

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

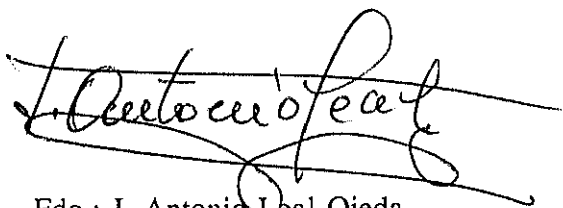
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

POLISACARIDOS DE *Talaromyces*: SU APLICACION
EN QUIMIOTAXONOMIA

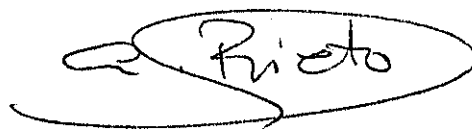
Tesis presentada por Alicia Prieto Orzanco,
Licenciada en Ciencias Biológicas, para optar al
grado de Doctor.

Madrid, Mayo de 1992.

Vº Bº del Director

A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Antonio Leal Ojeda", written in a cursive style.

Fdo.: J. Antonio Leal Ojeda

A handwritten signature in black ink, appearing to read "A. Prieto", written in a cursive style and enclosed within a large, hand-drawn oval.

17931

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



* 5 3 0 9 5 7 0 4 8 8 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

POLISACARIDOS DE *Talaromyces*: SU APLICACION

EN QUIMIOTAXONOMIA

Alicia Prieto Orzanco

Madrid, 1992

JUAN ANTONIO LEAL OJEDA, Doctor en Farmacia,
Ph. D. por la Universidad de Hull (Inglaterra),
Investigador Científico del C.S.I.C.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral ha sido realizada bajo su
dirección en la Unidad Estructural de Microbiología
Aplicada del Centro de Investigaciones Biológicas del
C.S.I.C. de Madrid.

A Miguel. A mi hijo.

Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la finalización de este trabajo y en particular a las siguientes personas:

Al Dr. Juan Antonio Leal Ojeda, director de este trabajo, por sus constantes enseñanzas y consejos y por el estímulo, la dedicación y la ayuda humana que siempre he recibido de él.

Al Profesor José Martínez Peinado por haber aceptado ser ponente de esa Tesis.

A la Dra. Reyes por su asesoramiento en la purificación de proteínas y su contínuo apoyo y a todos los miembros de su laboratorio, especialmente a los Dres. Carlos Alfonso y M^a Jesús Martínez, por su colaboración.

Al Dr. Manuel Bernabé por su valiosa contribución en los análisis de RMN.

A mis compañeros de laboratorio, Dra. Carmen Guerrero, Nuria A. Moreno, Jesús López y en especial a la Dra. Begoña Gómez-Miranda, por ayudarme y darme ánimo en todo momento.

A la Dra. Pilar Rupérez Antón que me inició en la técnica del análisis de metilación de carbohidratos.

A las Dras. Pilar Alonso e Inmaculada Giménez por su generosidad al brindarme su apoyo y desinteresada colaboración.

Al Dr. Angel T. Martínez por sus consejos.

A Aurelio Hurtado y José Blanco por la realización de gráficos y fotografías.

Al Centro de Investigaciones Biológicas por las facilidades dadas para realizar este trabajo.

Y por último, agradecer a mi familia su paciencia y ayuda incondicional.

INDICE

VIII

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y METODOS	19
1.- MICROORGANISMOS	20
2.- MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS	21
3.- MEDIO DE CULTIVO	21
4.- OBTENCION DE PAREDES CELULARES	21
5.- FRACCIONAMIENTO DE LAS PAREDES CELULARES	23
6.- SEPARACION DE POLISACARIDOS DE LA FIS. ESTIMACION DE SUS PESOS MOLECULARES	24
7.- ANALISIS QUIMICO	27
7.1.- Valoración de carbohidratos neutros totales	27
7.2.- Identificación de monómeros	27
7.2.1.- Hidrólisis ácidas	27
7.2.2.- Derivatización	27
7.2.3.- Cromatografía gas-líquido	28
8.- ANALISIS ESTRUCTURAL	29
8.1.- Espectrofotometría de infrarrojos	29
8.2.- Oxidación con periodato sódico y degradación de Smith	29
8.3.- Análisis de metilación	30
8.3.1.- Espectros infrarrojo	32
8.3.2.- Hidrólisis de los polisacáridos metilados	32
8.4.- Resonancia magnética nuclear	33

IX

9.- OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO DE *Penicillium oxalicum*.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD

GALACTANASA	34
9.1.- Valoración de actividades enzimáticas	35
9.1.1.- Sustratos empleados	35
9.1.2.- Mezcla de reacción	36
9.1.3.- Procedimiento de valoración	36
9.2.- Purificación de la enzima	37
9.2.1.- Cromatografía en columna	38
9.2.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.	39
9.3.- Determinación del punto isoeléctrico	39
9.4.- Determinación de carbohidratos en la proteína	39
RESULTADOS	41
1.- CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS Y OBTENCION DE PAREDES CELULARES	42
2.- OBTENCION DE LA FRACCION F1	43
3.- FRACCIONAMIENTO DE LA F1	44
4.- CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES SOLUBLES EN AGUA ...	45
4.1.- Carbohidratos neutros totales	45
4.2.- Análisis químico	45
4.3.- Análisis estructural	46
4.3.1.- Espectroscopía infrarroja	46

X

4.3.2.- Degradación de Smith de los polisacáridos	48
4.3.3.- Análisis de metilación de las fracciones	51
4.3.4.- Resonancia magnética nuclear	56
5.- SEPARACION DE DISTINTOS POLISACARIDOS DE LAS FRACCIONES F1S. ESTIMACION DE SUS PESOS MOLECULARES	63
6.- ANALISIS ESTRUCTURAL DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS	68
6.1.- <i>Talaromyces stipitatus</i>	68
6.2.- <i>Talaromyces wortmannii</i>	71
6.3.- <i>Talaromyces helicus</i>	71
6.4.- <i>Talaromyces rotundus</i>	75
6.5.- <i>Talaromyces luteus</i>	79
6.6.- <i>Talaromyces bacillisporus</i>	81
7.- CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES INSOLUBLES EN AGUA (FII)	84
7.1.- Carbohidratos neutros totales	84
7.2.- Análisis químico	85
7.3.- Análisis estructural	86
7.3.1.- Espectroscopía infrarroja	86
7.3.2.- Degradación de Smith de los polisacáridos	86
7.3.3.- Resonancia magnética nuclear	88
8.- COMPOSICION DE LA F1 DE GENEROS RELACIONADOS CON <i>Talaromyces</i>	92

9.- OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO DE *Penicillium oxalicum*.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD

GALACTANASA	96
9.1.- Purificación de la actividad galactanasa	96
9.2.- Caracterización físico-química y cinética de la	
enzima β -(1→5)-galactanasa	100
9.2.1.- pH óptimo y estabilidad al pH	100
9.2.2.- Punto isoelectrico	101
9.2.3.- Peso molecular	101
9.2.4.- Análisis de azúcares en la enzima	101
9.2.5.- Determinación de la constante de	
Michaelis-Menten	101
9.2.6.- Efecto de distintos iones	102
9.2.7.- Especificidad de sustrato	104
9.2.8.- Linealidad de la velocidad de reacción con el tiempo de	
incubación y con la concentración de la enzima	104
9.2.9.- Modo de acción de la enzima	104
DISCUSION	106
CONCLUSIONES	130
BIBLIOGRAFIA	133

INTRODUCCION

Los hongos son organismos eucarióticos, heterótrofos y carentes de clorofila. Este amplísimo filum tiene representantes prácticamente en todos los hábitats de la Tierra y muchos hongos son de gran importancia médica o económica para el hombre. Dentro de este inmenso grupo de microorganismos, los **hongos filamentosos** se caracterizan por presentar en su estado vegetativo una serie de filamentos microscópicos más o menos alargados y tabicados o no. Estos filamentos reciben individualmente el nombre de **hifas** y en conjunto el de **micelio**.

El estudio sistemático de los hongos comenzó hace apenas 250 años, pero este grupo de organismos es conocido por el hombre desde hace milenios. Su ubicuidad y el elevado número de especies que abarcan les hace desempeñar una misión primordial en los cambios, lentos pero constantes, que ocurren en nuestro entorno.

En la Naturaleza, los hongos juegan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica y son responsables junto a las bacterias del reciclaje del nitrógeno, carbono y otros elementos vitales. Entre ellos hay multitud de parásitos de plantas y animales. Por otra parte, numerosas especies de hongos poseen un gran valor económico, debido a la enorme variedad de metabolitos que pueden sintetizar: alcoholes, antibióticos, enzimas, ácidos orgánicos, polisacáridos, etc. Por esta razón se utilizan en gran número de fermentaciones industriales y tienen en la actualidad gran importancia en Biología experimental puesto que muchos de los resultados obtenidos con ellos pueden extrapolarse a sistemas superiores.

El principal componente estructural de estos microorganismos es la **pared celular**. Esta es una envoltura que rodea al protoplasto y confiere a la célula su forma

característica. La membrana plasmática, que es la barrera osmótica del microorganismo, es incapaz de soportar las variaciones osmóticas del medio y se rompería con facilidad si no tuviera la protección que representa una pared celular rígida. Así pues, podemos decir que la pared celular constituye una cubierta rígida que determina la forma de la célula, protege al citoplasma de las variaciones osmóticas del medio y proporciona protección frente a factores ambientales adversos (Mahadevan y Tatum, 1965; Villanueva, 1966). Podríamos considerar la pared celular fúngica como el producto de evolución del glicocálix, o capa de polisacáridos (solos o asociados a proteínas) que refuerza y confiere resistencia a las membranas plasmáticas, hacia un verdadero exoesqueleto.

La pared celular no puede considerarse como una estructura inerte ya que participa en fenómenos activos de superficie como permeabilidad, resistencia a antibióticos, respuesta inmune e interacción entre células. A este carácter dinámico se suma el hecho de que en ciertas circunstancias ocurren en ella fenómenos de síntesis e hidrólisis del material que la constituye. La hifa necesita que los polímeros que forman su pared sean modificados durante su crecimiento apical, ramificación y germinación.

Existen marcadas diferencias químicas y de estructura fina entre la pared celular de una célula procariótica y la de una eucariótica. Estas últimas deben la rigidez de su pared a las microfibrillas de polisacáridos, de las que carecen los procariotas. Dichas microfibrillas están formadas por la asociación de largas cadenas de azúcares (actuando a modo de varillas rígidas) y se encuentran cementadas por materiales amorfos (lípidos, proteínas y distintos tipos de polisacáridos) que a menudo pueden separarse químicamente sin alterar la forma de la pared. Por lo tanto, la pared celular eucariótica se puede comparar

al hormigón armado, que está compuesto de un armazón de varillas de acero y una matriz de cemento.

Entrando en mayor detalle, la pared fúngica está compuesta por glúcidos, proteínas, lípidos, pigmentos y sales minerales en orden decreciente de abundancia. Los azúcares constituyen, por sí solos, más del 80% del peso seco de la pared y de ellos es la glucosa la que se encuentra en mayor proporción, acompañada de glucosamina, galactosa y manosa. Pueden encontrarse también cantidades variables de otros hidratos de carbono menos abundantes y restringidos a determinados grupos taxonómicos, como galactosamina, ácido glucurónico, ramnosa, xilosa, arabinosa, ribosa y fucosa.

Los monosacáridos se hallan asociados en la pared en forma de polisacáridos, que pueden ser de varios tipos: homopolisacáridos, heteropolisacáridos y glicoproteínas. La naturaleza química de los polisacáridos de la pared o las combinaciones de dichos polímeros varía según el grupo taxonómico de los diferentes hongos (Bartnicki-García, 1968). Por otra parte, analizando la ultraestructura de la pared (Bracker, 1967; Troy y Koffler, 1969; Hunsley y Burnett, 1970; Burnett, 1976) se han encontrado también analogías, como por ejemplo la existencia de dos capas, una interna que contiene quitina o celulosa embebida en otros polímeros y una capa externa. La capa externa es soluble en álcali diluido, quedando la capa interna como un residuo insoluble. Existen técnicas de fraccionamiento que permiten separar los distintos polisacáridos de la pared.

Uno de los métodos de fraccionamiento más empleados es el descrito por Mahadevan y Tatum (1965) o alguna de sus variantes. Basándose en esta técnica, Sietsma y Wessels describieron en 1977 los principales polímeros presentes en la pared celular de

Schizophyllum commune. Estos mismos autores (Wessels y Sietsma, 1981) realizaron una clasificación general de los polímeros más importantes que se encuentran en las paredes celulares de los hongos:

- **R-glucano o β -(1 \rightarrow 3) Glucano.** Posiblemente, es el tipo de polímero más ampliamente distribuido en las paredes celulares fúngicas, y cuando está presente representa entre un 15 y un 30% de los polisacáridos de la pared. Es insoluble en álcali y parece estar íntimamente ligado a la quitina. Al hidrolizarlo con β -(1 \rightarrow 3) glucanasas purificadas se libera gentobiosa, un disacárido β -(1 \rightarrow 6). Este hecho pone de manifiesto la presencia de este tipo de enlaces en el R-glucano. Sonnenberg y col. demostraron en 1985 en las paredes celulares de *Schizophyllum commune* que la fracción conocida como R-glucano consta en realidad de dos polímeros diferentes. Tras eliminar enzimáticamente la quitina, consiguieron solubilizar el β -glucano, obteniendo una porción soluble en agua que contenía enlaces β -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 6), y una fracción soluble en álcali formada exclusivamente por enlaces β -(1 \rightarrow 3).

- **S-glucano o α -(1 \rightarrow 3) glucano.** Es un polímero que se extrae con álcalis a temperatura ambiente y representa entre el 15 y el 25% de los polisacáridos de la pared. Este glucano es uno de los componentes mayoritarios de las paredes celulares de Ascomycetos y Basidiomicetos (Kreger, 1954; Bacon y col., 1968; Bull, 1970; Wessels y col., 1972) y en algunas especies se ha observado que forma parte de una de sus capas más externas (Hunsley y Burnett, 1970; Wessels y col., 1972). Los diferentes α -(1 \rightarrow 3)-glucanos estudiados contienen proporciones variables de enlaces α -(1 \rightarrow 4). En las paredes celulares de varias especies de Basidiomicetos se ha descrito que estos glucanos están asociados a

xilomananos (Ralph y Bender, 1965; Bottom y Siehr, 1979; Kamada y Takemaru, 1983).

- **Quitina.** Es un polímero lineal compuesto por moléculas de N-acetilglucosamina enlazada en β -(1 \rightarrow 4) y está muy ampliamente distribuido en las paredes celulares fúngicas. Ha sido encontrada en todos los grupos taxonómicos, excepto en Oomicetos, que contienen celulosa, y en Zigomicetos, que tienen quitosano (Bartnicki-García y Reyes, 1968).

La proporción de quitina es variable, desde el 5% detectado en *Schizophyllum* (Wessels, 1965) hasta el 60% de *Sclerotium* (Bloomfield y Alexander, 1967).

- **Polímeros de galactosamina.** Se han detectado pequeñas cantidades de galactosamina en la pared de varios Ascomicetos (Mahadevan y Tatum, 1965; Applegarth y Bozoian, 1969; Bull, 1970; Katz y Rosenberger, 1970). Sin embargo, hay que señalar que con los antiguos métodos la detección de galactosamina sólo era fácil y precisa si la fracción analizada no contenía glucosamina. En al menos dos hongos, *Helminthosporium sativum* y *Aspergillus nidulans* se ha encontrado galactosamina como componente principal de la pared (Applegarth y Bozoian, 1969; Bull, 1970). Mc Cormick y col. (1970) aislaron de la pared de las esporas y esférulas de *Physarum polycephalum* un polisacárido compuesto aproximadamente de un 80% de galactosamina; estos autores concluyeron que si ésto es una característica general de los Mixomicetos o de algunos grupos de ellos, los situaría en un grupo taxonómico único, ya que los diferenciaría de los hongos que contienen polímeros tipo glucosamina como el principal componente de la pared. También los diferenciaría de los Mixomicetos que contienen celulosa y glucógeno como constituyentes de la pared (Ward y Wright, 1965). Las paredes de las esférulas de *Physarum polycephalum* fueron reexaminadas por Farr y col. (1977), quienes encontraron

un 88% de galactosamina anhidra como principal componente. Los estudios de este polisacárido indicaron que se trataba de un α -galactosaminoglicano de cadena larga unido exclusivamente por enlaces (1 \rightarrow 4).

- **Otros polisacáridos.** Al hidrolizar paredes celulares de diferentes especies se han encontrado otros cuatro azúcares en cantidades menores. Los Ascomicetos tienen manosa y galactosa, los Basidiomicetos manosa, fucosa y xilosa y los Zigomicetos manosa, fucosa y galactosa (Bartnicki-García, 1968). La información acerca de los polímeros que contienen estos monosacáridos es muy limitada. En Ascomicetos se sugirió que galactosa y manosa están en un heteropolímero con glucosa (Ruiz-Herrera, 1967; Zonneveld, 1971). En las paredes de varias especies de *Penicillium*, *Talaromyces* y *Eupenicillium* (Leal y col., 1984; Gómez-Miranda y col., 1984 y 1986; Rupérez y Leal, 1986; Rupérez y col., 1986) se ha encontrado un β -glucogalactano soluble en álcali. Rupérez y Leal (1987) describen, entre otros polímeros aislados de la pared de *Penicillium erythromellis*, dos glucogalactanos con diferentes proporciones de glucopiranososa unida en (1 \rightarrow 4) y galactofuranosa enlazada en (1 \rightarrow 2). En *Gliocladium viride* también se han descrito galactomanoglucanos extraídos de la pared con NaOH y posteriormente solubilizados con agua (Gómez-Miranda y col., 1990).

- **Celulosa.** En contraste con su ubicuidad en células vegetales, el β -(1 \rightarrow 4)-D-glucano se encuentra sólo en las paredes de hongos Oomicetos (Bartnicki-García, 1968; Gorin y Spencer, 1968) junto con una gran cantidad de R-glucano.

- **Homo- y hetero-glucuronanos.** Los polisacáridos ácidos son uno de los constituyentes principales de los Zigomicetos, en los cuales también hay con frecuencia polímeros que contienen un monómero catiónico: glucosamina.

- **Proteínas.** La existencia de proteínas en la pared ha sido durante mucho tiempo objeto de controversia, ya que a menudo es difícil distinguir si éstas son un componente real de la pared o una contaminación citoplasmática. En la actualidad ha quedado claramente establecido que las glicoproteínas forman parte estructural de la pared. La mayoría de ellas pueden extraerse con álcali diluido, y una parte de los aminoácidos resiste el tratamiento. Este material suele estar asociado al complejo glucano-quitina y en *Schizophillum commune* se ha demostrado que estos péptidos tienen una importante misión en el enlace entre el glucano y la quitina (Sietsma y Wessels, 1979).

No cabe duda de que los avances realizados en los últimos años en la química de carbohidratos complejos se deben, en gran parte, al desarrollo de técnicas e instrumentación sofisticadas. La elucidación de la estructura de un polisacárido es, en general, una tarea laboriosa y su secuenciación es considerablemente más difícil que la de proteínas o ácidos nucleicos, ya que se debe establecer no sólo la identidad y secuencia de los monómeros, sino también la forma del anillo, la posición del enlace y la configuración anomérica (Lee y Gray, 1988). Es importante destacar que la diversidad de especies sacarídicas es bastante mayor que la de otras sustancias. Los monosacáridos comprenden a las aldosas, cetosas, ácidos urónicos, aminoazúcares, ácidos aldáricos, etc. Cada clase está subdividida en varias subclases según el número de átomos de carbono y además estas moléculas presentan varios isómeros debido a diferencias de configuración.

El primer paso para determinar la estructura de un polisacárido purificado es la identificación de los monómeros que lo forman. Para ello es necesario hidrolizar el polisacárido. Se suele determinar experimentalmente cuál es el tipo de ácido más

apropiado, su concentración y el tiempo de hidrólisis, ya que cada tipo de polímero tiene unas condiciones óptimas para la liberación de monómeros. Los aminoazúcares suelen determinarse tras hidrólisis con HCl 2 M, 4 M o 6 M bien directamente en un analizador automático de aminoácidos o bien por cromatografía gas-líquido (CGL). En general, los polímeros que contienen ácidos urónicos o hexosaminas son muy difíciles de hidrolizar, y raras veces es posible la liberación completa de sus monómeros. Los azúcares neutros se hidrolizan normalmente con H₂SO₄ de distintas concentraciones, y también con HCl, ácido fórmico o ácido trifluoroacético. Los polisacáridos que contienen furanosas y/o cetosas se hidrolizan en condiciones suaves ya que son sumamente lábiles.

Otra forma de hidrolizar los polisacáridos consiste en la rotura enzimática de sus componentes. Una de las fuentes de estas enzimas es el propio hongo. Estos microorganismos producen enzimas líticas capaces de llevar a cabo su propia degradación, y pueden proceder de las ya existentes en el micelio o ser sintetizadas durante el proceso degradativo (Reyes y col., 1981). Pérez-Leblic y col. (1982a y 1982b) confirmaron la lisis de la pared celular fúngica con precipitados enzimáticos del propio hongo. Estos productos presentan un interés añadido al propio estudio de los procesos autolíticos de los hongos: su utilización para conseguir hidrólisis totales o parciales de polímeros de la pared. Al ser este tipo de hidrólisis muy específica para un determinado monómero, la utilización de enzimas puede ser un factor clave para el conocimiento de la estructura de un polisacárido.

La identificación y cuantificación de los monosacáridos liberados se lleva a cabo a continuación ya sea directamente por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o, tras convertirlos en derivados volátiles, por cromatografía gas-líquido. Los derivados más

comúnmente utilizados son dos: trimetilsilil derivados y acetatos de alditol.

Una vez conocida la identidad y proporciones de los monómeros que forman la cadena, la siguiente cuestión es saber cómo están enlazados en el polímero.

La técnica del análisis de metilación se emplea rutinariamente para la caracterización estructural de carbohidratos complejos, como medio de establecer los tipos de enlace de los monosacáridos constituyentes. Este método suministra información acerca de las unidades estructurales presentes en los polímeros, pero no determina la secuencia ni la naturaleza anomérica de los enlaces. El análisis supone la conversión de todos los grupos hidroxilo libres del material original en grupos metoxilo, seguida de la rotura hidrolítica de los enlaces glicosídicos y la identificación de los monómeros formados. Se han descrito muchos métodos de metilación desde 1903 en que Purdie e Irvine propusieron el primero, pero la mayor parte de ellos conducen a una metilación incompleta de los polisacáridos. El procedimiento de Hakomori (1964), que utiliza hidruro sódico y dimetil sulfóxido, representa en este aspecto un notable progreso, al conseguir un reactivo nucleofílico más potente que los previamente utilizados.

El análisis de los monómeros formados en la hidrólisis se efectúa por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) de sus correspondientes acetatos de alditol parcialmente metilados (Jansson y col., 1976).

En cuanto a la secuenciación, se han descrito varios métodos de degradación parcial que conducen a la determinación de la estructura primaria de una cadena polisacárida. Uno de los primeros métodos de degradación consiste en la hidrólisis ácida parcial de un carbohidrato complejo para dar fragmentos de menor tamaño que se purifican por HPLC

o por filtración en gel. Los oligosacáridos se hidrolizan, se caracterizan por GC-MS y, solapándolos, se llega a recomponer el polisacárido original (McNeil y col., 1982). Otros métodos para producir fragmentos oligosacarídicos son, por ejemplo, la oxidación con periodato, oxidación con trióxido de cromo, acetólisis o la ruptura enzimática del polisacárido nativo.

Un método muy potente para la secuenciación y análisis de carbohidratos complejos es la resonancia magnética nuclear (RMN). Sus características la hacen idónea para el estudio de polisacáridos, ya que es una técnica no destructiva y por tanto, se puede analizar un polímero sin modificarlo o degradarlo, recuperando el material intacto. En la espectroscopía de ^1H -RMN las señales del protón anomérico se separan bien de las señales producidas por el resto de los protones. Esto simplifica mucho la determinación de las diferentes clases de residuos en el polisacárido, y permite estimar sus proporciones relativas. También resulta más fácil obtener a partir de estas señales el desplazamiento químico y los parámetros de acoplamiento necesarios para asignar configuraciones anoméricas por RMN. Otra ventaja es que la cantidad de muestra necesaria para realizar estas determinaciones en un espectro de protón es mucho menor que la que se requiere para un espectro de carbono. Por otra parte, tal y como Allerhand (1975) apuntó, la cantidad de información que un espectro de protón puede suministrar decrece con el tamaño y complejidad de la molécula. En el caso de los polisacáridos, se produce un marcado ensanchamiento de las señales, de modo que sólo se aprecian resonancias individuales en la región del H-1. No obstante, estas señales de la región H-1 se han utilizado como "huella digital" (fingerprint) para la identificación de algunos mananos

(Gorin y col., 1968).

La ^{13}C -RMN suministra abundante información acerca de las propiedades químicas y físico-químicas de los polisacáridos, pudiendo también emplearse como criterio de pureza de preparaciones polisacarídicas. Una de sus aplicaciones más interesantes está en la elucidación del orden estructural en un polisacárido. Es un método excelente para determinar el grado de regularidad de secuencias en polisacáridos lineales con distintos tipos de enlaces y/o de residuos de azúcares (Gorin, 1980). No obstante, la solubilidad de los polímeros en los disolventes que se emplean para realizar los espectros (agua deuterada o NaOH deuterada) puede ser una limitación para el análisis de algunas sustancias.

En todos los microorganismos se pueden encontrar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos y otros componentes imprescindibles para su desarrollo. Sin embargo, la estructura fina de estos componentes presenta diferencias de naturaleza química muy significativas. Estas diferencias suelen ser taxón-específicas y por lo tanto pueden ser utilizadas para la clasificación e identificación de microorganismos (Kroppenstedt, 1988). La sistemática basada en marcadores químicos recibe el nombre de **quimiotaxonomía** o quimiosistemática.

Como se ha dicho con anterioridad, el rápido desarrollo de las técnicas cromatográficas y de la instrumentación en general durante las dos últimas décadas hace posible la separación e identificación de mezclas complicadas de moléculas pertenecientes a las células microbianas. Algunos de estos componentes se han utilizado en quimiotaxonomía. Entre ellos se encuentran los polisacáridos de paredes celulares y concretamente en hongos su análisis tiene un interés superior al estudio de otros

componentes celulares, porque ofrece claves sencillas para elucidar la posición taxonómica de los diferentes taxones. La significación filogenética de la distribución de la quitina puede ponerse de manifiesto, por ejemplo, en la distinción entre Oomicetos y Zigomicetos (Bartnicki-García, 1970).

Los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio se centran en el género *Penicillium* y sus estados teleomórficos: *Talaromyces* y *Eupenicillium*. Los datos referentes al concepto de especie en *Penicillium* son abundantes. Los *Penicillium* son muy ubicuos y pueden crecer en una gran variedad de sustratos orgánicos. Varias especies son importantes en la producción de alimentos y en fermentaciones industriales. El amplio papel desempeñado por los *Penicillium* en la naturaleza, especialmente sus efectos toxinogénico y destructivo, hacen que la exactitud de su diagnóstico sea un factor crítico. La taxonomía del género es muy compleja. Generalmente se acepta que las características morfológicas son de importancia primaria para la diferenciación de especies de estos géneros. La Figura 1 muestra los diferentes caracteres morfológicos de *Talaromyces flavus*. Dichos rasgos morfológicos se encuentran, con pequeñas variaciones, en todos los hongos peniciloides y se utilizan para su clasificación. En sistemas biológicos donde no existe un mecanismo formal para el intercambio genético (y esto incluye claramente géneros como *Aspergillus*, *Penicillium* y sus teleomorfos homotálicos), se puede prever que las especies aisladas de la naturaleza formen una sucesión de caracteres morfológicos y fisiológicos. El taxónomo trata de agrupar estos caracteres en grupos lógicos de géneros y especies. Los límites de estos agrupamientos son, a menudo, difíciles de definir y en muchos casos las

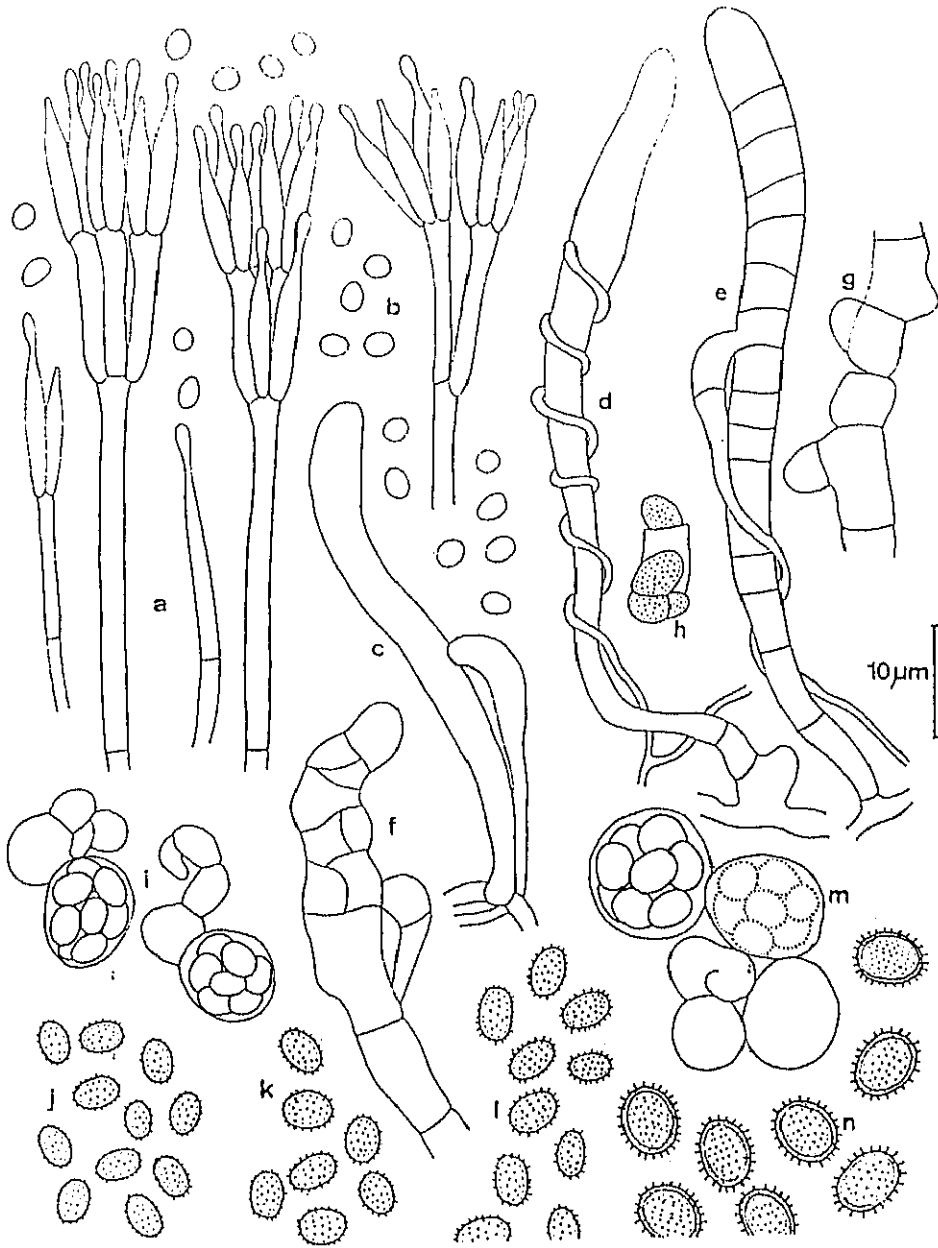


Figura 1.- *Talaromyces flavus* var. *flavus*. a) Diferentes tipos de estructuras conidiógenas; b) Conidios; c-d) Desarrollo de ascogonios y anteridios; e) Fusión entre los dos gametangios y septación del ascogonio; f) Desarrollo de septos; g-h) Producción de ramas de las células ascogoniales, que se desarrollarán a hifas ascógenas; i) Cadenas de ascas; j-l) Ascosporas de diferentes aislamientos. *Talaromyces flavus* var. *macrosporus*, m) Cadenas de ascas; n) Ascosporas.

distinciones entre especies, e incluso géneros, dependen de un pequeño número de criterios taxonómicos y hasta de un solo carácter. Todos los *Penicillium* producen colonias de crecimiento relativamente lento, generalmente con abundante esporulación. Los conidios suelen ser gris o verde-azulados, aunque Raper y Thom (1949) o Pitt (1979) no consideran esto como un criterio absoluto. Las estructuras conidiales están muy organizadas, desarrollándose según varios patrones muy bien definidos y las fiálides se producen sucesivamente. Pero la variabilidad del aspecto de una colonia es muy elevada, incluso en una única especie. Estas especies no pueden ser identificadas con precisión sin considerar otras propiedades morfológicas y fisiológicas (Fassatiová, 1985), de manera que el género es taxonómicamente difícil incluso para los expertos. Sus límites no están bien definidos y es difícil separar de forma efectiva a *Penicillium* de varios géneros relacionados. La confusión es aún más marcada si consideramos que *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Geosmithia* y *Merimbla* producen teleomorfos clasificados en *Talaromyces*. Pitt y Hocking describieron en 1985 cuatro nuevas especies que se sitúan en los límites de estos géneros. En su trabajo, incluyen en *Penicillium* las especies *P. sabulosum* y *P. oblatum*, aunque señalan que por sus características podrían representar un nuevo género.

