 1986) y el aislamiento de fenacina de suelos donde se observó control de la enfermedad y no en aquellos donde no se observaba (Thomashow *et al.*, 1990) demuestran que la fenacina es la responsable de la inhibición del crecimiento.

1.2.2. Competencia.

La competencia consiste en la disputa de dos o más organismos por un **sustrato** en cantidad insuficiente para todos ellos. Se pueden distinguir distintos tipos de competencias.

a) Competencia por nutrientes y agua, este tipo es característico en la fase de prepenetración del organismo patógeno.

b) Competencia por oxígeno, se produce generalmente en la rizosfera, ya que en esta localización se pueden dar situaciones de anaerobiosis.

c) Competencia por espacio, en este caso el antagonista cubre toda la superficie vegetal evitando así el establecimiento del patógeno. Este es un caso en el que resulta interesante la relación entre las velocidades de crecimiento de patógeno y antagonista (Baker y Cook, 1974; Cook y Baker, 1983).

Como ejemplo de competencia por espacio y nutrientes se puede citar la acción de un aislado bacteriano no identificado (**alf-87A**) sobre las ascosporas de ***Sclerotinia sclerotiorum***. Estas ascosporas necesitan colonizar, previamente a la infección, tejidos senescentes, muertos o heridos. La bacteria compete por estos tejidos reduciendo los puntos de infección y como consecuencia la incidencia y severidad de la infección (Huang, 1992).

1.2.3. Explotación.

Este mecanismo incluye la **predación** y parasitismo directo, implica contacto directo hospedador-parásito (Boosalis, 1964).

En este caso un organismo (parásito) consigue todo o parte de los nutrientes de otro organismo (hospedador) (Dubos, 1987). En biocontrol interesa buscar hongos parásitos de otros hongos patógenos de plantas, esto es lo que se conoce como hiperparasitismo.

Al requerirse un contacto directo **patógeno-hiperparásito**, se cuestionan estos últimos como antagonistas efectivos frente a la infección primaria, ya que es necesario un tiempo para el contacto en el cual el patógeno podría ser capaz de infectar (Baker y Cook, 1974). Los hiperparásitos son por tanto útiles para la reducción del **inóculo** del patógeno en infecciones secundarias.

1.2.4. Lisis.

Este tipo de mecanismo consiste en la degradación enzimática total o parcial de un organismo por enzimas líticas de otro organismo (**heterólisis**) o del propio organismo (autólisis). Se puede diferenciar entre: exolisis o digestión parcial de las paredes del organismo por enzimas hidrolíticas del tipo quitinasas y glucanasas y endolisis o disolución del citoplasma sin digestión previa de la pared. Ambos pueden ser el resultado de la heterólisis o de la **autólisis**. En ocasiones se dan ambos tipos de lisis.

Las actividades quitinasa y **β -1,3-glucanasa** están implicadas en los procesos de degradación de la pared celular fúngica y ambas conjuntamente son capaces de hidrolizar ésta significativamente.

Estas actividades también pueden ser sintetizadas por plantas como mecanismo de defensa y producen la inhibición del crecimiento microbiano (Legrand *et al.*, 1987; Kombrik *et al.*, 1988; Mauch *et al.*, 1988 a y b; Benhamou *et al.*, 1990). La síntesis de estas enzimas en la planta puede ser inducida por el ataque de hongos fitopatógenos (Barber *et al.*, 1989) o por la presencia de determinadas sustancias químicas como el etileno (Boller *et al.*, 1983; Vögeli *et al.*, 1988; Mauch y Staehelin, 1989).

Los hongos producen estas actividades, las cuales pueden degradar las

paredes celulares de otros hongos (Villanueva y García-Acha, 1971; Peberdy, 1979) o bien su propia pared (Reyes y Lahoz, 1977; Pérez-Leblic *et al.*, 1982 a y b).

Las enzimas hidrolíticas son producidas por los hongos de manera constitutiva, o inducida por la presencia de determinadas sustancias o paredes aisladas de otros hongos en el medio de cultivo, como únicas fuentes de carbono (Sivan y Chet, 1989).

La especie *Trichoderma*, actualmente uno de los pocos agentes de biocontrol disponibles comercialmente (Campbell, 1989), es considerado como un buen agente frente a patógenos del suelo (Chet y Henis, 1985). Se ha demostrado (Chérif y Benhamou, 1990) que *Trichoderma harzianum* es capaz de producir quitinasas y β -1,3-glucanasas que degradan la pared celular de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, inhibiendo el crecimiento del patógeno. Además se han encontrado cepas de *T. harzianum* efectivas en el control biológico de *Rhizoctonia solani*, en medios con paredes celulares de este patógeno como única fuente de carbono (Hadar *et al.*, 1979; Elad *et al.*, 1982; Ridout *et al.*, 1986). La purificación de tres quitinasas de *T. harzianum* capaces de degradar paredes celulares de hongos fitopatógenos (De la Cruz *et al.*, 1992), confirman la importancia de esta actividad en el antagonismo de *Trichoderma* frente a otros patógenos.

1.2.5. Resistencia inducida en el hospedador.

Consiste en preparar los mecanismos de defensa del hospedador frente a un ataque del patógeno, mediante el reconocimiento y respuesta a un organismo menos dañino, el agente de biocontrol (Campbell, 1989). Éste puede ser una cepa avirulenta del patógeno, una forma especial diferente o una especie distinta relacionada con el patógeno (Cook y Baker, 1983; Campbell, 1989).

Un ejemplo es la resistencia inducida en el algodón durante tres meses frente a la cepa patogénica de *Verticillium albo-altrum* por pulverización de las raíces con una cepa medianamente patogénica de este hongo (Campbell, 1989).

1.3. Composición y estructura de la pared celular de hongos filamentosos.

La pared celular se localiza exteriormente a la membrana plasmática protegiéndola de factores externos. Esta estructura participa en fenómenos tales como permeabilidad, resistencia a antibióticos, respuesta inmune e interacción entre células. En la pared ocurren procesos de síntesis e hidrólisis de material constituyente de la misma.

El interés del estudio de la pared celular está motivado no sólo por el conocimiento de su estructura y procesos biosintéticos que en ella tienen lugar, también es interesante conocer los procesos morfogénicos y de diferenciación a través del conocimiento de su síntesis y estructura. A la hora de diseñar una estrategia de biocontrol de un microorganismo patógeno, es de gran interés el conocimiento de la composición y estructura de su pared celular.

1.3.1. Composición química de la pared celular.

La pared celular esta compuesta por sustancias químicas de diversa naturaleza, las cuales se describen a continuación:

a) Sales inorgánicas y orgánicas: se encuentran en baja proporción. En cuanto a las sales orgánicas, éstas pueden encontrarse constituidas tanto por cationes como por aniones orgánicos unidos a aniones o cationes inorgánicos respectivamente.

b) Pigmentos: Generalmente son del tipo de la melanina. Suelen estar asociados a quitina (Bull, 1970 a) y parecen estar relacionados con la resistencia a la lisis (Bull, 1970 b).

c) Lípidos: Se encuentran en una proporción que oscila del 2 al 10 % (Bull, 1970 a; Gómez-Miranda *et al.*, 1984; Sikkema,1984). Están constituidos por ácidos grasos saturados y carecen de ácido pahnitoleico en su estructura, esto les diferencia de los lípidos citoplasmáticos. Son los encargados de dotar de flexibilidad y tersura a la pared celular, así como del **carácter hidrofóbico** de los esporangióforos y esporas (Bartnicki-García, 1968).

d) Proteínas: Podría tratarse de contaminantes citoplasmáticos, pero se consideran como integrantes de la pared ya que el tratamiento de ésta con proteasas altera su ultraestructura (Hunsley y Bumett, 1970) y el tratamiento con urea 8 M, no disocia las proteínas de la pared (Mitchell y Taylor, 1969), aunque Bull (1970 a) si lo conseguía utilizando detergentes. En general se trata de glicoproteínas con una parte glucídica unida por medio de enlaces **O**-glucosídicos o N-glucosídicos (Berman, 1985). Las más estudiadas han sido las mananoproteínas de levaduras (Sentandreu y Northocote, 1969; Sentandreu y Lampen, 1970 y 1972). Algunas de ellas tienen actividad enzimática como carbohidrasas y enzimas implicadas en la síntesis y lisis de componentes de la pared celular (Mahadevan y Mahadkar, 1970; Bartnicki-García, 1973).

Las glicoproteínas de pared participan en distintos procesos, como activadores de la respuesta defensiva en el hospedador frente a hongos fitopatógenos (Keen y Legrand, 1980; Anderson, 1989), como elementos de anclaje a la planta en hongos fitopatógenos (Carpenter *et al.*, 1992; St. Leger *et al.*, 1992) o en procesos de agregación de las hifas fúngicas para formar cuerpos fructíferos (Wessels, 1994).

e) Glúcidos: Constituyen más del 80% en peso de la pared. Los azúcares más abundantes en orden decreciente son glucosa, galactosa, **N**-acetilglucosamina, glucosamina y **manosa**. En menor proporción pueden encontrarse galactosamina, ácido glucurónico, ramnosa, **xilosa**, arabinosa, ribosa y **fucosa**. Suelen encontrarse asociados en forma de **polisacáridos**, los cuales pueden ser de varios tipos: homopolisacáridos y heteropolisacáridos o como constituyentes de glicoproteínas. La composición química de estos polímeros, o sus combinaciones cambia según el grupo taxonómico de los diferentes hongos.

Como constituyentes de las paredes celulares de hongos filamentosos se

han encontrado los siguientes polímeros (Wessels y Sietsma, 1981):

- **β -1,3-glucanos** o glucanos R: Constituyen entre un 15% y un 30% del total. Son polímeros de D-glucosa con enlaces **β -1,3** y ramificaciones **β -1,6** (Sonnenberg et al., 1985).

- **α -1,3-glucanos** o glucanos S: Representan de un 15% a un 25% de los polisacáridos totales. Están constituidos por D-glucosa con uniones **α -1,3** con proporciones variables de enlaces α -1,4. Son muy abundantes en Ascomicetos y Basidiomicetos.

- **β -1,4-glucanos** o celulosa, esta presente en Oomicetos en lugar de la quitina y constituye **m 35-40%** del total, siendo el componente mayoritario.

- Quitina: Está constituida por cadenas sin ramificaciones, de N-acetilglucosamina con uniones β -1,4. Su porcentaje oscila desde un 5% a un 60% del total de la pared. Esta presente en las paredes de la mayoría de los hongos.

- **Quitosán**: Es un polímero de glucosamina con uniones **β -1,4**, puede considerarse como quitina desacetilada. Está presente en la pared de los Zigomicetos en lugar de la quitina (**Bartnicki-García** y Reyes, 1968).

- Polímeros de galactosamina: Están formados por unidades de galactosamina unidas por enlaces α -1,4. Se encuentran en la pared de algunos Ascomicetos (Farr et al., 1977).

- **Polisacáridos complejos**: Están constituidos por otros azúcares que se encuentran en menor proporción. **En** especies de ***Penicillium*** se ha encontrado un **β -glucogalactano** (Rupérez y Leal, 1987) y en ***Gliocadium viride*** galactomanoglucanos (Gómez-Miranda et al., 1990).

- Horno- y hetero-glucuranos: Son uno de los constituyentes principales de la pared de los Zigomicetos, aunque se han detectado en otras especies, como en ***Fusarium*** (Gancedo et al., 1966; Iwahara et al., 1990).

La composición de la pared parece estar estrechamente relacionada con la **filogenia** de los hongos y su taxonomía (**Bartnicki-García**, 1968; Leal et al., 1984). Su composición puede cambiar con la edad del cultivo (Petit y Schneider, 1983; Gómez-Miranda et al., 1984), aunque en algunos microorganismos no se han observado **tales** cambios (Gómez-Miranda y Leal, 1985).

1.3.2. Estructura de la pared celular.

Se pueden distinguir dos tipos de componentes en la pared celular: compuestos fibrilares y compuestos amorfos. Los primeros forman un esqueleto rígido, entre ellos están la quitina, celulosa y los **β -glucanos**. Los compuestos cementantes o amorfos están constituidos por ácidos **poliurónicos**, aminopolisacáridos, otros glucanos, proteínas y lípidos.

La estructura de la pared en general esta formada por compuestos fibrilares embebidos en una matriz amorfa observándose diferentes capas. La superficie externa de la pared celular suele ser lisa o ligeramente reticular mientras que la superficie interna es normalmente fibrilar y es difícil observar

una separación clara entre las diferentes capas. Como ejemplo en las paredes de *Neurospora crassa* (Figura 1.1.) se observan diferentes capas de componentes individuales y en la parte más interna de la pared microfibrillas de quitina cubiertas por material proteico y un retículo de glicoproteínas. La parte más externa de la pared es una capa lisa constituida por α y β -glucanos (Burnett, 1979). En *Schizophyllum commune* (Figura 1.2.), la pared en su capa más interna consiste en un conjunto de microfibrillas de quitina embebidas en un **R-glucano**. Esta tiene un recubrimiento de **S-glucano** formando una capa amorfa, de carácter ligeramente reticular. La capa más externa de la pared, es una mezcla de un β -glucano soluble en agua, con enlaces β -1,3 y β -1,6; no esta claro si este glucano es constituyente o no de la pared celular (Sietsma y Wessels, 1979).

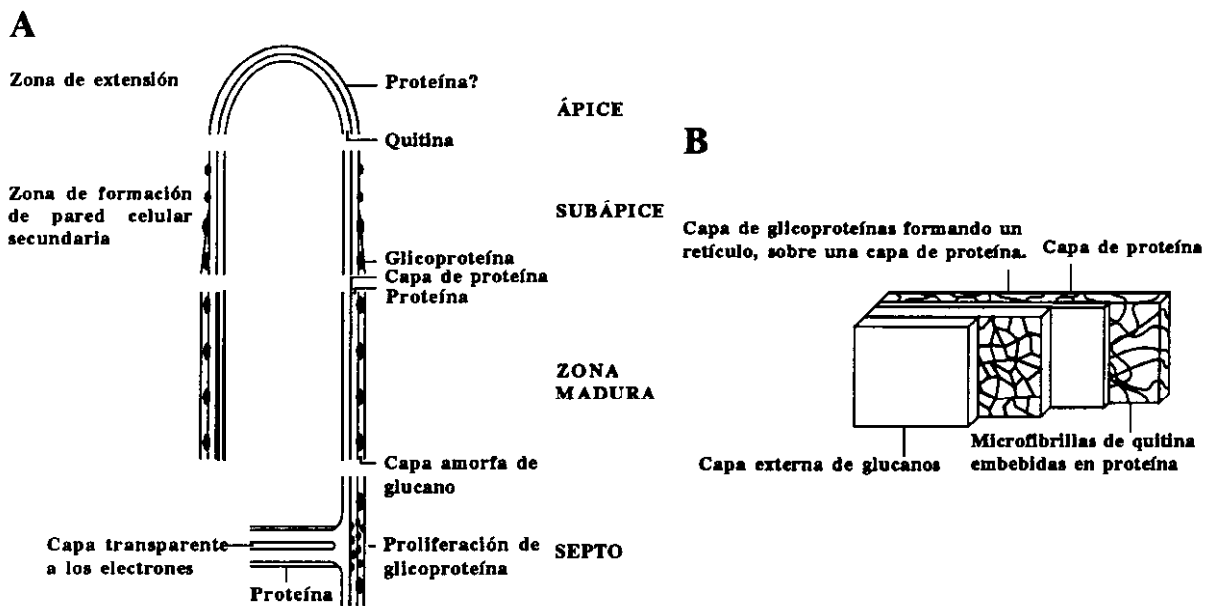


Figura 1.1. Esquema de la estructura de la pared celular (A) y las principales regiones existentes en la zona madura (B) de *Neurospora crassa* (Farkas, 1979).

Como consecuencia de esta estructura, la pared celular tiene una elevada resistencia mecánica. Se han observado enlaces covalentes quitina-glucano en *Aspergillus niger* (Stagg y Feather, 1973). Sietsma y Wessels (1979) describen la posible mediación de péptidos que contienen lisina, **citrulina** y ácido glutámico en enlaces entre β -glucano y quitina en las paredes de *Schizophyllum commune*. También se piensa en la mediación de histidina y lisina en *Verticillium albo-atrum* (Wang y Bartnicki-García, 1970). La unión puede ser también de tipo no covalente, fundamentalmente puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, así en levaduras Villa *et al.* (1986) han descrito complejos de glucano-manoproteínas unidos covalentemente o no. En el caso de unión covalente se pueden extraer las manoproteínas por digestión del complejo con glucanasas. Se ha propuesto que la arquitectura de las paredes de levaduras es resultado de la acumulación de determinados polímeros en los moldes

específicos formados por el complejo **glucano-manoproteínas** (Sentandreu, 1986).

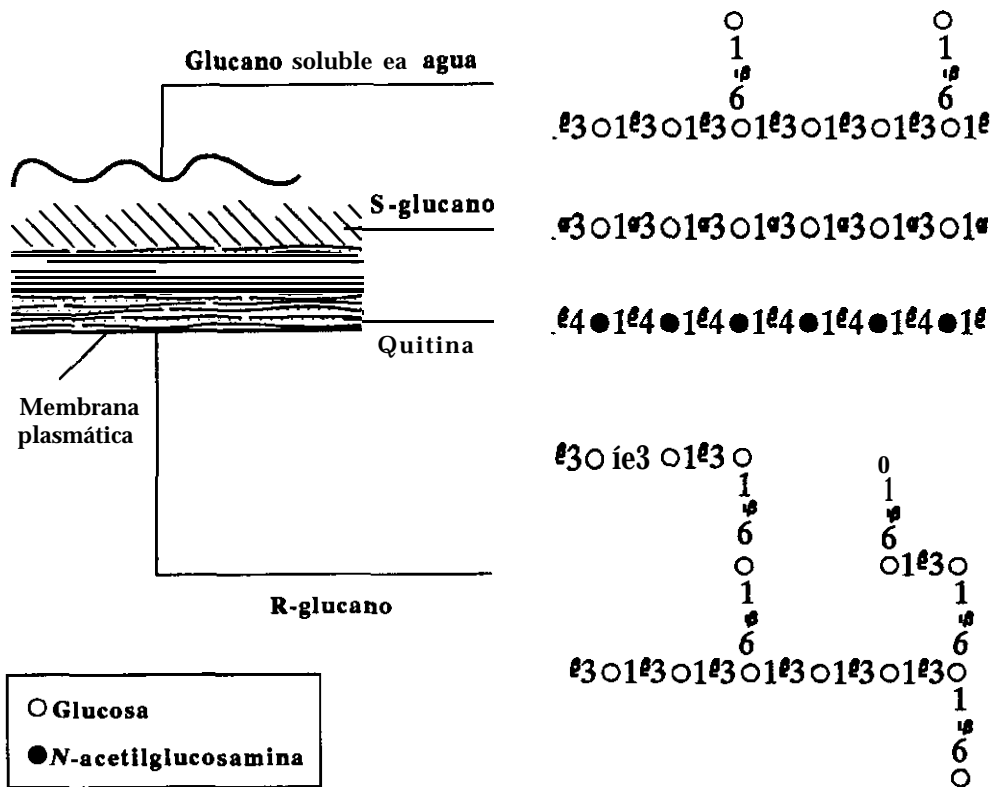


Figura 1.2. Esquema de la estructura de los polisacáridos presentes en la pared celular de *Schizophyllum commune* (Wessels y Sietsma, 1979).

1.4. **p-13 glucanasas de hongos filamentosos.**

Las **β -glucanasas** son enzimas producidas por muchas especies de hongos y levaduras y se encargan de la hidrólisis del enlace **β -glucosídico** de los **β -glucanos** (Figura 1.3.). En función del punto de ruptura en la cadena de **glucano**, se pueden diferenciar dos tipos de glucanasas, las que hidrolizan aleatoriamente enlaces intracadena dando lugar a **oligosacáridos** (endoglucanasas) o las que liberan moléculas de glucosa hidrolizando enlaces desde el extremo no reductor de la cadena (exoglucanasas) y las hay que pueden presentar ambos comportamientos (Figura 1.3.).

Las **β -glucanasas** tienen diversas funciones, como penetración en la pared celular de la célula del huésped (Albersheim et al., 1969), como mecanismo de defensa tanto del patógeno (Hohl et al., 1980) como del hospedador (Barber et al., 1989), participación en procesos que signifiquen un cambio en la pared celular y en el metabolismo de **polisacáridos** de reserva y extracelulares. Generalmente las **β -glucanasas** son específicas para cada tipo de enlace presente en un **β -glucano**, así existen **β -1,4**, **β -1,3**, **β -1,2**, **β -1,6-glucanasas** etc...

Dado que el enlace glucosídico más frecuente en los glucanos de la pared celular es el **β -1,3**, unas de las más estudiadas han sido las capaces de hidrolizar este tipo de enlace. Éstas están muy extendidas en la naturaleza y se encuentran

en la mayoría de los hongos (Bodenmann *et al.*, 1985; Ohno *et al.*, 1986; Pitson *et al.*, 1993) y bacterias (Kusama *et al.*, 1984; Beyer y Diekmann, 1984). También es destacable su presencia en plantas superiores (Bucheli *et al.*, 1985). Como todas las β -glucanasas, existen B-1,3 glucanasas con modo de acción **exo** o **endo**, aunque se han descrito con ambos modos de acción (Santos *et al.*, 1978 a; Pérez *et al.*, 1984); este hecho agiliza la hidrólisis de la pared celular. Durante la fase de crecimiento activo se localizan intracelularmente y **extracelularmente** asociadas a la pared celular y al comienzo de la fase de autólisis, en el líquido de cultivo incrementando sus niveles durante el transcurso de ésta (Pérez-Leblic *et al.*, 1985). En *Sclerotium rolfsii*, se ha descrito una β -1,3 glucanasa unida a la pared que se encuentra de forma latente y sólo es activa en los sitios de crecimiento de la misma (Kritzman *et al.*, 1978).

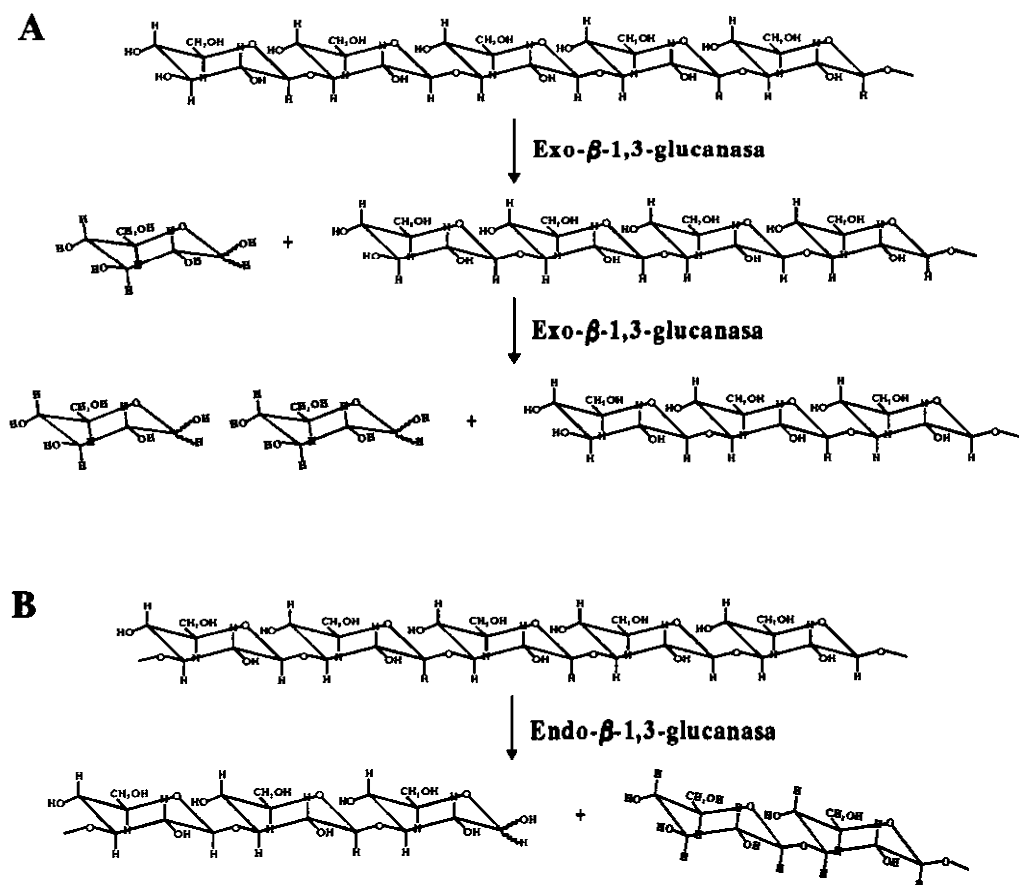


Figura 1.3. Esquema del mecanismo de acción de **exoglucanasas** (A) y **endoglucanasas** (B).

Se han sugerido diferentes mecanismos de síntesis y secreción de estas enzimas. El primero de ellos supone una síntesis regulada por represión por glucosa cuando esta presente en el medio de cultivo. Este hecho se ha puesto de manifiesto en el hongo *Neurospora crassa* en el que la actividad β -1,3 glucanasa aparece cuando la glucosa desaparece del medio de cultivo (Del Rey *et al.*, 1979). Igualmente **ocurre** en *Penicillium italicum* (Santos *et al.*, 1978 a), en el

Basidiomiceto QM806 (**Friebe** y Holldorf, 1975) y en bacterias (Lilley y **Bull**, 1974). Santos *et al.* (1978 b) encontraron que la producción de actividad β -1,3-glucanasa, **una** vez que la glucosa ha desaparecido del medio de cultivo, esta unida a una síntesis activa de proteínas. En *N. crassa*, se ha observado síntesis de β -1,3 glucanasa durante la fase de autólisis (Reyes *et al.*, 1981). Por parte de otros autores se establece una gran estabilidad de las β -1,3-glucanasas en el medio de cultivo, dado la permanencia de un nivel constante de actividad aún en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas (**Friebe** y Holldorf, 1975). Se ha comprobado que tras la adición de glucosa al medio de cultivo la actividad β -1,3-glucanasa puede seguir aumentando durante un cierto tiempo debido a que el **ARNm**, responsable de la síntesis de la enzima, acumulado en las células, no se ve afectado ni por la concentración de glucosa ni por inhibidores de su síntesis (Santos *et al.*, 1978 b). Al añadir glucosa al medio, la disminución de actividad no parece ser debida a una interacción directa **glucosa- β -1,3-glucanasa**, sino a la presencia de un sistema proteico inhibidor (**Friebe** y Holldorf, 1975). La represión catabólica por la glucosa parece ocurrir en un nivel anterior a la traducción en los ribosomas, bien en la síntesis de **ARNm** o en procesos posteriores de maduración o estabilización del mismo (Santos *et al.*, 1978 b). También se describe que el aumento de actividad al agotarse la fuente de carbono podría estar propiciado por la existencia de inductores de su síntesis **tales** como productos de la **hidrólisis enzimática** o glucanos resistentes a la hidrólisis (**Reese**, 1977).

Hay también casos en los que la actividad aumenta independientemente de la concentración de glucosa del medio, así **ocurre** en *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae* (Del Rey *et al.*, 1979). También se ha descrito su inducción en otras fases del ciclo biológico (**Nombela et al.**, 1980).

Además de los modos de regular su síntesis, se han descrito mecanismos que regulan su actuación, como pueden ser la modificación de la accesibilidad del **sustrato** al centro catalítico de la molécula de proteína (Bobbit *et al.*, 1977) modificando los enlaces intermoleculares o la hidrólisis por medio de proteasas en el caso de enzimas que se sintetizan en forma de **zimógenos** (Reichelt y **Fleet**, 1981).

En un mismo hongo se han descrito diferentes actividades β -1,3-glucanasas con diferentes modos de acción y que pueden tener diferentes cometidos dentro del ciclo celular. Santos *et al.* (1978 a) encontraron tres actividades β -1,3-glucanasas (**I, II y III**) en *P. italicum*, dos de ellas (II y III) implicadas en el crecimiento activo del hongo y la tercera (**I**) encargada de la movilización de los glucanos de reserva de la pared. Esta última solo aparece una vez ha desaparecido la fuente de carbono del medio de cultivo. En *Geotrichum lactis* Pérez *et al.* (1984) también han descrito tres β -1,3 glucanasas, dos participantes en el crecimiento activo y otra en el aprovechamiento de carbohidratos de reserva, aunque en este caso, están presentes durante las diferentes fases del crecimiento, incrementando su actividad específica en la fase

estacionaria. En *Aspergillus nidulans* se han descrito tres actividades β -1,3-glucanasas (I,II y III) durante la fase de autólisis de las cuales dos (I y II) están presentes durante todo el período degradativo y la III en los primeros y últimos días de la autólisis (Nuero *et al.*, 1993). Pitson *et al.* (1995), han purificado y caracterizado tres **exo- β -1,3-glucanasas** en *Acremonium persicinum* que tendrían funciones parecidas a las encontradas en *P. ifalicum*.

Las características físico-químicas y cinéticas de las **β -1,3-glucanasas** extracelulares de hongos filamentosos son muy variables. Generalmente sus **pHs** óptimos se encuentran entre 5 y 6, sus temperaturas óptimas entre 40 y 60 °C, sus masas moleculares en un rango de 20.000 a 80.000 Da y sus puntos isoeléctricos entre 3,4 y 9,8 unidades. Como propiedad importante destaca su gran estabilidad debido a su naturaleza glicoproteica. Sus **K_m** son bastante variables, desde 0,015 mg/ml hasta 1,7 mg/ml.

1.5. Interacción *Lycopersicum esculentum*-*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

El tomate, *Lycopersicum esculentum*, se extendió por Europa desde su introducción en el siglo XV. España dedica a su cultivo 60.400 Has de las cuales su mayoría son de regadío. La producción total es de 2,581.400 Tm, lo que supone una producción media de 428 Qm/Ha. La máxima producción se centra en las comunidades autónomas de Cataluña, Aragón, Murcia y Andalucía (Anuario de Estadística Agraria, 1988).

Una de las enfermedades que produce mayores pérdidas económicas es el marchitamiento vascular del tomate, éste puede ser provocado por dos especies de hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Verticillium dahliae*.

Dada la mayor presencia de casos de Fusariosis en plantas con síntomas de marchitamiento vascular, en este trabajo nos centramos en el estudio de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

F. oxysporum f.sp. *lycopersici* es un patógeno específico de tomate. Al principio de la enfermedad no se notan efectos visibles. Más tarde, se observa un amarilleamiento que finaliza con la necrosis total o parcial del limbo y un marchitamiento brusco en ocasiones irreversible. También pueden observarse epinastias o inclinación de los peciolos. Una vez la enfermedad ha avanzado durante unas semanas se oscurece el sistema vascular en el interior de los tallos, hecho que se refleja en la aparición en el exterior de una **estría** pardo-marrón (Tello y Lacasa, 1990).

Es de suma importancia el conocimiento del ciclo de vida del patógeno para estudiar el desarrollo de la enfermedad, éste incluye: una fase saprofítica, otra parasitaria y sucesivas fases de colonización y patogénesis en el hospedador. Una vez muere el tejido afectado, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* comienza su fase saprofítica y en el suelo debe competir con otros microorganismos por nichos adecuados de crecimiento y energía. Para

sobrevivir, *F. oxysporum f.sp. lycopersici* forma clamidosporas desde hifas, tubos germinativos o macroconidias. Las clamidosporas le permiten subsistir en el suelo durante largos períodos de tiempo a la espera de atacar a un nuevo cultivo. Las clamidosporas germinan como respuesta a estímulos nutritivos, generalmente la presencia de las raíces del hospedador, iniciándose una infección que ocurre en **tres** fases (Beckman, 1987).

- a) Penetración del patógeno en los tejidos externos y elementos vasculares.
- b) Colonización del sistema vascular.
- c) Desarrollo de síntomas en el hospedador.

El control de esta enfermedad no ha sido aún conseguido de manera eficaz por esto en esta Tesis se ha seleccionado un hongo no patógeno, *A. nidulans*, productor de **β -1,3-glucanasas** y quitinasas. En este hongo se estudia el sistema enzimático encargado de la degradación de los **β -1,3-glucanos** y su efectividad en la hidrólisis de **la** pared celular de *F. oxysporum lycopersici* raza 2.

1.6. Características de *A. nidulans*.

El microorganismo elegido para el presente trabajo **es *Aspergillus nidulans*** (Eidam) Winter CECT 2544, debido a que es productor de quitinasas y **β -1,3-glucanasas** (Reyes et *al.*, 1988; Nuero et *al.*, 1993) y a la hidrólisis observada de las paredes de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* raza 2 con enzimas líticas de este hongo (Alfonso et *al.*, 1992).

Según la composición de su pared celular, **está** encuadrado dentro del grupo V (quitina-glucano) de la clasificación de Bartnicki-García (1968). De acuerdo con la clasificación de Ainsworth (1973) *A. nidulans* se encuentra dentro de la División: *Eumycota*, Subdivisión: *Ascomycotina*, Clase: *Ascomycetes*, Subclase: *Plectomycetes*, Orden: *Eurotiales*, Familia: *Eurotiaceae*. *A. nidulans* **es** el estado **anamorfo** o imperfecto que corresponde al estado telemorfo **o** perfecto *Emericella nidulans*.

A. nidulans forma un micelio con hifas tabicadas y uninucleadas que presentan crecimiento apical. Como integrante de los *Ascomycetes*, **su** reproducción sexual tiene lugar en cuerpos fructíferos, dando lugar a ascosporas que se encuentran en el interior de una estructura **sacular** que recibe el nombre de asca. Las ascosporas se presentan en un **número** variable que oscila de 4 a 8. La reproducción asexual de *A. nidulans* se realiza mediante la formación de conidios. Estos se producen en conidióforos en forma de copa (Figura 1.4.), generalmente no septados, verticales y terminados en forma globosa o hinchada. Las fiálides se distribuyen **radialmente** por toda su superficie.

Las especies de *Aspergillus* se encuentran comúnmente en el suelo en climas templados, en el compost, residuos de plantas y grano almacenado. Algunas cepas **y** variedades de *A. nidulans* han sido descritas como parásitos de **uñas** en humanos y como patógenos de animales. Tienen importancia en procesos de degradación y existen como saprófitos (Raper y Fanell, 1965).

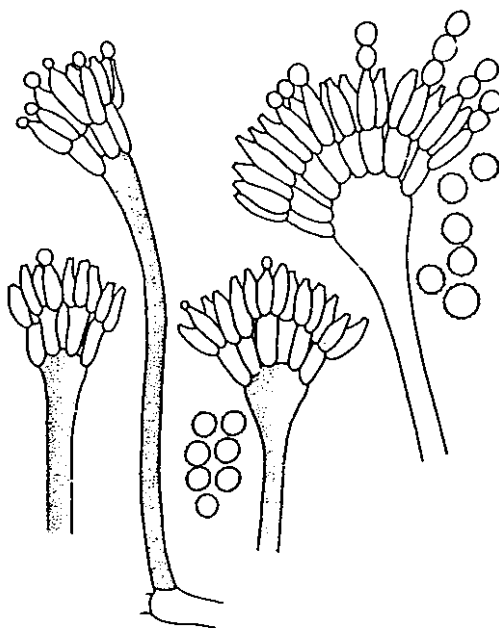


Figura 1.4. Conidióforos de *Aspergillus nidulans*.

1.7. Objetivos v planteamiento del trabajo.

Cada hongo es capaz de producir y excretar al medio de cultivo las enzimas líticas necesarias para degradar su pared celular durante su proceso degradativo (Pérez-Leblic et al., 1982 a, 1982 b; Reyes *et al.*, 1984; Martínez *et al.*, 1986). En la fase de autólisis las actividades hidrolíticas experimentan un aumento en el líquido de cultivo a partir de su inicio (KO y Lockwood, 1970; Lahoz *et al.*, 1976). Dado que los **β -1,3 glucanos** conjuntamente con la quitina son los componentes mayoritarios de la pared celular de los hongos filamentosos, el estudio de estas enzimas extracelulares es de utilidad para su posible aplicación en la degradación de la pared de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 2 (**Fo12**).

A la vista de lo **anteriormente** descrito, el plan de trabajo propuesto es el siguiente:

- 1.-** Selección del hongo antagonista ***A. nidulans*** por ser productor de quitinasas y **β -1,3-glucanasas** (Reyes *et al.*, 1988; Nuero *et al.*, 1993) y por la hidrólisis observada de las paredes de **Fo12** con enzimas líticas de ***A. nidulans*** (Alfonso *et al.*, 1992).
- 2.-** Estudio de las actividades quitinasa y **β -1,3-glucanasa**, implicadas en la degradación de la pared celular, producidas por ***A. nidulans*** durante su crecimiento y autólisis.
- 3.-** Estudio de la producción de las enzimas responsables de la actividad **β -1,3-glucanasa** producida por ***A. nidulans*** durante la fase de autólisis en los distintos medios suplementados.

4.- Purificación de las β -1,3-glucanasas de cultivos autolizados de *A. nidulans*.

5.- Estudio **cinético** y propiedades físico-químicas de las β -1,3-glucanasas purificadas.

6.- Comparación de las proteínas estudiadas basándose en:

a) Propiedades físico-químicas.

b) Parámetros cinéticos.

c) Modo de acción.

7.- Obtención de paredes celulares de **Fo12** y fracciones de las mismas.

8.- Degradación de las paredes celulares de **Fo12 y sus** fracciones por el crudo **enzimático de A. nidulans** y por sus β -1,3-glucanasas purificadas.

Con el presente plan de trabajo se tratan de alcanzar los siguientes objetivos:

1.- Caracterización de las β -1,3-glucanasas **de A. nidulans**.

2.- Determinación de la especificidad y modo de acción de éstas enzimas.

3.- Asignación de unas determinadas funciones a las β -1,3-glucanasas purificadas, durante la **autólisis** de *A. nidulans*

4.- Determinación del papel que pudieran tener las β -1,3-glucanasas purificadas en el control biológico por lisis **de Fo12** por *A. nidulans*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Microorganismos empleados.

Aspergillus nidulans (Eidam) Wmter CECT 2544 (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia).

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen raza 2 aislado de plantas de tomate parasitadas (Dr. J. Tello, INIA, Madrid) (Fol2).

2.2. Mantenimiento de los microorganismos.

Los hongos se mantuvieron a una temperatura de 25 a 27 °C, en tubos inclinados de agar-patata-dextrosa, resemebrándose periódicamente.

2.3. Medios de cultivo.

2.3.1. Medio agar-patata-dextrosa.

El medio agar-patata-dextrosa tenía una composición por litro de medio de: 200 g de infusión de patata, 20 g de bacto dextrosa, 15 g de bacto peptona y 20 g de agar. Este medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 15 minutos.

2.3.2. Medio de Reyes y Byrde (1973) suplementado con extracto de levadura (Medio basal).

El medio basal contenía por litro 10 g de glucosa, 2 g de tartrato amónico; 1 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de KCl ; 1 g de extracto de levadura (Difco) y 1 ml de una disolución de oligoelementos cuya composición por litro de disolución era la siguiente: 100 mg de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 70 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 50 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 10 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 10 mg de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. El medio se esterilizó durante 20 minutos a 110 °C, siendo su pH de 5,5 unidades.

2.4. Preparación del inóculo.

De cultivos en agar-patata-dextrosa de 10 a 20 días de crecimiento, dependiendo del hongo, se preparó una suspensión de esporas en agua estéril con una concentración aproximada de 10^6 esporas por mililitro.

2.5. Condiciones de cultivo.

Para el estudio del crecimiento del hongo, éste se cultivó en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo. Se inocularon con 0,1 ml de suspensión de esporas, en condiciones de cultivo estacionario a 25 °C. Para la obtención del crudo **enzimático** para la **purificación** se aumentó la escala de trabajo utilizando matraces de 1 l de capacidad, volúmenes de medio e inóculo proporcionales y las condiciones de cultivo descritas.

2.6. Toma de muestra.

Las muestras se tomaron diariamente por triplicado para determinar el día de peso máximo de micelio, que coincide con el principio de la autólisis. Posteriormente, las muestras se tomaron cada 5 días, también por triplicado. En cada muestra se realizaron las siguientes operaciones:

- A) Separación del micelio y del líquido de cultivo por **filtración** a vacío. La masa del micelio se lavó varias veces con agua destilada.
- B) El líquido de cultivo se llevó a su volumen inicial (20 ml) con agua destilada, analizando en el mismo: sustancias reductoras, proteínas, actividades enzimáticas, pH, conductividad y carbohidratos totales.
- C) El micelio se secó en una estufa a 60 °C durante 24 horas, de donde se pasó a un desecador, pesándose posteriormente.

2.7. Parámetros valorados en las muestras.

2.7.1. Grado de autólisis.

El grado de autólisis de un hongo se expresa como el porcentaje de pérdida de peso seco del micelio con respecto a su peso máximo.

2.7.2. pH.

El pH del líquido de cultivo se determinó en un pH-metro digital Orion SA 720.

2.7.3. Conductividad.

La conductividad del líquido se determinó en un conductímetro digital Crison 522.

2.7.4. Sustancias reductoras libres.

Se determinaron las sustancias reductoras del líquido de cultivo mediante el método de Somogyi (1945), en combinación con el método de Nelson (1944), usando glucosa como patrón.

2.7.4.1. Preparación de reactivos.

Reactivo alcalino de Somogyi:

- 24 g de Na_2CO_3 anhidro y 12 g de tartrato sódico potásico (Sal de la Rochelle) en 250 ml de agua destilada.
- 4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 40 ml de agua destilada. Esta disolución se añade a la anterior con agitación constante. Se añaden lentamente 16 g de NaHCO_3 .
- 180 g de Na_2SO_4 anhidro se disuelven en 500 ml de agua destilada y se hierven para desgasificar. Una vez que se enfrían se le añade la mezcla anterior y se completa el volumen hasta 1000 ml con agua destilada. Este

preparado se guarda en frasco topacio.

Reactivo de Nelson:

- Se añaden con agitación constante y con cuidado 21 ml de H_2SO_4 concentrado sobre una disolución de 25 g de molibdato amónico en 450 ml de agua destilada.
- A continuación se disuelven 3 g de arseniato sódico en 25 ml de agua destilada y se mezcla con la solución anterior. El reactivo se guarda en **una** estufa a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se guarda en frasco topacio.

2.7.4.2. Procedimiento.

A 100 μl de líquido de cultivo se le añaden 100 μl de reactivo de Somogyi y se calientan en **baño** de agua a ebullición durante 15 minutos. Se enfría y se añaden 100 μl del reactivo de Nelson. Se agita de nuevo y se completa el volumen hasta 1,5 ml con agua destilada, leyéndose la absorbancia a 540 nm.

2.7.5. **Glucosamina.**

La concentración de glucosamina y sus oligómeros se determinó por el método de **Tracey** (1954). Se utilizó glucosamina como **patrón**.

2.7.5.1. Prenaración de los reactivos.

- Acetilacetona al 4% en Na_2CO_3 1 N. Esta solución se prepara diariamente.
- Etanol del 95%.
- Reactivo de Ehrlich: Se disuelven 1,6 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 30 ml de **HCl** concentrado y 30 ml de etanol del 95%

2.7.5.2. Procedimiento.

A 100 μl de problema se le añaden 50 μl de reactivo de acetilacetona y se calientan en baño de agua a ebullición durante 20 minutos. En **frío**, se añaden 0,35 ml de alcohol del 95% y 50 μl de reactivo de Ehrlich para glucosamina. Se lee la absorbancia a 520 nm.

2.7.6. **N-acetilglucosamina.**

Para determinar la concentración de N-acetilglucosamina y oligómeros de la misma, se utilizó el método de **Tracey** (1954). Se utilizó como patrón *N*-acetilglucosamina.

2.7.6.1. Prenaración de los reactivos.

- Solución saturada de borato sódico.
- Reactivo de Ehrlich: 2 g de p-diethylaminobenzaldehído disueltos en

100 ml de ácido acético glacial y 5 ml de HCl concentrado.
- **Acido** acético glacial.

2.7.6.2. Procedimiento.

Se toman 100 μl de problema y se añaden 33 μl de solución de borato sódico, calentándose en baño de agua a ebullición durante 7 minutos. Ya en frío, se añade 1 ml de ácido acético glacial y 100 μl de reactivo de Ehrlich para *N*-acetilglucosamina. Después de una hora a temperatura ambiente, se lee la absorbancia a 540 nm.

2.7.7. **Proteínas.**

Las proteínas se valoraron por los métodos de **Lowry** et al. (1951), Bradford (1976) y espectrofotométricamente midiendo absorbancia a 280 nm. Se empleó albumina de suero bovino como patrón.

2.7.7.1. Método de Lowry.

Reactivos empleados.

- Reactivo A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1 N.
- Reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5%.
- Reactivo B': Tartrato sódico potásico al 1%.
- Reactivo C: Solución alcalina de cobre. Se mezclan 5 ml de reactivo A con 50 μl de reactivo B y 50 μl de reactivo B'.
- Reactivo D: Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada en proporción 1: 1.

Procedimiento.

A 120 μl de extracto enzimático se añaden 600 μl de reactivo C y se incuba a 37 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se añaden a cada tubo 60 μl de reactivo D. Los tubos se ponen a incubar de nuevo a 37 °C durante 30 minutos. Se lee la absorbancia a 660 nm.

2.7.7.2. Método de Bradford.

Reactivos empleados.

Se utilizó el reactivo de Bradford comercializado por Bio-Rad en las condiciones descritas en su protocolo para el microensayo, para valorar concentraciones de proteína de 1 a 25 $\mu\text{g/ml}$.

Procedimiento.

Se mezclan 800 μl de la muestra, diluida convenientemente, con 200 μl de reactivo concentrado y se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurridos éstos, se lee la absorbancia a 595 nm. Paralelamente se procesa

un blanco con 200 μ l de agua destilada.

2.7.8. Carbohidratos totales.

Para su determinación se utilizó el método de Trevelyan y Harrison (1952). Como patrón se utilizó glucosa.

2.7.8.1. Preparación de reactivos.

- Reactivo A: A 200 ml de agua desionizada se añaden lentamente con agitación y en baño de hielo 750 ml de **ácido** sulfúrico concentrado.
- Reactivo B: 200 mg de antrona disueltos en 100 ml del reactivo A.

