

Depositado en DEPARTAMENTO BIOQUÍMICA
VEGETAL Y BIOLOGÍA MOLECULAR
de esta Universidad desde el día 12-01-1994
hasta el día 29-01-1994

Sevilla, 15 de Febrero de 1994

ACTOR DE

Jesús de la Cruz Díaz

43 número 168

El Jefe del Departamento de...

Jesús de la Cruz Díaz

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE
HIDROLASAS IMPLICADAS EN EL MICOPARASITISMO DE
*Trichoderma harzianum***

TD/265

Trabajo presentado por el licenciado
Jesús de la Cruz Díaz
para optar al grado de Doctor en Biología
por la Universidad de Sevilla

Jesús de la Cruz Díaz

Sevilla, Febrero de 1994

Directores:

A. Llobell

Dr. Antonio Llobell González
Profesor Titular de Bioquímica
y Biología Molecular

Tahía Benítez

Dra. Tahía Benítez Fernández
Profesora Titular de
Genética

R. 11892





UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para
que mi Tesis Doctoral PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE PROTEÍNAS IMPUREZAS EN EL NICOTINATI-
VIDO DE *Tichodroma maritima*

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

Sevilla, a 27 de Octubre de 1994

JUAN DE LA CRUZ DÍAZ

TD-265

Especialmente a mi madre

La realización de esta Tesis Doctoral ha costado más de un disgusto pero numerosas alegrías. El trabajo ha sido realizado básicamente en el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla y en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, dirigido por el Profesor Miguel García Guerrero. Parte del trabajo también se ha realizado en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla; el apoyo prestado por uno de mis directores, la Dra. Tahía Benítez, fue esencial para solventar más de una susceptibilidad inicial en este último.

Son muchas las personas a las que tengo que agradecerles su contribución, empezando por mis directores de Tesis, el Dr. Antonio Llobell y la Dra. Tahía Benítez a los que les agradezco su interés y dedicación a la consecución tanto del trabajo como la iniciación a mi formación científica. Al Dr. J. Antonio Pintor Toro también le agradezco su interés. A la futura Dra. Isabel Mateos, al Dr. Aurelio Serrano y al Profesor Manuel Losada les agradezco el tiempo dedicado cuando me incorporé al Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis como alumno adherido.

En ciertas técnicas experimentales he necesitado la ayuda desinteresada de algunos amigos y de otros compañeros de trabajo. Admiro la paciencia del Dr. Enrique Martínez Force que me ayudó en todo momento, importándole más mi trabajo que el suyo propio, durante la realización de los experimentos de HPLC y con el manejo de ordenadores. Al Dr. Luis Bejarano, la realización de los antisueros de ratón anti-quitinasas y anti- β -1,6-glucanasa. A las Dras. Carmen Osuna y Josefina Cano, el espacio prestado en los animalarios de la Facultad de Medicina y de Farmacia de la Universidad de Sevilla, respectivamente, para obtener los antisueros de conejo anti-quitinasas. A los inseparables Dra. Maribel Muro y al "Dr." J. Carlos Reyes los seguimientos de mis purificaciones durante los fines de semana. Finalmente, a los Drs. Guy Bauw y Roberto Geremia, la ayuda esencial en las técnicas de microsecuenciación de proteínas durante mi estancia en el *Laboratorium voor Genetika* (Universidad de Gante, Bélgica), dirigido por el Profesor Marc van Montagu, al que también agradezco haberme acogido en su laboratorio.

Numerosos son los amigos que sin pedir nada a cambio han contribuido a crear una excelente mezcla de trabajo, diversión y amistad. Más de uno ha tenido que aguantar mis insoportables "dolores de cabeza" y sin ánimos de dejar a nadie en el tintero deseo expresar mis agradecimientos a las siguientes personas:

En primer lugar (claro está), a "mis niñas de la 108", Mari Cruz Muñoz, Ana Peciña, Isabel Martínez Férez y Blanca Fernández, y a "mis mayores", Dras. Mercedes García de la Vega y Teresa Ruiz. Nunca olvidaré los ratos felices vividos junto a ellas y con el Profesor Antonio Paneque y el Dr. Agustín Vioque, afortunadamente presentes en mi misma habitación de trabajo. Pero con toda sinceridad, sin la más que amistad de Cruciti y Aniti, el laboratorio hubiese sido más aburrido; no quiero asustarlas, pero si fuese posible, me encantaría trabajar siempre en su compañía.

En segundo lugar, agradecer "los granitos de arena" de mis amigos y compañeros Belén Floriano, Miguele Vega Palas, Montserrat Arista, Paco Navarro, Sebastián Chávez, Maribela Muro, J. Carlos Reyes, Javier Florencio, Amando Flores, Olga del Pozo y Antonio Carvallo. Belén más que "granitos" puso numerosas veces "camiones". Al resto de compañeros del Instituto de Bioquímica y a los que se sientan aludidos del Departamento de Genética, les agradezco su colaboración y su amistad.

A mis compañeros de grupo, Manolo Rey, Irene García, Fernando Dominguez, Antonio Hidalgo Gallego y J. Manuel Lora les agradezco su constante apoyo y su actitud crítica. De entre todos ellos, Manolo fue el "mejor escudero" que uno puede desear para vencer las dificultades que acarrea el trabajo de laboratorio. A Pepa Pérez de León, Antonia Friend, Nela Granados, Reyes Dominguez, Chon Blasco y Ana Moreno les agradezco su importante apoyo burocrático.

No se me olvidan mis amigos de siempre, Falete y Nano; creo que nadie mejor que ellos supieron soportar mis medias horas virtuales de trabajo convertidas por este doctorando en varias horas reales. Además, el apoyo moral y cervecero de ambos fue esencial para superar mis malas rachas personales y de trabajo.

Quiero agradecer igualmente al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una beca del Plan de Formación de Profesorado y del Personal Investigador y a las entidades Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, la Comunidad Europea y la Junta de Andalucía la financiación de este trabajo.

Finalmente, la realización de este trabajo y la escritura del mismo, imposible ésta última sin las sugerencias en los primeros manuscritos de Belén, Mercedes y Ana y " la edición de Javier ", han seguido la siguiente regla básica: "Es más sano no esperar nada y hacer lo posible, que entusiasmarse y no hacer nada" (G. Keller).

INDICE

INDICE DE FIGURAS	15
INDICE DE TABLAS	18
ABREVIATURAS	21
1. INTRODUCCION	25
1.1. <i>Trichoderma</i>: CARACTERISTICAS GENERALES	27
1.2. PAPEL CELULOLITICO DE <i>Trichoderma</i>	28
1.3. PAPEL ANTAGONISTA DE <i>Trichoderma</i>	32
1.4. ENZIMAS HIDROLITICAS DE POLIMEROS DE LA PARED CELULAR DE HONGOS FILAMENTOSOS	37
1.4.1. La pared celular de los hongos	37
1.4.2. Las quitinasas	42
1.4.3. Las β-1,3-glucanasas	48
1.4.4. Las β-1,6-glucanasas	51
2. OBJETIVOS	53
3. MATERIALES Y METODOS	57
3.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	59
3.1.1. Cepas de <i>Trichoderma</i>	59
3.1.2. Cepas de levaduras y de otros hongos filamentosos	59
3.1.3. Medios y condiciones de cultivo	60
3.1.3.1. Medios y condiciones de cultivo para el mantenimiento de los microorganismos. Recogida de esporas	60

3.1.3.2.	Medios y condiciones de cultivo para experimentos de inducción de enzimas extracelulares	61
3.1.3.3.	Medios y condiciones de cultivo para la purificación de enzimas	62
3.1.3.4.	Recogida de micelio y obtención de sobrenadantes	62
3.1.3.5.	Concentración de sobrenadantes por precipitación con sulfato amónico	62
3.2.	ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA Y DETERMINACION DE PROTEINAS	63
3.2.1.	Preparación de sustratos para ensayos enzimáticos	63
3.2.2.	Ensayos de actividad quitinasa y determinación de GlcNAc	65
3.2.3.	Ensayo de actividad β -1,3-glucanasa y determinación de azúcares reductores	66
3.2.4.	Ensayo de actividad β -1,6-glucanasa	67
3.2.5.	Ensayo de actividad quitobiasa	68
3.2.6.	Ensayo de actividad lisozima	68
3.2.7.	Ensayos de actividad lítica sobre paredes celulares	68
3.2.8.	Determinación de proteína extracelular	69
3.2.9.	Determinación de proteína total	69
3.3.	METODOS DE PURIFICACION Y TECNICAS CROMATOGRAFICAS	70
3.3.1.	Método de purificación de quitinasas	70
3.3.2.	Método de purificación de β -1,6-glucanasas	70
3.3.3.	Método de purificación de β -1,3-glucanasas	70
3.3.4.	Método de purificación de una enzima que hidroliza paredes de <i>B. cinerea</i> CECT 2100	71
3.3.5.	Técnicas cromatográficas	71
3.3.5.1.	Cromatoenfoque	71
3.3.5.2.	Cromatografía de filtración en gel. Determinación de la masa molecular en condiciones nativas y del radio de Stokes	71
3.3.6.	Concentración por ultrafiltración	72
3.4.	OBTENCION DE ANTISUEROS	73

3.5. ANALISIS DE PROTEINAS: CARACTERIZACION MOLECULAR	74
3.5.1. Electroforesis de proteínas	74
3.5.1.1. Electroforesis analíticas en geles de poliacrilamida que contenían SDS	74
3.5.1.2. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	75
3.5.1.3. Isoelectroenfoque	75
3.5.1.4. Tinción de glucoproteínas en geles de poliacrilamida y detección de estados de glicosilación en las proteínas	76
3.5.1.5. Detección de actividad quitinasa en geles de poliacrilamida	77
3.5.1.6. Detección de actividad β -1,6-glucanasa en réplicas de geles de poliacrilamida	78
3.5.1.7. Inmunotransferencia y detección de proteínas mediante el empleo de antisueros	78
3.5.1.8. Transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno para microsecuenciación de proteínas	79
3.5.2. Obtención y separación de péptidos trípticos	80
3.5.3. Microsecuenciación de proteínas y péptidos trípticos	81
3.6. ANALISIS DE PROTEINAS: CARACTERIZACION CINETICA	82
3.6.1. Determinación de K_m	82
3.6.2. Especificidades por sustrato	82
3.6.3. Determinación de la temperatura óptima de ensayo	83
3.6.4. Determinación de la estabilidad térmica	84
3.6.5. Determinación del modo de acción de las enzimas.	
Medida de productos de reacción por HPLC	84
3.7. OTROS METODOS ANALITICOS	85
3.7.1. Determinación de glucosa	85
3.7.2. Determinación del pH	85
3.7.3. Determinaciones espectrofotométricas	85
3.7.4. Eliminación de sales y moléculas pequeñas de las preparaciones proteicas	85
3.7.5. Precipitación de pequeños volúmenes de proteína	86

3.8. METODOS INFORMATICOS	86
3.8.1. Programas utilizados en ordenador personal	86
3.8.2. Programas utilizados en conexión con la red del Centro Informático Científico de Andalucía (CICA)	86
4. RESULTADOS	87
4.1. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES NUTRICIONALES SOBRE LOS NIVELES DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS B-GLUCANASAS Y QUITINASA DE <i>T. harzianum</i> CECT 2413	89
4.1.1. Efecto de distintas fuentes de carbono sobre la producción de las enzimas estudiadas	89
4.1.2. Efecto de la concentración de sustratos sobre la producción de las enzimas estudiadas	89
4.1.3. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de las enzimas estudiadas	92
4.1.4. Efecto de inhibidores de la traducción y de la transcripción sobre la producción de las enzimas estudiadas	94
4.2. ANALISIS POR CROMATOENFOQUE DEL NUMERO MINIMO DE ISOENZIMAS DISTINTAS PARA LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESTUDIADAS	97
4.3. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS QUITINASAS DE <i>T. harzianum</i> CECT 2413	101
4.3.1. Purificación de las quitinasas y criterios de homogeneidad	101
4.3.2. Propiedades físico-químicas	103
4.3.2.1. Masa molecular	103
4.3.2.2. Radio de Stokes	106
4.3.2.3. Punto isoelectrico	107
4.3.2.4. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad	107
4.3.2.5. Carácter glucoproteico	107
4.3.2.6. Obtención de secuencias parciales de aminoácidos	109
4.3.2.7. Reacción antigénica de las quitinasas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	112

4.3.3	Propiedades catalíticas	113
4.3.3.1.	Temperatura óptima	113
4.3.3.2.	Especificidad para los sustratos	113
4.3.3.3.	Constantes de Michaelis-Menten	113
4.3.3.4.	Productos de reacción y mecanismos de acción	114
4.3.4.	Propiedades líticas	116
4.3.5.	Resumen de propiedades	117
4.4.	PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS β-1,6-GLUCANASAS y DE UNA β-1,3-GLUCANASA DE <i>T. harzianum</i> CECT 2413	119
4.4.1.	Purificación de las β-1,6-glucanasas y criterios de homogeneidad. Purificación de una β-1,3-glucanasa	119
4.4.2.	Propiedades moleculares	125
4.4.2.1.	Masa molecular	125
4.4.2.2.	Punto isoeléctrico	125
4.4.2.3.	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad	126
4.4.2.4.	Carácter glucoprotéico	126
4.4.2.5.	Obtención de secuencias parciales de aminoácidos	127
4.4.2.6.	Reacción antigénica de las β-glucanasas purificadas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	128
4.4.3.	Propiedades catalíticas	128
4.4.3.1.	Temperatura óptima	128
4.4.3.2.	Especificidad para los sustratos	129
4.4.3.3.	Constante de Michaelis-Menten (Km)	130
4.4.3.4.	Productos de reacción y mecanismos de acción	131
4.4.4.	Propiedades líticas	135
4.4.5.	Resumen de propiedades	136
4.5.	PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA ENZIMA DE <i>T. harzianum</i> CECT 2413 QUE DEGRADA PAREDES CELULARES DE <i>B. cinerea</i> CECT 2100	137
4.5.1.	Purificación y criterios de homogeneidad	137
4.5.2.	Propiedades moleculares	139
4.5.2.1.	Masa molecular	139
4.5.2.2.	Punto isoeléctrico	139

4.5.2.3.	Carácter glucoproteico	139
4.5.3.	Propiedades catalíticas	140
4.5.3.1.	Especificidad para los sustratos	140
4.5.4.	Propiedades líticas	140
4.6.	QUITINASAS, β-1,3-GLUCANASAS Y β-1,6-GLUCANASAS EN OTRAS ESPECIES DE <i>Trichoderma</i>	141
4.6.1.	Actividades quitinasa y β -glucanasa en las distintas cepas de <i>Trichoderma</i>	141
4.6.2.	Detección inmunológica de quitinasas y β -1,6-glucanasas en las distintas cepas de <i>Trichoderma</i>	144
5.	DISCUSION	147
5.1.	REGULACION DE LA SINTESIS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESTUDIADAS EN <i>T. harzianum</i> CECT 2413	149
5.2.	PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS ENZIMAS ESTUDIADAS EN <i>T. harzianum</i> CECT 2413	151
5.2.1.	Quitinasas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	152
5.2.2.	β -glucanasas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	156
5.2.3.	Enzima que degrada paredes celulares de <i>B. cinerea</i> CECT 2100 purificada de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	160
5.3.	PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS ENZIMAS ESTUDIADAS	161
6.	CONCLUSIONES	165
7.	BIBLIOGRAFIA	169

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de las estructuras de los genes de celulasas descritas en <i>T. reesei</i>	30
Figura 2.	Estructura terciaria de las celulasas CBHI y CBHII de <i>T. reesei</i>	31
Figura 3.	Efecto micoparásito de <i>T. hamatum</i> durante la unión y la penetración	36
Figura 4.	Estructura primaria de la quitina, celulosa, β -1,3-glucano y β -1,6-glucano	38
Figura 5.	Esquema de los cambios morfogenéticos que se suceden durante el crecimiento apical de los hongos filamentosos	42
Figura 6.	Cinética de excreción de las actividades quitinasa (A), quitobiasa (B), β -1,3-glucanasa (C) y β -1,6-glucanasa (D) por diferentes fuentes de carbono en <i>T. harzianum</i> CECT 2413	91
Figura 7.	Efecto de la glucosa sobre la producción de las actividades quitinasa (A y C), quitobiasa (B y D), β -1,3-glucanasa (E) y β -1,6-glucanasa (F) en <i>T. harzianum</i> CECT 2413	93
Figura 8.	Efecto de la cicloheximida y 8-hidroxiquinolina sobre los niveles enzimáticos de β -1,3-glucanasa (A y B) y de β -1,6-glucanasa (C y D) de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	94
Figura 9.	Análisis mediante cromatoenfoco del número de isoenzimas con actividad β -1,3-glucanasa presentes en cultivos de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 inducidos en quitina al 1.5 %	97
Figura 10.	Análisis mediante cromatoenfoco del número de isoenzimas con actividad β -1,6-glucanasa presentes en cultivos de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 inducidos en quitina al 1.5 %	98
Figura 11.	Análisis mediante cromatoenfoco del número de isoenzimas con actividad quitinasa presentes en cultivos de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 inducidos en quitina	98
Figura 12.	Perfil de elución en una columna de cromatoenfoco de las quitinasas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	102
Figura 13.	Análisis mediante electroforesis analítica (A) y de actividad (B) de las quitinasas purificadas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	104
Figura 14.	Determinación de la masa molecular de las quitinasas purificadas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 en estado nativo mediante cromatografía de filtración en gel	105