La composición de la pared celular ha sido investigada en varias especies del género *Penicillium* (Hamilton y Knight, 1962; Applegarth, 1967; Applegarth y Bozoian, 1967; Grisaro y col., 1968; Rizza y Kornfeld, 1969; Troy y Koffler, 1969; Gander y col., 1974; Unger y Hayes, 1975; Gander y Fang, 1976; Matsunaga y col., 1981) pero siempre refiriéndose a especies aisladas, sin ningún propósito taxonómico ni comparativo.

Un estudio realizado por Leal y col. (1984) sobre fracciones de la pared de ocho

especies de *Penicillium* puso de manifiesto la existencia de al menos dos tipos de pared. La principal diferencia se encontró en una fracción soluble en NaOH 1 M a 20°C, que en uno de los grupos estaba constituida por un α -glucano y en el otro por un β -polisacárido rico en galactofuranosa. Gómez-Miranda y col. (1986) y Rupérez y col. (1986) estudiaron la misma fracción, pero en los géneros *Eupenicillium* y *Talaromyces* respectivamente, observando que, al igual que en *Penicillium*, unas especies contenían un α -glucano y otras un glucogalactano con enlaces β . El análisis de varios aislamientos de las especies tipo, *E. crustaceum* y *T. flavus*, por Gómez-Miranda y col. (1988) llevó finalmente a los autores a la conclusión de que las propiedades físicas y químicas de la fracción soluble en álcali pueden ser utilizadas como marcadores quimiotaxonómicos y ser de utilidad en la reorganización de estos géneros. Igualmente, proponen el uso de la composición de la pared, y en especial de los polisacáridos de esta fracción, para predecir la probable relación de especies de *Penicillium* (forma imperfecta) con sus estados perfectos, *Talaromyces* o *Eupenicillium*.

OBJETIVOS

Las investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio en los últimos años se han centrado en el estudio de la pared celular de hongos filamentosos. El análisis de los resultados obtenidos muestra la posible utilidad de los polisacáridos de la fracción soluble en NaOH como marcadores quimiotaxonómicos.

En este trabajo se intentará caracterizar la fracción polisacáridica de la pared celular soluble en NaOH a temperatura ambiente en algunas especies de los géneros *Talaromyces*, *Eupenicillium*, *Penicillium* y *Aspergillus*. Para ello se aislarán, purificarán y caracterizarán química y estructuralmente diferentes polisacáridos con el fin de:

a) Encontrar polisacáridos característicos para cada uno de estos géneros que puedan utilizarse como marcadores quimiotaxonómicos. Esto permitiría una mejor ordenación sistemática de estos microorganismos y el establecimiento de relaciones filogenéticas entre ellos.

b) Si se encontraran polisacáridos cuya composición y estructura no se hubiese descrito previamente, utilizarlos como sustrato para aislar y caracterizar nuevas actividades enzimáticas a partir de los medios de cultivo del hongo en fase de autólisis.

MATERIALES Y METODOS

1. MICROORGANISMOS.

El presente estudio se realizó con las especies que se detallan a continuación:

- Talaromyces stipitatus* (Thom) C.R. Benjamin CBS 375.48
- Talaromyces wortmannii* (Klöker) C.R. Benjamin CBS 235.38
- Talaromyces helicus* (Raper y Fennell) var. *helicus* C.R. Benjamin CBS 335.48.
- Talaromyces rotundus* (Raper y Fennell) CBS 369.48
- Talaromyces luteus* (Zukal) C.R. Benjamin CBS 348.51
- Talaromyces bacillisporus* (Swift) C.R. Benjamin CBS 136.45
- Eupenicillium crustaceum* Ludwig CBS 635.70
- Penicillium brevi-compactum* Dierckx CBS 168.44
- Penicillium decumbens* Thom CBS 258.33
- Penicillium oxalicum* (Currie & Thom) 1331 C.I.B.
- Aspergillus flavipes* (Bain & Sartory) Thom & Church CBS 129.61
- Aspergillus ochraceus* Wilhelm CBS 385.67

2. MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.

Los microorganismos se mantuvieron a 25°C en tubos inclinados con el siguiente medio:

Bacto-patata-dextrosa-agar (Difco) 39 g/l

Extracto de levadura 1 g/l

pH final 6,5.

3. MEDIO DE CULTIVO.

Se utilizó un medio base sintético descrito por Leal y col. (1984). Como inóculo se utilizó 1 ml de una suspensión de esporas (10^5 esporas) de cada uno de los microorganismos, obtenida a partir del cultivo de 15 días en medio de mantenimiento para inocular matraces de 2 l conteniendo 1 l de medio. Los cultivos se mantuvieron a $27\pm 1^\circ\text{C}$ y 120 rpm durante cinco días en un incubador orbital Gallekamp.

4. OBTENCION DE PAREDES CELULARES.

El método para la obtención de las paredes celulares fue el seguido por Prieto y col.

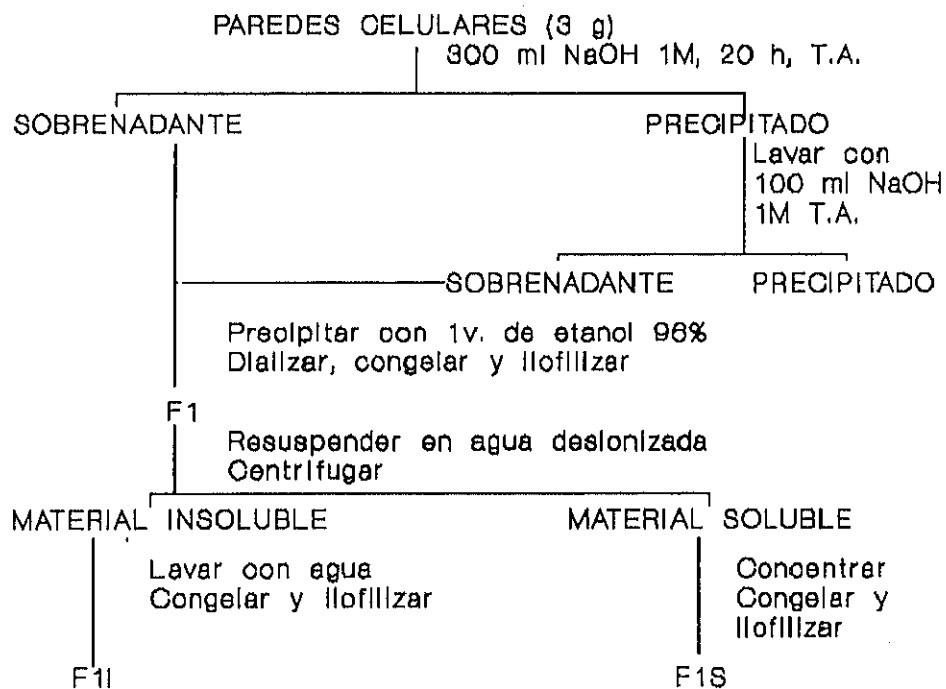
(1988). Después del período de incubación, se separó el micelio del medio de cultivo por filtración a través de tela y se lavó varias veces con agua destilada, desecándolo a 60°C en estufa de aireación. El micelio desecado se trituró en un homogeneizador Sorvall a la máxima velocidad y a continuación en un molino de bolas Pulverisette hasta dejarlo reducido a un polvo fino, con fragmentos de 5 a 15 µm. Al micelio pulverizado (30 g) se añadieron 500 ml de dodecil sulfato sódico al 1% en agua con un 0,02% de azida sódica para evitar la contaminación de la suspensión. Tras agitar durante 16 horas a temperatura ambiente se centrifugó, desechando el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en agua destilada, repitiéndose este proceso tres veces. Después de estos lavados se volvió a resuspender el sedimento en agua y se sometió a 3 períodos de sonicación de 3 minutos en un sonicador MSE modelo MK2, 150 W, a la máxima potencia con el fin de disgregar conglomerados de fragmentos de hifas y vaciarlas de restos de citoplasma. Las paredes deben quedar sueltas, sin formar grumos y en trozos de pequeño tamaño. Se lavaron varias veces con agua destilada hasta que en los sobrenadantes dejó de aparecer turbidez al centrifugar. La pureza de la preparación se comprobó por observación al microscopio de contraste de fases tiñendo con Azul de Coomasie. Una vez que las paredes estuvieron vacías de contenido, se deshidrataron lavándolas sucesivamente con alcohol del 50%, del 96% y acetona y se centrifugaron, dejándolas secar en estufa de aireación a 60°C hasta peso constante.

Las paredes celulares se pesaron y mantuvieron en un desecador para su posterior utilización.

5. FRACCIONAMIENTO DE LAS PAREDES CELULARES.

Las paredes celulares secas y pulverizadas se extrajeron con NaOH 1 M durante 20 horas, agitando a temperatura ambiente. La suspensión resultante se centrifugó separando el sobrenadante, que se reservó, y volviendo a resuspender el precipitado en NaOH 1 M con el fin de extraer todo el material soluble en estas condiciones. Se agitó la suspensión durante 2 horas a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente, juntando el sobrenadante con el de la extracción anterior. El material insoluble se desechó y los sobrenadantes se precipitaron con un volumen igual de etanol al 96%. El precipitado se recogió por centrifugación, se dializó para eliminar el NaOH y el alcohol, se concentró, congeló y liofilizó (Fracción F1).

Figura 2.- Obtención de la fracción F1 y aislamiento de polisacáridos.



Dicha fracción se resuspendió en agua destilada y se centrifugó, extrayendo así una parte soluble y una insoluble. El material insoluble se lavó varias veces con agua para extraer todo el material soluble. Los sobrenadantes que contenían el material soluble se juntaron y concentraron en rotavapor hasta un volumen adecuado, congelándolo. El material insoluble también se congeló y posteriormente ambos productos fueron liofilizados, constituyendo las fracciones **F1S** y **F1I** respectivamente.

6. SEPARACION DE DISTINTOS POLISACARIDOS DE LAS F1S.

ESTIMACION DE SUS PESOS MOLECULARES.

Se utilizó la filtración en geles de Sepharose CL para comprobar si las fracciones F1S previamente obtenidas estaban constituidas por un solo polisacárido o si eran una mezcla de varios y en su caso, separar los distintos polímeros que la formaban. La separación de los componentes de una mezcla mediante este método se basa exclusivamente en las diferencias de tamaño y forma de sus componentes.

Se utilizaron geles de Sepharose CL-2B, CL-4B y CL-6B, que retienen polisacáridos con pesos moleculares menores que $20 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^6$ y 10^6 Da respectivamente. Se emplearon como eluyentes agua, NaCl 0,9% en agua y NaOH 0,3 M. La homogeneidad del empaquetamiento y el calibrado de las columnas empleadas se realizó cargando en ellas una mezcla de azul dextrano (P_m medio= $2 \cdot 10^6$ Da), amarillo dextrano (P_m medio= $1 \cdot 10^5$ Da) y vitamina B₁₂ (P_m = 1355 Da).

Las mejores separaciones se obtuvieron en columnas de Sepharose CL-6B (40 cm x 2,6 cm) y NaOH 0,3 M.

Unos 100 mg de F1S se resuspendieron en 2 ml de NaOH 0,3 M, centrifugando en una centrífuga Microfuge durante 15 minutos a la máxima velocidad para eliminar precipitados. La disolución obtenida se cargó en la columna en dos veces. Se utilizó un flujo de eluyente de 21 ml.h⁻¹. Se recogieron fracciones de 2 ml, monitorizando rutinariamente su contenido en carbohidratos por el método del Fenol-Sulfúrico (Dubois y col., 1956). Las fracciones apropiadas se juntaron y concentraron, después se dializaron, congelaron y liofilizaron para su posterior análisis.

La confirmación de los resultados así obtenidos y la estimación de pesos moleculares se efectuó por HPLC, en un equipo de la casa Waters dotado de un controlador de bombas modelo 510, de un detector UV-visible modelo 440 y otro de índice de refracción modelo 410. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- Columna: Bio-Rad HPLC Gel Filtration Column Biogel TSK 40 (300 x 7,5 mm).
- Eluyente: Tampón PBS 10 mM con NaCl 0,308 M.
- Flujo: 0,75 ml.min⁻¹
- Detección por índice de refracción: n=64
- Detección UV: 230 nm.

Se prepararon disoluciones 1-10 µg.ml⁻¹ de las muestras en el tampón de elución, agitando y filtrando por filtros Millipore de 0,22 µ para eliminar cualquier resto insoluble. El volumen inyectado fue de 10 µl.

Los pesos moleculares aproximados se obtuvieron por comparación de los tiempos

de retención de los polisacáridos problema con los de distintos dextranos comerciales de peso molecular conocido. La recta de calibrado se representa en la Figura 3.

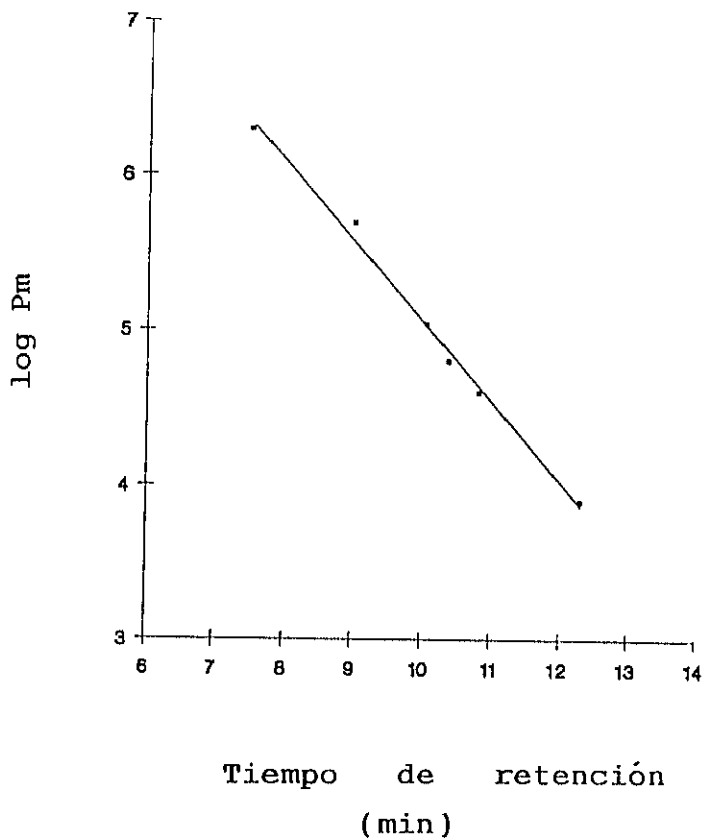


Figura 3.- Recta de calibrado de la columna Bio-Gel TSK 40, obtenida en las condiciones descritas en el texto con los siguientes dextranos comerciales: T-40, T-70, T-110, T-500, T-2000 y Dextran sulfato 8000.

7. ANALISIS QUIMICO.

7.1.- Valoración de carbohidratos neutros totales.

Se realizó según el método de la antrona descrito por Dreywood (1946), utilizando D-glucosa, D-galactosa y D-manosa como patrones.

7.2.- Identificación de monómeros.

7.2.1.- Hidrólisis ácidas.

Muestras de polisacáridos de entre 5 y 10 mg se hidrolizaron con 1 ml de H_2SO_4 de diferentes concentraciones a $100^\circ C$:

-Hidrólisis parcial con H_2SO_4 0,05 M durante 5 horas, que libera selectivamente las furanosas.

-Hidrólisis total con H_2SO_4 2 M durante 5 horas.

-Hidrólisis Saeman (Adams, 1965) para muestras que se hidrolizan con dificultad.

7.2.2.- Derivatización.

Los productos de la hidrólisis de los polisacáridos son sustancias no volátiles. Por ello fue necesario derivatizarlos para su identificación posterior por cromatografía gas-líquido. De entre los posibles derivados, se eligieron los acetatos de alditol por producir un único derivado de cada monosacárido, dando lugar a cromatogramas más simples.

Inmediatamente después de la hidrólisis se añadieron 1 mg de inositol como

estándar interno y 10 ml de agua y se neutralizó con carbonato de bario. Se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm y se recogió el sobrenadante sobre una cápsula de porcelana, que se desecó en estufa de aireación a 60°C. A continuación se añadió en dos veces 1 ml de agua destilada para recuperar el material, que se pasó a un tubo que contenía entre 12 y 15 mg de borohidruro sódico, dejándolo durante unas 20 horas a temperatura ambiente para reducir los monosacáridos. El exceso de borohidruro se destruyó añadiendo HCl hasta pH ácido. El material se evaporó a sequedad en un rotavapor, lavando después tres veces con 2 ml de metanol. Los azúcares fueron convertidos en sus correspondientes acetatos de alditol mediante tratamiento con 1 ml de piridina-anhídrido acético (1:1 v/v) a 100°C durante 1 hora (Laine y col., 1972). Estos reactivos se eliminaron en rotavapor y los derivados acetilados se disolvieron en 0,5 ml de cloroformo para su análisis por cromatografía gas-líquido (CGL).

7.2.3.- Cromatografía gas-líquido.

Los derivados obtenidos fueron identificados y cuantificados por cromatografía de gases. Se empleó un equipo de la casa 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. 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-Registrador modelo Sigma 10 de Perkin Elmer.

El pico de cada azúcar en el cromatograma se identificó comparando su tiempo de retención con los de patrones analizados en idénticas condiciones. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos y a los factores de respuesta de los azúcares.

8. ANALISIS ESTRUCTURAL.

8.1.- Espectrofotometría de infrarrojos (IR).

La naturaleza de los enlaces glicosídicos existentes entre los monómeros que forman un polisacárido, así como la presencia de sustituyentes de tipo acetamido, carboxilo o sulfato puede ser reconocida a partir de las bandas de absorción características de su espectro infrarrojo (Barker y col., 1956).

Los espectros se realizaron mediante la técnica del KBr (300 mg KBr con 1-2 mg de muestra finamente pulverizada) en un espectrofotómetro Perkin Elmer 1420 Ratio Recording Infrared Spectrophotometer.

8.2.- Oxidación con periodato sódico y degradación de Smith.

La oxidación con periodato se llevó a cabo según la técnica de Aspinall y Ferrier (1957). Unos 50 mg de polisacárido se trataron con 50 ml de periodato sódico 0,015 M en

oscuridad, midiendo cada 24 h a 223 nm el descenso de absorbancia como indicación del consumo de periodato. Cuando este valor se estabilizó, se consideró que los polisacáridos estaban totalmente oxidados. Los productos de la oxidación se dializaron frente a agua, se redujeron con borohidruro sódico y tras dializar para eliminar el exceso de borohidruro, se liofilizaron y almacenaron para posteriormente hidrolizarlos con H_2SO_4 . A continuación se trataron como el resto de las hidrólisis convirtiendo los productos en sus correspondientes acetatos de alditol para analizarlos por cromatografía de gases.

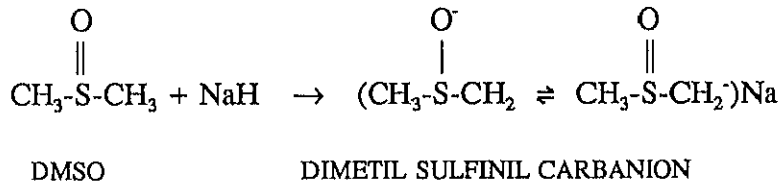
Puesto que la interpretación de los resultados obtenidos puede ser complicada, se ha considerado oportuno explicar en este apartado solamente la parte experimental y exponer con más detalle el fundamento de la técnica y el origen de los productos de la degradación en la sección de Resultados.

8.3.- Análisis de metilación.

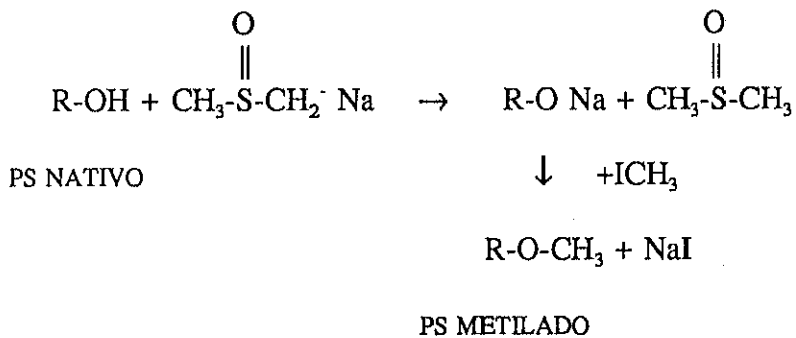
Se siguió una modificación (Jansson y col., 1976) del método de Hakomori (1964), con la excepción de que el tratamiento con la base fue de 16 horas. Entre 10 y 15 mg del polisacárido se secaron durante una noche en una estufa de vacío a $50^\circ C$. A la mañana siguiente se sustituyó el vacío por atmósfera de argón y se sacaron de la estufa los tubos que contenían las muestras. Se añadió a cada tubo 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) por cada 5 mg de polisacárido y se colocaron los tubos en un baño ultrasónico para disolver los polisacáridos. A cada tubo se le añadió 1 ml de dimetil sulfinil carbanión (previamente preparado mediante reacción de DMSO con NaH en atmósfera de argón; ver Figura 4) por cada 5 mg de polisacárido, agitando y dejando reaccionar durante 16 horas en atmósfera

de argón. Este paso sirve para preparar los polisacáridos para la reacción de metilación, que se completa en aproximadamente dos horas con ioduro de metilo (1 ml/5 mg de polisacárido) como agente metilante. El material metilado se extrajo con cloroformo:metanol (1:1), se filtró a través de filtros GF/C (Millipore), se dializó y se evaporó a sequedad.

Figura 4.- A) Preparación del dimetil sulfinil carbanión.



B) Reacción de metilación.



8.3.1.- Espectros IR.

El espectro IR de las fracciones una vez metiladas no debe mostrar absorción correspondiente a grupos hidroxilo (3500 cm^{-1}) y sí una fuerte absorción a 3000 cm^{-1} debida a los grupos metilo. Esto indica si la metilación ha sido completa o no.

8.3.2.- Hidrólisis de los polisacáridos metilados.

Los polisacáridos metilados se hidrolizaron a 100°C con ácido fórmico del 90% (2 horas) y a continuación con H_2SO_4 0,25 M (16 horas). La reducción de los productos se realizó con NaBD_4 con el fin de introducir un átomo de deuterio en el carbono 1 de cada monómero. Esto permitirá analizar con mayor facilidad los iones presentes en el espectro de masas, ya que todos los fragmentos iónicos que contengan dicho carbono presentarán una unidad de masa más que los que no lo contengan. Por último, las muestras se acetilaron (Ring y Selvendran, 1978; Stevens y Selvendran, 1980) y los acetatos de alditol parcialmente metilados así obtenidos se analizaron por CGL en una columna con un 3% OV-225 a 170°C para calcular los tiempos de retención relativos e identificar los monómeros.

El análisis combinado GC-MS se realizó en un espectrómetro de masas modelo ITD de la casa Perkin-Elmer (del tipo trampa de iones) acoplado a un cromatógrafo de gases con una columna capilar de sílice fundido de SP-2100 o SPB-1 (30 m x 0,22 mm; espesor de la película $0,25\text{ }\mu\text{m}$), con helio como gas portador. Se utilizó un programa de temperaturas que comenzaba en 160°C (1 min) para luego subir a razón de $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 220°C . La temperatura de la trampa de iones fue de 220°C y la línea de transferencia se

programó a 270°C. La ionización se realiza por impacto electrónico.

La cuantificación se llevó a cabo atendiendo al área de los picos en los cromatogramas obtenidos por GC-MS, sin utilizar factores de respuesta.

8.4.- Resonancia magnética nuclear.

Las muestras se prepararon disolviendo 30-35 mg de polisacárido en 0,8 ml de D₂O (fracciones F1S) o NaOD (fracciones F1I) y centrifugando a 8000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se utilizó para registrar los espectros.

Los espectros de ¹H-RMN se registraron en un aparato Varian XL-300 a 300 MHz. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), con DSS (4,4-di-metil-4-silapentano-1-sulfonato) como referencia externa.

La espectroscopía de RMN tiene un conjunto de características que la hacen especialmente ventajosa para el estudio de polisacáridos (Bovey, 1972; James, 1975; Jones, 1976). A diferencia de otros métodos físicos, la espectroscopía de RMN no es destructiva. Por ello, es posible examinar un polímero sin degradarlo ni modificarlo y recuperar el material intacto.

En ¹H-RMN, las señales correspondientes a los protones anoméricos están bien separadas de las producidas por la mayor parte de los otros protones. El análisis de la zona anomérica de los espectros de ¹H-RMN indica el grado de complejidad del polímero, pudiéndose determinar el número de residuos diferentes en el polisacárido y sus proporciones relativas. Cada protón anomérico da una señal, que la mayor parte de las veces se desdobra debido a la constante de acoplamiento, la cual varía según la

configuración anomérica.

Los espectros de ^{13}C -RMN se obtuvieron con desacoplamiento de banda ancha, sobre la misma disolución y en el mismo aparato, a 75 MHz. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), usando dioxano ($\delta=67,4$ ppm) como referencia externa.

El uso de la transformada de Fourier es obligatorio para los análisis de ^{13}C -RMN debido a la baja abundancia natural (1,1%) e intrínsecamente escasa sensibilidad del núcleo de ^{13}C .

Las señales del C-1 de los polisacáridos presentan un rango diferente de desplazamientos químicos según contengan enlaces α o β . En el caso de la manopiranosas las resonancias del C-1 de ambos anómeros están muy próximas, pero las señales de los respectivos C-2, C-3 y C-5 se distinguen con facilidad (Gorin, 1981).

Los desplazamientos químicos del C-1 de las furanosas suelen registrarse a campo más bajo que el correspondiente a su homólogo en la serie piranósica (Gorin, 1981).

9. OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO DE *Penicillium oxalicum*. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD GALACTANASA.

Se utilizó para realizar estos estudios el microorganismo *Penicillium oxalicum* (Currie y Thom) 1331 de la colección del C.I.B. del C.S.I.C. e incluido en la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC 64198, cedido por la Dra. Reyes para realizar estos

estudios. A partir de cultivos de 5 días de crecimiento en agar inclinado, se obtuvo una suspensión de esporas en agua estéril (10^6 esporas.ml⁻¹).

El microorganismo se cultivó en el medio líquido de Reyes y Byrde (1973), suplementado con extracto de levadura. Este medio se distribuyó en matraces de 1 l (200 ml por frasco), añadiendo 1 ml de la suspensión de esporas del hongo a cada uno de ellos. Una vez inoculados, los matraces se incubaron estáticamente a 25°C y en oscuridad durante 14 días.

El líquido de cultivo se separó de los residuos de la degradación del hongo por centrifugación.

9.1.- Valoración de actividades enzimáticas.

9.1.1.- Sustratos empleados.

Se utilizaron distintos polisacáridos solubles estudiados en este trabajo y otros que se obtuvieron en el laboratorio por modificación de productos comerciales:

-F1S de *Talaromyces flavus*. Es una mezcla de varios polímeros en la que encontramos β -(1→5)-galactofuranosa, β -(1→4)-galactopiranososa, β -(1→2)-galactopiranososa y algo de β -(1→6)-galactopiranososa.

-Mediante degradación de Smith de goma arábica (Ikotum, 1984) se obtuvo un β -(1→3)-galactopirano.

-También se obtuvo un β -(1→4)-galactopirano reduciendo pectina de *Citrus* con NaBH₄ 100 mM en NaOH 5 M a 90°C (Tsumuraya y col., 1990).

-Se obtuvieron oligómeros de β -(1 \rightarrow 5)-galactano hidrolizando el galactano de *E. crustaceum* con HCl 6 M a 25°C durante 30 minutos. El HCl se eliminó en rotavapor y los oligómeros resultantes fueron separados en una columna de Bio-Gel P2, calculando sus masas moleculares con la curva de calibración correspondiente a esta columna. Se utilizaron como patrones rafinosa, gentobiosa y oligómeros de N-acetil glucosamina (Reyes y col., 1989).

Se emplearon también como controles negativos quitina, almidón, laminarina y celulosa. La actividad β -galactosidasa se ensayó usando un sustrato cromogénico: el *o*-nitrofenil galactopiranosido (Sigma).

Todos los sustratos se prepararon a una concentración de 1 mg.ml⁻¹.

9.1.2.- Mezcla de reacción.

Se preparó con 100 μ l del sustrato y 100 μ l de la disolución de enzima, incubando a 37°C durante distintos tiempos.

9.1.3.- Procedimiento de valoración.

La actividad β -(1 \rightarrow 5)-galactanasa se valoró midiendo espectrofotométricamente (D.O. 540 nm) los azúcares reductores liberados mediante la hidrólisis enzimática de los correspondientes sustratos, según el método de Somogyi (1952) y Nelson (1944). Este método se basa en la oxidación de los azúcares y sustancias reductoras por sulfato cúprico, que se reduce a óxido de cobre. Al reaccionar el ión cuproso con el arsenomolibdato del reactivo de Nelson, se forma un complejo de

coloración azul estable, cuya intensidad puede medirse espectrofotométricamente a 540 nm.

En todas las valoraciones realizadas se preparó además un blanco de sustrato y un blanco del extracto enzimático, para descartar cualquier posible hidrólisis no enzimática del sustrato y los grupos reductores que pudieran estar presentes en la disolución enzimática.

La identificación de los monómeros liberados y su cuantificación se realizó por cromatografía de gases.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de azúcares reductores solubles por minuto.

La actividad β -galactosidasa se determinó en las mismas condiciones, midiendo la cantidad de *o*-nitrofenol liberado a partir del *o*-nitrofenil galactósido. Para parar la reacción y detectar la presencia del nitrofenol liberado se añadieron 2 ml de tampón borato sódico-potásico 0,2 M pH 9,8.

9.2.- Purificación de la enzima.

El líquido de cultivo filtrado de *Penicillium oxalicum* fue sometido a una secuencia de tratamientos para la purificación de la actividad galactofuranasa.

Una parte del mismo fue concentrada 10 veces en rotavapor a 25°C y congelada en fracciones de 4 ml. Una de estas fracciones se filtró a través de carbón vegetal para eliminar los pigmentos. Otra fracción se precipitó con un 1% de ácido tánico (Shibata y Nisizawa, 1965), dejando sedimentar durante 2 horas a 4°C y recogiendo después el precipitado, que se lavó varias veces con acetona también a 4°C para eliminar el ácido tánico. Este material se desecó con una corriente de aire, guardándolo en nevera hasta su

utilización. El fin de estas operaciones era comprobar con cual de los tratamientos se obtenía un mayor incremento en la actividad galactanasa con respecto al líquido inicial y utilizar el material más adecuado en los pasos siguientes.

9.2.1.- Cromatografía en columna.

A) Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-200.

El extracto enzimático concentrado se centrifugó y se cargó en una columna de 90 x 2,6 cm de Sephadex G-200, que retiene proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 1×10^3 y 2×10^5 Da, equilibrada con tampón fosfato 10 mM pH 6,5. Se recogieron fracciones de 3,5 ml hasta completar el volumen total de la columna. Se midió D.O. a 280 nm y actividad galactanasa en todas las fracciones eluidas, concentrando el pico de actividad enzimática a un volumen de 2,5 ml.

B) Cromatografía de intercambio iónico.

El pico de actividad galactanasa recogido de la columna de Sephadex G-200 se filtró a través de una columna de PD-10 (Pharmacia) para eliminar las sales. El material resultante se cargó en inyecciones sucesivas de 200 μ l en una columna de intercambio iónico Mono Q HR 5/5 FPLC (5 mm x 50 mm) equilibrada con tampón fosfato sódico 10 mM pH 6,5. Se aplicó un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,5 M. Las fracciones que presentaron actividad galactanasa se reunieron y se concentraron 5 veces.

C) Filtración en Superose 6.

El extracto obtenido en el paso anterior se filtró en una columna de Superose 6 HR 10/30 FPLC (1,3 cm x 30,8 cm) equilibrada con tampón fosfato 50 mM

pH 5,39 con NaCl 150 mM.

El pico con actividad galactanasa se concentró y recromatografió en las mismas condiciones.

9.2.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.

El material obtenido tras toda la secuencia de purificación se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida (7% acrilamida) según la técnica descrita por Laemmli (1970), y en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) con un 17% de acrilamida. La tinción de los geles se realizó por el método de Morrissey (1981).

9.3.- Determinación del punto isoeléctrico.

El isoelectroenfoque de la enzima purificada se llevó a cabo en geles de poliacrilamida de 0,1 mm en un rango de pH desde 3,5 hasta 10 (anfolito LKB). Se utilizó un "kit" de calibración para isoelectroenfoque de proteínas de la casa Pharmacia de 3,5 a 10 unidades de pH. Las disoluciones de ánodo y cátodo fueron, respectivamente, ácido aspártico 0,025 M y etilendiamina 2 M. Los geles se tiñeron con Azul Brillante de Coomasie R-250.

9.4.- Determinación de carbohidratos en la proteína.

La concentración total de carbohidratos en la enzima purificada se determinó por el método de la antrona. La identificación de los monómeros que la forman se estudió en hidrolizados de la proteína con H₂SO₄ 0,5 M durante 16 horas a 100°C, obteniendo sus

correspondientes acetatos de alditol y analizándolos por cromatografía gas-líquido como se describe en los apartados 7.2.2 y 7.2.3.