2.7.8.2. Procedimiento.

A 60 μ l de muestra se añaden 300 μ l del reactivo B, se agita la mezcla y se hierve en **baño** de agua durante 10 minutos. Al cabo de este tiempo se agita y deja enfriar. Una vez frío se lee la **absorbancia** a 660 nm.

2.7.9. Valoración de actividades enzimáticas.

En el líquido de cultivo se valoraron las actividades **β -1,3-glucanasa** y quitinasa según los métodos descritos en el apartado 2.10.

2.8. Preparación de los sustratos enzimáticos.

2.8.1. Quitina.

2.8.1.1. Preparación de quitina a partir de cutícula de gamba.

Para su obtención se utilizó el método de Jeniaux (1966).

Las cáscaras de gambas se lavan durante dos horas con un detergente para eliminar las partículas residuales. El detergente se elimina lavando varias veces con agua destilada. A continuación se tratan con **HCl** 1 N, añadiéndolo poco a poco y con agitación hasta que deje de desprenderse CO₂, y se lavan varias veces con agua destilada. Después, se mantienen en un baño de agua a ebullición con **NaOH** 0,5 N durante 30 minutos de forma que la sosa extraiga los pigmentos. La sosa se elimina lavando con agua destilada. Posteriormente se tratan con **KMnO₄** al 0,5% a 60 °C durante 20 minutos. Se vuelve a lavar varias veces con agua destilada y se tratan con **una** disolución saturada de piro-sulfito sódico como agente reductor. A continuación se elimina la **arenilla** que pudieran contener lavándolas con agua hirviendo. Una vez terminado este proceso **los** lípidos se extraen por tratamiento con alcohol absoluto durante 30 minutos y se lavan con agua destilada. Por último, se tritura en medio acuoso, se centrifuga a 4000 g, se lava con acetona y se seca con una corriente de aire estéril.

2.8.1.2. Preparación de quitina coloidal.

A 200 mg de quitina se añaden 5 ml de agua destilada y se coloca sobre

un baño de hielo. A continuación, se le agregan agitando **6,4** ml de ácido sulfúrico concentrado.

Una vez disuelta la quitina, ésta se agrega muy lentamente y agitando a 108 ml de etanol frío al 50%. La quitina así precipitada se centrifuga y se lava con agua destilada fría hasta que el pH sea aproximadamente de 5 unidades, después de lo cual se centrifuga de nuevo. La quitina en medio acuoso, se guarda a 4 °C para preparar un coloide en el momento oportuno.

2.8.2. Xilano.

2.8.2.1. Preparación de xilano coloidal.

A 200 mg de xilano, se le añaden 2 ml de **NaOH** 1 N. Una vez disuelto el **xilano** se añade, agitando, **HCl** 1 N, hasta que el pH de la mezcla es neutro. El xilano precipitado, se centrifuga y lava con agua destilada hasta que desaparezcan todos los iones. Posteriormente, se centrifuga de nuevo y se recoge el precipitado. Esta masa de xilano coloidal se guarda en nevera a 4 °C para preparar un coloide en el momento de **usarlo**.

2.83. Curva de peso seco de sustratos coloidales.

Se prepara un coloide de cada **sustrato** en agua destilada, se toman diferentes **volúmenes**, se llevan hasta 1 ml con agua destilada y se lee su turbidez en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm. Del coloide preparado se toman 1,5 ml y 2 ml y se llevan a sequedad (24 horas a 70 °C) en pesasustancias previamente tarados. Una vez fríos, se vuelven a pesar y los $\mu\text{g/ml}$ de **sustrato** en el coloide se calculan por diferencia.

2.8.4. Preparación de laminarina oxidada.

Con objeto de determinar la actividad **endo- β -1,3-glucanasa** se preparó laminarina oxidada por el método de Goldstein (1965).

Se prepara **una** solución de 25 mg de laminarina en 25 ml de agua y sobre ésta se añaden 25 ml de una solución 30 **mM** de periodato sódico. La mezcla se deja a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 96 horas. Una vez transcurrido ese tiempo se añade etilenglicol para eliminar el exceso de periodato. A continuación, la mezcla se dializa frente a agua destilada durante 24 horas. El dializado se liofiliza para su posterior utilización.

2.8.5. Preparación de laminaribiosa y oligómeros de glucosa.

Se obtuvo laminaribiosa y una mezcla de oligómeros de glucosa de diferente peso molecular por hidrólisis química de **laminarina**. Para ello, se disolvían 10 mg de laminarina en 2 ml de ácido sulfúrico **0,5** N y se calentaban durante 1 hora a 100 °C. Una vez transcurrido este tiempo se neutralizaba la mezcla de reacción con **Ba(OH)₂**. Se centrifugaba a 3.000 g para eliminar el precipitado de **BaSO₄** y el sobrenadante se cargaba en la columna de Bio-Gel

P-2 descrita en el apartado 2.15.2.1. El peso molecular de los oligómeros se calculó a partir de su volumen de **elución**. El enlace **β -1,3** de la laminaribiosa se **caracterizó** por Resonancia Magnética Nuclear (^1H -RMN) en un aparato Varian Unity 500 a 500 Mhz a 30 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura, utilizando D_2O como disolvente, **referenciando** sobre el HDO residual a 4,71 ppm. Para realizar el espectro la laminarinobiosa se deuteroó como se indica en el apartado 2.17.8.1.

2.9. Preparación de disoluciones tampón.

Dependiendo del rango de pH deseado se utilizaron los siguientes tampones: acetato, fosfato, tartrato y citrato-fosfato-borato. Los tampones acetato, fosfato y tartrato se prepararon con una solución del ácido a la **molaridad** deseada, ajustando el pH necesario con una solución de **NaOH** 10 M.

Para preparar el tampón citrato-fosfato-borato al pH necesario, se mezclaron 20 ml de una solución A (ácido cítrico 33 mM, H_3PO_4 33 mM, H_3BO_3 66 mM y NaOH 334 mM) con la cantidad apropiada de otra solución B (HCl 0,1 M) **añadiendo** la cantidad necesaria de agua destilada para ajustar el volumen **final**.

2.10. Valoraciones enzimáticas.

2.10.1. Actividad β -1,3-glucanasa.

2.10.1.1. Sustrato.

Se utilizó una disolución de **laminarina** a una concentración de 1 mg/ml en tampón fosfato 50 mM, pH 5,5.

2.10.1.2. Procedimiento.

De la disolución de sustrato, se incubaron 50 μl con 50 μl de líquido de cultivo a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, llevando paralelamente con el problema blancos de líquido de cultivo y de sustrato.

La actividad de esta enzima se determinó por la liberación de glucosa, la cual se medía por el método de Somogyi (1945) en combinación con el de Nelson (1944), de la manera descrita en el apartado 2.7.4.

Una unidad de actividad **β -1,3-glucanasa** se define como la cantidad de enzima que libera un μmol de glucosa por minuto.

2.10.2. Actividad β -glucosidasa.

2.10.2.1. Sustrato.

Como **sustrato** se utilizó una disolución 2 mM de *p*-nitrofenil- β -D-glucósido en tampón fosfato 50 mM, pH 5,5.

2.10.2.2. Procedimiento.

A 250 μl de disolución de **sustrato** se añadían 225 μl de tampón fosfato 50 **mM**, pH **5,5** y sobre esta 25 μl de solución enzimática. La actividad β -glucosidasa se determinó por la liberación de p-nitrofenol en la hidrólisis enzimática. Para ello, se registró el aumento de **absorbancia** de la mezcla de reacción a 420 nm durante 2 minutos. Paralelamente se procesaron controles de enzima y sustrato.

Una unidad de actividad β -glucosidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de p-nitrofenol durante un minuto. Para construir una recta patrón se utilizaron disoluciones a distintas concentraciones de p-nitrofenol en tampón fosfato 50 **mM**, pH **5,5**.

2.10.3. **Actividad quitinasa.**

2.10.3.1. Sustrato.

Se utilizó como **sustrato** quitina coloidal en tampón fosfato 50 **mM**, pH **5,5** a una concentración de 1 **mg/ml**.

2.10.3.2. Procedimiento.

Se incubaron 50 μl de **sustrato** con 50 μl de líquido de cultivo durante 30 minutos, llevándose paralelamente blancos de líquido de cultivo y sustrato.

La actividad se valoró por liberación de **N-acetilglucosamina**, la cual se determinó por el método de **Tracey** (1954) descrito en el apartado 2.7.6.

Una unidad de actividad quitinasa se **define** como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de **N-acetilglucosamina** por minuto.

2.11. Estudio de la producción de actividades enzimáticas en diferentes medios sudementados.

2.11.1. **Sustancias añadidas en el medio.**

Se emplearon como aditivos en el medio: celulosa (C), homogeneizado de plántulas de *Lycopersicum esculentum* (Tomate, variedad Novy) (PL), laminarina (L), pectina (P), quitina (Q) y xilano (X).

2.11.2. **Procedimiento.**

El experimento se llevó a cabo en el medio basal, utilizado como control y en otros 6 medios suplementados cada uno con 500 $\mu\text{g/ml}$ de las diferentes sustancias.

Los medios se distribuyeron a razón de 20 ml en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Se tomaron tres matraces por cada medio, cada día durante el crecimiento y cada 5 días después del comienzo de la autólisis, para determinar los parámetros físico-químicos del hongo, así como las actividades **enzimáticas** implicadas en la degradación de la pared celular: quitinasa y β -1,3-glucanasa.

2.12. Estudio de la producción de la actividad β -1,3-glucanasa por FPLC en diferentes medios sudementados.

El objeto de este estudio es conocer la evolución a lo largo del proceso degradativo de las actividades β -1,3-glucanasas parciales y total.

Los medios suplementados con las diferentes sustancias descritas en el apartado 2.11.1. se repartieron en porciones de 200 ml en matraces Erlenmeyer de 1 l. Se sacaron muestras a los 10, 30 y 50 días de crecimiento y se separaron los micelios del líquido de cultivo por centrifugación. En el sobrenadante se precipitaron las proteínas con ácido tánico al 1% como se describe en el apartado 2.134. El total del precipitado se diluyó en 2,5 ml de tampón fosfato 10 mM, pH 7,5. Estas disoluciones se centrifugaron para eliminar la parte insoluble y se pasaron a través de una columna PD-10 (Pharmacia) para eliminar sales y un pigmento rojizo. Se cargó 1 ml del eluido en el sistema descrito en el apartado 2.15.3.2. utilizando como fase móvil tampón fosfato 10 mM, pH 7,5. Las proteínas retenidas se eluyeron utilizando un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,5 M realizado en 28 minutos. Se registró la absorbancia a 280 nm en el eluido y en los picos separados se analizó la actividad β -1,3-glucanasa.

2.13. Métodos de precipitación y concentración de proteínas.

Tras concentrar cinco veces el líquido de cultivo en un rotavapor a temperatura ambiente, se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos y en el sobrenadante se precipitaron las proteínas mediante los siguientes métodos.

2.13.1. Precipitación fraccionada con acetona.

A un determinado volumen de líquido de cultivo a 4 °C se añadió acetona a 4 °C para obtener concentraciones finales del 40, 60 y 80%, agitando la mezcla suavemente en baño de hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos, a 4 °C. Los precipitados obtenidos se disolvieron en tampón fosfato 10 mM pH 5,5, eliminando los restos de acetona en un rotavapor.

2.13.2. Precipitación fraccionada con etanol.

Sobre un volumen de líquido de cultivo a 4 °C se añadió etanol a 4 °C para obtener concentraciones finales del 40, 60 y 80%, agitando la mezcla suavemente en baño de hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos, a 4 °C. Los precipitados obtenidos se disolvieron en tampón fosfato 10 mM, pH 5,5, eliminando los restos de etanol en un rotavapor.

2.13.3. Precipitación fraccionada con sulfato amónico.

Se utilizó un método similar a los anteriores, manteniendo la temperatura a 4 °C durante todo el proceso. Al líquido de cultivo se añadieron las cantidades de sulfato amónico necesarias para alcanzar porcentajes del 50, 70 y 90% de

saturación, agitando suavemente la mezcla durante una hora en baño de hielo. La mezcla se centrifugó a 3.000 g durante 40 minutos. Los precipitados obtenidos se disolvieron en agua y se dializaron.

2.13.4. Precipitación con ácido tánico.

Se siguió el método de Shibata y Nisizawa (1965). El líquido de cultivo a 4 °C se precipitó con ácido tánico al 1%, dejándolo a 4 °C durante 90 minutos. El precipitado obtenido se lavó tres veces con acetona a 4 °C, secándose en baño de hielo con **una** corriente de aire filtrado. Este precipitado se guarda en nevera a 4 °C.

2.14. Técnicas cromatográficas.

2.14.1. Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina se empleó para la identificación de los productos procedentes de la hidrólisis tanto química como enzimática. Como fase estacionaria se utilizaron placas de Silicagel 60 F₂₅₄ de 20 x 20 cm y **0,25** mm de espesor (**Merck**). Para su desarrollo se empleó la técnica de Kusama *et al.* (1986) utilizando como fase móvil una mezcla **CHCl₃:CH₃OH:H₂O** en proporción **95:65:15**. Cada uno de los experimentos se sometió a 3 desarrollos y se revelaron pulverizando **H₂SO₄** al **50%**, calentando posteriormente a 140 °C durante 4 minutos.

2.14.2. Cromatografía de exclusión molecular.

2.14.2.1. Separación de oligómeros de glucosa en Bio-Gel P-2.

Para la separación de oligómeros de glucosa procedentes de la hidrólisis química de la laminatina se utilizaron dos columnas en serie (Pharmacia C **16/70** y K **26/40**) utilizando como fase estacionaria Bio-Gel P-2 (Bio-Rad). El volumen de exclusión se calculó con azul de dextrano y fue de 140 ml. Las muestras se eluyeron con agua destilada, utilizando un flujo de 24 ml h⁻¹ recogiendo fracciones de **3,5** ml y detectando la presencia de azúcares por el método de Trevelyan y Hanison (1952) descrito en el apartado 2.7.7. La columna se calibró utilizando los siguientes patrones: Glucosa (PM= **180**), Gentiobiosa (PM= 342) y Rafinosa (PM= 504). Se construyó una curva de calibrado representando los valores del logaritmo del peso molecular de cada azúcar frente a su volumen de **elución**. De esta manera, determinando el volumen de **elución** de los oligómeros separados, se pudo calcular su peso molecular.

2.14.2.2. Purificación de proteínas en Sephadex G-200.

Se utilizó una columna Pharmacia K **26/70** utilizando como fase estacionaria Sephadex G-200 (Pharmacia). El volumen de exclusión se calculó

utilizando azul de dextrano y fue de 140 ml. Se cargaron muestras de **2,5 ml** procedentes de la parte no retenida en la columna de DEAE Bio-Gel A descrita en el apartado 2.14.3.1. Las muestras se eluyeron con tampón fosfato **50 mM**, pH **6,5** con un **0,02%** de **NaN₃**. El flujo fue de **20 ml h⁻¹** y se recogieron fracciones de 4 ml. Se midió la absorción del eluido a **280 nm** y en cada una de las fracciones recogidas se valoró la actividad **β -1,3-glucanasa**.

2.14.2.3. Purificación de proteínas en Superosa 12 HR 10/30 FPLC.

Para la separación de proteínas y cálculos de masa molecular se utilizó el sistema siguiente:

- Inyector Rheodyne 7125 con una espira de **200 μ l**.
- Columna Pharmacia **Superosa 12 HR 10/30 FPLC**.
- Monitor de longitud de onda variable LKB 2141.
- Bomba formadora de gradiente LKB 2249.
- Registrador Perkin-Ehner 56.
- Ordenador a-Net 386 DX.
- Paquetes informáticos HPLC manager versión 1.00 y Nelson versión 5.5.5.

Se cargaron muestras de **200 μ l** de volumen y se eluyeron con tampón acetato **10 mM**, pH **5,0**, **NaCl 150 mM** con el fin de evitar la adsorción de las proteínas al gel. El flujo fue de **12 ml h⁻¹**. En el eluido se valoró la actividad **β -1,3-glucanasa** y se midió su absorción a **280 nm**. La columna se calibró utilizando las siguientes proteínas patrones de masa molecular conocida: fosforilasa B (97.400 Da), albúmina bovina (66.000 Da), albúmina de huevo (45.000 Da) y anhidrasa carbónica (29.000 Da). Se construyó una curva de calibrado representando los valores del logaritmo de la masa molecular de cada proteína frente a su volumen de **elución**. De esta manera, determinando el volumen de **elución** de las proteínas purificadas, se pudo calcular su masa molecular.

2.14.3. **Cromatografía de intercambio iónico.**

Antes de cada paso de cromatografía de intercambio iónico las soluciones de proteínas se dializaban a través de una columna PD-10 (Pharmacia).

2.14.3.2. Purificación de proteínas en DEAE Bio-Gel A.

Se utilizó una columna **Econo Column Bio Rad** de **1,5 cm** de diámetro interno y **10 cm** de longitud conectada al sistema **Econo** de Bio Rad que constaba de:

- Detector LJV **Econo** modelo EM-1.
- Bomba peristáltica **Econo** modelo EP-1.
- Controlador **Econo** modelo ES-1.
- Monitor de gradiente **Econo** modelo EG-1.
- Colector de fracciones **Econo** modelo 2110.

- Registrador **Econo** modelo 1326.

La columna se equilibró con tampón tartrato 10 **mM** a pH **3,5** y las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de 0 a **0,5 M** de **NaCl** realizado en 50 minutos. Se utilizó un flujo de 60 ml **h⁻¹** y se recogieron fracciones de 3 ml registrando la absorbancia a 280 nm del eluido. En cada una de las fracciones se valoró la actividad **β -1,3-glucanasa**.

2.14.3.2 Purificación de nroteínas en Mono Q HR 5/5 FPLC.

El sistema utilizado fue el mismo que el del apartado 2.14.2.3. a excepción de la columna, que en este caso fue una columna de intercambio **aniónico** Pharmacia Mono Q HR 5/5 y la espira del inyector que en este caso fue de 1 ml. La columna se equilibró con tampón acetato a diferentes pH y se eluyeron las proteínas utilizando diferentes gradientes de **NaCl**, dependiendo del paso de purificación:

- Para las muestras eluidas de la cromatografía en Sephadex G-200 se equilibró la columna con acetato 10 **mM** a pH **5,5** y las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente **lineal** de 40 minutos de **NaCl** de **0,15 M** a **0,35 M**.
- Para la proteína retenida en DEAE **Bio-Gel A** la columna fue equilibrada con tampón acetato 10 **mM** a pH 5,0 y se eluyó con un gradiente lineal de **NaCl** de **0,28 M** a **0,34 M** en 20 minutos.
- Las proteínas con actividad **β -1,3-glucanasa** separadas en los procesos anteriores fueron recromatografiadas en las condiciones siguientes:
 - **β -1,3-glucanasa I**: se equilibró la columna con acetato 10 **mM** pH **5,5** y se eluyó con un gradiente isocrático de **NaCl** a una concentración **0,16 M** durante 20 minutos.
 - **β -1,3-glucanasa II**: se equilibró la columna con acetato 10 **mM** pH **5,5** y se eluyó con un gradiente isocrático de **NaCl** a una concentración **0,20 M** durante 20 minutos.
 - **β -1,3-glucanasa III**: se equilibró la columna con acetato 10 **mM** pH **5,5** y se eluyó con un gradiente ísocrático de **NaCl** a una concentración **0,28 M** durante 20 minutos.

En todos los casos se empleó un flujo de 30 **ml h⁻¹**. En el eluido se valoró la actividad **β -1,3-glucanasa** y se registró la absorbancia a 280 nm.

2.14.4. **Análisis de azúcares reductores por cromatografía gas-líquido (GLC).**

2.14.4.1. Preparación de derivados volátiles.

Debido a su naturaleza no volátil, los productos resultantes de la hidrólisis química o enzimática requieren una derivatización posterior para identificarlos por GLC. De entre los posibles derivados, se eligieron los acetatos de alditol ya que es posible obtener un sólo derivado de cada monosacárido, lo que simplifica

los cromatogramas.

Procedimiento:

Inmediatamente después de la hidrólisis se añadieron 1 mg de inositol, como estándar interno, y 10 ml de agua, neutralizándose a continuación con BaCO_3 . La disolución se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm y se recogió el sobrenadante sobre una cápsula de porcelana para ser desecado a 60 °C en una estufa de aireación. Transcurrido este tiempo se añadió en dos veces 1 ml de agua destilada para recuperar el material. Para proceder a la reducción de los monosacáridos, se pasó el material a un tubo con NaBH_4 (12-15 mg), dejándose unas 20 horas a temperatura ambiente. El exceso de borohidruro se destruyó con HCl hasta obtener un pH ácido. El siguiente paso fue la desecación del producto anterior en un rotavapor, lavando después tres veces con metanol. Los azúcares fueron convertidos en sus correspondientes acetatos de alditol mediante tratamiento con 1 ml de piridina:anhídrido acético (1:1) a 100 °C durante 1 hora (Laine *et al.*, 1972). Estos reactivos se eliminaron en rotavapor y los derivados acetilados se disolvieron en 0,5 ml de CHCl_3 para su análisis por cromatografía gas-líquido.

2.14.4.2. Análisis de los derivados mediante cromatografía gas-líquido (GLC).

Se empleó un equipo de la casa comercial Perkin-Elmer, modelo Sigma 3 con detector de ionización de llama. Se utilizó una columna de vidrio de 2 m de longitud y 2 mm de diámetro interno que contenía como fase estacionaria un 3% SP-2340 sobre 100/120 Supelcoport. El gas portador fue nitrógeno y su flujo de 30 ml min^{-1} . Inyector y detector se programaron a una temperatura de 250 °C. Los distintos componentes de la muestra se separaron mediante un programa de temperaturas que comienza isotérmicamente a 200 °C durante 3 minutos para luego subir a razón de 10 °C por minuto hasta los 230 °C, temperatura que se mantiene durante 8 minutos. El tiempo total del análisis fue de 14 minutos. El cromatograma resultante y el área de cada pico se recogieron en un Integrador-Registador modelo Sigma 10 Perkin-Elmer.

En el cromatograma, el pico de cada azúcar se identificó comparando su tiempo de retención con los patrones analizados en idénticas condiciones. La cuantificación se realizó teniendo en cuenta el área de los picos obtenidos y los factores de respuesta de cada monómero.

2.15. Técnicas electroforéticas.

2.151. **Electroforesis en geles de poliacrilamida.**

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecil-sulfato sódico (SDS) según el método descrito por Laemmli (1970). La electroforesis en condiciones nativas, se hizo de la misma manera sin añadir 2-mercaptoetanol ni SDS.

2.15.1.1. Formación de los geles.

Los geles estaban formados por un gel de concentración en la parte superior y un gel de separación. Para los geles de separación se utilizaron porcentajes de acrilamida del **12,5%** y del **7,5%**

- Composición del gel de concentración (acrilamida al 4%): se mezclan **2,5 ml** de tampón **Tris-HCl 0,5 M**, pH **6,8** con **1,3 ml** de **acrilamida/bisacrilamida (29%/0,8%)**; **25 µl** de persulfato amónico al 10% y **5 µl** de TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina) y se llevan a **10 ml** con agua destilada.
- Composición del gel de separación (acrilamida al **12,5%**): se mezclan **2,5 ml** de tampón **Tris-HCl 1,5 M**, pH **8,8** con **4 ml** de **acrilamida/bisacrilamida (29%/0,8%)**; **50 µl** de persulfato amónico al 10% y **5 µl** de TEMED y se llevan a **10 ml** con agua destilada.
- Composición del gel de separación (acrilamida al **7,5%**): **2,5 ml** de tampón **Tris-HCl 1,5 M**, pH **8,8** mezclados con **2,5 ml** de **acrilamida/bisacrilamida (29%/0,8%)**; **50 µl** de persulfato amónico al 10% y **5 µl** de TEMED y se llevan a **10 ml** con agua destilada.

En electroforesis realizadas en condiciones desnaturalizantes se añadieron **100 µl** de SDS al 10% en los geles.

2.15.1.2. Preparación de las muestras.

Las muestras se disolvían en un tampón cuya composición era la siguiente: **0,2 ml** de azul de bromofenol al **0,05%**, **4 ml** de **Tris-HCl 0,5 M**, pH **6,8** y **0,8 ml** de glicerol y agua destilada hasta completar **6 ml**.

En el caso de condiciones **desnaturalizantes** se añadían **1,6 ml** de SDS al 10% y **0,8 ml** de 2-mercaptoetanol. Las muestras preparadas se hervían durante **5 minutos**.

2.15.1.3. Procedimiento.

Se utilizó el sistema Mini Protean II de Bio-Rad con geles de **1 mm** de espesor.

El tampón de electroforesis se preparó mezclando **0,3 g** de Tris-base con **1,4 g** de glicina por **100 ml** de disolución. Para electroforesis en condiciones desnaturalizantes se añadió **1 ml** de SDS al 10% al tampón.

La diferencia de potencial aplicada fue de **50 voltios** durante el proceso de concentración y **150 voltios** durante el proceso de separación.

2.15.1.4. Determinación de la masa molecular.

Para la determinación de la masa molecular se utilizaron condiciones desnaturalizantes y las proteínas patrones de masa molecular para electroforesis de Bio-Rad.

- Para geles con porcentaje de acrilamida del **7,5%** se utilizaron las

proteínas patrones de Bio-Rad de alta masa molecular: Ovoalbúmina de clara de huevo (45.000 Da), albumina de suero bovino (66.200 Da), fosforilasa B de músculo de conejo (97.400 Da), β -galactosidasa de *Escherichia coli* (116.250 Da) y miosina (200.000 Da).

• Para geles con porcentaje de acrilamida del **12,5%** se utilizaron las proteínas patrones de Bio-Rad de baja masa molecular: **Lisozima** de huevo (14.400 Da), inhibidor de **tripsina** de soja (21.500 Da), anhidrasa carbónica bovina (31.000 Da), ovoalbúmina de huevo (45.000 Da), albumina de suero bovino (66.200 Da) y fosforilasa B de músculo de conejo (97.400 Da).

Se construyó en cada caso una curva de calibrado representando los valores del logaritmo de la masa molecular de cada proteína frente a sus Rf. De esta manera determinando por electroforesis desnaturalizante el Rf de las proteínas purificadas se pudo calcular su masa molecular.

2.152. Isoelectroenfoque.

Se realizó por el método de Görg et al. (1980) en placas horizontales, en un rango de pH de **2,5** a 5 unidades.

2.15.2.1. Formación de los geles.

Se utilizó un formador de geles de **0,4** mm de espesor para isoelectroenfoque Bio-Rad. La composición de los geles fue la siguiente: **2,5** ml de **acrilamida/bisacrilamida (29%/0,8%)**, **0,75** ml de anfolitos Pharmalyte (85% de rango de pH **2,5** a 5 y un 15% de rango de pH **3,5** a **10**), **50 μ l** de persulfato amónico al **10%**, **50 μ l** de TEMED y **5,7** ml de agua destilada.

2.15.2.2. Preparación de las muestras.

Las muestras se concentraron y dializaron. Se aplicaron al gel mediante cuadrados de papel Whatman **nº3** de 1 cm de lado colocados a **1,5** cm del cátodo como mínimo.

2.15.2.3. Procedimiento.

Se colocaron tiras de papel Whatman **nº3** humedecidas con **NaOH** 1 N y **H₃PO₄** 1 N en el cátodo y en el ánodo, respectivamente. Se aplicó una corriente de **5 mA** de intensidad, **5 W** de potencia y una diferencia de potencial de **800** voltios durante **3** horas.

2.15.2.4. Determinación del punto isoelectroenfoque (pI).

Para la determinación del punto isoelectroenfoque de las proteínas se midió el gradiente de pH formado con un electrodo de contacto y se representó frente a la distancia al cátodo. Así, se pudo calcular el punto isoelectroenfoque de las **β -1,3-glucanasas** purificadas a partir de la distancia recorrida.

2.153. Tinción de proteínas.

La tinción de proteínas se hizo con azul de Coomassie R-250 o con nitrato de plata.

2.15.3.1. Tinción de proteínas con azul de Coomassie R-250.

Terminada la técnica **electroforética** el gel se sumergía en **una** solución fijadora que contenía **CH₃OH:CH₃COOH:H₂O** en proporción **30: 10:60** durante 1 hora, posteriormente se introducía en una solución de Coomassie R-250 al **0,002%** en una mezcla de metanol y ácido acético al 46% y **7,6%** respectivamente. El gel se desteñía sumergiéndolo en una solución de metanol al 30% y ácido acético al 10%

2.15.3.2. Tinción de proteínas con nitrato de plata.

La tinción se realizó siguiendo las instrucciones del kit de tinción de plata para proteínas **Silver Stain Plus** de Bio-Rad.

2.154. Determinación de actividad β -1,3-glucanasa en geles de electroforesis.

Se utilizó el método de Pan *et al.* (1989).

2.15.4.1. Preparación de los reactivos.

- Reactivo A: Tampón fosfato 50 mM, pH 7,5.
- Reactivo B: Laminarina 0,5 g/ml en tampón fosfato 25 mM, pH 7,5.
- Reactivo C: Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) 0,3 g en 200 ml de NaOH 1M.
- Solución D: CH₃COOH:CH₃OH:H₂O; 7:12:81.

2.15.4.2. Procedimiento.

Una vez terminada la electroforesis, se introducía el gel durante 7 minutos en tampón fosfato 50 mM, pH 7,5. Después el gel se incubaba durante 30 minutos en la disolución de laminarina a 37 °C. Posteriormente se sumerge en la solución con **TTC** y se calienta durante tres minutos en un microondas. Transcurrido este tiempo aparecen **unas** bandas de color rojo correspondientes a las de actividad **β -1,3-glucanasa**. El gel se guarda en la disolución de ácido acético y metanol.

2.16. Propiedades físico-químicas de las enzimas purificadas.

2.16.1. pH óptimo.

El pH óptimo se determinó a 37 °C de temperatura, en tampón **citratofosfato-borato** 50 mM, variando el pH de 1 unidad en 1 unidad, desde pH 2 a pH 12.

2.16.2. Estabilidad al pH.

Para determinar la estabilidad frente al pH se incubaron cada una de las enzimas durante 1 hora a temperatura ambiente a distintos pH, en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM, variando de 1 unidad en 1 unidad, desde pH 2 a pH 12. Transcurrido este tiempo se llevo a cabo la reacción con el sustrato, valorando la actividad de cada enzima en tampón fosfato 50 mM a su pH óptimo.

2.16.3. Temperatura óptima.

La temperatura óptima se determinó incubando cada enzima en un rango de temperaturas de 0 a 100 °C, a intervalos de 10 en 10 grados con el **sustrato** en tampón fosfato 50 mM a su pH óptimo.

2.16.4. Estabilidad a la temperatura.

Las enzimas se incubaron a 0, 25, 50, 75 y 100 °C, se sacaron muestras cada 15 minutos hasta una hora de incubación. Las muestras se congelaban **inmediatamente** tras su recogida en un baño **acetona/nieve** carbónica a -78 °C. Una vez recogidas y descongeladas todas las muestras se añadió el **sustrato** en tampón fosfato 50 mM al pH óptimo de cada enzima, y se incubaba la reacción a 37 °C. En otro experimento, las enzimas se incubaron durante 1 hora, a las mismas temperaturas que en el apartado 2.16.3., después se añadía el **sustrato** en tampón fosfato 50 mM a su pH óptimo y se incubaba la reacción a 37 °C.

2.16.5. Masa molecular.

La masa molecular se determinó por cromatografía de exclusión molecular en una columna de **Superosa 12 (FPLC)** y por electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

2.16.6. Punto isoeléctrico (pI).

Se determinó como se indica en el apartado 2.15.2.

2.16.7. Contenido en carbohidratos.

El contenido en carbohidratos de las proteínas purificadas se determinó por el método de Trevelyan y Harrison (1952), descrito en el apartado 2.7.8.

2.17. Estudio cinético de las enzimas purificadas.

El estudio cinético de las enzimas se llevó a cabo a 37 °C, en tampón fosfato 50 mM al pH óptimo de cada enzima y utilizando una concentración de enzima de 2,5 µg/ml y un tiempo de incubación de 15 minutos.

2.17.1. Variación de la actividad con la concentración de enzima.

Para cada enzima se estudió la variación de su actividad con su concentración frente a una disolución de laminarina con una concentración de

1 mg/ml durante 15 minutos de tiempo de reacción.

2.17.2. Variación de la actividad con el tiempo de incubación.

Se estudió el comportamiento de las diferentes enzimas purificadas durante distintos tiempos de incubación frente a laminarina a una concentración de 1 mg/ml a una temperatura de 37 °C.

2.17.3. Variación de la actividad con la concentración de sustrato. K_m y $V_{m\acute{a}x}$.

Para todas ellas se utilizó como sustrato laminarina y para la β -1,3-glucanasa II también se utilizó p-nitrofenil-B-D-glucósido. K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se determinaron utilizando el método de Lineweaver-Burk.

2.17.4. Inhibición por gluconod-lactona. K_i .

Se estudio la inhibición de las actividades enzimáticas purificadas por glucono-B-lactona, inhibidor competitivo de β -glucosidasas y β -glucanasas no específicas (Pitson *et al.*, 1995). Se utilizó como sustrato laminarina a una concentración de 1 mg/ml. Las constantes de inhibición (K_i) se calcularon por el método de Dixon y Webb (1964).

2.175 Actividad enzimática en presencia de diferentes iones.

Se determinó el aumento o disminución de la actividad enzimática frente a laminarina en tampón fosfato 50 mM a su pH óptimo a una concentración de 1 mg/ml en presencia de distintos iones a concentraciones 1 y 10 mM.

2.17.6. Estudio de la hidrólisis por las enzimas purificadas de laminarina y distintos disacáridos por cromatografía en capa fina.

En todos los casos los resultados de la hidrólisis se analizaron por cromatografía en capa fina en las condiciones descritas en el apartado 2.14.1.

2.17.6.1. Estudio de la hidrólisis de laminarina.

Se utilizó como sustrato laminarina en tampón fosfato 50 mM pH 5,5 a una concentración de 1 mg ml⁻¹. Se sacaron muestras a los 15 y 30 minutos y a 1, 4 y 24 horas de hidrólisis. En las muestras la reacción se detuvo calentando la mezcla a 100 °C durante 30 minutos y congelándolas posteriormente en un baño acetona/nieve carbónica a -78 °C. Se utilizaron como patrones, una hidrólisis química con H₂SO₄ en las condiciones descritas en el apartado 2.8.4. y glucosa. En todos los casos se cargó un control con enzima calentada a ebullición durante 30 minutos.

2.1762. Estudio de la hidrólisis de diferentes disacáridos.

En este caso se estudió la hidrólisis de celobiosa, gentiobiosa y laminaribiosa por las enzimas purificadas. Se utilizaron disoluciones en tampón fosfato 50 mM, pH 5,5 de 1 mg/ml. Se cargaron muestras a las 2 horas de

hidrólisis. Las muestras se procesaron de la manera descrita en el apartado anterior.

2.17.7. Análisis de los azúcares reductores liberados en la hidrólisis de laminarina con las enzimas purificadas por cromatografía gas-líquido (GLC).

En tubos Eppendorf de 2 ml se mezclaron 950 μ l de una solución de laminarina de **1 mg/ml** con 50 μ l de una solución **enzimática** de 5 μ g/ml de cada enzima purificada y se dejó transcurrir la hidrólisis durante 72 horas. Transcurrido este tiempo se paró la reacción calentando a ebullición durante 1 hora y se analizaron los azúcares reductores Liberados por GLC como se indica en el apartado 2.154.

2.17.8. Estudio del modo de acción de las enzimas purificadas en la hidrólisis de laminarina por Resonancia Magnética Nuclear (^1H -RMN).

Se utilizó el método de Malet et al. (1993). Con este experimento se trata de conocer si la hidrólisis de la laminarina por estas enzimas transcurre con inversión o retención de la configuración β en la glucosa, ya que sus formas α y β son **diferenciables** por Resonancia Magnética Nuclear.

Esto es posible siempre que la reacción enzimática transcurra a mayor velocidad que la de mutarrotación de la glucosa liberada. Dado que la banda correspondiente al H_2O interfiere en los espectros registrados, es necesario minimizar la presencia de ésta, deuteroando enzimas y sustrato.

2.17.8.1. Deuteración de las enzimas v sustrato.

Una disolución de laminarina (1 mg en **0,7 ml**) se trató con D_2O tres veces, liofilizando cada vez, para **minimizar** la señal del HDO residual. Finalmente se disolvió en D_2O del **99,98% (Merck)** y se separó en tres tubos de ensayo en fracciones de **0,7 ml**. Para **eliminar** la máxima cantidad de H_2O y retener la máxima actividad **enzimática** posible se liofilizaron las preparaciones enzimáticas purificadas (10 μ g/ml). El **liofilizado** se **rediluyó** en D_2O del **99,98%**.

2.17.8.2. Procedimiento.

Se mezclaron 25 μ l de solución enzimática con **0,7 ml** de la solución de **sustrato** y se registraron espectros de ^1H -RMN a diferentes tiempos de incubación en un aparato Varian Unity 500 a 500 Mhz y 30 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura, con objeto de evitar al máximo el solapamiento de los dobletes correspondientes al ^1H del carbono anomérico de α y β glucosa con la banda correspondiente a HDO. Se referenció sobre el HDO residual a **4,71 ppm**. Como control se realizaron espectros de la laminarina, glucosa y mezcla de ambas en las mismas condiciones.

2.18. Especificidad de sustrato.

Se estudió la especificidad de las enzimas purificadas en tampón fosfato a su pH óptimo frente a diferentes sustratos de carácter glucídico a una concentración de 1 mg/ml. Para los sustratos para glucosidasas p-nitrofenil- α -D-glucosido y p-nitrofenil- β -D-glucosido se utilizó una concentración 10 mM.

2.19. Degradación de paredes celulares de *F. oxysporum lycopersici* raza 2 y fracciones de las mismas por el crudo enzimático de *A. nidulans*.

En este experimento se trata de estudiar en detalle la degradación de las paredes celulares de *Fol2* por el crudo enzimático de *A. nidulans* para su posible aplicación como antagonista de *Fol2*.

2.19.1. Obtención del crudo enzimático de *A. nidulans*.

Para la obtención del preparado enzimático se partió de cultivos autolizados de 50 días de crecimiento de *A. nidulans*.

El líquido de cultivo fue concentrado cinco veces a vacío a 30 °C y luego precipitado con ácido tánico al 1% como se describe en el apartado 2.14.4.

2.19.2. Obtención de paredes celulares de *F. oxysporum lycopersici* raza 2 y fraccionamiento de las mismas.

2.19.2.1. Obtención de paredes celulares.

Para obtener paredes celulares de *Fol2*, éste se cultivo en el medio descrito por Gómez-Miranda et al. (1984). Este medio contenía por litro 15 g de glucosa, 1 g de extracto de levadura (Difco), 3 g de casaminoácidos (Difco), 1 mg de hidrocloreto de tiamina, 0,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,002 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0,02 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Este medio se ajustó a pH 6,5 y se distribuyó en porciones de 1 l en matraces erlenmeyer de 2 l de capacidad. Una vez inoculados los matraces se incubaron a 25 °C a 120 r.p.m. en un incubador orbital Gallenkamp IH-465 durante 5 días, tiempo necesario para que el micelio alcance su peso seco máximo. Para la obtención de las paredes celulares de *Fol2* se utilizó el método descrito por Prieto *et al.* (1988). Una vez crecidos los cultivos, se procedió a su filtrado mediante una bomba de vacío y un filtro de nylon. El micelio obtenido fue secado en una estufa a 65 °C con aireación y, a continuación, pulverizado primero en un homogeneizador Sorvall a la máxima velocidad y después en un molino de bolas Pulverisette durante media hora. El micelio pulverizado se pesó y se añadió a un matraz que contenía 500 ml de agua y azida al 0,02%, manteniéndose en agitación 12 horas. La suspensión resultante se centrifugó a 7500 rpm durante 10 minutos, desechándose el sobrenadante. El precipitado se resuspendió y se centrifugó secuencialmente, primero en agua 4 veces y después en etanol al 50% y al 96%. Una vez terminado el proceso se comprobaba que las paredes estaban libres de

contenido citoplasmático a través del microscopio óptico.

2.19.2.2. Fraccionamiento de las paredes celulares.

Se utilizó el método de Alfonso et *al.* (1995 b) según el esquema de la figura 2.1.

Se trata **una** cantidad de paredes conocida (6 g) con **NaOH** 1 M durante 20 h. La parte soluble constituye la fracción **F1**. Esta fracción se precipita con etanol al 96% y se dializa durante toda la noche. El dializado se centrifuga y el sedimento y sobrenadante se liofilizan por separado constituyendo la fracción **F1I** y **F1S** respectivamente. El residuo del primer tratamiento se trata con **NaOH** 1 M a 70 °C durante 1 h, después se centrifuga y el sobrenadante se trata con etanol al 96% no observándose precipitado. El sedimento se dializa y liofiliza constituyendo la fracción **F4**. Todas las fracciones se caracterizaron por **espectroscopía** infrarroja.

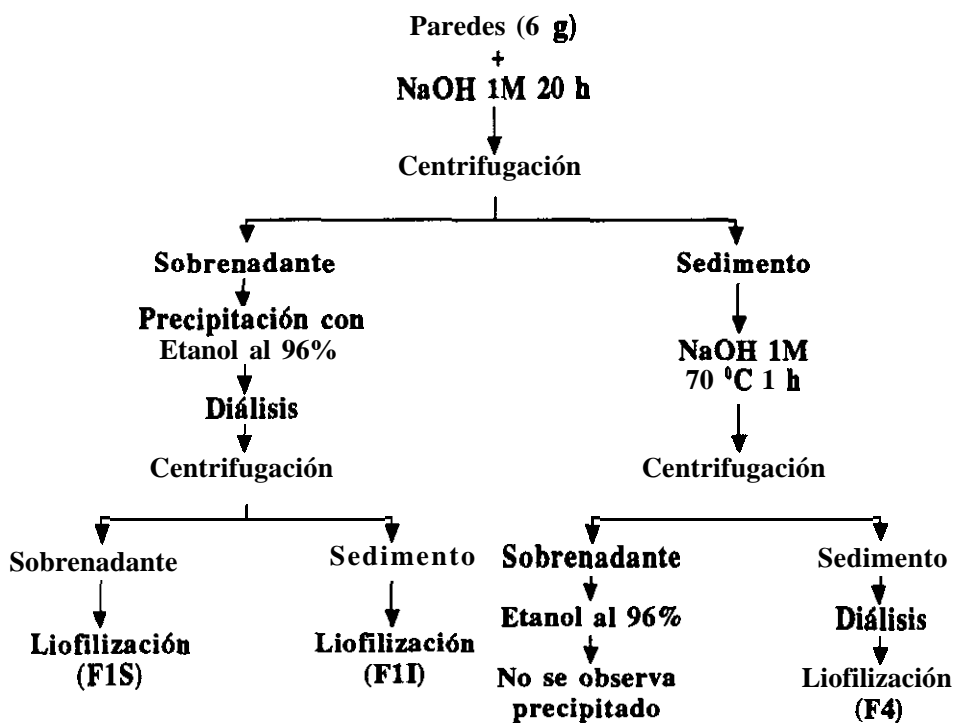


Figura 2.1. **Método** de fraccionamiento de las paredes de *Fo12* (Alfonso, 1995 b).

2.19.3. Degradación de *las* paredes celulares de *F. oxysporum lycopersici* raza 2.

El método utilizado se basa en el descrito por Hughes (1971). Se preparó una suspensión de paredes celulares (2 mg/ml) en tampón fosfato 10 mM, pH 6,5, con 0,02% de NaN₃ por tratamiento ultrasónico.

Se incubó 1 ml de esta suspensión de paredes con 1 ml de preparación

enzimática (2 mg/ml) de *A. nidulans* (previamente centrifugada a 10.000 g y esterilizada por filtración a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore)) a 37 °C durante 72 horas.

Se midieron a distintos tiempos la disminución de absorbancia a 660 nm y la liberación de sustancias reductoras, controlándose la posible contaminación bacteriana a través del microscopio óptico. Los azúcares reductores liberados en la hidrólisis se analizaron por cromatografía gas-líquido.

2.19.4. Degradación de fracciones de la pared celular de *F. oxysporum lycopersici* raza 2.

2.19.4.1. Degradación de la fracción soluble (F1S).

Para estudiar la degradación de la fracción F1S se preparó una disolución de 2 mg/ml de la misma en tampón fosfato 50 mM, pH 5,5, con 0,02% de NaN₃. Un mililitro de esta disolución se incubó con 1 ml de preparación enzimática (2 mg/ml) de *A. nidulans* (centrifugada a 10.000 g y esterilizada por filtración a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore)) a 37 °C durante 72 horas. Se midieron a diferentes tiempos la liberación de sustancias reductoras y los azúcares liberados en la hidrólisis se analizaron por cromatografía gas-líquido.

2.19.4.2. Degradación de la fracción insoluble (F4).

Se utilizó el mismo método descrito en la sección 2.19.2.3. preparando una suspensión de la fracción F4 (2 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM, pH 5,5. La disminución de la absorbancia a 660 nm y la liberación de sustancias reductoras, se midieron a diferentes tiempos. Además se determinó la liberación de glucosamina y *N*-acetilglucosamina en los hidrolizados. Los azúcares liberados en la hidrólisis se analizaron por cromatografía gas-líquido.

2.20. Degradación de paredes de *F. oxysporum lycopersici* raza 2 y fracciones de las mismas por las β-1,3-glucanasas de *A. nidulans* purificadas.

Para determinar la participación de las β-1,3-glucanasas purificadas en la degradación de la pared celular de *Fo12* y sus fracciones, se estudió su posible hidrólisis por cada una de las enzimas purificadas y por mezclas de ellas (I y II), (I y III), (II y III) y (I, II y III) durante 72 horas. Transcurrido el tiempo de reacción se analizaron azúcares reductores mediante el método de Somogyi y Nelson descrito en el apartado 2.7.4.

3. RESULTADOS.

3. RESULTADOS.

3.1. Parámetros valorados en el líquido de cultivo de *A. nidulans*.

Los resultados relativos a los parámetros valorados en el líquido de cultivo de *A. nidulans* se muestran en las figuras 3.1. a 3.9.

3.1.1. Peso seco de micelio.

La variación del peso seco de micelio, en los diferentes medios ensayados, con el tiempo de incubación se representa en la figura 3.1.