Figura 15.	Determinación de la masa molecular de las quitinasas purificadas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS	105
Figura 16.	Determinación del radio de Stokes de las quitinasas purificadas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 mediante cromatografía de filtración el gel	106
Figura 17.	Perfil de inactivación térmica de las quitinasas purificadas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	108
Figura 18.	Alineamiento en los bancos de secuencias de las secuencias de los péptidos 16 de CHIT 42 (A) y 6 de CHIT 33 (B)	110
Figura 19.	Alineamiento de los péptidos obtenidos de CHIT 42 con la secuencia de aminoácidos de la quitinasa Chi 1 de <i>A. album</i>	111
Figura 20.	Análisis antigénico de las quitinasas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	112
Figura 21.	Análisis de los productos de reacción de las quitinasas purificadas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 mediante HPLC	115
Figura 22.	Actividad lítica sobre paredes celulares de <i>B. cinerea</i> CECT 2100 asociada a las quitinasas purificadas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	116
Figura 23.	Perfil de elución en una columna de cromatoenfoco de las β -1,6-glucanasas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	120
Figura 24.	Electroforesis analítica de los picos de actividad β -1,6-glucanasa obtenidos mediante cromatoenfoco	120
Figura 25.	Análisis mediante electroforesis analítica (A) y réplica de actividad (B) de la β -1,6-glucanasa (β -1,6-II) purificada de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	121
Figura 26.	Perfil de elución en una columna de filtración en gel de la β -1,6-glucanasa (β -1,6-I) y de la β -1,3-glucanasa (β -1,3-I) de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	122
Figura 27.	Análisis mediante electroforesis analítica y réplica de actividad de la β -1,6-glucanasa (β -1,6-I) purificada de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	123
Figura 28.	Análisis de la β -1,3-glucanasa (β -1,3-I) purificada de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 mediante electroforesis analítica	123
Figura 29.	Análisis antigénico de la β -1,6-glucanasa (β -1,6-II) de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	129
Figura 30.	Análisis de los productos de reacción de la β -1,6-I purificada de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 mediante HPLC	132
Figura 31.	Análisis de los productos de reacción de la β -1,6-II purificada de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 mediante HPLC	133
Figura 32.	Análisis de los productos de reacción de la β -1,3-I purificada de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 mediante HPLC	134

Figura 33.	Perfil de elución en una columna de filtración en gel de la actividades β -1,3-glucanasa y clarificadora de paredes celulares de <i>B. cinerea</i> CECT 2100 de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	138
Figura 34.	Análisis de la proteína clarificadora de paredes celulares de <i>B. cinerea</i> CECT 2100, purificada de <i>T. harzianum</i> CECT 2413 mediante electroforesis analítica	138
Figura 35.	Análisis antigénico de la quitinasa CHIT 42 en distintas cepas de <i>Trichoderma</i> y en <i>Gliocladium</i>	145
Figura 36.	Análisis antigénico de la quitinasa CHIT 37 en distintas cepas de <i>Trichoderma</i> y en <i>Gliocladium</i>	145
Figura 37.	Análisis antigénico de la quitinasa CHIT 33 en distintas cepas de <i>Trichoderma</i> y en <i>Gliocladium</i>	146
Figura 38.	Análisis antigénico de la β -1,6-glucanasa β -1,6-II en distintas cepas de <i>Trichoderma</i> y en <i>Gliocladium</i>	146

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Hongos fitopatógenos controlados por las especies de <i>Trichoderma</i> y <i>Gliocladium</i>	32
Tabla 2.	Relación entre la composición de pared celular y grupos taxonómicos de hongos	39
Tabla 3.	Componentes de la pared celular de los hongos	40
Tabla 4.	Cepas de <i>Trichoderma</i> y de <i>Gliocladium</i> usadas en este trabajo	59
Tabla 5.	Otros hongos empleados en este trabajo	60
Tabla 6.	Efecto de la fuente de carbono sobre los niveles extracelulares de actividad β -1,3-glucanasa, β -1,6-glucanasa, quitinasa y actividad lítica en <i>T. harzianum</i> CECT 2413	90
Tabla 7.	Efecto de la adición de cicloheximida u 8-hidroxiquinolina en los niveles extracelulares e intracelulares de actividad quitinasa y quitobiasa de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	95
Tabla 8.	Purificación de las quitinasas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	103
Tabla 9.	Secuencias parciales de aminoácidos de las quitinasas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	109
Tabla 10.	Especificidad de las quitinasas para los distintos sustratos	114
Tabla 11.	Constantes cinéticas (K_m) de las quitinasas purificadas	114
Tabla 12.	Resumen de las propiedades de las quitinasas purificadas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	117
Tabla 13.	Purificación de las β -1,6-glucanasas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	124
Tabla 14.	Purificación de una β -1,3-glucanasa de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	124
Tabla 15.	Secuencias parciales de aminoácidos de las β -glucanasas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	127
Tabla 16.	Especificidad de las β -glucanasas purificadas para los distintos sustratos	130
Tabla 17.	Acción lítica sobre paredes celulares de las β -glucanasas purificadas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	135
Tabla 18.	Resumen de las propiedades de las β -glucanasas purificadas de <i>T. harzianum</i> CECT 2413	136
Tabla 19.	Especificidad para los distintos sustratos de la enzima clarificadora de paredes celulares de <i>B. cinerea</i> CECT 2100 purificada	140
Tabla 20.	Actividad quitinasa en distintas especies de <i>Trichoderma</i> y de <i>Gliocladium</i>	142

Tabla 21.	Actividad β -1,3-glucanasa en distintas especies de <i>Trichoderma</i> y de <i>Gliocladium</i>	142
Tabla 22.	Actividad β -1,6-glucanasa en distintas especies de <i>Trichoderma</i> y de <i>Gliocladium</i>	143
Tabla 23.	Actividad lítica en distintas especies de <i>Trichoderma</i> y de <i>Gliocladium</i>	143

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
APS	Persulfato amónico
bisacrilamida	N,N',-bis-metilén-acrilamida
β -1,3-I	β -1,3-glucanasa I
β -1,3-II	β -1,3-glucanasa II
β -1,3-III	β -1,3-glucanasa III
β -1,6-I	β -1,6-glucanasa I
β -1,6-II	β -1,6-glucanasa II
CBH	Celobiohidrolasa
cDNA	DNA complementario
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CHIT 33	Quitinasa de 33 kDa
CHIT 37	Quitinasa de 37 kDa
CHIT 42	Quitinasa de 42 kDa
CMC	Carboximetilcelulosa
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilén-diamino-tetraacético
EG	Endoglucanasa
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad terrestre
GalN	β -D-Galactosamina
GlcN	β -D-Glucosamina
GlcNAc	β -D-N-acetil-glucosamina
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
K_m	Constante de Michaelis-Menten
MeUmb	4-Metil-umbeliferil
Np-(GlcNAc) ₂	p-nitrofenil-N,N',-diacetil-quitobiosa
Np-GalNAc	p-nitrofenil-N-acetil- β -D-galactosamina
Np-GlcNAc	p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina
pb	Par de bases
pI	Punto isoeléctrico

Hidrolasas de T. harzianum

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonio
PTH	Fenil tioidantoína
p/v	Relación peso/volumen
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Rf	Movilidad relativa
RFLPs	Polimorfismo de tamaño de fragmentos de restricción
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sustrato
SDS	Laurilsulfato sódico
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metil-etilén-diamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
U	Unidad de actividad enzimática
V	Velocidad inicial
v/v	Relación volumen/volumen
V _e	Volumen de elución
V _{max}	Velocidad máxima
V ₀	Volumen de vacío
V _t	Volumen total

Aminoácidos

A	Alanina
R	Arginina
N	Asparagina
D	Acido aspártico
C	Cisteína
E	Acido glutámico
Q	Glutamina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
L	Leucina
K	Lisina
M	Metionina
F	Fenilalanina
P	Prolina
S	Serina
T	Treonina
W	Triptófano
Y	Tirosina
V	Valina

1. INTRODUCCION

1.1. *Trichoderma*: CARACTERISTICAS GENERALES

El género *Trichoderma* agrupa hongos filamentosos Deuteromicetos, que se caracterizan por carecer de ciclo sexual conocido. Su forma de reproducción conocida hasta el momento es una alternancia micelio-conidio asexual (Fassatiouva, 1986). El micelio está formado por un conjunto de hifas más o menos ramificadas cuyas células se encuentran tabicadas y contienen más de un núcleo. El número de cromosomas por núcleo se ha estudiado mediante la técnica de electroforesis de campo pulsante e hibridación de Southern, encontrándose entre 5 y 7 (Herrera-Estrella *et al.*, 1993; Mäntylä *et al.*, 1991). Los conidios o esporas poseen un sólo núcleo probablemente haploide (Rosen *et al.*, 1974). Los conidios son ovoides, de color verde (excepcionalmente hialinos) y se forman sobre estructuras muy ramificadas denominadas conidióforos, que a su vez se sitúan sobre células especiales denominadas fialidas. La conidiación, en el laboratorio, se produce si el organismo es expuesto a pulsos cortos de luz visible o ultravioleta o es sometido a hambre de nutrientes (Horwitz *et al.*, 1985). La germinación, menos estudiada, se produce en numerosos sustratos pero nunca en agua destilada, lo que indica que se necesita una fuente externa de nutrientes para iniciar este proceso (Danielson y Davey, 1973). En determinadas condiciones nutricionales adversas, o frente a la desecación se producen otro tipo de estructuras asexuales, esta vez intercaladas en el micelio y denominadas clamidosporas, que se han descrito como formas de resistencia (Lewis y Papavizas, 1984). El género *Hypocrea* se ha considerado que es la forma perfecta de *Trichoderma* (Davet, 1990), aunque aún no se ha establecido de forma definitiva.

La taxonomía de *Trichoderma* permanece muy imprecisa. Dado su carácter de hongo imperfecto, no pueden establecerse cruces genéticos que definan especies dentro del género, similares a los realizados para otros grupos de hongos (Anderson y Ullrich, 1979). El esquema taxonómico inicial incluía nueve grupos, denominados "agregados", que se diferenciaban entre si por caracteres morfológicos (Rifai, 1969). Actualmente, los grupos taxonómicos están mejor definidos gracias al uso de las técnicas de biología molecular del DNA. Meyer (1991) mediante análisis de fragmentos de restricción del DNA mitocondrial estableció dos grupos dentro del agregado *T. viride*. Más recientemente, el mismo autor (Meyer *et al.*, 1992), analizando mediante RFLPs nueve especies diferentes de *Trichoderma*, estableció cinco grupos: el grupo I formado por *T. reesei* y *T. todica*; el grupo II formado por *T. longibrachiatum*, *T. polysporum*, *T. koningii* y *T. pseudokoningii*; el grupo III por *T. virgatum*; el grupo IV por *T. saturnisporum* y el grupo V y último por *T. harzianum*.

En cuanto a su ecología y fisiología, *Trichoderma* comprende especies ubícuas que viven en el suelo (Papavizas, 1985). Posee características que lo convierten en un organismo de gran interés comercial. Por un lado, algunas especies producen grandes cantidades de celulasas, enzimas capaces de transformar la celulosa en glucosa (Montenecourt, 1983), utilizable para alimentación y para la manufactura de otros productos. Otros procesos en el que la utilización de celulasas es de gran interés son las fermentaciones alcohólicas, el procesamiento del almidón y la producción de zumos vegetales (Wood, 1989). Por otra parte, *Trichoderma* puede servir como alternativa a los organismos ya usados biotecnológicamente para producir proteínas de mamíferos con fines farmacéuticos. Entre sus ventajas se encuentran la capacidad para excretar proteínas y la existencia de mutantes carentes de actividad proteasa y de métodos efectivos de transformación (Nevalainen *et al.*, 1991); de hecho algunas proteínas heterólogas, como la quimosina de ternera, se han expresado ya en *Trichoderma* (Harkki *et al.*, 1987). Finalmente, algunas especies de este género se han usado como agentes de control biológico de ciertas enfermedades de plantas (Papavizas, 1985). Esta propiedad, observada por primera vez por Weidling (1934), junto con su ubicuidad, la facilidad para ser aislado del suelo y crecer de forma axénica en medios sintéticos con una amplia gama de fuentes de carbono y de nitrógeno, la amplia variedad de patógenos de plantas a los que ataca y su carácter inocuo para las plantas, lo hacen uno de los organismos más atractivos para el estudio del control biológico.

1.2. PAPEL CELULOLITICO DE *Trichoderma*

Los hongos del género *Trichoderma*, y muy en particular *T. reesei*, son los microorganismos celulolíticos mejor estudiados (Nevalainen *et al.*, 1991). El "descubrimiento" de *Trichoderma* se produce en el sudeste asiático durante la Segunda Guerra Mundial, como consecuencia de los destrozos que producía en las ropas de algodón de los soldados y en las tiendas de campaña. En 1950, Reese y Mandels, observaron que las cepas aisladas de *Trichoderma* producían y excretaban una batería enzimática de celulasas requeridas para la sacarificación de la celulosa en glucosa. En 1977, estas cepas se nombraron en honor de uno de sus descubridores como *T. reesei* (Montenecourt, 1983).

En general, la degradación de la celulosa, polímero de β -1,4-glucosa, se lleva a cabo por un sistema enzimático bien definido: endoglucanasas (β -1,4-glucan glucanohidrolasas, E.C. 3.2.1.4), exoglucanasas (β -1,4-glucan celobiohidrolasas, E.C. 3.2.1.91) y β -glucosidasas (β -D-glucósido glucohidrolasa, E.C. 3.2.1.21). Las endoglucanasas (EG) hidrolizan al azar enlaces β -1,4-glucosídicos internos en las moléculas de celulosa, las

celobiohidrolasas (CBH) liberan disacáridos (celobiosa) a partir de los extremos no reductores y las β -glucosidasas hidrolizan celobiosa y otros oligosacáridos de bajo peso molecular hasta glucosa (Béguin, 1990). No obstante, la conversión de celulosa en glucosa es más compleja debido a la naturaleza del sustrato: la celulosa, en su forma natural, está embebida en una matriz de hemicelulosas y ligninas que reducen la accesibilidad a las enzimas celulolíticas, por lo que se requiere la participación de otras enzimas como ligninasas, hemicelulasas, xilanasas etc. para una degradación eficiente.

En *T. reesei* se han identificado al menos, tres formas inmunológicamente distintas de endoglucanasas, EGI, EGII y EGIII, dos celobiohidrolasas, CBHI y CBHII y distintas formas de β -glucosidasas, si bien una es mayoritaria (Nevalainen *et al.*, 1991). Todas estas enzimas han sido purificadas y caracterizadas por numerosos laboratorios (Håkansson *et al.*, 1974; Nummi *et al.*, 1983; Penttilä *et al.*, 1986; Saloheimo *et al.*, 1988; Chirico y Brown, 1987). EGI representa entre el 5-10 % de la proteína total excretada por *T. reesei* cuando utiliza celulosa como fuente de carbono; CBHI es el principal componente del sistema celulolítico, constituyendo el 60 % de la proteína total excretada (Wood, 1989), mientras que CBHII representa aproximadamente el 20 %. Las actividades minoritarias β -glucosidasa se deben en parte a proteólisis parcial de la β -glucosidasa mayoritaria (Hofer *et al.*, 1989); a diferencia de las anteriores, la actividad β -glucosidasa está localizada fundamentalmente en la pared celular (Sprey, 1986).

En el sistema celulolítico de *T. reesei*, el grado de hidrólisis que se alcanza por combinación de las actividades EGs, CBHs y β -glucosidasa es superior a la suma de las actividades individualizadas, fenómeno denominado sinergismo (Cabib, 1987). El modelo de sinergismo más aceptado es aquel en el que las endoglucanasas generan grupos no reductores libres del interior de las moléculas de celulosa nativa durante los primeros estadios de hidrólisis. Estos extremos son atacados sucesivamente por las celobiohidrolasas liberando celobiosa. La acción conjunta y continuada de endoglucanasas y celobiohidrolasas determina la solubilización de la celulosa nativa en celobiosa y oligosacáridos cortos. La actividad β -glucosidasa libera glucosa de estos últimos. (Wood, 1989).