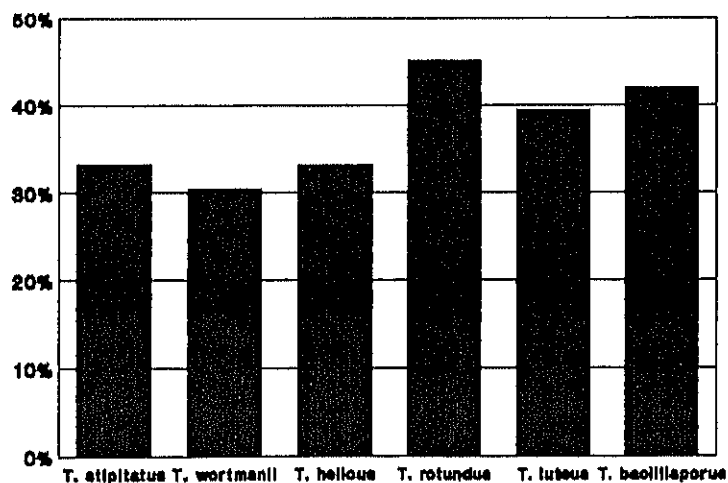
RESULTADOS

1.- CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS Y OBTENCION DE PAREDES CELULARES.

El aspecto de los cultivos tras el período de crecimiento muestra características diferentes según las especies. El micelio de *T. stipitatus* y *T. helicus* tiene aspecto filamentoso. *T. wortmannii* y *T. rotundus* crecen formando pequeñas esferas de filamentos, mientras que en *T. luteus* y *T. bacillisporus* las hifas forman esferas de mayor tamaño.

En las condiciones de cultivo empleadas, las paredes celulares obtenidas al final del proceso de purificación representan entre un 30 y un 45% del peso seco de micelio a partir del cual fueron extraídas (Figura 5).

Figura 5.- Porcentaje que representa la pared celular en varias especies de *Talaromyces*.



2.- OBTENCION DE LA FRACCION F1.

Llamamos fracción F1 al material polisacárido soluble que se obtiene al tratar las paredes celulares con NaOH 1 M a temperatura ambiente. La proporción de esta fracción en la pared y su composición puede verse en la Tabla 1.

La proporción de material extraído en estas condiciones oscila entre un 10% y un 33%. En cuanto a su composición, observamos claramente dos grupos: tres de las especies estudiadas tienen galactosa como azúcar mayoritario, mientras que en las otras tres predomina la glucosa.

TABLA 1.- AZUCARES NEUTROS LIBERADOS EN LA HIDROLISIS CON H₂SO₄ 2 M DE LA FRACCION F1 DE VARIAS ESPECIES DE *Talaromyces*.

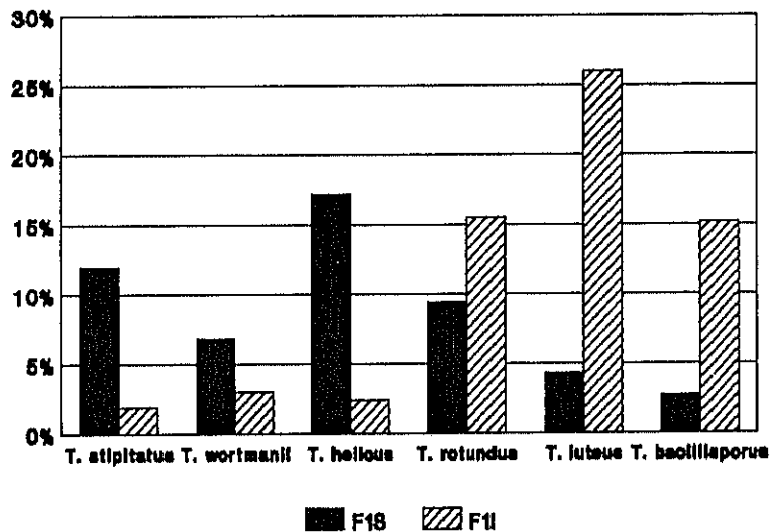
	% pared	ARA	XIL	MAN	GAL	GLU	%
<i>T. stipitatus</i>	15,0	tr.	9,4	4,3	20,9	18,0	52,6
<i>T. wortmannii</i>	10,6	tr.	2,0	3,9	47,2	9,5	2,6
<i>T. helicus</i>	20,0	tr.	tr.	7,2	37,6	26,6	71,4
<i>T. rotundus</i>	30,2	tr.	tr.	2,3	3,9	61,3	67,5
<i>T. luteus</i>	32,8	tr.	tr.	2,5	2,8	60,8	66,1
<i>T. bacillisporus</i>	19,5	tr.	1,2	0,5	0,5	72,7	74,9

tr.= trazas (cantidades inferiores al 0,3%).

3.- FRACCIONAMIENTO DE LA F1.

De la fracción F1 se obtuvo un material soluble en agua destilada (F1S) y otro insoluble (F1I). En la Figura 6 se representan sus proporciones referidas a la cantidad inicial de pared celular. Es de destacar que en *T. stipitatus*, *T. wortmannii* y *T. helicus* la cantidad de F1S es de 3 a 7 veces superior a la de F1I, mientras que en *T. luteus*, *T. rotundus* y *T. bacillisporus* predomina la F1I.

Figura 6.- Porcentajes de las fracciones F1S y F1I respecto de la pared celular.



4. CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES SOLUBLES EN AGUA.

4.1.- Carbohidratos neutros totales.

La determinación de carbohidratos neutros totales, realizada por el método de la antrona, demostró que estas fracciones estaban constituidas mayoritariamente por azúcares neutros, como se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2.- CARBOHIDRATOS NEUTROS TOTALES DE LAS FRACCIONES F1S.

<i>T. stipitatus</i>	66,5 %
<i>T. wortmannii</i>	75,4 %
<i>T. helicus</i>	84,5 %
<i>T. rotundus</i>	72,7 %
<i>T. luteus</i>	72,9 %
<i>T. bacillisporus</i>	60,7 %

4.2.- Análisis químico.

Todas las fracciones F1S se hidrolizaron con H₂SO₄ 0,05 M, 2 M y por hidrólisis Saeman. En la Tabla 3 vemos los resultados obtenidos en la hidrólisis Saeman, con la que se consiguieron las condiciones óptimas para la liberación de

cada azúcar. En todas ellas el contenido en galactosa es muy alto. Los monómeros en configuración furanósica se hidrolizan con H_2SO_4 0,05 M. El hecho de que la galactosa que contienen las muestras estudiadas se libere en estas condiciones indica que este azúcar se encuentra en forma de furanosa.

TABLA 3.- AZUCARES NEUTROS LIBERADOS EN LA HIDROLISIS SAEMAN DE LA FRACCION FIS DE VARIAS ESPECIES DE *Talaromyces*.

	ARA	XIL	MAN	GAL	GLU	%
<i>T. stipitatus</i>	0,8	tr.	13,5	61,4	14,7	90,4
<i>T. wortmannii</i>	1,4	2,0	13,5	76,6	9,5	100,0
<i>T. helicus</i>	0,4	0,5	9,1	44,4	45,5	99,9
<i>T. rotundus</i>	tr.	tr.	7,0	59,6	21,2	87,8
<i>T. luteus</i>	0,4	1,0	28,3	27,8	36,8	97,0
<i>T. bacillisporus</i>	1,0	2,0	10,0	64,0	14,0	91,0

4.3.- Análisis estructural.

4.3.1.- Espectroscopía infrarroja.

Los espectros infrarrojos de las fracciones FIS de las seis especies se

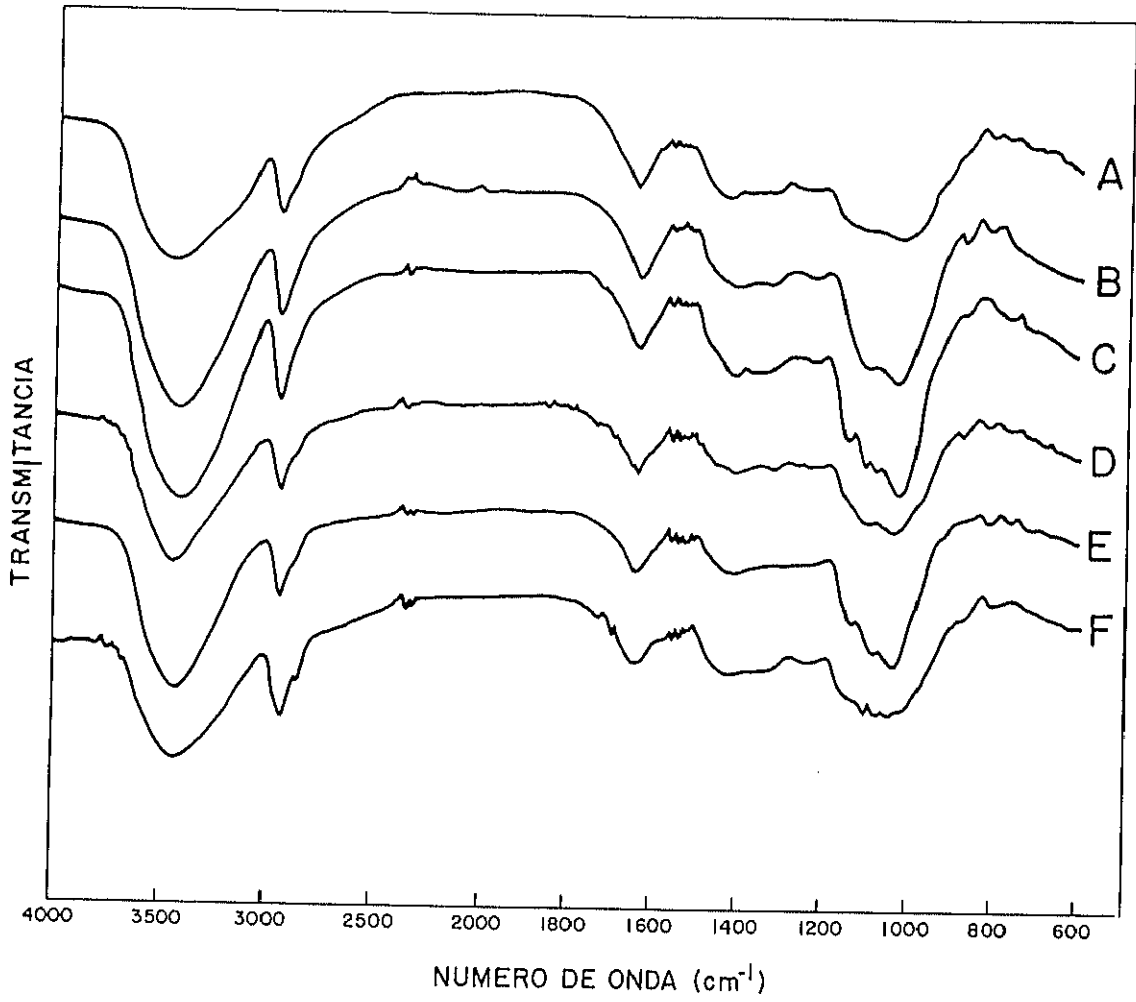


Figura 7.- Espectros infrarrojos de las fracciones FIS obtenidas a partir de paredes celulares de: A) *T. stipitatus*; B) *T. wortmannii*; C) *T. helicus*; D) *T. rotundus*; E) *T. luteus* y F) *T. bacillisporus*.

representan en la Figura 7. Todos ellos, excepto el correspondiente a *T. luteus*, presentaron bandas a 810 y 870 cm^{-1} características de β -galactofuranosa, aunque en algunos casos estas bandas son poco intensas. En el espectro de *T. luteus* no se ve la banda a 870 cm^{-1} .

No se detectaron bandas correspondientes a proteínas ni N-acetil-aminoazúcares.

4.3.2.- Degradación de Smith de los polisacáridos.

La Tabla 4 presenta los productos obtenidos por la oxidación con periodato sódico, reducción e hidrólisis de los polisacáridos, detectados como acetatos de alditol por cromatografía de gases.

Al comparar los productos de la degradación de Smith con la composición del material original podemos deducir, teniendo en cuenta las limitaciones de este método, los tipos de enlace que hay en estas fracciones.

Cuando una molécula de carbohidrato con dos grupos hidroxilo contiguos se trata con periodato sódico, tiene lugar la rotura de la cadena carbonada entre los carbonos que soportan los dos grupos hidroxilo, dando lugar a moléculas de menor tamaño que las presentes en el material original, como muestra el esquema de la Figura 8.

El GLICEROL (del 11 % al 24 % excepto en *T. luteus*, con un 57 %) procede de residuos terminales, furanosas en (1→6) o de piranosas enlazadas en (1→6), en (1→2) o en (1→2,6) y en estos dos últimos casos se producen dos moléculas de

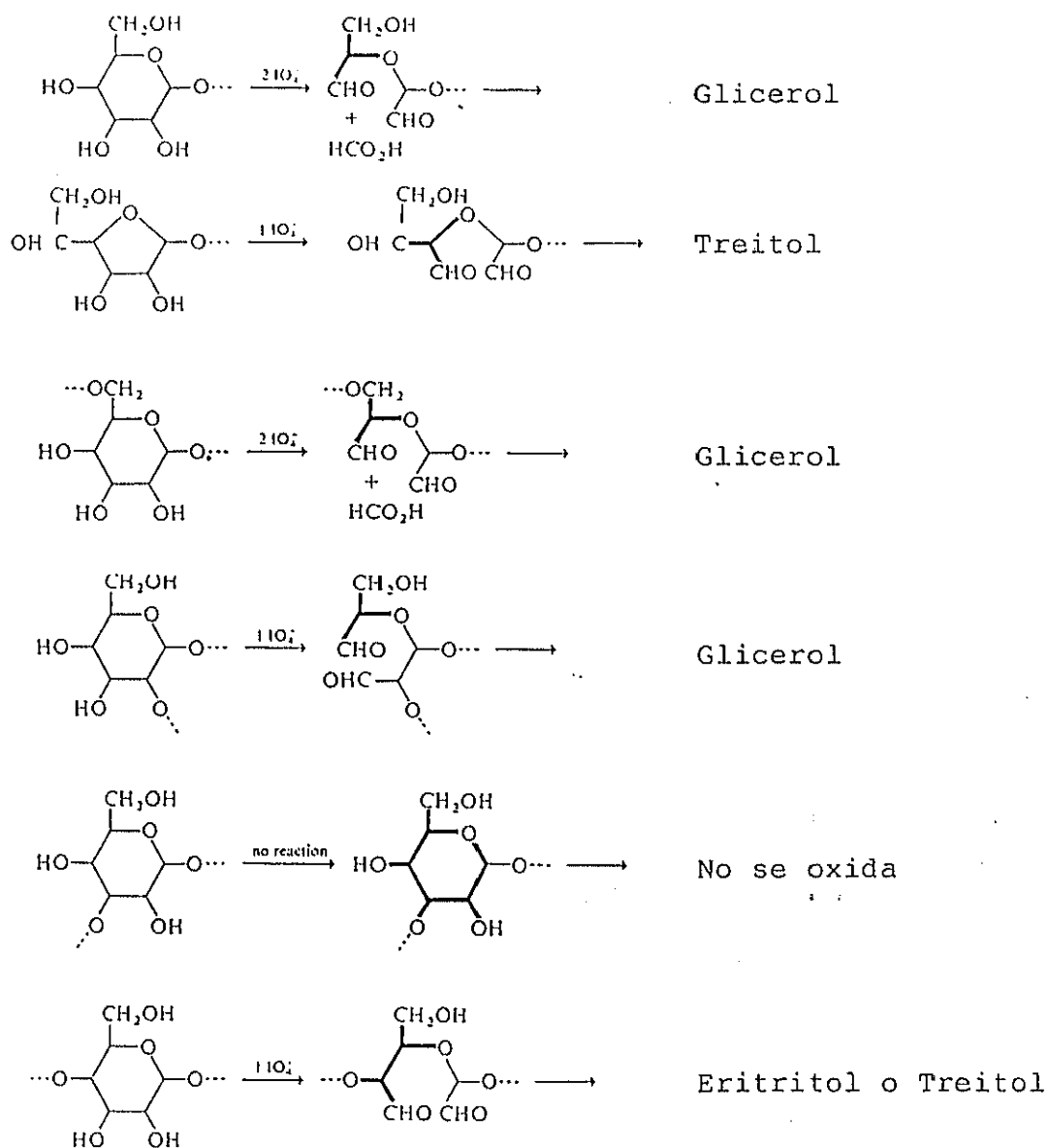


Figura 8.- Oxidación por periodato sódico de algunos tipos de enlace de los polisacáridos.

glicerol a partir de la molécula nativa. El ERITRITOL (pequeñas cantidades, excepto el 28% de *T. helicus* y el 11% de *T. bacillisporus*) se origina a partir de manosa o glucosa cuando las uniones son de tipo (1→4) ó (1→4,6). Las moléculas de galactopiranosas enlazadas en posición (1→4) ó (1→4,6) y las de galactofuranosa unidas en (1→5) dan lugar a TREITOL (entre un 17% y un 27% excepto los valores extremos de *T. wortmannii* y *T. bacillisporus*). El ARABINITOL puede formarse a partir de galactofuranosa con enlaces (1→3) ó (1→2). En las FIS encontramos resultados tan dispares como el 4,1 % de *T. luteus* y el 67 % de *T. wortmannii* o el 47 % de *T. rotundus*, presentando las fracciones de las tres especies restantes valores similares (11-15 %).

TABLA 4.- PORCENTAJES MOLARES DE LOS PRODUCTOS DE LA DEGRADACION DE SMITH DE LA FRACCION FIS DE VARIAS ESPECIES DE *Talaromyces*.

	GLI	ERI	TRE	RIB	ARA	XIL	MAN	GAL	GLU
<i>T. stipitatus</i>	24,3	3,2	27,0	1,5	12,7	3,4	3,4	14,7	9,7
<i>T. wortmannii</i>	11,1	3,7	4,9	2,6	66,9	0,8	1,6	5,4	3,0
<i>T. helicus</i>	14,6	28,2	20,1	1,4	15,0	0,7	2,1	10,4	7,5
<i>T. rotundus</i>	15,2	2,6	17,8	2,0	46,8	0,8	1,7	7,7	5,4
<i>T. luteus</i>	57,6	2,2	17,4	0,0	4,1	0,0	2,6	11,1	4,9
<i>T. bacillisporus</i>	11,4	10,8	44,8	1,2	11,5	0,9	3,3	7,9	8,2

Las unidades de MANOSA (1-3,5 %), GALACTOSA (5-15 %) Y GLUCOSA (3-10 %) enlazadas en (1→3) o formando parte de otras ramificaciones no son atacadas por el periodato, detectándose como tales tras el proceso.

La variedad de los productos obtenidos por este tratamiento pone de manifiesto la complejidad estructural de estas fracciones. Aunque orientativo, este método es insuficiente para deducir la estructura de nuestras muestras por lo que recurrimos a técnicas que suministren mayor información.

4.3.3.- Análisis de metilación de las fracciones.

En las Figuras 9, 10 y 11 se muestran los cromatogramas correspondientes a todas las fracciones F1S metiladas. Es preciso señalar que aún con este método resulta imposible distinguir entre (1→4)-galactopiranososa y (1→5)-galactofuranosa ya que producen el mismo derivado (1,4,5-triacetil-2,3,6-trimetil galactitol), aunque si consideramos los resultados de las hidrólisis del material nativo (máxima liberación de galactosa con H₂SO₄ 0,05 M) y los datos de los espectros de IR es más lógico pensar que se trata de (1→5)-galactofuranosa.

Por otra parte, se puede ver que la metilación no ha sido total, ya que el número de puntos de ramificación (derivados dimetilados) supera al número de residuos terminales detectados (derivados tetrametilados). Esto puede deberse a que el acceso de los grupos metilo a determinadas posiciones de los azúcares en el polímero sea más difícil.

A pesar de los inconvenientes apuntados, el análisis de metilación nos

proporciona una información valiosa acerca de la estructura de estas fracciones.

A la vista de los cromatogramas se aprecia la similitud existente entre las fracciones F1S de *T. stipitatus*, *T. helicus* y *T. bacillisporus*. En los tres casos los componentes mayoritarios son unidades de galactofuranosa enlazadas en (1→5) y (1→2), con puntos de ramificación en la posición 6 de algunas de estas unidades ((1→2,6)-galactofuranosa) y en los residuos de manosa ((1→2,6)-manopiranosas). Igualmente, se detecta en los tres casos una cierta proporción de una furanosa (diferente a la galactofuranosa) unida en las posiciones 2 y 6. Algunas diferencias entre estas tres F1S serían, por ejemplo, la presencia de una cantidad apreciable de (1→4)-glucopiranosas en *T. helicus* y la mayor proporción de (1→6)-galactofuranosa en *T. bacillisporus*.

También es manifiesto el parecido entre el material procedente de *T. wortmannii* y *T. rotundus*. Los componentes más abundantes son monómeros de (1→2) y (1→3) galactofuranosa en una proporción aproximada de (1:1). Algunas de las unidades de (1→2) galactofuranosa están ramificadas en su posición 6 y los residuos terminales son de glucopiranosas y galactofuranosa.

La F1S de *T. luteus* es diferente a todas las anteriores. Parece estar muy ramificada, ya que los componentes mayoritarios son residuos terminales de glucopiranosas y derivados dimetilados (3,4-Me₂-Man; 2,3-Me₂-Man y 3,5-Me₂-Gal). También presenta una considerable cantidad de manopiranosas enlazadas en la posición 6.

TABLA 5.- RELACION DE COMPUESTOS DETECTADOS POR GC-MS EN EL ANALISIS DE METILACION DE LAS FRACCIONES F1S Y TIPOS DE ENLACE DEDUCIDOS DE LOS MISMOS.

1.- <i>1,5-diacetil-2,3,4,6-tetrametil-glucofuranosa</i>	953 seg ^a	Glc _p -(1→
2.- <i>1,4-diacetil-2,3,5,6-tetrametil-galactofuranosa</i>	965 seg	Gal _f -(1→
3.- <i>1,2,4-triacetil-3,5,6-trimetil-hexofuranosa</i>	1123 seg	→2)-Hex _f -(1→
4.- <i>1,3,4-triacetil-2,5,6-trimetil-galactofuranosa</i>	1145 seg	→3)-Gal _f -(1→
5.- <i>1,3,5-triacetil-2,4,6-trimetil-glucofuranosa</i>	1155 seg	→3)-Glc _p -(1→
6.- <i>1,4,5-triacetil-2,3,6-trimetil-galactosa</i>	1160 seg	→5)-Gal _f -(1→
7.- <i>1,4,5-triacetil-2,3,6-trimetil-glucofuranosa</i>	1179 seg	→4)-Glc _p -(1→
8.- <i>1,2,4-triacetil-3,5,6-trimetil-galactofuranosa</i>	1181 seg	→2)-Gal _f -(1→
9.- <i>1,5,6-triacetil-2,3,4-trimetil-manopiranososa</i>	1234 seg	→6)-Man _p -(1→
10.- <i>1,4,6-triacetil-2,3,5-trimetil-galactofuranosa</i>	1285 seg	→6)-Gal _f -(1→
11.- <i>1,4,5,6-tetraacetil-2,3-dimetil-manopiranososa</i>	1441 seg	→4,6)-Man _p -(1→
12.- <i>1,2,4,6-tetraacetil-3,5-dimetil-hexofuranosa</i>	1478 seg	→2,6)-Hex _f -(1→
13.- <i>1,2,5,6-tetraacetil-3,4-dimetil-manopiranososa</i>	1490 seg	→2,6)-Man _p -(1→
14.- <i>1,2,4,6-tetraacetil-3,5-dimetil-galactofuranosa</i>	1558 seg	→2,6)-Gal _f -(1→
15.- <i>Inositol hexaacetato (patrón interno)</i>	1843 seg	

^aTiempo de retención en segundos.

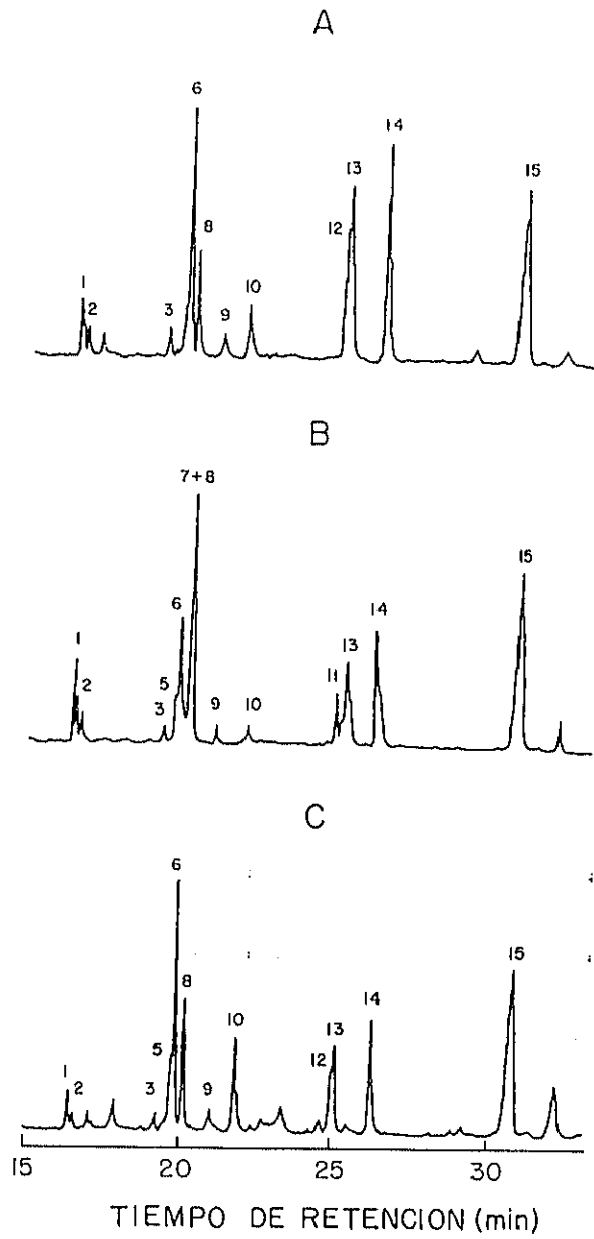


Figura 9.- Cromatogramas correspondientes a los acetatos de aldítol parcialmente metilados obtenidos a partir de fracciones FIS de A) *T. stipitatus*; B) *T. helicus*; C) *T. bacillisporus*, analizadas por GC-MS.

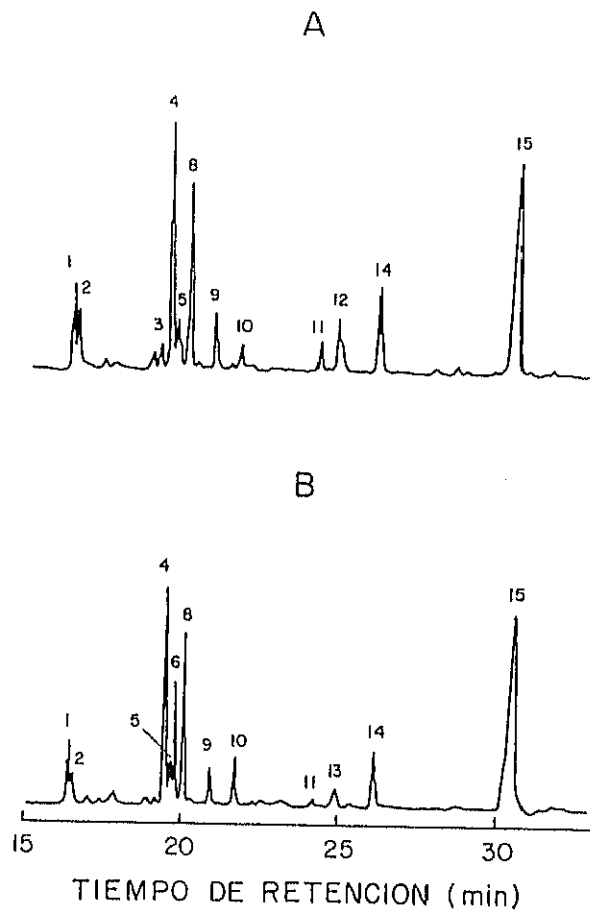


Figura 10.- Cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol parcialmente metilados obtenidos a partir de fracciones F1S de A) *T. wortmannii*; B) *T. rotundus*, analizados por GC-MS.

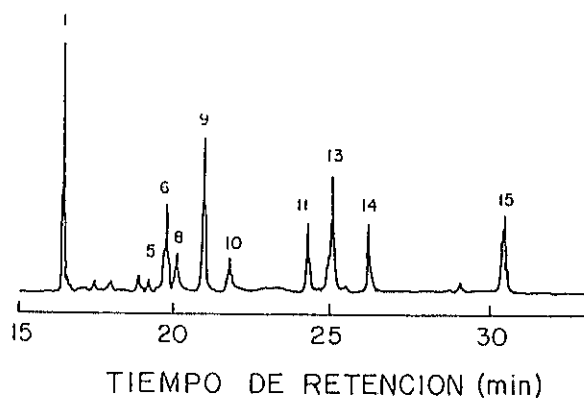


Figura 11.- Cromatograma correspondiente a los acetatos de alditol parcialmente metilados obtenidos a partir de la fracción F1S de *T. luteus*, analizada por GC-MS.

4.3.4.- Resonancia magnética nuclear.

Todas las fracciones F1S se analizaron por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN en las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

En las Figuras 12, 13 y 14 se presentan los registros correspondientes a las resonancias de ^1H de la zona anomérica de las F1S. Para comparaciones posteriores, hemos incluido el espectro de la especie tipo del género, *T. flavus*. Se aprecia en ellos el mismo hecho que hemos comentado a la vista del análisis de metilación, es

decir, el enorme parecido de esta fracción en las especies *T. stipitatus*, *T. helicus* y *T. bacillisporus* (todos tienen las señales a $\delta = 5,33, 5,30, 5,0$ y $4,97$ ppm), la similitud entre *T. wortmannii* y *T. rotundus* (ambos con señales a $5,24$ y $5,18$ ppm) y la diferencia de *T. luteus* con respecto a las demás F1S. El espectro del polisacárido de *T. luteus* es complicado y difícil de interpretar. En él se recogen señales de al menos nueve monómeros diferentes y no han podido realizarse asignaciones de las mismas. La Tabla 6 muestra las asignaciones de las señales registradas en los restantes espectros de $^1\text{H-RMN}$.

TABLA 6.- ASIGNACIONES DE LAS SEÑALES MAYORITARIAS DE LOS ESPECTROS DE $^1\text{H-RMN}$.

	H-1 (ppm)	J_{12} (Hz)	
A)			
	5,33	4,3	α -piranosa α -furanosa
	5,30	2,0	β -furanosa
	5,00	<1,0	β -furanosa
	4,97	3,8	α -piranosa
B)			
	5,24	<1,0	β -furanosa
	5,18	<1,0	β -furanosa

A) En *T. flavus*, *T. helicus*, *T. stipitatus* y *T. bacillisporus*; B) *T. wortmannii* y *T. rotundus*.

Los espectros de ^{13}C (Figuras 15, 16 y 17) reafirman los resultados anteriores en lo referente a la existencia de tres tipos de estructura diferentes en las fracciones estudiadas. Las asignaciones de las señales recogidas mediante estos espectros (excepto el correspondiente a *T. luteus*) figuran en la Tabla 7. La asignación de los carbonos en el espectro se realizó por heterocorrelación o utilizando modelos sintetizados por los Dres. E. Parra y M. Bernabé.

TABLA 7.- ASIGNACIONES DE LAS SEÑALES MAYORITARIAS DE LOS ESPECTROS DE ^{13}C -RMN.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
A)						
→2- α -Gal β -1→	100,0	81,3	73,6	82,2	73,2	63,3
→2,6- β -Gal β -1→	106,2	88,0	76,0	83,3	70,3	70,2
→5- β -Gal β -1→	108,8	81,9	77,5	82,9	76,8	62,2
α -Glc β -1→	98,4	72,2	73,9	70,6	73,1	61,6
B)						
→2- β -Gal β -1→	106,7	88,7	76,3	80,5 ^b	71,3 ^a	63,7
→3- β -Gal β -1→	108,7	80,7 ^b	83,4 ^c	83,1 ^c	71,5 ^a	63,7

^{a,b,c}Estos valores podrían estar cambiados, pero esto no afecta a la asignación de la estructura, ya que la variación es del orden de décimas.

A) En *T. flavus*, *T. helicus*, *T. stipitatus* y *T. bacillisporus*; B) En *T. wortmannii* y *T. rotundus*.