En todos los medios se alcanzó el peso máximo, si bien su valor fue diferente, el 5º día de incubación y éste se consideró como el principio de la autólisis. A partir de este día se observó una disminución del peso seco similar en los medios estudiados, excepto en los suplementados con extracto de planta de tomate y pectina en los que se observó una menor disminución los primeros días.

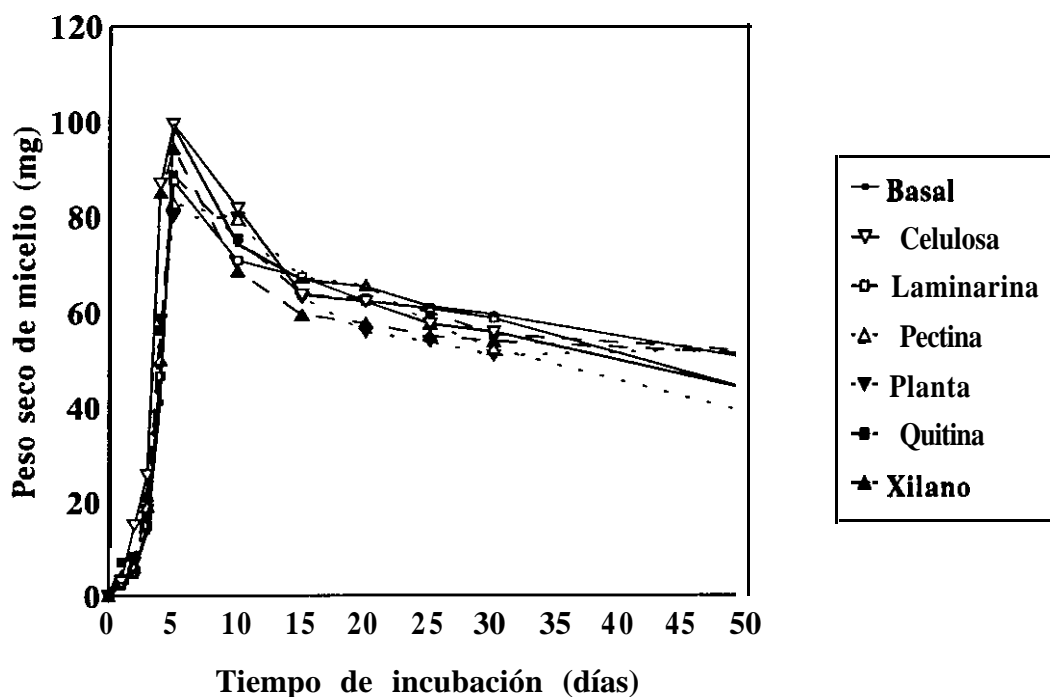


Figura 3.1. Curva de crecimiento de *A. nidulans* en los diferentes medios ensayados.

3.1.2. Grado de autólisis.

La variación del grado de autólisis, calculada a partir de la curva de crecimiento, se muestra en la figura 3.2.

En todos los medios la tendencia fue similar, a excepción de los medios suplementados con pectina y extracto de planta de tomate en los cuales se

observa un menor incremento del grado de autólisis en los primeros días de ésta.

El grado de autólisis al final del periodo estudiado osciló entre un 30% y un 55% en los distintos medios.

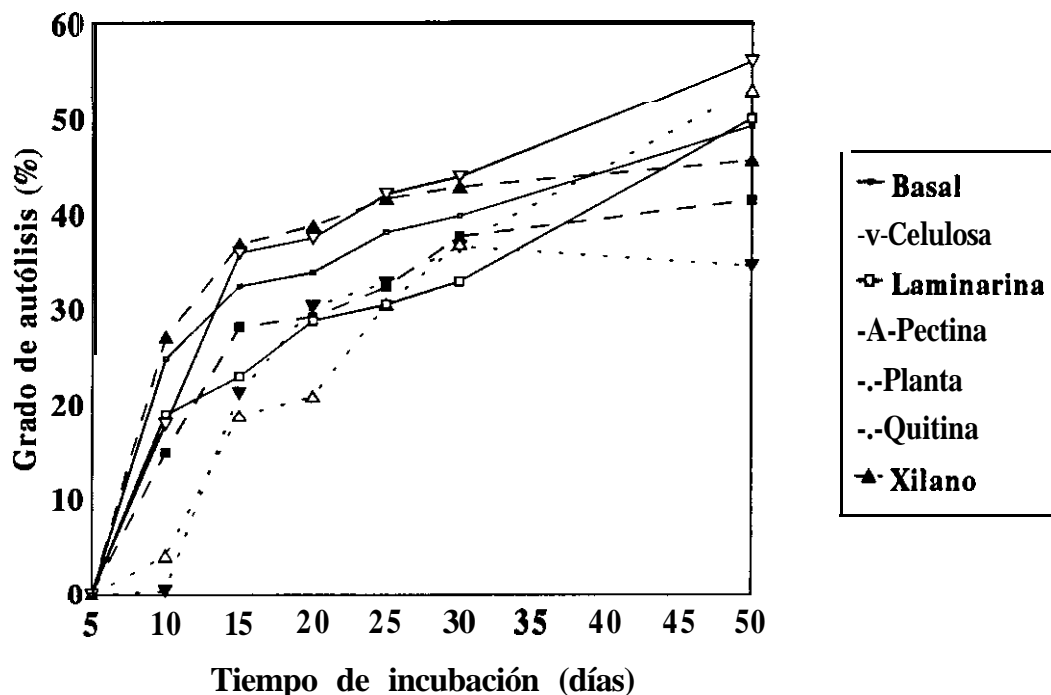


Figura 3.2. Variación del grado de autólisis en cultivos de *A. nidulans* en diferentes medios con el tiempo de incubación.

3.1.3. pH.

En los primeros días de crecimiento se observó una disminución del pH en todos los medios para luego aumentar, la autólisis transcurrió a pH básico y éste tuvo un comportamiento semejante en todos los medios disminuyendo a lo largo del proceso degradativo del hongo. Este comportamiento se muestra en la figura 3.3.

3.1.4. Conductividad.

En la figura 3.4. se observa que la conductividad del medio descendió los primeros días de cultivo hasta el comienzo del proceso degradativo, a partir de entonces aumentó de manera parecida en todos los medios.

3.1.5. Sustancias reductoras libres.

La concentración de sustancias reductoras disminuye rápidamente los días previos a la autólisis y a partir del inicio de ésta se mantienen a niveles muy bajos (figura 3.5).

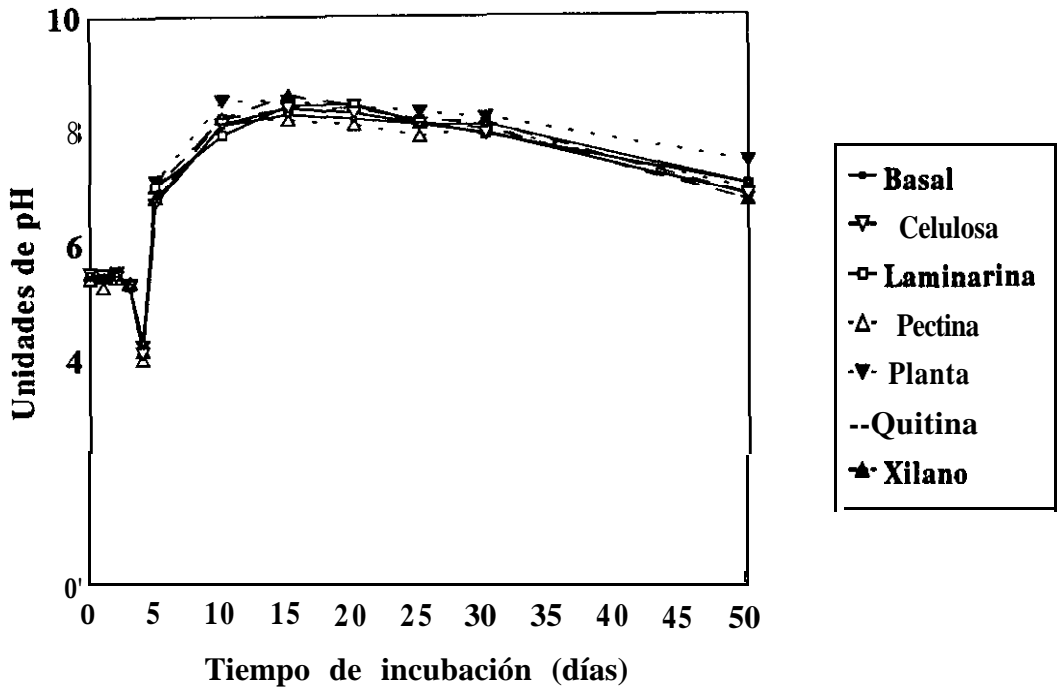


Figura 3.3. Variación del pH del medio en los diferentes cultivos de *A. nidulans*.

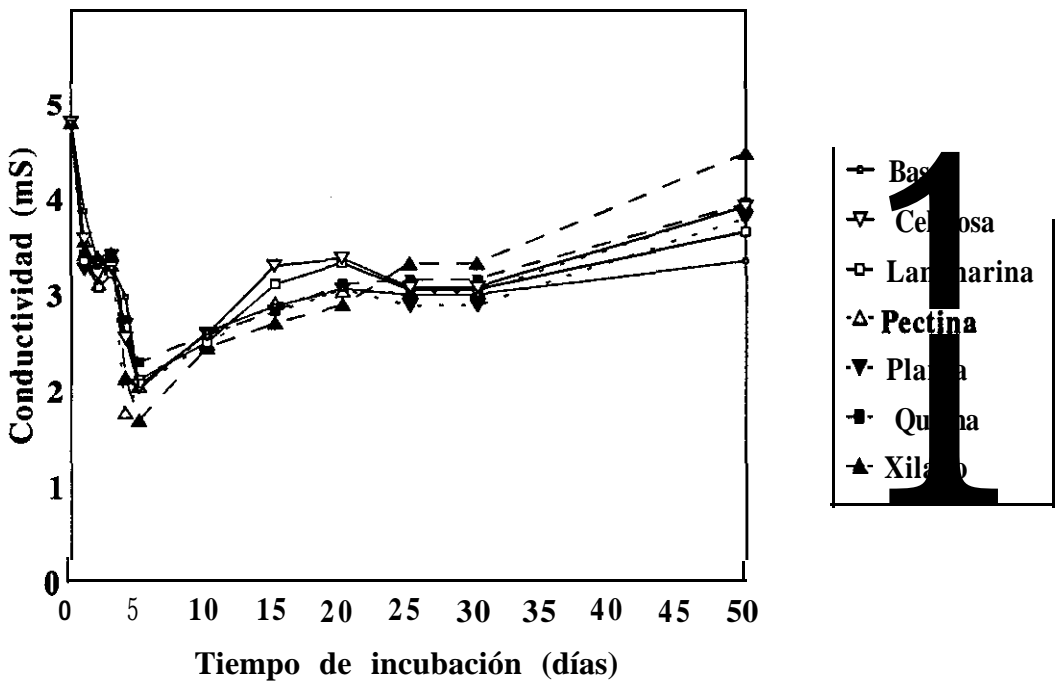


Figura 3.4. Variación de la conductividad en el medio en los diferentes cultivos de *A. nidulans*.

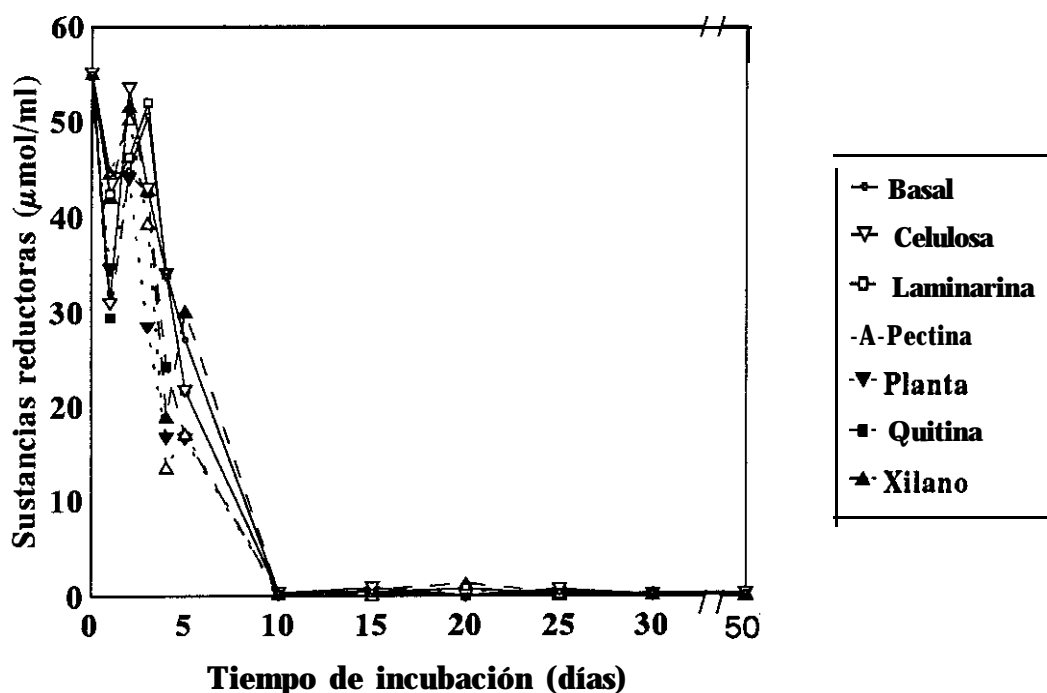


Figura 3.5. Variación de la concentración de sustancias reductoras en el medio en los diferentes cultivos de *A. nidulans*.

3.1.6. Carbohidratos totales.

Se observó un comportamiento muy parecido al de la concentración de sustancias reductoras como se puede ver en la figura 3.6.

3.1.7. Concentración de proteínas.

La figura 3.7. representa el comportamiento de la concentración de proteínas a lo largo del proceso estudiado. Se observa una disminución muy acusada durante la fase de crecimiento del hongo. Sin embargo durante la fase de autólisis se observa tendencia al aumento en la concentración de proteínas.

3.1.8. Valoración de actividades enzimáticas.

Los resultados correspondientes a la valoración de actividades enzimáticas en el líquido de cultivo de *A. nidulans* en diferentes medios se muestran en las figuras 3.8. y 3.9.

3.1.8.1. Actividad β -1,3-glucanasa.

La actividad β -1,3-glucanasa comenzó a observarse en el medio de cultivo a partir del quinto día de incubación. Presentó un primer máximo el décimo día de cultivo, muy acusado en los suplementados con extracto de planta y pectina. En todos ellos alcanzó un segundo máximo de actividad al final del estudio, excepto en el suplementado con quitina (figura 3.8.).

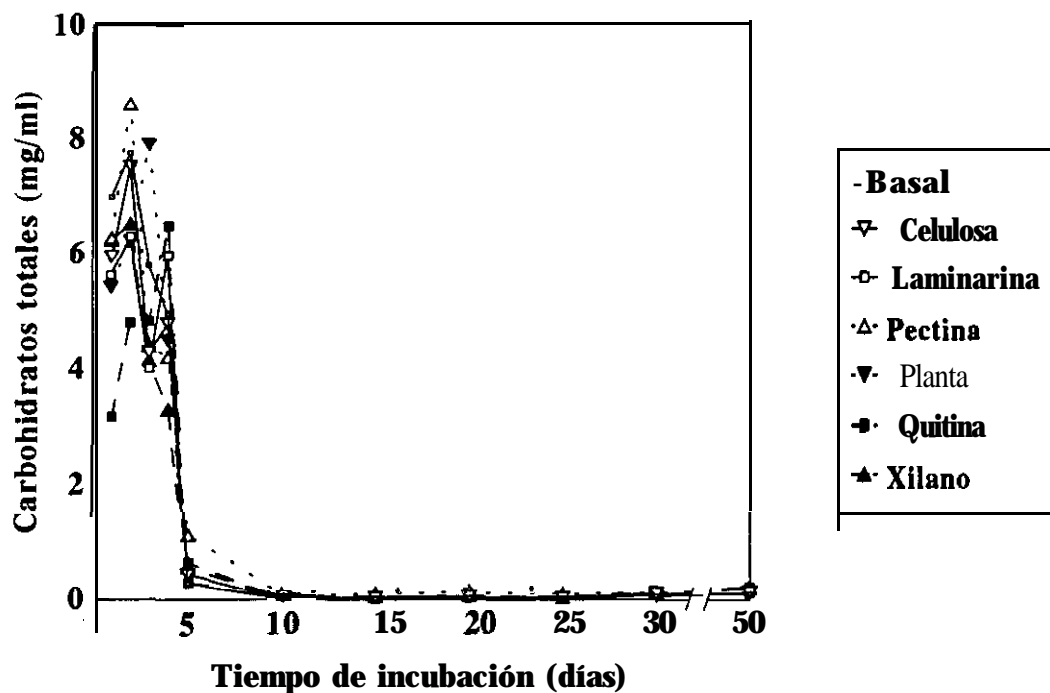


Figura 3.6. Variación de la concentración de carbohidratos en el medio en los diferentes cultivos de *A. nidulans*.

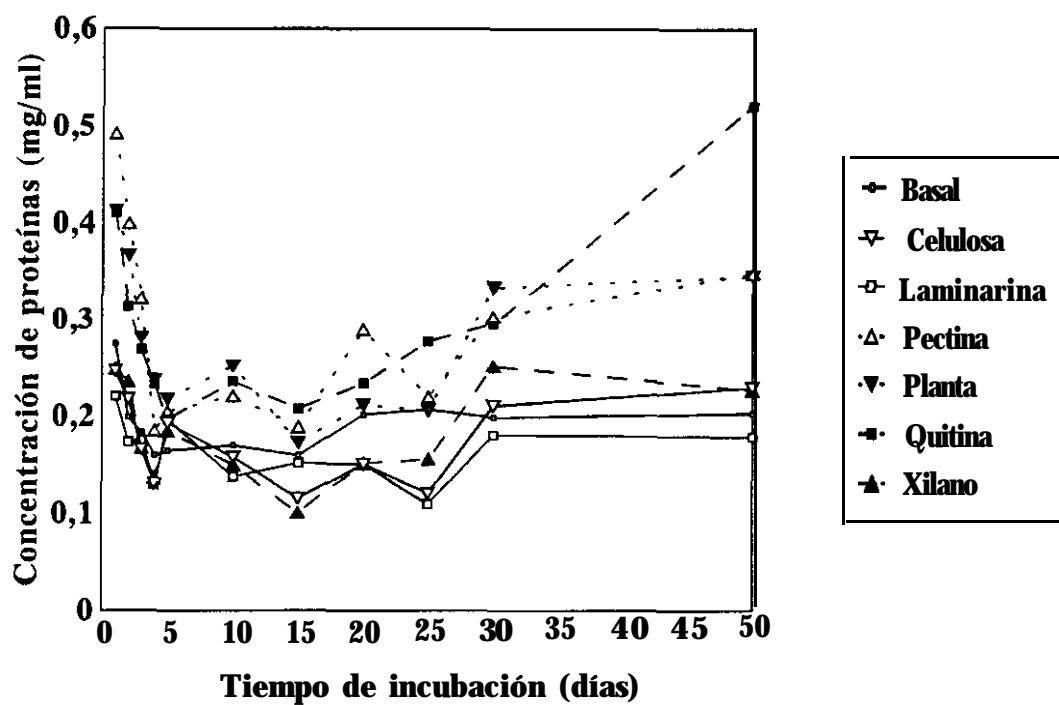


Figura 3.7. Comportamiento de la concentración de proteínas en el medio en cultivos de *A. nidulans*.

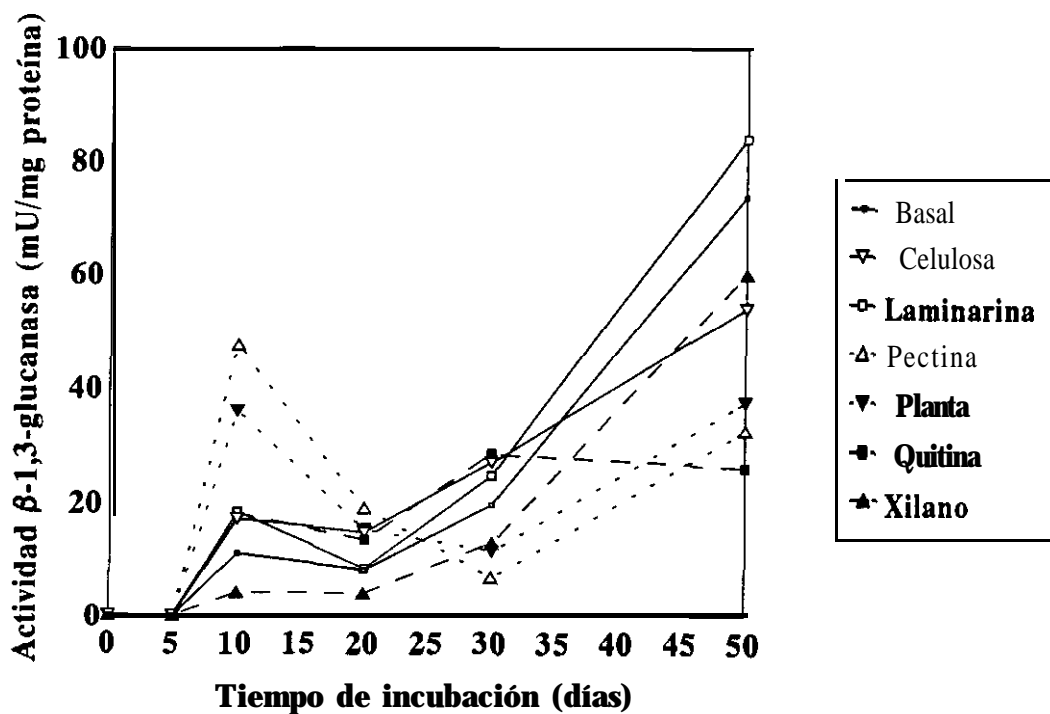


Figura 3.8. Variación de la actividad β -1,3-glucanasa con el tiempo de incubación en el medio en los diferentes cultivos de *A. nidulans*.

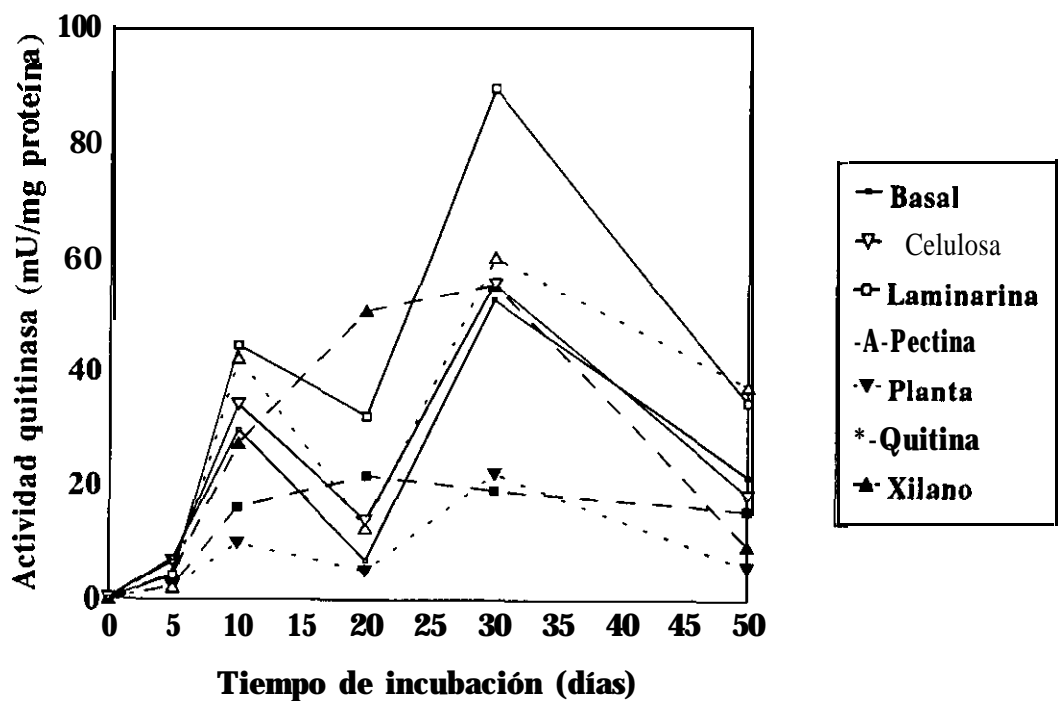


Figura 3.9. Variación de la actividad quitinasa con el tiempo de incubación en el medio en los diferentes cultivos de *A. nidulans*.

3.1.8.2. Actividad auitinasa.

La actividad quitinasa se observó en el medio a partir del quinto día de crecimiento y presentó dos máximos los días 10 y 30 respectivamente. En los suplementados con quitina y xilano la máxima actividad se observó los días 20 y 30 respectivamente (figura 3.9.).

3.2. Estudio de la producción de la actividad β -1,3-glucanasa por FPLC en diferentes medios suplementados.

Se separaron tres fracciones con actividad β -1,3-glucanasa por cromatografía de intercambio iónico de alta eficacia (FPLC) y se estudió el comportamiento de cada una de las tres a lo largo de la autólisis, en los diferentes medios suplementados descritos en el apartado 2.11.1. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 3.10. y 3.11. y en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Cuantificación de las tres proteínas con actividad β -1,3-glucanasa después de la separación por cromatografía de intercambio iónico en FPLC.

Medio	Día	Actividad β -1,3-glucanasa (mU)			Total (I+II+III)
		I	II	III	
B	10	104	18	109	231
	30	177	239		416
	50	956	790	137	1921
C	10	139	39	96	274
	30	238	335	-	573
	50	641	279	592	1512
L	10	72	15	169	256
	30	200	249		449
	50	940	281	45	1266
P	10	331	297	516	1144
	30	93	145		238
	50	578	543	184	1305
PL	10	148	178	473	799
	30	154	185		339
	50	474	675	-	1149
Q	10	117	60	178	355
	30	377	331		708
	50	466	527	148	1141
X	10	45		14	59
	30	237	269		506
	50	997	382	764	2143

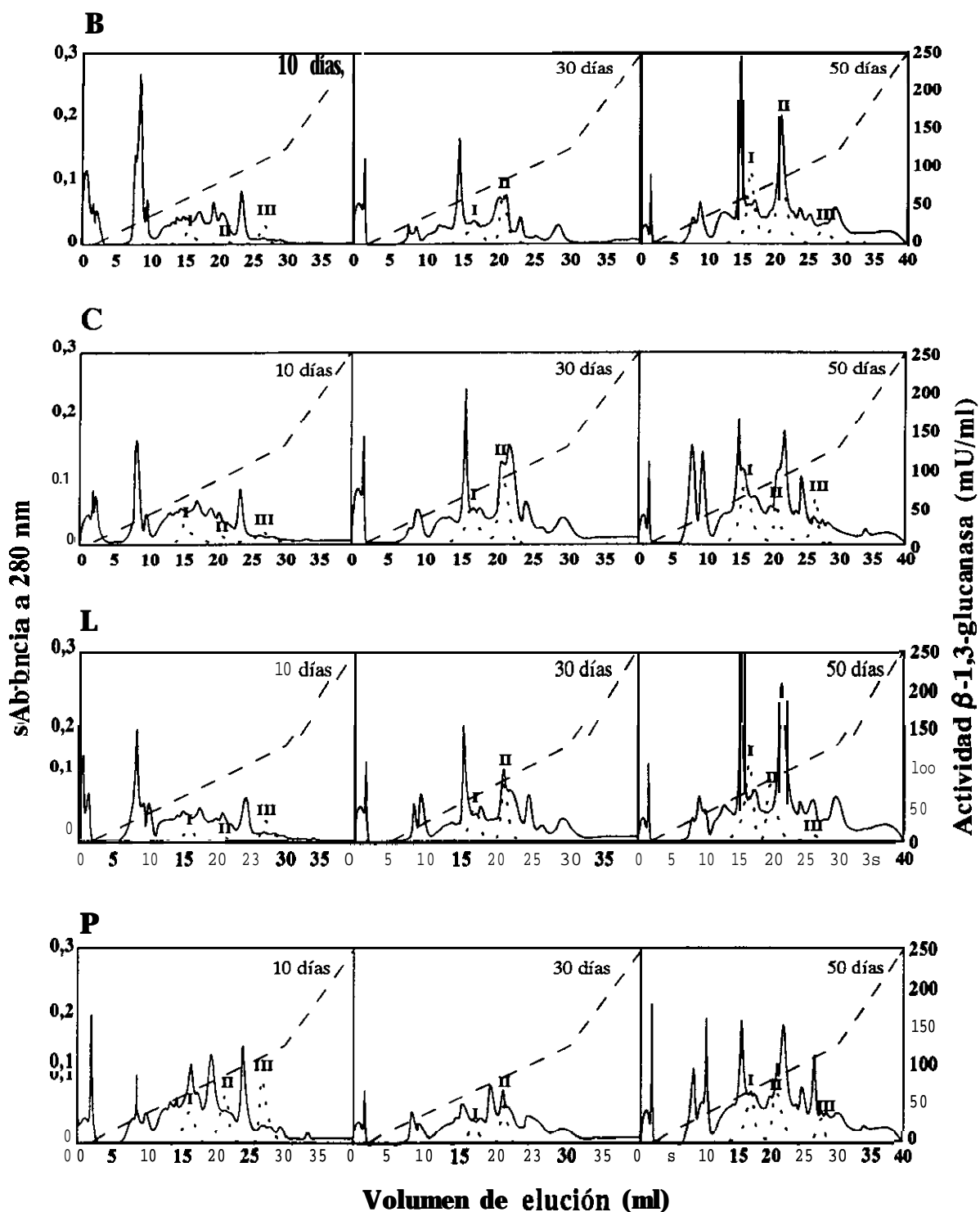


Figura 3.10. Perfil de elución de proteínas (—) y de la actividad β -1,3-glucanasa (.....) a través de una columna de intercambio iónico Mono Q HR 5/5 FPLC procedentes de cultivos en el medio basal (B) y en los medios suplementados con celulosa (C), laminarina (L) y pectina (P). También está representado el gradiente de NaCl 1M (- -).

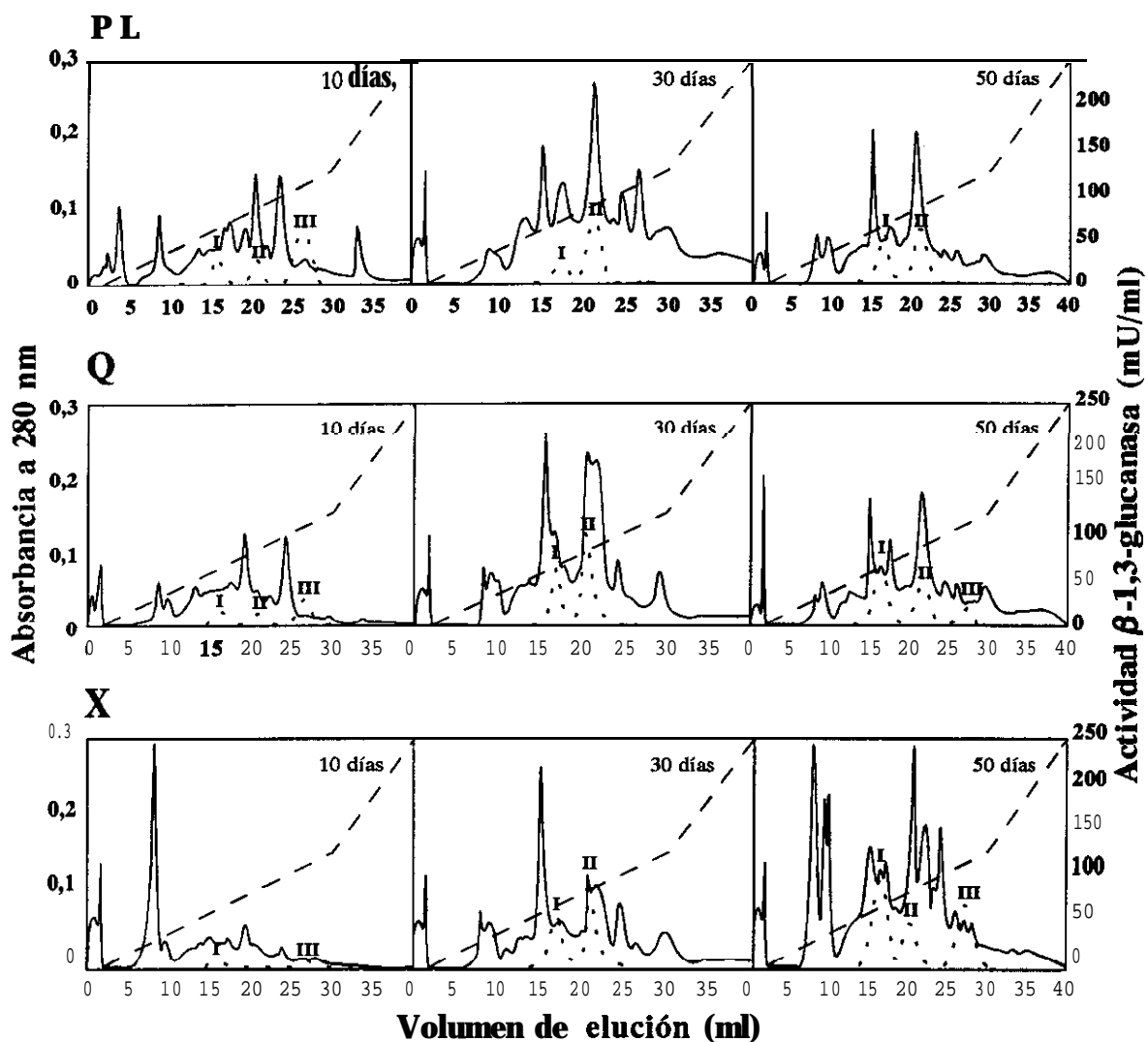


Figura 3.11. Perfil de elución de proteínas (—) y de la actividad β -1,3-glucanasa (.....) a través de una columna de intercambio iónico Mono Q HR 5/5 FPLC procedentes de cultivos en los medios suplementados con extracto de plantas de *Lycopersicum esculentum* (PL), quitina (Q) y xilano (X). También está representado el gradiente de NaCl 1M (- -).

El comportamiento de la actividad β -1,3-glucanasa global en el medio de cultivo se describe en el apartado 3.1.8.1. Cada una de las actividades parciales tuvo un comportamiento diferente, así, la β -1,3-glucanasa I en general aumentó su nivel con el tiempo de incubación y estuvo presente en el medio de cultivo durante todo el proceso degradativo en todos los medios. La actividad β -1,3-glucanasa II también aumentó sus niveles al progresar la fase de autólisis y en los primeros días de autólisis es muy baja, excepto en los medios suplementados con pectina y extracto de planta en los cuales su nivel es más elevado. En el medio suplementado con xilano no se observó su presencia. El comportamiento

más curioso fue el de la β -1,3-glucanasa III, la cual está presente en los primeros días del proceso degradativo, desapareciendo más tarde para luego volver a observarse en los últimos días del proceso estudiado. Su nivel es alto los primeros días, en los medios suplementados con pectina y extracto de planta de tomate y en este último no se obtuvo en los días finales del estudio. Para esta proteína se observó un alto nivel en los medios suplementados con celulosa y xilano en los últimos días del proceso.

3.3. Preparación de laminaribiosa y oligómeros de glucosa.

Se obtuvieron laminaribiosa y una mezcla de oligómeros de glucosa de diferente peso molecular (de 3 a 7 unidades de glucosa) de la manera descrita en el apartado 2.8.5. La concentración de carbohidratos del eluido se muestra como **absorbancia** a 660 nm en la figura 3.12. y se determinó por el método de Trevelyan y Harrison (1952). Una vez separadas, las fracciones se liofilizaron y se conservaron a 4 °C hasta el momento de usarlas.

Para calcular su peso molecular a partir de su volumen de **elución** se utilizó la curva de calibrado que se representa en la figura 3.13.

En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear (^1H -RMN) de la laminaribiosa se observan las señales correspondientes al enlace β -1,3, entre 4,66 y 4,76 ppm como se indica en la figura 3.14.

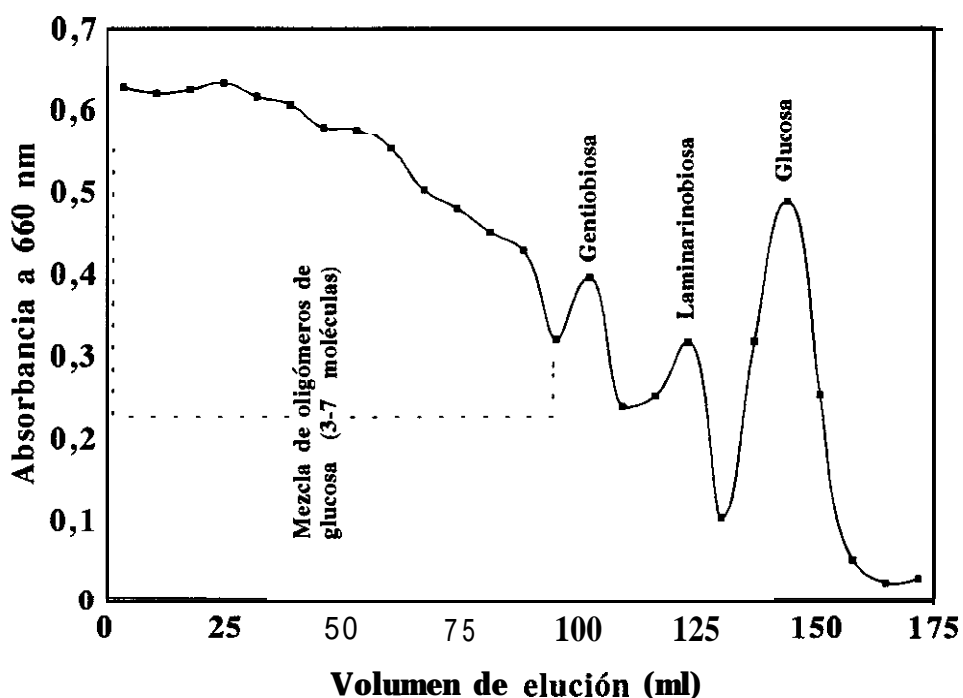


Figura 3.12. Perfil de elución en Bio Gel P-2 de la mezcla de reacción obtenida por hidrólisis química de la laminarina con H_2SO_4 0,5 N.

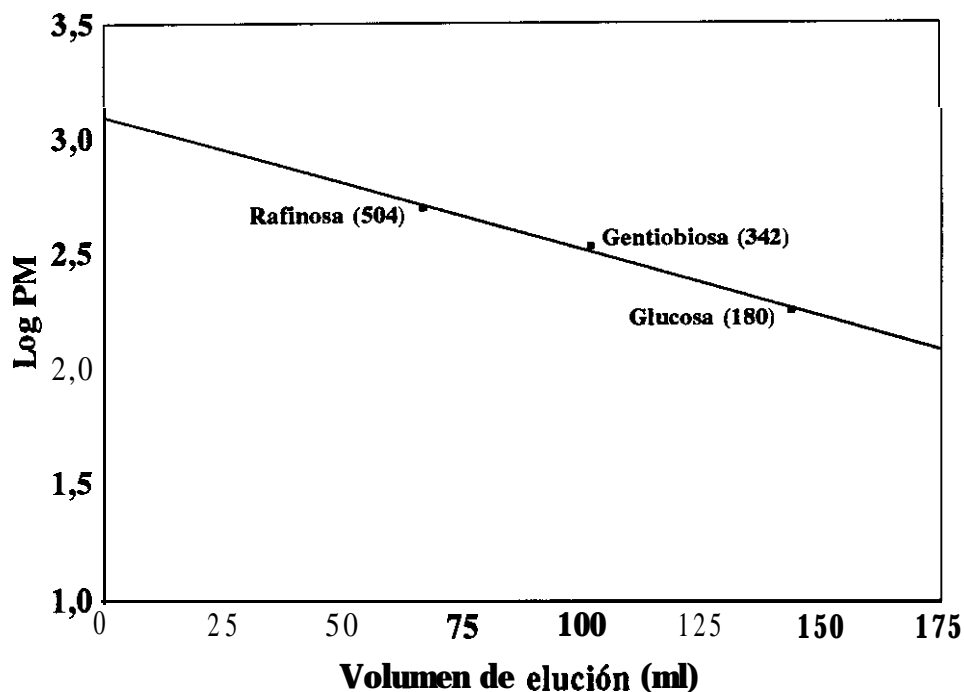


Figura 3.13. Curva de calibrado de la columna de Bio Gel P-2.

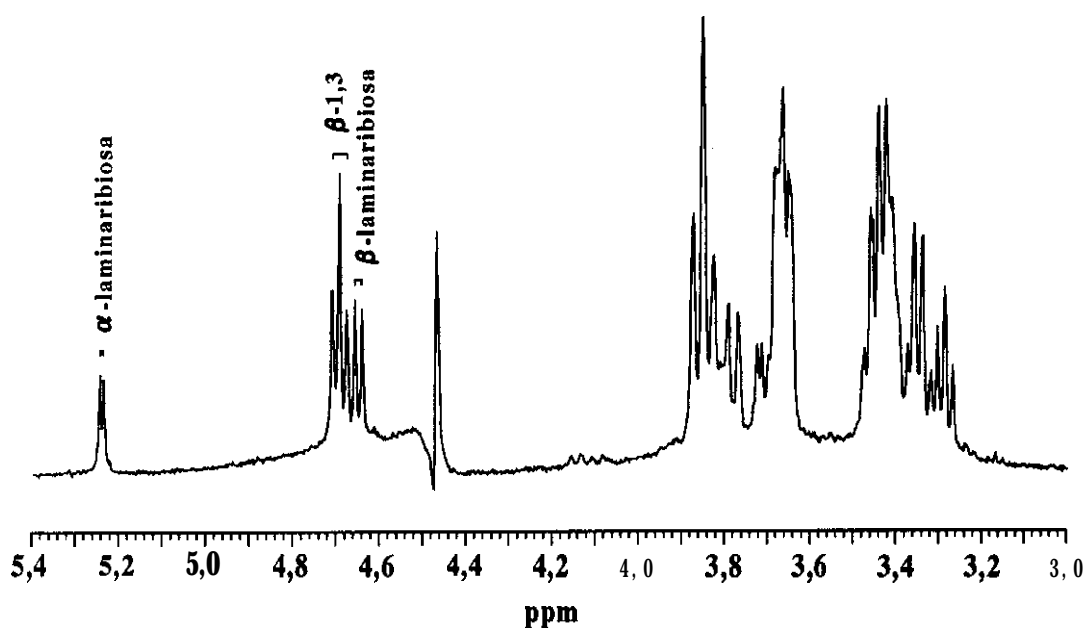


Figura 3.14. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (^1H -RMN) de la laminaribiosa obtenida.

3.4. Purificación de las actividades β -1,3 glucanasas producidas durante la autólisis de *A. nidulans*.

El proceso de purificación utilizado (figura 3.15.) podría resumirse en:

precipitación de proteínas del líquido de cultivo con ácido tánico al 1% y posteriores cromatografías en columnas de DEAE Bio Gel A, Sephadex G-200, Mono Q HR 5/5 y Superosa 12 HR 10/30.

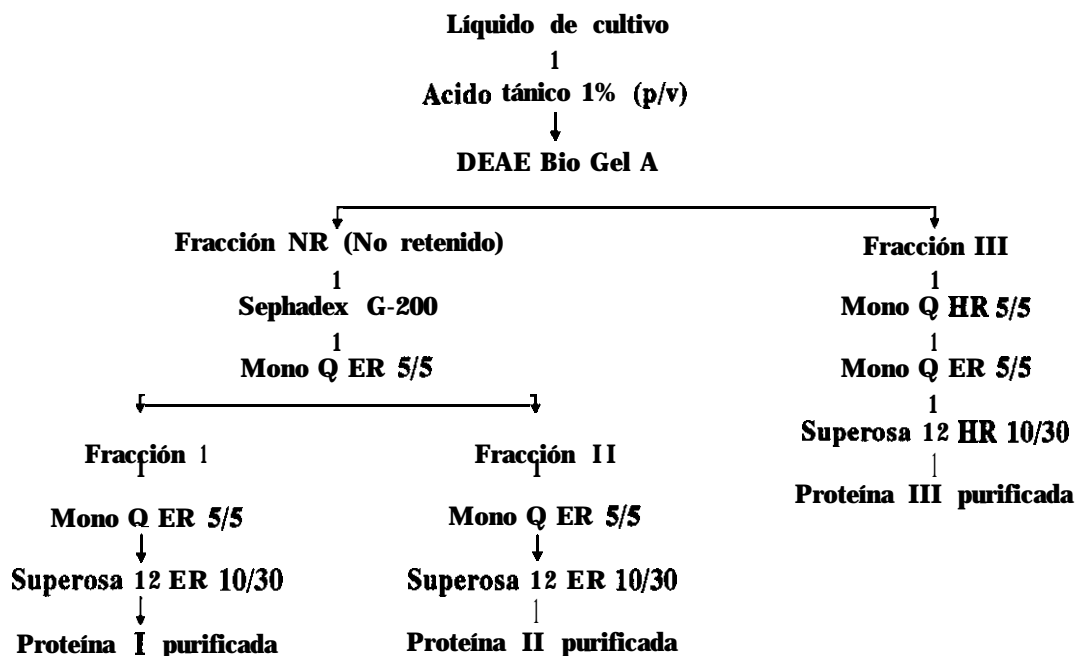


Figura 3.15. Esquema del proceso de purificación de las β -1,3-glucanasas 1, II y III de *A. nidulans*.

3.4.1. Selección del material de partida.

Como material de partida para la purificación se utilizaron cultivos de *A. nidulans* de 50 días de crecimiento en el medio basal, ya que no se observó un importante aumento de actividad específica en los diferentes medios suplementados (Tabla 3.2.).

Tabla 3.2. Actividad específica, actividad total y cantidad de proteínas en el medio de cultivos de *A. nidulans* de 50 días de crecimiento.