Se han clonado y caracterizado en detalle cuatro genes de celulasas de *T. reesei*, *cbh1* (Shoemaker *et al.*, 1983; Teeri *et al.*, 1983), *cbh2* (Chen *et al.*, 1987; Teeri *et al.*, 1987), *egl1* (Penttilä *et al.*, 1986; van Arsdell *et al.*, 1987) y *egl3* (Saloheimo *et al.*, 1988), y el gen de la β -glucosidasa (*bgl1*, Barnett *et al.*, 1991; Fowler y Brown, 1992). Los genes *cbh1*, *cbh2* y *egl3* se han mapado en el cromosoma II y *egl1* en el cromosoma VI (Mäntylä *et al.*,

1991). Los cuatro genes contienen intrones de unas 40-150 pb (figura 1). El análisis de las secuencias de aminoácidos deducida de los genes anteriores muestran la presencia de péptidos señales cortos en todas las proteínas, además sólo existe homologías significativas entre EGI y CBHI (un 45 % de identidad). Si bien no existe una homología significativa global entre las proteínas, la comparación de las secuencias predichas de aminoácidos (figura 1) pone de manifiesto la presencia de algunas áreas interesantes de homología, definidas como los bloques AB (Knowles *et al.*, 1987). El bloque A contiene 35 aminoácidos y un 70 % de identidad para los cuatro genes. Esta región es rica en cisteína y glicina y posee dos puentes disulfuro. El bloque se localiza en el extremo carboxilo terminal en CBHI y EGI y en el extremo amino terminal en CBHII y EGIII. La segunda zona homóloga, denominada bloque B, adyacente al bloque A, es rica en serina, treonina, prolina y arginina y está altamente O-glicosilada en las proteínas. El bloque B está aparentemente duplicado en CBHII.

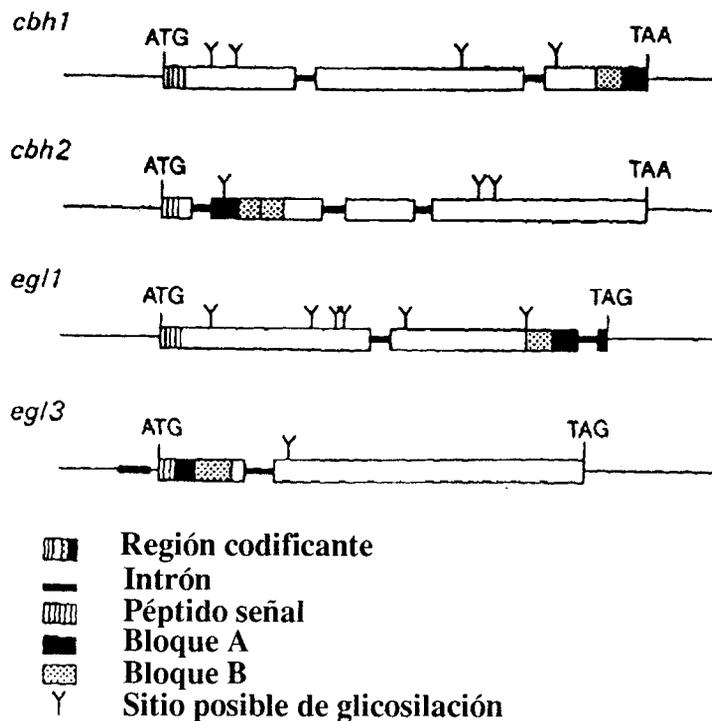


FIGURA 1. Esquema de las estructuras de los genes de celulasas descritas en *T. reesei*.

Análisis bioquímicos de proteólisis parcial con papaína (van Tilbeurgh *et al.*, 1986) han permitido separar los bloques AB del resto de las proteínas; estos restos se denominan núcleos porque portan los centros activos. La separación no causa pérdida de actividad pero

si de afinidad por sustratos de alto peso molecular. Estos ensayos, reforzados por datos de estructura terciaria obtenidos por difracción de rayos X para CBHI y CBHII (Abuja *et al.*, 1988; Rouvinen *et al.*, 1990), sugieren que las celulasas (figura 2) están compuestas por al menos dos dominios, una región grande o "cabeza" que contiene el centro activo y una cola terminal flexible que contiene el bloque A. La región B actuaría como una bisagra manteniendo los dos dominios juntos. El bloque A sería entonces, aquel que define el centro de unión a celulosa. La abundante O-glicosilación y los residuos de prolina del bloque B se han considerado como resistencias frente a ataques proteolíticos.

La hidrólisis enzimática de la celulosa es muy semejante al mecanismo de catálisis ácida establecido para las lisozimas. Se han descrito homologías entre el centro activo de las lisozimas y zonas en la estructura primaria de algunas celulasas (Teeri *et al.*, 1987).

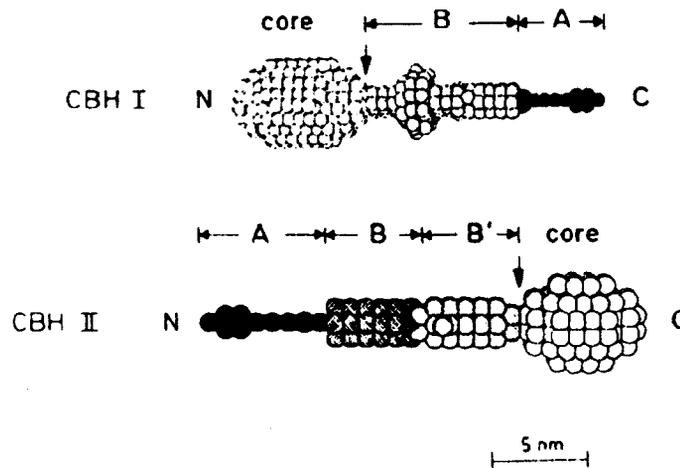


FIGURA 2. Estructura terciaria de las celulasas CBHI y CBHII de *T. reesei*.

La síntesis de las celulasas está regulada a nivel transcripcional (Nevalainen *et al.*, 1991), se induce por sustrato y se reprime por glucosa, aunque no se conoce ni la naturaleza del inductor ni el mecanismo de inducción. La soforosa y la celobiosa, productos de reacción de las β -glucosidasas, son buenos inductores (El-Gogary *et al.*, 1989; Kubicek *et al.*, 1993). A nivel de actividad, las celulasas presentan inhibición por producto: las endoglucanasas y las celobiohidrolasas se inhiben por celobiosa y las β -glucosidasas por glucosa (Montenecourt, 1983).

Se han expresado en levaduras copias de cDNAs de los cuatro genes anteriores (Penttilä *et al.*, 1987; Penttilä *et al.*, 1988) ya que las levaduras son buenos modelos para

estudiar las propiedades individuales de las celulasas sin la interferencia dada por la mezcla de celulasas presentes en *T. reesei*. Más que el aumento de los niveles de actividad enzimática por incremento de la dosis génica, la termorresistencia y la reducción de la inhibición por producto se discuten como propiedades interesantes de mejora de las celulasas (Knowles *et al.*, 1987).

1.3. PAPEL ANTAGONISTA DE *Trichoderma*

Muchos hongos producen enfermedades en plantas, causando importantes pérdidas en los rendimientos y descensos en la calidad de los cultivos. La aplicación de fungicidas artificiales tiene graves consecuencias ecológicas y repercusiones en la salud de personas y animales que ingieren los vegetales tratados. Por tanto, los programas actuales de mejora se centran en la selección de resistencias naturales transferibles a las plantas cultivables o en la búsqueda de fungicidas naturales. Las técnicas de biología molecular han permitido introducir en algunas plantas cultivadas genes de resistencia a fitopatógenos, incluyendo bacterias, hongos e insectos (Lamb *et al.*, 1992). Por otra parte, se conocen algunos microorganismos que limitan el crecimiento de muchos patógenos de plantas y que se han usado como agentes de biocontrol para la protección de las cosechas. En este sentido, algunas especies del género *Trichoderma* se han descrito como antagonistas en el suelo de una amplia variedad de hongos fitopatógenos (Papavizas, 1985). Esta característica ha permitido la utilización de algunas estirpes de *Trichoderma* y del género afín *Gliocladium* (Davet, 1990) como agentes del control de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos en el suelo o en los órganos aéreos de las plantas (tabla 1). Además, *Trichoderma* produce sustancias que estimulan el crecimiento de las plantas, o potencian la formación y el funcionamiento de las micorrizas (Baker, 1989).

TABLA 1. Hongos fitopatógenos controlados por las especies de *Trichoderma* y *Gliocladium*.

Patógeno combatido	Planta tratada	Agente de biocontrol
<i>Rhizoctonia solani</i>	Remolacha	<i>T. harzianum</i>
	Rábano	<i>T. hamatum</i>
	Rábano	<i>T. harzianum</i>
	Judía	<i>T. harzianum</i>
	Zanahoria	<i>T. harzianum</i>
	Patata	<i>G. virens</i>
	Patata	<i>T. viride</i>
	Tabaco	<i>T. harzianum</i>

<i>Sclerotinia minor</i>	Lechuga	<i>T. harzianum</i>
<i>Sclerotium cepivorum</i>	Ajo	<i>T. harzianum</i>
<i>S. rolfsii</i>	Tomate	<i>T. harzianum</i>
	Judía	<i>T. viride</i>
	Judía	<i>T. harzianum</i>
	Judía	<i>G. virens</i>
	Girasol	<i>T. harzianum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	Algodón	<i>T. harzianum</i>
	Melón	<i>T. harzianum</i>
	Judía	<i>G. catenulatum</i>
	Patata	<i>T. harzianum</i>
<i>Phytophthora</i> spp.	Patata	<i>T. harzianum</i>
<i>Verticilium</i> spp.	Patata	<i>T. viride</i>
	Tomate	<i>T. harzianum</i>
<i>Armillaria mellea</i>	Frutales	<i>T. harzianum</i>
<i>Botrytis</i> spp.	Patata	<i>G. roseum</i>

Para explicar el antagonismo de *Trichoderma* se han descrito tres mecanismos de acción: 1.- competición, 2.- antibiosis y 3.- micoparasitismo.

1.- El efecto protector de *Trichoderma* se ha explicado mediante una competición en la rizosfera por los nutrientes (Sivan y Chet, 1989). La capacidad para competir por el hierro podría cumplir un papel importante en algunas especies antagonistas de *Trichoderma*. Se ha descrito la producción de sideróforos semejantes a los caracterizados para las bacterias del género *Pseudomonas* (Nakas y Hagedorn, 1990), aunque no se ha encontrado una buena correlación entre producción de sideróforos y las propiedades antagonistas de las especies de *Trichoderma* analizadas. En otros casos, se ha observado correlación entre mutantes competentes en la rizosfera y la capacidad de éstos para utilizar sustratos celulolíticos asociados a la raíz (Ahmad y Baker, 1987). *Trichoderma* no sólo parece competir por los nutrientes sino también por el espacio (Davet, 1990). La protección de los racimos de uvas contra la enfermedad conocida como podredumbre gris causada por el hongo patógeno *Botrytis cinerea* se debe a que las estirpes antagónicas de *Trichoderma* se instalan antes que *B. cinerea* en los capuchones florales de las vides; colonizados éstos por el primero, no existe infección por el segundo.

2.- Ciertas cepas de *Trichoderma* producen, en presencia de fitopatógenos, antibióticos clasificados como volátiles y no volátiles (Dennis y Webster, 1971a; Dennis y Webster, 1971b). Algunos de ellos, se han caracterizado en detalle: la tricodermina es un sesquiterpeno y la alemeticina y la suzukamicina son péptidos con propiedades antibacterianas y antifúngicas (Nakas y Hagedorn, 1990). Aunque el efecto antibiótico de estas sustancias se ha demostrado por múltiples ensayos *in vitro* (Lewis *et al.*, 1989), la producción de antibióticos por *Trichoderma* y el control biológico *in vivo* tampoco guardan una buena correlación.

3.- El micoparasitismo se define como el parasitismo de un hongo sobre otro, es decir el fenómeno por el que un hongo establece una asociación íntima con otro del que extrae parte o todos sus nutrientes sin ofrecer ningún tipo de beneficio a cambio. El término hiperparasitismo define la acción parasitaria de un hongo sobre cualquier tipo de microorganismo que a su vez es parásito o patógeno. Los micoparásitos se han dividido en dos grupos (Lewis *et al.*, 1989), los biótrofos que obtienen nutrientes de las células o tejidos que invaden sin matarlos y los necrótrofos que matan a sus hospedadores antes o tras la invasión de sus células o tejidos, absorbiendo los nutrientes de las células que están muriendo o de las ya muertas. Los micoparásitos biótrofos son de espectro restringido y comunmente producen estructuras especializadas para absorber los nutrientes, mientras que los necrótrofos son de amplio espectro y están poco especializados en su modo de acción.

Los hongos del género *Trichoderma*, especialmente las especies *T. harzianum* y *T. viride*, incluyen parásitos e hiperparásitos con características intermedias entre micoparásitos biótrofos y necrótrofos. *Trichoderma* forma estructuras diferenciadas propias de los biótrofos para permitir el contacto y la penetración, aunque mata a sus víctimas, generalmente parásitos de plantas, por lo que tendría que ser clasificado como necrótrofo hiperparásito.

El proceso micoparasitario de *Trichoderma* puede dividirse arbitrariamente en varias fases: 1.- acercamiento, 2.- reconocimiento, 3.- ataque, 4.- penetración y 5.- digestión de los contenidos intracelulares (Chet, 1990).

1.- La primera fase comprende la localización del hospedador por el micoparásito. En este sentido, Chet *et al.* (1981) demostraron que *T. hamatum* puede detectar a sus hospedadores a distancia creciendo hacia las hifas del hongo susceptible sin ningún tipo de contacto previo. El mecanismo bioquímico que define esta fase no se conoce, aunque se

especula sobre la formación de un gradiente químico originado en el hospedador y detectado por el micoparásito.

2.- La segunda fase es el reconocimiento, en ella tanto las hifas del hospedador como las del micoparásito crecen paralelas unas a otras sin que se produzcan contactos (Dennis y Webster, 1971c). El reconocimiento hospedador-parásito se ha entendido como una interacción entre lectinas del parásito y residuos de azúcares, generalmente galactosa o fucosa, de la pared celular de *Trichoderma* (Elad *et al.*, 1983a). De hecho, se han aislado lectinas de las hifas o de los filtrados de cultivo de hongos parasitados por *Trichoderma*, tales como *Rhizoctonia solani* (Elad *et al.*, 1983a) o *Sclerotium rolfsii* (Barak *et al.*, 1985), capaces de aglutinar conidios de algunas especies micolíticas de *Trichoderma*. Barak *et al.* (1986) han descrito la purificación y caracterización de lectinas de *R. solani* y *S. rolfsii*; al menos, la de *R. solani* posee residuos L-fucosilos que podrían servir de receptores en la interacción de *T. harzianum*. Recientemente, Inbar y Chet (1992) han proporcionado una evidencia muy clara del papel de las lectinas en el micoparasitismo: cultivando *T. harzianum* en presencia de fibras de nylon tratadas con la lectina de plantas, concanavalina A, o con la lectina purificada de *S. rolfsii*, se observó que éste interaccionaba con las fibras tratadas de manera semejante a como lo haría en presencia de un hongo susceptible de micoparasitismo.

3.- Tras el reconocimiento se producen uniones entre la hifas del micoparásito y las del hospedador. El uso de la microscopía óptica y electrónica de barrido han demostrado que la unión de *Trichoderma* se produce fundamentalmente por enrollamiento a las hifas del hospedador mediante horquillas o apresorios (Elad *et al.*, 1983b).

4.- La siguiente fase es la penetración del antagonista en el interior del micelio hospedador. La invasión intracelular se supone consecuencia de una acción mecánica junto a una acción enzimática en las zonas de la pared celular del hospedador encerrada por los enrollamientos, horquillas o apresorios. Mientras que el papel de la acción mecánica durante la penetración es especulativo (Goldman, 1993), el papel enzimático está bien establecido. Se tienen algunas evidencias de actividad enzimática en las zonas de penetración mediante observación microscópica, el uso de indicadores fluorescentes y estudios bioquímicos.

La figura 3 muestra que la eliminación de las hifas de *T. harzianum* en las zonas de penetración revela la presencia de zonas de lisis en toda la zona de interacción y de perfectos agujeros a través de los que se ha producido la penetración (Elad *et al.*, 1983b).



FIGURA 3. Efecto micoparásito de *T. hamatum* durante la unión y la penetración. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido (8300 aumentos). (A) Enrollamiento y penetración a una hifa de *R. solani*. (B) Hifa de *S. rolfsii* que muestra las zonas de penetración tras eliminar la hifa de *T. hamatum*.