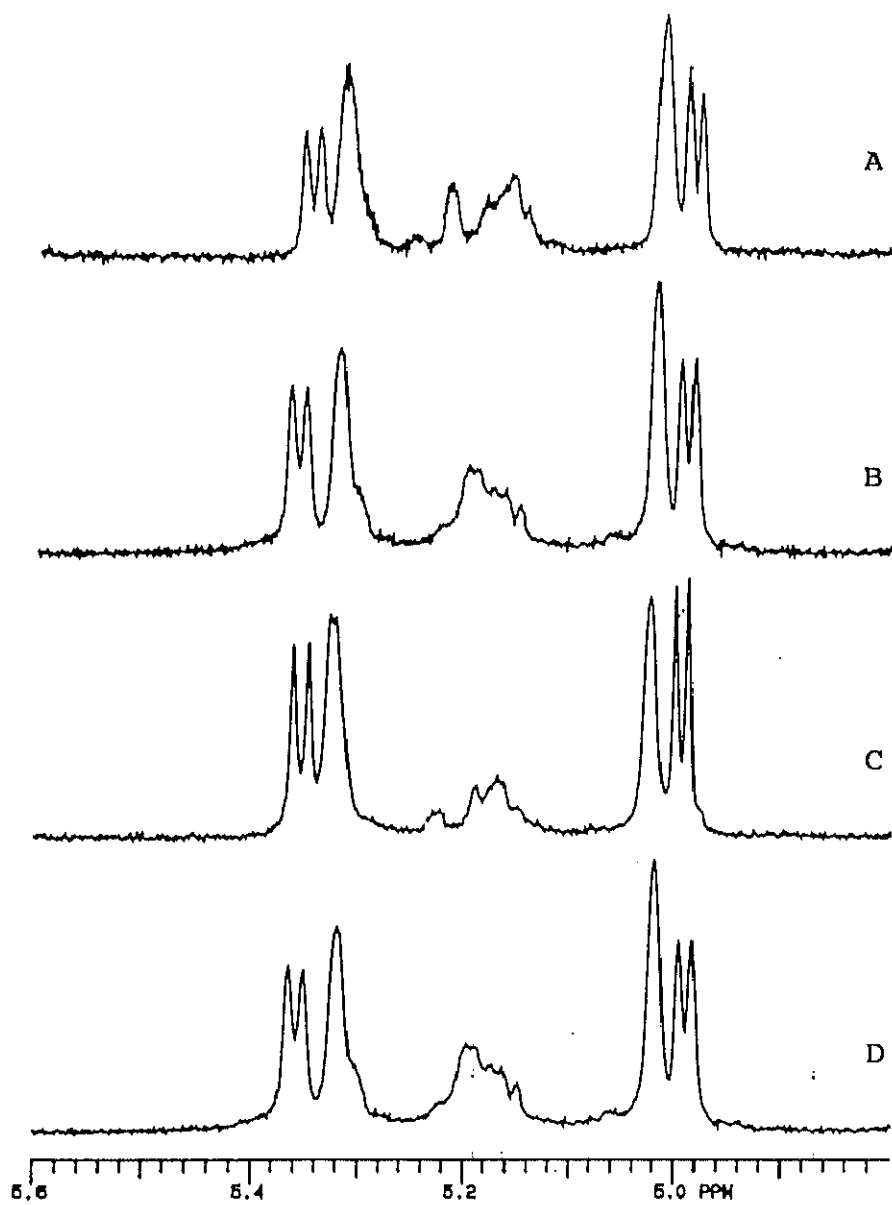


Figura 12.- Espectros de $^1\text{H-RMN}$ de la región anomérica de las fracciones F1S de: A) *T. bacillisporus*; B) *T. stipitatus*; C) *T. helicus* y D) *T. flavus*.

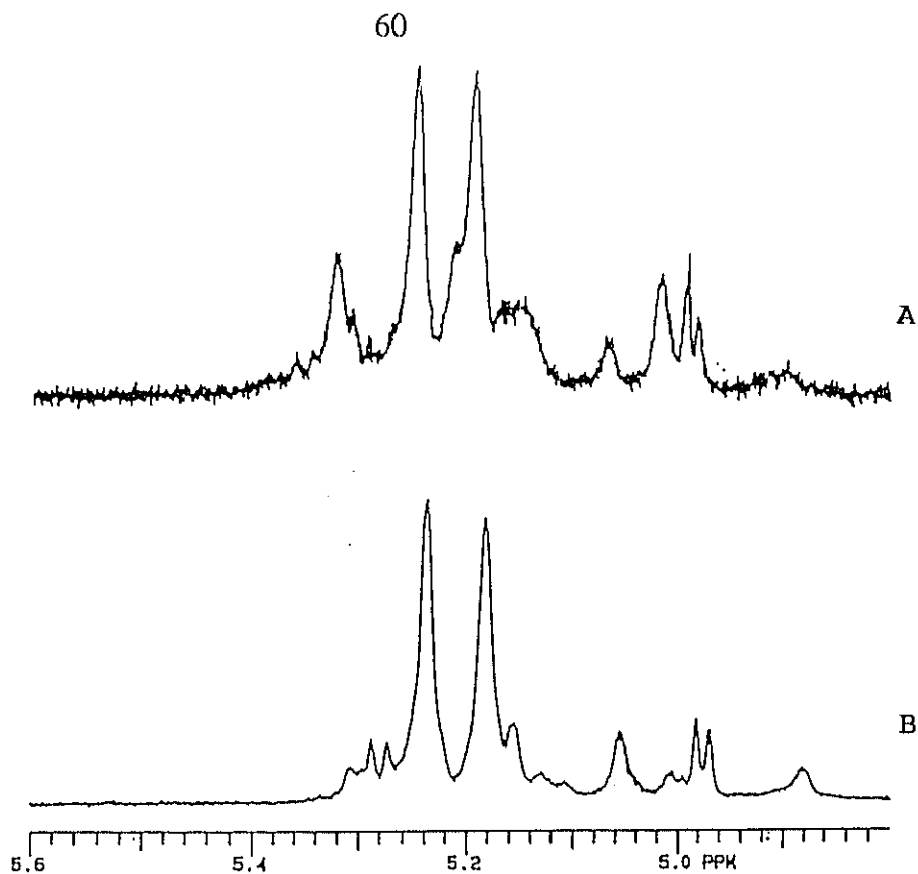


Figura 13.- Espectros de ^1H -RMN de la región anomérica de las fracciones FIS de: A) *T. wortmannii*; B) *T. rotundus*.

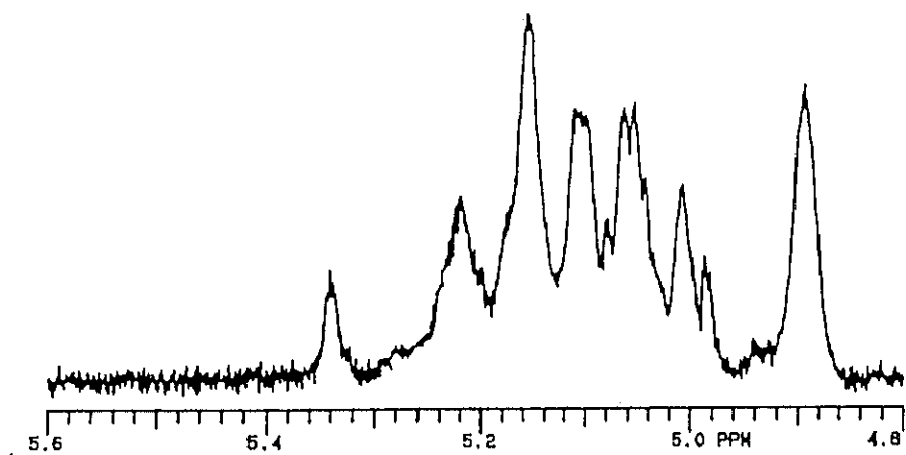


Figura 14.- Espectro de ^1H -RMN de la región anomérica de la FIS de *T. luteus*.

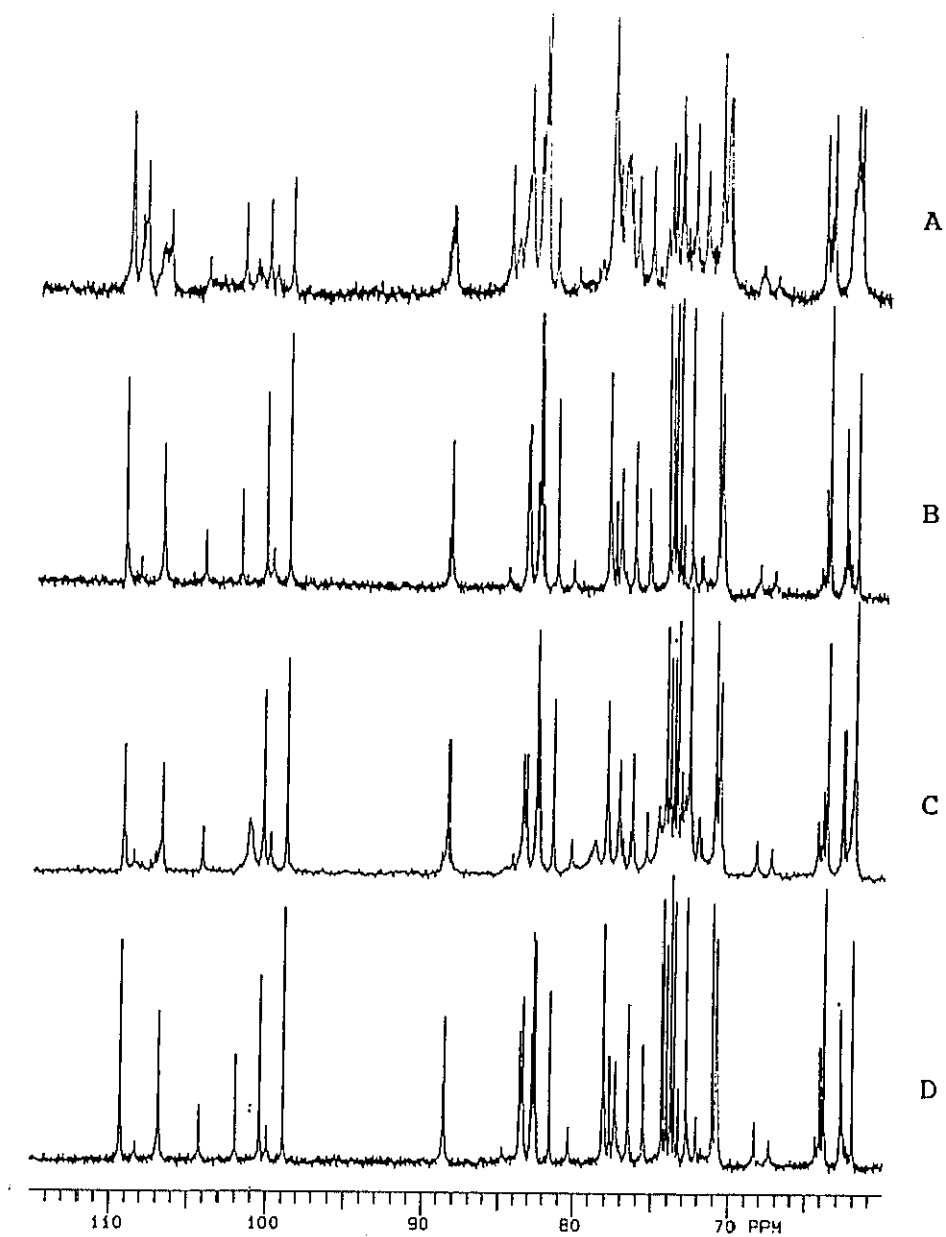


Figura 15.- Espectros ^{13}C -RMN de las fracciones F1S de: A) *T. bacillisporus*; B) *T. stipitatus*;
C) *T. helicus* y D) *T. flavus*.

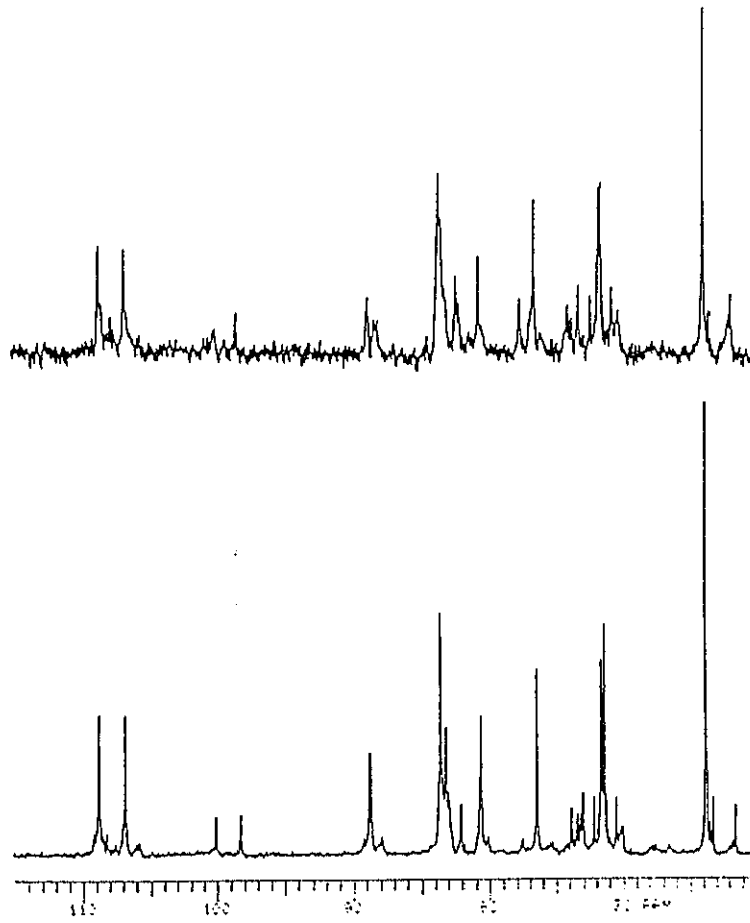


Figura 16.- Espectros de ^{13}C -RMN de las fracciones F1S de: A) *T. wortmanii*; B) *T. rotundus*.

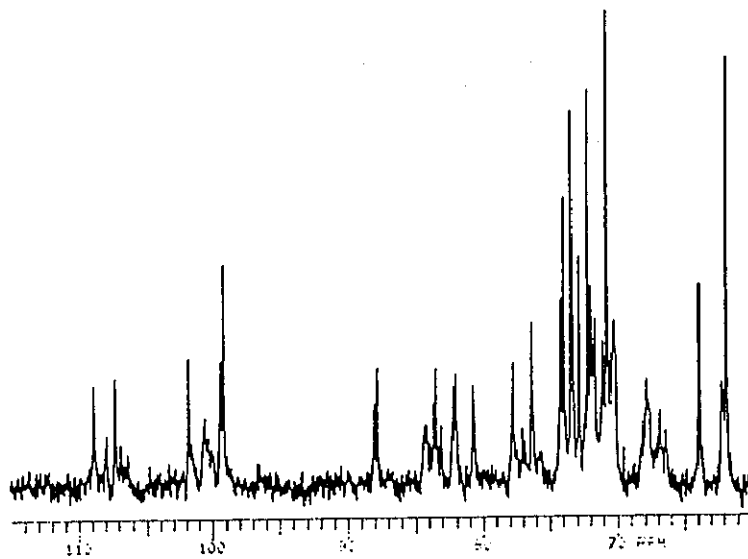


Figura 17.- Espectro de ^{13}C -RMN de la F1S de *T. luteus*.

5. SEPARACION DE DISTINTOS POLISACARIDOS DE LAS FRACCIONES F1S. ESTIMACION DE SUS PESOS MOLECULARES.

La gran complejidad de los resultados encontrados hasta este momento nos hizo considerar la posibilidad de que estas fracciones no fueran un material homogéneo, sino que estuvieran compuestas por una mezcla de polímeros. Por ello, decidimos someterlas a un proceso de filtración en gel a escala preparativa. Después de realizar pruebas con diferentes geles y eluyentes, se llegó a la conclusión de que las mejores separaciones y recuperaciones se obtenían en una columna de 40 x 2,6 cm empaquetada con Sepharosa CL-6B utilizando NaOH 0,3 M como eluyente. Por esta razón sólo se mostrarán los perfiles de elución correspondientes a la separación obtenida en estas condiciones (Figuras 18 y 19).

La F1S de *T. luteus*, que como ya hemos visto en los anteriores resultados era muy diferente al resto de las especies estudiadas en su composición y estructura, presenta un único pico tras el proceso de filtración en gel. En el resto de las fracciones F1S encontramos un polímero de alto peso molecular cuya proporción es variable, y dos o tres picos de diferente peso molecular que quedan retenidos en el gel y que no llegan a separarse completamente, cosa que no es de extrañar dada la naturaleza polidispersa de los polisacáridos. La segunda fracción es en todos los casos la más abundante.

La denominación de los polisacáridos en los resultados que siguen se hará mediante dos letras (correspondientes a las iniciales de la especie) y un número

romano (que indica el número de pico en el gráfico de filtración en gel).

Cada una de las fracciones aisladas se recromatografió para comprobar su pureza. Al recromatografiar la fracción T.s.III se obtuvieron dos picos, no bien resueltos, que se recogieron por separado (T.s.III-1 y T.s.III-2).

Los monómeros presentes en las diferentes fracciones se determinaron mediante hidrólisis con H_2SO_4 2 M durante 5 horas a $100^\circ C$ (Tabla 8).

Para una determinación más aproximada de los pesos moleculares de estos polímeros y como comprobación de la separación obtenida por filtración en gel a baja presión se analizaron todas las fracciones F1S por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), técnica que proporciona mayor eficacia en la separación.

Los resultados obtenidos en HPLC analítica concuerdan totalmente con los perfiles de elución previamente obtenidos. Los polisacáridos purificados por filtración en gel a escala preparativa fueron también analizados por HPLC en iguales condiciones que las fracciones F1S enteras con el fin de confirmar su pureza. Los pesos moleculares aproximados de los polisacáridos, calculados en el punto medio del pico, están detallados en las correspondientes figuras.

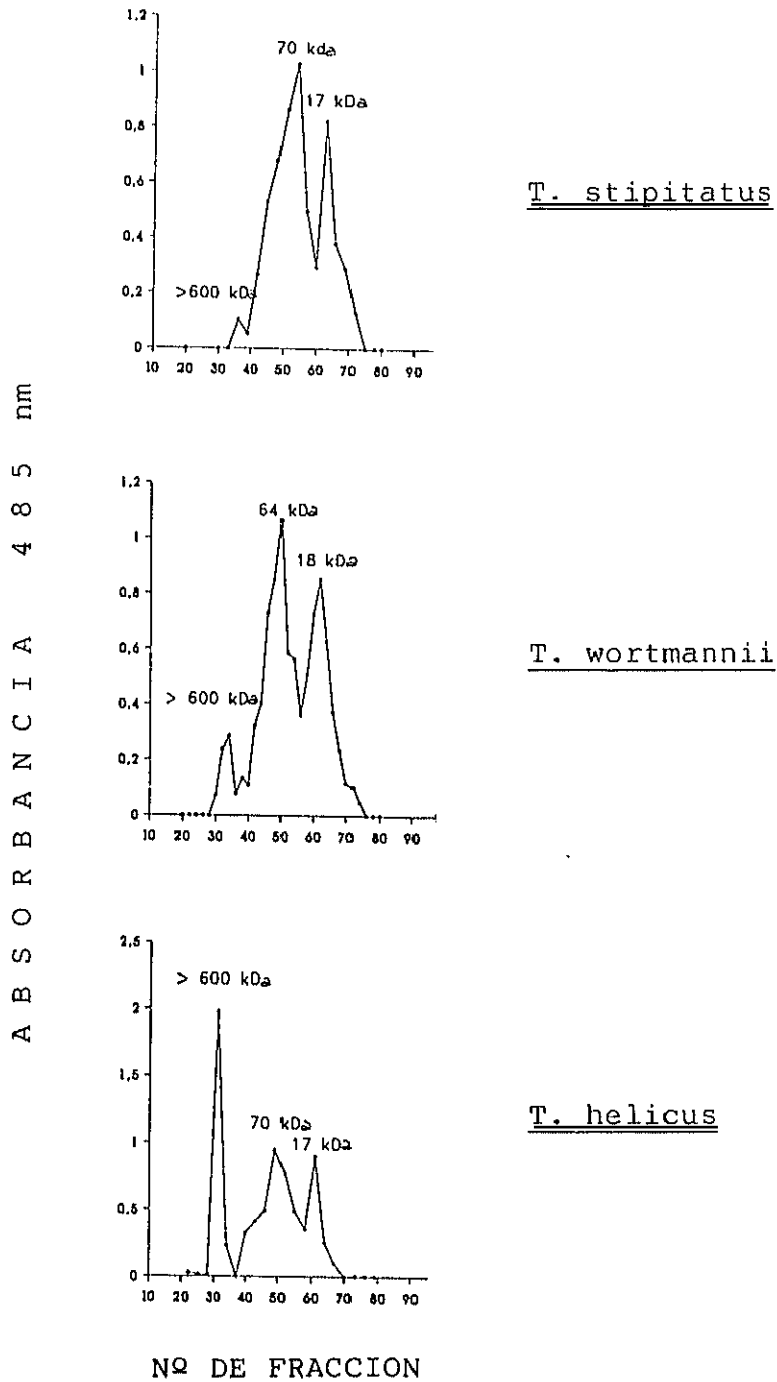


Figura 18.- Filtración a través de Sepharose CL-6B de la F1S de las especies que se indican en cada caso. En el máximo de cada pico figura el peso molecular aproximado, calculado por HPLC.

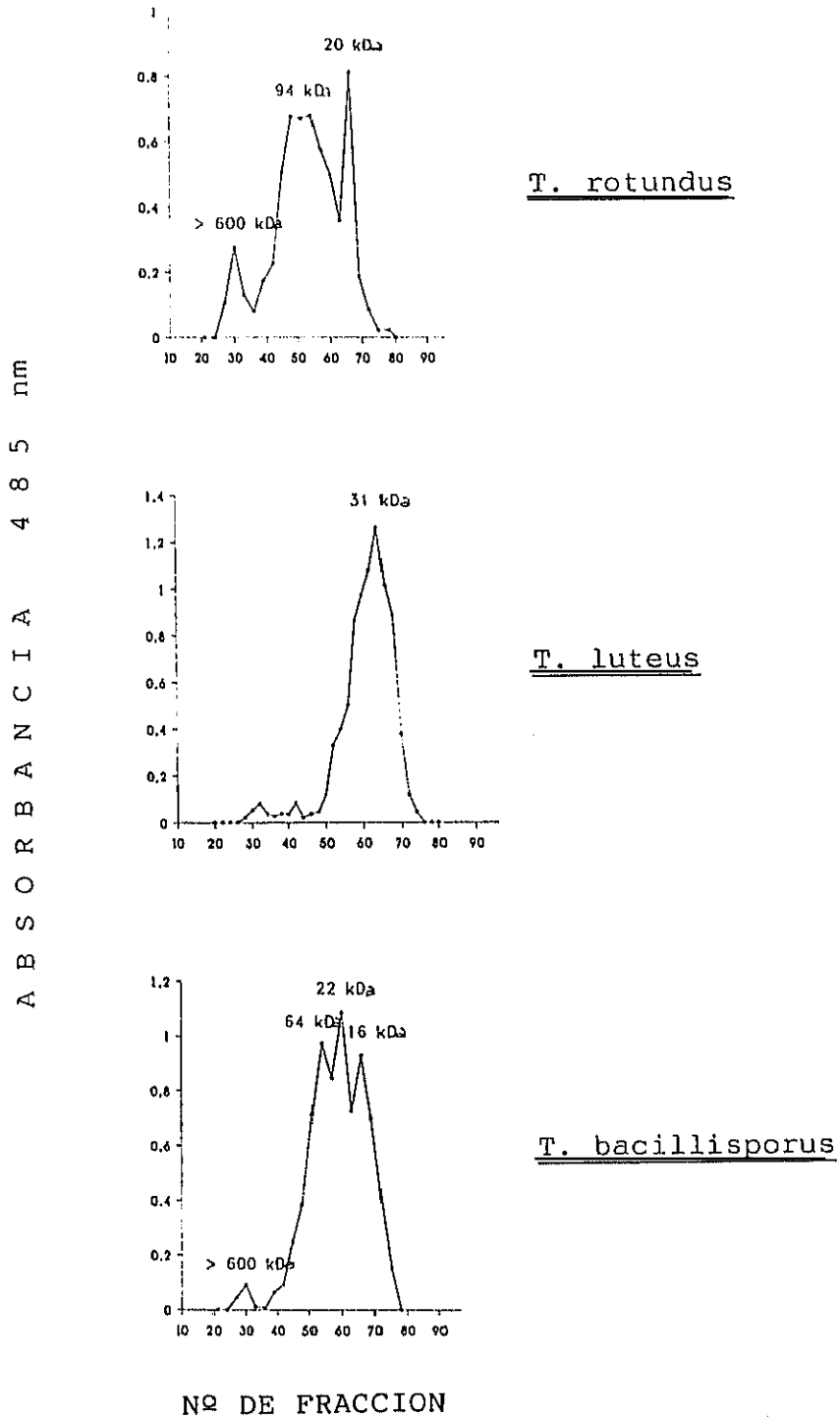


Figura 19.- Filtración a través de Sepharose CL-6B de la FIS de las especies que se indican en cada caso. En el máximo de cada pico figura el peso molecular aproximado, calculado por HPLC.

TABLA 8.- AZUCARES NEUTROS LIBERADOS EN LA HIDROLISIS DE LAS DIFERENTES FRACCIONES PURIFICADAS.

	MAN	GAL	GLU	RECUPERACION (%)
T.s.I (3,5 %)	2,5	6,0	40,0	48,5
T.s.II (54,0 %)	10,8	53,7	11,4	76,9
T.s.III (42,5 %)	6,4	41,4	9,4	57,2
T.w.I (5,0 %)	1,7	6,3	24,7	32,7
T.w.II (70,0 %)	9,5	64,5	6,3	80,3
T.w.III (25,0 %)	7,2	59,6	5,0	71,8
T.h.I (33,6 %)	2,9	5,7	70,6	79,2
T.h.II (46,8 %)	10,4	47,9	13,5	71,7
T.h.III (19,6 %)	3,9	40,8	10,1	54,8
T.r.I (10,5 %)	2,4	3,5	23,6	29,5
T.r.II (64,2 %)	6,9	64,8	5,1	76,8
T.r.III (25,3 %)	3,6	42,5	3,3	49,4
T.l. (100 %)	33,4	28,3	32,9	94,6
T.b.I (2,4 %)	-	-	-	-
T.b.II (33,4 %)	9,0	55,7	9,5	74,3
T.b.III (37,0 %)	9,1	64,2	10,0	83,3
T.b.IV (27,2 %)	3,6	47,6	7,7	58,9

6. ANALISIS ESTRUCTURAL DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS.

El análisis estructural de los polisacáridos mayoritarios se realizó obteniendo sus acetatos de alditol parcialmente metilados y analizándolos por cromatografía de gases-espectrometría de masas. En las tablas sólo se presentará la cuantificación de las fracciones mayoritarias.

6.1.- *Talaromyces stipitatus*.

El polisacárido **T.s.I** (Figura 20A) supone una proporción muy pequeña de la F1S (3,5 %) y está compuesto principalmente por unidades de glucosa enlazadas en (1→4), aunque también se ven pequeñas cantidades de enlaces (1→3).

T.s.II (Figura 20B) es un β-galactofurano con enlaces (1→5) y (1→2) y numerosos puntos de ramificación en la posición 6 de unidades de (1→2) galactofuranosa y de unidades de glucosa. Se detectan también pequeñas cantidades de galactofuranosa en (1→6), galactopiranososa en (1→6) y otra furanosa (posiblemente manosa) en (1→2). Los residuos terminales son de glucopiranososa y de galactofuranosa (Tabla 9).

La estructura de **T.s.III-1** (Figura 20C) es muy similar a la del polisacárido anterior, con una proporción ligeramente superior de residuos de galactofuranosa en (1→2). Otra diferencia entre ambas radica en su peso molecular.

La fracción **T.s.III-2** (Figura 20D) es también similar a las dos anteriores, pero se detectan además residuos de una hexofuranosa enlazada en las posiciones 2 y 6,

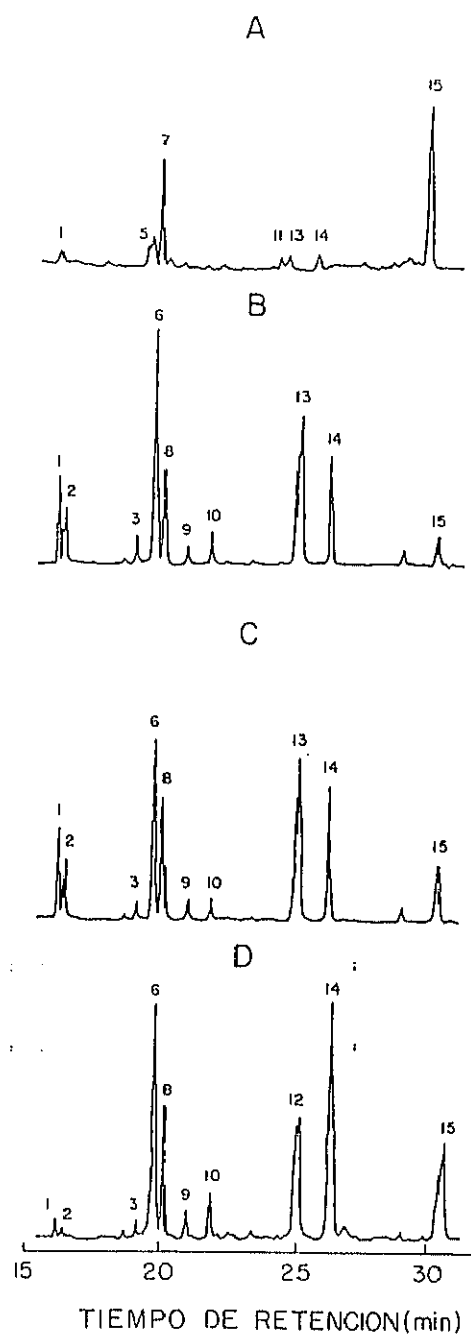


Figura 20.- Cromatogramas correspondientes a los acetatos de aldítol parcialmente metilados de las cuatro fracciones purificadas a partir de la FIS de *T. stipitatus* por filtración en Sepharose CL-6B. A) T.s.I; B) T.s.II; C) T.s.III-1 y D) T.s.III-2.

TABLA 9.- ACETATOS DE ALDITOL PARCIALMENTE METILADOS DETECTADOS EN LA FRACCION T.s.II DE *Talaromyces stipitatus* POR GC-MS.

ALDITOL	RRT*	PROPORCIONES RELATIVAS	PRINCIPALES FRAGMENTOS EN EL ESPECTRO DE MASAS (m/z)	TIPO DE ENLACE
2,3,4,6-Me ₄ -Glu ^b	1,00	0,3	87,88,101,102,118,129,145,161,162,205	Glup-(1→
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	1,09	0,1	45,89,102,118,145,162,205	Gal _f -(1→ ^c
3,5,6-Me ₃ -Gal	1,90	0,4	45,59,89,130,145,190,205,306	→2)-Gal _f -(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	2,13	1	45,102,113,118,162,173,233	→5)-Gal _f -(1→
2,3,5-Me ₃ -Gal	2,64	tr.	102,117,118,130,162,173,233	→6)-Gal _f -(1→
3,5-Me ₂ -Gal	4,90	0,6	88,101,117,130,173,190,233	→2,6)-Gal _f -(1→
2,3,4-Me ₃ -Man	2,22	tr.	102,118,129,130,162,173,189,206,233	→6)-Man _p -(1→
3,4-Me ₂ -Man	4,20	0,7	87,88,129,130,189,190	→2,6)-Man _p -(1→
3,5,6-Me ₃ -Hex	1,66	tr.	45,88,89,130,190,205,306	→2)-Hex _f -(1→

*Tiempo de retención relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol en OV-225 a 170°C.

^b2,3,4,6-Me₄-Glu= 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol, etc. ^cGal_f= galactofuranosa.

cuya identidad no pudo ser determinada debido a que ni mano- ni glucofuranosa aparecen descritos en la bibliografía. La metilación de este polímero es deficiente, como demuestra la desproporción entre residuos terminales (tetrametilados) y puntos de ramificación (derivados dimetilados).

6.2.- Talaromyces wortmannii.

El polisacárido **T.w.I** (Figura 21A) es muy escaso (5%) y se metila con mucha dificultad. Posiblemente sea un polímero lineal de glucosa con enlaces (1→4) y una pequeña cantidad de enlaces (1→3).

El análisis de **T.w.II** (Figura 21B) nos indica que es un β-galactofurano enlazado en (1→2) y (1→3). Encontramos unidades de (1→2,6) galactofuranosa como únicos puntos de ramificación, siendo los residuos terminales de glucopiranososa y galactofuranosa. Otros residuos que aparecen en baja proporción son una piranososa unida en (1→2) y galactosa unida en (1→6) (Tabla 10).

El polisacárido **T.w.III** (Figura 21C) tiene menor peso molecular que la fracción anterior, pero su estructura es prácticamente idéntica.

6.3.- Talaromyces helicus.

A diferencia de los casos anteriores, el pico no retenido en la columna de Sepharose CL-6B es bastante abundante (33,6%). El análisis de **T.h.I** (Figura 22A) nos indica que es un glucano ramificado ((1→4,6)-glucopiranososa) con enlaces (1→4) y (1→3). Los residuos terminales son de glucopiranososa y se encuentran también

TABLA 10.- ACETATOS DE ALDITOL PARCIALMENTE METILADOS DETECTADOS EN LA FRACCION T.w.II DE *Talaromyces wortmannii* POR GC-MS.