Medio de cultivo	Proteínas (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (mU/mg)	Enriquecimiento (%)
B	205,00	15,15	74,0	100
C	232,76	12,56	54,0	73
L	181,69	15,26	84,0	114
P	353,19	11,49	32,5	44
PL	350,15	13,09	37,4	54
Q	527,25	13,72	26,0	35
X	230,40	13,82	60,0	81

3.4.2. Selección de un método de precipitación de proteínas.

En la tabla 3.3. se muestran los resultados obtenidos en la precipitación de proteínas del medio de cultivo con los diferentes agentes precipitantes empleados. Se observa que los mayores enriquecimientos se obtuvieron precipitando con acetona al 60% y con etanol al 80%. Aunque, el mayor rendimiento se obtuvo precipitando con ácido tánico al 1%. En este paso se consideró más importante la cantidad de actividad recuperada que el grado de purificación obtenido y por este motivo, se eligió el método del ácido tánico para la precipitación.

Tabla 3.3. Rendimiento y enriquecimiento en la precipitación de proteínas del medio en cultivos de *A. nidulans* de 50 días de crecimiento con diferentes agentes.

		Proteínas (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (mU/mg)	Rendimiento (%)	Grado de purificación (veces)
Líquido de cultivo		205,00	15,15	74,0	-	
Concentrado		204,90	10,60	51,7	70	0,7
Acetona	40%	1,25	0,30	240,0	2	3,2
	60%	22,65	9,45	417,2	62	5,6
	80%	36,00	0,90	25,0	6	0,3
Etanol	40%	1,50	0,15	100,0	1	1,4
	60%	16,10	2,70	167,7	18	2,3
	80%	33,05	6,60	199,7	44	2,7
Sulfato amónico	50%	12,85	0,15	11,6	1	0,2
	70%	13,65	0,30	22,0	2	0,3
	90%	34,10	1,05	30,8	7	0,4
Acido tánico	1%	104,10	12,45	119,6	82	1,6

3.4.3. Separación mediante cromatografía líquida.

A continuación se describen los resultados obtenidos en la secuencia de cromatografías a las que se sometió el crudo enzimático hasta la purificación de las tres proteínas con actividad β -1,3-glucanasa.

3.4.3.1. Separación en DEAE Bio Gel A.

‘En este primer paso una de las tres proteínas (III) se retuvo en la columna y se eluyó a una concentración 180 mM de NaCl y se separó del resto de las proteínas del crudo que no quedaban retenidas. Las fracciones correspondientes a este pico se unieron y se concentraron y dializaron para someterlas al siguiente proceso. En la parte no retenida (NR) se diferenciaron dos picos muy poco separados con actividad β -1,3-glucanasa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.16.

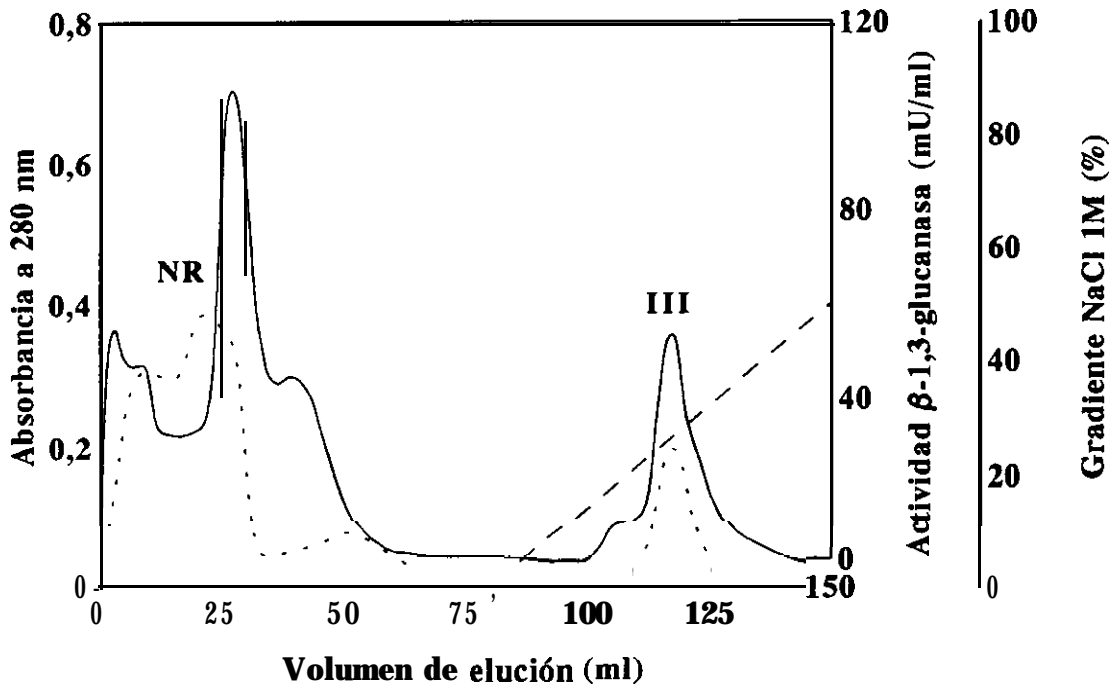


Figura 3.16. Perfil de elución de proteínas (—) y de la actividad β -1,3-glucanasa (·····) a través de una columna de DEAE Bio Gel A. También está representado el gradiente de NaCl 1M (---).

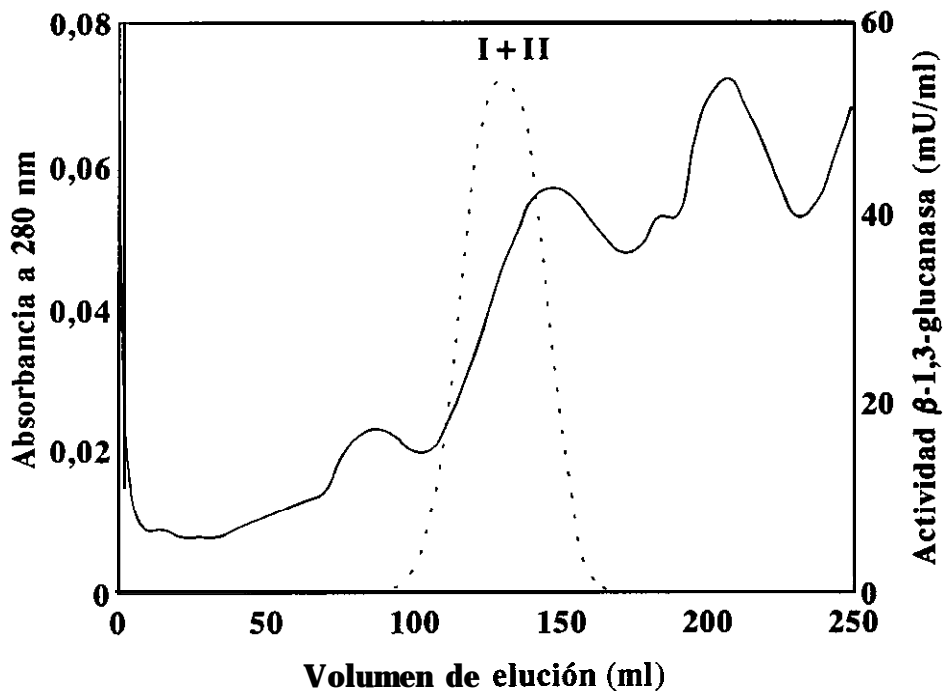


Figura 3.17. Perfil de elución de las proteínas no retenidas en DEAE Bio Gel A (—) y de la actividad β -1,3-glucanasa (·····) a través de una columna de Sephadex G-200.

3.4.3.2. Senaración en Senhadex G-200.

La fracción no retenida en DEAE Bio Gel A (NR) se mezcló y concentró para someterla a cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-200. En este paso se eliminó un pigmento rojizo que interfería en la purificación y un pico con actividad β -1,3-glucanasa (I+II) (figura 3.17.). Este se concentró y dializó para someterlo a una posterior cromatografía en Mono Q HR 5/5.

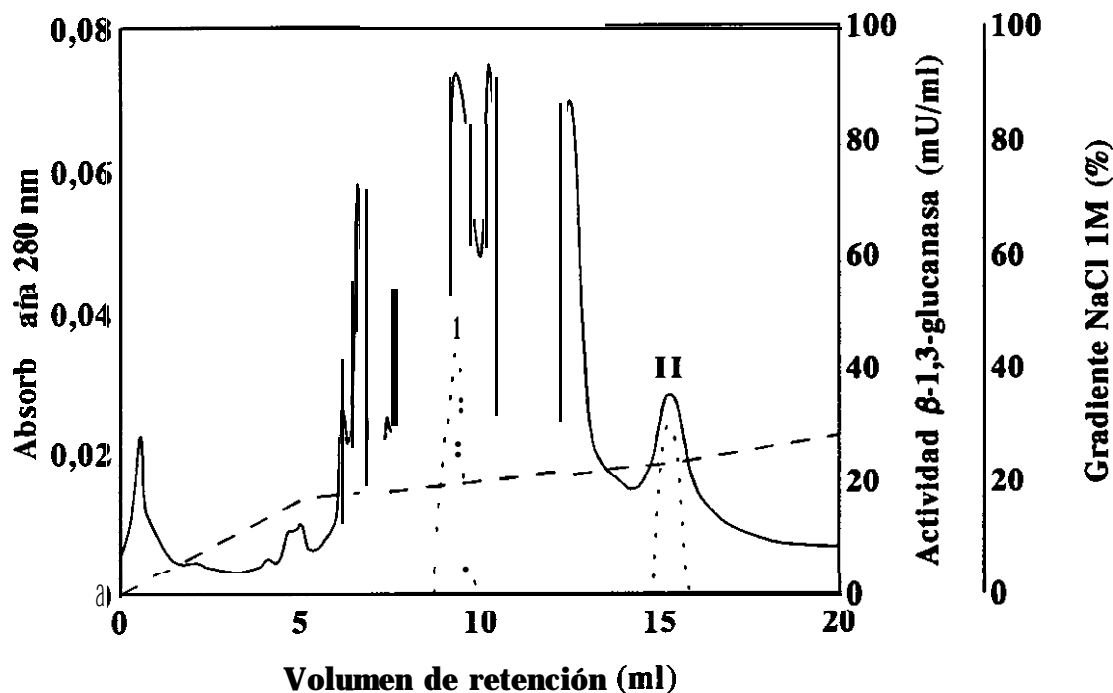


Figura 3.18. Perfil de elución de proteínas del pico I+II procedente de la cromatografía en Sephadex G-200 (—) y de la actividad β -1,3-glucanasa (.....) a través de una columna Mono Q HR 5/5. El gradiente de NaCl 1M también está representado (- -).

3.4.3.3. Senaración en Mono Q HR 5/5 de las uroteínas 1 y II.

El pico 1+II obtenido de la cromatografía en Sephadex G-200 se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en una columna Mono Q HR 5/5. En este paso las proteínas 1 y II se eluyeron a una concentración de NaCl de 192 mM y 226 mM respectivamente (figura 3.18.). Una vez separados los picos 1 y II, se dializaron y se recromatografiaron en la misma columna en condiciones isocráticas (figuras 3.19. y 3.20).

3.4.3.4. Senaración en Mono Q HR 5/5 de la nroteína III.

El pico III obtenido en la cromatografía en DEAE Bio Gel A se cargó en una columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5. El pico con actividad separado (III) se eluyó a una concentración de NaCl de 322 mM (figura 3.21.). Éste se dializó y se recromatografió en condiciones isocráticas en la misma

columna (figura 3.22.).

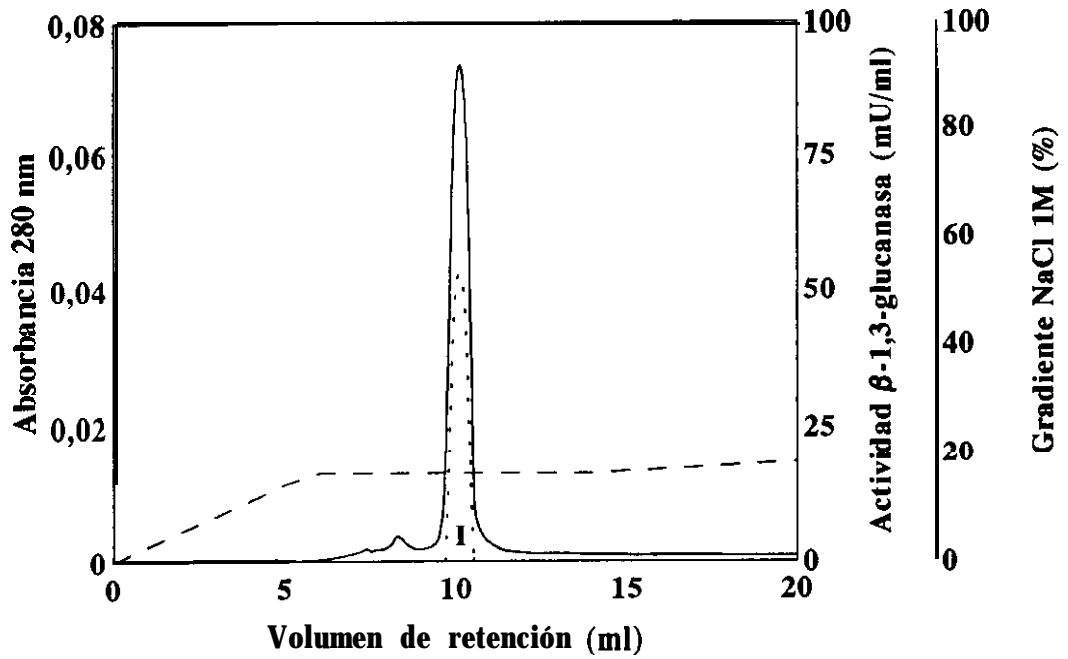


Figura 3.19. Perfil de elución de proteínas del pico 1 procedente de Mono Q HR 5/5 (—) y de la actividad β -1,3-glucanasa (.....) a través de una columna Mono Q HR 5/5 con un gradiente isocrático de NaCl (- -).

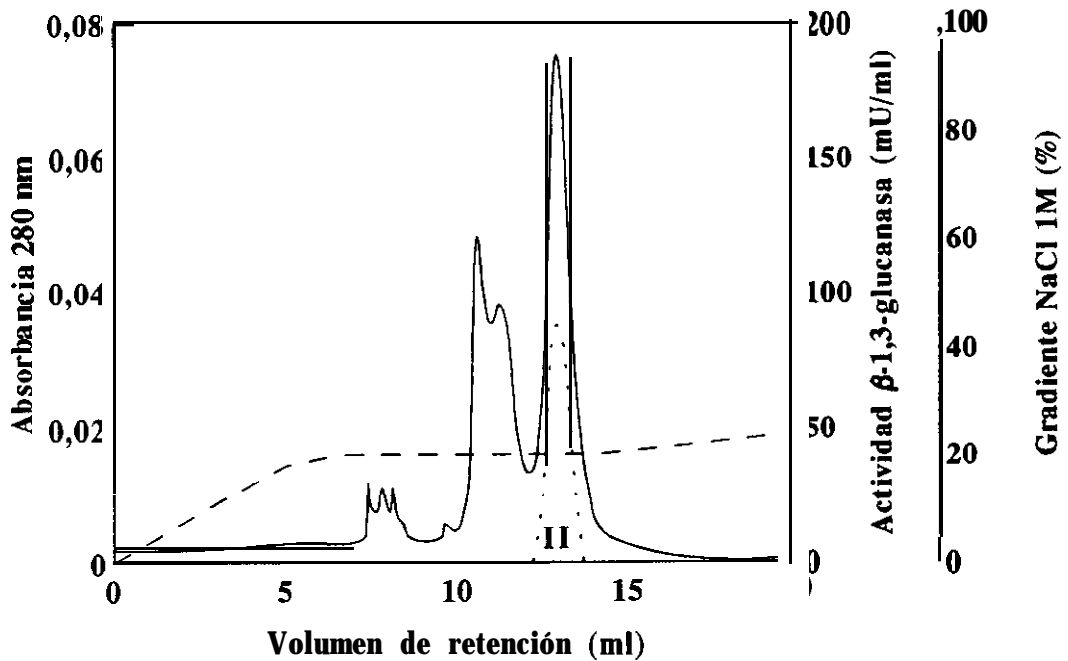


Figura 3.20. Perfil de elución de proteínas del pico II procedente de Mono Q HR 5/5 (—) y de la actividad β -1,3-glucanasa (.....) a través de una columna Mono Q HR 5/5 con un gradiente isocrático de NaCl (- -).

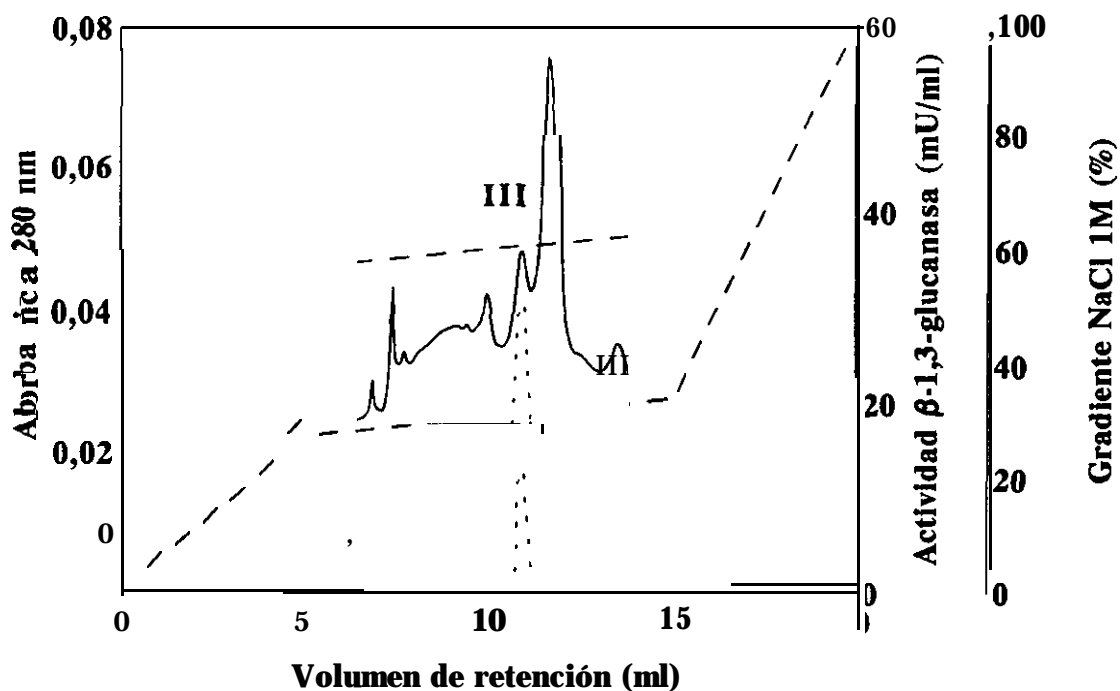


Figura 3.21. Perfil de elución de proteínas del pico III procedente de la columna de DEAE Bio Gel A (—) y de la actividad β -1,3-glucanasa (.....) en la columna Mono Q HR 5/5 El gradiente de NaCl también está representado (- -).

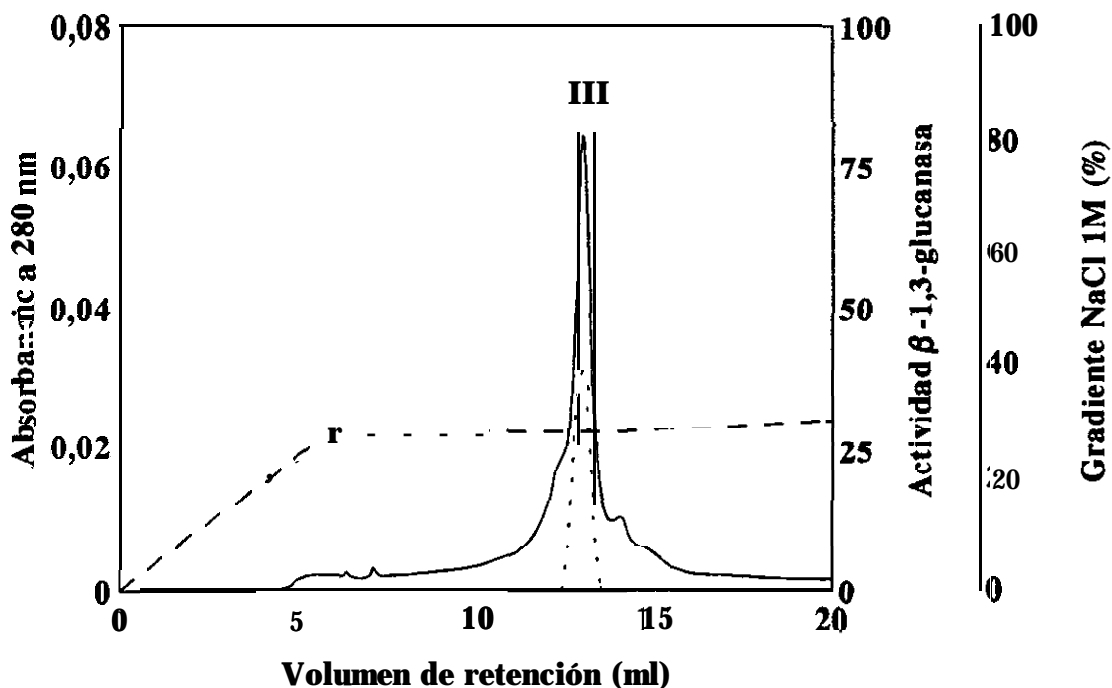


Figura 3.22. Perfil de elución de proteínas del pico III procedente de Mono Q HR 5/5 (—) y de la actividad β -1,3-glucanasa (.....) a través de una columna Mono Q HR 5/5 con un gradiente isocrático de NaCl (- -).

3.4.3.5. Separación en Superosa 12 HR 10130.

Las figuras 3.23. a 3.25. muestran los resultados correspondientes a la cromatografía de los picos 1, II y III procedentes de la cromatografía en Mono Q HR 5/5 a través de la columna Superosa 12 HR 10/30.

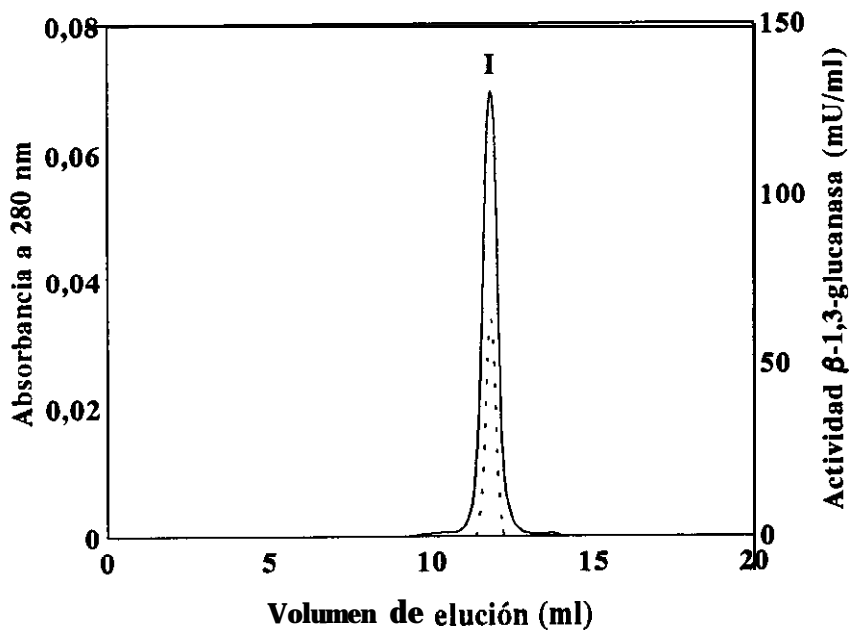


Figura 3.23. Perfil de elución de proteínas del pico 1 procedente de la cromatografía en Mono Q HR 5/5 (—) y de la actividad β -1,3-glucanasa (.....) a través de la columna Superosa 12 I-IR 10/30.

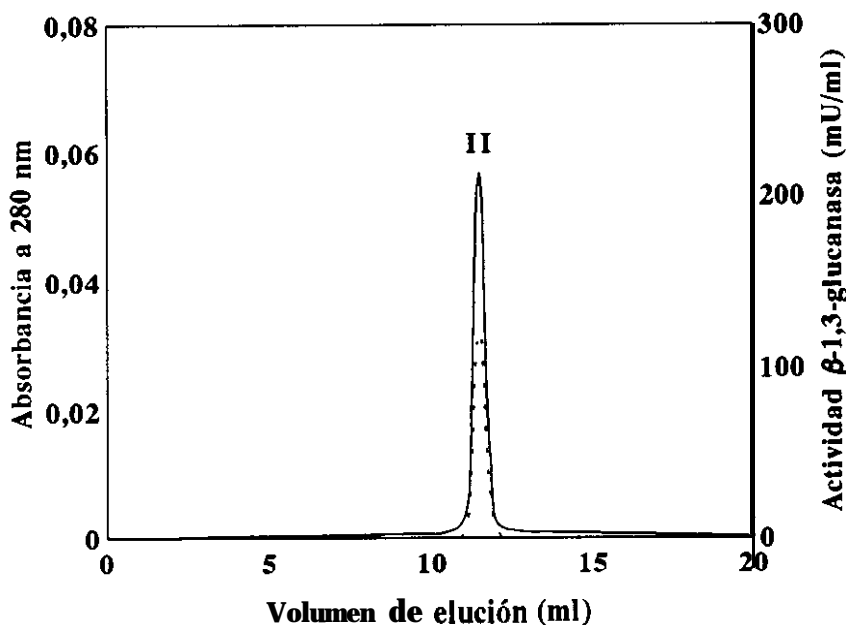


Figura 3.24. Perfil de elución de proteínas del pico II procedente de la cromatografía en Mono Q HR 5/5 (—) y de la actividad β -1,3-glucanasa (.....) en la columna Superosa 12 HR 10/30.

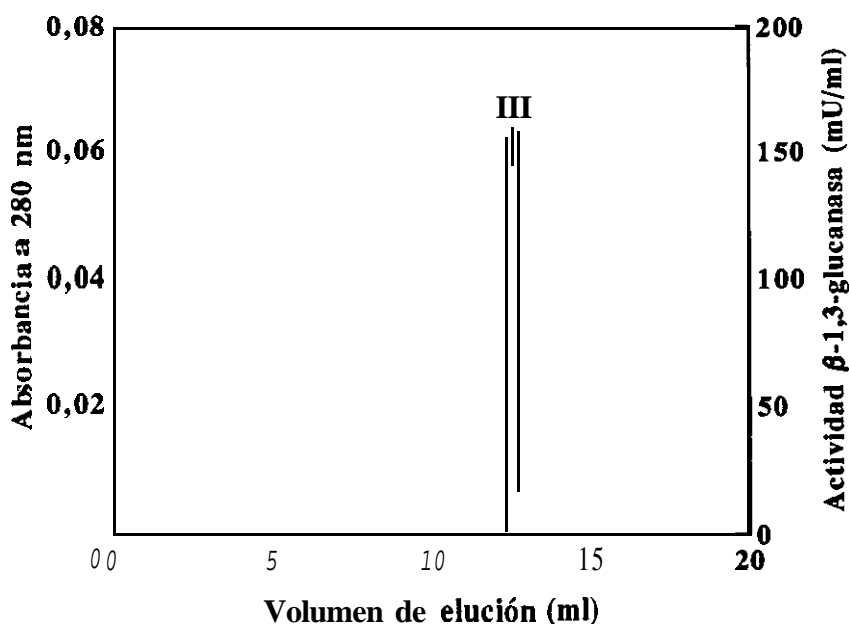


Figura 3.25. Perfil de elución de proteínas del pico III procedente de la cromatografía en Mono Q HR 5/5 (—) y de la actividad β -1,3-glucanasa (.....) en la columna Superosa 12 HR 10/30.

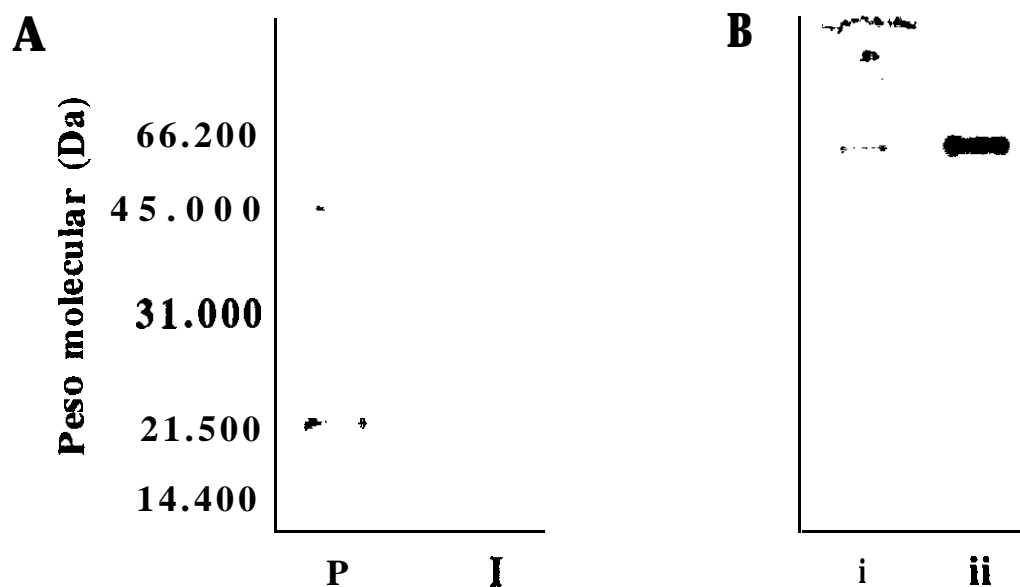


Figura 3.26. Electroforesis en gels de poliacrilamida de la β -1,3-glucanasa 1 de *A. nidulans*. A: Condiciones desnaturalizantes en gels del 12% (i). Proteínas patrón de peso molecular (P). B: Condiciones nativas en gels del 12%. Revelado con AgNO_3 (i). Revelado como actividad β -1,3-glucanasa (ii).

3.4.4. Electroforesis de las proteínas 1, II y III purificadas.

Los picos obtenidos en la cromatografía en Superosa 12 se sometieron a electroforesis en gels de poliacrilamida en condiciones nativas y desnaturalizantes. Todas ellas se mostraron homogéneas en condiciones nativas

y presentaron una sola banda al revelarlas como actividad β -1,3-glucanasa. En condiciones desnaturalizantes las β -1,3-glucanasa II y III se mostraron homogéneas, mientras que la β -1,3-glucanasa I mostró dos bandas. Los resultados se muestran en las figuras 3.26. a 3.28.

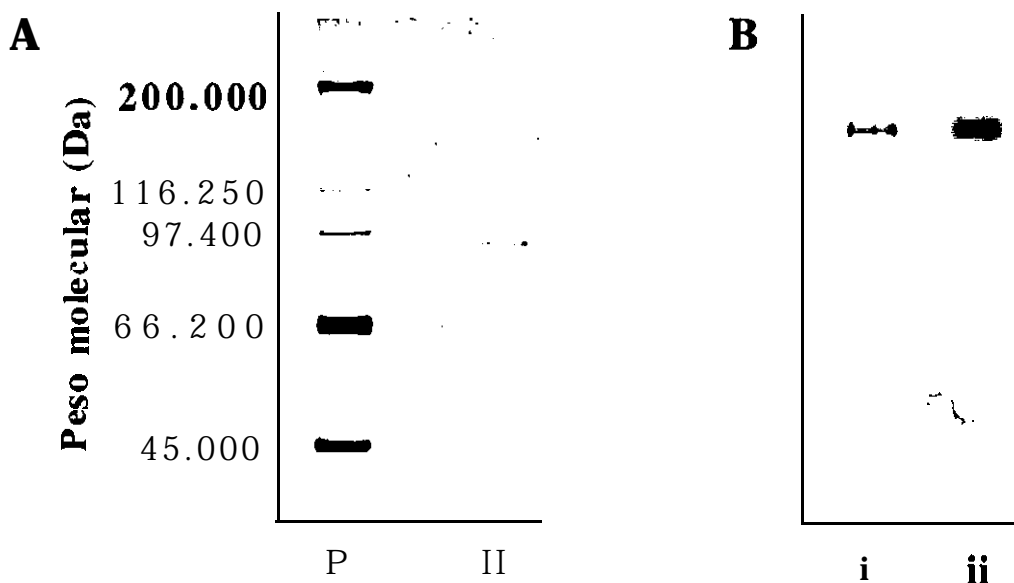


Figura 3.27. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la β -1,3-glucanasa II de *A. nidulans*. A: Condiciones desnaturalizantes en geles del 7,5% (i). Proteínas patrón de peso molecular (P). B: Condiciones nativas en geles del 12%. Revelado con AgNO₃ (i). Revelado como actividad β -1,3-glucanasa (ii).

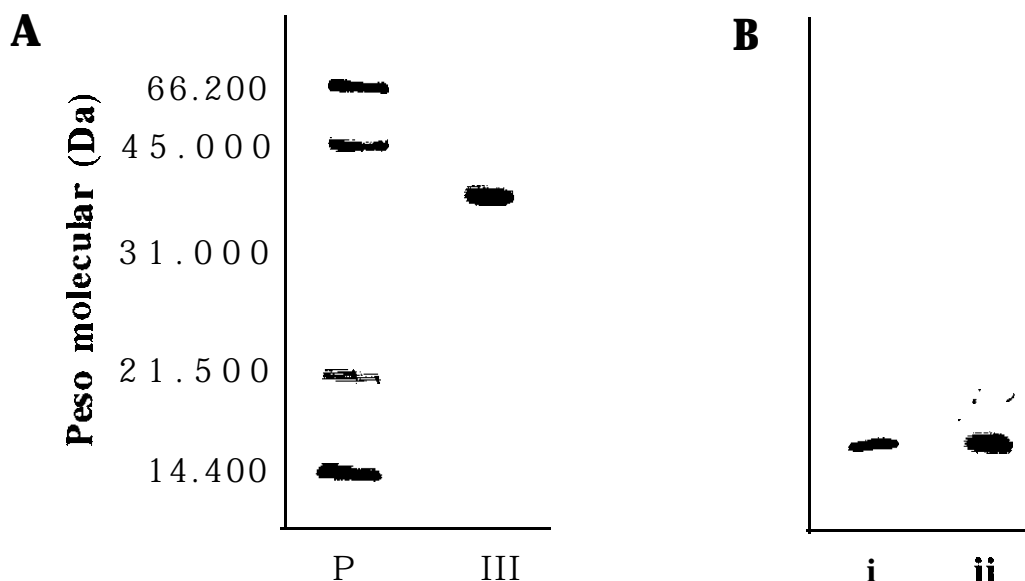


Figura 3.28. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la β -1,3-glucanasa III de *A. nidulans*. A: Condiciones desnaturalizantes en geles del 12% (i). Proteínas patrón de peso molecular (P). B: Condiciones nativas en geles del 12%. Revelado con azul de Coomassie (i). Revelado como actividad β -1,3-glucanasa (ii).

3.4.5. Rendimiento en la purificación.

El rendimiento global de la purificación fue de un 28 %, y para las proteínas I, II y III de un 15%, un 12% y un 1% respectivamente. Los resultados de cada paso de purificación se muestran en las tablas 3.4 a 3.6.

Tabla 3.4. Tabla de purificación de la actividad β -1,3-glucanasa I de *A. nidulans*.

	Proteínas (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Grado de purificación (veces)
Líquido de cultivo	205,00	15,15	0,074		
Acido tánico 1 % (p/v)	104,10	12,45	0,120	8,2	1,6
DEAE Bio Gel A	36,15	10,85	0,300	7,2	4,1
Sephadex G-200	9,70	10,70	1,103	7,1	14,9
Mono Q HR 5/5	1,70	4,70	2,765	3,1	37,4
Mono Q HR 5/5	0,80	2,75	3,438	1,8	46,5
Superosa 12 HR 10/30	0,55	2,25	4,091	1,5	55,3

Tabla 3.5. Tabla de purificación de la actividad β -1,3-glucanasa II de *A. nidulans*.

	Proteínas (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Grado de purificación (veces)
Líquido de cultivo	205,00	15,15	0,074	-	
Acido tánico 1 % (p/v)	104,10	12,45	0,120	8,2	1,6
DEAE Bio Gel A	36,15	10,85	0,300	7,2	4,1
Sephadex G-200	9,70	10,70	1,103	7,1	14,9
Mono Q HR 5/5	1,10	3,33	3,027	2,2	40,9
Mono Q HR 515	0,30	2,70	9,000	1,8	121,6
Superosa 12 HR 10/30	0,15	1,82	12,333	1,2	164,0

Tabla 3.6. Tabla de purificación de la actividad β -1,3-glucanasa III de *A. nidulans*.

	Proteínas (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Grado de purificación (veces)
Líquido de cultivo	205,00	15,15	0,074		
Acido tánico 1 % (p/v)	104,10	12,45	0,120	82,0	1,6
DEAE Bio Gel A	1,50	1,25	0,833	8,0	11,3
Mono Q HR 5/5	0,14	0,18	1,286	1,2	16,9
Mono Q HR 5/5	0,04	0,16	3,855	1,1	52,2
Superosa 12 HR 10/30	0,02	0,16	8,000	1,0	104,9

3.5. Propiedades físico-químicas de las β -1,3-glucanasas purificadas.

3.5.1. pH óptimo.

Los pHs óptimos de las tres β -1,3-glucanasas fueron de 5, 7 y 5 unidades para las enzimas I, II y III respectivamente (figura 3.29.).

3.5.2. Estabilidad al pH.

En la figura 3.30. se muestra el comportamiento de las tres enzimas después de ser incubadas durante una hora a diferentes pH a temperatura ambiente. Todas resultaron ser estables a valores de pH básicos. Así, la β -1,3-glucanasa I es estable en un rango de pH de 8 a 11 unidades decayendo su actividad al disminuir el pH para luego aumentar a valores de pH muy ácidos (2-3 unidades). El comportamiento de la β -1,3-glucanasa II es diferente, ésta resulta ser estable en un rango de pH de 10 a 12 unidades y su estabilidad disminuye bruscamente al disminuir el pH. La β -1,3-glucanasa III es estable en un rango de 8 a 11 unidades de pH y su estabilidad decrece a valores de pH más bajos.

3.5.3. Temperatura óptima.

La temperatura óptima para las enzimas I, II y III fue de 60 °C, 60 °C y 40 °C respectivamente (figura 3.31.).

3.5.4. Estabilidad a la temperatura.

La estabilidad a diferentes temperaturas fue similar para las enzimas I y II (figuras 3.32. y 3.33.) perdiendo rápidamente su actividad a altas temperaturas (75 y 100 °C). La β -1,3-glucanasa III fue más estable a temperaturas elevadas (figura 3.34.). Incubándolas durante una hora a diferentes temperaturas, la

estabilidad de las β -1,3-glucanasas 1 y II fue muy similar para ambas siendo estables durante 1 hora hasta una temperatura de 30 °C. La β -1,3-glucanasa III tuvo un comportamiento diferente ya que esta resultó ser estable hasta 50 °C (figura 3.35.):

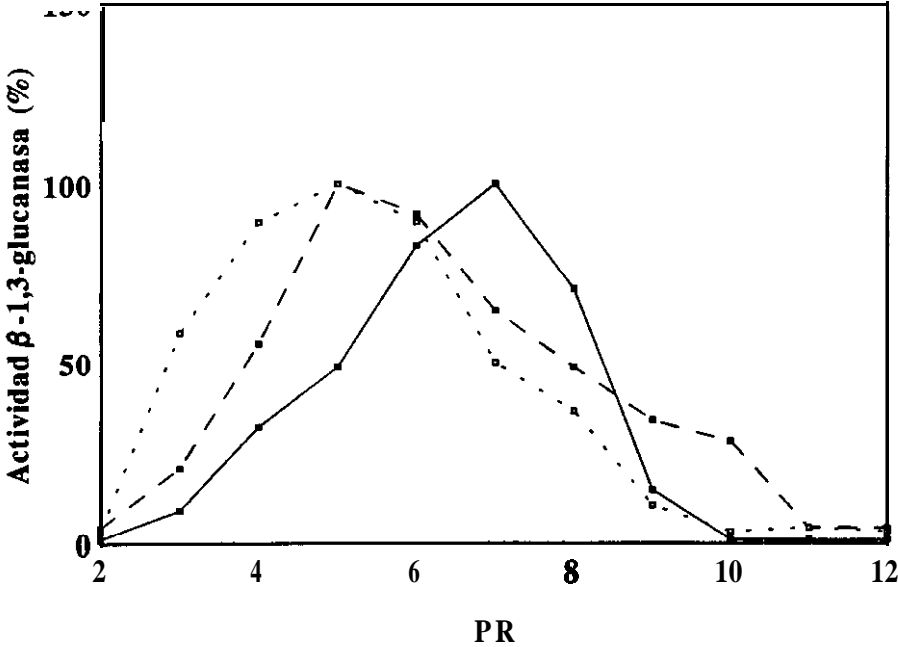


Figura 3.29. pH óptimo de las β -1,3-glucanasas 1 (.....), II (—) y III (- - -).

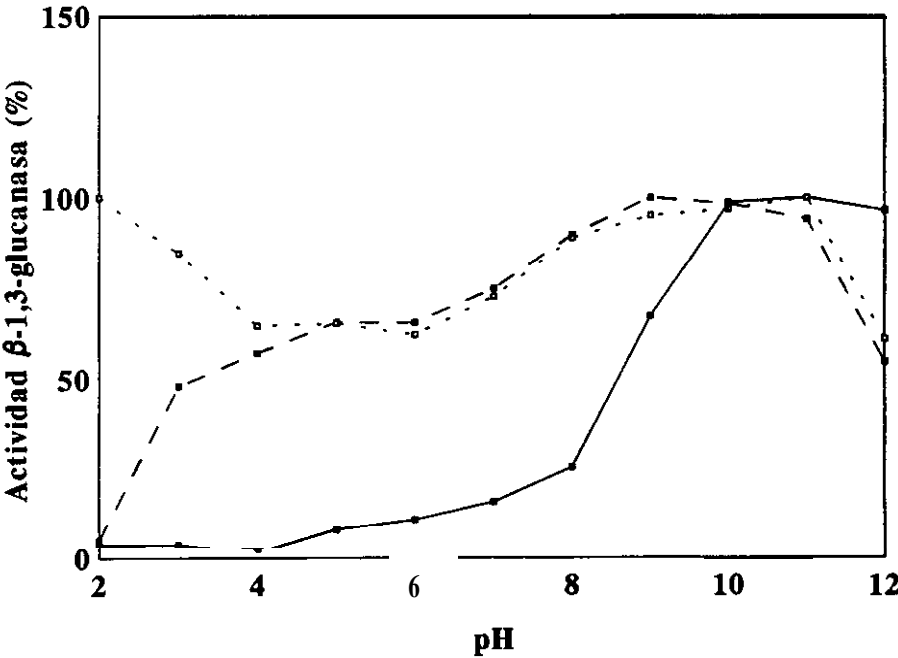


Figura 3.30. Estabilidad frente al pH de las β -1,3-glucanasas 1 (.....), II (—) y III (- - -).

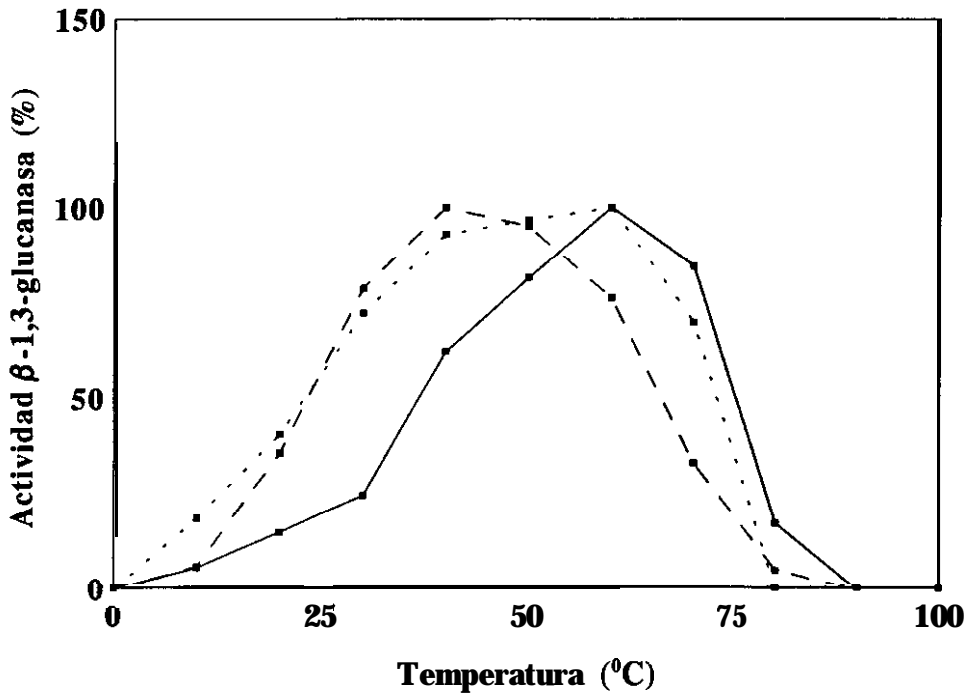


Figura 3.31. Temperatura óptima de las enzimas I (.....), II (—) y III (---).