El calcofluor se une selectivamente a los extremos de oligómeros de polisacáridos degradados de pared celular. Tales sitios de unión están presentes en los lugares donde, tras una acción enzimática, se ha producido la penetración de *Trichoderma* en la hifa hospedadora (Elad *et al.*, 1983b). Otros indicadores son aquellas lectinas que tienen compuestos fluorescentes conjugados, tales como el FITC-aglutinina del endospermo de trigo. Este compuesto fluorescente se une específicamente a oligómeros de GlcNAc y su unión en las zonas de enrollamiento determina la presencia de GlcNAc en las mismas, resultado de una digestión enzimática (Elad *et al.*, 1983b). Finalmente, son numerosos los estudios bioquímicos que asocian una acción enzimática con la penetración (Elad *et al.*, 1982; Ridout *et al.*, 1988; Sivan y Chet, 1989): la pared celular de la mayoría de los hongos filamentosos está constituida fundamentalmente por los polímeros estructurales quitina y β -glucanos, de

manera que las actividades quitinasa y β -glucanasas deben ser cruciales durante la penetración. *Trichoderma* excreta β -glucanasas y quitinasas al medio de cultivo cuando se cultiva en presencia de quitina, β -glucanos o en presencia de paredes celulares de hongos como fuente de carbono (Elad *et al.*, 1982; Ridout *et al.*, 1986). En numerosos casos, el grado de biocontrol de un patógeno se ha relacionado con los niveles de actividad enzimática producidos por el antagonista (Elad *et al.*, 1982; Papavizas, 1985; Sivan y Chet, 1989).

5.- La última fase del micoparasitismo consiste en la digestión de los contenidos intracelulares de los hongos atacados. La digestión va acompañada de algunos efectos morfológicos como vacuolización, pérdida de citoplasma y desintegración de las hifas del hospedador. En algunos casos se ha comprobado que, tras la completa digestión de los hongos atacados, *Trichoderma* esporula (Elad *et al.*, 1984).

1.4. ENZIMAS HIDROLITICAS DE POLIMEROS DE LA PARED CELULAR DE HONGOS FILAMENTOSOS

1.4.1. La pared celular de los hongos

La pared celular es la estructura que *Trichoderma* debe franquear para nutrirse de los contenidos intracelulares de los hongos a los que ataca. Además de la función de barrera física a los ataques de parásitos, la pared cumple entre otros los siguientes papeles: es responsable de la forma celular de los hongos, permite la integridad osmótica, actúa como filtro para la secreción e incorporación de sustancias y es una buena reserva de carbono, movilizándose ciertos componentes de la misma en situaciones de déficit nutricional (Santandreu *et al.*, 1983).

La composición química de la pared celular de los hongos es relativamente simple: carbohidratos, proteínas, lípidos, pigmentos y sales minerales en orden decreciente de abundancia (Peberdy, 1990). Los carbohidratos, en forma de homo o heteropolisacáridos, constituyen más del 80 % del peso seco de la pared. Los polisacáridos de la pared celular se dividen en dos grupos atendiendo a su estado de agregación. Unos forman estructuras fibrilares y en otros no existe una organización aparente. Los fibrilares son los componentes estructurales de la pared y sus cadenas se enlazan formando fibras embebidas en una matriz compuesta por polisacáridos más solubles en agua y de apariencia amorfa y granular. Los polisacáridos fibrilares fundamentales son la quitina, los β -glucanos y la celulosa (figura 4). La quitina, homopolímero de GlcNAc unidas por enlaces de tipo β -1,4 glucosídico, permite

distinguir claramente las paredes celulares de los hongos de las de las plantas. Los β -glucanos son homopolisacáridos de glucosa unidas generalmente por enlaces β -1,3-glucosídicos y contienen ramificaciones de glucosas unidas por enlaces del tipo β -1,6-glucosídicos. Ciertos grupos de hongos contienen celulosa, un β -glucano de glucosas unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos pero, con la excepción de los hongos Oomicetos, prácticamente todos los hongos contienen quitina y β -glucanos como elementos esqueléticos mayoritarios.

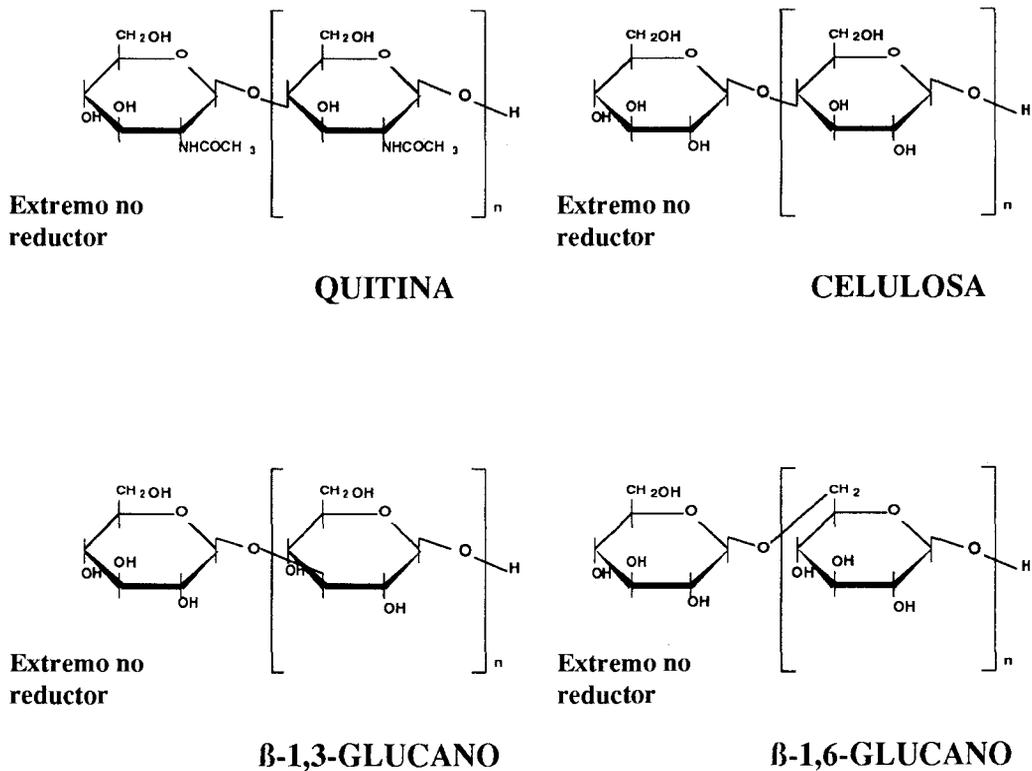


FIGURA 4. Estructura primaria de la quitina, celulosa, β -1,3-glucano y β -1,6-glucano. Proyecciones de Haworth.

A diferencia de los fibrilares, los carbohidratos de la matriz son poco cristalinos y más solubles en agua. Entre ellos se incluyen el quitosán (GlcN unidas por enlaces β -1,4 glucosídicos), los galactanos y los α -glucanos. El polisacárido matricial más común es el α -1,3-glucano, denominado pseudonigeran, que a veces alterna con glucosas unidas por enlaces α -1,4 (nigeran). Otros carbohidratos en la matriz, tales como los de las manoproteínas de las levaduras, forman parte de las glucoproteínas de pared.

La composición química en los polisacáridos mayoritarios de la pared sirve de indicador taxonómico (Garraway y Evans, 1984).

Basado en aquellos azúcares presentes en mayor concentración se han distinguido ocho grupos taxonómicos que se exponen en la tabla 2.

TABLA 2. Relación entre la composición de pared celular y grupos taxonómicos de hongos.

Grupo	Composición	Organismos
I	Celulosa-glucógeno	Acrasiomicetos
II	Celulosa-glucano	Oomicetos
III	Celulosa-quitina	Hifoquitridiomicetos
IV	Quitina-quitosan	Zigomicetos
V	Quitina-glucano	Quitridiomicetos, Ascomicetos (miceliares), Basidiomicetos (miceliares), Deuteromicetos
VI	Manano-glucano	Ascomicetos (levaduras), Deuteromicetos (levaduras)
VII	Manano-quitina	Basidiomicetos (levaduras)
VIII	Poligalactosamina-galactano	Tricomietos

Las proteínas de la pared celular están fundamentalmente en la matriz y constituyen un 10 % del peso seco de la misma. Estas pueden ser estructurales o enzimáticas. Las estructurales tienen en general carácter glucoproteico, destacando las manoproteínas de la pared celular de las levaduras; en éstas las unidades de manosa se unen bien a la treonina o la serina por un enlace O-glucosídico, o bien a la asparragina mediante un enlace N-glucosídico, con dos GlcNAc de puente. Las enzimas son fundamentalmente hidrolasas que permiten la conversión de sus sustratos en sustancias fácilmente asimilables; entre otras se distinguen las fosfatasas ácidas, las α -amilasas, las proteasas, las β -glucosidasas, etc. (Peberdy, 1990).

Los lípidos constituyen generalmente menos del 8 % del peso seco de la matriz. Las propiedades hidrófobas que distinguen a algunas estructuras como por ejemplo algunas esporas, resultan del contenido en lípidos de la pared (Peberdy, 1990).

Los componentes minoritarios son los pigmentos y las sales minerales. El principal pigmento en la pared celular es la melanina, presente en la pared celular de muchas esporas y que juega un papel de protección frente a la radiación ultravioleta y a la desecación, así como un papel protector frente a enzimas líticas de pared a las que inhibe no competitivamente. Los elementos menos abundantes de la pared son las sales minerales, como los fosfatos, presente en los azúcares fosforilados y en los fosfolípidos. El calcio y el magnesio también se encuentran en pequeñas cantidades (Peberdy, 1990).

La tabla 3 resume las sustancias de las que se ha hablado antes y que forman parte de la pared celular de los hongos.

TABLA 3. Componentes de la pared celular de los hongos.

1. Componentes esqueléticos:	<i>insolubles en agua altamente cristalinos homopoliméricos</i>
- quitina (β -1,4-GlcNAc) - β -glucanos o R-glucano (β -1,3-Glc, β -1,6-Glc)	
2. Componentes matriciales:	<i>más solubles en agua poco cristalinos o amorfos homopoliméricos</i>
- α -glucanos: α -1,3-glucano, S-glucano o pseudonigeran (α -1,3-Glc) α -1,3-1,4-glucano o nigeran (α -1,3-Glc, α -1,4-Glc) - glucoproteínas	
3. Otras:	
- quitosan (β -1,4-GlcN) - polímeros de GalN - poliurónidos - melaninas - lípidos - sales minerales	

La composición química de la pared puede variar cuantitativa y cualitativamente con las condiciones de cultivo, la edad del micelio o el estado de crecimiento. Las variaciones de composición más drásticas son aquellas que suceden en aquellas especies dimórficas con una fase levaduriforme y otra micelial que puede esporular, como es el caso de *Mucor rouxii*.

Las formas levaduriformes de *M. rouxii* son más ricas en mananos que las miceliarias (Garraway y Evans, 1984); igualmente, la pared de las esporas de *M. rouxii* son ricas en β -glucanos mientras que la de las dos formas vegetativas de éste lo son en quitosan (Peberdy, 1990).

Con cortes transversales se aprecia que la pared celular está constituida por distintas capas. Normalmente, los componentes fibrilares o esqueléticos son interiores y los componentes matriciales son exteriores. Esta estructura simple es la que se encuentra típicamente en hongos tales como *Schizophyllum commune*, *Aspergillus nidulans* y *S. cerevisiae* (Peberdy, 1990). En otros hongos, como *Neurospora crassa*, la estructura de la pared es más compleja, ya que presenta una capa fibrilar interna de quitina cubierta de proteínas y un red de glucoproteínas, que a su vez se recubre de una capa exterior de α y β -glucanos.

El crecimiento de los hongos filamentosos está íntimamente asociado al crecimiento de su pared celular. Los hongos filamentosos sólo crecen apicalmente; además, el crecimiento se considera marcadamente polarizado pues sólo se produce en la porción más curva del ápice (Santandreu *et al.*, 1983). El alargamiento tiene lugar gracias a la incorporación a la pared de material fibrilar recién sintetizado en la zona subapical y que se transporta a la zona apical a través de diversos tipos de vesículas, algunas de las cuales (quitosomas) contienen también las enzimas biosintéticas. La fusión de estas vesículas con la membrana plasmática del ápice de las hifas, facilita la incorporación del material a la estructura preexistente. La porción de pared que rodea al ápice es más fina y simple en estructura y la rigidez de la pared se debe a la adición posterior de los restantes componentes matriciales o cementantes. La pared celular no es una estructura rígida. Para explicar la extensión de la misma en la zona apical es necesario un equilibrio controlado de síntesis y degradación. Se han propuesto distintos modelos de extensión, entre ellos, el modelo de Barcnicki-García (Santandreu *et al.*, 1983) supone una síntesis continua acompañada de una hidrólisis continua y controlada. La ruptura de algunos enlaces permite la incorporación en esos sitios de más monómeros con el consiguiente alargamiento (figura 5).

Puesto que la quitina y los β -glucanos son los polímeros mayoritarios de pared prácticamente universales para todos los grupos de hongos, las quitinasas y las β -glucanasas deben ser las enzimas claves en la acción micoparasitaria. Si los componentes matriciales embeben a los anteriores, otras enzimas hidrolíticas, como proteasas y α -glucanasas también deben jugar un papel importante que permitan, con éxito, la completa degradación en las

zonas de penetración. En el siguiente apartado, se exponen más detalladamente algunas de las enzimas líticas de la pared celular de los hongos.

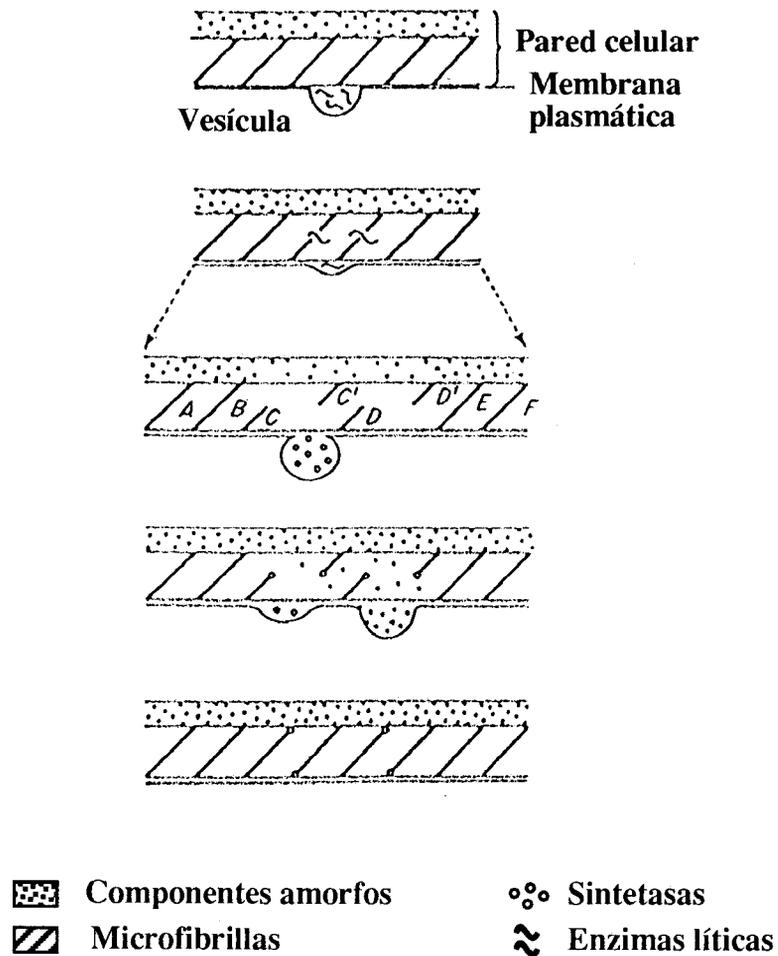


FIGURA 5. Esquema de los cambios morfogénéticos que se suceden durante el crecimiento apical de los hongos filamentosos.

1.4.2. Las quitinasas

La quitina es el segundo compuesto más abundante en la Naturaleza tras la celulosa y las quitinasas se han encontrado en casi todos los organismos, desde bacterias, levaduras, hongos filamentosos, plantas, artrópodos y vertebrados. Se han descrito también para protozoos, celentereos, nemátodos y moluscos (Jeuniaux, 1966).

La hidrólisis enzimática de la quitina a GlcNAc se lleva a cabo por un sistema, en parte análogo al ya descrito para las celulasas, que actúa de manera sinérgica y consecutiva

en aquellos organismos que contienen todo el sistema (Deshpande, 1986). Las endoquitinasas (E.C. 3.2.1.14) liberan oligosacáridos a partir de las moléculas íntegras de quitina, así como de los oligosacáridos liberados por la misma. Las exoquitinasas (E.C. 3.2.1.14) liberan consecutivamente a partir del extremo no reductor dímeros de GlcNAc denominados quitobiosas. Finalmente, las quitobiasas (N-acetil-β-D-glucosaminidasas, E.C. 3.2.1.30) hidrolizan la quitobiosa y oligosacáridos cortos de quitina a moléculas de GlcNAc. La GlcNAc formada se usa entonces como fuente de carbono y potencialmente como fuente de nitrógeno.