ALDITOL	RRT ^a	PROPORCIONES RELATIVAS	PRINCIPALES FRAGMENTOS EN EL ESPECTRO DE MASAS (m/z)	TIPO DE ENLACE
2,3,4,6-Me ₄ -Glu ^b	1,00	0,2	87,88,101,102,118,129,145,161,162,205	Glup-(1→
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	1,09	tr.	45,89,102,118,145,162,205	Gal ^c -(1→ ^c
2,5,6-Me ₃ -Gal	1,90	1	45,59,89,130,145,190,205,306	→3)-Gal ^c -(1→
3,5,6-Me ₃ -Gal	1,90	1	45,59,89,130,145,190,205,306	→2)-Gal ^c -(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	2,13	tr.	45,102,113,118,162,173,233	→5)-Gal ^c -(1→
2,3,5-Me ₃ -Gal	2,64	tr.	102,117,118,130,162,173,233	→6)-Gal ^c -(1→
3,5-Me ₂ -Gal	4,90	0,2	88,101,117,130,173,190,233	→2,6)-Gal ^c -(1→
2,3,4-Me ₃ -Man	2,22	0,1	87,102,118,129,130,162,173,189,206,233	→6)-Man ^p -(1→

^aTiempo de retención relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol en OV-225 a 170°C.

^b2,3,4,6-Me₄-Glu= 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol, etc. ^cGal^c= galactofuranosa.

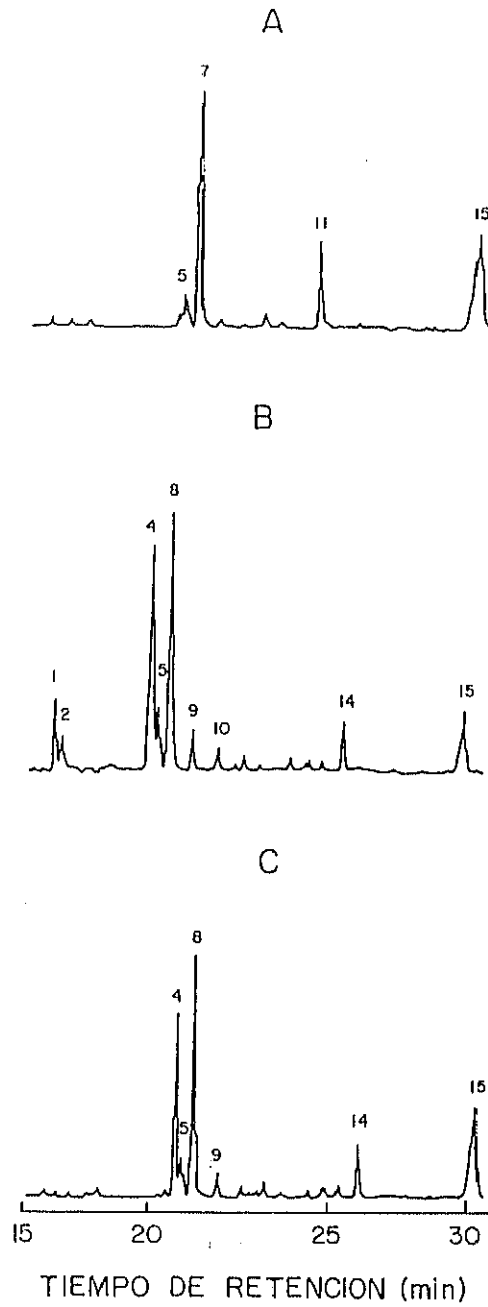


Figura 21.- Cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol parcialmente metilados de las tres fracciones purificadas a partir de la F1S de *T. wortmannii* por filtración en Sepharose CL-6B. A) T.w.I; B) T.w.II y C) T.w.III.

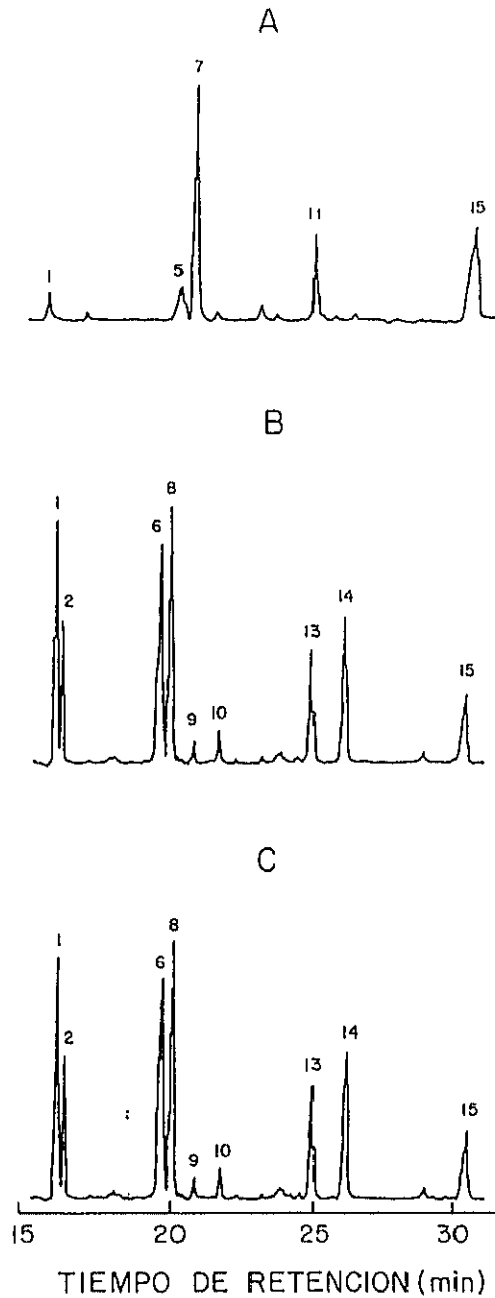


Figura 22.- Cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol parcialmente metilados de las tres fracciones purificadas a partir de la FIS de *T. helicus* por filtración en Sepharose CL-6B. A) T.h.I; B) T.h.II y C) T.h.III.

pequeñas cantidades de residuos de galactofuranosa unida en (1→2) y (1→5). El segundo polisacárido obtenido a partir de la F1S de este hongo (**T.h.II**) es un galactofurano muy parecido al T.s.II. Mayoritariamente está formado por galactofuranosa con enlaces (1→5) y (1→2), con numerosos puntos de ramificación en la posición 6 de estas últimas unidades (Figura 22B y Tabla 11). El polisacárido **T.h.III** (Figura 22C) tiene igual estructura, pero diferente peso molecular.

6.4.- Talaromyces rotundus.

T.r.I (Figura 23A) es un (1→4) glucano con puntos de ramificación en las posiciones 6. Se detectan también residuos de galactofuranosa y glucopiranososa con enlaces (1→3). Todos los residuos terminales son de glucosa.

En **T.r.II** (Figura 23B) encontramos los derivados correspondientes a un galactofurano con uniones (1→2), (1→3) y (1→5). La presencia de 3,5-di-O-metilgalactitol indica que los puntos de ramificación están en las posiciones 6 de residuos de (1→2)-galactofuranosa. Los terminales son monómeros de glucopiranososa y de galactofuranosa. Este polímero tiene además algunas unidades de una hexopiranososa (manosa ó glucosa) y de galactofuranosa enlazadas en (1→6) (Tabla 12).

T.r.III (Figura 23C) es parecido al polisacárido anterior. Los tipos de enlace son los mismos, pero sus proporciones relativas varían ligeramente. Está menos ramificado, aunque los puntos de ramificación están en las mismas posiciones. Casi todos los residuos terminales son de glucosa.

TABLA 11.- ACETATOS DE ALDITOL PARCIALMENTE METILADOS DETECTADOS EN LA FRACCION T.h.II DE *Talaromyces helicus* POR GC-MS.

ALDITOL	RRT ^a	PROPORCIONES RELATIVAS	PRINCIPALES FRAGMENTOS EN EL ESPECTRO DE MASAS (m/z)	TIPO DE ENLACE
2,3,4,6-Me ₄ -Glu ^b	1,00	0,5	87,88,101,102,118,129,145,161,162,205	Glup-(1→
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	1,09	0,3	45,89,102,118,145,162,205	Gal ^c -(1→
3,5,6-Me ₃ -Gal	1,90	1	45,59,89,130,145,190,205,306	→2)-Gal ^c -(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	2,13	1	45,102,113,118,162,173,233	→5)-Gal ^c -(1→
2,3,5-Me ₃ -Gal	2,64	tr.	102,117,118,130,162,173,233	→6)-Gal ^c -(1→
3,5-Me ₂ -Gal	4,90	0,5	88,101,117,130,173,190,233	→2,6)-Gal ^c -(1→
2,3,4-Me ₃ -Man	2,22	tr.	102,118,129,130,162,173,189,206,233	→6)-Man ^c -(1→
3,4-Me ₂ -Man	4,20	0,3	87,88,129,130,189,190	→2,6)-Man ^c -(1→

^aTiempo de retención relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol en OV-225 a 170°C.

^b2,3,4,6-Me₄-Glu= 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol, etc. ^cGal^c= galactofuranosa.

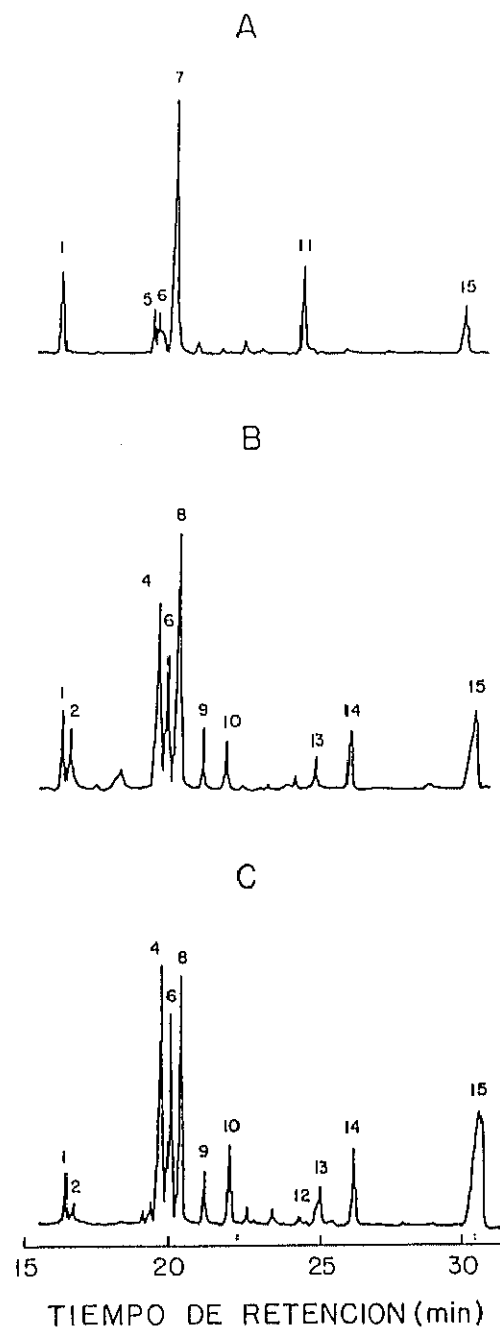


Figura 23.- Cromatogramas correspondientes a los acetatos de aldítol parcialmente metilados de las tres fracciones purificadas a partir de la FIS de *T. rotundus* por filtración en Sepharose CL-6B. A) T.r.I; B) T.r.II y C) T.r.III.

TABLA 12.- ACETATOS DE ALDITOL PARCIALMENTE METILADOS DETECTADOS EN LA FRACCION T.r.II DE *Talaromyces rotundus* POR GC-MS.

ALDITOL	RRT ^a	PROPORCIONES RELATIVAS	PRINCIPALES FRAGMENTOS EN EL ESPECTRO DE MASAS (m/z)	TIPO DE ENLACE
2,3,4,6-Me ₄ -Glu ^b	1,00	0,2	87,88,101,102,118,129,145,161,162,205	Glup-(1→
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	1,09	0,1	45,89,102,118,145,162,205	Gal ^c -(1→
2,5,6-Me ₃ -Gal	1,90	0,8	45,59,89,130,145,190,205,306	→3)-Gal ^c -(1→
3,5,6-Me ₃ -Gal	1,90	1	45,59,89,130,145,190,205,306	→2)-Gal ^c -(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	2,13	0,4	45,102,113,118,162,173,233	→5)-Gal ^c -(1→
2,3,5-Me ₃ -Gal	2,64	0,1	102,117,118,130,162,173,233	→6)-Gal ^c -(1→
3,5-Me ₂ -Gal	4,90	0,2	88,101,117,130,173,190,233	→2,6)-Gal ^c -(1→
2,3,4-Me ₃ -Man	2,22	0,1	102,118,129,130,162,173,189,206,233	→6)-Man ^c -(1→
3,4-Me ₂ -Man	4,20	0,1	87,88,129,130,189,190	→2,6)-Man ^c -(1→

^aTiempo de retención relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol en OV-225 a 170°C.

^b2,3,4,6-Me₄-Glu= 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol, etc. ^cGal^c= galactofuranosa.

6.5.- *Talaromyces luteus*.

La fracción T.I. (Figura 24) es igual a la F1S de esta especie ya que se obtiene un único pico por cromatografía de exclusión molecular. Su estructura es compleja y diferente al resto de las estudiadas en este trabajo. Parece estar muy ramificado y los derivados metilados más abundantes corresponden precisamente a residuos terminales de glucopiranososa y puntos de ramificación (1→2,6-manopiranososa). Hay también abundante (1→6) manopiranososa y presenta al menos otros seis componentes en menor cantidad (Tabla 13).

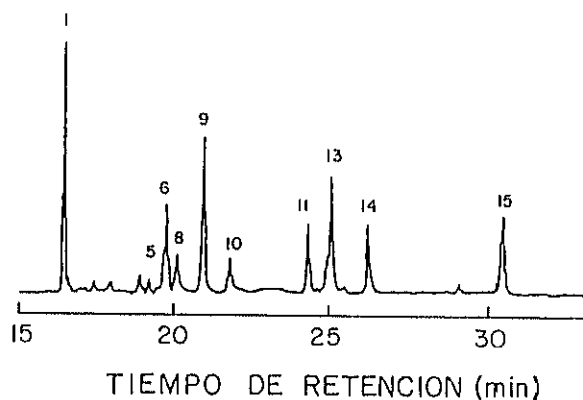


Figura 24.- Cromatograma correspondiente a los acetatos de alditol parcialmente metilados de la fracción T.I. purificada a partir de la F1S de *T. luteus* por filtración en Sepharose CL-6B.

TABLA 13.- ACETATOS DE ALDITOL PARCIALMENTE METILADOS DETECTADOS EN LA FRACCION T.I. DE *Talaromyces luteus* POR GC-MS.

ALDITOL	RRT*	PROPORCIONES RELATIVAS	PRINCIPALES FRAGMENTOS EN EL ESPECTRO DE MASAS (m/z)	TIPO DE ENLACE
2,3,4,6-Me ₄ -Glu ^b	1,00	0,9	87,88,101,102,118,129,145,161,162,205	Glup-(1→
3,5,6-Me ₃ -Gal	1,90	0,2	45,59,89,130,145,190,205,306	→2)-Galf-(1→ ^c
2,3,6-Me ₃ -Gal	2,13	0,5	45,102,113,118,162,173,233	→5)-Galf-(1→
2,3,5-Me ₃ -Gal	2,64	0,1	102,117,118,130,162,173,233	→6)-Galf-(1→
3,5-Me ₂ -Gal	4,90	0,5	88,101,117,130,173,190,233	→2,6)-Galf-(1→
2,3,4-Me ₃ -Man	2,22	1	102,118,129,130,162,173,189,206,233	→6)-Manp-(1→
3,4-Me ₂ -Man	4,20	0,9	87,88,129,130,189,190	→2,6)-Manp-(1→
4,6-Me ₂ -Man	2,92	0,5	45,101,161,201,261	→2,3)-Manp-(1→

*Tiempo de retención relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol en OV-225 a 170°C.

^b2,3,4,6-Me₄-Glu= 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol, etc. ^cGalf= galactofuranosa.

6.6.- Talaromyces bacillisporus.

La primera fracción obtenida por filtración en Sepharose CL-6B (**T.b.I**) representa un 2,4% de la F1S y no se pudo analizar por su insolubilidad en DMSO.

T.b.II (Figura 25A) está formada mayoritariamente por unidades de galactofuranosa unidas en (1→5) y (1→2), con abundantes puntos de ramificación (se detectaron monómeros de una hexopiranososa y de galactofuranosa enlazados en las posiciones 2 y 6). Los residuos terminales son mayoritariamente de glucopiranososa, aunque también se encontró algo de galactofuranosa terminal (Tabla 14).

T.b.III (Figura 25B) está formada por los mismos monómeros que la anterior, aunque sus proporciones varían ligeramente. Posiblemente la principal diferencia entre ambas estriba en su peso molecular.

T.b.IV (Figura 25C) es también similar en su estructura a las dos anteriores, pero al igual que ocurre en T.s.III-2, encontramos residuos de mano- o glucofuranosa en puntos de ramificación (con enlaces en las posiciones 2 y 6).

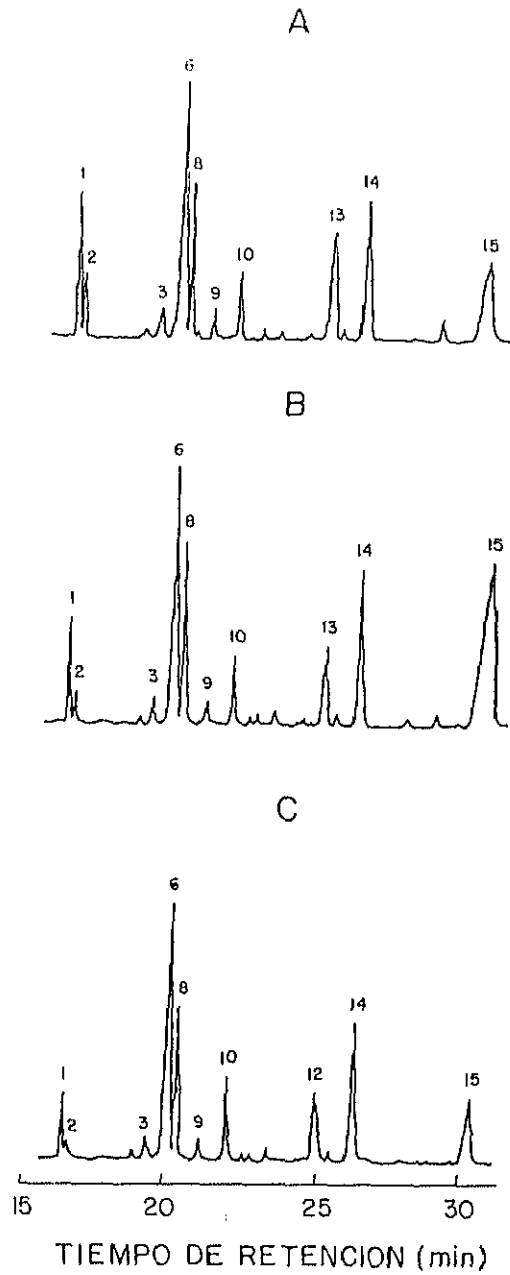


Figura 25.- Cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol parcialmente metilados de las tres fracciones purificadas a partir de la F1S de *T. bacillisporus* por filtración en Sepharose CL-6B. A) T.b.II; B) T.b.III y C) T.b.IV.

TABLA 14.- ACETATOS DE ALDITOL PARCIALMENTE METILADOS DETECTADOS EN LA FRACCION T.b.II DE *Talaromyces bacillisporus* POR GC-MS.

ALDITOL	RRT*	PROPORCIONES RELATIVAS	PRINCIPALES FRAGMENTOS EN EL ESPECTRO DE MASAS (m/z)	TIPO DE ENLACE
2,3,4,6-Me ₄ -Glu ^b	1,00	0,4	87,88,101,102,118,129,145,161,162,205	Glup-(1→
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	1,09	0,1	45,89,102,118,145,162,205	Gal ^c -(1→
3,5,6-Me ₃ -Gal	1,90	0,5	45,59,89,130,145,190,205,306	→2)-Gal ^c -(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	2,13	1	45,102,113,118,162,173,233	→5)-Gal ^c -(1→
2,3,5-Me ₃ -Gal	2,64	0,1	102,117,118,130,162,173,233	→6)-Gal ^c -(1→
3,5-Me ₂ -Gal	4,90	0,5	88,101,117,130,173,190,233	→2,6)-Gal ^c -(1→
2,3,4-Me ₃ -Man	2,22	tr.	102,118,129,130,162,173,189,206,233	→6)-Man ^c -(1→
3,4-Me ₂ -Man	4,20	0,5	87,88,129,130,189,190	→2,6)-Man ^c -(1→
3,5,6-Me ₃ -Hex	1,66	tr.	45,88,89,130,190,205,306	→2)-Hex ^c -(1→

*Tiempo de retención relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol en OV-225 a 170°C.

^b2,3,4,6-Me₄-Glu= 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol, etc. ^cGal^c= galactofuranosa.

7. CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES INSOLUBLES EN AGUA (FII).

7.1.- Carbohidratos neutros totales.

Se determinó el porcentaje de carbohidratos en estas fracciones mediante el método de la antrona. Los resultados figuran en la Tabla 15. Los valores obtenidos para *T. stipitatus*, *T. wortmannii* y *T. helicus*, inferiores al 54%, se deben a la resistencia de estos polisacáridos al tratamiento con ácido.

TABLA 15.- CARBOHIDRATOS NEUTROS TOTALES DE LAS FRACCIONES FII.

<i>T. stipitatus</i>	41,6 %
<i>T. wortmannii</i>	42,6 %
<i>T. helicus</i>	54,8 %
<i>T. rotundus</i>	74,8 %
<i>T. luteus</i>	75,4 %
<i>T. bacillisporus</i>	82,4 %

7.2.- Análisis químico.

Todas las fracciones FII se hidrolizaron con H_2SO_4 2 M y por hidrólisis Saeman. En la Tabla 16 vemos los resultados obtenidos en la hidrólisis Saeman, que fue la que dio mejores rendimientos.

7.3.- Análisis estructural.

7.3.1.- Espectroscopía infrarroja.

En la Figura 26 se recogen los espectros infrarrojos de las fracciones FII de cada una de las especies. *T. stipitatus*, *T. wortmannii* y *T. helicus* tienen la banda a 890 cm^{-1} característica de anómeros en configuración β . *T. luteus*, *T. rotundus* y *T. bacillisporus* presentan bandas a 820 y 850 cm^{-1} típicas de anómeros en configuración α .

7.3.2.- Degradación de Smith de los polisacáridos.

Las fracciones FII fueron oxidadas con periodato sódico 0,015 M como se describe en el apartado 8.2 de Materiales y Métodos. Tras las correspondientes etapas de reducción, hidrólisis ácida y transformación en los acetatos de alditol, se detectaron los productos que se detallan en la Tabla 17.

Las FII obtenidas a partir de *T. stipitatus* y *T. bacillisporus* son prácticamente iguales, con un 85-87 % de (1 \rightarrow 3) glucopiranosas. Se detecta también

TABLA 16.- AZUCARES NEUTROS LIBERADOS EN LA HIDROLISIS SAEMAN DE LA FRACCION F1I DE VARIAS ESPECIES DE *Talaromyces*.

	ARA	XIL	MAN	GAL	GLU	%
<i>T. stipitatus</i>	2,6	14,7	8,3	18,0	26,1	69,7
<i>T. wortmannii</i>	1,9	8,3	4,7	23,6	21,1	59,6
<i>T. helicus</i>	0,7	0,5	3,9	8,1	64,7	77,9
<i>T. rotundus</i>	1,8	2,0	3,2	7,1	86,0	99,8
<i>T. luteus</i>	tr.	tr.	2,8	1,1	95,1	99,0
<i>T. bacillisporus</i>	1,8	4,6	4,8	3,4	85,1	99,7

aproximadamente un 4 % de glicerol, que puede proceder de distintos monómeros en la estructura original.

Las F1I de *T. rotundus* y *T. bacillisporus* son (1→3) glucanos lineales.

La de *T. wortmannii* parece tener una estructura bastante más complicada, puesto que se detectan muchos productos de degradación, siendo los mayoritarios glucosa (23% procedente de enlaces (1→3) o de puntos de ramificación) y un 23% de eritritol (de enlaces (1→4) de glucosa o manosa).

Los principales tipos de enlace en la F1I de *T. helicus* son (1→3) y (1→4)-glucosa.

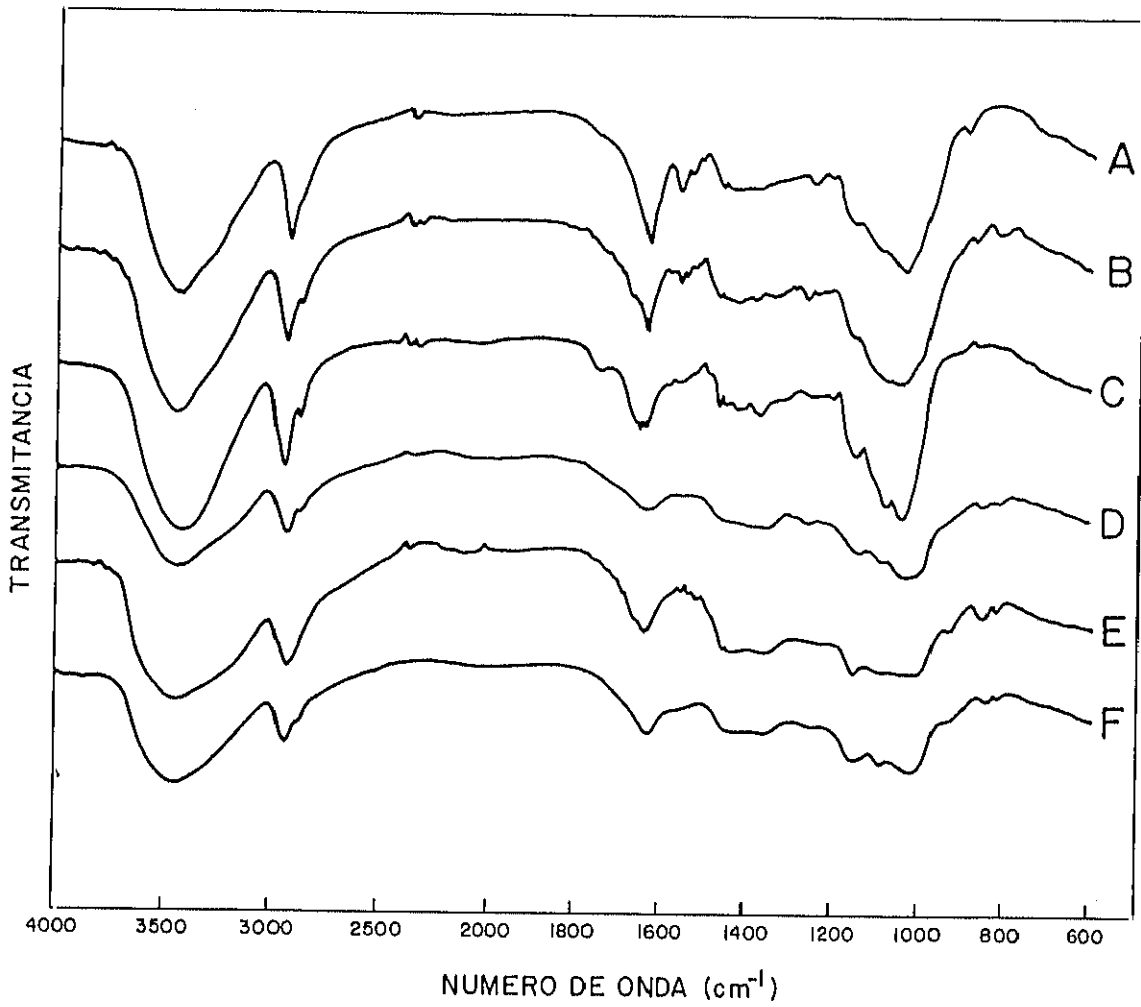


Figura 26.- Espectros infrarrojos de las fracciones FII obtenidas de las paredes celulares de:
A) *T. stipitatus*; B) *T. wortmannii*; C) *T. helicus*; D) *T. rotundus*; E) *T. luteus* y F) *T. bacillisporus*.

TABLA 17.- PORCENTAJES MOLARES DE LOS PRODUCTOS DE LA DEGRADACION DE SMITH DE LA FRACCION FII DE VARIAS ESPECIES DE *Talaromyces*.

	GLI	ERI	TRE	RIB	ARA	XIL	MAN	GAL	GLU
<i>T. stipitatus</i>	4,3	3,3	1,4	0,0	1,8	0,0	0,0	1,3	87,2
<i>T. wortmannii</i>	16,2	23,0	0,0	0,0	7,9	16,8	2,8	1,1	32,2
<i>T. helicus</i>	7,4	17,1	2,7	0,0	3,0	1,6	2,6	1,8	63,8
<i>T. rotundus</i>	0,8	0,0	1,6	0,0	0,9	0,0	1,2	0,0	95,6
<i>T. luteus</i>	0,9	3,6	0,0	0,0	0,9	0,0	2,2	0,0	92,4
<i>T. bacillisporus</i>	3,9	1,9	0,0	0,0	1,9	5,6	1,6	0,0	85,1

7.3.3.- Resonancia magnética nuclear.

Se obtuvieron los espectros de protón de las fracciones FII (asignaciones de las señales en la Tabla 18) y de ^{13}C (Figuras 27 y 28) como análisis complementario a la oxidación con periodato sódico, ya que la extrema insolubilidad de estos polímeros en DMSO hizo infructuosos todos los intentos de metilación. Los espectros de la FII de *T. helicus* no pudieron conseguirse, ya que se encontraron problemas al disolverlo en NaOD.

Las asignaciones de las señales registradas por ^{13}C -RMN están en la Tabla 19. Las señales obtenidas para la β -(1 \rightarrow 3)-glucopiranososa no se corresponden bien con las descritas en la bibliografía para este tipo de enlace en ninguna de las dos especies

TABLA 18.- ASIGNACION DE LAS SEÑALES MAYORITARIAS REGISTRADAS EN LOS ESPECTROS DE ^1H -RMN DE LAS FRACCIONES FIL.

	H-1 (ppm)	$J_{1,2}$ (Hz)
A)		
α -piranosa	4,95	<4
B)		
β -piranosa	4,16 ^b -4,18 ^a	8,1 ^a -8,2 ^b

A) En *T. rotundus*, *T. luteus* y *T. bacillisporus*; B) ^aEn *T. stipitatus*; ^bEn *T. wortmannii*.

TABLA 19.- ASIGNACIONES DE LAS SEÑALES MAYORITARIAS REGISTRADAS EN LOS ESPECTROS DE ^{13}C -RMN DE LAS FRACCIONES FIL.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
A)						
$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-GlcP-1}\rightarrow$	101,6	72,2	84,9	71,7	74,1	62,4
B)						
$\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-GlcP-1}\rightarrow$	101,1	73,7	82,4	72,1	74,9	62,3
C)						
No asignado	101,5	75,2	74,2	72,5	70,5	62,5

A) En *T. rotundus*, *T. luteus* y *T. bacillisporus*; B) En *T. stipitatus*; C) En *T. wortmannii*.

que la contienen, especialmente en la fracción FII de *T. wortmannii*. Esto puede ser debido a que estos residuos estén unidos a xilosa (ambas fracciones contienen dicha pentosa), variando los desplazamientos químicos con respecto a los datos publicados para los β -glucanos.

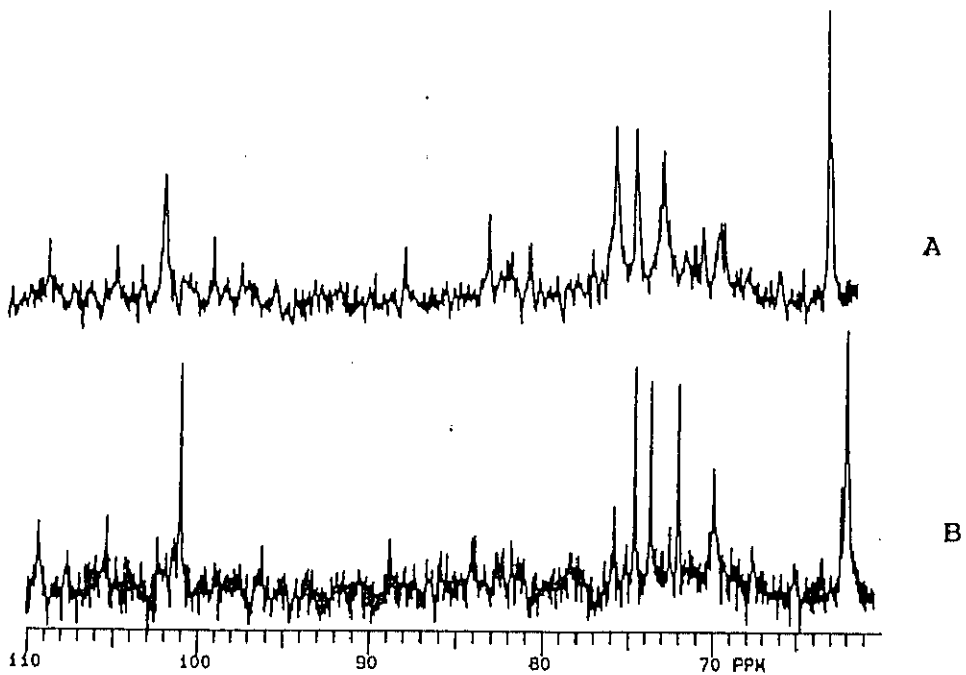


Figura 27.- Espectros de ^{13}C -RMN de las fracciones FII de : A) *T. wortmannii* y B) *T. stipitatus*.