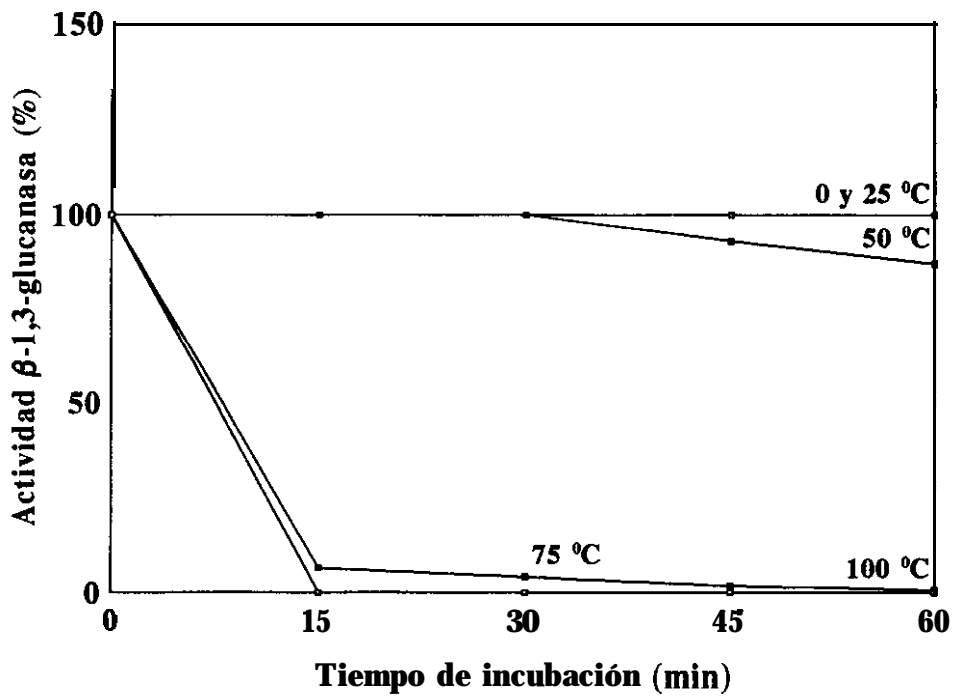


Figura 3.32. Estabilidad a la temperatura de la β -1,3-glucanasa 1.

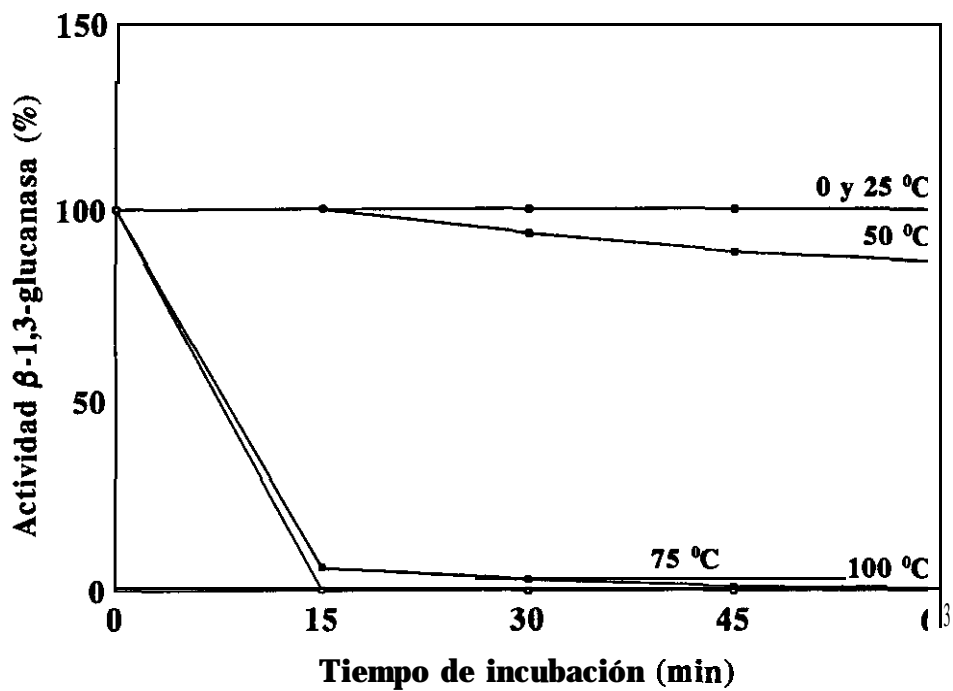


Figura 3.33. Estabilidad a la temperatura de la β -1,3-glucanasa II.

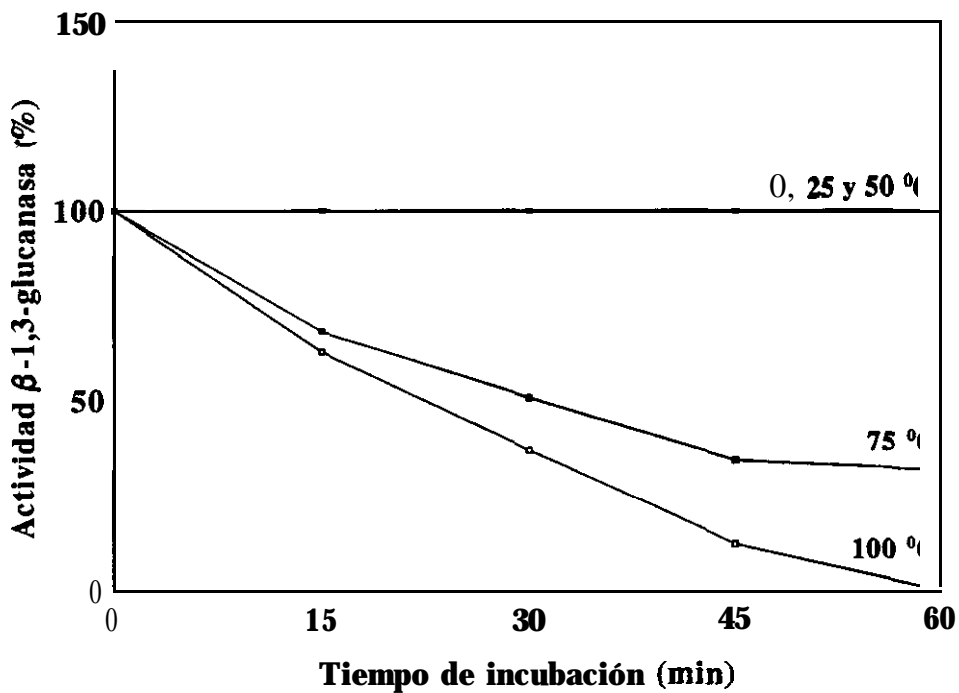


Figura 3.34. Estabilidad a la temperatura de la β -1,3-glucanasa III.

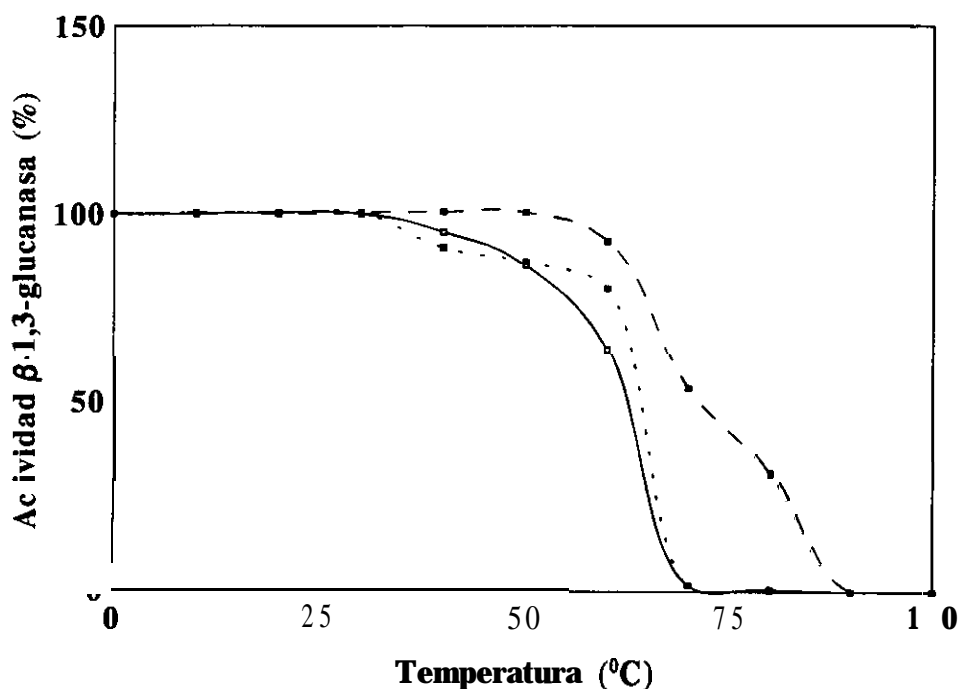


Figura 3.35. Estabilidad frente a la temperatura al cabo de una hora de incubación de las β -1,3-glucanasas I (.....), II (—) y III (- - -).

3.55. Masa molecular.

Las masas moleculares calculadas por cromatografía en Superosa 12 HR 10/30 fueron de 69500, 69700 y 44600 Da para las β -1,3-glucanasas I, II y III respectivamente (figura 3.36.). Al calcular las masas moleculares por electroforesis desnaturizante (figura 3.37.) la β -1,3-glucanasa I se desdobló en dos bandas de 52800 Da y 48900 Da. Las masas moleculares calculados por este último procedimiento fueron de 97400 Da para la β -1,3-glucanasa II y 41100 Da para la β -1,3-glucanasa III (figuras 3.38. y 3.39. respectivamente).

3.5.6. Punto isoelectrico (pI).

Todas las proteínas se mostraron homogéneas en isoelectroenfoque. Los puntos isoelectricos fueron de 4,56 unidades para I, 4,49 unidades para II y 2,94 unidades para III. Los resultados obtenidos en el calculo de los puntos isoelectricos se muestran en las figuras 3.40. a 3.42. Tmbién se muestra el gradiente de pH obtenido.

3.5.7. Porcentaje de carbohidratos.

El porcentaje de carbohidratos fue del 40 % para la β -1,3-glucanasa I, del 34 % para la β -1,3-glucanasa II y del 15% para la β -1,3-glucanasa III.

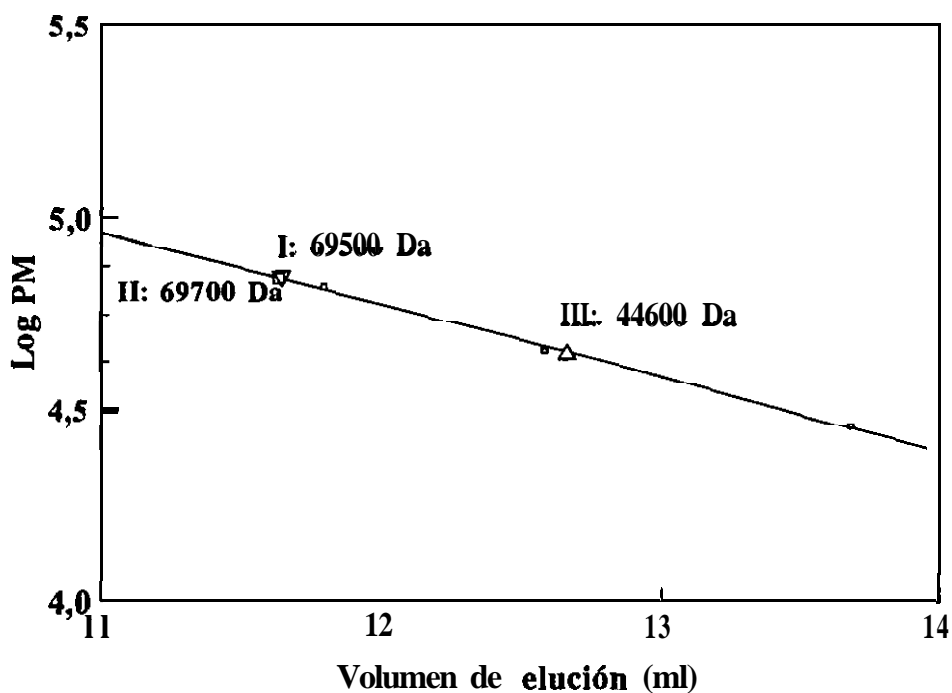


Figura 3.36. Cálculo de la masa molecular de las proteínas 1, II y III por cromatografía en Superosa 12 HR 10/30.

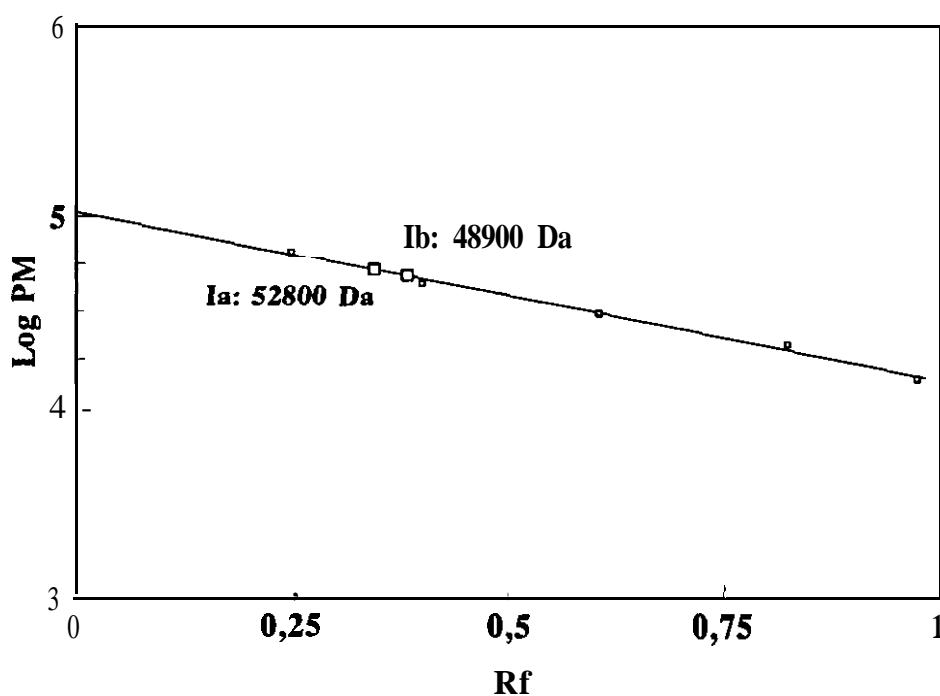


Figura 3.37. Cálculo de la masa molecular de la β -1,3-glucanasa I por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (\square).

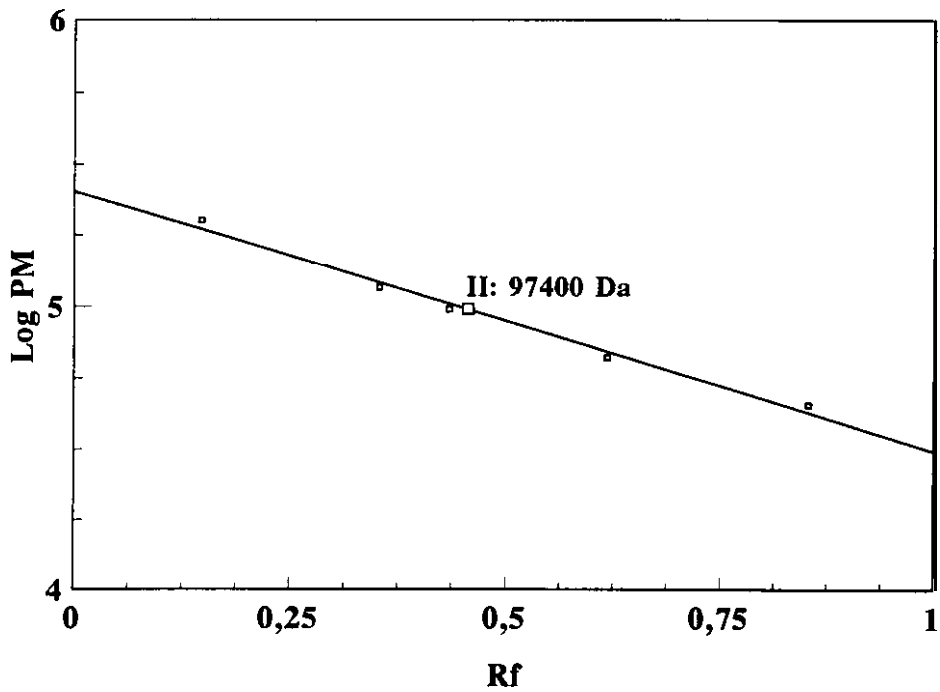


Figura 3.38. Cálculo de la masa molecular de la β -1,3-glucanasa II por electroforesis en condiciones **desnaturalizantes** (\square).

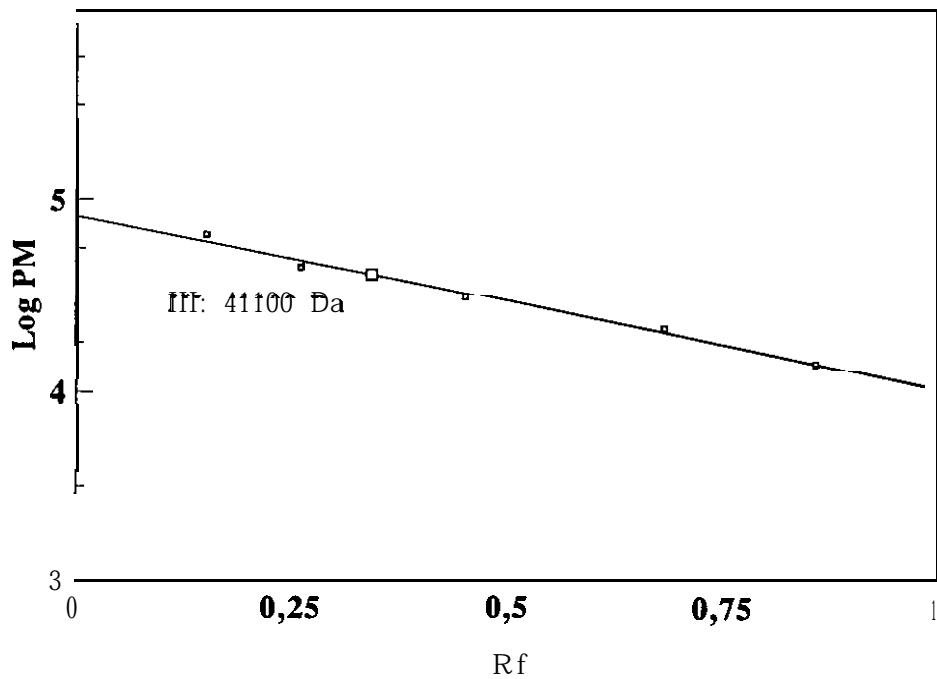


Figura 3.39. Cálculo de la masa molecular de la β -1,3-glucanasa III por electroforesis en condiciones **desnaturalizantes** (\square).

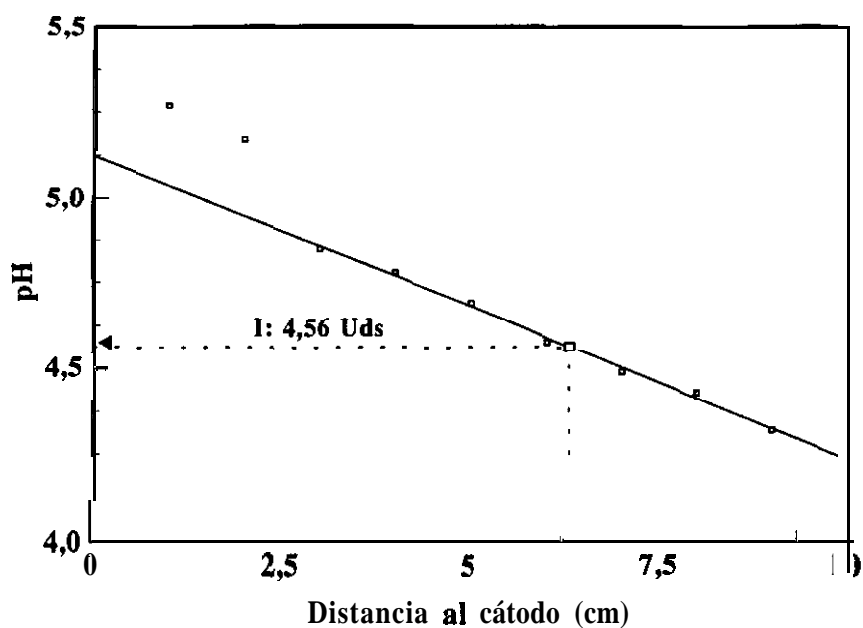


Figura 3.40. Determinación del punto isoelectrico de la β -1,3-glucanasa I utilizando anfolitos de 2,5 a 5 unidades de pH.

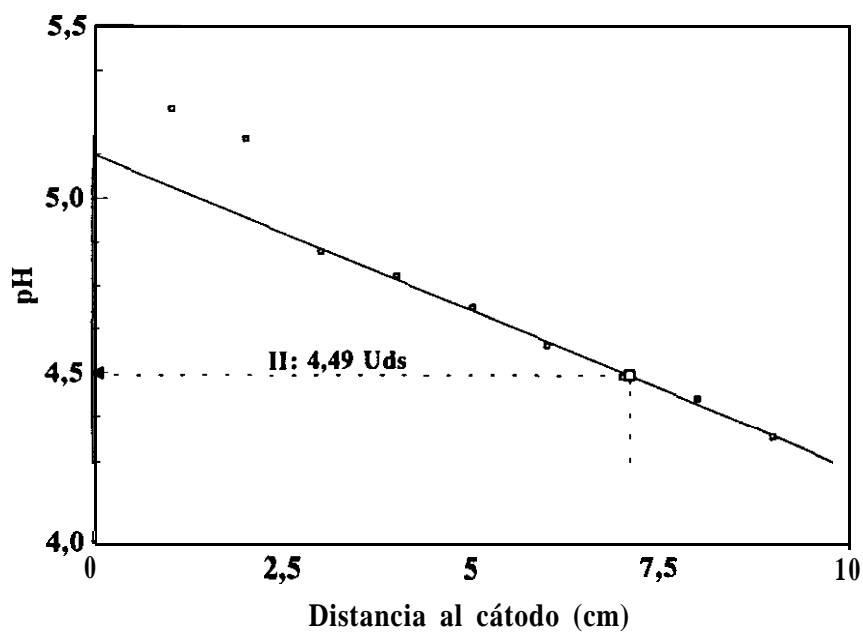


Figura 3.41. Determinación del punto isoelectrico de la β -1,3-glucanasa II utilizando anfolitos de 2,5 a 5 unidades de pH.

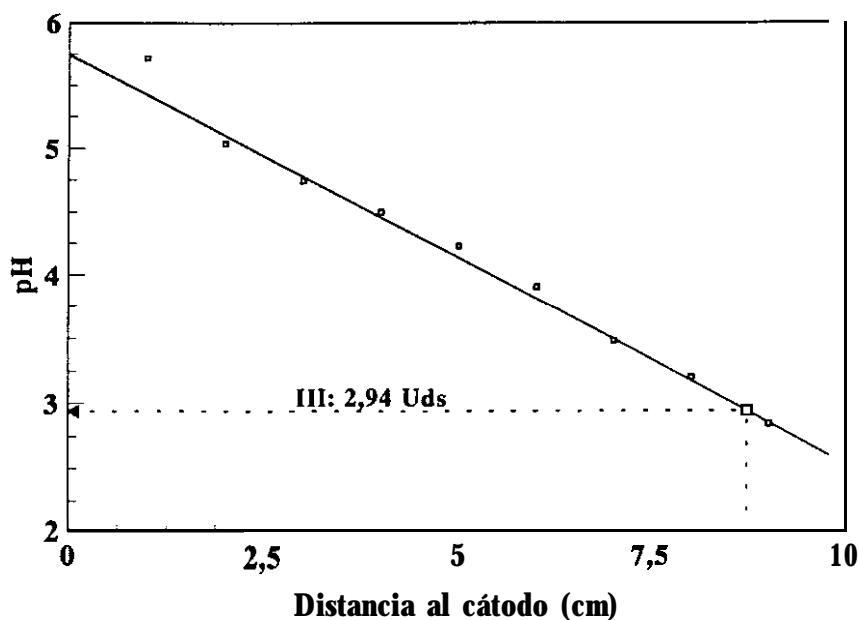


Figura 3.42. Determinación del punto isoeléctrico de la β -1,3-glucanasa III utilizando anfolitos de 2,5 a 5 unidades de pH.

3.6. Estudio cinético de las enzimas purificadas.

3.6.1. Variación de la actividad con la concentración de enzima.

Utilizando la concentración de sustrato y tiempo de reacción indicados en el apartado 2.18.1. la enzima I presentó comportamiento lineal para todas las concentraciones ensayadas. Para la β -1,3-glucanasa II se observó un incremento lineal hasta una concentración de 7,5 μ g/ml. Finalmente, la enzima III sólo presentó linealidad a bajas concentraciones (figura 3.43.).

3.6.2. Variación de la actividad con el tiempo de incubación.

La enzima 1 presentó un incremento lineal durante 60 minutos de reacción, mientras que la enzima II mostró linealidad únicamente durante los primeros 30 minutos. En el caso de la β -1,3-glucanasa III sólo se observó comportamiento lineal durante 20 minutos de reacción (figura 3.44.).

3.6.3. Variación de la actividad con la concentración de sustrato. K_m y $V_{m\acute{a}x}$.

Las K_m son de 0,86 mg/ml, 0,15 mg/ml y 0,94 mg/ml para las enzimas I, II y III respectivamente utilizando laminarina como sustrato. Considerando la masa molecular de la laminarina como 4000 Da (Villa y col. 1976), los valores de K_m se pueden expresar en molaridad siendo de 0,22 mM, 0,038 mM y 0,24 mM para cada una de las β -1,3-glucanasas respectivamente. La K_m para la

enzima II utilizando p-nitrofenil-B-D-glucósido como sustrato es de 2,07 mM (figuras 3.45. a 3.48. y tabla 3.7).

Tabla 3.7. Parámetros cinéticos de las β -1,3-glucanasas purificadas.

	Laminarina			p-nitrofenil- β -D-glucósido		
	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	$V_{m\acute{a}x}/K_m$ (U/mM mg)	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	$V_{m\acute{a}x}/K_m$ (U/mM mg)
I	0,22	10,91	49,59			
II	0,038	15,88	417,69	2,07	3,04	1,47
III	0,24	23,03	95,96	-		

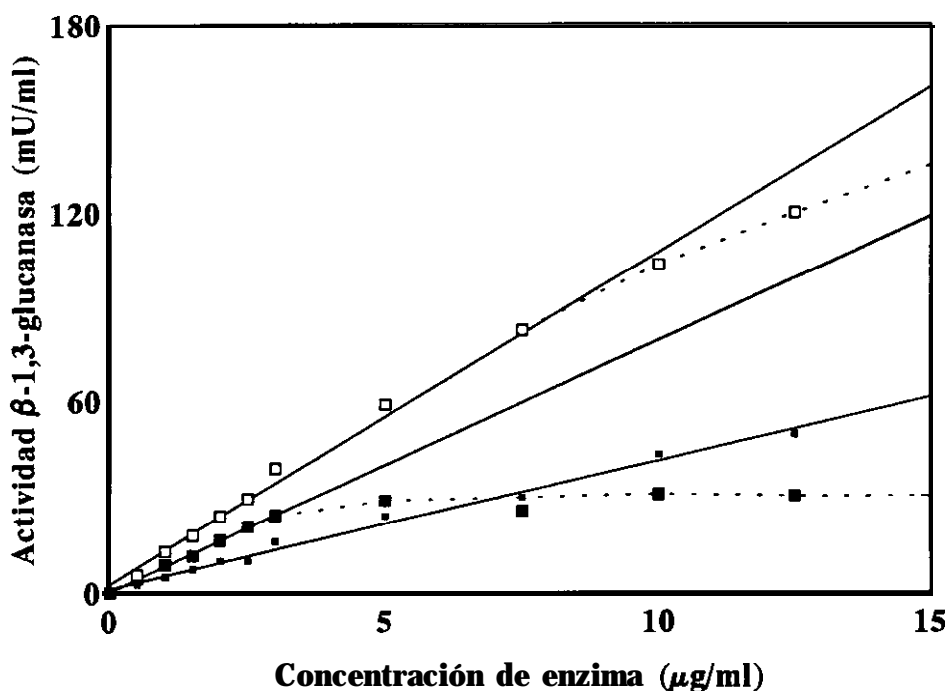


Figura 3.43. Variación de las actividades I (\square), II (\square) y III (\blacksquare) con la concentración de enzima.

3.6.4. Inhibición por glucono-blactona. K_i .

En las figuras de la 3.49. a 3.51. se observan diferentes grados de inhibición por glucono-g-lactona de las β -1,3-glucanasas purificadas. Así, la β -1,3-glucanasa I se inhibe en un 71% a una concentración 100 mM de glucono- δ -lactona. La enzima II lo hace en un 89% a una concentración de glucono- δ -lactona 100 μ M y el mismo valor se observa para la III a una concentración de glucono- δ -lactona 30 mM. Las constantes de inhibición (K_i) fueron de 3,4 mM, 2,26 μ M y 2,44 mM respectivamente para las enzimas I, II y III.

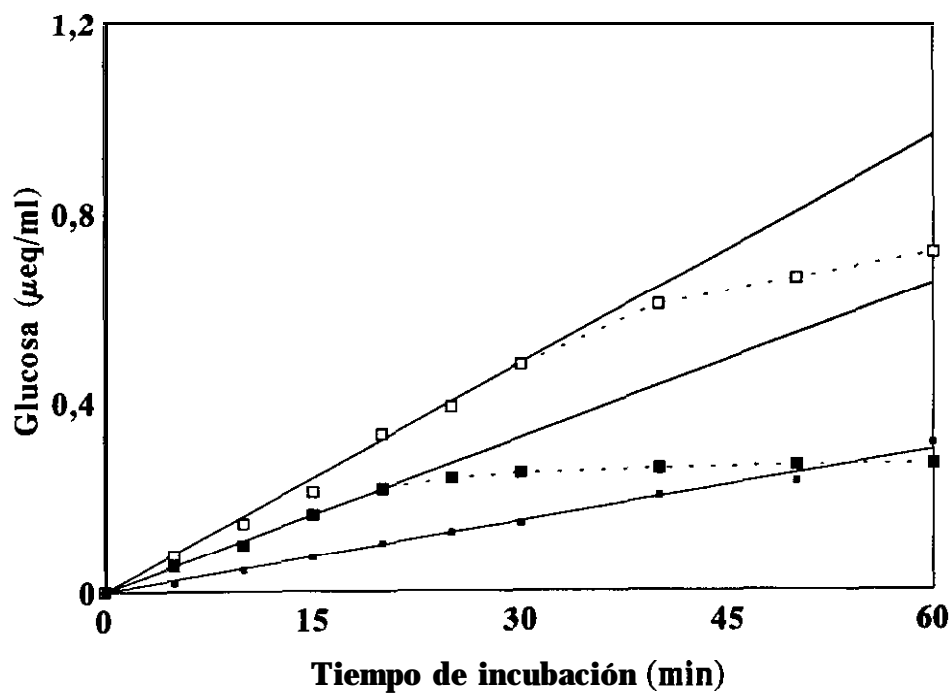


Figura 3.44. Variación de las actividades I (■), II (□) y III (■) con el tiempo de incubación.

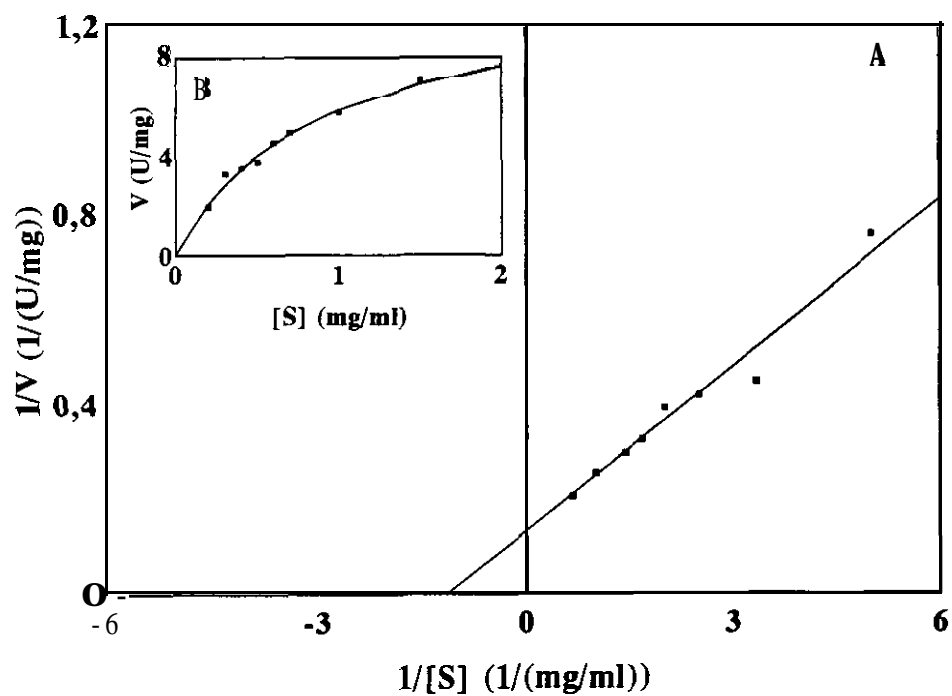


Figura 3.45. Cálculo de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima I (A) y variación de su actividad con la concentración de sustrato utilizando laminarina (B).

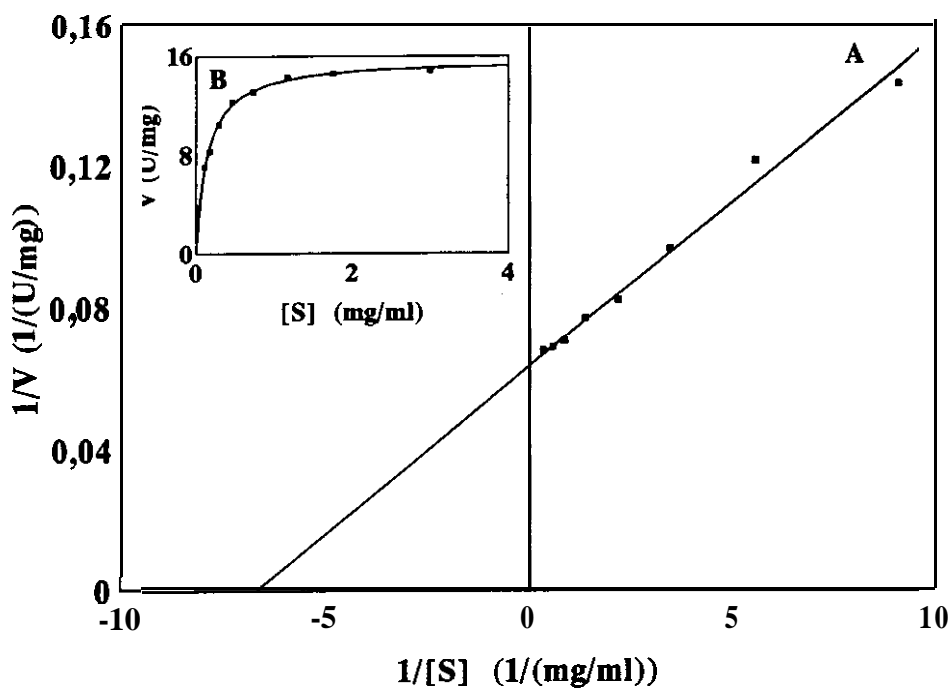


Figura 3.46. Cálculo de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima II (A) y variación de su actividad con la concentración de sustrato utilizando laminarina (B).

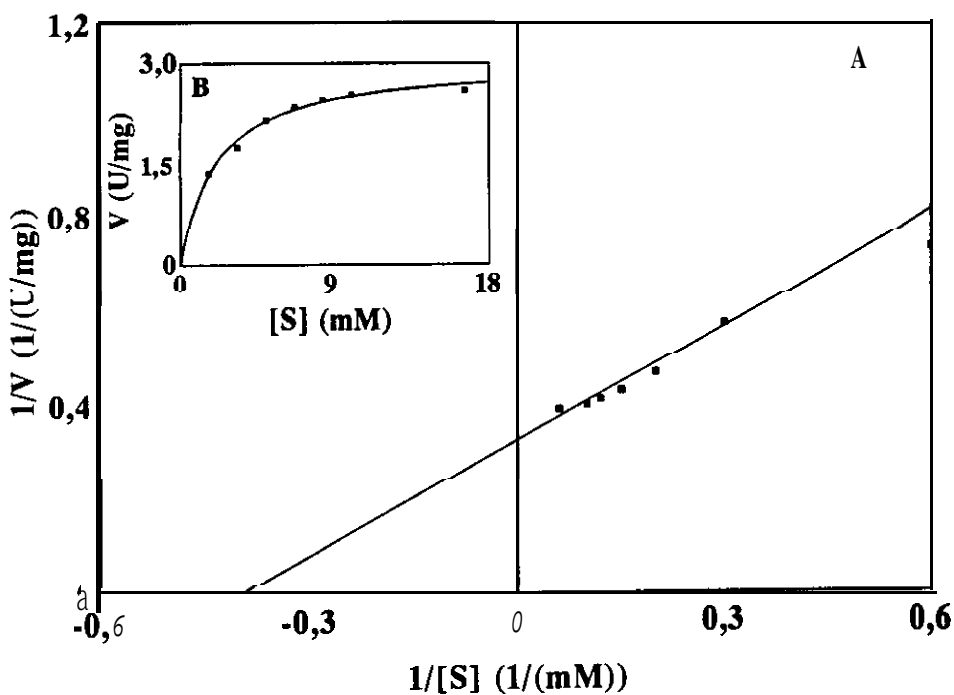


Figura 3.47. Cálculo de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima II (A) y variación de su actividad con la concentración de sustrato utilizando *p*-nitrofenil- β -D-glucósido (B).

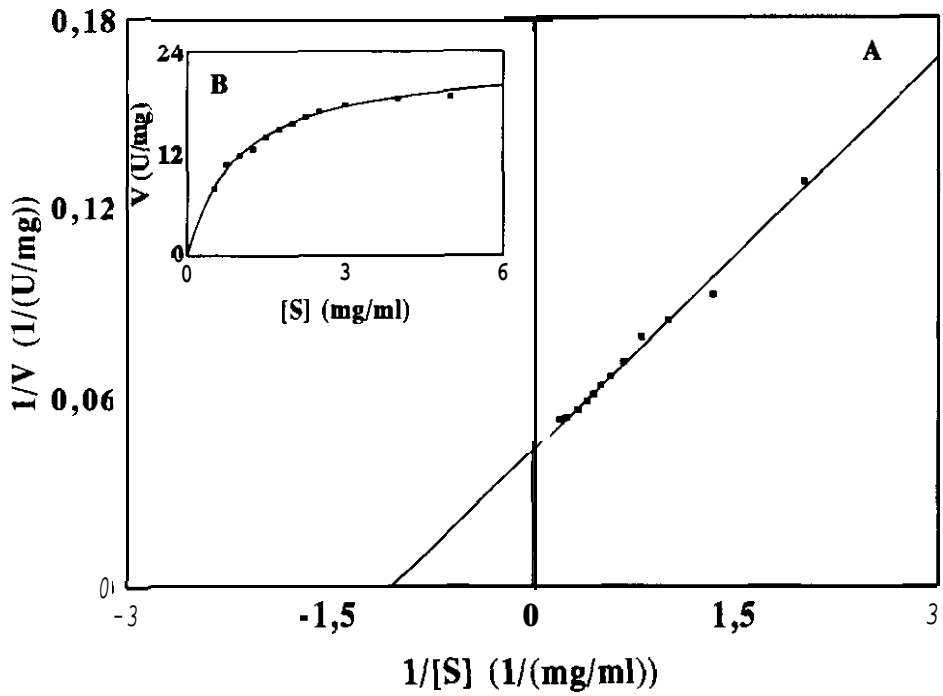


Figura 3.48. Cálculo de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima III (A) y variación de su actividad con la concentración de sustrato (B) utilizando laminarina.

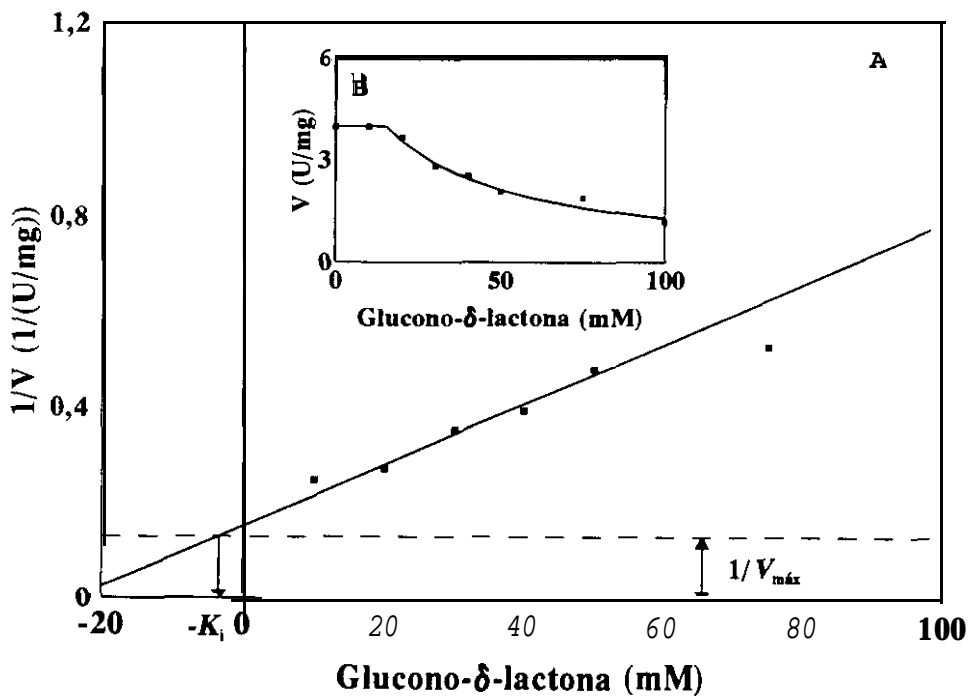


Figura 3.49. Cálculo de K_i de la enzima 1 (A) e inhibición de su actividad enzimática por glucono-S-lactona (B).

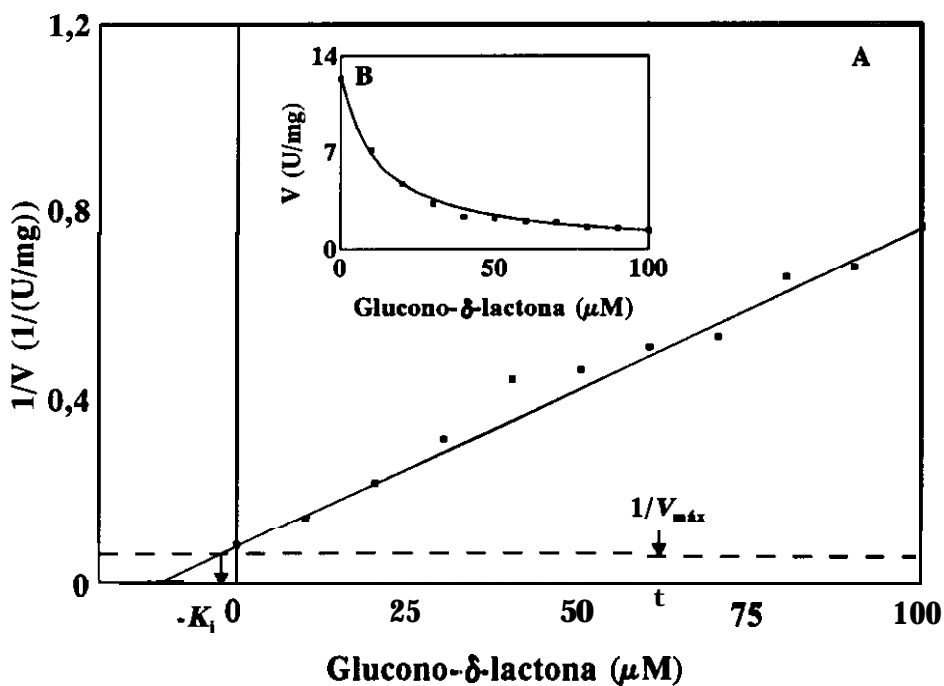


Figura 3.50. Cálculo de K_i de la enzima II (A) e inhibición de su actividad enzimática por glucono- δ -lactona (B).

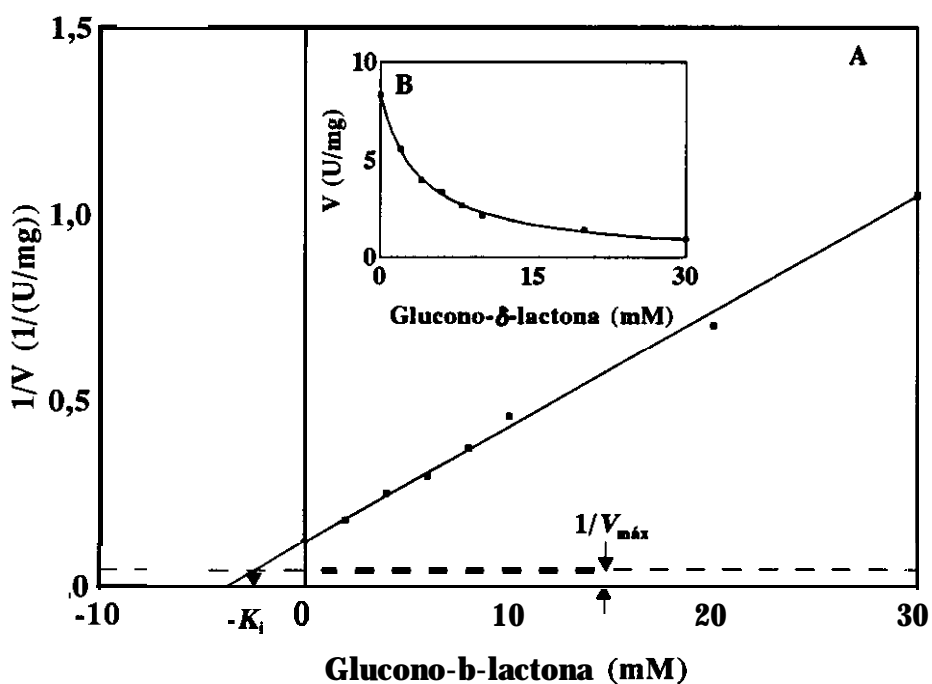


Figura 3.51. Cálculo de K_i de la enzima III (A) e inhibición de su actividad enzimática por glucono- δ -lactona (B).