La función de las quitinasas depende de la naturaleza del organismo que las posee. En bacterias, organismos que no contienen quitina, las quitinasas son hidrolasas que proporcionan GlcNAc como fuente de carbono y energía (Jones *et al.*, 1986). Las bacterias quitinolíticas más citadas en la literatura son las especies de *Bacillus* (Watanabe *et al.*, 1992a), *Serratia* (Jones *et al.*, 1986) y *Streptomyces* (Robbins *et al.*, 1992). En levaduras, se ha atribuido una función morfogénica en la separación de las yemas hijas de la célula madre durante la reproducción vegetativa (Kuranda y Robbins, 1991). En este sentido, mutantes de *S. cerevisiae* carentes de quitinasa son incapaces de separarse y forman "rosarios" celulares. Este mismo fenotipo se ha observado usando dimetilalosamidina, un fuerte inhibidor de la quitinasa de levaduras.

Se han propuesto tres funciones principales para las quitinasas de hongos filamentosos: un papel autolítico asociado a la liberación de las esporas en algunos cuerpos fructíferos de basidiomicetos, una función morfogénica en el crecimiento y diferenciación de los hongos que contienen quitina, y un papel nutricional, para el aprovechamiento de la quitina o como vía de penetración, en los hongos saprófitos y micoparásitos, respectivamente (Gooday *et al.*, 1985).

En las plantas, se ha encontrado actividad quitinasa en hojas, tallos y raíces de numerosas familias, llegándose a considerar ubicua dentro de este reino (Collinge *et al.*, 1993). Aparentemente, esta ubicuidad no está relacionada con una función indispensable en el metabolismo, en el crecimiento o en el desarrollo, dado que la quitina, sustrato de las quitinasas, no se encuentra presente en las plantas, sino que se ha sugerido que pueden participar en la defensa directa o indirecta frente a los fitopatógenos potenciales. Aunque la quitina no está presente en las plantas, se ha sugerido un papel para una endoquitinasa ácida en zanahoria que podría tener una función importante durante los primeros estadios del desarrollo del embrión (de Jong *et al.*, 1992). Además, la GlcNAc se encuentra como

residuo en los oligosacáridos de las glucoproteínas y de algunos factores de nodulación de ciertas especies de *Rhizobium* (Collinge *et al.*, 1993). No obstante, se desconoce si las quitinasas están implicadas en los procesos de embriogénesis, glicosilación o nodulación y son varias las evidencias que apoyan la hipótesis de su papel defensivo, incluyendo su acción inhibitoria del crecimiento de algunos hongos filamentosos (Mauch *et al.*, 1988).

Las quitinasas de los artrópodos son morfogenéticas, ya que las cutículas de los artrópodos contienen quitina y las quitinasas participan en su degradación durante las mudas (Cabib, 1987). Las quitinasas también se secretan en las mucosas digestivas de anfibios, reptiles, peces, aves y mamíferos (Jeuniaux, 1966).

Es muy frecuente la presencia de distintas isoenzimas en todas las enzimas que hidrolizan polisacáridos, incluyendo las quitinasas. Por ejemplo, *Bacillus circulans* produce seis quitinasas (Watanabe *et al.*, 1990) y *Serratia marcescens* dos (Jones *et al.*, 1986). Los hongos filamentosos y las plantas también producen varias quitinasas (Cabib, 1987). La variedad de formas se ha interpretado como la disponibilidad de distintas enzimas, cada una con un modo de acción distinto, para degradar la quitina más eficientemente (Deshpande, 1986). En cuanto a su localización celular, las quitinasas bacterianas y la mayoría de las descritas en hongos filamentosos son extracelulares. En otros hongos, como es el caso de *M. rouxii*, está en la pared celular (Pedraza-Reyes y López-Romero, 1989). La actividad quitinasa de *S. cerevisiae* tiene localización periplásmica (Elango *et al.*, 1982). En plantas, se localizan en las vacuolas o en los espacios intercelulares (Collinge *et al.*, 1993).

Se han purificado quitinasas de distintos organismos gracias a su afinidad por su sustrato insoluble o mediante métodos convencionales de cromatografía. En general, son proteínas monoméricas de masas moleculares comprendidas entre 30 y 50 kDa y poseen puntos isoeléctricos básicos, neutros o ácidos. Las quitinasas muestran generalmente un intervalo de pH óptimo amplio respecto a su actividad frente a quitina, con una actividad máxima en torno a pH 6 y un 50 % de la actividad máxima a pH 3 ó pH 9. Las temperaturas óptimas frecuentes son de unos 40 °C y son estables a temperaturas superiores a 50 °C. Se ha asignado un carácter glucoproteico a las quitinasas de levaduras (Correa *et al.*, 1982) y a algunas quitinasas ácidas de plantas (Collinge *et al.*, 1993). En los casos estudiados, carecen de cofactores y se inhiben por GlcNAc o por las alosamidinas, conjunto de sustancias artificiales análogos tóxicos de la quitobiosa.

De la misma manera que sucede para otras hidrolasas, la formación de producto *versus* concentración de enzima o tiempo, no son lineales y su modo de acción puede ser exo

o endohidrolítico (Cabib, 1987). Las quitinasas exohidrolíticas liberan dímeros de GlcNAc desde el extremo no reductor de las moléculas y las endohidrolíticas actúan en el interior de las cadenas de quitina y en los oligosacáridos que generan. Las quitinasas bacterianas son fundamentalmente exohidrolíticas y las de hongos y plantas endohidrolíticas. En todos los casos estudiados, las quitinasas rinden fundamentalmente como productos finales de la hidrólisis de la quitina dímeros y trímeros de GlcNAc. Los productos de reacción (iniciales y finales) pueden identificarse fácilmente cuando se usa como sustrato quitina tritiada o coloidal y como métodos de separación cromatografía en papel, en capa fina o cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Las quitinasas presentan una alta especificidad por sustrato. No obstante, numerosas quitinasas de plantas poseen actividad lisozima (E.C. 3.2.1.17), es decir, son capaces de degradar los enlaces β -1,4 presentes entre el N-acetil-murámico y la GlcNAc en el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias (Collinge *et al.*, 1993). Igualmente, se han descrito reacciones de transglicosilación (Collinge *et al.*, 1993; Usui *et al.*, 1990). Finalmente, en la planta *Coix lachryma-jobi* se ha descrito una endoquitinasa que posee actividad inhibidora de α -amilasas (Ary *et al.*, 1989) y en la levadura *Kluyveromyces lactis*, el factor *killer* es una poderosa toxina de tres subunidades, una de las cuales presenta actividad exoquitinasa (Butler *et al.*, 1991).

La estructura primaria de las quitinasas no está muy conservada entre los distintos organismos. Esta característica ha servido para indicar un origen polifilético para las mismas o una extremada divergencia desde la aparición del ancestro común. Otras hipótesis apuntan a que a partir de un número reducido de ancestros y mediante diferentes tipos de recombinaciones se originó una gran diversidad de enzimas que hidrolizan polisacáridos, incluyendo las quitinasas (Yanai *et al.*, 1992).

Las secuencias de aminoácidos, deducidas de las secuencias de nucleótidos, sugieren que estas proteínas están divididas en dominios estructurales. Los primeros 20-40 aminoácidos de las quitinasas analizadas de bacterias y levaduras corresponden al péptido señal para su secreción. A continuación, se sitúa la región central que contiene el sitio activo de las enzimas. Esta región central presenta homologías para las quitinasas de los distintos organismos y otras hidrolasas de polisacáridos, incluyendo las celulasas y las lisozimas. En esta región se incluyen tres residuos de ácido aspártico y uno de glutámico, que por analogía con las lisozimas, pueden estar implicados en la catálisis (Malcolm *et al.*, 1989). Otros dominios son ricos en serina y treonina, regiones que contienen una alta O-glicosilación con residuos de manosa. Especial interés suscitan los dominios de unión a la quitina, que en la estructura primaria de las proteínas suelen localizarse en el extremo carboxilo terminal. En la

quitinasa A1 de *B. circulans* este dominio es muy homólogo a las fibronectinas de tipo III, proteínas de la matriz extracelular que permiten la adhesión de las células de mamíferos (Watanabe *et al.*, 1990). El dominio de unión a quitina para la quitinasa de *S. cerevisiae* también se sitúa en el extremo carboxilo de la proteína; la delección de este fragmento imposibilita a la proteína truncada unirse a quitina o a paredes celulares aunque no afecta significativamente a la actividad sobre sustratos de bajo peso molecular (Kuranda y Robbins, 1991).

Las referencias de secuencias de genes de quitinasas de hongos filamentosos son escasas. Se han caracterizado hasta la fecha sólo tres genes, uno en *Aphanocladium album* (Blaiseau y Lafay, 1992) y dos en *Rhizopus oligosporus* (Yanai *et al.*, 1992). Las secuencias definen un péptido señal, una región central que mantiene los aminoácidos ácidos anteriormente citados (con alta probabilidad, responsables de la catálisis) y dominios ricos en serina y treonina donde se sitúan las O-glicosilaciones de manosa. En *R. oligosporus* el dominio de unión a quitina se ha identificado por el 50 % de homología que éste posee con el dominio encontrado en la quitinasa de *S. cerevisiae* (Yanai *et al.*, 1992).

En plantas se han clonado, secuenciado y caracterizado numerosos genes de quitinasas de distintas fuentes. La comparación de la estructura primaria de las proteínas deducidas permiten clasificarlas en cuatro categorías. Las de la clase I son enzimas generalmente básicas, que poseen dos dominios bien definidos y conservados. El dominio amino terminal, de aproximadamente 40 aminoácidos, es rico en cisteína y define el dominio de unión a quitina, el segundo es central y determina el dominio catalítico. En el dominio de unión a quitina, existen ocho cisteínas que definen cuatro enlaces disulfuro. Este dominio es altamente homólogo a secuencias de lectinas de plantas, proteínas que unen carbohidratos con una alta afinidad (Chrispeels y Raiknel, 1991). Las quitinasas de tipo II están representadas por las quitinasas acídicas y poseen un dominio principal, homólogo al dominio central de las quitinasas anteriores. Las de tipo III son distintas de las anteriores y presentan homologías débiles con las quitinasas bacterianas. Recientemente, se han definido las quitinasas de tipo IV, que recuerda a las de tipo I aunque contienen cuatro delecciones que las hacen más cortas (Collinge *et al.*, 1993). Estructura y localización van asociadas en las quitinasas de plantas, puesto que las de tipo I y IV son vacuolares mientras que las de tipo II se localizan en los espacios intercelulares. Es necesario y suficiente un dominio carboxilo terminal para dirigir las quitinasas de tipo I al interior de la vacuola (Neuhaus *et al.*, 1991).

En general, las quitinasas están reguladas transcripcionalmente. En bacterias y en los hongos en los que se ha estudiado, existe una clara inducción por quitina y represión catabólica. El modelo bacteriano incluye un represor (ChiD) que actuaría en ausencia de quitina, y un activador (ChiE), que actuaría en *trans* tras la adición de quitina y la ausencia de una fuente de carbono fácilmente metabolizable (Joshi *et al.*, 1987). En *Streptomyces plicatus* y en la región promotora de los dos genes caracterizados de quitinasa se han encontrado repeticiones directas de secuencias de nucleótidos implicadas en la represión catabólica (Delic *et al.*, 1992). En hongos, son numerosos los trabajos que demuestran la aparición de actividad quitinasa en medios que contienen quitina y ausencia de actividad en aquellos que incluyen glucosa, aún conteniendo quitina. En *A. album*, la regulación se ha demostrado que es transcripcional (Blaiseau *et al.*, 1992). Aunque la regulación por quitina está demostrada, la naturaleza exacta del inductor no se conoce. Obviamente, la quitina es una macromolécula demasiado grande para ser considerada el inductor molecular, habiéndose apuntado un posible papel inductor para la quitobiosa (Cabib, 1987). En plantas, el esquema de regulación es más complejo y los estudios más profundos (Collinge *et al.*, 1993). Los niveles basales de actividad y de mensajero de las quitinasas difieren entre distintas plantas y distintos órganos dentro de una misma planta. En ciertos tejidos o semillas la expresión es constitutiva, mientras que en otros la actividad está regulada transcripcionalmente por numerosos factores tales como tratamientos hormonales (por ejemplo, inducción por etileno), infección por patógenos víricos, bacterianos o fúngicos, tratamientos con paredes celulares de hongos o componentes de las mismas (grupo de sustancias que se conocen con el término anglosajón *elicitor*), condiciones adversas como heridas o tratamientos con metales pesados. Durante el desarrollo floral también existe inducción de las quitinasas. Actualmente se ha iniciado el análisis de los elementos regulatorios, es decir los promotores y aquellos reguladores que en *trans* participan en las inducciones (Collinge *et al.*, 1993).

En ciertas quitinasas también parece que existe regulación post-traducciona. En algunas quitinasas de hongos se ha encontrado activación proteolítica, indicando la existencia de formas zimógenas para las mismas (Cabib, 1987). En *R. oligosporus* se ha encontrado una secuencia carboxilo terminal que es necesario eliminar para hacer la enzima funcionalmente activa (Yanai *et al.*, 1992).

1.4.3. Las β -1,3-glucanasas

Las β -1,3-glucanasas o las β -1,3-glucan glucanohidrolasas son enzimas hidrolíticas de los β -1,3-glucanos tanto lineales como ramificados, ampliamente distribuidas en la Naturaleza. Se ha descrito la presencia de β -1,3-glucanasas en hongos, bacterias, plantas, algas y animales (Reese y Mandels, 1959). Son enzimas extracelulares en bacterias y hongos filamentosos (Reese y Mandels, 1959) aunque en algunos hongos se han descrito como asociadas a la pared celular (Hiura *et al.*, 1986). Las bacterias carecen de β -glucanos, por lo que se les ha establecido un papel nutricional asociado a la capacidad para lisar hongos y levaduras (Andrews y Asenjo, 1987). En levaduras se ha asignado un papel morfogenético. El β -1,3-glucano constituye el principal polisacárido responsable de la forma y la rigidez de la envoltura celular de las levaduras (Peberdy, 1990) y las β -1,3-glucanasas podrían participar en el control de la hidrólisis de la pared celular durante los procesos de gemación, expansión celular y esporulación (Muthukumar *et al.*, 1993). Las β -1,3-glucanasas de plantas pertenecen a la familia de proteínas relacionadas con la patogenicidad (*PR-proteins*) que se acumulan en respuesta a invasiones de organismos patógenos (Collinge *et al.*, 1993). En este sentido, las β -1,3-glucanasas de plantas podrían actuar sinérgicamente junto a otras hidrolasas como proteasas y quitinasas, inhibiendo el crecimiento de los hongos invasores (Mauch *et al.*, 1988) o liberando oligosacáridos de las paredes celulares de los mismos que podrían actuar como señales químicas para la activación de otras respuestas de defensa (Keen y Yoshikawa, 1983). A diferencia de la quitina, las plantas contienen β -glucanos (calosa), que engrosan la pared celular de las células vegetales tras una agresión, por lo que las β -1,3-glucanasas deben estar implicadas en la eliminación posterior de estos β -glucanos. También desempeñan papeles morfogenéticos, por ejemplo, durante la germinación de las semillas de cereales (Fincher, 1989).

En hongos filamentosos se han asignado funciones semejantes a las descritas en el apartado anterior para las quitinasas. En primer lugar, un papel morfogenético durante el crecimiento y la diferenciación celular (Peberdy, 1990). Durante los procesos autolíticos asociados a carencia de fuente de carbono, los hongos movilizan los β -glucanos capsulares mediante β -1,3-glucanasas (Rapp, 1992). Finalmente, se han establecido papeles nutricionales para las β -1,3-glucanasas de hongos saprófitos o de penetración en los hongos patógenos de plantas que degradan la calosa o los β -1,3-glucanos de las paredes de los hongos en el caso de los micoparásitos (Papavizas, 1985).

Existen dos familias de enzimas distinguibles por sus mecanismos de acción. Las endo- β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.6 o EC 3.2.1.39) actúan en el interior de las moléculas liberando oligosacáridos y las exo- β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.58) liberan consecutivamente unidades de glucosa a partir de extremos no reductores de las moléculas de glucano y en el caso de una acción conjunta de los oligosacáridos generados por las anteriores.

La multiplicidad de enzimas, consecuencia de la presencia de diferentes isoenzimas y de proteólisis de una determinada glucanasa, también es frecuente en el caso de las β -1,3-glucanasas, e implica diferentes maneras de actuación en el polisacárido que determina una degradación más eficiente (Watanabe *et al.*, 1992a).

En *S. cerevisiae* se ha descrito una multiplicidad de formas, diferentes en propiedades estructurales y en especificidad por sustrato, presentes en distintas etapas del crecimiento. Durante el crecimiento vegetativo, se segregan endo y exo- β -1,3-glucanasas, algunas de las cuales permanecen atrapadas en la pared celular (Sánchez *et al.*, 1982a). Otras se inducen durante la meiosis, estando asociadas al proceso de esporulación (Correa *et al.*, 1992; Muthukumar *et al.*, 1993).