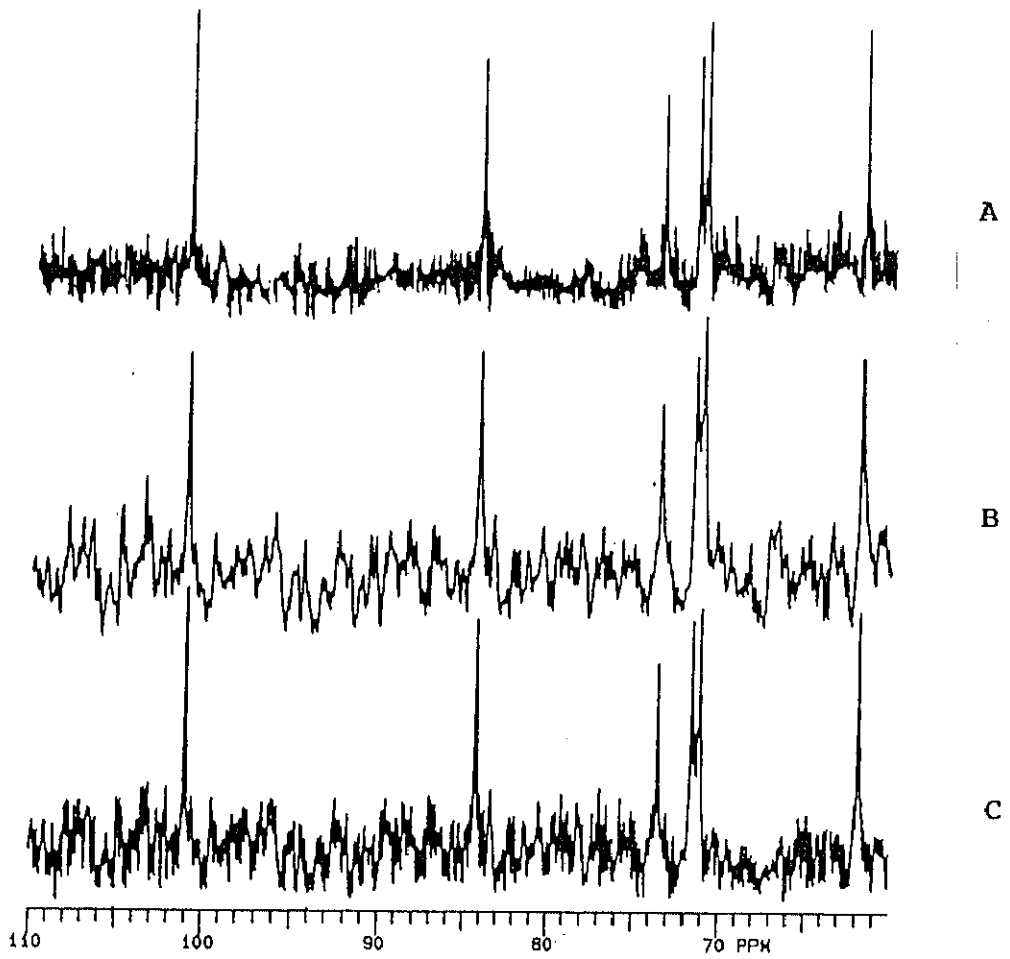


Figura 28.- Espectros de ^{13}C -RMN de las fracciones F11 de: A) *T. luteus*; B) *T. rotundus* y C) *T. bacillisporus*.

8. COMPOSICION DE LA F1 DE HONGOS DE GENEROS RELACIONADOS CON *Talaromyces*.

En nuestro laboratorio se había descrito que la composición de la pared de varias especies de *Penicillium* mostraba diferencias y lo mismo ocurría al estudiar especies de los géneros *Talaromyces* y *Eupenicillium*. Estas diferencias deberían reflejarse en los polisacáridos que forman la pared. Para demostrarlo y ver qué variaciones había se extrajeron las fracciones F1S y F1I de varias especies de los géneros *Eupenicillium*, *Penicillium* y *Aspergillus*. La fracción F1S representó entre el 2,5 y el 6,2%, y la F1I entre un 16,2 y un 32,5%.

En la Tabla 20 se presenta la composición química de ambas fracciones para cada especie.

En la F1S el azúcar más abundante es la galactosa, con menores cantidades de glucosa y manosa. Hay que señalar que *P. brevicompactum* tiene un 22% de glucosa, pero ésta no se detecta en el espectro de RMN. Esto indica que la glucosa detectada en la hidrólisis de esta fracción procede de una contaminación de algún otro polímero de la pared, y que se elimina en la centrifugación previa al análisis por RMN.

Toda la galactosa de las fracciones F1S se liberó al hidrolizar con H_2SO_4 0,05 M, lo que indica que este monómero está en configuración furanósica.

Las fracciones F1S se analizaron estructuralmente por ^{13}C -RMN, encontrándose en los espectros de todas ellas (Figura 29) únicamente las señales características de un polímero de galactofuranosa enlazada en β -(1 \rightarrow 5).

TABLA 20.- AZUCARES NEUTROS LIBERADOS EN LA HIDROLISIS DE LAS FRACCIONES FIS Y FII DE VARIAS ESPECIES.

	FIS				RECUPERACION (%)
	XIL	MAN	GAL	GLU	
<i>Eupenicillium crustaceum</i>	0,0	5,8	76,0	4,9	86,7
<i>Penicillium brevicompactum</i>	tr.	7,0	26,0	22,0	55,0
<i>Penicillium decumbens</i>	tr.	4,5	85,6	8,5	98,6
<i>Aspergillus flavipes</i>	1,6	7,7	41,7	6,4	57,4
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,6	5,7	52,5	6,4	65,2

	FII				RECUPERACION (%)
	XIL	MAN	GAL	GLU	
<i>Eupenicillium crustaceum</i>	0,0	0,4	0,0	52,1	52,5
<i>Penicillium brevicompactum</i>	1,9	0,0	2,3	90,2	94,4
<i>Penicillium decumbens</i>	0,0	0,6	1,8	88,2	90,6
<i>Aspergillus flavipes</i>	1,0	0,6	0,0	42,2	43,8
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1,0	0,7	5,0	63,5	70,2

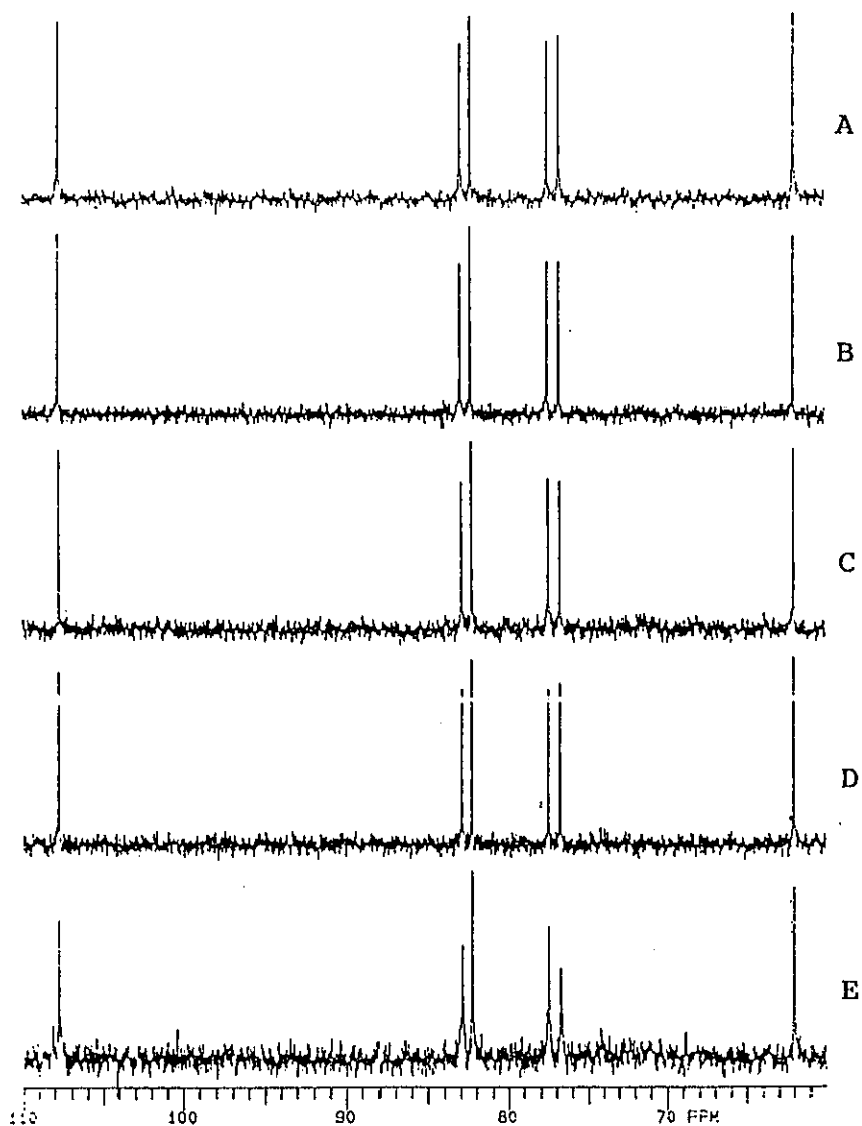


Figura 29.- Espectros de ^{13}C -RMN de las fracciones FIS de: A) *E. crustaceum*; B) *P. decumbens*; C) *P. brevi-compactum*; D) *A. ochraceus* y E) *A. flavipes*.

Viendo que las FIS obtenidas a partir de todas estas especies eran iguales, se escogió una de ellas, la de *E. crustaceum*, para purificarla por filtración en Sepharose CL-6B (Figura 30). Se obtuvieron dos picos, uno de los cuales representaba el 90% de la FIS (E.c.II) y tenía un Pm aproximado de 17 kDa. El otro (E.c.I), que supuso un 10% de la FIS, quedaba totalmente excluido del gel.

La fracción E.c.II se metiló, resultando ser el (1→5)-galactano.

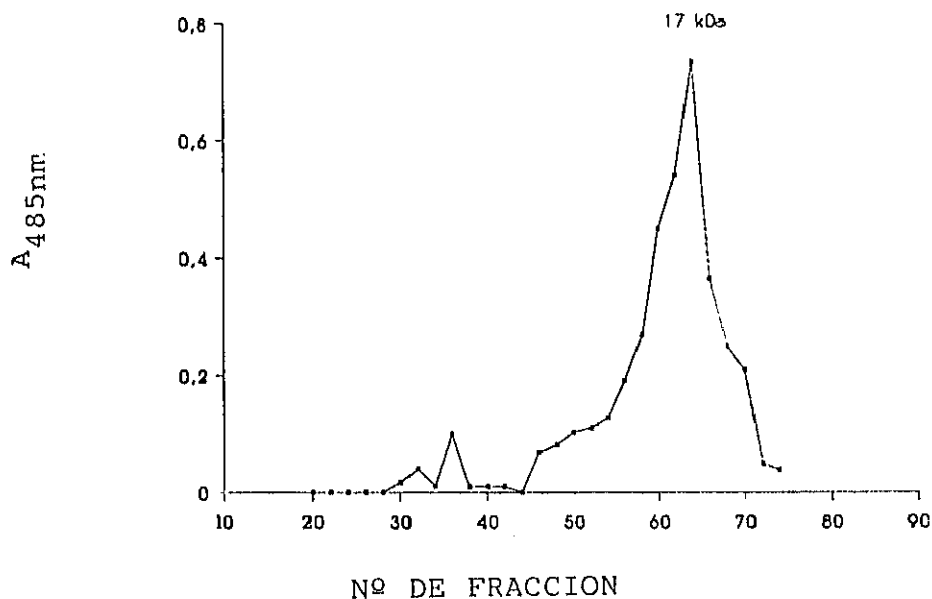


Figura 30.- Filtración a través de Sepharose CL-6B de la FIS de *E. crustaceum*.

9. OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO DE *Penicillium oxalicum*. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD GALACTANASA.

9.1.- Purificación de la actividad galactanasa.

Una vez obtenido el líquido de cultivo de *Penicillium oxalicum*, se concentró 10 veces y se distribuyó en alícuotas de 4 ml que fueron congeladas. Varias de estas fracciones se emplearon para someterlas a distintos tratamientos iniciales.

Utilizando como sustrato el β -(1 \rightarrow 5)-galactofurano de *E. crustaceum*, se midió la actividad enzimática de:

- a) El extracto concentrado.
- b) El líquido resultante de filtrar el extracto a través de carbón vegetal.
- c) El extracto precipitado con un 1% de ácido tánico.

La mayor actividad se encontró en el extracto concentrado y por este motivo el resto de la purificación se realizó con este material.

Una fracción de 4 ml se cargó en una columna de Sephadex G-200 equilibrada con tampón fosfato 14 mM a pH 6,5 para eliminar un pigmento fenólico amarillo que aparece en distintas cepas de *P. oxalicum* (Reyes y col., 1981) y que presenta una fuerte absorción a 280 nm. Se recogieron fracciones de 3,5 ml midiendo en cada una de ellas la D.O. a 280 nm (Figura 31). Se obtuvieron tres fracciones con actividad β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranasa, a las que denominamos A, B y C, y que representaron

TABLA 21.- PURIFICACION DE LA ENZIMA β -(1 \rightarrow 5)-GALACTOFURANASA.

ETAPA DE PURIFICACION	ACT. TOTAL PROTEINA (Unidades)	PROTEINA (mg)	ACT. ESPECIF. (unidades.mg ⁻¹)	PURIFICACION (n ^o veces)	RENDIMIENTO (%)
Concentrado inic.	0,211	6,00	0,035	1	100
Sephadex G-200	0,148	0,60	0,247	7	70
PD-10	0,133	0,60	0,222	6	63
Mono Q HR 5/5	0,062	0,13	0,477	14	29
Superosa 6 HR 10/30	0,192	0,06	3,200	91	91

respectivamente un 5,4%, 73,5% y 20,6% de la actividad total. El pigmento eluyó junto con la fracción C.

La fracción B se filtró a través de una columna de PD-10 para eliminar las sales y a continuación se prosiguió con la purificación por FPLC de intercambio iónico en una columna Mono Q HR 5/5 equilibrada con tampón fosfato sódico 10 mM a pH 7,2. Un 76% de la actividad no queda retenida en la columna en estas condiciones, eluyendo antes de la aplicación del gradiente de NaCl (Figura 32). Esta fracción no retenida se cargó en una columna de filtración en gel para FPLC Superosa 6 HR 10/30 (Figura 33).

En la Tabla 21 se resume el proceso total de purificación de la enzima β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranasa.

La enzima β -(1 \rightarrow 5)-galactanasa se purificó 91 veces con un rendimiento del 91%. Este elevado rendimiento se debe a que en la última etapa de purificación se

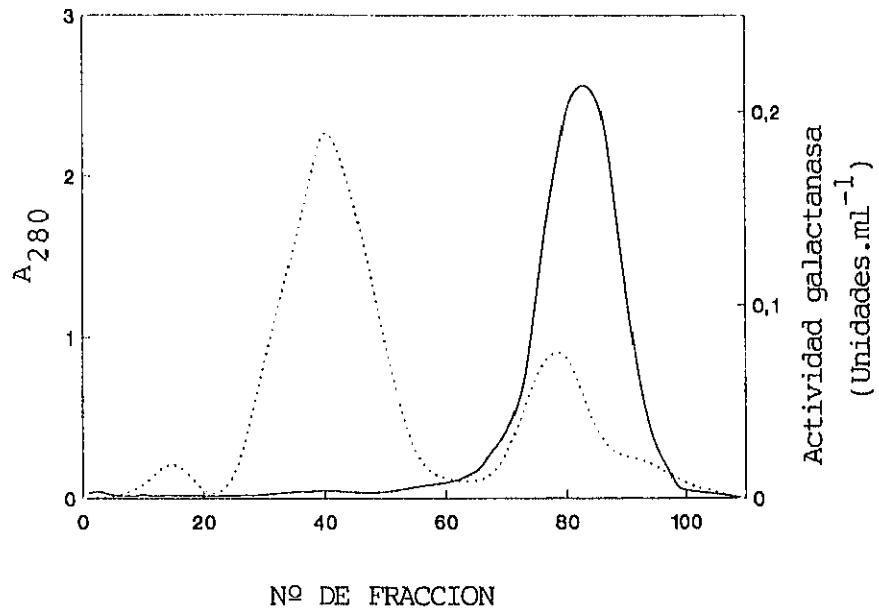


Figura 31.- Purificación de la actividad β -(1 \rightarrow 5)-galactanasa a través de Sephadex G-200 con tampón fosfato 14 mM a pH 6,5.

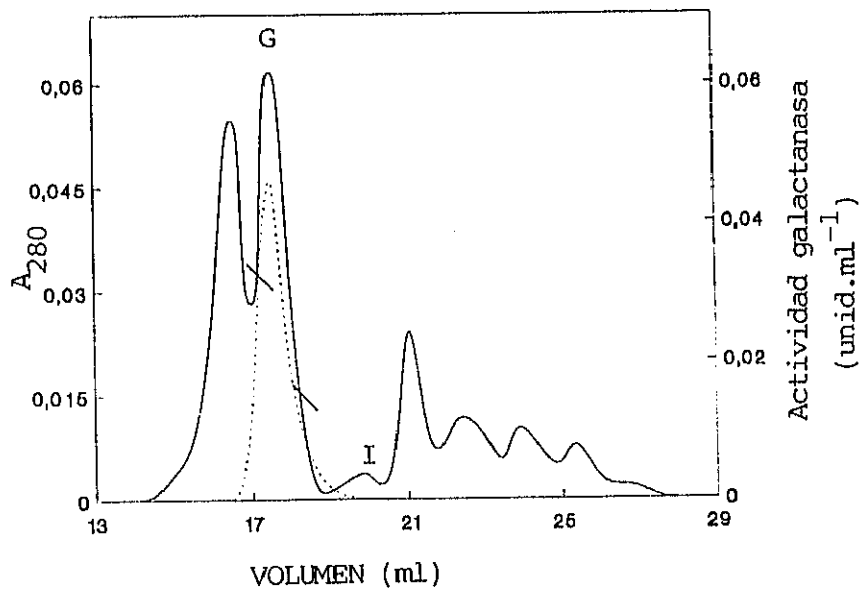


Figura 32.- Purificación de la actividad galactanasa a través de Mono Q HR 5/5, equilibrada con tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,2.

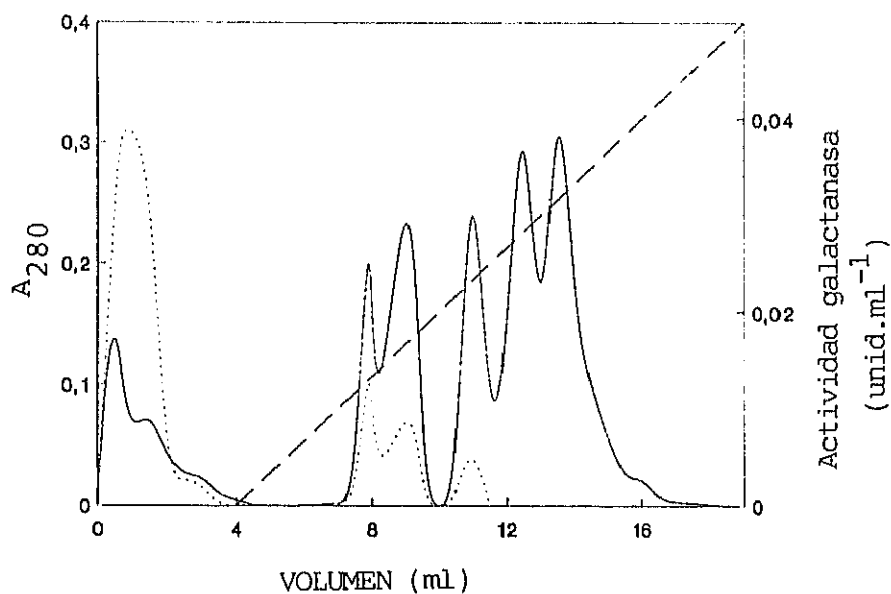


Figura 33.- Filtración en gel a través de Superose 6 HR 10/30 equilibrada con tampón fosfato sódico 50 mM pH 5,2/NaCl 150 mM. Las barras (λ) indican la fracción que se recogió como enzima purificada. G es la galactofuranasa; I es un inhibidor.

eliminó un inhibidor, caracterizado como un polisacárido. Dicho polisacárido (30 μ g) inhibía el 70% de la actividad de la galactanasa purificada (60 μ g). La comprobación de la pureza de la enzima se hizo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con y sin SDS, migrando en ambos casos como una única banda (Figura 34).

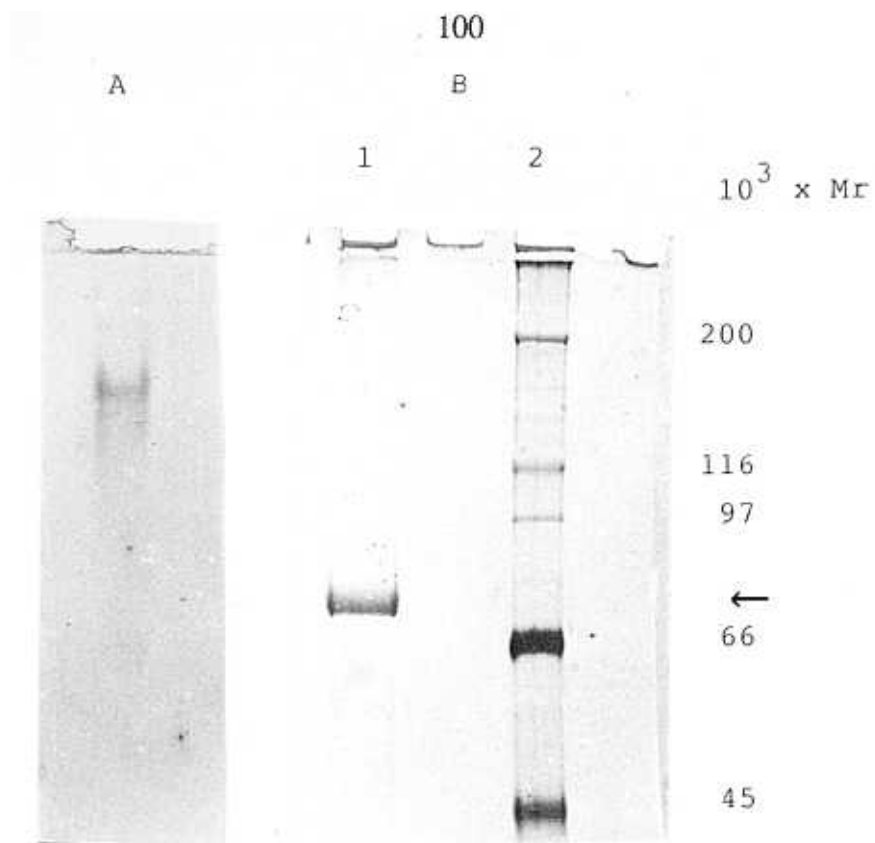


Figura 34.- Electroforesis en gel de poliacrilamida de la endo- β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranasa: A) en condiciones nativas; B) en condiciones desnaturalizantes. Carril 1: problema; Carril 2: patrones.

9.2.- Caracterización físico-química y cinética de la enzima β -(1 \rightarrow 5)-galactanasa.

9.2.1.- pH óptimo y estabilidad al pH.

La enzima presenta un máximo de actividad a pH 5,0. Tras un período de incubación de 2 h a 25°C y a distintos valores de pH, se comprobó su estabilidad en un rango comprendido entre 4,0 y 7,5.

9.2.2.- Punto isoeléctrico.

Al realizar el isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida con anfólitos en un rango de pH entre 3,5 y 10, la enzima purificada se resolvió en una sola banda que correspondió a un pH aproximado de 7,9.

9.2.3.- Peso molecular.

El peso molecular de la enzima purificada se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, encontrándose un valor aproximado de 77000 D (Figura 34). Al determinar el peso molecular aparente por filtración en gel de Superosa 6 se encontró un valor menor que el determinado por electroforesis. Este hecho puede deberse a una interacción hidrofóbica de la proteína con el gel en las condiciones de ensayo con NaCl 150 mM. Este efecto se observó en valores de pH comprendidos entre 5,5 y 7,2.

9.2.4.- Análisis de azúcares en la enzima.

La β -(1 \rightarrow 5)-galactanasa es una glicoproteína con un contenido en carbohidratos que oscila entre el 18% y el 22%, y de los cuales la galactosa es el monómero más abundante.

9.2.5.- Determinación de la constante de Michaelis-Menten.

La afinidad de la enzima por el β -(1 \rightarrow 5)-galactano de *E. crustaceum* se estimó determinando la constante de Michaelis-Menten a partir de la representación

gráfica de Lineweaver-Burk, obteniéndose un valor de $1,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. La velocidad máxima fue de $0,55 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$.

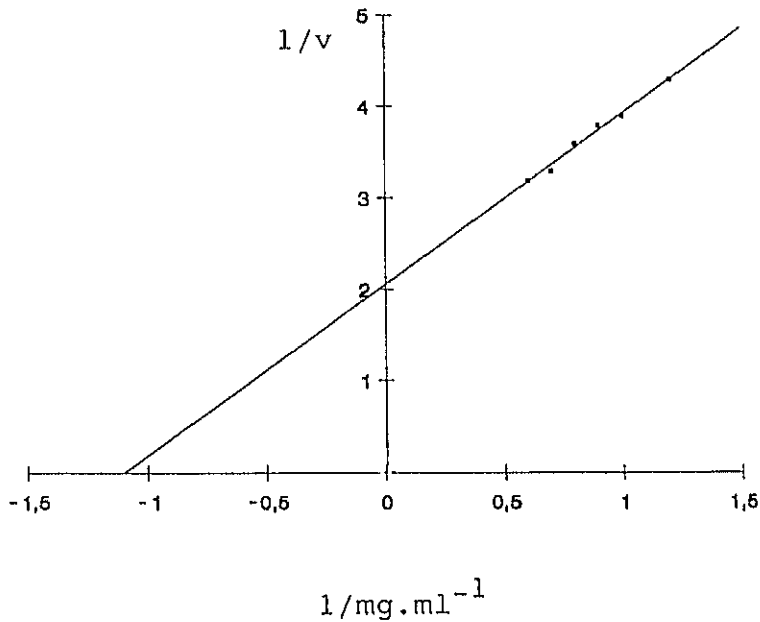


Figura 35.- Representación gráfica de Lineweaver-Burk para el cálculo de la K_m y la velocidad máxima.

9.2.6.- Efecto de distintos iones.

Al estudiar el efecto de diferentes iones (a una concentración 50 mM) sobre la actividad enzimática, se observó una fuerte inhibición por la mayoría de los iones ensayados, como acetato, borato y citrato. La inhibición fue total con Fe^{3+} .

TABLA 22.- ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LA ENZIMA β -(1 \rightarrow 5)-GALACTOFURANASA.

SUSTRATO	COMPOSICION QUIMICA	% DE HIDROLISIS*
F1S de:		
<i>E. crustaceum</i>	β -(1 \rightarrow 5)-Galactofuranosa	100
<i>T. flavus</i>	(1 \rightarrow 5)(1 \rightarrow 2)-Galactofuranosa	33
<i>T. stipitatus</i>	(1 \rightarrow 5)(1 \rightarrow 2)-Galactofuranosa	30
<i>T. helicus</i>	(1 \rightarrow 5)(1 \rightarrow 2)-Galactofuranosa	25
<i>T. bacillisporus</i>	(1 \rightarrow 5)(1 \rightarrow 2)-Galactofuranosa	30
<i>T. wortmannii</i>	(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 2)-Galactofuranosa	0
<i>T. rotundus</i>	(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 2)-Galactofuranosa	5
<i>T. luteus</i>	Galactoglucomanano	0
Goma arábica	β -(1 \rightarrow 3)-galactopiranosas con ramificaciones	0
Degrad. Smith de Goma arábica	β -(1 \rightarrow 3)-galactano	0
Pectina de <i>Citrus</i>	β -(1 \rightarrow 4)-ácido galacturónico	0
Pectina de <i>Citrus</i> reducida	β -(1 \rightarrow 4)-galactano	0
<i>o</i> -Nitrofenil galactopiranósido	-	0
β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranobiosa	-	0
Quitina	Poli[β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-glucosamina]	0
Quitosan	Poli[β -(1 \rightarrow 4)-glucosamina]	0
Celulosa de algodón	Poli[β -(1 \rightarrow 4)-glucosa]	0
Carboximetilcelulosa	Poli[β -(1 \rightarrow 4)-carboximetilglucosa]	0
Xilano	Poli[β -(1 \rightarrow 4)-xilopiranosas]	0
Liquenan	β -(1 \rightarrow 3)- y β -(1 \rightarrow 4)-Glucano	0

*El % de hidrólisis se calculó con respecto al obtenido para la F1S de *E. crustaceum*.

9.2.7.- Especificidad de sustrato.

La enzima hidroliza fracciones F1S que contienen β -(1 \rightarrow 5)-galactofurano y no tiene actividad sobre *o*-nitrofenil-galactopiranosido, β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranobiosa ni otros polisacáridos (Tabla 22).

9.2.8.- Linealidad de la velocidad de reacción con el tiempo de incubación y con la concentración de enzima.

La velocidad de reacción de la enzima resultó ser proporcional: a) al tiempo de incubación durante las etapas iniciales de la reacción, esto es, durante los 30 primeros minutos; b) al incremento en la concentración de enzima en un rango entre 0 y 250 μ l.

9.2.9.- Modo de acción de la enzima.

Los productos de la degradación enzimática del β -(1 \rightarrow 5)-galactofurano de *E. crustaceum* obtenidos entre 0,5 y 24 horas se analizaron por cromatografía en capa fina y por cromatografía gas-líquido. A pesar de que el total de sustancias reductoras aumentó con el tiempo de incubación, la concentración de monómero liberado permaneció constante tras 4 h de tratamiento. La cromatografía en capa fina puso de manifiesto la producción de monómero, dímero y trímero de galactosa. Transcurridas 24 h de incubación el único producto detectado fue galactosa (Figura 36).

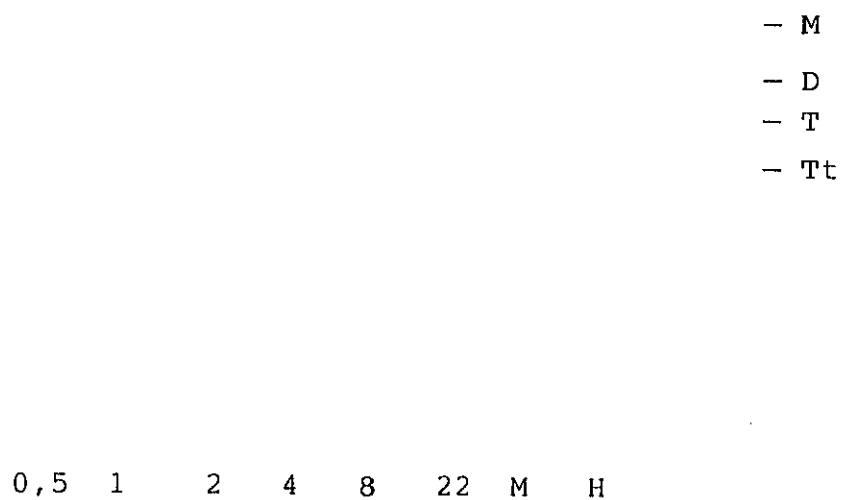


Figura 36.- Análisis por cromatografía en capa fina de los productos de la hidrólisis enzimática del β -(1 \rightarrow 5)-galactofurano de *E. crustaceum* por la enzima purificada.

DISCUSSION

A pesar de que la composición y estructura de la pared celular fúngica viene siendo estudiada desde el siglo pasado, aún es escasa la información que existe sobre ella. En los primeros trabajos desarrollados en este campo se emplearon tratamientos químicos para obtener las paredes celulares a partir del micelio. Puesto que dichos métodos se basaban en la utilización de ácidos o álcalis en condiciones enérgicas, tan sólo los polímeros que resistían el tratamiento (como quitina o celulosa) podían ser analizados, dando una idea distorsionada de la composición de la pared. Cuando las paredes celulares se empezaron a obtener mediante técnicas que no alteraban su composición química, como los métodos de ruptura celular (Aronson y Machlis, 1959; Crook y Johnston, 1962; Aronson, 1965; Rosenberger, 1976) fue posible identificar otros polímeros.