3.6.5. Actividad enzimática en presencia de diferentes iones.

En la tabla 3.8. se muestra el efecto de la presencia de diferentes iones sobre la actividad de las diferentes β -1,3-glucanasas purificadas. Los iones Cd^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , NH_4^+ , Zn^{2+} y EDTA inhiben en mayor o menor medida todas las β -1,3-glucanasas purificadas. Además, para la β -1,3-glucanasa 1 se observa inhibición en presencia de Ag^+ , Ca^{2+} , Na^+ y Pb^{2+} . Los iones Fe^{2+} , Fe^{3+} , $\text{CH}_3\text{-COO}^-$, citrato, H_2PO_4^- y tartrato inhiben la β -1,3-glucanasa II. La actividad β -1,3-glucanasa III es inhibida en presencia de los iones Ag^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} . Algunos de los iones probados activan las enzimas purificadas. Así, para la β -1,3-glucanasa 1 se puede destacar el efecto activador de los cationes Fe^{3+} y K^+ . El catión Pb^{2+} y el anión $\text{CH}_3\text{-COO}^-$ activan las β -1,3-glucanasas II y III, respectivamente.

Tabla 3.8. Efecto de diferentes iones sobre la actividad de las diferentes β -1,3-glucanasas purificadas, expresado como actividad relativa (%).

	β -1,3-glucanasa 1		β -1,3-glucanasa II		β -1,3-glucanasa III	
	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM
Control	100	100	100	100	100	100
Cationes						
Ag^+	105	62	108	109	98	68
Ca^{2+}	93	83	97	99	109	75
Cd^{2+}	106	43	97	77	91	62
Co^{2+}	100	51	81	69	60	56
Cu^{2+}	103	98	101	108	58	0
Fe^{2+}	115	112	48	1	30	0
Fe^{3+}	97	129	96	52	45	0
Hg^{2+}	53	29	47	45	64	5
K^+	116	140	103	93	96	109
Mg^{2+}	88	82	80	84	97	88
Mn^{2+}	20	20	83	71	55	57
Na^+	103	54	99	97	95	94
NH_4^+	108	16	71	70	88	57
Pb^{2+}	118	89	103	140	117	88
Sn^{2+}	105	112	91	91	27	0
Zn^{2+}	95	84	54	45	22	27
Aniones						
$\text{CH}_3\text{-COO}^-$	109	104	92	63	105	144
EDTA	110	80	96	75	73	61
Citrato	94	93	96	72	103	90
H_2PO_4^-	104	97	94	74	75	69
HPO_4^{2-}	103	97	102	95	91	83
Tartrato	104	105	86	41	102	100

3.6.6. Estudio de la hidrólisis de diferentes sustratos por las enzimas purificadas por cromatografía en capa fina (TLC).

3.6.6.1. Estudio de la hidrólisis de laminarina.

Los productos obtenidos en la hidrólisis enzimática de laminarina por las β -1,3-glucanasas purificadas a diferentes tiempos de incubación, hasta un máximo de 24 horas, se analizaron por cromatografía en capa fina. Los resultados de estos ensayos se muestran en las figuras de la 3.52. a la 3.54. En ellos se observan diferentes comportamientos para las diferentes enzimas dando lugar a diferentes productos durante la hidrólisis. Así, la enzima I produce glucosa mayoritariamente, aunque también se detectó producción de gentiobiosa a partir de 1 hora de hidrólisis. La β -1,3-glucanasa II hidrolizó la laminarina produciendo únicamente glucosa. El comportamiento de la enzima III fue diferente, ya que a tiempos intermedios se detectaron diferentes oligómeros. El producto mayoritario fue laminaribiosa y no se observó producción de glucosa hasta las 4 horas de hidrólisis.

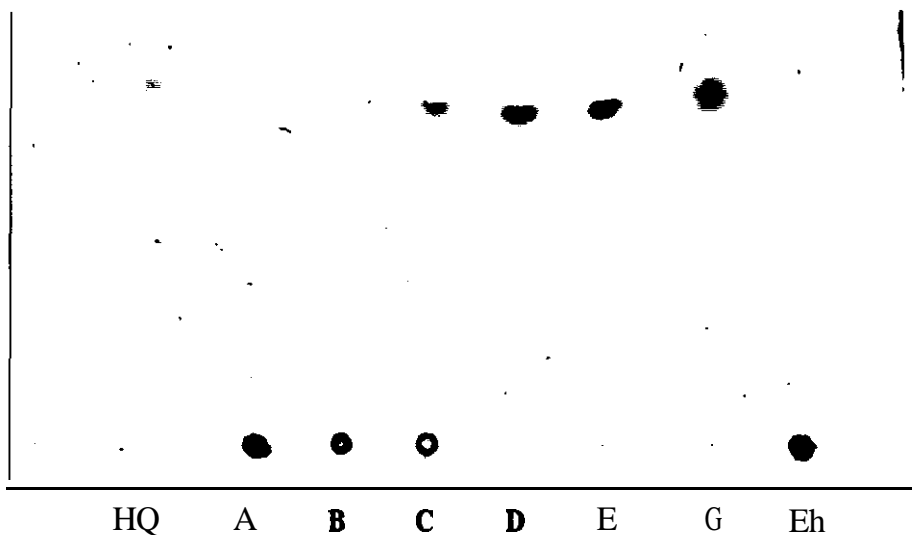


Figura 3.52. Estudio por TLC de la hidrólisis de la laminarina por la enzima I. Hidrólisis química (HQ). Hidrólisis enzimática a distintos tiempos: 15 (A) y 30 minutos (B) y 1 (C), 4 (D) y 24 horas (E). Enzima hervida a 100 °C durante 1 hora (Eh). Glucosa (G).

3.6.6.2. Estudio de la hidrólisis de diferentes disacáridos.

La β -1,3-glucanasa II fue la única capaz de producir glucosa a partir de laminaribiosa y en menor proporción, gentiobiosa a las dos horas de hidrólisis. Los resultados se muestran en la figura 3.55.

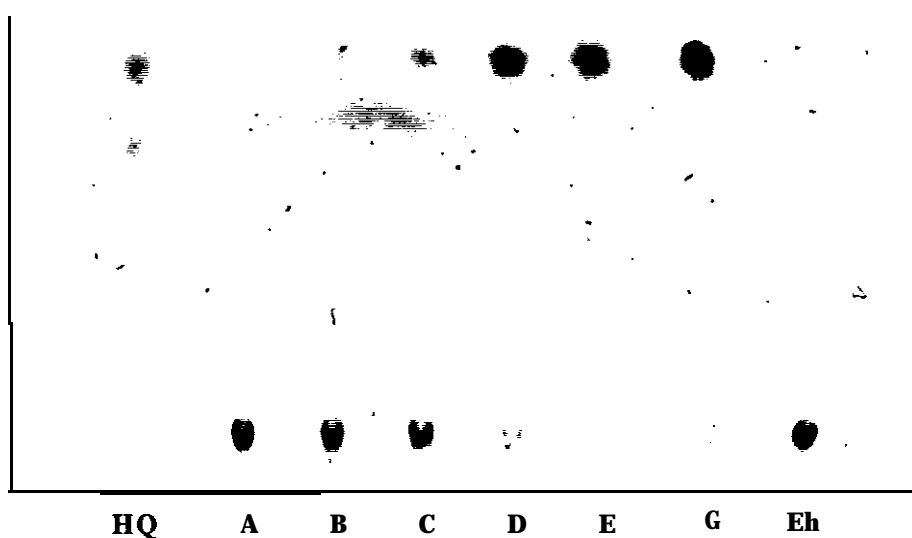


Figura 3.53. Estudio por TLC de la hidrólisis de la laminarina por la enzima II. Hidrólisis química (HQ). Hidrólisis enzimática a distintos tiempos: 15 (A) y 30 minutos (B) y 1 (C), 4 (D) y 24 horas (E). Enzima hervida a 100 °C durante 1 hora (Eh). Glucosa (G).

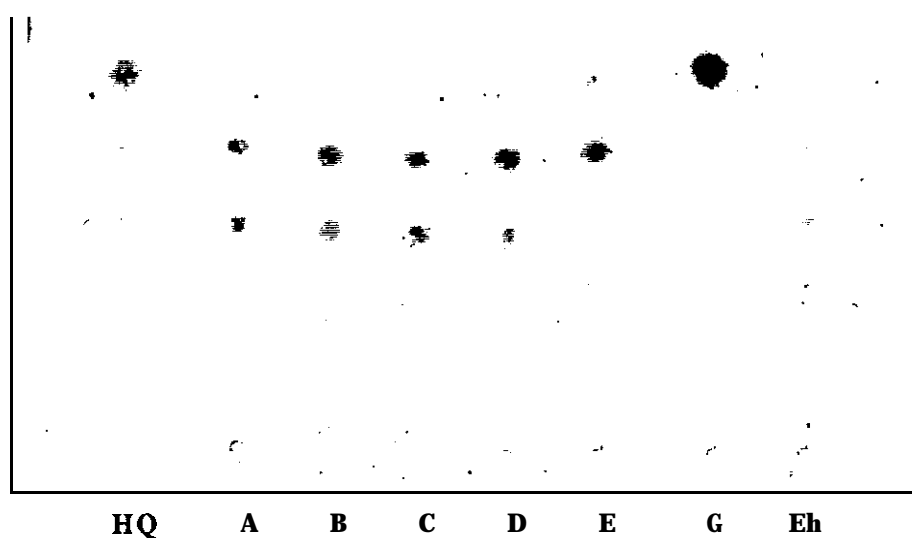


Figura 3.54. Estudio por TLC de la hidrólisis de la laminarina por la enzima III. Hidrólisis química (HQ). Hidrólisis enzimática a distintos tiempos: 15 (A) y 30 minutos (B) y 1 (C), 4 (D) y 24 horas (E). Enzima hervida a 100 °C durante 1 hora (Eh). Glucosa (G).

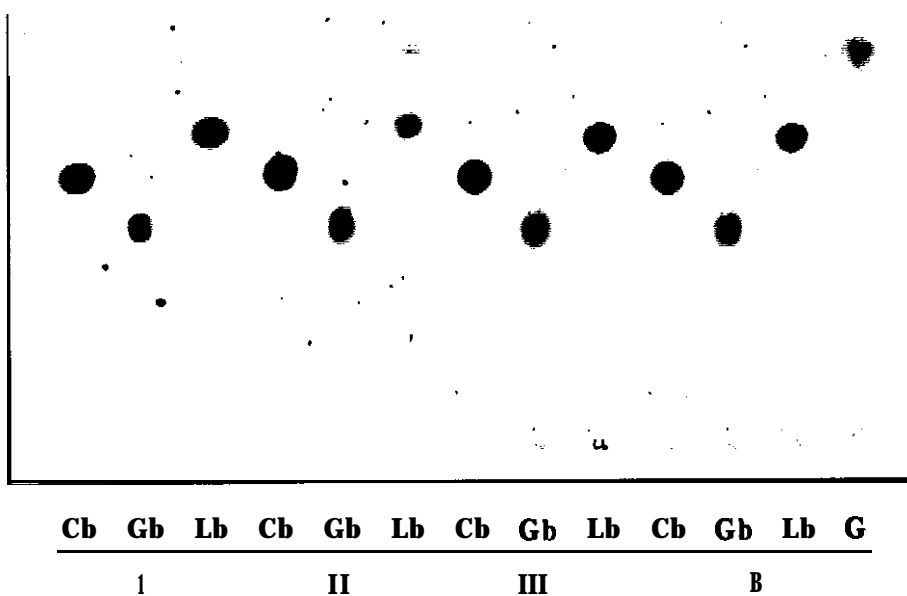


Figura 3.55. Estudio por TLC de la hidrólisis de celobiosa (Cb), gentiobiosa (Gb) y laminaribiosa (Lb) por las β -1,3-glucanasas I (I), II (II) y III (III) purificadas. Patrones de los disacáridos (B) y de glucosa (G).

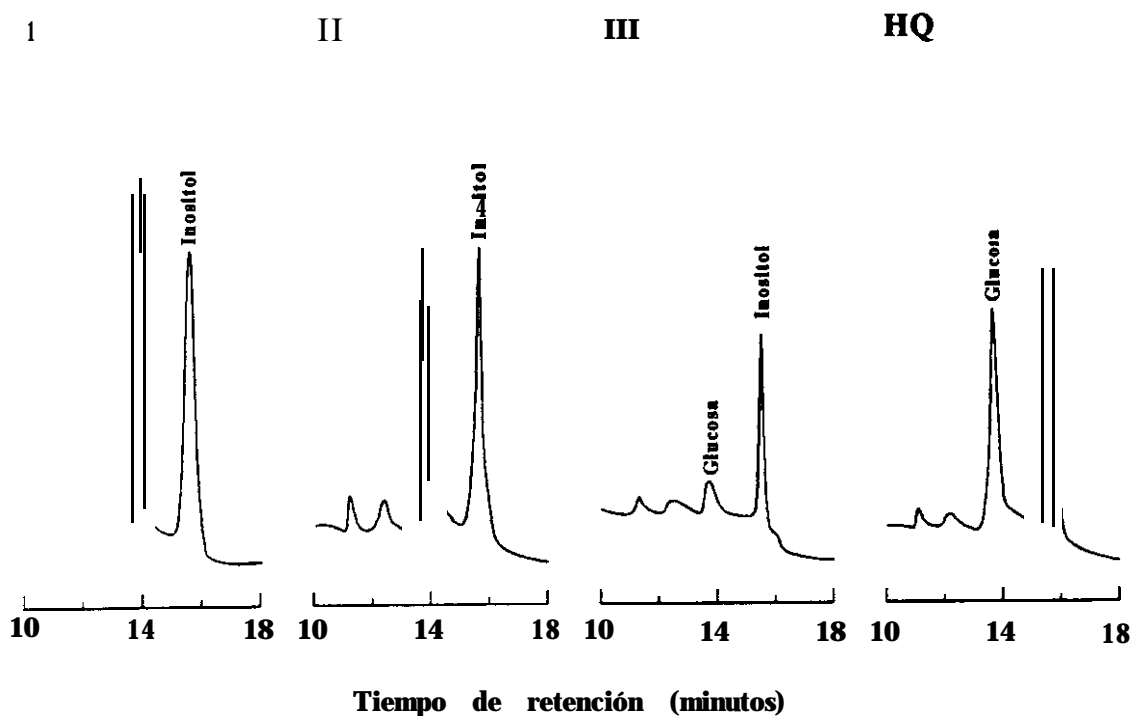


Figura 3.56. Cromatogramas correspondientes al análisis de los azúcares reductores liberados en la hidrólisis enzimática de laminarina por las enzimas I (I), II (II) y III (III). Hidrólisis química control (HQ).

3.6.7. Análisis por cromatografía gas-líquido (GLC) de azúcares reductores liberados en la hidrólisis de laminarina por las enzimas purificadas.

En el análisis por GLC de los azúcares reductores liberados tras 72 horas de hidrólisis enzimática de laminarina sólo se detectó glucosa. El porcentaje de glucosa producido fue de un 26% en la hidrólisis con la β -1,3-glucanasa 1, un 25% en la hidrólisis con la β -1,3-glucanasa II y un 2,4% para la hidrólisis con la β -1,3-glucanasa III con respecto al peso inicial de laminarina utilizado. En la figura 3.56. se muestran los cromatogramas correspondientes a las hidrólisis enzimáticas y a una hidrólisis química de laminarina con H_2SO_4 que se utilizó como control.

3.6.8. Estudio del modo de acción de las enzimas purificadas en la hidrólisis de la laminarina por Resonancia Magnética Nuclear (1H -RMN).

El objetivo de este experimento era conocer si la hidrólisis de la laminarina transcurría con inversión o retención de la configuración β del carbono anomérico de la glucosa liberada. Puesto que la deuteración requiere condiciones muy extremas, la recuperación de la actividad enzimática fue muy baja. Por esto, la velocidad de hidrólisis no fue lo suficientemente rápida como para evitar que la glucosa liberada mutarrotara antes de su detección en el espectro de 1H -RMN y no pudo distinguirse si en la reacción se liberaba α ó β -glucosa. No obstante, se pudo conseguir bastante información acerca de la especificidad de las enzimas por los enlaces β -1,3. Así, mientras que se observó un descenso de las señales correspondientes a los enlaces β -1,3 en el transcurso de la hidrólisis, a los 60 días de reacción aun estaba presente la señal correspondiente a los enlaces β -1,6 de la laminarina en todas las reacciones enzimáticas (figuras 3.58. a 3.60).

La figura 3.57. muestra los espectros correspondientes a glucosa, laminarina y de la mezcla de ambas, que se utilizaron como referencia. Los espectros correspondientes a la hidrólisis con la β -1,3-glucanasa 1 se muestran en la figura 3.58. Para esta enzima se observó producción de glucosa a las 24 horas de hidrólisis y a los 60 días el espectro era muy similar al de la glucosa. En la figura 3.59. se puede observar que la β -1,3-glucanasa II tuvo un comportamiento similar al de la enzima, puesto que degrada la laminarina hasta glucosa tras 60 días de hidrólisis. En este caso la señal de los enlaces β -1,6 esta en menor proporción que para la enzima 1, lo que indicaría hidrólisis de estos enlaces. Como puede observarse en la figura 3.60., la β -1,3-glucanasa III resultó algo más lenta, ya que la glucosa no se detectó hasta los 60 días de reacción, en este momento el espectro de 1H -RMN es distinto al de las hidrólisis con las otras enzimas, probablemente debido a una mezcla de glucosa y diferentes oligómeros de la misma, generados en la hidrólisis.

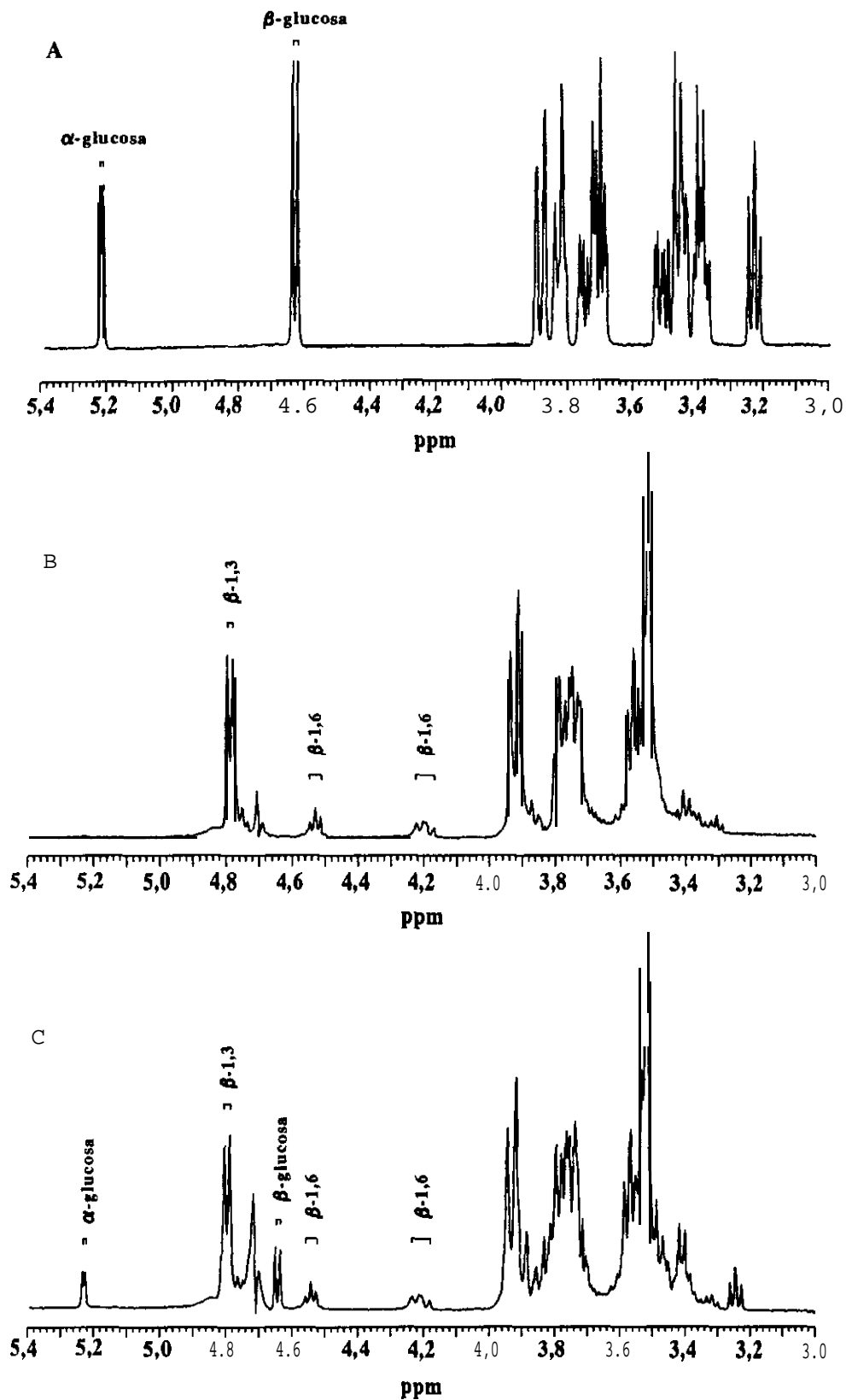


Figura 3.57. Espectros de ^1H RMN de glucosa (A), laminarina (B) y de la mezcla de ambas (C).

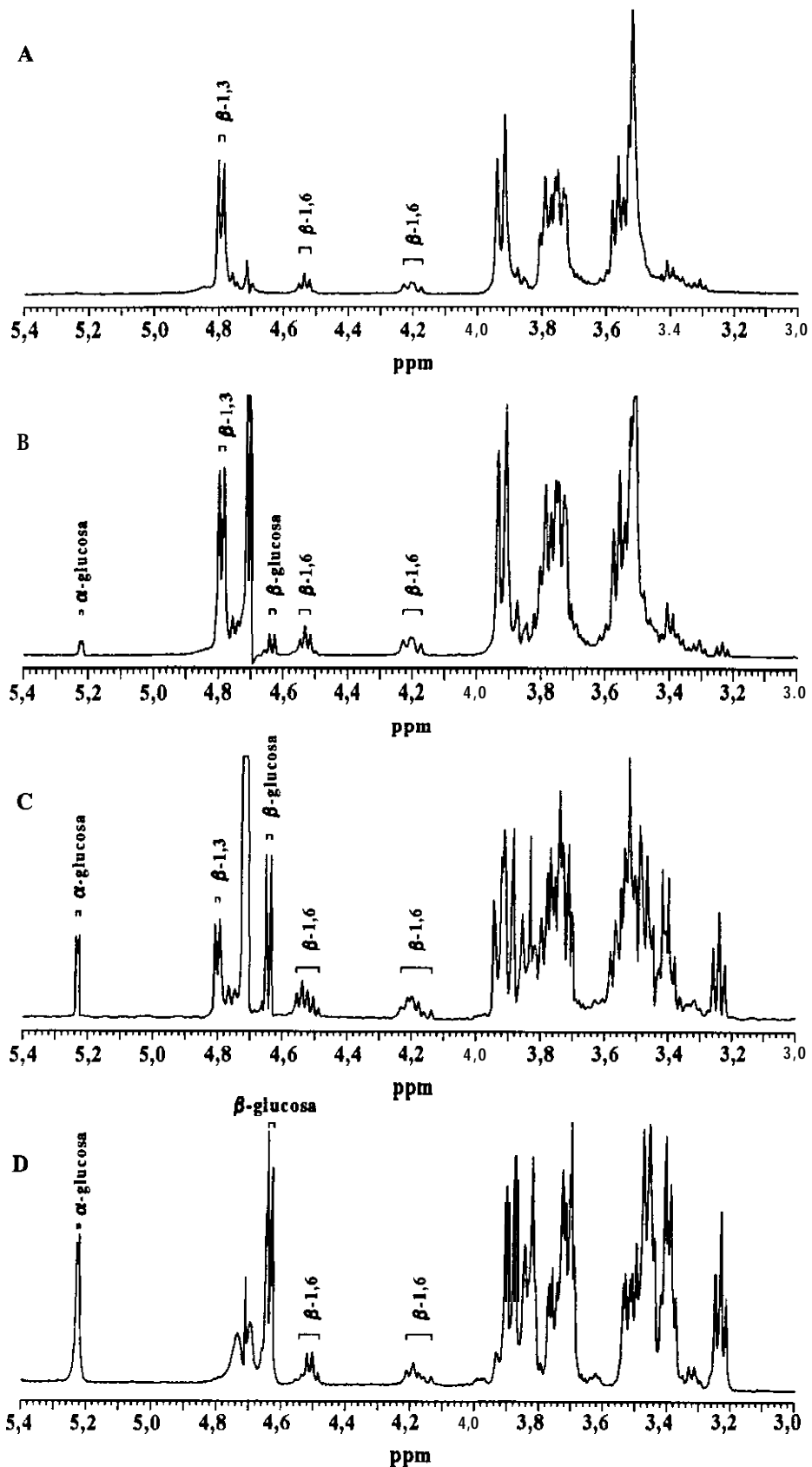


Figura 3.58. Espectros de ^1H RMN a diferentes tiempos de incubación de la hidrólisis enzimática de laminarina por la β -1,3-glucanasa 1: Tiempo cero (A), 24 horas (B), 90 horas (C) y 60 días (D) de hidrólisis.

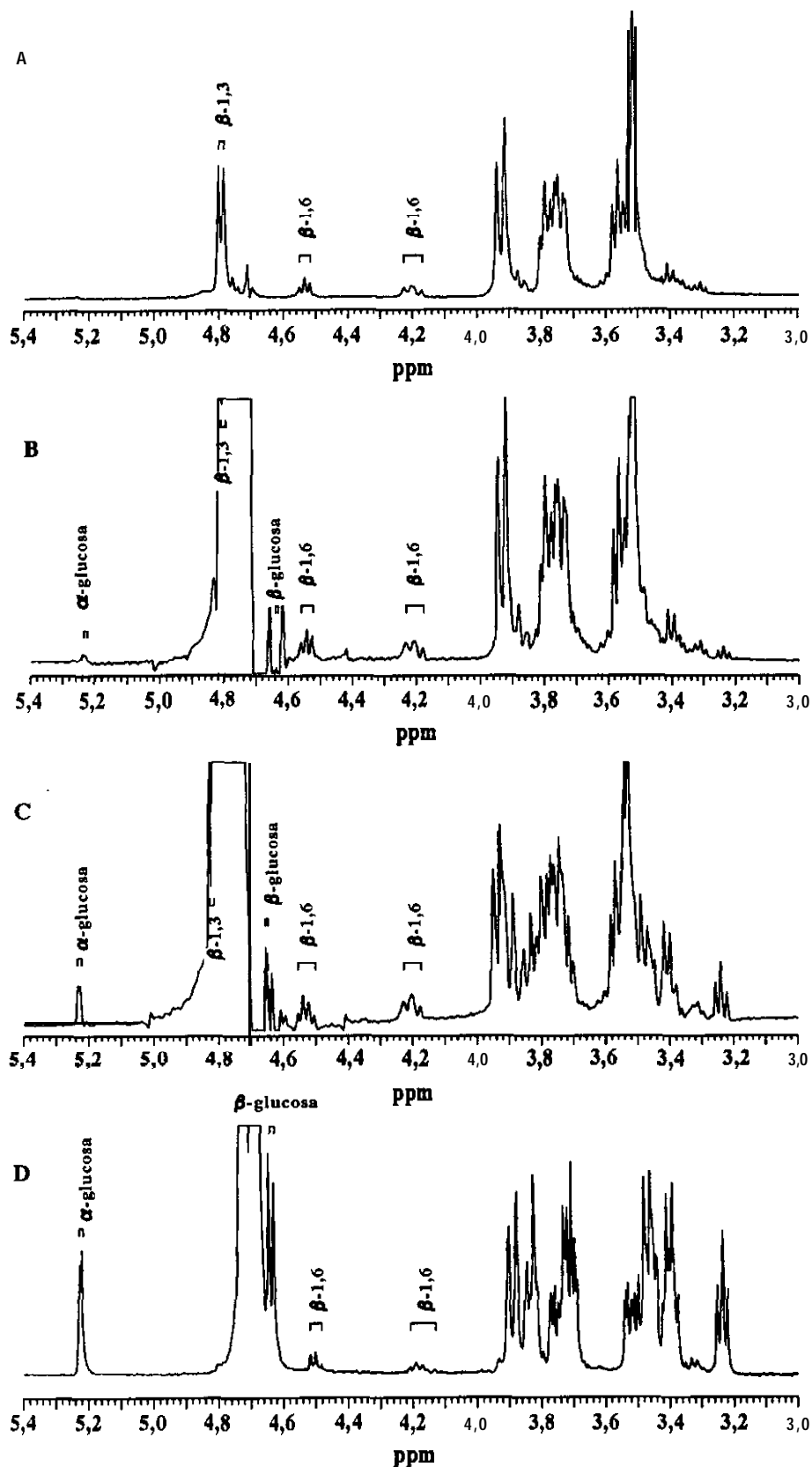


Figura 3.59. Espectros de ¹H RMN a diferentes tiempos de incubación de la hidrólisis enzimática de laminarina por la β-1,3-gluconasa II: Tiempo cero (A), 24 horas (B), 90 horas (C) y 60 días (D) de hidrólisis.

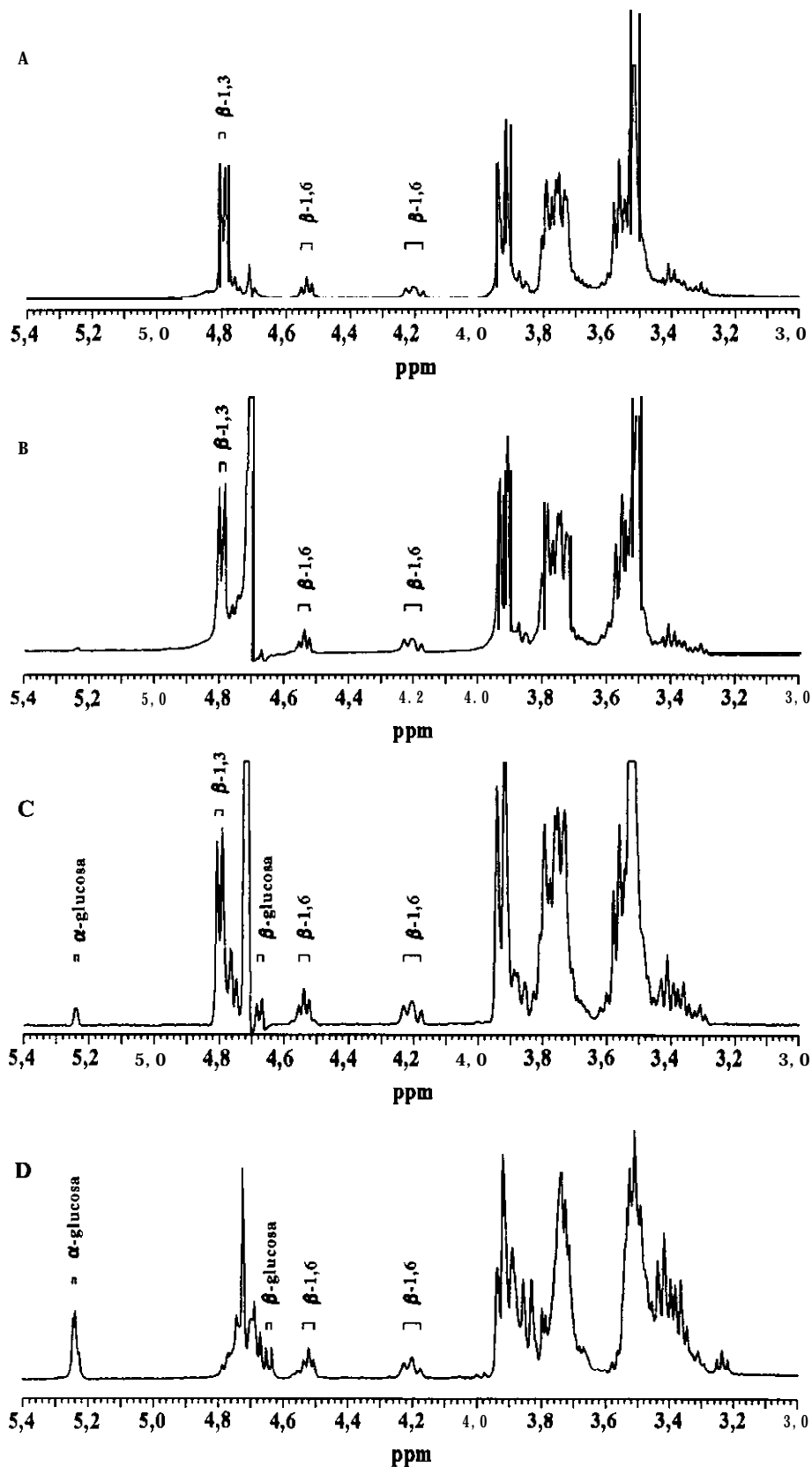


Figura 3.60. Espectros de ¹H RMN a diferentes tiempos de incubación de la hidrólisis enzimática de laminarina por la β-1,3-glucanasa III: Tiempo cero (A), 24 horas (B), 90 horas (C) y 60 días (D) de hidrólisis.

3.7. Especificidad de sustrato.

Las β -1,3-glucanasas de *A. nidulans* purificadas mostraron diferentes especificidades (Tabla 3.9.). La enzima I hidrolizó laminarinas de *Luminaria digitata* y *Luminaria hyperborea*, aunque esta última en menor extensión posiblemente debido a su baja solubilidad, y ligeramente algunos disacáridos. Esta enzima no fue capaz de hidrolizar laminarina oxidada ni otros **polímeros** con enlaces β -1,3. La β -1,3-glucanasa II fue capaz de hidrolizar las laminarinas de *L. digitata* y *L. hyperborea*, siempre mejor la de *L. digitata*, e hidrolizó con mayor extensión que la β -1,3-glucanasa I los diferentes disacáridos probados, así como p-nitrofenil-B-D-glucósido. No hidrolizó laminarina oxidada. La enzima III fue la única capaz de hidrolizar laminarina oxidada y laminarina de *L. digitata* en la misma extensión. También fue capaz de reconocer laminarina de *L. hyperborea*, aunque en menor extensión. No hidrolizó los diferentes disacáridos probados.

Tabla 3.9. Especificidad de las β -1,3-glucanasas purificadas.

Sustrato	Actividad enzimática		
	I (U/mg)	II (U/mg)	III (U/mg)
Laminarina (<i>Laminaria digitata</i>) (β -1,3)	4,19	12.68	8,19
Laminarina (<i>Laminaria hyperborea</i>) (β -1,3)	2,74	9.98	2,84
Laminarina oxidada (β -1,3)			7,98
Lichenán (<i>Cetraria islándica</i>) (β -1,3:1,4)	-	-	
Pustulán (<i>Umbilicaria pustulata</i>) (β -1,6)	-	-	
Almidón (α - 1,4)	-	-	
Dexuano (α - 1,6)	-	-	
Carboximetilcelulosa (β -1,4)	-	-	
Quitina (β - 1,4)	-	-	
Xilano (β -1,3:1,4)	-	-	
Galactano (<i>Penicillium expansum</i>) (β -1,2: 1.3)	-	-	
Glucano (<i>A. nidulans</i>) (α -1,3)	-	-	
Glucano (<i>Hordeum vulgare</i> , Cebada) (β -1,3:1,4)	-	-	
<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glucósido			
<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucósido		2,86	
Sacarosa (β -1,2)			
Celobiosa (β - 1,4)		4,92	
Gentiobiosa (β -1,6)	0,04	6,32	
Laminaribiosa (β -1,9)	0,64	9,13	

3.8. Degradación de paredes celulares de *F. oxysporum lycopersici* raza 2 y fracciones de las mismas por el crudo enzimático de *A. nidulans*.

3.8.1. Obtención de paredes celulares de *F. oxysporum lycopersici* raza 2 y fraccionamiento de las mismas.

3.8.1.1. Obtención de paredes celulares.

Se obtuvieron paredes celulares de cultivos de 6 días de crecimiento según el método descrito en el apartado 2.13.2.1. Las paredes representaron un 30% del peso seco de micelio.

3.8.1.2. Fraccionamiento de las paredes celulares.

Seis gramos de paredes celulares de *Fol2* se sometieron al proceso de fraccionamiento descrito en el apartado 2.13.2.2.

La tabla 3.10. muestra las cantidades obtenidas de cada una de las fracciones tras el proceso y el porcentaje que representan con respecto al total de la pared celular.

En los espectros infrarrojos mostrados en la figura 3.61. se observa, para todas las fracciones, una banda que aparece a 890 cm^{-1} lo que indica una alta riqueza en enlaces β .

Tabla 3.10. Fracciones obtenidas de la pared celular de *Fol2*.

Fracción	mg	Porcentaje
F1S	900	15
F1I	78	1
F4	3240	52

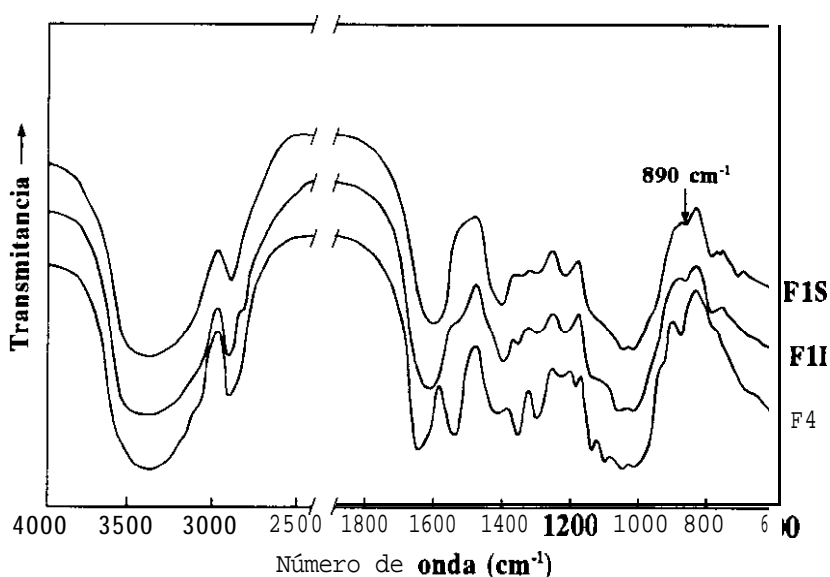


Figura 3.61. Espectros infrarrojos de las fracciones de la pared celular de *Fol2*.

3.9.2. Degradación de paredes celulares de *F. oxysporum lycopersici* raza 2.

Se observó un aumento del porcentaje de degradación con el tiempo de incubación, alcanzándose a las 140 horas de incubación un 22%, un 10,8% y un 6,5% como descenso de absorbancia a 660 nm, liberación de sustancias reductoras y N-acetilglucosamina respectivamente. No se observó liberación de glucosamina (figura 3.62.).

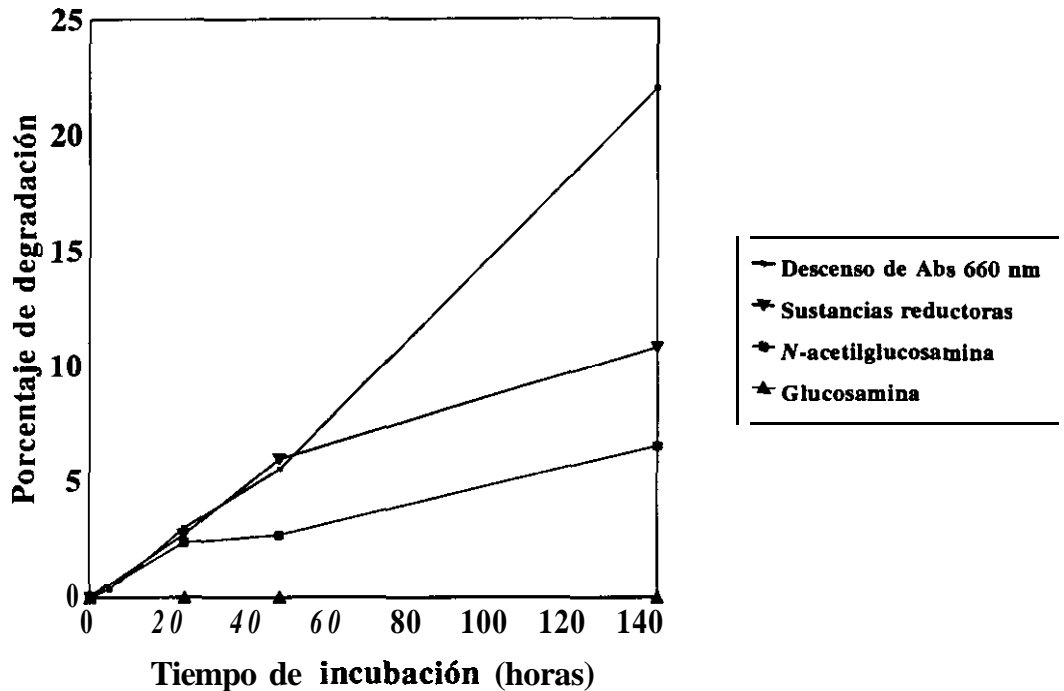


Figura 3.62. Degradación de las paredes celulares de *Fo12* por el crudo enzimático de *A. nidulans*.

3.8.3. Degradación de fracciones de la pared celular de *F. oxysporum lycopersici* raza 2.

Se estudió la degradación de las fracciones F1S y F4 por considerarlas las más representativas de la pared celular.

3.8.3.2. Degradación de la fracción soluble (F1S).

Los resultados correspondientes a la degradación de la fracción F1S se han representado en la figura 3.63. Se observó un aumento del porcentaje de degradación, medido como liberación de sustancias reductoras, durante las primeras 24 horas. Una vez transcurridas éstas se mantuvo alrededor de un 3%.

3.8.3.3. Degradación de la fracción insoluble (F4).

La figura 3.64. muestra los resultados obtenidos en la degradación de la fracción F4 por el crudo enzimático de *A. nidulans*. El descenso de la absorbancia a 660 nm experimentó un rápido aumento durante las primeras 24

horas. A partir de este momento la degradación fue más lenta. La liberación de sustancias reductoras y N-acetilglucosamina tuvieron comportamientos similares alcanzando un máximo a las 48 horas de incubación. Al **final** del proceso estudiado se observó liberación de glucosamina correspondiente a un **3,2%** de degradación.

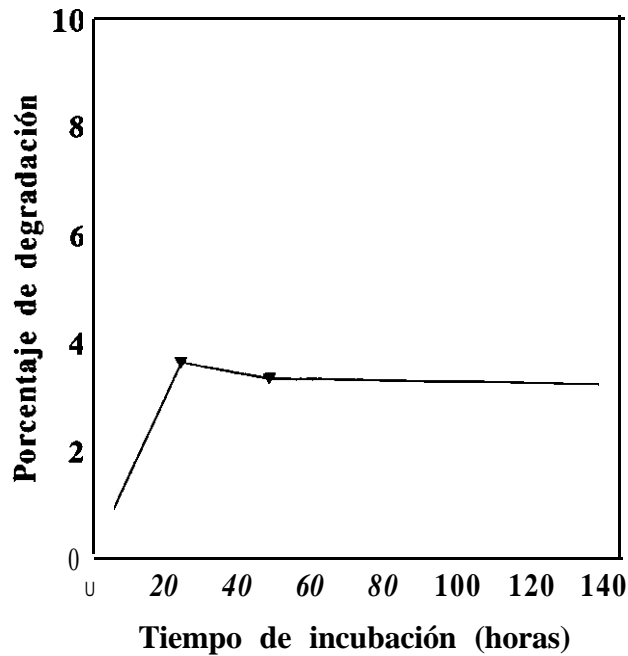


Figura 3.63. Degradación de la fracción **F1S** de la pared celular de *Fo12* como liberación de sustancias reductoras por el crudo **enzimático** de *A. nidulans*.

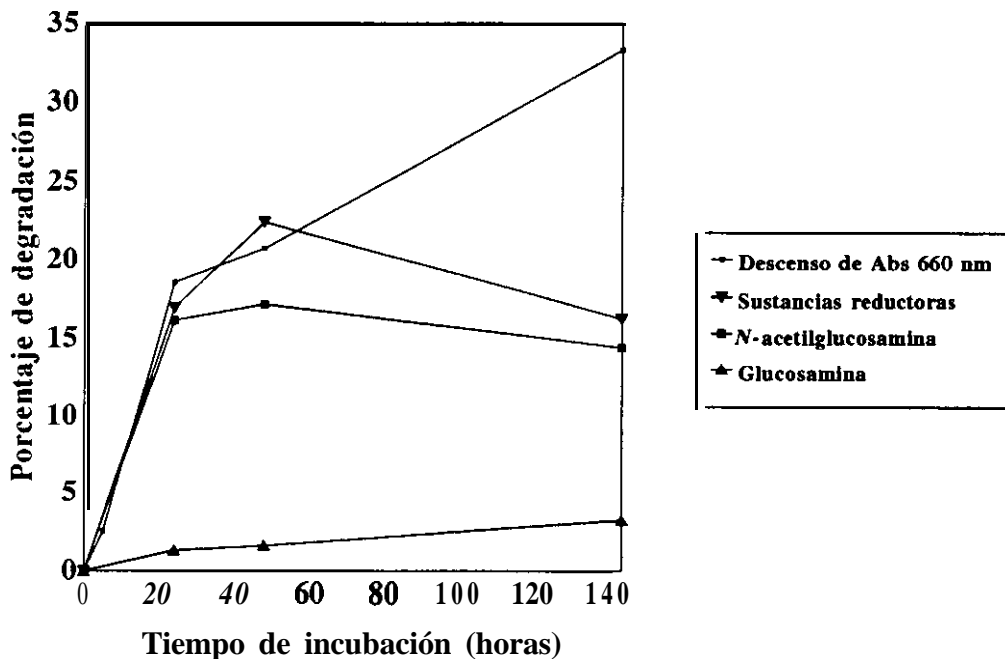


Figura 3.64. Degradación de la fracción **F4** de la pared celular de *Fo12* por el crudo **enzimático** de *A. nidulans*.

3.8.4. Análisis por cromatografía gas-líquido (GLC) de los azúcares reductores liberados en la hidrólisis de las paredes celulares y las fracciones F1S y F4 por el crudo enzimático de *A. nidulans*.

Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 3.65. En todas las hidrólisis, tanto de la pared como de sus fracciones, el azúcar liberado en mayor proporción fue glucosa. Así, en la hidrólisis de la pared celular se liberó un 3,7% de glucosa, un 1,8% de galactosa y un 1% de manosa. Para la fracción F1S, se liberó un 1,5%, un 1,2% y un 0,25% de glucosa, galactosa y manosa respectivamente. Finalmente en la hidrólisis de la fracción F4 los porcentajes de liberación fueron algo mayores, siendo la glucosa la mayormente liberada (7,5%), después la galactosa (3,6%) y por último la manosa (2%).

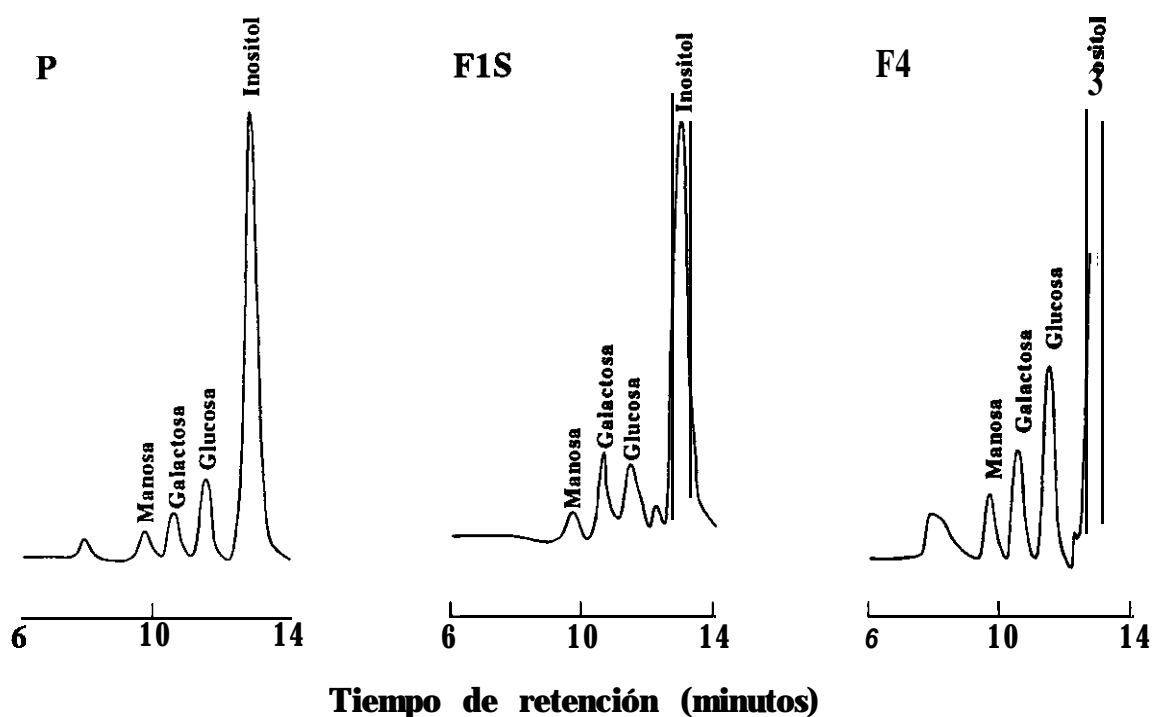


Figura 3.65. Cromatogramas correspondientes al análisis por GLC de los azúcares reductores liberados tras 140 horas de incubación en la hidrólisis de las paredes celulares de *Fo12* (P), la fracción F1S (F1S) y la fracción F4 (F4).

3.9. Degradación de paredes de *F. oxysporum lycopersici* raza 2 y fracciones de las mismas por las β -1,3-glucanasas de *A. nidulans* purificadas.

En este experimento tras 72 horas de hidrólisis no se observó degradación ni de las paredes ni de sus fracciones por cada una de las β -1,3-glucanasas purificadas, ni por las mezclas de ellas.

4. DISCUSIÓN.

4. DISCUSIÓN.

4.1. Introducción.

Las enfermedades producidas por hongos causan grandes pérdidas tanto en agricultura como en horticultura. Para combatir estas enfermedades se han desarrollado métodos de control químico bastante eficaces, pero el excesivo uso de estos compuestos, generalmente perjudiciales para el ecosistema, ha hecho pensar en el desarrollo de métodos alternativos. Así, se trata de obtener plantas resistentes frente a los patógenos y de desarrollar métodos de control biológico del patógeno, por otros microorganismos. Los microorganismos antagonistas pueden utilizar diferentes mecanismos de acción: competencia, antibiosis, explotación, resistencia inducida en el hospedador y lisis. Este último consiste en la lisis del organismo patógeno por medio de las enzimas líticas que produce el antagonista (Mukerji, 1988). El hecho de que en la mayoría de las infecciones por hongos, las plantas respondan al ataque produciendo quitinasas y β -1,3-glucanasas hace que el estudio de los sistemas enzimáticos que degradan la quitina y β -1,3-glucanos respectivamente sean de interés para sentar las bases del biocontrol vía heterólisis del patógeno.

Fusarium oxysporum f.sp. *fycopersici* raza 2 (**Fo12**) produce una de las enfermedades más dañinas de la planta de tomate, generando marchitamiento y muerte de la misma, con gran repercusión en cultivos de tomate protegidos en España (Tello, 1989). Puesto que *A. nidulans* es productor de quitinasas y β -1,3-glucanasas es posible plantearse la idea de utilizar *A. nidulans* como antagonista para el biocontrol de **Fo12**.

En este trabajo se estudia el sistema enzimático encargado de la degradación de los β -1,3-glucanos en *A. nidulans* durante su autólisis, purificando las diferentes enzimas y determinando su modo de acción, complementando así los estudios ya realizados sobre el sistema quitinolítico en este hongo (Reyes et al., 1989 a y b; Alfonso et al., 1995 a), como base para el control biológico de **Fo12**.

4.2. Crecimiento v autólisis de *A. nidulans* en medio líquido.

En todos los medios los diferentes parámetros estudiados tuvieron un comportamiento similar, no dependiendo del suplemento añadido.

A. nidulans, alcanza su peso máximo de micelio al quinto día de crecimiento (Figura 3.1.) en todos los medios estudiados y este día se considera como el principio de la autólisis. Una vez comenzada la autólisis, el hongo experimenta una rápida disminución del peso seco durante los 15 primeros días de incubación y a partir de este momento esta disminución es más lenta. Estas dos fases ya han sido descritas para la fase de autólisis de *Aspergillus niger* por Lahoz et al. (1986).

El proceso degradativo de *A. nidulans* transcurrió a pH básico (Figura 3.3.). La conductividad del medio (Figura 3.4.) disminuye durante el crecimiento

del hongo y aumenta al comenzar la autólisis, lo que podría deberse a la liberación de diferentes iones al medio de cultivo (Lahoz *et al.* 1985). El agotamiento de la fuente de carbono está relacionado con el principio de la autólisis. La concentración de las sustancias reductoras presentes en el medio en los cultivos de *A. nidulans* (Figura 3.5.) presenta una rápida disminución de ésta hasta niveles muy bajos, y es a partir de este momento cuando comienza la fase de autólisis, como se describe también en *Penicillium oxalicum* (Pérez-Leblic *et al.*, 1985). En *Penicillium chrysogenum* se ha encontrado que durante esta fase existe liberación de glucosa al medio, pero ésta es rápidamente utilizada para la formación de nuevas hifas (Trinci y Righelato, 1970). Un comportamiento similar se observó para la concentración de carbohidratos totales (Figura 3.6.).

La evolución de la concentración de proteínas (Figura 3.7.) experimenta dos fases, una primera en la que se observa una rápida disminución debido al consumo de las proteínas suministradas en el medio por el hongo y una segunda en la que la concentración de proteínas extracelular tiende a aumentar debido a su excreción por parte del hongo. Este patrón de proteínas es similar al descrito para *A. nidulans* por Isaac y Ghokale (1982).

4.3. Estudio de la producción de la actividad β -1,3-glucanasa y quitinasa, durante la autólisis de *A. nidulans*, en diferentes medios suplementados.

En un estudio previo, Reyes *et al.* (1988) estudiaron la producción de las actividades β -1,3-glucanasa y quitinasa durante la autólisis. En él encontraron que mientras que sus niveles en el líquido de cultivo aumentaban con el transcurso de la autólisis, en el micelio éstos eran menores y constantes. La actividad β -1,3-glucanasa (Figura 3.8.) no se observa en el medio de cultivo hasta el principio de la autólisis. Un comportamiento parecido se observa en otros hongos como *Botrytis cinerea* (Martínez *et al.*, 1982) y *Neurospora crassa* (Reyes *et al.*, 1981). Según diferentes autores esto puede ser atribuido bien a una desrepresión catabólica (Friebe y Holldorf, 1975; Santos *et al.*, 1978 b), bien a una inducción por azúcares u oligosacáridos libres procedentes de la hidrólisis de las paredes celulares del hongo o a la presencia de un glucano resistente a la hidrólisis (Reese, 1977). Al estudiar las actividades β -1,3-glucanasa y quitinasa se observan comportamientos similares. Así, para la actividad β -1,3-glucanasa en el medio basal y con los diferentes suplementos se observa un primer máximo, muy acusado en los medios suplementados con quitina y pectina, durante los primeros días de autólisis y un segundo máximo al concluir el período estudiado. No se observa aumento de la síntesis, en los diferentes medios suplementados, de esta actividad enzimática. Para la actividad quitinasa (Figura 3.9.) también se observan dos máximos de actividad los días 10 y 30 respectivamente. Se observa un comportamiento diferente en los medios suplementados con quitina y xilano, en los que la máxima actividad aparece a los 20 y 30 días de incubación, respectivamente. Las enzimas responsables de esta actividad, una β -N-acetilglucosaminidasa y una endoquitinasa ya han sido

purificadas en *A. nidulans* por Reyes *et al.* (1989 a y b).

4.4. Estudio de la producción, durante la autólisis de *A. nidulans*, de las enzimas responsables de la actividad β -1,3-glucanasa en diferentes medios sualementados.

Después de realizar el estudio anterior se tomaron muestras de cultivos a los 5, 10, 30 y 50 días de crecimiento para estudiar comparativamente, en los distintos medios, la producción de las diferentes enzimas β -1,3-glucanasas.

Las Figuras 3.10 y 3.11. muestran el perfil cromatográfico de proteínas y la actividad β -1,3-glucanasa obtenidos en la cromatografía de intercambio iónico en Mono Q HR 5/5, para las muestras obtenidas de los cultivos en el medio basal y en los diferentes medios suplementados. En la Tabla 3.1. se cuantifican los valores obtenidos para cada una de las tres actividades una vez separadas, para los diferentes medios.

A los 10 días de crecimiento en todos los medios se detectaron tres picos correspondientes a proteínas con actividad β -1,3-glucanasa (I, II y III). En este momento la proteína II mostró muy baja actividad en todos los medios excepto en los medios suplementados con pectina y extracto de planta de *Lycopersicum esculentum* (tomate), en los que su nivel fue más alto y no se detectó en el medio suplementado con xilano. A los 30 días de cultivo no se encontró la actividad III en ninguno de los medios, luego el incremento de la actividad β -1,3-glucanasa global sólo es debido al incremento de sólo dos de las actividades parciales (I y II). Por último a los 50 días de cultivo, los tres picos están presentes en todos los medios excepto en el medio suplementado con extracto de planta, en el cual no aparece la β -1,3-glucanasa III. En este caso, se observa un perfil de elución de proteínas y grado de autólisis similares al del cultivo de 30 días de crecimiento. Como conclusión, la proteína I esta presente durante todo el proceso degradativo e incrementa su actividad con el tiempo de incubación. La proteína II mostró un retraso los primeros días de la autólisis con relación a la proteína I y después incrementa su actividad con el tiempo de incubación y ambas están presentes a lo largo de todo el proceso degradativo. El distinto comportamiento de la proteína III podría indicar una función diferente de esta proteína durante la autólisis de *A. nidulans*. El estudio de las propiedades de las enzimas purificadas y su modo de acción, sugiere diferentes funciones para las enzimas I, II y III durante el proceso degradativo de *A. nidulans* que se discuten en la sección 4.8.

4.5. Método de purificación de las β -1,3-glucanasas de *A. nidulans*.

Tras el estudio de la producción de la actividad β -1,3-glucanasa en diferentes medios suplementados (Tabla 3.2.) no se observaba un aumento en su producción, pues solamente en el caso de utilizar un medio suplementado con laminarina se observaron valores ligeramente más altos de actividad específica. Este hecho, hizo que se utilizara el medio sin suplementar por resultar más

económico y sencillo. Al observar el comportamiento de cada una de las proteínas individualmente en los diferentes medios suplementados (Tabla 3.1.) se observa que en el medio basal los niveles de las proteínas I y II son de los más altos a los 50 días de incubación. Aunque en el medio suplementado con xilano la proteína III tenía mayores niveles, se decidió utilizar el medio no suplementado por la misma razón anterior y por que la β -1,3-glucanasa II estaba presente en menor proporción.

El primer paso de purificación consiste en una precipitación de proteínas, con objeto de obtener soluciones de partida más concentradas (Tabla 3.3.). De esta manera se seleccionó el método de precipitación con mayor rendimiento, puesto que las actividades de interés se separarían por cromatografía posteriormente. Así, se seleccionó la precipitación con ácido tánico al 1% con la que se conseguía un 82% de rendimiento y un grado de purificación de 1,6 veces. De todos modos hubo métodos con los que se consiguió un mayor grado de purificación, como es la precipitación con solventes orgánicos. Así, con acetona al 60% se conseguía purificar 5,6 veces y con etanol al 80%, 2,7 veces, aunque los rendimientos fueron inferiores, del 62% y 44% respectivamente. En estos casos hay que tener en cuenta además que en cromatografías de intercambio iónico de alta eficacia posteriores mostraron que en estas precipitaciones se perdía la β -1,3-glucanasa III. En este experimento de selección hay que destacar la alta pérdida de actividad observada al tratar de precipitar con sulfato amónico, este hecho se ha observado en nuestro laboratorio con diferentes carbohidrasas.

Una vez precipitadas las proteínas con ácido tánico al 1%, se ensayaron diferentes técnicas y soportes cromatográficos, intercambio iónico (DEAE Biogel A y CM Biogel A), cromatografía de exclusión (PBE 94) y exclusión molecular (Sephadex G-200). El mejor rendimiento se obtuvo con la columna de exclusión molecular pese a perder la β -1,3-glucanasa III, proteína minoritaria. Tras esta cromatografía se obtenía la fracción denominada I+II (Figura 3.17.) y se separaba un pigmento marrón que interfería en la purificación y que quedaba adherido irreversiblemente en las columnas de intercambio iónico de alta eficacia. Con objeto de no perder la proteína BI se introduce un paso previo a la cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna de DEAE Bio Gel A (Figura 3.16.) en el que esta proteína era separada (Fracción IB) de casi todas las proteínas del crudo dado su bajo punto isoeléctrico. La fracción no retenida (Fracción NR), que contenía las β -1,3-glucanasas I y II, se concentraba y cargaba en la columna de Sephadex G-200 anteriormente descrita en fracciones de 2,5 ml. De esta manera, una vez dializadas, se obtienen dos soluciones enzimáticas (IB y I+II) listas para su separación por cromatografía de alta eficacia.

Una vez separada y dializada la fracción IB se sometió a cromatografía de intercambio iónico de alta eficacia en una columna Mono Q HR 5/5. Se equilibró la columna con tampón acetato 10 mM a pH 5,0 y para eluir las

proteínas retenidas se utilizó un gradiente lineal de NaCl de 0,28 M a 0,34 M en 20 minutos, ya que en estas condiciones se evitaba el solapamiento del pico de interés de la cromatografía con un pico mayoritario en el eluido (Figura 3.21.). En este paso el rendimiento obtenido fue muy bajo. Esto puede ser debido a la separación de una proteína con actividad frente a p-nitrofenil-B-D-glucósido, posiblemente una β -glucosidasa que podría actuar sobre los oligómeros producidos por la β -1,3-glucanasa III en la degradación de la laminarina, generando glucosa. Una vez separada la proteína III ésta se sometió nuevamente a una cromatografía en la misma columna (Figura 3.22.) utilizando tampón acetato 10 mM a pH 5,0 y en condiciones isocráticas a una concentración de NaCl de 0,28 M durante 20 minutos, para mejorar la pureza del pico con actividad β -1,3-glucanasa. Una vez separada, se sometió a un paso final en una columna de exclusión molecular de alta eficacia Superosa 12 HR 10/30 equilibrada con tampón acetato 10 mM a pH 5,0 y 150 mM de NaCl, en la que se eluye como un pico homogéneo a un volumen de elución correspondiente a una masa molecular de 44.600 Da (Figura 3.25.). Analizada su pureza por electroforesis (Figura 3.28.) se obtuvo una sola banda tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes.

La purificación de las proteínas I y II se realizó de una manera similar. Así, el primer paso tras la cromatografía en Sephadex G-200, es una cromatografía de intercambio iónico de alta eficacia en Mono Q HR 5/5 (Figura 3.18.) utilizando tampón acetato 10 mM a pH 5,5 y para eluir las proteínas un gradiente lineal de NaCl de 0,15 M a 0,35 M en 40 minutos. El objeto de este paso es separar las proteínas I y II, que se eluyen conjuntamente de la cromatografía en Sephadex G-200. Se utilizaron estas condiciones ya que se consigue una mejor resolución para el pico correspondiente a la proteína I. Una vez separados los picos correspondientes a las proteínas I y II, se volvieron a cromatografiar en Mono Q HR 5/5 (Figuras 3.19. y 3.20.) para separar algunas impurezas y obtener unas muestras más ricas en actividad β -1,3-glucanasa. En este paso para la proteína I se mantuvo el pH del tampón acetato 10 mM a 5,5, ya que en experiencias anteriores a éste pH se obtenía una mejor resolución. Se utilizaron condiciones isocráticas a una concentración de NaCl de 0,16 M durante 20 minutos. En el caso de la proteína II se cambió el pH del tampón a pH 5,0 y también se usaron condiciones isocráticas a una concentración de NaCl 0,20 M, ya que así se conseguía la separación del pico de actividad de otros dos picos mayores y algunas impurezas. Los picos eluidos con las proteínas I y II se sometieron a sendas cromatografías de exclusión molecular de alta eficacia en Superosa 12 HR 10/30 (Figuras 3.23. y 3.24.), como paso final de la purificación. Las proteínas I y II se eluyeron a un volumen correspondiente a una masa molecular de 69.500 Da y 69.700 Da respectivamente. Los análisis por electroforesis en condiciones nativas muestran dos bandas homogéneas para ambas proteínas (Figuras 3.26. y 3.27.). Al analizar la homogeneidad de la proteína I por electroforesis desnaturalizante (Figura 3.26.), ésta se desdobra en

dos bandas de 52.800 Da y 48.900 Da de masa molecular respectivamente. Esto puede ser debido bien a que la proteína 1 sea dimérica como ocurre para la **exo- β -1,3-glucanasa** de *Candida albicans* (Molina *et al.*, 1989), o bien a que al tratarse de una glicoproteína la unión de los glúcidos a la proteína sea lábil y parte de ellos se desprendan en el tratamiento térmico necesario al preparar la muestra para electroforesis desnaturizante. La proteína II es homogénea en condiciones desnaturizantes (Figura 3.27.).

Los rendimientos de la purificación (Tablas 3.4. a 3.6.) fueron de un 15%, un 12% y un 1% para las proteínas 1, II y III respectivamente, esto supone un rendimiento global de un 28%. Teniendo en cuenta los grados de purificación alcanzados (55, 164 y 105 veces para cada enzima respectivamente) y los datos encontrados en la bibliografía, este valor se puede considerar como un rendimiento aceptable.

4.6. Propiedades físico-químicas de las β -1,3-glucanasas purificadas.

En las Tablas 4.1. y 4.2. se muestran las propiedades de las β -1,3-glucanasas purificadas comparándolas frente a algunas de las β -1,3-glucanasas fúngicas descritas en la bibliografía. Se han estudiado β -1,3-glucanasas en *Acremonium persicinum*, *Mucor hiemalis*, *Neurospora crassa*, *Penicillium italicum*, *Penicillium oxalicum*, *Phytophthora infestans*, *Porodisculus pendulus*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus chinensis*, *Schizophyllum commune*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibranchiatum* y *Trichoderma reesei* (Pitson *et al.*, 1993; Prokop *et al.*, 1994; Pitson *et al.*, 1995).

Los pH óptimos de las β -1,3-glucanasas 1 y III de *A. nidulans* fueron de 5 unidades (Figura 3.30.). Estos valores son típicos de β -1,3-glucanasas fúngicas, cuyos pH óptimos suelen estar dentro del rango de pH de 5 a 6 (Pitson *et al.*, 1993). Se han descrito β -1,3-glucanasas con pH óptimo fuera de ese rango como una de las **endo- β -glucanasas** de *Phytophthora infestans* con pH óptimo de 7 (Bodenmann *et al.*, 1985) y una de las **exo- β -glucanasas** de *Acremonium persicinum* (Pitson *et al.*, 1995). La enzima II de *A. nidulans* mostró un pH óptimo de 7 unidades, fuera del rango común para las β -1,3-glucanasas descritas (Figura 3.29.).

La estabilidad al pH de las enzimas 1 y BI fue muy parecida ya que ambas fueron estables en un rango de 8 a 11 unidades durante una hora (Figura 3.29.). Sin embargo, la proteína 1 resultó ser estable a pH ácidos, mientras que la III no. El comportamiento de la **β -1,3-glucanasa II** es diferente, ésta resulta ser estable en un rango de pH de 10 a 12 unidades y su estabilidad disminuye bruscamente al disminuir el pH (Figura 3.30.). El hecho de que para estas proteínas se observe un pH óptimo fuera de los rangos de estabilidad podrían indicar un efecto protector por parte del sustrato, de la actividad enzimática. Un comportamiento similar ha sido descrito para las β -1,3-glucanasas de *Phytophthora infestans* (Bodenmann *et al.*, 1985).

Los valores de las temperaturas óptimas de las β -1,3-glucanasas fúngicas

se encuentran entre 40 y 60 °C (Pitson *et al.*, 1993). Este rango se ajusta bien para las temperaturas óptimas de las **β -1,3-glucanasas** purificadas (Figura 3.3 1.). Así, las **β -1,3-glucanasas** I y II son las más parecidas en cuanto a su temperatura óptima siendo de 60 °C para ambas. La enzima III tuvo una temperatura óptima de 40 °C.

Al incubar durante distintos tiempos las **β -1,3-glucanasas** purificadas a diferentes temperaturas se observa que la pérdida de actividad fue similar para las enzimas I y II, siendo estables a 50 °C durante 30 minutos (Figuras 3.32. y 3.33.). Esto contrasta con la alta estabilidad de la enzima III (Figura 3.34.), ya que mientras que I y II pierden su actividad rápidamente al incubarlas a 100 °C de temperatura ella es capaz de mantener un 40% de su actividad tras 30 minutos de incubación.

La estabilidad frente a la temperatura durante 1 hora de incubación fue muy similar para las proteínas I y II siendo estables hasta una temperatura de 30 °C (Figura 3.35.). La **β -1,3-glucanasa** III es más estable ya que no se observó pérdida de actividad hasta alcanzar los 50 °C (Figura 3.35.). El hecho de que las proteínas I y II tengan una temperatura óptima mayor que la temperatura a la cual empiezan a perder su actividad, indica que, como ocurre con el pH, el **sustrato** ejerce un efecto estabilizante sobre estas enzimas. Este efecto ya ha sido descrito por Copa-Patiño *et al.* (1989) para la **exo- β -1,3-glucanasa** de *Penicillium oxalicum*.

Las masas moleculares calculados por cromatografía en **Superosa** 12 HR 10/30 fueron de 69.500, 69.700 y 44.600 Da para las **β -1,3-glucanasas** I, II y III respectivamente (Figura 3.36.). La similar masa molecular que presentan las proteínas I y II, hace que sea muy difícil su separación por cromatografía de exclusión molecular. Al determinar las masas moleculares por electroforesis desnaturizante (Figuras 3.37. a 3.39.), su comportamiento es diferente. Así, la proteína I muestra dos bandas en electroforesis desnaturizante de 52.800 y 48.900 Da. Puesto que al calcular su punto isoeléctrico solo se observa una banda, se puede pensar en una proteína dimérica o bien que al tratarse de una glicoproteína la unión de la parte glucídica sea una unión lábil que se rompa al preparar la muestra para electroforesis. Suponiendo que se tratara de una proteína dimérica y ambas subunidades estuvieran en proporción 1:1, su masa molecular sería de 101.700 Da. Este valor es muy parecido a la masa molecular calculado para la **β -1,3-glucanasa** II (97.400 Da) por electroforesis desnaturizante, de masa similar a la I calculado por cromatografía de exclusión molecular. Ya se han descrito proteínas diméricas con actividad **β -1,3-glucanasa** en levaduras, aunque no en hongos filamentosos (Pitson *et al.*, 1993). Así, se ha descrito una **exo- β -1,3-glucanasa** dimérica con una masa molecular de 107.000 Da en *Candida albicans* (Molina *et al.*, 1989) y en *Schizosaccharomyces pombe* una **endo- β -1,3-glucanasa** de 160.500 Da de masa molecular (Reichelt y Fleet, 1981). Finalmente la proteína III muestra una masa molecular por electroforesis desnaturizante de 41.100 Da, dentro del rango de masas moleculares más

frecuentes para las **endo- β -1,3-glucanasas** descritas (Tabla 4.2.). El hecho de que las proteínas 1 y II muestren una masa molecular diferente y más alta por electroforesis desnaturalizante que por cromatografía de exclusión molecular, puede ser debido, bien a una afinidad de las dos enzimas por el soporte cromatográfico, o a que sean proteínas muy compactas y se eluyan a un volumen mayor del que les corresponde.

Los puntos isoeléctricos (Figuras 3.40. a 3.42.) fueron muy parecidos para las enzimas 1 y II siendo de **4,56** y **4,49** unidades respectivamente. Estos valores son típicos de **β -1,3-glucanasas** fúngicas cuyos puntos isoeléctricos se encuentran en el rango de **3,4** a **9,8** unidades (Bodenmann et al., 1985; Totsuka y Usui, 1986). El valor del punto isoeléctrico de la **β -1,3-glucanasa III** es de **2,94** unidades, algo bajo para **β -1,3-glucanasas** fúngicas aunque se han descrito B-1,3-glucanasas de levaduras con valores de punto isoeléctrico de 3,0 unidades en *Candida utilis* (Villa et al., 1976). El hecho de que la proteína III tenga un punto isoeléctrico tan bajo y diferente al resto de las proteínas del crudo enzimático hace posible su separación del resto de las proteínas en la columna de DEAE Biogel A (Figura 3.21.).

Tabla 4.1. Propiedades de las **β -1,3-glucanasas 1 y II** comparadas con algunas de las de las **exo- β -1,3-glucanasas** fúngicas caracterizadas (Pitson et al., 1993).

	Masa molecular (Dalton)	Punto isoeléctrico	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)
β-1,3-glucanasa I	101.700 ^a	4,56	5,0	60
β-1,3-glucanasa II	97.400	4,49	7,0	60
<i>Acremonium persicinum</i>	81.000	5,3	6,5	65
	85.000	5,1	5,0	55
	89.000	4,4	5,0	60
<i>Mucor hiemalis</i>	75.000	9,6	5,5	40
<i>Neurospora crassa</i>	82.000		4,5	45
	120.000		4,5	45
<i>Penicillium oxalicum</i>	79.400	6,3	4,0	55
<i>Porodisculus pendulus</i>	55.500		4,5-5,0	50
<i>Rhizoctonia solani</i>	73.000	9,3	5,8	
<i>Trichoderma harzianum</i>	31.000		4,6	46
	40.000	7,8		
<i>Trichoderma longibranchiatum</i>	40.000	7,8	5,0	35
<i>Trichoderma reesei</i>	70.000	4,2	4,2	

a. Suponiendo que se tratara de un **dímero** con subunidades de 52.800 y 48.900 Da.

En cuanto al porcentaje de carbohidratos, para la proteína 1 es de un 40%, muy parecido al de la β -1,3-glucanasa II cuyo porcentaje es del 34%. La proteína III tiene un porcentaje de carbohidratos menor, del 15%. Si se comparan estos valores con los escasos encontrados en la bibliografía, éstos están dentro del rango normalmente descrito, entre un 0% y un 68% (Pitson et *al.*, 1995; Notario et *al.*, 1976). El hecho de que se trate de glicoproteínas favorece su solubilidad y las hace más resistentes a la degradación por parte de las proteasas, pH y temperatura (Berman y Lasky, 1985). Esto ocurre con una *exo*- β -1,3-glucanasa de *Saccharomyces cerevisiae* que carente de carbohidratos es menos estable frente a pH y temperatura que la enzima completa (Sánchez, 1982). En este caso dos de las β -1,3-glucanasas, 1 y II, con similar porcentaje de carbohidratos presentan una estabilidad muy parecida. Un tanto sorprendente es el que la proteína más estable, la β -1,3-glucanasa III, sea la de menor porcentaje de carbohidratos, en este caso su mayor estabilidad podría explicarse por una estructura terciaria más resistente a la desnaturalización.

Tabla 4.2. Propiedades de la β -1,3-glucanasa III comparadas con algunas de las de las *endo*- β -1,3-glucanasas fúngicas caracterizadas (Pitson et *al.*, 1993).

	Masa molecular (Dalton)	Punto isoeléctrico	pI- óptimo	Temperatura óptima (°C)
β -1,3-glucanasa III	41.100	2,94	5,0	40
<i>Penicillium italicwn</i>	65.000-68.000	4,7	6,0	50
<i>Phytophthora infestans</i>	160.000-230.000	3,4	7,0	40
	21.000	3,4	4,5	45
<i>Porodisculus pendulus</i>	43.000		5,0	50
<i>Rhizoctonia solani</i>	29.000	9,8	5,5	
	25.000-27.000		5,5	30
<i>Rhizopus chinensis</i>	22.000		5,5	40
<i>Schizophyllum commune</i>	35.000	3,95	5,5	50
<i>Trichoderma longibranchiatum</i>	70.000	7,2	4,8	55

4.7. Estudio cinético. especificidad y modo de acción de las β -1,3-glucanasas purificadas.

Al estudiar la cinética de las tres β -1,3-glucanasas purificadas se observan mayores diferencias entre ellas. Así, el comportamiento frente al tiempo de incubación de la enzima I es lineal durante una hora de incubación (Figura 3.44.). Igualmente ocurre cuando se estudia su variación en un rango de

concentraciones de enzima de 2,5 a 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3.43.). En el caso de la β -1,3-glucanasa II se observó pérdida de la linealidad a partir de una concentración de enzima de 7,5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3.43.). Al estudiar la hidrólisis por esta enzima frente al tiempo de incubación (Figura 3.44.) se observa pérdida de la respuesta lineal a partir de los primeros 30 minutos de hidrólisis. El estudio de la cinética de la enzima III, tanto a diferentes concentraciones de enzima (Figura 3.43.) como a distintos tiempos de incubación (Figura 3.44.), manifiesta comportamiento lineal hasta concentraciones de enzima de 3 $\mu\text{g/ml}$ y durante los primeros 20 minutos de incubación respectivamente. Puesto que los oligómeros dan menos reacción como sustancias reductoras que la glucosa, esto puede explicarse por un agotamiento del **sustrato** disponible para la enzima debido a la existencia de una primera hidrólisis rápida de la laminarina a oligómeros de alto peso molecular y una posterior muy lenta de los oligómeros generados en la fase anterior (Figura 4.3.). Este comportamiento se confirma en los estudios de la cinética de la reacción por cromatografía en capa **fina** como puede verse en la figura 3.54.

Las enzimas I y III tienen valores de constante de Michaelis (K_m) muy parecidos, aunque sus velocidades máximas son claramente diferentes (Tabla 3.7.), con lo que se puede decir que su afinidad por la laminarina es muy similar. La enzima II es la que mayor afinidad presenta por la laminarina ya que su valor de K_m (Tabla 3.7.) es el más pequeño (0,15 mg/ml ó 0,038 mM). Esta última presenta actividad frente a p-nitrofenil-P-D-glucósido. Esta proteína no puede considerarse como β -glucosidasa ya que su K_m para el p-nitrofenil-P-D-glucósido tiene un valor de 2,07 mM , mucho mayor que el que se obtiene utilizando laminarina como **sustrato** (Tabla 3.7.). Esto ocurre también en otras **exo- β -1,3-glucanasas** descritas (Santos *et al.*, 1979; Villa *et al.*, 1976; Notario *et al.*, 1976; Notario, 1982). Los valores de K_m de estas enzimas se encuentran entre los descritos frente a la laminarina para otras **β -1,3-glucanasas**, que oscilan entre 0,015 mg/ml y 1,7 mg/ml en *Trichoderma harzianum* (Dubordieu *et al.*, 1985) y *Candida albicans* (Molina *et al.*, 1989) respectivamente.

La $V_{\text{máx}}$ más alta la presenta la **β -1,3-glucanasa III**. Las **β -1,3-glucanasas I y II** tienen una $V_{\text{máx}}$ menor, aunque ésta es mayor para la **β -1,3-glucanasa II** que para la I (Tabla 3.7.).

La enzima más eficaz ($V_{\text{máx}}/K_m$) fue la **β -1,3-glucanasa II**, que también presenta la mayor afinidad. Las **β -1,3-glucanasas I y III** presentan una eficacia bastante menor, aunque dentro de ellas la **β -1,3-glucanasa III** es la más eficaz de las dos (Tabla 3.7.).

La glucono-S-lactona es un inhibidor específico de **β -glucosidasas** y de **β -glucanasas** no específicas cuyo efecto es muy bajo sobre **exo- β -glucanasas** específicas (Pitson *et al.*, 1995). Las **β -1,3-glucanasas** objeto de este estudio se ajustan muy bien a este patrón. Así, la **β -1,3-glucanasa I**, necesita concentraciones elevadas de glucono-S-lactona (100 mM) para inhibirse en un 71% (Figura 3.49.). Si se tiene en cuenta que se trata de una **exo- β -1,3-**

glucanasa muy específica del enlace β -1,3, como puede deducirse del estudio de su especificidad y del modo de acción por cromatografía en capa fina, donde se obtienen como productos finales de la hidrólisis gentiobiosa y glucosa (Figura 3.52.), cabe esperar un resultado como el obtenido. La β -1,3-glucanasa II se inhibe en un 89% a una concentración de glucono-S-lactona 0,1 mM (Figura 3.50.), muy pequeña. Si se tiene en cuenta que al hidrolizar laminarina se obtiene como producto final glucosa (Figura 3.53.), se puede considerar como una **exo- β -glucanasa** no específica, aunque presenta mayor actividad frente a enlaces β -1,3. En el caso de la β -1,3-glucanasa III se observa una inhibición del 89% para una concentración de glucono- δ -lactona 30 mM (Figura 3.51.). Al calcular las constantes de inhibición (K_i) para las β -1,3-glucanasas purificadas (Figuras 3.49. a 3.51.), se observa una K_i muy pequeña para la β -1,3-glucanasa II en relación a su K_m y a las K_i de las otras dos enzimas, esto y el hecho de que sea capaz de hidrolizar disacáridos con diferentes enlaces β -glicosídicos (Tabla 3.9.) confirma que se trata de una **exo- β -glucanasa** no específica.

Las tres β -1,3-glucanasas purificadas se inhiben por Hg^{2+} , inhibidor de la gran mayoría de las β -1,3-glucanasas descritas, y por otros metales pesados (Tabla 3.8.) ya descritos como inhibidores de la actividad β -1,3-glucanasa (Copa-Patino et al., 1989; Prokop et al., 1994; Pitson et al., 1995). Las tres enzimas purificadas se inhiben por la presencia de EDTA, ésto puede indicar la necesidad de la presencia de algún catión divalente para la hidrólisis del sustrato, si bien éste no sería esencial puesto que la inhibición no es total. Como se puede observar en la Tabla 3.8., las β -1,3-glucanasas purificadas se inhiben por NH_4^+ , hecho que no ha sido encontrado en la bibliografía. Esto estaría relacionado con el bajo rendimiento observado en la precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ (Tabla 3.3.). En este caso la inhibición podría ser irreversible, ya que al dializar las soluciones del precipitado enzimático no se recuperó la actividad. La β -1,3-glucanasa II se inhibe en presencia de $H_2PO_4^-$, y la III además por HPO_4^{2-} , la inhibición por estos iones ya ha sido descrita en *Trichoderma harzianum* (Dubordieu et al., 1985).

Del estudio de la especificidad de las enzimas purificadas se puede concluir que son diferentes (Tabla 3.9.). Como cabe esperar, todas las β -1,3-glucanasas hidrolizan laminarina tanto de *Luminaria digitata* como de *Luminaria hyperborea*, aunque esta última en menor extensión. Este resultado puede ser reflejo de la menor solubilidad de este sustrato, y como consecuencia la accesibilidad para la enzima es menor. Los demás polisacáridos probados con diferentes enlaces β -glicosídicos no son hidrolizados por las enzimas purificadas, incluso algunos con mezcla de enlaces β -1,3 y otros tipos de enlaces β . Esto es indicativo de una alta especificidad para todas ellas en la hidrólisis de enlaces β -1,3 en moléculas largas. El estudio de la hidrólisis de laminarina oxidada y los diferentes disacáridos permite hacerse una idea de como sera su modo de acción. De esta manera las β -1,3-glucanasas I y II que son capaces de hidrolizar algunos disacáridos, pueden considerarse como **exo β -1,3-glucanasas** y la capacidad de

hidrólisis de laminarina oxidada, en igual extensión que la laminarina no oxidada, de la β -1,3-glucanasa III permite clasificarla como **endo- β -1,3-glucanasa**. Si se compara la hidrólisis de disacáridos por parte de las β -1,3-glucanasas I y II se puede establecer una diferencia de especificidad entre ellas dos. La β -1,3-glucanasa I se puede clasificar como una **exo- β -1,3-glucanasa** específica del enlace β -1,3 debido a que hidroliza laminaribiosa y en muy baja extensión, gentiobiosa. Por el contrario, la β -1,3-glucanasa II además de hidrolizar p-nitrofenil-P-D-glucósido, hidroliza disacáridos, preferentemente laminaribiosa y gentiobiosa y celobiosa en menor grado. Estos resultados la caracterizan como una **exo- β -glucanasa** no específica, aunque no es capaz de hidrolizar enlaces β -glicosídicos diferentes a los β -1,3 en moléculas largas.

Al analizar los resultados de los estudios realizados para averiguar el modo de acción de las β -1,3-glucanasas purificadas se puede establecer que hidrolizan la laminarina de manera diferente (Figura 4.1.):

- La β -1,3-glucanasa I es una **exo- β -1,3-glucanasa** específica del enlace β -1,3. Esto es posible deducirlo de los siguientes resultados.

- a) El hecho de que para inhibir su actividad sea necesaria una alta concentración de glucono-Z-lactona (Figura 3.49.) que es una característica de las **exo- β -1,3-glucanasas** específicas (Pitson et al., 1995).
- b) En el estudio de la hidrólisis por cromatografía en capa **fina** (Figura 3.52.), como productos finales se obtienen glucosa y gentiobiosa.
- c) El análisis de azúcares reductores por cromatografía de gases revela una alta liberación de glucosa (Figura 3.56.).
- d) En el estudio de la hidrólisis de la laminarina por Resonancia Magnética Nuclear ($^1\text{H-RMN}$), tras 60 días de incubación aún se ven señales correspondientes a enlaces β -1,6 (Figura 3.58.).
- e) El bajo grado de hidrólisis encontrado para la gentiobiosa (Tabla 3.9.) y la no hidrólisis de sustratos con enlaces diferentes al β -1,3.

- La β -1,3-glucanasa II es una **exo- β -glucanasa** no específica. No es capaz de hidrolizar enlaces diferentes del enlace β -1,3 en cadenas largas (Tabla 3.9.). Esto se puede deducir de los siguientes hechos:

- a) Se inhibe en un alto porcentaje con muy bajas concentraciones de glucono-s-lactona (Figura 3.50.), **característico** de **exo- β -glucanasas** no específicas (Pitson *et al.*, 1995).
- b) Al estudiar los productos liberados en la hidrólisis de laminarina por cromatografía en capa **fina** (Figura 3.53.), se obtiene como producto **final** glucosa exclusivamente lo que implica necesariamente hidrólisis de la gentiobiosa (β -1,6) generada en dicha hidrólisis.
- c) Al analizar los azúcares reductores liberados en la hidrólisis de laminarina por cromatografía de gases se observa una alta liberación de glucosa (Figura 3.56.).
- d) En el estudio de la hidrólisis de la laminarina por Resonancia Magnética Nuclear ($^1\text{H-RMN}$), tras 60 días de incubación aún se ven

señales correspondientes a enlaces β -1,6, aunque en menor proporción que para la β -1,3-glucanasa 1 (Figura 3.59).

e) Se observa hidrólisis de laminaribiosa, pero también de gentiobiosa y celobiosa en menor extensión (Tabla 3.9). No se observa hidrólisis de sustratos de cadena larga con enlaces diferentes al β -1,3.

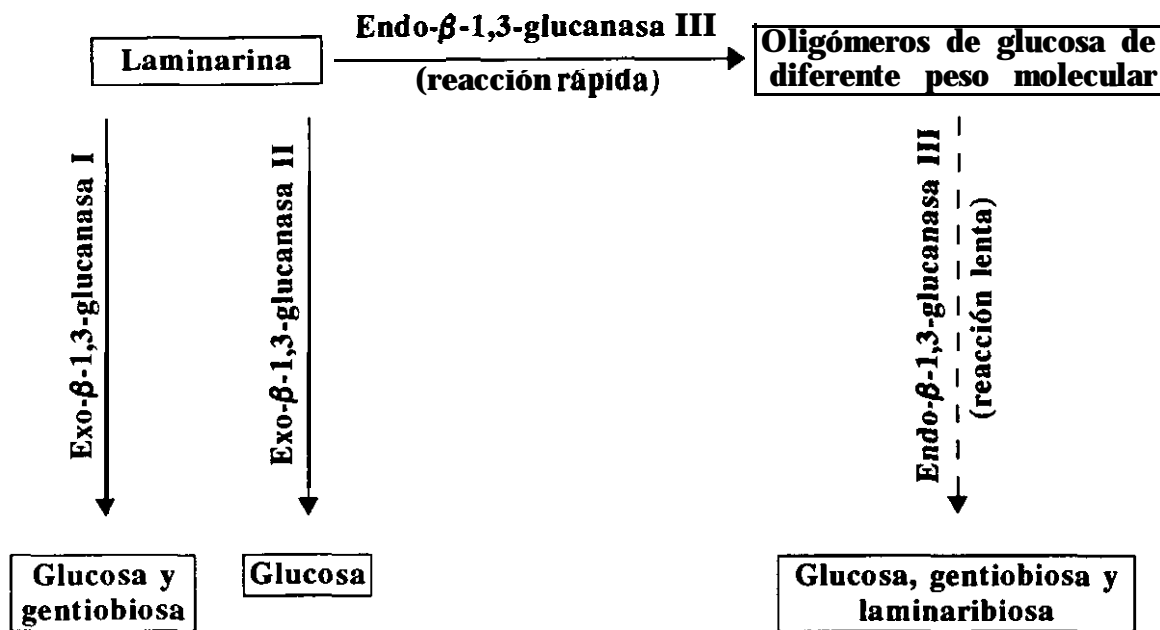


Figura 4.1. Modo de acción de las β -1,3-glucanasas de *A. nidulans*.

- La β -1,3-glucanasa III es una **endo- β -1,3-glucanasa** específica. No es capaz de hidrolizar enlaces diferentes del enlace β -1,3 (Tabla 3.9). Es capaz de generar glucosa aunque muy lentamente. Esto es posible deducirlo de:

- Al estudiar la variación de la actividad enzimática con el tiempo de incubación y con la concentración de enzima (Figuras 3.43. y 3.44.), se observa **una** rápida saturación. Esto se puede explicar por la existencia de una primera hidrólisis rápida a oligómeros de distinto peso molecular. Posteriormente, puede haber una hidrólisis muy lenta de éstos a glucosa.
- En la hidrólisis de la laminarina se liberan oligómeros de diferente peso molecular, como se observa por cromatografía en capa fina (Figura 3.54.). La glucosa no aparece hasta transcurridas 4 horas de hidrólisis.
- En la hidrólisis de laminarina se libera glucosa en muy baja proporción, como se observa al analizar el hidrolizado por cromatografía de gases (Figura 3.56.).
- En el estudio de la hidrólisis de la laminarina por Resonancia Magnética Nuclear, tras 60 días de incubación el espectro no se corresponde con el de glucosa, probablemente reflejo de una mezcla de glucosa y oligómeros de la misma. También se ven señales correspondientes a enlaces β -1,6 (Figura 3.60)

e) Es capaz de hidrolizar laminarina oxidada. No hidroliza sustratos de cadena larga con enlaces diferentes al B-1,3, ni disacáridos (Tabla 3.9.).

No fue posible determinar en los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear si la hidrólisis enzimática transcurre con inversión o retención de la configuración β puesto que la velocidad de hidrólisis es del orden de la de mutarrotación de la glucosa debido a la baja actividad recuperada en la deuteración de las enzimas.

4.8. Funciones de las β -1,3-glucanasas purificadas, durante la autólisis de *A. nidulans*.

Como se ha visto en el apartado 4.4. las β -1,3-glucanasas purificadas tienen un comportamiento diferente a lo largo de la autólisis. Una vez caracterizadas y determinado su modo de acción, es posible asignarlas diferentes funciones y explicar su comportamiento. Las **endo- β -1,3-glucanasas** están consideradas como las principales enzimas implicadas en procesos de degradación de la pared celular como se ha descrito para especies de *Schizosaccharomyces* (Fleet y Phaff, 1974) y en *Saccharomyces cerevisiae* (Santos *et al.*, 1979). No ocurre igual con las **exo- β -1,3-glucanasas** a las que no se les considera necesarias para la degradación de la pared celular, como ocurre en *Candida albicans* (Molina *et al.*, 1987). También se han descrito una **exo- β -1,3-glucanasa** muy poco activa frente a su pared celular en *Schizosaccharomyces versatilis* (Fleet y Phaff, 1975) y un **mutante** no productor de **exo- β -1,3-glucanasa** de *Saccharomyces cerevisiae* cuyo crecimiento no se veía afectado (Santos *et al.*, 1979). Por esto, se les atribuye la degradación de los oligómeros generados por las **endo- β -1,3-glucanasas** (Pitson *et al.*, 1993).