En las plantas, las β -1,3-glucanasas están constitutivamente presentes en las raíces y en las flores de plantas sanas y son enzimas inducibles por los procesos de infección por patógenos. Existen formas ácidas y formas básicas. Las ácidas se segregan al espacio extracelular y las básicas se localizan en el interior de la vacuola (Carvalho *et al.*, 1992).

Las β -1,3-glucanasas de numerosos organismos han sido bien caracterizadas tanto a nivel bioquímico como a nivel molecular. Incluso se ha descrito la localización cromosómica en levaduras (Correa *et al.*, 1992). Generalmente son proteínas monoméricas cuyas masas moleculares están comprendidas entre 30 y 80 kDa, de puntos isoelectrónicos ácidos, neutros o básicos y estables hasta temperaturas próximas a los 70 °C. Las temperaturas óptimas son de 40-50 °C y el pH de actividad óptima ligeramente ácido de pH 5-6. En los casos estudiados, aparentemente no requieren metales ni cofactores. Se ha investigado la importancia de determinados residuos catalíticos mediante el uso de agentes modificadores de grupos funcionales e inhibidores. La inhibición por iones Ag^+ , Hg^{2+} y Fe^{2+} sugiere un posible papel de grupos tiólicos en la catálisis o en el mantenimiento de la estructura terciaria en estas proteínas.

En cuanto a su mecanismo de acción, las β -1,3-glucanasas específicamente hidrolizan sustratos que contiene enlaces β -1,3-glucosídicos incluyendo la laminarina, el curdlan, escleroglucanos, pachiman y en general todos aquellos glucanos extraídos de paredes celulares de hongos o levaduras. En los casos en los que las β -1,3-glucanasas puedan actuar frente a paredes intactas o microorganismos, las enzimas se denominan líticas. Son muy pocas las excepciones de enzimas con carencia de especificidad, como el caso de las exo- β -1,3-glucanasas descritas en levaduras que hidrolizan β -1,3-glucanos pero igualmente β -1,6-glucanos y disacáridos (Sánchez *et al.*, 1982a).

Se han clonado y caracterizado molecularmente las β -1,3-glucanasas de numerosos organismos, incluyendo bacterias, levaduras, hongos y plantas. En *B. circulans* se han determinado en la secuencia de nucleótidos de la β -1,3-glucanasa A1 tres dominios N-terminales esenciales en la unión a los β -glucanos (Watanabe *et al.*, 1992a). En *S. cerevisiae* se han descrito dos genes, cuyos productos se excretan al medio (*EXG1*, Vázquez de Aldana *et al.*, 1991) o se incorporan a la pared celular (*BGL2*, Mrsa *et al.*, 1993), respectivamente. Adicionalmente, se ha descrito otro gen, significativamente homólogo a *EXG1*, que se expresa en esporulación (*SPR1*, Muthukumar *et al.*, 1993). Las β -1,3-glucanasas de plantas forman una familia multigénica. Por ejemplo, se han caracterizado al menos cinco genes de proteínas ácidas y tres genes de proteínas básicas en tabaco. Todas las proteínas básicas contienen una extensión carboxilo terminal necesaria para dirigirlas a las vacuolas (Linthorst *et al.*, 1990).

En general, las β -1,3-glucanasas de bacterias y hongos están sometidas a represión catabólica, aún con niveles basales altos (Santos *et al.*, 1978a). En determinados casos existe inducción por sustrato (del Rey *et al.*, 1979). En hongos filamentosos, la desrepresión en condiciones carenciales de fuente de carbono se asocia a fenómenos de movilización de los β -glucanos capsulares o de pared celular (Copa-Patiño *et al.*, 1989; Rapp, 1992). En plantas, el esquema de regulación apuntado es análogo al ya descrito para las quitinasas (Carvalho *et al.*, 1992).

Existe una regulación post-traducciona para determinadas β -1,3-glucanasas. Por ejemplo, en *B. circulans* al menos cuatro β -1,3-glucanasas son productos proteolíticos de la misma proteína (Watanabe *et al.*, 1992b).

1.4.4. Las β -1,6-glucanasas

Se han descrito dos tipos de enzimas con capacidad para degradar enlaces β -1,6-glucosídicos. Por una parte, las endo- β -1,6-glucanasas (EC 3.2.1.75) que actúan en el interior de los polisacáridos que contienen estos enlaces y por otra, las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) que producen la hidrólisis del residuo terminal no reductor de una amplia variedad de β -glucósidos, incluida la gentibiosa (β -1,6-glucósido). La actividad β -1,6-glucanasa es importante cuando se lleva a cabo la lisis de los componentes polisacáridicos de las paredes celulares de levaduras y hongos filamentosos (Yamamoto *et al.*, 1974).

Las referencias de β -1,6-glucanasas en la literatura son muy escasas, encontrándose ejemplos sólo en bacterias y hongos. Reese *et al.* (1962) realizaron un estudio exhaustivo de la presencia de la actividad β -1,6-glucanasa extracelular en 150 hongos filamentosos, detectándose la actividad en al menos dos tercios de los hongos ensayados. Estudios posteriores (Shibata y Fukimbara, 1972) definen tres tipos de hongos en relación a la actividad β -1,6-glucanasa: hongos que producen constitutivamente la actividad incluso en presencia de glucosa, hongos en los que la enzimas se inducen por sustrato, y hongos de comportamiento parcialmente inducible. En cuanto a su función, se ha establecido que la actividad β -1,6-glucanasa puede cumplir un papel morfogenético en el aumento de la turgencia de las esporas durante la extensión de sus paredes celulares (Benítez, 1976). Igualmente, se ha apuntado la posibilidad de un papel nutricional en los hongos saprófitos y en los hongos micoparásitos (Benítez, 1976). Este papel es el que se ha sugerido que cumplen las β -1,6-glucanasas bacterianas (Rombouts y Phaff, 1976).

Dado que raramente se han descrito, los estudios referentes a su purificación y caracterización son muy escasos. Por ejemplo, la homogeneidad electroforética se ha alcanzado en *B. circulans* (Rombouts y Phaff, 1976), *S. cerevisiae* (Sánchez *et al.*, 1982a), *Gibberella fujikuroi* (Shibata y Fukimbara, 1973) y *Rhizopus chinensis* (Yamamoto *et al.*, 1974). En todos los casos estudiados son proteínas monoméricas de masas moleculares comprendidas entre 30 y 50 kDa.

En cuanto a su especificidad por sustrato, las β -1,6-glucanasas son enzimas selectivas para polímeros con enlaces β -1,6-glucosídicos y carecen de actividad β -glucosidasa, con la excepción de las β -1,3-1,6-glucanasas inespecíficas de levaduras (Sánchez *et al.*, 1982a). El modo de acción es de tipo endohidrolítico, es decir, generan series de oligosacáridos, siendo los productos finales de degradación la gentibiosa y la

Hidrolasas de T. harzianum

glucosa, salvo para las enzimas inespecíficas anteriores cuyo modo de acción es exohidrolítico.

Con la excepción de la enzima inespecífica de *S. cerevisiae* (Vázquez de Aldana *et al.*, 1991), no se ha caracterizado hasta el momento ningún gen para las β -1,6-glucanasas.

2. OBJETIVOS

Los objetivos generales de nuestro proyecto son dos. Por un lado, se pretende conseguir cepas de *T. harzianum* con una capacidad micoparasitaria más efectiva para su posible utilización en el control biológico de enfermedades de plantas producidas por hongos. Asimismo, se pretende potenciar la resistencia natural de plantas solanáceas cultivables introduciéndoles genes de *T. harzianum* implicados en el micoparasitismo que impidan el desarrollo de las enfermedades fúngicas. Entre estos genes están los responsables de la producción de las distintas hidrolasas capaces de actuar sobre las paredes celulares de los fitopatógenos. La comprensión a nivel fisiológico, bioquímico y molecular del proceso micoparasitario es pues el primer paso para la consecución de estos objetivos.

La finalidad del trabajo que aquí se presenta es contribuir al conocimiento de la función desarrollada por algunas hidrolasas de paredes celulares de hongos, a saber, quitinasas, β -1,3-glucanasas y β -1,6-glucanasas, en el micoparasitismo de *Trichoderma*. Por ello, se ha estudiado la inducción de las actividades enzimáticas anteriores por distintas fuentes de carbono en cultivos de *T. harzianum*. Además, se han purificado a homogeneidad distintas enzimas con estas actividades a partir de sobrenadantes de cultivo de *T. harzianum* cultivado en presencia de quitina como fuente de carbono. Se han estudiado las propiedades moleculares y cinéticas de estas enzimas, se han generado anticuerpos y se han determinado secuencias de aminoácidos. Finalmente, se ha estudiado la capacidad de las enzimas aisladas o en combinación para hidrolizar paredes celulares de algunos hongos fitopatógenos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.1.1. Cepas de *Trichoderma*

Las especies de *Trichoderma* y de *Gliocladium* empleadas en este trabajo se presentan en la tabla 4. La mayor parte del trabajo se ha centrado en la especie *T. harzianum* CECT 2413. Todas las cepas son silvestres y proceden de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjassot, Valencia), salvo *T. harzianum* IMI 206040, que procede de la Universidad de Gante, Bélgica.

TABLA 4. Cepas de *Trichoderma* y de *Gliocladium* usadas en este trabajo.

Especie	Cepa
<i>T. harzianum</i>	CECT 2413
<i>T. harzianum</i>	IMI 206040
<i>T. koningii</i>	CECT 2412
<i>T. longibrachiatum</i>	CECT 2606
<i>T. reesei</i>	CECT 2414
<i>T. viride</i>	CECT 2423
<i>G. virens</i>	CECT 2460

3.1.2. Cepas de levaduras y de otros hongos filamentosos

En la tabla 5 se presentan otros hongos filamentosos usados en este trabajo. La mayoría pertenecen a la Colección Española de Cultivos Tipo. *Gibberella fujikuroi* IMI 58289 y *Phycomyces blakeesleanus* NRRL1555 proceden del Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla. Los micelios autoclavados de estos hongos o bien sus paredes se utilizaron como fuente de carbono en los experimentos de inducción presentados en el apartado 4.1 y como sustratos en la determinación de las actividades líticas (apartado 3.2.7).

La especie de levadura *S. cerevisiae* se consiguió como bloque de levadura panadera de la marca comercial la Cinta Roja (Cruzcampo S.A., España).

TABLA 5. Otros hongos empleados en este trabajo.

Especie	Cepa
<i>Botrytis cinerea</i>	CECT 2100
<i>Rhizoctonia solani</i>	CECT 2815
<i>Phycomyces blakesleanus</i>	NRRL1555
<i>Phytophthora syringae</i>	CECT 2351
<i>Gibberella fujikuroi</i>	IMI 58289
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	La Cinta Roja

3.1.3. Medios y condiciones de cultivo

3.1.3.1. Medios y condiciones de cultivo para el mantenimiento de los microorganismos. Recogida de esporas

Los hongos filamentosos se mantuvieron en el medio de cultivo patata-glucosa-agar cuya composición es la siguiente: glucosa 20 g/l, extracto de puré de patata (Riera-Marsá, España) 20 g/l y agar 15 g/l. El medio se esterilizó durante 20 min a 120 °C y se solidificó en cajas de Petri.

Los cultivos se incubaron a 22 °C. Una vez crecidos y/o esporulados las cajas se guardaron a 4 °C.

Las esporas junto a restos de micelio se recogieron en tubos de 10 ml estériles, lavando la superficie de las cajas con 10 ml de agua destilada estéril. Para el enriquecimiento en esporas, las suspensiones se filtraron a través de papel Whatman nº 1 (Whatman, Inglaterra) esterilizado, se lavaron y centrifugaron dos veces con 10 ml de agua estéril y finalmente, se resuspendieron en 5-10 ml de agua estéril. Las suspensiones obtenidas (generalmente 10⁹ esporas/ml) se utilizaron inmediatamente para iniciar nuevos cultivos o se resuspendieron en una solución de 10 % (v/v) de glicerol en agua y se conservaron a 4 °C o a -20 °C. Para determinar el número de esporas, se contaron suspensiones diluídas de éstas con ayuda de un microscopio en una cámara de Burker.

3.1.3.2. Medios y condiciones de cultivo para experimentos de inducción de enzimas extracelulares

Los experimentos de inducción enzimática se realizaron en medio de cultivo líquido Czapek. La composición del medio, sin incluir fuente de carbono, es la siguiente:

MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.5	g/l
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.01	g/l
KCl	0.425	g/l
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	0.115	g/l
NH ₄ Cl	2.1	g/l
NaHPO ₄	0.92	g/l

Todos los componentes del medio se prepararon en dos soluciones concentradas 50 veces, una que contenía sólo NaHPO₄, y la segunda las restantes sales. Estas soluciones se añadieron diluídas a los matraces de cultivo. Los medios se esterilizaron 20 min a 120 °C. La fuente de carbono apropiada, generalmente a una concentración de 10 ó 20 g/l, se esterilizó por separado y se añadió una vez fría.

Para mantener constante el pH del medio, se añadió tampón fosfato potásico 1 M pH 6.0, que se esterilizó aparte y se añadió al resto del medio de cultivo una vez frío. La concentración del tampón en el medio de cultivo fue de 70 mM.

Los cultivos de los experimentos de inducción enzimática se realizaron de la siguiente manera: en primer lugar, esporas de *T. harzianum* CECT 2413 a una concentración final de 10⁶ esporas/ml se inocularon en matraces Erlenmeyer de 1 l de capacidad con 400 ml de medio Czapek suplementado con 100 g/l de glucosa como fuente de carbono (condiciones de represión). Los matraces se incubaron hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial a 28 °C con agitación de 200 rpm en un agitador orbital New Brunswick Scientific (EE.UU.). A continuación, las hifas se recogieron por filtración en un Quitasato a través de papel Whatman nº 1, se lavaron exhaustivamente con 500 ml de MgCl₂ 50 mM y con 500 ml de agua destilada, en condiciones estériles y finalmente se resuspendieron en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad que contenían 200 ml de medio Czapek suplementado con la fuente de carbono apropiada (condiciones de inducción). Estos nuevos matraces se incubaron durante 2 ó 4 días en las condiciones de agitación y temperatura descritas.

3.1.3.3. Medios y condiciones de cultivo para la purificación de enzimas

Para la purificación de enzimas, el medio utilizado fue el medio Czapek. Las condiciones de cultivo fueron análogas a las descritas anteriormente con la única excepción de que en todos los casos, tras lavar y transferir el micelio a los segundos matraces de cultivo, la fuente de carbono utilizada fue quitina en escamas a una concentración de 15 g/l. Los cultivos se incubaron durante 48 h.

3.1.3.4. Recogida de micelio y obtención de sobrenadantes

Para la recogida de células se utilizaron las condiciones descritas en el apartado 3.1.3.2 y posteriormente el micelio se conservó a -20 °C.

El sobrenadante recogido por filtración se centrifugó en centrífugas refrigeradas Sorvall (EE.UU.) modelos RC2-B y RC5-C con rotores GSA a 8000 x g durante 10 min, para eliminar las partículas en suspensión que pasaban a través del filtro.

En los experimentos de inducción enzimática, se recogieron 10 ml de cultivo en tubos enrasados que se filtraron a través de papel Whatman nº 1 en equipos de filtración Millipore (EE.UU.) tipo HA. El micelio se lavó con 10 ml de MgCl₂ 50 mM y con 10 ml de agua destilada, conservándose hasta su utilización a -20 °C. Los sobrenadantes de cultivo se centrifugaron en una centrífuga de mesa de rotor basculante, Labofuge I (EE.UU.) a 6000 x g durante 10 min y se dializaron frente a 2 l de tampón acetato potásico 50 mM pH 5.5 a 4 °C. La diálisis duró 16 h y a lo largo de ese tiempo se llevaron a cabo tres cambios del tampón. Las soluciones dializadas se conservaron a -20 °C hasta su uso.

3.1.3.5. Concentración de sobrenadantes por precipitación con sulfato amónico

Al filtrado, obtenido como se describe en el apartado anterior, se le añadió sulfato amónico sólido hasta alcanzar un 80 % de saturación a 4 °C (51.6 g por cada 100 ml de solución) y la solución se dejó agitándose a esta temperatura 30 min después de alcanzar una completa disolución del sulfato amónico. El precipitado formado se recogió por centrifugación a 12000 x g durante 30 min en centrífugas Sorvall modelo RC5-C con rotores SS34, y se resuspendió en el mínimo volumen posible de agua destilada. La solución fue posteriormente dializada frente a 2 l de tampón acetato potásico 50 mM pH 5.5 a 4 °C. La diálisis duró 16 h y a lo largo de ese tiempo se llevaron a cabo tres cambios del tampón.