La mayoría de los trabajos publicados en el pasado se han realizado con paredes enteras (Hamilton y Knight, 1962; Applegarth, 1967; Grisaro y col., 1968; Applegarth y Bozoian, 1969) o bien con fracciones polisacáridicas extraídas de la misma (generalmente mediante tratamientos con álcali) pero no sometidas a posteriores procesos de purificación (Leal y col., 1984; Gómez-Miranda y col., 1984 y 1986; Rupérez y Leal, 1986; Rupérez y col., 1986). La tendencia más reciente se dirige hacia la obtención de polímeros purificados (Rupérez y Leal, 1987; Prieto y col., 1988; Gómez-Miranda y col., 1990). Este aspecto es especialmente interesante, ya que polímeros que se encuentran en la pared en proporciones pequeñas pueden tener gran importancia en taxonomía.

Si nos ceñimos al grupo de los Ascomycetos, el polímero mayoritario presente en las paredes celulares de sus numerosas especies es un complejo β -glucano-quitina (Bartnicki-García, 1968 y 1970), cuya composición y estructura no varía demasiado entre

los diferentes géneros que componen este grupo. Las mayores diferencias se han encontrado en la fracción que se extrae de la pared celular con álcali a temperatura ambiente, que a lo largo de este trabajo hemos denominado F1, y que es otra de las fracciones mayoritarias de la pared celular de Ascomicetos (entre un 10 y un 33% en las especies analizadas por nosotros). En la mayoría de los hongos estudiados esta fracción es un α -(1 \rightarrow 3)-glucano con proporciones variables de enlaces (1 \rightarrow 4) (Wessels y Sietsma, 1981), aunque en otras especies se ha encontrado un β -glucano.

En la fracción F1 de tres de las especies estudiadas aquí (*T. rotundus*, *T. luteus* y *T. bacillisporus*) se encontró glucosa como componente mayoritario (60-72%) y pequeñas cantidades de galactosa y manosa. Sin embargo, en las otras tres (*T. stipitatus*, *T. wortmannii* y *T. helicus*) el contenido en galactosa es superior al de glucosa. Este hecho ya ha sido descrito en la misma fracción de la pared en algunas especies de *Penicillium* (Leal y col., 1984), *Eupenicillium* (Gómez-Miranda y col., 1986) y en otras especies de *Talaromyces* (Rupérez y col., 1986).

Leal y col. (1984) estudiaron la composición de la pared celular de ocho especies de *Penicillium*, encontrando que en cuatro de ellas la fracción S (soluble en NaOH) tenía una proporción elevada de glucosa y escasa de galactosa (grupo A) mientras que en las otras cuatro se encontraron cantidades muy superiores de galactosa (grupo B). El espectro IR de las fracciones S ricas en galactosa mostró bandas de absorción características de residuos de galactofuranosa a 810 y 870 cm^{-1} que desaparecen al eliminar la galactosa con H_2SO_4 0,2 N, manifestándose una banda a 890 cm^{-1} propia de anómeros β . Estos mismos autores identificaron este material como un β -glucogalactano. La fracción S del grupo A se

identificó como un α -glucano, similar al descrito en otras especies (Johnston, 1965; Bacon y col., 1968; Zonneveld, 1971; Wessels y col., 1972).

Un primer fraccionamiento del material soluble en NaOH 1 M a temperatura ambiente consistió en resuspenderlo en agua destilada, separando en cada caso una porción soluble (F1S) y otra insoluble (F1I).

La fracción soluble (F1S) de las especies de *Talaromyces* estudiadas representa entre el 2,5 y el 17% de la pared celular según las especies y la hidrólisis ácida demostró que su componente más abundante es la galactosa (45-76%), aunque tiene también manosa (7-28%) y glucosa (9-45%). Hay que considerar aparte el caso de *T. luteus*, que tiene en esta fracción cantidades muy similares de los tres monómeros. También conviene hacer notar que en *T. helicus* la cantidad de glucosa es muy alta (45,5%), hecho que será explicado en experimentos posteriores.

La liberación de residuos de galactosa por hidrólisis parcial con H_2SO_4 0,05 M (sólo hidroliza las furanosas de un polímero) nos indica que la mayor parte de la galactosa que contiene este tipo de material se encuentra en configuración furanósica. Además, las bandas a 810 y 870 cm^{-1} del espectro de IR son características de β -galactofuranosa y aparecen en los espectros de todas las fracciones F1S, excepto en *T. luteus*.

Se han descrito residuos de β -galactofuranosa en varias especies del género *Penicillium*, tanto formando parte de la pared (Leal y col., 1984) como de algunos exopolisacáridos. Matsunaga y col. (1981) detectaron residuos de β -D-galactofuranosa en la pared de *P. ochro-chloron* utilizando ^{13}C -RMN y cromatografía de gases. A partir de paredes celulares purificadas extrajeron una fracción soluble en H_2SO_4 0,1 N (Ps B) que

fue posteriormente analizada, encontrándose que estaba compuesta por dos galactanos, PSB1 y PSB2. Los resultados de la ^{13}C -RMN indicaron que PSB1 era un polímero de β -(1 \rightarrow 2)-galactofuranosa. Gander y Fang (1976) describieron un polímero compuesto principalmente de residuos galactofuranosilo y glucosilo en la pared celular de *Penicillium charlesii* (actualmente denominado *P. dierckxii*). En el polisacárido extracelular de esta misma especie se han descrito residuos de β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranosa (Gander y col., 1974; Rick y col., 1974; Gander y Fang, 1976; Gorin y Mazurek, 1976). Gómez-Miranda y col. (1984) encontraron galactofuranosa en las paredes de *P. allahabadense*. También Azuma y col. (1971) detectaron un péptido-galactomanano en *Aspergillus fumigatus*, en el que los residuos de β -galactofuranosa están unidos a una cadena principal de α -(1 \rightarrow 2) manosa. En 1980 Barreto-Bergter y col. estudiaron un D-galacto-D-manano obtenido por extracción alcalina a partir de las hifas de *Aspergillus niger*. La estructura de dicho polisacárido constaba de un núcleo con una cadena principal de α -D-(1 \rightarrow 6)-manopiranososa sustituida en la posición 2 por cadenas laterales de α -(1 \rightarrow 2)-manopiranososa y de otras cadenas laterales formadas por unos cuatro residuos de β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranosa unidas al núcleo de manano por el -OH del carbono 6. Prepararon esta misma fracción en *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus* y *A. nidulans*, analizándolas por ^{13}C -RMN y comprobando que los galactomananos de todas estas especies presentaban una estructura similar. Un polímero parecido a este fue descrito en *Neurospora crassa* (Nakajima y col., 1984), con la diferencia de que los residuos de β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranosa están unidos al núcleo de manano por las unidades de α -(1 \rightarrow 2)-manopiranososa. Todos los autores coinciden en la posible importancia antigénica de los residuos de galactofuranosa.

El análisis de los tipos de enlace existentes en las fracciones F1S se realizó por varias técnicas. La oxidación con periodato sódico y degradación de Smith de estas fracciones da una información que debe ser utilizada con cautela, pero que es interesante como análisis preliminar. La permetilación de las fracciones seguida de la separación de los derivados por cromatografía de gases e identificación por espectrometría de masas ha demostrado ser de suma utilidad en el análisis de carbohidratos (Jansson y col., 1976) pero no da ningún dato acerca de la naturaleza anomérica de los monómeros ni de su secuencia en el polímero al que pertenecen. La RMN sí que nos indica de qué tipo de anómeros se trata. Esta técnica, en manos de un especialista, tiene las características idóneas para llevar a cabo la secuenciación de un carbohidrato. Los espectros de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN que presentamos en este trabajo tienen como finalidad apoyar los resultados obtenidos en la metilación, indicar la configuración anomérica de los monosacáridos más abundantes e ilustrar las similitudes y diferencias encontradas entre las especies estudiadas. Estas similitudes se basan en la comparación de los componentes mayoritarios de cada fracción. En los análisis de metilación se detectan e identifican también otros monómeros que se encuentran en pequeñas proporciones.

Las fracciones F1S de *T. rotundus* y *T. wortmannii* son las que producen mayor cantidad de arabinosa tras la degradación de Smith (Tabla 4), siendo en los dos casos el producto mayoritario (67% y 47%, respectivamente). Tanto las unidades de galactofuranosa enlazadas en (1→2) como las unidas en (1→3) originan este producto y ambos tipos de enlace se detectan en el análisis de metilación (Figura 10; picos 4 y 8) en la proporción (1,5:2). Los residuos terminales de glucopiranososa y galactofuranosa (picos 1 y 2) darían

lugar a la mayor parte del glicerol detectado en la degradación de Smith (15% y 11% respectivamente). Los puntos de ramificación están principalmente en monómeros de galactofuranosa con enlaces (1→2,6), que no resultan degradados por el periodato y se detectan como galactosa tras la degradación de Smith (5 y 7%).

En el espectro de ^1H -RMN de estas dos fracciones F1S, las principales señales en la región de los protones anoméricos se observaron a δ 5,18 ($J_{1,2}<1$) y 5,24 ($J_{1,2}<1$). Estas constantes de acoplamiento son características de β -furanósidos (Bebault y col., 1972). En los espectros de ^{13}C -RMN se observan también dos señales intensas en la región de los carbonos anoméricos a 106,7 y 108,7 ppm, siendo estos valores característicos de β -(1→2)-y β -(1→3)-galactofuranosa (Altman y col., 1988; Richards y Leitch, 1989).

A pesar de estas características comunes de la F1S de *T. rotundus* y *T. wortmannii*, existen diferencias entre ellas. La más importante es que en el análisis de metilación de *T. rotundus* se detecta una cantidad apreciable de (1→5)-galactofuranosa (que origina el 18% de treitol encontrado en la degradación de Smith), mientras que en la otra especie sólo hay trazas.

Por otra parte, las F1S de *T. stipitatus*, *T. helicus* y *T. bacillisporus* arrojan unos resultados muy similares en el análisis de metilación (Figura 9), siendo sus diferencias básicamente de orden cuantitativo. Las tres especies tienen (1→2) y (1→5) galactofuranosa mayoritariamente (picos 8 y 6), con un elevado número de puntos de ramificación en unidades de (1→2,6)-galactofuranosa y (1→2,6)-manopiranosas (picos 13 y 14). Los enlaces (1→2) dan lugar al arabinitol (11-15%) que se registra en la degradación de Smith. El treitol procede de la galactofuranosa enlazada en (1→5) o (1→6). En *T. bacillisporus* se encontró

un pico notable de (1→6)-galactofuranosa (pico 10), mientras que en *T. stipitatus* este pico es mucho menor y en *T. helicus* no aparece. Esta diferencia explica los diferentes porcentajes de treitol obtenidos en la oxidación con periodato de estas tres fracciones (20-45%). Algo similar ocurre con la proporción de glicerol, que en *T. stipitatus* es aproximadamente el doble que en las otras dos, debido a una mayor proporción de (1→2,6)-manopiranosas. La diferencia más marcada está en la F1S de *T. helicus*, con un 28% de eritritol, producto derivado de las unidades de mano o glucopiranosas en (1→4). Al analizar el cromatograma correspondiente a la F1S permetilada de esta especie, se pudo comprobar que el derivado de la glucopiranosas enlazada de ese modo coeluye con el correspondiente a la (1→5)-galactofuranosa, detectándose esta incidencia a la vista del espectro de masas del pico, que resultó ser una mezcla de los espectros de ambos componentes.

La similitud entre estas tres especies se refleja también en los espectros de RMN. En las Figuras 12 y 15 se ha incluido el espectro de la F1S de la especie tipo del género, *T. flavus* (cortesía de los Dres. E. Parra y M. Bernabé), con el fin de demostrar el parecido con los otros espectros de la figura. Todos ellos presentan en la región anomérica del espectro de ¹H-RMN cuatro señales mayoritarias. Estas similitudes se reflejan también en los espectros de ¹³C. En las Tablas 6 y 7 están las asignaciones de las señales más importantes. La señal que en el espectro de protón aparece a 5,33 ppm con $J_{1,2}=4,3$ y que podría corresponder a una α -piranosas o a una α -furanosa se asigna definitivamente a esta última con el espectro de ¹³C. Este tipo de residuos es muy poco común en la Naturaleza. Los desplazamientos químicos de la α -glucopiranosas terminal coinciden con los descritos por Jansson y col. (1988). El resto de las asignaciones se realizó, como en los restantes

casos, por heterocorrelación o utilizando modelos (Dr. M. Bernabé, comunicación personal).

La F1S de *T. luteus* tiene como componentes mayoritarios glucopiranososa terminal y (1→2,6)-manopiranososa en la proporción (1:1). Este dato nos indica que hay abundantes ramificaciones en esta fracción. En los espectros de ^1H - y ^{13}C -RMN se ven al menos nueve tipos de monómeros diferentes. Por GC-MS de sus alditoles permetilados se encuentran, además de los ya mencionados y de otros minoritarios, (1→6)-manopiranososa, (1→2,6)-galactofuranosa y (1→5)-galactofuranosa y no se detecta galactofuranosa terminal.

Al filtrar las fracciones F1S por geles de Sepharose CL-6B se observó que todas estaban formadas por varios polisacáridos, excepto la de *T. luteus*, que dio un único pico de Pm 31 kDa y que será considerada en último lugar.

La fracción polisacáridica de mayor peso molecular es, como veremos, prácticamente igual en todas las especies en las que se estudió.

Los restantes polisacáridos purificados son heteropolímeros ramificados de galactosa, manosa y glucosa (Tabla 8). Toda la glucosa que contienen se encuentra como residuos terminales (aparecen únicamente derivados tetrametilados de glucosa) y la manosa en puntos de ramificación (sólo se detectan derivados dimetilados de manosa). La galactosa es el azúcar más abundante y está enlazada de distintas maneras, siendo comunes a todos ellos la galactofuranosa terminal, (1→2)- y (1→2,6)-galactofuranosa.

Analizaremos en tres apartados, elaborados en función de similitudes estructurales, los resultados que siguen.

a) Polímeros con (1→4)-glucosa como componente mayoritario.

En general, el primer pico que eluye ($P_m > 600$ kDa) representa una proporción muy pequeña de la F1S (2-10%), con la excepción del polisacárido T.h.I, que constituye un 33%. La composición de esta primera fracción parece ser muy similar en todas las especies estudiadas y según el análisis de metilación, es un (1→4)-glucano con algunos enlaces (1→3) y puntos de ramificación en la posición 6 de algunas de las unidades de glucosa. Polímeros de características semejantes han sido descritos en la fracción F1S de *Aphanoascus fulvescens* (Leal y col., 1992) y en la de *Penicillium erythromellis* (Rupérez y Leal, 1987). La elevada proporción de esta fracción en *T. helicus* es la responsable de la alta cantidad de eritritol detectada en la degradación de Smith de la F1S y del 2,3,6-trimetil-glucitol que se veía al metilarla.

b) Polímeros con (1→2)- y (1→3)-galactofuranosa como componentes mayoritarios.

Esta clase de polímeros aparece en las fracciones obtenidas a partir de la F1S de *T. rotundus* y *T. wortmannii*. En general, se metilan mejor y están menos ramificados que los del grupo siguiente.

Los polisacáridos T.r.II (P_m 94 kDa) y T.r.III (P_m 20 kDa) son prácticamente idénticos en cuanto a sus componentes pero las proporciones de los mismos varían ligeramente. Los monómeros más abundantes son (1→2), (1→3) y (1→5) galactofuranosa, en la relación (1:0,8:0,4) para T.r.II y (1:1:0,5) para T.r.III. En este último la cantidad de residuos terminales de galactofuranosa es menor y además se encuentra mano- o glucofuranosa unida en las posiciones 2 y 6. Otros residuos minoritarios que están en

ambos polímeros son una hexopiranososa y una galactofuranosa en (1→6).

Las fracciones T.w.II (Pm 64 kDa) y T.w.III (Pm 18 kDa) son casi iguales. La no aparición de residuos terminales en T.w.III posiblemente sea debida a un defecto en la metilación. Encontramos (1→2) y (1→3)-galactofuranosa en la proporción (1:1). Nuestros resultados parecen indicar que estos polímeros tienen un esqueleto formado por enlaces (1→2) y (1→3) alternados, con ramificaciones en la posición 6 de algunas unidades (1→2). Esta clase de polisacáridos no ha sido descrita hasta la fecha.

c) Polímeros con (1→2)- y (1→5)-galactofuranosa como componentes mayoritarios.

Los polímeros obtenidos a partir de la FIS de *T. stipitatus*, *T. helicus* y *T. bacillisporus* son muy semejantes entre sí, aunque en las fracciones de esta última especie los componentes minoritarios son más abundantes.

T.s.II (Pm 70 kDa) y T.s.III-1 (Pm 17 kDa) tienen (1→5)-, (1→2)-, (1→2,6)-galactofuranosa y (1→2,6)-manopiranososa en las proporciones (1:0,4:0,6:0,7) y (1:0,5:0,6:0,7) respectivamente. A raíz de estos datos se deduce que estos polímeros presentan una estructura muy ramificada. Aunque T.s.III-2 parece igual a las anteriores, el espectro de masas del pico 12 (Figura 20) es característico de una hexofuranosa (1→2,6) que no puede ser galactosa, puesto que ésta eluye más tarde. Los residuos terminales son de glucopiranososa y galactofuranosa.

T.h.II (Pm 70 kDa) y T.h.III (Pm 17 kDa) son idénticos, como demuestra la Figura 22 (B y C). Sus componentes son los mismos que se encuentran en las fracciones de *T. stipitatus*, pero las proporciones son (1:1:0,5:0,3). La metilación en estas dos fracciones ha

mismo tetrasacárido sea la unidad repetitiva que forma dichos polímeros.

Este hecho avalaría la relación que algunos autores han sugerido entre la composición de polímeros que se localizan en las capas más externas de la pared celular y los polisacáridos extracelulares que algunas especies liberan al medio de cultivo (Buck y col., 1968). Incluso se ha postulado que ambos son sintetizados por un sistema enzimático común (Bull, 1972).

d) Fracción F1S purificada de *T. luteus*.

Puesto que la purificación de la F1S de *T. luteus* dio un solo pico en Sepharose CL-6B, la composición de este material es igual a la descrita para la fracción entera. Sus características hacen que la incluyamos en un grupo aparte, ya que presenta manosa, galactosa y glucosa en proporciones similares. Los espectros de RMN reflejan la existencia de al menos nueve monómeros diferentes, los mismos que se detectan por CG-MS. En común con los polímeros descritos en los apartados anteriores tiene las unidades de galactofuranosa unidas en (1→2,6), (1→6) y (1→2) y la manosa (1→2,6), pero los residuos mayoritarios son de glucopiranososa terminal y de (1→6)-manosa. No tiene galactofuranosa terminal. Su estructura es muy difícil de predecir con los ensayos realizados y continúa siendo investigada por RMN.

Estos resultados no son más que otra muestra de que el género *Talaromyces* es extremadamente complejo. Como se comentó en la introducción a este trabajo, la separación taxonómica entre *Penicillium* y varios géneros relacionados es en muchas ocasiones difícil, ya que los criterios generalmente establecidos son morfológicos. Como Pitt y Samson (1990) señalan, sería muy deseable conseguir una clasificación de las

especies de *Penicillium* y *Aspergillus* simple, precisa y reproducible, puesto que estos géneros incluyen algunos de los hongos más importantes económicamente.

Raper y Thom (1949) fueron los pioneros en la elaboración de una clasificación taxonómica seria, que ha constituido la base de los estudios realizados durante treinta años. Pero, como todos los estudios de taxonomía de hongos que se basan únicamente en la morfología, tiene muchos inconvenientes. El rango de caracteres que se utilizaba para distinguir las especies era muy reducido y algunas veces conducían a equívocos. Uno de los más empleados, especialmente para delimitar divisiones infragenéricas, fue la textura de la colonia. Varios aislamientos con textura flocosa o funiculosa, que era consecuencia de una deterioración debida a largos períodos de mantenimiento, fueron descritos como especies nuevas y clasificadas en diferentes secciones del género. Como resultado de hechos de este tipo, incluso los expertos tienen dificultades para distinguir muchas de las especies aceptadas por Raper y Thom.

Estos errores se han ido arrastrando a lo largo del tiempo y durante las décadas de los 60 y 70 la taxonomía de *Penicillium* se hizo incierta, casi caótica, con identificaciones inexactas descritas en la literatura, muchas de las cuales persisten en la actualidad tanto en la bibliografía como en algunas colecciones de cultivos. Algunos de estos errores fueron corregidos por Samson y col. (1976) y por Pitt (1979), pero a expensas de producir una notable confusión.

En los últimos años se está abordando un nuevo enfoque en taxonomía con el análisis de caracteres fisiológicos, como la producción de micotoxinas y metabolitos secundarios. Turner (1971) demostró que *Penicillium* y *Aspergillus* producían una gran

variedad de metabolitos secundarios, pero su uso en taxonomía fue propuesto por Ciegler y col. (1973). Con estos nuevos criterios se han realizado recientemente otras clasificaciones de especies de *Penicillium* subgénero *Penicillium* (Frisvad y Filtenborg, 1989), de teleomorfos de *Aspergillus* (Frisvad, 1985; Samson y col., 1990) y de *Talaromyces* (Frisvad y col., 1990). Estos esquemas de producción de metabolitos secundarios han demostrado ser una poderosa técnica para diferenciar aislamientos a nivel de especie y subespecie. Una aplicación particularmente importante es la identificación precisa de aislamientos en grandes colecciones de cultivos, donde las equivocaciones son de suma importancia. Basándose en las técnicas que acabamos de mencionar, Frisvad (1989) reidentificó más de 150 aislamientos de *Penicillium* incorrectamente clasificados en la bibliografía. A nuestro entender, la taxonomía basada en la producción de micotoxinas y metabolitos secundarios es más apropiada para caracterizar una especie concreta, que para separar de forma efectiva los agrupamientos naturales de estas especies o establecer relaciones filogenéticas entre ellas.

Talaromyces difiere del otro estado perfecto, *Eupenicillium*, por su ascoma suave y se distingue de géneros relacionados en las Eurotiáceas por sus ascas encadenadas. Basándose en sus estados conidiales Stolk y Samson (1972) dividieron el género en cuatro secciones: *Talaromyces*, *Emersonii*, *Thermophila* y *Purpurea*. Sin embargo el género tiene un carácter heterogéneo y, según los mismos autores, puede parecer justificado dividir *Talaromyces* en varios géneros.

Frisvad y col. (1990) llegaron a la conclusión de que los perfiles de metabolitos secundarios de *Talaromyces* confirman la actual clasificación taxonómica de este género

basada en la morfología. Esta afirmación no concuerda con nuestros resultados, que ponen de manifiesto la existencia de al menos tres tipos de pared celular en función de la estructura de polisacáridos aislados de la F1S. La pared celular es una superestructura estable cuya composición química y estructura prácticamente no varía. Si llegamos a tener un conocimiento profundo de esta cubierta, responsable por otra parte de los caracteres externos del hongo utilizados en taxonomía y de la mayoría de los fenómenos de superficie de la célula fúngica, sus características podrían ser utilizadas en conjunción con los criterios morfológicos para mejorar la clasificación existente en la actualidad.

En el apartado 8 de la sección de Resultados se hace un estudio de las características de la fracción F1S de varias especies de géneros próximos a *Talaromyces*. Dichas especies pertenecen a tres géneros distintos, *Eupenicillium*, *Penicillium* y *Aspergillus* pero en todas ellas la fracción F1S representa una pequeña proporción de la pared celular y es un polímero que contiene exclusivamente β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranosa. De estos datos se puede deducir que existe una relación más próxima entre estas especies que con otras de sus propios géneros que carecen de β -(1 \rightarrow 5)-galactofurano.

La F1S de *Gliocladium viride*, otro hongo peniciloide, fue estudiada por Gómez-Miranda y col. (1990), purificando tres fracciones de composición química similar. Los análisis de metilación de las dos fracciones mayoritarias demostraron que se trataba de dos galactomanoglucanos muy ramificados, y que su estructura consistía en un esqueleto de (1 \rightarrow 6)-glucosa sustituida en la posición 2 o en la 3 por manosa. Estos tipos de enlace muestran claras diferencias con los encontrados en otros hongos peniciloides.

Basándonos en los polisacáridos encontrados en este trabajo, en resultados recogidos

en la bibliografía y en resultados no publicados obtenidos en nuestro laboratorio, se ha confeccionado un esquema (Figura 37) en el que se relacionan quimiotaxonómicamente los géneros *Penicillium*, *Eupenicillium* y *Talaromyces*.

En todas las especies de *Eupenicillium* investigadas se ha encontrado únicamente galactofurano unida en β -(1 \rightarrow 5) en la fracción F1S, por lo cual este polímero es un buen marcador para el género. Sin embargo, *Talaromyces* es un género más heterogéneo, ya que se han encontrado especies que contienen en la fracción F1S heteropolisacáridos cuyos componentes mayoritarios son β -(1 \rightarrow 2)(1 \rightarrow 5)-galactofurano, β -(1 \rightarrow 2)(1 \rightarrow 3)-galactofurano o un galactoglucomanano. Estos heteropolisacáridos definen al género *Talaromyces* y lo diferencian de *Eupenicillium*. En el género *Penicillium* se han encontrado todos los polímeros descritos en los estados perfectos excepto el galactoglucomanano, lo que demuestra la relación de *Penicillium* con sus teleomorfos y permitirá en su día (cuando se hayan analizado todas las especies) dividir este género en dos grupos.

El aislamiento, la purificación y el análisis estructural de los polímeros de la pared es imprescindible para llegar a conclusiones válidas en quimiotaxonomía. Postulamos que algunos de estos polisacáridos pueden ser utilizados como marcadores quimiotaxonómicos, para contribuir a un mejor reordenamiento de estos géneros, y predecir relaciones filogenéticas entre los mismos.

El estudio de la fracción insoluble en agua (F1I) fue más difícil de abordar ya que presenta una importante limitación: su insolubilidad en DMSO, que elimina la posibilidad del análisis de metilación, y la baja solubilidad en NaOH deuterada de algunas de ellas.

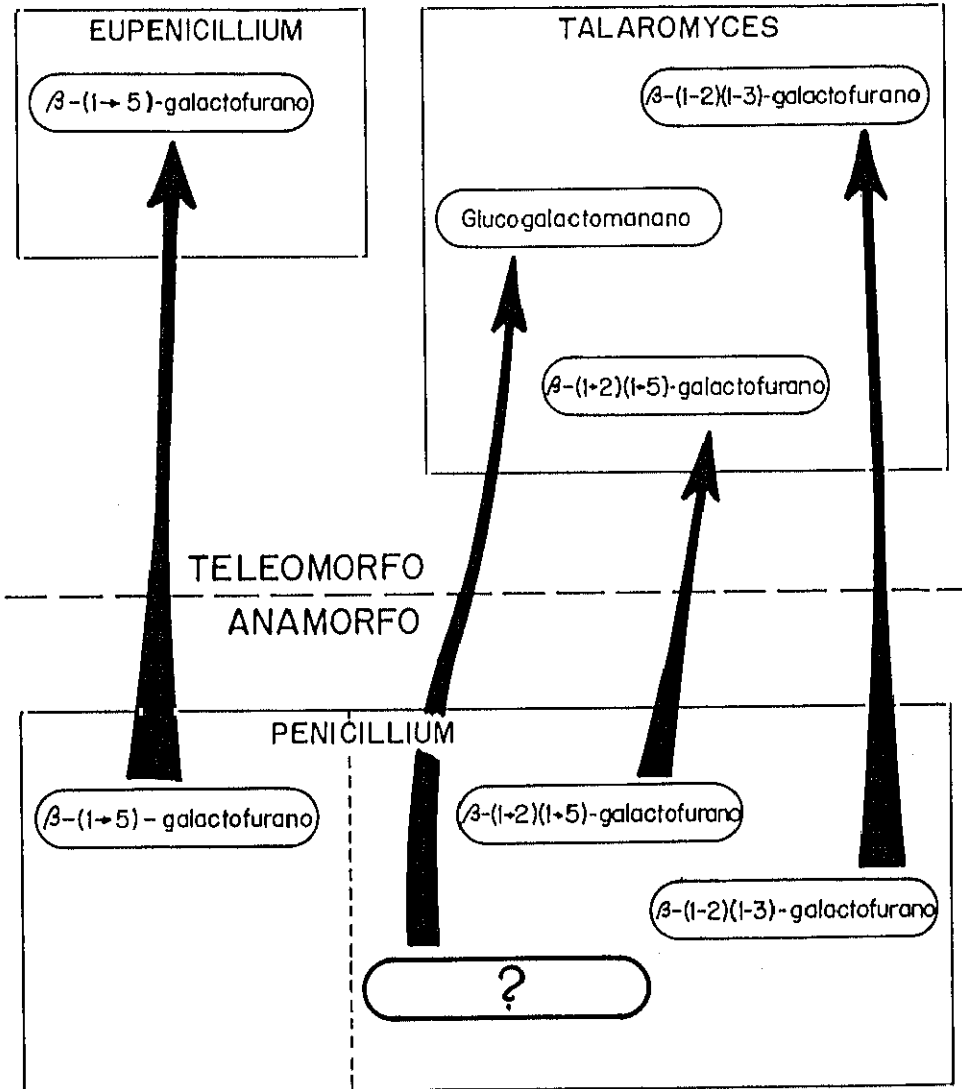


Figura 37.- Representación esquemática de las relaciones entre *Penicillium* y sus estados teleomórficos, *Eupenicillium* y *Talaromyces* basada en los polisacáridos de la fracción F1S.

Las dificultades encontradas se ponen de manifiesto desde el momento de la determinación de los carbohidratos neutros totales por el método de la antrona, ya que en *T. stipitatus*, *T. wortmannii* y *T. helicus* se obtienen porcentajes muy bajos, posiblemente porque resisten el tratamiento con ácido. Lo mismo ocurre con la hidrólisis Saeman, aunque los rendimientos son algo mejores. Los espectros IR y de RMN de estas fracciones nos indican que no hay componentes no polisacáridicos.

Las fracciones FII están compuestas mayoritariamente por glucosa, aunque en *T. stipitatus* y *T. wortmannii* hay también galactosa (18 y 24%) y xilosa (14,7 y 8,3%). Las FII de *T. rotundus*, *T. luteus* y *T. bacillisporus* son α -(1 \rightarrow 3)-glucanos como se demuestra por oxidación con periodato y ^{13}C -RMN. El α -(1 \rightarrow 3)-glucano es uno de los polímeros más abundantes de las paredes celulares de Ascomicetos y Basidiomicetos y ha sido descrito en numerosas especies (Johnston, 1965; Wessels y col., 1972; Colson y col., 1974; Leal y col., 1984; Gómez-Miranda y col., 1986; Rupérez y Leal, 1986). Los diferentes α -(1 \rightarrow 3)-glucanos estudiados contienen cantidades variables de enlaces α -(1 \rightarrow 4). En los tres α -(1 \rightarrow 3)-glucanos encontrados por nosotros esta proporción de enlaces (1 \rightarrow 4) es muy baja o nula (*T. rotundus*).

En las tres especies restantes, los enlaces son predominantemente de tipo β -(1 \rightarrow 3) (banda a 890 cm^{-1} en el espectro IR, glucosa como principal producto de la degradación de Smith y señal en el espectro de ^{13}C -RMN a 101 ppm con una constante de acoplamiento alta). Sin embargo, estos polímeros β no son iguales entre sí. Los procedentes de *T. stipitatus* y *T. helicus* son bastante parecidos, pero en este último se detectó un 17% de eritritol procedente de enlaces (1 \rightarrow 4). Los β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)-glucanos no son frecuentes en las

paredes celulares de Ascomicetos. En la fracción F1I de *T. wortmannii* encontramos, además de un 23% de enlaces (1→4), un 17% de xilosa. Al no resultar degradada por el periodato, esta xilosa debe ser xilofuranosa sustituida en 2 o en 3 o bien xilopiranososa 2,4 o 3,6 disustituida. En la degradación de Smith de esta fracción aparece además un 16% de glicerol y un 8% de arabinosa, que podrían derivar de la galactosa de la fracción nativa. Esto puede deberse a que el material esté contaminado con restos de la F1S, rica en (1→2)-galactofuranosa. Las tres fracciones insolubles con anómeros β se analizan mal por RMN. La F1I de *T. helicus* no se consiguió disolver convenientemente en NaOD y por lo tanto no se pudo registrar su espectro. Los desplazamientos químicos de la F1I de *T. stipitatus* se desvían ligeramente de los descritos en la bibliografía para β-(1→3)-glucanos. En *T. wortmannii* sólo se puede afirmar que este polímero está formado por anómeros β, pero no se pueden extraer más conclusiones a partir de los espectros de RMN ya que los desplazamientos químicos no se parecen a los valores publicados para ningún β-glucano. La xilosa que contiene esta fracción puede ser la responsable de estas variaciones, ya que los desplazamientos químicos de un determinado monómero están afectados por la identidad del monómero al cual se encuentra asociado en la cadena.

La mayoría de los β-(1→3)-glucanos descritos en paredes celulares fúngicas presentan mayor o menor número de sustituciones en el C-6 (Barreto-Bergter y Gorin, 1983). Si observamos las proporciones de glucosa y glicerol encontradas en la oxidación con periodato de *T. stipitatus* y *T. helicus* podríamos suponer que estos dos glucanos son bastante lineales y por lo tanto, poco solubles. Se han descrito algunos β-glucanos poco ramificados como componentes estructurales de las paredes celulares de *Pullularia*

pullulans (Brown y Lindberg, 1967) y de *Piricularia oryzae* (Nakajima y col., 1972).

El último apartado a considerar es la purificación y caracterización de la enzima β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranasa.