Basándose en estos hechos se puede explicar que las **tres β -1,3-glucanasas** producidas por *A. nidulans* estén presentes al principio de la fase de autólisis (Figuras 3.10. y 3.11., Tabla 3.1.) por la necesidad de una rápida utilización de los **β -1,3-glucanos** de reserva o de la pared celular como fuente de carbono. Así la **β -1,3-glucanasa III** estaría encargada de producir oligómeros sobre los cuales actuarían las **β -1,3-glucanasas I y II** para producir glucosa que sería utilizada por el hongo. Además las **β -1,3-glucanasas I y II** son capaces de producir también glucosa a partir de moléculas de **β -1,3-glucano** (Figura 4.2. A). La cooperación de todo el sistema enzimático encargado de la degradación de los **β -1,3-glucanos** estaría relacionado con el rápido descenso del peso seco de micelio observado en este **período**. Una vez transcurrida esta primera fase, el peso seco de micelio ralentiza su disminución y esto podría estar relacionado con la desaparición de la **β -1,3-glucanasa III** del medio de cultivo a los 30 días de cultivo (Figuras 3.10. y 3.11., Tabla 3.1.). En este caso se puede pensar que las **β -1,3-glucanasas I y II** se encargarían de producir glucosa, a partir de **β -1,3-glucanos**, que sería reciclada por el hongo (Figura 4.2. B), ya se han descrito **exo- β -1,3-glucanasas** implicadas en la degradación de la pared celular durante el crecimiento en *Acremonium persicinum* (Pitson *et al.*, 1995). Al **final** del proceso de **autólisis**

el hongo intenta aprovechar al máximo todos los β -1,3-glucanos disponibles como fuente de carbono, y por tanto se haría necesaria la participación de todo el sistema enzimático encargado de su degradación (Figura 4.2. C). Esto explicaría la reaparición de la **endo- β -1,3-glucanasa III** y el que las actividades **exo- β -1,3-glucanasas 1 y II** alcancen su máximo nivel a los 50 días de cultivo (Figuras 3.10. y 3.11., Tabla 3.1.).

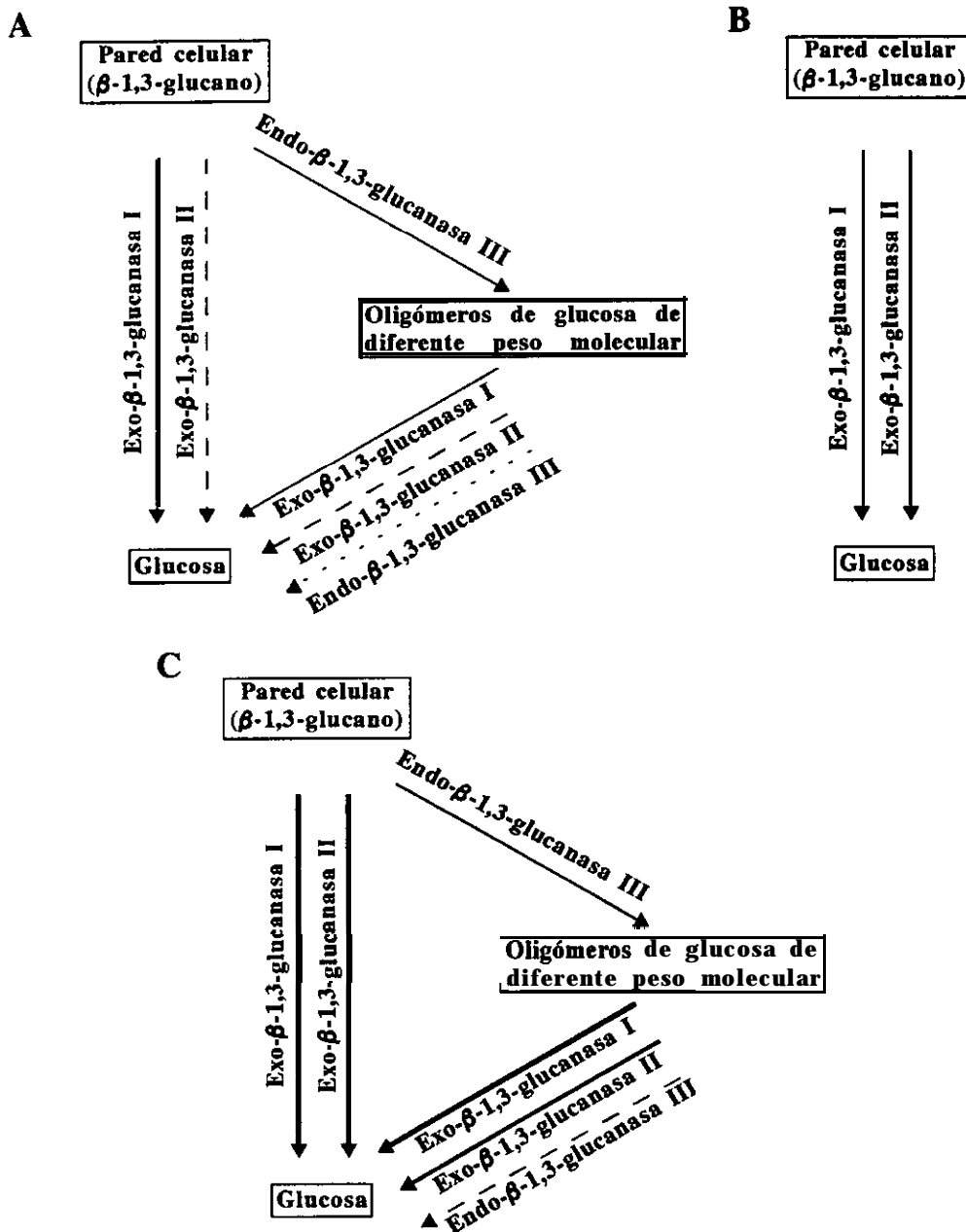


Figura 4.2. Esquema de las funciones que pueden tener las β -1,3-glucanasas de *A. nidulans* a lo largo de su autólisis a los 10 días (A), 30 días (B) y 50 días de incubación (C). El *grosor* de la flecha es indicativo del nivel de la actividad enzimática.

4.9. Degradación de paredes celulares de *F. oxysporum lycopersici* raza 2 y fracciones de las mismas por las enzimas líticas de *A. nidulans*.

Las quitinasas y β -1,3-glucanasas están relacionadas con los procesos de defensa de las plantas superiores. El hecho de que algunos hongos utilizados como micoparásitos sean capaces de producir estas actividades que degradan la pared celular (Chérif y Benhamou, 1990), hicieron pensar en *A. nidulans* como un posible antagonista de *Fo12* ya que es productor de quitinasas y β -1,3-glucanasas (Reyes *et al.*, 1988; Nuero *et al.*, 1993). En este trabajo se obtuvieron resultados similares a los previamente descritos por Alfonso *et al.* (1992) para la degradación de las paredes de *Fo12*, con las enzimas líticas de *A. nidulans*. Así, los porcentajes de degradación alcanzados en la hidrólisis fueron de un 22%, un 10,8% y un 6,5% medidos como descenso de absorbancia a 660 nm, liberación de sustancias reductoras y liberación de N-acetilglucosamina respectivamente (Figura 3.62.). Estos resultados refuerzan la idea del uso de *A. nidulans* como antagonista de *Fo12*. La liberación de glucosa encontrada por cromatografía gas-líquido (GLC) en la hidrólisis de la pared celular de *Fo12* podría ser debida a la participación de las β -1,3-glucanasas producidas por *A. nidulans*. Sin embargo, el estudio de la degradación de las paredes de *Fo12* por las β -1,3-glucanasas de *A. nidulans* purificadas no tuvo resultados positivos, probablemente debido a la necesidad de la actuación conjunta de éstas con otras hidrolasas como las que componen el sistema quitinolítico en *A. nidulans* (Reyes *et al.*, 1989 a y b; Alfonso *et al.*, 1995 a), en la degradación de la pared celular. Esta idea se apoyaría en el hecho de que haya un 6,5% de degradación como liberación de N-acetilglucosamina, de la cual estaría encargado el sistema quitinolítico descrito en *A. nidulans* por Reyes *et al.* (1989 a y b; Alfonso *et al.*, 1995 a). Por esto es posible pensar que con la aplicación conjunta de las β -1,3-glucanasas purificadas y el sistema quitinolítico de *A. nidulans* se hubieran obtenido resultados positivos.

Se analizó la composición de la pared celular de *Fo12*, encontrándose tres fracciones, F1S, F1I y F4 de diferente naturaleza (Alfonso *et al.*, 1995 b). F1S es un β -gluco-galacto-manano de estructura compleja, F1I esta compuesta fundamentalmente por β -1,3-glucano y una contaminación por F1S, mientras que F4 es un complejo formado por quitina y β -1,3-glucano. La fracción F1I no se considera como una fracción independiente de la pared, debido a su bajo porcentaje en la misma, ya que podría tratarse de una fracción intermedia entre F1S y F4 (Alfonso *et al.*, 1995 b).

La fracción F1S es un polisacárido complejo ya descrito para otras especies de *Fusarium* (Jikibara *et al.*, 1992) que el crudo enzimático de *A. nidulans* hidroliza en muy poca extensión, alcanzándose únicamente, medido como liberación de sustancias reductoras, un 3 % de hidrólisis. Resultados parecidos se obtienen con los crudos enzimáticos de hongos del orden Mucorales (Santamaría *et al.*, 1994). Sin embargo, estos bajos porcentajes de hidrólisis de la fracción F1S contrastan con los altos porcentajes encontrados en su

degradación *con* enzimas de *otras* especies de *Fusarium* (Santamaría *et al.*, 1995). El cromatograma obtenido por GLC del hidrolizado de esta fracción de la pared celular de *Fo12* por las enzimas líticas de *A. nidulans* revela que el azúcar liberado en mayor proporción fue glucosa (Figura 3.65.), aunque también se observa liberación de galactosa y **manosa**, componentes de **F1S**. Este patrón es distinto al descrito por Santamaría *et al.* (1995) en la hidrólisis de esta fracción por crudos enzimáticos de diferentes especies de *Fusarium*, en el cual el azúcar mayormente liberado fue **manosa**. Puesto que este tipo de fracciones complejas compuestas por **manosa** no son frecuentes en hongos (Gómez-Miranda *et al.*, 1990), es posible que *A. nidulans* no tenga las enzimas necesarias para hidrolizar eficazmente esta fracción. La liberación de glucosa hizo pensar en un posible papel de las **β -1,3-glucanasas** en la hidrólisis de ésta fracción. Puesto que al intentar hidrolizar esta fracción con las **β -1,3-glucanasas** de *A. nidulans* purificadas, éstas no fueron capaces de hidrolizarla, o bien no participarían en la hidrólisis de esta fracción o requerirían de la acción conjunta de otras enzimas, ya que se ha descrito que estos polímeros complejos requieren de la participación de diferentes actividades enzimáticas para su hidrólisis (Mc Cleary, 1983).

La fracción F4 esta constituida por **un** complejo quitina-glucano descrito en muchos hongos (Bartnicki-García, 1968). Esta fracción es degradada en un alto porcentaje, tras 140 horas de incubación, por las enzimas líticas de *A. nidulans* llegando a alcanzarse hasta un 33% de degradación medida como descenso de la **absorbancia** a 660 nm (Figura 3.64.). Al estudiar la degradación como sustancias reductoras, N-acetilglucosamina o glucosamina liberadas se alcanza un **22,4%**, un **17,1%** y un **3,2%** respectivamente (Figura 3.64.), aunque al **final** del período estudiado, se observa una disminución de estos porcentajes probablemente debido a la existencia de posibles transglicosilaciones (Nakano *et al.*, 1986). Puesto que cada hongo durante la autólisis sintetiza las enzimas necesarias para llevar a cabo la degradación de su pared celular (Pérez-Leblic *et al.*, 1982 a, 1982 b; Reyes *et al.*, 1984; Martínez *et al.*, 1986), la mayor degradación conseguida frente a esta fracción podría ser debida a la presencia en *A. nidulans* de quitinasas y **β -1,3-glucanasas** (Reyes *et al.*, 1988; Nuero *et al.*, 1993), necesarias para la degradación de esta fracción. Basándose en estos hechos, se puede pensar que las **β -1,3-glucanasas** de *A. nidulans* podrían jugar un papel importante en la hidrólisis de esta fracción ya que en ésta se libera mayormente glucosa, como puede deducirse del cromatograma obtenido por GLC del hidrolizado de esta fracción (Figura 3.65.). Puesto que al intentar hidrolizar esta fracción F4 con las **β -1,3-glucanasas** purificadas de *A. nidulans* no se observa degradación y dada la liberación de N-acetilglucosamina y glucosamina encontrada en la hidrólisis con el crudo enzimático (Figura 3.64.), es posible pensar en que, como ocurre para la degradación de la pared celular, para hidrolizar el complejo quitina-glucano sería necesaria la acción conjunta de las **β -1,3-glucanasas** y del complejo quitinolítico de *A. nidulans*. Por esto, tal vez

el uso de las β -1,3-glucanasas purificadas conjuntamente con el complejo quitinolítico de *A. nidulans* hubiera conseguido resultados similares a los alcanzados en la hidrólisis con el crudo enzimático.

5. CONCLUSIONES.

5. CONCLUSIONES.

1.- Los diferentes parámetros físico-químicos estudiados durante la autólisis de *Aspergillus nidulans* tuvieron comportamientos similares en todos los medios estudiados.

2.- El aumento de la actividad β -1,3-glucanasa durante la autólisis de *Aspergillus nidulans* no es dependiente de la presencia de diferentes sustancias en el medio. Este aumento es dependiente del tiempo de autólisis.

3.- El aumento de la actividad β -1,3-glucanasa durante la autólisis de *Aspergillus nidulans* es debido al incremento de tres proteínas (I, II y III).

4.- La β -1,3-glucanasa I es una **exo- β -1,3-glucanasa** específica del enlace β -1,3 glicosídico. Su pH óptimo es de 5 unidades, su temperatura óptima de 40 °C, al calcular su masa molecular por electroforesis desnaturante se desdobra en dos bandas de 52.800 Da y 48.900 Da y su punto isoelectrico es de 4,56 unidades. Es una glicoproteína con un 40% de carbohidratos. Su K_m frente a laminarina es de 0,86 mg/ml ó 0,22 mM.

5.- La β -1,3-glucanasa II es una **exo- β -glucanasa** no específica, aunque presenta mayor actividad frente a compuestos con enlaces β -1,3 glicosídicos. Su pH óptimo es de 7 unidades, su temperatura óptima de 60 °C, su masa molecular calculado por electroforesis desnaturante de 97.400 Da y su punto isoelectrico de 4,49 unidades. Es una glicoproteína con un 34% de carbohidratos. Su K_m frente a laminarina es de 0,15 mg/ml ó 0,038 mM, frente a p-nitrofenil-P-D-glucósido es de 2,07 mM.

6.- La β -1,3-glucanasa III es una **endo- β -1,3-glucanasa** específica del enlace β -1,3 glicosídico. Su pH óptimo es de 5 unidades, su temperatura óptima 40 °C, su masa molecular calculado por electroforesis desnaturante de 41.100 Da y su punto isoelectrico de 2,94 unidades. Es una glicoproteína con un 15% de carbohidratos. Su K_m frente a laminarina es de 0,94 mg/ml ó 0,24 mM.

7.- Las tres β -1,3-glucanasas purificadas tienen distintas funciones durante la autólisis. La **endo- β -1,3-glucanasa III** estaría implicada en la degradación de los β -1,3-glucanos de la pared celular de *Aspergillus nidulans* produciendo oligómeros de glucosa a partir de los cuales las β -1,3-glucanasas I y II generarían glucosa. Las β -1,3-glucanasas I y II también pueden producir glucosa a partir de los β -1,3-glucanos de la pared celular de *Aspergillus nidulans*.

8.- El crudo enzimático de cultivos autolizados de *Aspergillus nidulans* es capaz de hidrolizar la pared celular de **Fo12** y la fracción F4 de la misma.

9.- El crudo enzimático de cultivos autolizados de *Aspergillus nidulans* no es capaz de hidrolizar en alta extensión la fracción **F1S** de la pared celular de **Fo12**.

10.- Las β -1,3-glucanasas purificadas, tanto individual como conjuntamente, no fueron capaces de hidrolizar, ni las paredes celulares de **Fo12**, ni sus fracciones.

6. BIBLIOGRAFÍA.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Ainsworth, C.C. (1973). Introduction and keys to higher taxa. En: *The fungi*. Eds. G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow y A.S. Sussman. Academic Press. New York and London. Vol 4A, pp 1-7.
- Albersheim, P., Jones, T.M. y English, P.D. (1969). Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 7, 171-194.
- Alfonso, C., del Amo, F., Nuero, O.M. y Reyes, F. (1992). Physiological and biochemical studies on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2 for its biocontrol by nonpathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 99, 169-174.
- Alfonso, C., Nuero, O.M., Santamaría, F. y Reyes, F. (1995 a). Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Curr. Microbiol.* 30, 49-54.
- Alfonso, C., Santamaría, F., Nuero, O.M., Prieto, A., Leal, J.A. y Reyes, F. (1995 b). Biochemical studies on the cell wall degradation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2 by its own lytic enzymes for its biocontrol. *Lett. Appl. Microbiol.* 20, 105-109.
- Anderson, A.J. (1989). The biology of glycoproteins as elicitors. En: *Plant Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives*. Eds. T. Josuge, E.W. Nester. Mc Graw-Hill. New York. Vol 2, pp 87-130.
- Anuario de Estadística Agraria (1988). Servicio de Publicaciones del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.
- Baker, R. (1968). Mechanisms of biological control of soil-borne plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 6, 263-294.
- Baker, K.F. y Snyder, W.C. (1970). *Ecology of Soilborne Plant Pathogens. Prelude to Biological Control*. Eds. K.F. Baker y W.C. Snyder. University of California Press. Berkeley. Los Angeles. London. 571 pp.
- Baker, K.F. y Cook, R.J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 433 pp.
- Baker, K.F. (1987). Evolving concepts of biological control of plants pathogens, *Ann. Rev. Phytopathol.* 25, 67-85.
- Barber, M.S, Bertram, R.E. y Ride, J.P. (1989). Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34, 3-12.
- Bartnicki-García, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* 22, 87-108.
- Bartnicki-García, S. y Reyes, E. (1968). Polyuronides in the cell walls of *Mucor rouxii*. *Biochim. Biophys. Acta.* 170, 54-62.
- Bartnicki-García, S. (1973). Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* Eds. J.O. Ashworth y J.E. Smith. Cambridge University. Cambridge.
- Beckman, C.H. (1987). *The Nature of Wilt Disease of Plant*. APS Press, St. Paul. Minnesota. 174 pp.
- Benhamou, N., Joosten, M.H.A.J. y de Wit, D.J.G.M. (1990). Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant. Physiol.* 92, 1108-1120.

- Berman, W.P. y Lasky, L.A. (1985). Engineering glycoproteins for use as pharmaceuticals. *Trends. Biotechnol.* **3**(2), 51-53.
- Beyer, M. y Diekmann, H. (1984). The laminarinase system of *Streptomyces* sp. ATCC 11238. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 207-212.
- Blakeman, J.P. y Fokkema, N.J. (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* **20**, 167-192.
- Bobbit, T.F., Nordin, J.H., ROUX, H., Rerol, J.F. y Marchessault, R.H. (1977). Distribution and conformation of crystalline nigeran in hyphal walls of *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. *J. Bacteriol.* **132**, 691-703.
- Bodenmann, J., Heiniger, V. y Hohl, H.R. (1985). Extracellular enzymes of *Phitophthora infestans*, endo-cellulase, β -glucosidases, and 1,3- β -glucanases. *Can. J. Microbiol.* **31**(1), 75-82.
- Boller, T., Gehri, F., Mauch, F. y Vögeli, U. (1983). Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta.* **157**, 22-31.
- Boosalis, M.G. (1964). Hyperparasitism. *Ann. Rev. Phytopathol.* **2**, 363-376.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bucheli, P., Durr, M., Buchala, A.J. y Meier, H. (1985). β -glucanases in developing cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibres. *Planta.* **166**, 530-536.
- Bull, A.T. (1970 a) Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. *J. Gen. Microbiol.* **63**, 75-94.
- Bull, A.T. (1970 b). Inhibition of polysaccharides by melanin; Enzyme inhibition in relation to mycolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **137**, 345-356.
- Burnett, J.H. (1979). Aspects of the structure and growth of hyphal cell walls. En: *Fungal walls and hyphal growth*. Eds. J.H. Burnett y A.P.J. Trinci. Cambridge University Press, Cambridge. pp 1-25.
- Campbell, R. (1989). *Biological control of microbial plant pathogens*. Cambridge University Press, Cambridge. 218 pp.
- Campbell, R. (1990 a). Biological control of soil-borne plant diseases. *Brighton Crop Prot. Conf. (Pests and Diseases)*. **2**, 607-615.
- Campbell, R. (1990 b). Current status of biological control of soilborne diseases. *Soil Use and Management*. **6**, 173-178.
- Carpenter, C.E., Mueller, R.J., Kazmierczak, P., Zhang, L., Villalon, D.K. y van Alfen, N.K. (1992). Effect of a virus on accumulation of a tissue-specific cell-surface protein of the fungus *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 55-61.
- Chérif, M. y Benhamou, N. (1990). Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*. **80**, 1406-1414.
- Chet, I. y Elad, Y. (1982). Prevention of plant infection by biological means. En: *Le Sélection des Plantes*. Ed. INRA Publ. Vol II, pp 195-204.

- Chet, I. y Henis, Y. (1985). *Trichoderma* as a biocontrol agent against soilborne root pathogens. En: ***Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens***. Eds. C.A. Parker, K.J. Moore, P.T.W. Wong, A.D. Rovira & J.F. Collmorgen. APS Press, St. Paul, Minnesota. pp 110-112.
- Chet, I. (1987). *Trichoderma* - Application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. En: ***Innovative Approaches to Plant Disease Control***. Ed. I. Chet John Wiley and sons. New York. pp 137-160.
- Cook, R.J. y Baker, K.F. (1983). ***The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens***. APS Press. St. Paul, Minnesota. 539 pp.
- Copa-Patiño, J.L., Reyes, F. y Perez Leblic, M.I. (1989). Purification and properties of a 1,3- β -glucanase from *Penicillium oxalicum* autolysates. ***FEMS Microbiol. Lett.*** **53**, 285-291.
- De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Llorca, J.M., Benítez, T., Pintor-Toro, J.A. y Llobell, A. (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. ***Eur. J. Biochem.*** **206**, 859-867.
- Deacon, J.W. (1983). ***Microbial Control of Pests and Plant Diseases***. Eds. J.A. Cole, C.J. Knowles y D. Schlessinger. England: Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd. 88 pp.
- Dekker, J. y Georgopoulos, S.G. (1982). ***Fungicide Resistance in Crop Protection***. Eds. J. Dekker y S.G. Georgopoulos. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen. 265 pp.
- Del Rey, F., García-Acha, I. y Nombela, C. (1979). The regulation of β -glucanase synthesis in fungi and yeast. ***J. Gen. Microbiol.*** **110**, 83-89.
- Dixon, M. y Webb, E.C. (1979). ***Enzymes***. 3ª edición. Longman, Green & Co. Ltd. London., p 350.
- Dubordieu, D., Desplanques, C., Villetaz, J-C. y Ribereau-Gayon, P. (1985). Investigations of an industrial β -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. ***Carbohydr. Res.*** **144**, 277-287.
- Dubos, I. (1987). Fungal antagonism in serial agrobiocenoses. En: ***Innovative Approaches to Plant Disease Control***. Ed. I. Chet. John Wiley and sons. New York. pp 107-135.
- Elad, Y., Chet, I. y Henis, Y. (1982). Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. ***Can. J. Microbiol.*** **28**, 719-725.
- Farkas, V. (1979). Biosynthesis of cell walls of fungi. ***Microbiol. Rev.*** **43(2)**, 117-144.
- Farr, D.R., Schuler-Hovanessian, A. y Horisberger, M. (1977). Structure of a α -D-Galactosaminoglycan from *Physarum policephalum* sphenule walls. ***Carbohydr. Res.*** **59**, 151-154.
- Fleet, G.H. y Phaff, H.J. (1974). Glucanases in *Schizosaccharomyces*. ***J. Biol. Chem.*** **249(6)**, 1717-1728.
- Fleet, G.H. y Phaff, H.J. (1975). Glucanases in *Schizosaccharomyces*. Isolation and properties of an exo- β -glucanase from the cell extracts and culture fluid of *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis*. ***Biochem. Biophys. Acta*** **410**, 318-332.
- Fravel, R. (1988). Role of the antibiosis in the biocontrol of plant diseases. ***Ann. Rev. Phytopathol.*** **26**, 75-91.

- Friebe, B. y Holldorf, A.W. (1975). The control of extracellular 1,3- β -glucanase activity in the Basidiomycete species QM 806. *Biochem. Soc. Trans.* **3**, 944-946.
- Gancedo, J.M., Gancedo, C. y Asensio, C. (1966). Uronic acids in fungal cell walls. *Biochem. Z.* **346**, 328-332.
- Garret, S.D. (1970). *Pathogenic roo? infecting fungi*. Cambridge University Press. Cambridge. 264 pp.
- Goldstein, I.J., Way, G.W., Lewis, B.A. y Smith, F. (1965). Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. En: *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Ed. R.L. Whistler. Academic Press. New York. London., Vol 5, pp 361-368.
- Gómez-Miranda, B., Guerrero, C. y Leal, J.A. (1984). Effect of culture age on cell wall polysaccharide of *Penicillium alhabadense*. *Exp. Mycol.* **8**, 248-303.
- Gómez-Miranda, B. y Leal, J.A. (1985). Carbohydrate stability during ageing in *Penicillium expansum* cell wall. *Microbiología SEM.* **1**, 67-75.
- Gómez-Miranda, B., Prieto, A. y Leal, J.A. (1990). Chemical composition and characterization of a galactoglucomannan from *Gliocadium viride*. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**, 331-336.
- Görg, A., Posterl, W. y Westermeier, R. (1980). En: *Electrophoresis*. Ed. B.J. Radola. Walter de Gruiter & Co. New York., pp 67-68.
- Gottlieb, D. y Shaw, P.D. (1970). Mechanism of action of antifungal antibiotics. *Ann. Rev. Phytopathol.* **8**, 371-402.
- Hadar, Y., Chet, I. y Henis, Y. (1979). Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology.* **69**, 64-68.
- Hohl, H.R., Slossel, P. y Hazler, H. (1980). Papilla formation and partial inhibition of fungal glucanases by phytoalexins in the *Phytophthora infestans-Solanum tuberosum* system. *Ann. Phytopathol.* **12**, 353-362.
- Huang, H.C. (1992). Ecological basis of biological control of soilborne plant pathogens. *Can. J. Plant Pathol.* **14**, 86-91.
- Hughes, R.C. (1971). Autolysis of *Bacillus cereus* cell wall and isolation of structural components. *Biochem. J.* **121**, 791-802.
- Hunsley, D. y Burnett, J.H. (1970). The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. *J. Gen. Microbiol.* **62**, 203-218.
- Isaac, S. y Gokhale, V. (1982). Autolysis: a tool for protoplast production from *Aspergillus nidulans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **78(3)**, 389-394.
- Iwahara, S., Jikibara, T. y Takegawa, K. (1990). Identification of O-a-D-glucopyranosyluronate-(1 \rightarrow 2)-D-galactose isolated from the acidic polysaccharide of *Fusarium* sp. M7-1. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1559-1561.
- Jeniaux, Ch. (1966). Chitinases. En: *Methods in Enzymology*. Eds. Newfeld y V. Ginsburg (Eds.). Academic Press. New York., Vol 8, pp 644-650.
- Jenkyn, J.F. y White, N. (1988). Activity of triadimefon vapour against *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Ann. Appl. Biol.* **113**, 15-25.
- Jikibara, T., Takegawa, K., Iwahara, S. (1992). Studies on the uronic acid-containing glycoproteins of *Fusarium* sp. M7-1: III. The primary structures of the acidic polysaccharides of the glycoproteins. *J. Biochem.* **111**, 236-243.

- Keen, N.T. y Legrand, M. (1980). Surface glycoproteins: evidence that they may function as the race specific phytoalexin elicitors of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Phys. Plant Pathol.* 17, 175-192.
- Ko, W. y Lockwood, J.L. (1970). Mechanisms of lysis of fungal mycelia in soil. *Phytopathology.* 60, 148-154.
- Kombrink, E., Schröder, M. y Hahlbrock, K. (1988). Several pathogenesis-related proteins in potato are β -1,3-glucanases and chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 782-786.
- Kritzman, G., Cbet, J. y Henis, Y. (1978). Localization of β -1,3-glucanase in the mycelium of *Sclerotium rolfsii*. *J. Bacteriol.* 134, 470-475.
- Kusama, S., Kusakabe, I. y Murakami, K. (1986). Purification and some properties of β -1,3-glucanase from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* 50(5), 1101-1106.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* 227, 680-685.
- Laboz, R., Reyes, F. y Pérez-Leblic, M.I. (1976). Lytic enzymes in the autolysis of filamentous fungi. *Mycopathologia.* 60, 45-49.
- Lahoz, R., Reyes, F. y Martínez, M.J. (1979). Effect of the pH on the degree of autolysis of *Aspergillus niger*. *Can. J. Bot.* 57, 1901-1903.
- Lahoz, R., Reyes, F., Gómez-Alarcón, G., Ramos, A. y Cribeiro, L. (1985). Liberation of electrolytes during the induced autolysis of *Aspergillus niger*. *Zbr. Mikrobiol.* 140, 83-87.
- Lahoz, R., Reyes, F., Gómez-Alarcón, G., Cribeiro, L., Junquera, M.A. y Lahoz-Beltrá, R. (1986). The kinetics of the autolytic phase of growth in cultures of *Aspergillus niger*. *Mycopathologia.* 94, 75-78.
- Laine, R.A., Esselman, W.J. y Sweeley, C.C. (1972). Gas-liquid chromatography of carbohydrates. En: *Methods in Enzymology*. Eds. E.F. Newfeld y V. Ginsburg. Academic Press. New York. Vol 28, pp 159-167.
- Leal, J.A., Moya, A., Gómez-Miranda, B., Rupérez, P. y Guerrero, C. (1984). Differences in cell wall polysaccharides in some species of *Penicillium*. En: *Microbial cell wall synthesis and autolysis*. Ed. C. Nombela. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. New York. London. pp 149-155.
- Legrand, M., Kauffmann, S. y Fritig, B. (1987). Biological function of pathogenesis-related proteins. Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 6750-6754.
- Lilley, G. y Bull, A.T. (1974). The production of β -1,3-glucanase by thermophilic species of *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* 83, 123-133.
- Lowry, O.H., Rosebrough, A., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lynch, P.T., Collin, H.A. e Isaac, S. (1985). Use of autolytic enzyme for isolation of protoplast from *Fusarium tricinctum* hyphae. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84(3), 472-478.
- Mahadevan, P.R. y Mahadkar, U.R. (1970). Role of enzymes in growth and morphology of *Neurospora crassa*: Cell wall bound enzymes and their possible role in branching. *J. Bacteriol.* 101, 941-947.

- Malet, C., Jiménez-Barbero, J., Bernabé, M., Brosa, C. y Planas A. (1993). Stereochemical course and structure of the products of the enzymic action of endo-1,3-1,4- β -D-glucanohydrolase from *Bacillus licheniformis*. *Biochem. J.* 296, 753-758.
- Martínez, M.J., Reyes, F. y Lahoz, R. (1982). Cell wall plant degrading polysaccharide-degrading enzymes in autolysis of *Botrytis cinerea*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 78(3), 395-403.
- Martínez, M.J., Vázquez, C., Lahoz, R. y Reyes, F. (1986). Role of uronic acids present in phytopathogenic fungi as inducers of polygalacturonases during autolysis. *Mycopathologia.* 93, 33-37.
- Mauch, F., Hadwiger, L.A. y Boller, T. (1988 a). Antifungal hydrolases in pea tissue I. Purification and characterization of two chitinases and two β -1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. *Plant Physiol.* 87, 325-333.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. y Boller, T. (1988 b). Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88, 936-942.
- Mauch, F. y Staehelin, L. (1989). Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell.* 1, 447-457.
- Mitchell, A. y Taylor, I.F. (1969). Cell wall proteins in *Aspergillus niger* and *Chaetomium globosum*. *J. Gen. Microbiol.* 59, 103-109.
- McCleary, B.V. (1983). Enzymic interactions in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar *Cyamopsis tetragonolobus* the role of exo- β -mannanase EC-3.2.1.78. *Phytochem. (Oxf).* 22, 649-658.
- Molina, M., Cenamor, R. y Nombela, C. (1987). Exo- β -1,3-glucanase activity in *Candida albicans*: Effect of the yeast-to-mycelium transition. *J. Gen. Microbiol.* 133, 609-617.
- Molina, M., Cenamor, R., Sanchez, M. y Nombela, C. (1989). Purification and some properties of *Candida albicans* exo-1,3- β -glucanase. *J. Gen. Microbiol.* 135, 309-314.
- Mukerji, K.G. y Garg, K.L. (1988). *Biocontrol of Plant Diseases*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. Vol I y II, 211 y 198 pp.
- Nakano, H., Takemishi, S. y Watanabe, Y. (1986). Action of galactanase from *Penicillium citrinum* on *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside. *Agr. Biol. Chem.* 50, 3005-3012.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375-380.
- Nombela, C., Santos, T., Del Rey, F., Sánchez, M., García-Acha, I. y Villanueva, J.R. (1980). Regulation and genetics of fungal 1,3- β -glucanases. *Cienc. Biol. (Portugal).* 5, 35-41.
- Notario, V., Villa, T.G., Benitez, T. y Villanueva, J.R. (1976). β -glucanases in the yeast *Cryptococcus albidus* var. *aerius*. Production and separation of β -glucanases in asynchronous cultures. *Can. J. Microbiol.* 22, 261-268.

- Notario, V., Villa, T.G. y Villanueva, J.R. (1976). Purification of an exo β -D-glucanase from cell free extracts of *Candida utilis*. *Biochem. J.* **159**, 555-562.
- Notario, V. (1982). β -Glucanases from *Candida albicans*: purification, characterization and the nature of their attachment to cell wall components. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 747-759.
- Nuero, O.M., Alfonso, C., del Amo, F. y Reyes, F. (1993). Study of β -1,3-glucanase activity during autolysis of *Aspergillus nidulans* by FPLC ion-exchange chromatography. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**, 104-108.
- Ohno, N., Hashimoto, Y. y Yamadoe, T. (1986). Purification and properties of an exo-1,3- β -D-glucanase from the culture filtrate of *Mucor hiemalis*. *Carbohydr. Res.* **158**, 217-226.
- Pan, S.Q., Ye, X.S. and Kuc, J. (1989). Direct detection of beta-1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *Anal. Biochem.* **182**, 136-140.
- Papavizas, G.C. y Lumsden, R.D. (1980). Biological control of soilborne fungal propagules. *Ann. Rev. Phytopathol.* **18**, 389-413.
- Peberdy, J.F. (1979). Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**, 21-39.
- Pérez, P., García-Acha, I. y Durán, A. (1984). β -1,3-glucanases from *Geotrichum lactis*, activity on its own nascent and preformed β -glucan. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**, 233-238.
- Pérez-Leblic, M.I., Reyes, F., Lahoz, R. y Archer, S.A. (1982 a). Autolysis of *Penicillium oxalicum* with special reference to its cell walls. *Can. J. Microbiol.* **28**, 1289-1295.
- Pérez-Leblic, M.I., Reyes, F., Martínez, M.J. y Lahoz, R. (1982 b). Cell wall degradation in the autolysis of filamentous fungi. *Mycopathologia.* **80**, 147-155.
- Pérez-Leblic, M.I., Copa-Patiño, J.L., Arias, M.E., Reyes, F. y Laborda, F. (1985). 1,3- β -glucanases in the autolysis of *Penicillium oxalicum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **84**(3), 467-471.
- Petit, M. y Schneider, A. (1983). Chemical analysis of the wall of the yeast form of *Taphrina deformans*. *Arch. Mikrobiol.* **135**, 141-146.
- Pitson, S.M., Seviour, R.J. y McDougall, B.M. (1993). Noncellulolytic fungal β -glucanases: Their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 178-192.
- Pitson, S.M., Seviour, R.J., McDougall, B.M., Woodward, J.R. y Stone, B.A. (1995). Purification and characterization of three extracellular (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan glucohydrolases from the filamentous fungus *Acremonium persicinum*. *Biochem. J.* **308**, 733-741.
- Prieto, A., Rupérez, P., Hernández-Barranco, A. y Leal, J.A. (1988). Partial characterization of galactofuranose-containing heteropolysaccharides from the cell walls of *Talaromyces helicus*. *Carbohydr. Res.* **177**, 265-272.
- Prokop, A., Rapp, P. y Wagner, F. (1994). Production, purification and characterization of an extracellular endo- β -1,3-glucanase from a monokaryon of *Schizophyllum commune* ATCC 38548 defective in exo- β -1,3-glucanase formation. *Can. J. Microbiol.* **40**, 18-23.

- Raper, K.B. y Fanell, D.I (1965). *The genus Aspergillus*. R.E. Krieger (Ed.). New York. pp 495-503.
- Reese, E.T. (1977). The structure, biosynthesis and degradation of wood. *Rec. Adv. Phytochem. II*, 31 1-367.
- Reichelt, B.Y. y Fleet, G.H. (1981). Isolation, properties, function and regulation of endo-1,3- β -glucanases in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **147**, 1085-1094.
- Reyes, F. y Byrde, R.J.W. (1973). Partial purification and properties of β -N-acetylglucosaminidase from the fungus *Sclerotinia fructigena*. *Biochem. J.* **131**, 381-388.
- Reyes, F. y Lahoz, R. (1977). Variation of lysis of walls of *Sclerotinia fructigena* with the age of culture. *J. Gen. Microbiol.* **98**, 607-610.
- Reyes, F., Lahoz, R. y Val-Moreno, A. (1979). Influence of carbon and nitrogen sources on release of β -1,3-glucanase and β -N-acetylglucosaminidase during *Neurospora crassa* autolysis. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **72(2)**, 447-451.
- Reyes, F., Lahoz, R. y Val-Moreno, A. (1981). Synthesis of 1,3- β -glucanase and β -N-acetylglucosaminidase during autolysis of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **126**, 347-353.
- Reyes, F., Pérez-Leblic, M.I., Martínez, M.J. y Lahoz, R. (1984). Protoplasts production from filamentous fungi with their own autolytic enzymes. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**, 281-283.
- Reyes, F., Calatayud, J. y Martínez, M.J. (1988). Chitinolytic activity in the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**, 239-243.
- Reyes, F., Calatayud, J. y Martínez, M.J. (1989 a). Endochitinase from *Aspergillus nidulans* implicated in the autolysis of its cell wall. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**, 119-124.
- Reyes, F., Calatayud, J., Vázquez, C. y Martínez, M.J. (1989 b). β -N-acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* which degrades chitin oligomers during autolysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**, 83-88.
- Ridout, C.J., Coiey-Smith, J.R. y Lynch, J.M. (1986). Enzyme activity and electrophoretic T profile of extracellular protein induced in *Trichoderma* spp. by cell walls of *Rhizoctonia solani*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2345-2352.
- Rupérez, P. y Leal, J.A. (1987). Mannoglucogalactans from the cell walls of *Penicillium erythromellis*: isolation and partial characterization. *Carbohydr. Res.* **167**, 269-278.
- Sánchez, M., Nombela, C., Villanueva, J.R. y Santos, T. (1982). Purification and partial characterization of a developmentally regulated 1,3- β -glucanase from *Penicillium italicum*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2047-2053.
- Santamaría, F., Nuero, O.M., Alfonso, C., Prieto, A., Leal, J.A. y Reyes, F. (1994). Biochemical studies on the cell wall degradation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Iycopersici* race 2 by lytic enzymes from Mucorales for its biocontrol. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**, 152-155.
- Santamaría, F., Nuero, O.M., Alfonso, C., Prieto, A., Leal, J.A. y Reyes, F. (1995). Cell wall degradation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Iycopersici* race 2 by lytic enzymes from different *Fusarium* species for its biocontrol. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**, 385-390.

- Santos, T., Sánchez, M., Villanueva, J.R. y Nomhela, C. (1978 a). Regulation of the β -1,3-glucanase system in *Penicillium italicum*, glucose repression of the various enzymes. *J. Bacteriol.* **133(2)**, 465-471.
- Santos, T., Villanueva, J.R. y Nombela, C. (1978 b). Regulation of β -1,3-glucanase synthesis in *Penicillium italicum*. *J. Bacteriol.* **133(2)**, 542-548.
- Santos, T., Del Rey, F., Conde, J., Villanueva, J.R. y Nombela, C. (1979). *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in exo-1,3- β -glucanase production. *J. Bacteriol.* **139(2)**, 333-338.
- Sentandreu, R. y Northcote, D.H. (1969). The characterization of oligosaccharides attached to threonine and serine in mannan glycopeptides obtained from the cell walls of yeast. *Carbohydr. Res.* **10**, 584-585.
- Sentandreu, R. y Lampen, J.O. (1970). Biosynthesis of yeast mannan: inhibition of synthesis of mannose acceptor by cycloheximide. *FEBS Lett.* **11**, 95-99.
- Sentandreu y Lampen, (1972). Biosynthesis of mannan in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of a lipid intermediate and its identification as a mannosyl-1-phosphoryl polyphenol. *FEBS Lett.* **27**, 331-334.
- Sentandreu, R. (1986). Contribución de las mananoproteínas de la pared celular de las levaduras a la pared celular. *Resúmenes de la III Reunión Conjunta de Micología*. Jarandilla de la Vera, Cáceres. España. pp 13.
- Sbibata, Y. y Nisizawa, K. (1965). Microheterogeneity of β -glucosidases of apricot emulsin. *Arch. Biochem. Biophys.* **109**, 516-521.
- Sietsma, J.H. y Wessels, J.G.H. (1979). Evidences for covalent linkages between chitin and β -glucan in a fungal cell wall. *J. Gen. Microbiol.* **114**, 99-108.
- Sikkema, W.D. y Lovett, J.S. (1984). Cell wall composition of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Exp. Mycol.* **8**, 225-237.
- Sivan, A. y Chet, I. (1989). Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 675-682.
- Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* **160**, 61-73.
- Sonnenberg, A.S.M., Sietsma, J.H., y Wessels, J.C.H. (1985). Spatial and temporal differences in the synthesis of (1 \rightarrow 3)- β and (1 \rightarrow 6)- β linkages in a wall glucan of *Schizophyllum commune*. *Exp. Mycol.* **9**, 141-148.
- Stagg, C.N. y Feather, M.S. (1973). The characterization of chitin associated D-glucan from the cell wall of *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Acta.* **320**, 64-62.
- St. Leger, R.J., Staples, R.C. y Roberts, D.W. (1992). Cloning and regulatory analysis of starvation stress-gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin like protein from the entomopathogenic fungus *Metharizium anisopliae*. *Gene.* **120**, 119-124.
- Tello, J. (1989). *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral mediterráneo en España. Fases parasitarias Fusariosis vasculares del tomate y del clavel y no parasitaria. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- Tello, J.C. y Lacasa, A. (1990). *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral Mediterráneo de España. Fases parasitaria (fusariosis vasculares del tomate y del clavel) y no parasitaria. *Boletín de Sanidad Vegetal. Monog.* **19**.
- Tbomashow, L.S., Weller, D.M. y Cook, R.J. (1986). Molecular analysis of phenazine antibiotic synthesis by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Third Int. Symp. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact.* Mc Gill Univ. Montreal. Canada.

- Thomashow, L.S. y Weller, D.M. (1987). Role of a phenazine antibiotic in disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathology*. **77**, 1724.
- Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bonsall, R.F. y Pierson III, L.S. (1990). Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by Fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *App. Environ. Microbiol.* **56**, 908912.
- Totsuka y Usui (1986). Separation of the endo- β -(1,3)-D-glucanase from *Rhizoctonia solani*. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 543-550.
- Tracey, M.V. (1954). Chitin. En: *Modern Methods of Plant Analysis* II. Eds. K. Paech and M.V. Tracey Springer-Verlag. Berlin., pp 264-274.
- Trevelyan, W.E. y Harrison, J.S. (1952). Studies on yeast metabolism. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.* **50**, 298-303.
- Trinci A.P.J. y Righelato R.C. (1970). Changes in constituents and ultrastructure of hyphal compartments during autolysis of glucose starved *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.* **60**, 239-249.
- Villa, T.G., Notario, V., Benítez, T. y Villanueva, J.R. (1976). Purification of an exo 1,3- β -glucanase from *Candida utilis*. *Can. J. Biochem.* **54**, 927-934.
- Villa, T.G., Notario, V. y Villanueva, J.R. (1986). Chemical and enzymatic analyses of *Pichia polymorpha* cell walls. *Can. J. Microbiol.* **26**, 169-174.
- Villanueva, J.R. y García-Acha, I.G. (1971). Production and use of fungal protoplasts. En: *Methods in Microbiology*. C. Booth (Ed.). Academic Press, Inc. London. Vol 4. pp 666-718.
- Vögeli, V, Meins, F. y Boller, T. (1988). Co-ordinated regulation of chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Planta*. **174**, 364-372.
- Wang, M.C. y Bartnicki-García, S. (1970). Structure and composition of the walls of the yeast from of *Verticillium albo-atrum*. *J. Gen. Microbiol.* **64**, 51-54.
- Wessels, J.G.H. y Sietsma, J.H. (1979). Wall structure and growth in *Schizophyllum commune*. En: *Fungal walls and hyphal growth*. Eds. J.H. Burnett y A.P.J. Trinci. Cambridge University Press. Cambridge. pp 27-48.
- Wessels, J.G.H. y Sietsma, J.H. (1981). Fungal cell walls: A survey. En: *Plant Carbohydrates II. Extracellular carbohydrates. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*. Eds. W. Tanner y F.A. Loewus. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. Vol 13B, pp 352-394.
- Wessels, J.G.H. (1994). Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Ann. Rev. Phytopathol.* **32**, 413-437.
- Zehr, E.I. (1989). Reflections in innovation in plant disease control. *Plant Dis.* **73**, 372.