En los experimentos de cromatofoco del apartado 4.2, la diálisis se realizó en tampón imidazol/HCl 25 mM pH 7.4. La solución dializada se centrifugó de nuevo en las condiciones anteriores, eliminándose el precipitado obtenido. La solución resultó concentrada unas 25 veces y se conservó a -20 °C hasta su uso.

3.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y DETERMINACION DE PROTEINAS

3.2.1. Preparación de sustratos para ensayos enzimáticos

A. QUITINA COLOIDAL

A 10 g de quitina en escamas (Sigma, EE.UU., grado práctico), se añadieron 175 ml de HCl 10 N, en una campana de extracción dejándose toda la noche a 4 °C y posteriormente, al menos 4 h a temperatura ambiente. A continuación, la solución obtenida se filtró a través de un embudo con fibra de vidrio tupida en un matraz que contenía 1 l de etanol absoluto a -20 °C en agitación. Con ello se conseguía la formación de flóculos de quitina coloidal, que se dejaron decantar toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se centrifugaron en botes de 250 ml en centrífugas Sorvall RC5-C con rotores GSA durante 10 min a 5000 x g, lavándose varias veces con agua destilada y finalmente, con tampón fosfato potásico 70 mM, pH 6.0. A 1 ml del precipitado final obtenido se le determinó el peso seco y finalmente se resuspendió la totalidad en tampón fosfato 70 mM, pH 6.0 a la concentración de 10 mg de peso seco/ml, conservándose a 4 °C. Esta fue la solución usada para la purificación de las quitinasas (apartado 4.3.1).

Para los ensayos enzimáticos dicha solución se diluyó en el mismo tampón suplementado con 1 mM de NaN₃, hasta alcanzar una absorbancia de 1.0 a 600 nm. Esta solución tenía una concentración aproximada de 5 mg de peso seco de quitina/ml.

B. GLICOL-QUITINA

El sustrato glicol-quitina se preparó de manera idéntica a la descrita en Molano *et al.* (1977). Se añadieron lentamente 20 ml de ácido acético al 10 % (v/v) por gramo de glicol-quitosa (Sigma) y la mezcla se trituró en un mortero. La solución viscosa obtenida se dejó toda la noche a temperatura ambiente hasta completar la disolución del polisacárido. Al día siguiente, se añadieron lentamente 90 ml de metanol y la solución final se filtró en vacío a

través de gasa de vidrio. El filtrado se transfirió a un vaso de precipitado y se añadieron, en agitación constante, 1.5 ml de anhídrido acético hasta que la mezcla gelificó. A continuación la mezcla se dejó reposar y se cortó en pequeños trozos con la ayuda de una espátula para eliminar el metanol sobrante. Los trozos de gel se transfirieron a un homogeneizador Waring Blendor (EE.UU.) cubierto de metanol y se homogeneizaron durante 4 min a velocidad máxima. Finalmente, la suspensión se centrifugó a 27000 x g durante 4 min y se lavó con 500 ml de agua destilada. El homogeneizado así obtenido se resuspendió en agua destilada hasta alcanzar una concentración de 1 % (p/v), añadiéndose NaN₃ hasta una concentración de 1 mM. La solución se conservó a 4 °C hasta su uso.

C. LAMINARINA

A 0.5 g de laminarina (de *Laminaria digitata* grado analítico, Sigma) se añadieron 100 ml de tampón acetato potásico 50 mM, pH 5.5. La disolución obtenida se conservó a 4 °C hasta su uso en los ensayos enzimáticos.

D. PUSTULAN

A 0.5 g de pustulan (de *Umbillicaria papulosa*, Calbiochem, EE.UU.) se añadieron 100 ml de tampón acetato potásico 50 mM, pH 5.5, obteniéndose una suspensión que posteriormente se solubilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min. Esta solución se conservó a 4 °C y se utilizó directamente en los ensayos enzimáticos.

Para la purificación de las β -1,6-glucanasas (apartado 4.4.1) se disolvieron 0.5 g de pustulan en 100 ml de agua destilada. A continuación, se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto, con lo que se conseguía la precipitación del sustrato en forma particulada. La suspensión se lavó con agua destilada y se centrifugó en una centrífuga de rotor basculante para eliminar los restos de etanol. Finalmente, se resuspendió en tampón acetato potásico 0.5 M, pH 5.5 hasta una concentración de 1 mg/ml. La suspensión se conservó a 4 °C hasta su uso.

E. PAREDES CELULARES

Las suspensiones de paredes celulares de *S. cerevisiae*, *B. cinerea* CECT 2100, *G. fujikuroi* IMI 58289, *P. syringae* CECT 2351 y *P. blakesleanus* NRRL1555 se prepararon siguiendo el método descrito por Fleet y Phaff (1974). A 25 g de bloque de levadura de

panadería o de micelio liofilizado de los hongos filamentosos anteriores se les añadieron 100 ml de agua destilada en agitación hasta formar una pasta espesa. A continuación, las células se rompieron en un homogeneizador Braun modelo MSK (Bronwill Scientific, EE.UU.) y se lavaron y centrifugaron numerosas veces a 6000 x g, primero con una solución 2 M de NaCl y posteriormente con agua destilada. Las paredes obtenidas se liofilizaron y se conservaron a temperatura ambiente. El grado de purificación de las paredes se determinó observando por el microscopio óptico la ausencia de material citoplásmico y de membrana plasmática. Los rendimientos obtenidos fueron de aproximadamente 0.2 g de paredes liofilizadas/g de peso seco de material inicial.

F. β -GLUCANO

Las preparaciones de β -glucano (insoluble en álcali) de levaduras se obtuvieron siguiendo el método descrito por Fleet y Phaff (1974). A 10 g de bloque de levaduras, se le añadió NaOH hasta 3 % (p/v) y la mezcla se conservó a temperatura ambiente durante 1 h y a 70 °C durante otra hora. Después de neutralizar con HCl 1 N, el material insoluble se lavó tres veces con 40 ml de agua destilada, una vez con 40 ml de etanol absoluto, y nuevamente dos veces con 40 ml de agua destilada. El glucano insoluble obtenido se liofilizó y se conservó a temperatura ambiente.

3.2.2 Ensayos de actividad quitinasa y determinación de GlcNAc

La actividad quitinasa se ensayó a 37 °C según el método descrito por Boller *et al.* (1983). La mezcla de reacción contenía 0.2 ml de una solución de quitina coloidal y 0.5 ml de solución enzimática diluida apropiadamente. Se incubó de 30 min a 1 h y la reacción se detuvo calentando la mezcla a 100 °C durante 7 min. A continuación, las muestras se centrifugaron a 5000 x g durante 5 min en una centrífuga de rotor basculante. 0.2 ml de cada sobrenadante se incubaron con 40 μ l de una solución enzimática de helicasa a 30 mg/ml (IBF Biotechnics, Francia) durante 1 h a 37 °C, para transformar los oligosacáridos resultantes de la acción enzimática de las quitinasas en GlcNAc. Finalmente, la presencia de GlcNAc se determinó en 0.2 ml de la mezcla final. Se llevaron en paralelo blancos de enzima sin sustrato y de sustrato sin enzima.

La actividad intracelular se midió en células permeabilizadas de la siguiente manera: los micelio obtenidos de cada 10 ml de cultivo, se resuspendieron en 4.5 ml de tampón fosfato potásico 70 mM, pH 6.0, 0.25 ml de etanol absoluto y 0.25 ml de tolueno. A

continuación, se agitaron las mezclas constantemente durante 5 min, se lavaron y centrifugaron 5 veces con agua destilada en una centrífuga de rotor basculante y finalmente, se resuspendieron en 4 ml de tampón fosfato potásico 70 mM, pH 6.0. La actividad se ensayó como se ha descrito anteriormente.

La determinación de GlcNAc se realizó según el método de Reissig *et al.* (1955). A 0.2 ml de solución problema se les añadieron 40 μ l de una solución de borato potásico 0.8 M, pH 9.1 y se hirvieron durante 3 min. A continuación, la mezcla se enfrió rápidamente en un recipiente que contenía una mezcla de agua-hielo, se añadió 1 ml de una solución de para-dimetil-aminobenzaldehído diluída 10 veces con ácido acético glacial y se incubó durante 25 min a 37 °C. Finalmente, se registró la absorbancia a 585 nm. Como patrón se emplearon concentraciones conocidas de GlcNAc desde 0 a 1 mg/ml. Una unidad de enzima (1 U) se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de equivalentes de GlcNAc por minuto en las condiciones de ensayo descritas.

La solución de para-dimetil-aminobenzaldehído se preparó disolviendo 10 g de para-dimetil-aminobenzaldehído en 87.5 ml ácido acético glacial y 12.5 ml de HCl 10 N. La solución se conservó protegida de la luz a 4 °C.

3.2.3. Ensayo de actividad β -1,3-glucanasa y determinación de azúcares reductores

La actividad β -1,3-glucanasa se determinó a 37 °C. La mezcla de reacción contenía 0.8 ml de solución de laminarina al 0.5 % (p/v) y 0.2 ml de solución enzimática apropiadamente diluída. La mezcla se incubó de 30 min a 1 h y la reacción se detuvo calentándola a 100 °C durante 7 min. Finalmente, se determinó la concentración de azúcares reductores en 0.15 ml de mezcla de reacción por el método de Somogyi (1952) y Nelson (1957), usando como patrón glucosa a concentraciones de 0 a 1 mg/ml. Una unidad enzimática (1 U) se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de equivalentes de Glc por minuto en las condiciones de ensayo anteriores.

La determinación de azúcares reductores se realizó de la siguiente manera: a 0.15 ml de muestra se añadieron 0.15 ml de una solución 4:1 Somogyi I:Somogyi II y se hirvió durante 10 min. A continuación, la mezcla se enfrió rápidamente en un recipiente con agua helada, se añadieron 0.15 ml de solución Nelson y se agitó vigorosamente para favorecer la

eliminación del CO₂ formado. Finalmente, la mezcla se diluyó con 1.5 ml de agua destilada y se determinó la absorbancia a 520 nm.

Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Solución Somogyi I:

Se disolvieron, por este orden, 15 g de tartrato sódico potásico y 30 g de Na₂CO₃ anhidro en 300 ml de agua destilada. Posteriormente, se añadieron 20 g de NaHCO₃. Por otro lado, se disolvieron 180 g de Na₂SO₄ anhidro en 500 ml de agua destilada, calentando sin hervir para eliminar el aire formado. Una vez fría esta disolución, se añadió a la solución anterior y se completó hasta 1 l con agua destilada. La solución final se conservó a temperatura ambiente.

Solución Somogyi II:

Se disolvieron, por este orden, 2 g de CuSO₄·5H₂O y 18 g de Na₂SO₄ anhidro en 100 ml de agua destilada. El reactivo se conservó a temperatura ambiente.

Solución Nelson:

Se disolvieron 12.5 g de molibdato amónico·4H₂O en 225 ml de agua bidestilada y se añadieron agitando 10.5 ml de H₂SO₄ concentrado. Aparte se disolvieron 1.5 g de arseniato sódico en 12.5 ml de agua bidestilada que se mezclaron con la disolución de molibdato. El reactivo final se conservó protegido de la luz a temperatura ambiente, tras mantenerlo al menos 48 h a 37 °C.

3.2.4. Ensayo de actividad β-1,6-glucanasa

La actividad β-1,6-glucanasa se determinó a 37 °C. La mezcla de ensayo enzimático contenía 0.8 ml de solución de pustulan al 0.5 % (p/v) y 0.2 ml de solución enzimática apropiadamente diluida. La mezcla se incubó como en el caso anterior de 30 min a 1 h y la reacción se detuvo calentándola a 100 °C durante 7 min. Finalmente, se determinó el incremento en contenido de azúcares reductores en 0.15 ml de mezcla de reacción por el método de Somogyi (1952) y Nelson (1957), usando como patrón glucosa a concentraciones de 0 a 1 mg/ml. Una unidad enzimática (1 U) se define igualmente como la

cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de equivalentes de Glc por minuto en las condiciones de ensayo descritas.

Con el mismo método se determinó la actividad intracelular en células permeabilizadas obtenidas de la manera indicada anteriormente (apartado 3.2.2).

3.2.5. Ensayo de actividad quitobiasa

La actividad quitobiasa se determinó según el método descrito en Roberts y Selitrennikoff (1988) usando Np-GlcNAc (Sigma) como sustrato. A 1 ml de una solución 0.3 mg/ml de Np-GlcNAc en tampón fosfato 70 mM, pH 6.0 se le añadió 0.05 ml de una solución enzimática apropiadamente diluída y se incubó a 37 °C durante 10-30 min. La reacción se detuvo por adición de 25 μl de NaOH 1 N. El p-nitrofenol formado, resultado de la acción enzimática, se determinó espectrofotométricamente a 410 nm. Una unidad enzimática (1 U) se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de equivalentes de p-nitrofenol por minuto, en las condiciones de ensayo anteriores.

Con el mismo método se determinó la actividad intracelular en células permeabilizadas obtenidas según se describe en el apartado 3.2.2.

3.2.6. Ensayo de actividad lisozima

La actividad lisozima se determinó siguiendo el método de Roberts y Selitrennikoff (1988) usando células de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) como sustrato. Se vertieron en cajas de Petri suspensiones de 1 mg/ml de células en agarosa fundida al 1 % (p/v) en tampón fosfato potásico 70 mM, pH 6.0. Una vez solidificada la mezcla, se hicieron pocillos de 6 mm de diámetro y se añadieron 0.05 ml de solución enzimática. Las cajas se incubaron toda la noche a 37 °C. La presencia de actividad enzimática se apreció por la aparición de halos de clareamiento. La actividad lisozima se determinó igualmente midiendo la disminución de absorbancia a 645 nm en suspensiones de 0.2 mg/ml de células. En estos ensayos se usó como control positivo lisozima comercial de huevo de gallina (Sigma).

3.2.7. Ensayos de actividad lítica sobre paredes celulares

La acción enzimática sobre paredes celulares se estimó siguiendo una modificación del método descrito por Tanaka y Phaff (1965). La mezcla de reacción contenía 1 mg/ml de

paredes liofilizadas de *B. cinerea* CECT 2100 o de una cepa panadera de *S. cerevisiae*, 1 mM de NaN₃ y 1 % (p/v) de agar en tampón acetato potásico 50 mM, pH 5.5. Las suspensiones se vertieron en cajas de Petri y una vez solidificadas se hicieron pocillos de 6 mm de diámetro. Después de añadir 0.05 ml de solución enzimática por pocillo, las cajas se incubaron 16 h a 37 °C. La cantidad de actividad lítica se determinaba en función de la aparición y del tamaño de los halos de clareamiento. En los casos en los que la actividad no era observable directamente, las cajas se incubaron 5 min con 10 ml de una solución 0.1 mg/ml de calcofluor (*fluorescent brightener 28*, Sigma) en tampón Tris/HCl 0.5 M, pH 8.9, se lavaron abundantemente con agua destilada y se expusieron a iluminación con luz ultravioleta de 302 nm, utilizándose para ello un transiluminador LKB (Suecia), modelo Macro Vue. La presencia de actividad enzimática se apreció, entonces, por la ausencia de fluorescencia alrededor del pocillo.

La actividad lítica sobre paredes celulares de hongos también se determinó en suspensiones líquidas. Para ello, 0.8 ml de suspensiones de paredes a concentraciones de 5 mg/ml se mezclaron con 0.2 ml de solución enzimática diluída apropiadamente y se incubaron a 37 °C durante tiempos que variaban de 2 a 16 h. La liberación de azúcares reductores tras la acción enzimática, se determinó por el método de Somogyi (1952) y Nelson (1957) usando glucosa como patrón.

3.2.8. Determinación de proteína extracelular

La determinación de la proteína presente en los sobrenadantes dializados de cultivo, concentrados con sulfato amónico y otras preparaciones libres de células se llevó a cabo por el método de Bradford (1976), usando el reactivo para proteínas de Bio-Rad (EE.UU.) y siguiendo el procedimiento de microensayo (1 a 20 µg proteína/ml) recomendado por dicha firma comercial. Se usó ovoalbúmina de gallina (Sigma) como patrón.

3.2.9. Determinación de proteína total

La determinación de proteína micelial se llevó a cabo por el método de Lowry *et al.* (1951) con las modificaciones de Markwell *et al.* (1978), utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) como patrón.

3.3. METODOS DE PURIFICACION Y TECNICAS CROMATOGRAFICAS

3.3.1. Método de purificación de quitinasas

Para la purificación de las quitinasas a partir de sobrenadantes de cultivo de *T. harzianum* CECT 2413, se empleó una combinación de técnicas de afinidad junto a técnicas cromatográficas. El método incluía los siguientes pasos básicos: precipitación del sobrenadante con sulfato amónico al 80 % de saturación (apartado 3.1.3.5), unión por afinidad a quitina coloidal (apartado 4.3.1), cromatoenfoque (apartado 3.3.5.1) y concentración por ultrafiltración (apartado 3.3.6).

La pureza de las preparaciones finales se comprobó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (apartado 3.5.1.1).