Se han descrito varias galactanasas y galactosidasas producidas por hongos, capaces de despolimerizar la fracción hemicelulósica de la pared celular de plantas. *Verticillium albo-atrum* y *Fusarium oxysporum* sintetizan varias enzimas que actúan sobre los principales polisacáridos de las paredes celulares de las plantas a las que infectan. De entre ellas, destacaremos el sistema enzimático de *V. albo-atrum*, activo frente a galactanos β -(1 \rightarrow 3) y/o β -(1 \rightarrow 6) y frente a β -(1 \rightarrow 4), habiendo caracterizado varias enzimas con actividad exo- β -galactosidasa (Cooper y Wood, 1975). Del líquido de cultivo de *P. charlesii* se aisló una exo- β -D-galactofuranosidasa que hidroliza los residuos de β -D-galactofuranosa del péptidofosfogalactomanano extracelular producido por este hongo (Rietschel-Berst y col., 1977). *P. citrinum* produce dos endo-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactanasas que actúan sobre sustratos de bajo peso molecular (Nakano y col., 1985). También *Sclerotinia sclerotium* produce una endo- β -(1 \rightarrow 4)-galactanasa que parece hidrolizar el sustrato de una forma aleatoria, produciendo una mezcla de mono- di- y trisacáridos de galactosa (Bauer y col., 1977). A partir de una preparación enzimática comercial obtenida del líquido de cultivo del basidiomiceto *Irpex lacteus*, la Driselasa, Tsumuraya y col. (1990) purificaron una exo-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactanasa. Ikotum (1984) describió la detección y purificación de enzimas producidas *in vitro* e *in vivo* por *P. oxalicum*. Una de las hemicelulasas encontradas fue una endo- β -(1 \rightarrow 4)-galactanasa que demostró tener una gran actividad tanto cuando la

enzima se obtiene a partir de líquidos de cultivo como cuando se aísla de tejidos de batata infectados por el hongo.

Durante la fase de autólisis, *P. oxalicum* produce enzimas líticas capaces de degradar sus propias paredes celulares (Pérez-Leblic y col., 1982a; Pérez-Leblic y col., 1985; Copa-Patiño y col., 1989; Copa-Patiño y col., 1990) y polisacáridos de diversas fuentes. En algunos casos estas enzimas se sintetizan *de novo* durante el proceso degradativo (Reyes y col., 1981). Se cree que los monómeros u oligómeros que se producen durante la lisis de la pared pueden actuar como inductores de esta síntesis, manteniéndose en el medio de cultivo en los bajos niveles necesarios para la inducción (Reese, 1977; St. Leger y col., 1986) y se ha sugerido que cada hongo es capaz de producir y excretar al medio de cultivo las enzimas líticas necesarias para degradar su pared celular durante el proceso de autólisis (Pérez-Leblic y col., 1982a y 1982b; Reyes y col., 1984; Martínez y col., 1986). La presencia de la actividad β -(1 \rightarrow 5)-galactanasa podría entonces explicarse por el hecho de que tanto *P. oxalicum* como otras especies del género *Penicillium* tienen galactofuranosa en su pared celular (Leal y col., 1984).

En las diferentes etapas que condujeron a la purificación de la enzima, encontramos que ésta interacciona con los geles utilizados. Después de filtrar por Sephadex G-200 se obtuvieron tres fracciones con actividad enzimática (A, B y C) que representaron el 5,4%, 73,5% y 20,6%. Si tomamos la última fracción (C) y la volvemos a cargar en la columna en idénticas condiciones, se repite el mismo perfil cromatográfico. Esto significa que la galactanasa interacciona con otras proteínas presentes en la mezcla, quedando retenida parte de la misma. Un efecto similar se produce al filtrar por Superose 6 en presencia de NaCl

150 mM. La enzima se retiene en el gel más de lo que debería, posiblemente por interacciones hidrofóbicas proteína-gel, y el peso molecular calculado por este método no coincide con el obtenido por electroforesis.

Al final del proceso la enzima se purificó 91 veces, eliminando en la última etapa un inhibidor de naturaleza polisacáridica, y el rendimiento fue de un 91% (Tabla 21). La β -(1 \rightarrow 5)-galactanasa purificada tiene un Pm aparente de 77000, considerablemente menor que el descrito para otras galactanasas (Nakano y col., 1985) y es una glicoproteína (20% de carbohidratos, sobre todo galactosa). Su pI es 7,9. Su modo de acción corresponde al de una endoenzima, hidrolizando enlaces internos y con la formación de di- y trisacáridos de galactosa y algo de monómero. Después de 24 horas de incubación no se detectaron dímeros ni trímeros y la cantidad de monómero no aumentó como cabría esperar si se hubiera producido la degradación de estos oligosacáridos por la enzima. Por otra parte, uno de los sustratos utilizados para comprobar la especificidad de la enzima fue el dímero de β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranosa, no siendo degradado por la enzima. Estos datos nos llevaron a pensar en la existencia de un posible fenómeno de transgalactosilación, con producción de oligómeros de mayor tamaño, pero este hecho no ha sido comprobado. La galactanasa producida por *P. citrinum* parece catalizar una reacción de este tipo (Nakano y col., 1986). También se han descrito transgalactosilaciones catalizadas por β -galactosidasas, que dan lugar a productos con diferentes tipos de enlaces glicosídicos, como β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 4) y β -(1 \rightarrow 6). La especificidad de la enzima es muy elevada, ya que no hidroliza sustratos de la β -galactosidasa, de exo-enzimas ni enlaces diferentes a los de β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranosa.

En la bibliografía tan solo se ha descrito una enzima que hidroliza β -(1 \rightarrow 5)-

galactanos, pero ni el modo de acción ni las características de la β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranosidasa de *P. charlesii* se parecen a la obtenida por nosotros (Rietschel-Berst y col., 1977).

Basándonos en las propiedades de esta enzima se podría planificar un mecanismo más sencillo de purificación considerando su alto pI y propiedades hidrofóbicas.

Esta enzima se empleará en trabajos posteriores para conseguir una hidrólisis parcial controlada de polímeros que contengan β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranosa. La secuenciación de los oligosacáridos obtenidos puede ser de gran ayuda para determinar la estructura del polímero completo.

CONCLUSIONES

1.- La fracción soluble en NaOH a temperatura ambiente (Fracción F1) representa entre un 10 y un 33% de la pared celular en las distintas especies y está formada por un α ó β -glucano y heteropolisacáridos ricos en galactofuranosa.

2.- De la fracción F1 se obtuvo un material soluble en agua (Fracción F1S) que representa entre el 2,5 y el 17% de la pared celular. El análisis de este material reveló que dicha fracción está compuesta de galactofuranosa (45-76%), glucosa (9-45%) y manosa (7-28%), excepto en *T. luteus* que tiene cantidades muy similares de los tres monómeros.

3.- La fracción F1S de las especies de *Talaromyces* está formada por diferentes polisacáridos:

a) Un α -(1 \rightarrow 4)-glucano que representa entre el 2 y el 10% de la F1S. En *T. helicus* este polímero es más abundante y constituye el 33% de la fracción F1S.

b) Heteropolímeros ricos en galactofuranosa que se diferencian por sus tipos de enlace ó por sus pesos moleculares. En todas las especies se encontró un polímero mayoritario.

c) En *T. luteus* se encontró un galactoglucomanano como único componente de la fracción F1S.

4.- En función de la estructura del componente mayoritario se han delimitado tres grupos en el género *Talaromyces*:

a) Especies que contienen un heteropolímero rico en β -(1 \rightarrow 2)(1 \rightarrow 5)-galactofuranosa similar a la varianosa: *T. stipitatus*, *T. helicus* y *T. bacillisporus*. En este grupo se incluye también la especie tipo del género, *T. flavus*.

b) Especies que contienen un heteropolímero rico en β -(1 \rightarrow 2)(1 \rightarrow 3)-galactofuranosa:

T. wortmannii y *T. rotundus*.

c) Especies que contienen un glucogalactomanano: *T. luteus*.

5.- La fracción F1S de las especies de *Eupenicillium*, *Penicillium* y *Aspergillus* estudiadas en este trabajo es un polímero de β -galactofuranosa enlazada en (1 \rightarrow 5).

6.- Los polisacáridos mayoritarios de la fracción F1S pueden constituir un criterio quimiotaxonómico válido para llevar a cabo una reorganización de estos géneros en conjunción con los caracteres morfológicos y ser de utilidad para el establecimiento de relaciones filogenéticas entre ellos.

7.- La fracción insoluble en agua (F1I) de estas especies está formada por un α -(1 \rightarrow 3)-glucano ó por un β -glucano. En las especies estudiadas no se ha encontrado correlación alguna entre la estructura de los polisacáridos de la F1S y de la F1I.

8.- Se ha purificado una nueva enzima (β -(1 \rightarrow 5)-galactanasa) del líquido de cultivo obtenido durante la autólisis de *P. oxalicum*. La enzima es una glicoproteína de peso molecular 77 kD y cuyo punto isoeléctrico es de 7,9. Es estable en un rango de pH comprendido entre 4,0 y 7,5. Su Km es de 1,2 mg/ml y su Vmax 0,55 μ mol/h.

9.- Su modo de acción corresponde al de una endoenzima y su especificidad es muy elevada, ya que no hidroliza ni el dímero de β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranosa, ni el *o*-nitrofenilgalactopiranosido ni polisacáridos que no contengan β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranosa.

10.- La enzima es inhibida por iones Fe^{3+} , acetato, citrato y borato y por un polisacárido presente en el líquido de cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, G.A. (1965). Complete acid hydrolysis. En: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5: 269-276.
- ALLERHAND, A. (1975). Natural abundance Carbon-13 Fourier Transform NMR studies of large molecules. *Pure and Applied Chemistry*, 41: 247-273.
- ALTMAN, E., BRISSON, J.-R. y PERRY, M.B. (1988). Structure of the O-antigen polysaccharide of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 3 (ATCC 27090) Lipopolysaccharide. *Carbohydrate Research*, 179: 245-258.
- APPLEGARTH, D.A. (1967). The cell wall of *Penicillium notatum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 120: 471-478.
- APPLEGARTH, D.A. y BOZOIAN, G. (1967). Presence of chitin in the cell wall of a griseofulvin-producing specie of *Penicillium*. *Journal of Bacteriology*, 94: 1787-1788.
- APPLEGARTH, D.A. y BOZOIAN, G. (1969). The cell wall of *Helminthosporium sativum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 134: 285-289.
- ARONSON, J.M. (1965). The cell wall. En: *The fungi*. Vol. 1. The fungal cell. pp. 46-76. G.C. Ainsworth y A.D. Sussman (Eds.). Academic Press Inc.
- ARONSON, J.M. y MACHLIS, L. (1959). The chemical composition of the hyphal walls of the fungus *Allomyces*. *American Journal of Botany*, 46: 292-300.
- ASPINALL, G.O. y FERRIER, R.J. (1957). A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrates. *Chemistry and Industry*, 1216.

- AZUMA, I., KIMURA, H., HIRANO, F., TSUBURA, E., YAMAMURA, Y. y MISAKI, A. (1971). Biochemical and immunological studies on *Aspergillus*. III. Chemical and Immunological properties of glycopeptide obtained from *Aspergillus fumigatus*. Japanese Journal of Microbiology, 15: 237-246.
- BACON, J.S.D., JONES, D., FARMER, V.C. y WEBLEY, D.M. (1968). The occurrence of α -(1 \rightarrow 3) glucan in *Cryptococcus*, *Schizosaccharomyces* and *Polyporus* species and its hydrolysis by a *Streptomyces* culture filtrate lysing cell walls of *Cryptococcus*. Biochimica et Biophysica Acta, 158: 313-315.
- BARKER, S.A., BOURNE, E.J. y WHIFFEN, D.M. (1956). Use of infrared Analysis in the determination of Carbohydrate structure. Methods of Biochemical Analysis, 3: 213-245.
- BARRETO-BERGTER, E.M., TRAVASSOS, L.R. y GORIN, P.A.J. (1980). Chemical structure of the D-galacto-D-mannan component from hyphae of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* spp. Carbohydrate Research, 86: 273-285.
- BARRETO-BERGTER, E. y GORIN, P.A.J. (1983). Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. Vol. 41. pp. 67-103.
- BARTNICKI-GARCIA, S. (1968). Cell wall Chemistry, Morphogenesis and Taxonomy of Fungi. Annual Review of Microbiology, 22: 87-108.
- BARTNICKI-GARCIA, S. (1970). Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. En: Phytochemical Phylogeny, pp. 81-103. J.B. Harborne, (Ed.). Academic Press. New York/London.

- BARTNICKI-GARCIA, S. y REYES, E. (1968). Polyuronides in the cell walls of *Mucor rouxii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 170: 54-62.
- BAUER, W.D., BATEMAN, D.F. y WHALEN, C.H. (1977). Purification of an Endo- β -(1 \rightarrow 4)-galactanase produced by *Sclerotinia sclerotium*: Effects on isolated plant cell walls and potato tissue. *Physiology and Biochemistry*, 67: 862-868.
- BÉBAULT, G.M., DUTTON, G.G.S. y WALKER, R.H. (1972). *Carbohydrate Research*, 23: 430-432.
- BLOOMFIELD, B.J. y ALEXANDER, M. (1967). Melanins and resistance of fungus to lysis. *Journal of Bacteriology*, 93: 1276-1280.
- BOTTOM, C.B. y SIEHR, D.J. (1979). Structure of an alkali-soluble polysaccharide from the hyphal wall of the Basidiomycete *Coprinus microrhizus* var. *microsporus*. *Carbohydrate Research*, 77: 169-181.
- BOVEY, F.A. (1972). High Resolution N.M.R. of macromolecules. Academic Press. New York.
- BRACKER, C.E. (1967). Ultrastructure of fungi. *Annual Reviews in Phytopathology*, 5: 343-374.
- BROWN, R.G. y LINDBERG, B. (1967). Polysaccharides from cell walls of *Aureobasidium (Pullularia) pullulans*. Part I. Glucans. *Acta Chemica Scandinavia*, 21: 2379-2382.
- BUCK, K.W., CHEN, A.W., DICKERSON, A.G. y CHAIN, E.B. (1968). Formation and structure of extracellular glucans produced by *Claviceps* species. *Journal of General Microbiology*, 51: 337-352.

- BULL, A.T. (1970). Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. *Journal of General Microbiology*, 63: 75-94.
- BULL, A.T. (1972). Environmental factors influencing the synthesis and excretion of exocellular macromolecules. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*, 22: 261-292.
- BURNETT, J.H. (1976). *Fundamentals of mycology*. 2nd edn. Edward Arnold (Ed.). London. pp. 1-664.
- CIEGLER, A., FENNELL, D.I., SANSING, G., DETROY, R.W. y BENNET, G.A. (1973). Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: classification into subgroups. *Applied Microbiology*, 26: 271-278.
- COLSON, P., JENNINGS, H.J. y SMITH, I.C.P. (1974). Composition, sequence and conformation of polymers and oligomers of glucose as revealed by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of the American Chemical Society*, 96: 8081-8087.
- COOPER, R.M. y WOOD, R.K.S. (1975). Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological Plant Pathology*, 5: 135-156.
- 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 Microbiology Letters*, 65: 285-292.
- COPA-PATIÑO, J.L., RODRIGUEZ, J., REYES, F. y PEREZ-LEBLIC, M.I. (1990). Effect

- of β -glucanases on *Penicillium oxalicum* cell wall fractions. FEMS Microbiology Letters, 70: 233-240.
- CROOK, E.M. y JOHNSTON, I.R. (1962). The qualitative analysis of the cell walls of selected species of fungi. Biochemical Journal, 83: 325-330.
- DREYWOOD, R. (1946). Qualitative test for carbohydrate material. Industrial and Engineering Chemistry. Analytical Edition, 18: 499.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. y SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356.
- FARR, D.R., SCHULER-HOVANESSIAN, A. y HORISBERGER, M. (1977). Structure of an α -D-galactosaminoglycan from *Physarum policephalum* spherule walls. Carbohydrate Research, 59: 151-154.
- FASSATIOVA, O. (1985). Evaluation of some morphological features of asymmetric penicillia on different media. En: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics. NATO ASI Series. Series A: Life Sciences, vol. 102. pp. 105-111. R.A. Samson y J.I. Pitt (Eds.). Plenum Press. New York and London.
- FRISVAD, J.C. (1985). Secondary metabolites as an aid to *Emericella* classification. En: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. NATO ASI Series. Series A: Life Sciences, vol. 102. pp. 437-444. R.A. Samson y J.I. Pitt (Eds.). Plenum Press. New York and London.
- FRISVAD, J.C. (1989). The connection between the *Penicillia* and *Aspergilli* and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. Archives Environmental

Contamination Toxicology, 18: 452-467.

FRISVAD, J.C. y FILTENBORG, O. (1989). Terverticillate *Penicillia*: Chemotaxonomy and Mycotoxin production. *Mycologia*, 81: 837-861.

FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O., SAMSON, R.A. y STOLK, A.C. (1990). Chemotaxonomy of *Talaromyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57: 179-189.

GANDER, J.E., JENTOFT, N.H., DREWES, L.K. y RICK, P.D. (1974). The 5-O- β -D-galactofuranosyl-containing exocellular glycopeptide of *Penicillium charlesii*. Characterization of the phosphogalactomannan. *Journal of Biological Chemistry*, 249: 2063-2072.

GANDER, J.E. y FANG, F. (1976). The occurrence of ethanolamine and galactofuranosyl residues attached to *Penicillium charlesii* cell wall saccharides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71: 719-725.

GOMEZ-MIRANDA, B., GUERRERO, C., y LEAL, J.A. (1984). Effect of culture age on cell wall polysaccharides of *Penicillium allahabadense*. *Experimental Mycology*, 8: 298-303.

GOMEZ-MIRANDA, B., MOYA, A. y LEAL, J.A. (1986). Hyphal polysaccharides as potential phylogenetic markers for *Eupenicillium* species. *Experimental Mycology*, 10: 184-189.

GOMEZ-MIRANDA, B., MOYA, A. y LEAL, J.A. (1988). Differences in the cell wall composition in the type species of *Eupenicillium* and *Talaromyces*. *Experimental Mycology*, 12: 258-263.

GOMEZ-MIRANDA, B., PRIETO, A. y LEAL, J.A. (1990). Chemical composition and

characterization of a galactomannoglucan from *Gliocladium viride* wall material. FEMS Microbiology Letters, 70: 331-336.

GORIN, P.A.J. (1980). Structural studies on Fungal Polysaccharides using Carbon-13 and Proton NMR Spectroscopy. En: Fungal Polysaccharides. pp. 159-182. P.A. Sandford y K. Matsuda (Eds.).

GORIN, P.A.J. (1981). Carbon-13 Nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. En: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. Vol. 38. pp. 12-104.

GORIN, P.A.J. y MAZUREK, M. (1976). Carbohydrate Research, 48: 171-186.

GORIN, P.A.J. y SPENCER, J.F.T. (1968). Structural chemistry of fungal polysaccharides. En: Advances in Carbohydrate Chemistry. Vol. 23. pp. 367-417. M.L. Wolfron y R.S. Tipson (Eds.). Academic Press, New York and London.

GORIN, P.A.J., MAZUREK, M. y SPENCER, J.F.T. (1968). Canadian Journal of Chemistry, 46: 2305-2310.

GRISARO, V., SHARON, N. y BARKAI-GOLAN, R. (1968). The chemical composition of the cell walls of *Penicillium digitatum* Sacc. and *Penicillium italicum* Whem. Journal of General Microbiology, 54: 145-150.

HAKOMORI, S.I. (1964). A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalysed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. Journal of Biochemistry (Tokio), 55: 205-208.

HAMILTON, P.B. y KNIGHT, S.G. (1962). An analysis of the cell walls of *Penicillium chrysogenum*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 99: 282-287.

- HUNSLEY, D. y BURNETT, J.H. (1970). The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. *Journal of General Microbiology*, 62: 203-218.
- IKOTUM, T. (1984). Cell wall-degrading enzymes produced by *Penicillium oxalicum* Curie et Thom. *Mycopathologia*, 88: 15-21.
- JAMES, J.L. (1975). *Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry*. Academic Press. New York.
- JANSSON, P.-E., KENNE, L., LIEDGREN, H., LINDBERG, B. y LÖNNGREN, J. (1976). A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Chem. Commun.* n° 8.
- JANSSON, P.-E., KUMAR, N.S., LINBERG, B., WIDMALM, G. y HENRICHSEN, J. (1988). Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* Type 18A. *Carbohydrate Research*, 173: 227-233.
- JANSSON, P.-E. y LINDBERG, B. (1980). Structural studies of varianose. *Carbohydrate Research*, 82: 97-102.
- JOHNSTON, I.R. (1965). The composition of the cell wall of *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 96: 651-658.
- JONES, D.W. (1976). Combined applications of spectroscopy and other techniques. En: *Introduction to the spectroscopy of Biological polymers*. Vol. 295. Academic Press. New York.
- KAMADA, T. y TAKEMARU, T. (1983). Modifications of cell wall polysaccharides during stipe elongation in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Journal of General Microbiology*, 129: 703-709.

- KATZ, D. y ROSENBERGER, R.F. (1970). A mutation in *Aspergillus nidulans* producing hyphal walls which lack chitin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 208: 452-460.
- KREGER, D.R. (1954). Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by X-ray diffraction and solubility tests. *Biochimica et Biophysica Acta*, 13: 1-9.
- KROPPESTEDT, R.M. (1988). Chemical methods in the systematic of bacteria. Comunicación a la III Reunión del Grupo de Taxonomía Bacteriana de la SEM. Madrid, 22-23 de Septiembre.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 680-685.
- LAINE, R.A., ESSELMAN, W.J. y SWEETLEY, C.C. (1972). Gas-liquid chromatography of carbohydrates. En: *Methods in Enzymology*, Vol. 28. pp. 159-167. S.P. Colowick y N.O. Kaplan (Eds.). Academic Press. New York/London.
- LEAL, J.A., MOYA, A., GOMEZ-MIRANDA, B., RUPEREZ, P. y GUERRERO, C. (1984). Differences in cell wall polysaccharides in some species of *Penicillium*. En: *Microbial cell wall synthesis and autolysis*. (FEMS Symp. 27) pp. 149-155. C. Nombela (Ed.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam. New York and Oxford.
- LEAL, J.A., GOMEZ-MIRANDA, B., BERNABE, M., CANO, J. y GUARRO, J. (1992). The chemical composition of the wall of six species of *Aphanoascus*: the taxonomic significance of the presence of α -(1→2)(1→6) mannan and α -(1→4) glucan. *Mycological Research*, en prensa.
- LEE, C.K. y GRAY, G.R. (1988). A general strategy for the chemical sequencing of polysaccharides. *Journal of the American Chemical Society*, 110: 1292-1293.

- MAHADEVAN, P.R. Y TATUM, E.L. (1965). Relationship of the major constituents of the *Neurospora crassa* cell wall to wild type and colonial morphology. *Journal of Bacteriology*, 90: 1073-1081.
- MARTINEZ, M.J., VAZQUEZ, 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.
- MATSUNAGA, T., OKUBO, A., FUKAMI, M., YAMAZAKI, S. Y TODA, S. (1981). Identification of β -galactofuranosyl residues and their rapid internal motion in the *Penicillium ochro-chloron* cell wall probed by ^{13}C -NMR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 102: 524-530.
- MCCORMICK, J.J., BLOOMQUIST, J.C. y RUSCH, H.P. (1970). Isolation and characterisation of a galactosamine wall from spores and spherules of *Physarum polycephalum*. *Journal of Bacteriology*, 104: 1119-1125.
- McNEIL, M., DARVILL, A.G., AMAN, P., FRANZEN, L.-E. Y ALBERSHEIM, P. (1982). Structural analysis of complex carbohydrates using High-Performance Liquid Chromatography, Gas Chromatography and Mass Spectrometry. En: *Methods in Enzymology*. Vol. 83. pp. 3-45.
- MORRISEY, J.H. (1981). Silver staining for proteins in polyacrilamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, 117: 307-310.
- NAKAJIMA, T., TAMARI, K., MATSUDA, K., TANAKA, H. y OGASAWARA, N. (1972). Studies on the cell wall of *Piricularia oryzae*. Part III. The chemical

- structure of the β -D-glucan. *Agricultural Biological Chemistry*, 36: 11-17.
- NAKAJIMA, T., YOSHIDA, M., HIURA, N. y MATSUDA, K. (1984). Structure of the cell wall proteogalactomannan from *Neurospora crassa*. II. Structural analysis of the polysaccharide part. *Journal of Biochemistry*, 96: 1013-1020.
- NAKANO, H., TAKENISHI, S. y WATANABE, Y. (1985). Purification and properties of two galactanases from *Penicillium citrinum*. *Agricultural Biological Chemistry*, 49: 3445-3454.
- NAKANO, H., TAKENISHI, S. y WATANABE, Y. (1986). Action of galactanase from *Penicillium citrinum* on *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside. *Agricultural Biological Chemistry*, 50: 3005-3012.
- NELSON, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method to the determination of the glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153: 375-380.
- PEREZ-LEBLIC, M.I., REYES, F., LAHOZ, R. y ARCHER, S.A. (1982a). Autolysis of *Penicillium oxalicum* with special reference to its cell walls. *Canadian Journal of Microbiology*, 28: 1289-1295.
- PEREZ-LEBLIC, M.I., REYES, F., MARTINEZ, M.J. Y LAHOZ, R. (1982b). Cell wall degradation in the autolysis of filamentous fungi. *Mycopathology*, 80: 147-155.
- PEREZ-LEBLIC, M.I., COPA, J.L., ARIAS, M.E., REYES, .F. y LABORDA, F. (1985). 1,3- β -glucanases in the autolysis of *Penicillium oxalicum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 84: 467-471.
- PITT, J.I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, New York and London.

- PITT, J.I. y HOCKING, A.D. (1985). Interfaces among genera related to *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologia*, 77: 810-824.
- PITT, J.I. y SAMSON, R.A. (1990). Approaches to *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. *Studies on Mycology*, 32: 77-90.
- PRIETO, A., RUPEREZ, P., HERNANDEZ-BARRANCO, A. Y LEAL, J.A. (1988). Partial characterisation of galactofuranose-containing heteropolysaccharides from the cell walls of *Talaromyces helicus*. *Carbohydrate Research*, 177: 265-272.
- PURDIE, T. e IRVINE, J.C. (1903). *Journal of the Chemical Society (London)*, 83: 1021.
- RALPH, B.J. y BENDER, V.J. (1965). Isolation of two new polysaccharides from the wall of *Polyporus tumulosus*. *Chemistry and Industry*, 1: 181.
- RAPER, K.B. y THOM, C. (1949). *Manual of the Penicillia*. Williams and Wilkins (Eds.). Baltimore.
- REESE, E.T. (1977). The structure, biosynthesis and degradation of wood. Recent advances in *Phytochemistry*, 11: 311-367.
- REYES, F. y BYRDE, J.W. (1973). Partial purification and properties of a β -N-Acetylglucosaminidase from the fungus *Sclerotinia fructigena*. *Biochemical Journal*, 131: 381-388.
- REYES, F., LAHOZ, R. y VAL MORENO, A. (1981). Synthesis of 1,3- β -glucanase and β -N-acetylglucosaminidase during autolysis of *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, 126: 347-353.
- REYES, F., PEREZ-LEBLIC, M.I., MARTINEZ, M.J. y LAHOZ, R. (1984). Protoplasts production from filamentous fungi with their own autolytic enzymes. *FEMS*

Microbiological Letters, 24: 281-283.

REYES, F., CALATAYUD, J. y MARTINEZ, M.J. (1989). Endochitinase from *Aspergillus nidulans* implicated in the autolysis of its cell wall. FEMS Microbiology Letters, 60: 119-124.

RICHARDS, J.C. y LEITCH, R.A. (1989). Elucidation of the structure of the *Pasteurella haemolytica* serotype T10 Lipopolysaccharide O-antigen by NMR spectroscopy. Carbohydrate Research, 186: 275-286.

RICK, P.D., DREWES, L.R. y GANDER, J.E. (1974). The 5-o- β -D-galactofuranosyl-containing exocellular glycopeptide from *Penicillium charlesii*. Occurrence of ethanolamine and partial characterisation of the peptide portion and the carbohydrate-peptide linkage. The Journal of Biological Chemistry, 249: 2073-2078.

RIETSCHEL-BERST, M., JENTOFT, N.H., RICK, P.D., PLETCHER, C., FANG, F. y GANDER, J.E. (1977). Extracellular exo- β -galactofuranosidase from *Penicillium charlesii*. The Journal of Biological Chemistry, 252: 3219-3226.

RING, S.G. y SELVENDRAN, R.R. (1978). Purification and methylation analysis of cell wall material from *Solanum tuberosum*. Phytochemistry, 17: 745-652.

RIZZA, V. y KORNFELD, J.M. (1969). Components of conidial and hyphal walls of *Penicillium chrysogenum*. Journal of General Microbiology, 58: 307-315.

ROSENBERGER, R.F. (1976). The cell wall. En: The filamentous fungi. Volume II. Biosynthesis and Metabolism. pp. 328-344. J.E. Smith y D.R. Berry (Eds.).

RUIZ-HERRERA, J. (1967). Chemical components of the cell wall of *Aspergillus* species.

- Archives of Biochemistry and Biophysics, 122: 118-125.
- RUPEREZ, P., MOYA, A. y LEAL, J.A. (1986). Cell wall polysaccharides from *Talaromyces* species. Archives of Microbiology, 146: 250-255.
- RUPEREZ, P. y LEAL, J.A. (1986). Age-related changes in *Penicillium erythromellis* cell wall. Transactions of the British Mycological Society, 86: 279-285.
- RUPEREZ, P. y LEAL, J.A. (1987). Mannoglucogalactans from the cell walls of *Penicillium erythromellis*: isolation and partial characterisation. Carbohydrate Research, 167: 269-278.
- SAMSON, R.A., STOLK, A.C. y HADLOCK, R. (1976). Revision of the subsection *Fasciculata* of *Penicillium* and some allied species. Studies in Mycology, 11: 1-47.
- SAMSON, R.A., NIELSEN, P.V. y FRISVAD, J.C. (1990). The genus *Neosartorya*: differentiation by scanning electron microscopy and mycotoxin profiles. En: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. pp. 455-467. R.A. Samson y J.I. Pitt (Eds.). Plenum Press. New York and London.
- SHIBATA, Y. y NISIZAWA, K. (1965). Microheterogeneity of β -glucosidases in apricot emulsion. Archives of Biochemistry and Biophysics, 109: 516-521.
- SIETSMA, J.H. y WESSELS, J.G.H. (1977). Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. Biochimica et Biophysica Acta, 496: 225-239.
- SOMOGYI, M. (1952). Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry, 195: 19-23.
- SONNENBERG, A.S.M., SIETSMA, J.H. y WESSELS, J.G.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*. *Experimental Mycology*, 9: 141-148.
- STEVENS, B.J.H. y SELVENDRAN, R.R. (1980). The isolation and analysis of cell wall material from the alcohol-insoluble residue of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Journal of Science of Food and Agriculture*, 31: 1257-1267.
- St. LEGER, R.J., COOPER, R.M. y CHARNLEY, A.K. (1986). Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of the production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology*, 132: 1509-1517.
- STOLK, A. y SAMSON, R.A. (1972). The genus *Talaromyces*. Studies on *Talaromyces* and related genera. *Studies on Mycology*, 2: 1-65.
- TROY, F.A. y KOFFLER, H. (1969). The chemistry and molecular architecture of the cell walls of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biological Chemistry*, 244: 5563-5576.
- TSUMURAYA, Y., MOCHIZUKI, N., HASHIMOTO, Y. y KOVAC, P. (1990). Purification of an exo- β -(1 \rightarrow 3)-D-galactanase of *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) and its action on arabinogalactan-proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 7207-7215.
- TURNER, W.B. (1971). *Fungal metabolites*. Academic Press. New York and London.
- UNGER, P.D. y HAYES, A.W. (1975). Chemical composition of the hyphal wall of a toxigenic fungus *Penicillium rubrum* Stolk. *Journal of General Microbiology*, 91: 201-206.
- VILLANUEVA, J.R. (1966). Protoplasts of fungi. En: *The fungi*, Vol. 2. pp. 2-62. G.C. Ainsworth y A.S. Sussman (Ed.). New York: Academic Press.

- WARD, C. y WRIGHT, B.E. (1965). Cell wall synthesis in *Dictiostelium discoideum*. *Biochemistry*, 4: 2021-2027.
- WESSELS, J.G.H. (1965). Morphogenesis and biological processes in *Schizophyllum commune*. *Wentia*, 13: 1-113.
- WESSELS, J.G.H., KREGER, D.R., MARCHANT, R., REGENSBURG, B.A. Y DE VRIES, O.M.H. (1972). Chemical and morphological characterisation of the hyphal wall surface of the Basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 273: 346-358.
- WESSELS, J.G.H. y SIETSMA, J.H. (1981). Fungal Cell Walls: A Survey. En: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Volume 13B. Plant Carbohydrates II. Extracellular Carbohydrates.* pp. 352-394. W. Tanner y F.A. Loewus (Eds.). Springer-Verlag. Berlín. Heidelberg. New York.
- ZONNEVELD, B.J.M. (1971). Biochemical analysis of the cell wall of *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 249: 506-514.