3.3.2. Método de purificación de β -1,6-glucanasas

El método seguido para la purificación de las β -1,6-glucanasas a partir de sobrenadantes de cultivo de *T. harzianum* CECT 2413 incluía los siguientes pasos básicos: concentración del sobrenadante con sulfato amónico al 80 % de saturación (apartado 3.1.3.5), unión por afinidad a pustulan particulado (apartado 4.4.1), cromatoenfoque (apartado 3.3.5.1), cromatografía de filtración en gel (apartado 3.3.5.2) y concentración por ultrafiltración (apartado 3.3.6).

Al igual que en el apartado anterior, la pureza de las preparaciones finales se comprobó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (apartado 3.5.1.1).

3.3.3. Método de purificación de β -1,3-glucanasas

La purificación de una β -1,3-glucanasa se llevó a cabo de manera idéntica a la descrita en el apartado anterior.

3.3.4. Método de purificación de una enzima que hidroliza paredes de *B. cinerea* CECT 2100

Se llevó a cabo siguiendo los siguientes pasos: precipitación del sobrenadante con sulfato amónico al 80 % de saturación (apartado 3.1.3.5), unión por afinidad a suspensiones 20 mg/ml de paredes celulares (apartado 4.5.1), concentración por ultrafiltración (apartado 3.3.6), cromatografía de filtración en gel (apartado 3.3.5.2) y nueva ultrafiltración.

3.3.5. Técnicas cromatográficas

3.3.5.1. Cromatoenfoque

En este trabajo se usó la técnica de cromatoenfoque como método analítico para determinar el número de isoenzimas con la misma actividad, como paso de purificación preparativo y para determinar el pI de las enzimas purificadas. Se empleó una columna de vidrio calibrado, modelo C 10/20 (1 cm de diámetro, 20 cm de altura) de Pharmacia (Suecia), que contenía un lecho de 18 ml de Polybuffer Exchanger 94 de la misma marca, limitado en su parte superior por 1 ml de Sephadex G-25 (Pharmacia) y un émbolo AC 10 y empaquetado siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. La cromatografía se desarrolló a 4 °C. La columna se equilibró con 20 volúmenes de tampón imidazol/HCl 25 mM pH 7.4, previamente desgasificado por succión. La muestra se dializó frente al mismo tampón y se aplicó a través del émbolo. La elución se realizó con Polybuffer 74/HCl:agua en una proporción 1:8. La solución se desgasificó previamente y el pH se ajustó a 4.0. Se aplicó un flujo de 9 ml/h por medio de una bomba peristáltica LKB 10200 conectada a la salida de la columna y se recogieron fracciones de aproximadamente 1.5 ml mediante un colector automático Pharmacia modelo Frac-100. Tras medir el pH de las fracciones, se ensayaron las actividades enzimáticas pertinentes. Para su reutilización, los geles se regeneraron mediante lavado con 5 volúmenes de una solución 1 M de NaCl y se equilibraron de nuevo.

3.3.5.2. Cromatografía de filtración en gel. Determinación de la masa molecular en condiciones nativas y del radio de Stokes

En este trabajo se utilizó la cromatografía de filtración en gel como paso de purificación preparativo y para la determinación de los radios de Stokes y masas moleculares nativas de las enzimas estudiadas. Se empleó una columna de vidrio calibrado K 16/40 (1.6

cm de diámetro, 40 cm de altura) Pharmacia, que contenía un lecho de 24 ml de Sephacryl S-200 HR (Pharmacia), empaquetado siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante, y limitado en su parte superior por una cestilla de aplicación de muestras. La cromatografía se desarrolló a 4 °C. La columna se equilibró con tampón acetato 100 mM, pH 5.0, suplementado con 100 mM de KCl. Para la cromatografía de purificación de la primera β -1,6-glucanasa y de la β -1,3-glucanasa se empleó tampón acetato 100 mM, pH 5.0 suplementado con 1 M de KCl (apartado 4.4.1). Se aplicaron 0.5 ml de muestra, que contenía 20 mg/ml de sacarosa, directamente sobre la cestilla, usando una jeringa Hamilton (EE.UU.) de 1 ml. Inmediatamente, se aplicó un flujo de 7 ml/h proporcionado por succión mediante una bomba peristáltica modelo Pharmacia LKB P1. Con la ayuda de un colector modelo Pharmacia Frac-100 se recogieron fracciones de 0.65 ml de forma automática.

La determinación de la masa molecular de las proteínas en condiciones nativas y el radio de Stokes se llevó a cabo siguiendo las aplicaciones de Andrews (1965) y de Laurent y Kilander (1964), respectivamente. El volumen de elución de cada muestra (V_e) se determinó por el peso del líquido correspondiente, el volumen de vacío (V_0) se estimó como el volumen de elución de una muestra de azul dextrano a 10 mg/ml y el volumen total (V_t) calculando el volumen de cilindro que contenía el lecho. Las proteínas marcadoras y los valores considerados como sus masas moleculares y radios de Stokes, tomados de Brewer *et al.* (1974), fueron: α -quimotripsinogeno (25 kDa, 2.09 nm), anhidrasa carbónica bovina (31 kDa, 2.43 nm), ovoalbúmina de gallina (43 kDa, 3.05 nm) y seroalbúmina bovina (67 kDa, 3.55 nm). La elución de todas las proteínas se detectó midiendo la absorbancia a 280 nm y el azul dextrano midiendo la absorbancia a 650 nm. La masa molecular en condiciones nativas se calculó extrapolando a partir de la representación de K_{AV} frente al logaritmo de la masa molecular de las proteínas marcadoras, siendo $K_{AV} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$. El radio de Stokes se determinó extrapolando a partir de la representación del $(-\log K_{AV})^{1/2}$ frente al radio de Stokes de las proteínas marcadoras.

3.3.6. Concentración por ultrafiltración

La concentración de proteínas se realizó centrifugando las muestras a 4° C y 3000 x g durante 30 min, en aparatos Centricon PM-10 (Amicon, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, montados en una centrífuga refrigerada Sorvall RC5C y sobre un rotor SS34.

3.4. OBTENCION DE ANTISUEROS

Se inyectaron intraperitonealmente en hembras de ratón (Balb/C) muestras de 3 μ g cada una de dos quitinasas purificadas a homogeneidad y emulsionadas en 50 μ l de adyuvante completo de Freud. Previamente, se había procedido a la extracción de sangre con objeto de disponer de suero preinmune. En dos intervalos de quince días, se inyectaron dos nuevas muestras con la misma cantidad de proteína en adyuvante incompleto de Freud. Quince y treinta días después de la segunda inyección, se extrajeron 200 μ l de sangre, se centrifugaron en una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415 C (EE.UU.) a la máxima velocidad y los sobrenadantes se conservaron a -20 °C. Estos sobrenadantes constituyeron los antisueros anti-quitinasas.

De manera similar, se obtuvieron antisueros anti- β -1,6-glucanasa inyectando en este caso tres muestras de 15 μ g de proteína.

También, se obtuvieron antisueros contra las quitinasas purificadas en conejos blancos machos de raza neozelandesa. Para ello, muestras de 200 μ g de cada proteína purificada a homogeneidad se emulsionaron con un volumen equivalente de adyuvante completo de Freud, y se inyectaron en distintas zonas del cuerpo de cada conejo. Previamente, se extrajo sangre con objeto de disponer de suero preinmune. Con intervalos de quince días, se inyectaron dos nuevas muestras con la misma cantidad de proteína en adyuvante incompleto de Freud. En los mismos intervalos de tiempo y tras quince días después de la última inyección, se extrajeron de 20 a 40 ml de sangre, que se centrifugaron a 48000 x g durante 10 min a 10 °C y los sobrenadantes obtenidos se incubaron durante 15 min a 56 °C con el fin de inactivar el complemento. Seguidamente, los sobrenadantes se enfriaron a 4 °C, se repartieron en alícuotas de 1 ml y se conservaron hasta su utilización a -20 °C. Estos sobrenadantes constituyeron los antisueros anti-quitinasas.

3.5. ANALISIS DE PROTEINAS: CARACTERIZACION MOLECULAR

3.5.1. Electroforesis de proteínas

3.5.1.1. Electroforesis analíticas en geles de poliacrilamida que contenían SDS

Las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Weber y Osborn (1975), usando geles al 12 % de acrilamida; se utilizó un aparato Mini-Protean II de Bio-Rad (EE.UU.) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Para preparar los geles se mezclaron 4 ml de una solución de acrilamida al 29.2 % (p/v) y bis-acrilamida al 0.8 % (p/v) con 2.5 ml de tampón Tris/HCl 1.5 M, pH 8.8, 0.1 ml de una solución de SDS al 10 % y 3.35 ml de agua destilada. Los gases disueltos se eliminaron mediante vacío y posteriormente se añadieron 5 µl de TEMED y 50 µl de una solución de persulfato amónico (APS) para desencadenar la polimerización, que se realizó a temperatura ambiente entre dos placas de vidrio de 10.2 x 7.3 cm y 10.2 x 8.3 cm dispuestas paralelamente dejando un espacio de 0.75 mm entre ellas y montadas según las instrucciones del fabricante. El espacio delimitado por las placas se llenó hasta aproximadamente 5 cm del extremo inferior, cubriéndose el menisco con una capa (1-2 cm de altura) de gel de empaquetamiento que contenía 6 % de poliacrilamida en tampón Tris/HCl 0.5 M, pH 6.8. Inmediatamente antes de la polimerización se introdujo en la parte superior del gel un peine de teflón de 0.75 mm de grosor, de diez dientes de 5 mm de ancho y 13 mm de altura, separados entre si 3 mm, para formar los pocillos. El peine se retiró una vez que el gel había polimerizado, lavándose los pocillos con abundante agua destilada.

Las muestras se mezclaron con medio volumen de una solución de tampón de carga que contenía, tampón Tris/HCl 0.25 M, pH 6.8, glicerol al 40 %, SDS al 8 %, 2-mercaptoetanol al 20 % (v/v) y azul de bromofenol al 0.05 %, todo ello en agua destilada, tras lo cual se calentaron a 100 °C durante 5 min. La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente. El voltaje aplicado fue de 200 V que se mantuvo hasta que el colorante alcanzó la parte inferior de la placa (unos 45 min). El tampón de electrodo usado fue Tris (25 mM)/glicina (192 mM), pH 8.3 que contenía SDS al 0.1 %.

Como patrones se utilizaron las siguientes proteínas, suministradas por Bio-Rad (EE.UU.): fosforilasa B de músculo de conejo (97.4 kDa), seroalbúmina bovina (66.2 kDa), ovoalbúmina de gallina (45.0 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31.0 kDa), inhibidor de tripsinógeno de semilla de soja (21.5 kDa) y lisozima de huevo de gallina (14.4 kDa). Cuando las electroforesis se realizaron como paso previo a la detección inmunológica de proteínas, se emplearon las formas preteñidas de los mismos patrones. Las masas moleculares aparentes fueron en este caso: 106.0 kDa, 80.0 kDa, 49.5 kDa, 32.5 kDa, 27.5 kDa y 18.5 kDa. Para la determinación de las masas moleculares, se representó en ordenadas el logaritmo decimal de los valores de masa molecular de las proteínas patrones y en abscisas la movilidad electroforética relativa de cada una respecto al frente de electroforesis.

3.5.1.2. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se localizaron tiñéndolas por inmersión de los geles en una solución de azul de Coomassie R-250 (Sigma) al 0.1 % (p/v), 10 % (v/v) de ácido acético y 40 % (v/v) de metanol en agua. Tras una hora de tinción a temperatura ambiente, los geles se lavaron repetidas veces con una solución de ácido acético al 10 % (v/v) y metanol al 40 % (v/v) en agua. Las proteínas se visualizaron como bandas de color azul en el gel de poliacrilamida. Los geles una vez teñidos se conservaron en ácido acético al 7 % (v/v) en agua.

3.5.1.3. Isoelectroenfoque

La determinación del pI de las proteínas purificadas se llevó a cabo mediante isoelectroenfoque siguiendo el procedimiento descrito por Robertson *et al.* (1987), con un sistema vertical de minigeles de poliacrilamida en un aparato Mini-Protean II de Bio-Rad.

La composición de los geles fue la siguiente: 2 ml de una solución de acrilamida al 29.2 % (p/v) y bis-acrilamida al 0.8 % (p/v), 7 ml de agua destilada, 0.6 ml de anfolitos de pH comprendidos entre pH 3.5 y pH 10 (Serva fine Biochemicals, EE.UU.) y 2.4 ml de glicerol al 50 % (v/v). Después de eliminar los gases disueltos por succión, se añadieron 50 µl de APS y 20 µl de TEMED. La polimerización se realizó a temperatura ambiente entre dos placas de vidrio de 10.2 x 8.3 cm dispuestas paralelamente dejando un espacio de 1.5 mm entre ellas y montadas según las instrucciones del fabricante. Los pocillos de carga se formaron inmediatamente antes de la polimerización, introduciendo un peine de teflón de

diez dientes de 5 mm de ancho separados entre si 3 mm, de 13 mm de altura y 1.5 mm de grosor.

Las muestras se mezclaron con un volumen de una solución de glicerol al 60 % (v/v) y 4 % (v/v) de anfolito del mismo margen de pH utilizados en el gel. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1.5 h a 200 V y después se aumentó el voltaje a 400 V durante 1.5 h. Como solución catódica se usó NaOH 25 mM y como solución anódica ácido acético 20 mM. Ambas se mantuvieron a 4 °C hasta realizar la electroforesis.

Como marcadores se usaron las siguientes proteínas suministradas por Pharmacia LKB: tripsinógeno (pI 9.30), lentil lectinas (pIs 8.65, 8.45 y 8.15), mioglobina de caballo (pIs 7.35 y 6.85), anhidrasa carbónica B humana (pI 6.55), anhidrasa carbónica bovina (pI 5.85), β-lactoalbúmina A (pI 5.20), inhibidor de tripsinógeno de soja (pI 4.55) y amiloglucosidasa (pI 3.50).

Tras la migración, el gel se trató durante 10 min con una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % (p/v) con agitación suave, se lavó varias veces durante 1 h con TCA 1 % (p/v) y posteriormente se dejó toda la noche en esta solución. A continuación, el gel se tiñó y se destiñó siguiendo el método descrito en el apartado anterior.

3.5.1.4. Tinción de glucoproteínas en geles de poliacrilamida y detección de estados de glicosilación en las proteínas

La detección de estados de glicosilación de proteínas en geles de poliacrilamida que contenían SDS se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Dubray y Bezar (1982), o el procedimiento del ácido peryódico-base de Schiff (Sigma).

Con respecto al primer método, una vez terminada la electroforesis, los geles se incubaron durante toda una noche a temperatura ambiente en una solución de alcohol isopropílico al 25 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v). A continuación, se transfirieron a una solución de ácido acético al 7.5 % (v/v) durante 30 min y posteriormente 1 h a 4 °C en una solución acuosa de ácido peryódico al 0.2 % (p/v). Los geles se lavaron con agua destilada durante 3 h repetidas veces y posteriormente se añadió una solución de plata amoniacal. Este reactivo se preparó de la siguiente manera: a una solución de 21 ml de NaOH al 0.36 % y 1.4 ml de NH₄OH se le añadieron lentamente y con agitación vigorosa 4 ml de AgNO₃ al 19.4 %. Pasados 15 min, los geles se lavaron 2 min con agua destilada y se

transfirieron a una solución fresca que contenía ácido cítrico al 0.05 % (v/v), formaldehído al 0.019 % (v/v) y metanol al 10 % (v/v). Cuando las glucoproteínas se hicieron visibles, la reacción se detuvo usando fijador de fotografía Agfix (Agfa, Alemania).

El segundo método se realizó sumergiendo el gel en una solución de ácido acético al 7.5 % (v/v) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se trató 45 min a 4 °C en una solución de ácido peryódico al 0.2 % (p/v) e inmediatamente se colocó el gel 45 min en el reactivo de Schiff suministrado por Sigma. Los geles se destiñeron a temperatura ambiente con ácido acético al 10 % (v/v) varias veces.

En ambos casos, como control positivo se utilizó invertasa extracelular de *S. cerevisiae* (Sigma), proteína que está altamente glicosilada.

Los posibles cambios en los estados de glicosilación de las proteínas purificadas también se analizaron mediante incubación durante toda una noche de 5 µg de proteína purificada con 100 mU de endoglicosidasa-H o de α-manosidasa (Boeringher Mannheim, Alemania). Tras la incubación, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes. Los cambios en la movilidad electroforética de las muestras tratadas frente a las no tratadas, se interpretaron como presencia de carbohidratos glicosilantes en las proteínas. En este caso, también se usó invertasa extracelular de levaduras como control positivo.

3.5.1.5. Detección de actividad quitinasa en geles de poliacrilamida

Para la detección de actividad quitinasa, se hicieron electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturizantes (apartado 3.5.1.1) que contenían 0.01 % (p/v) de glicol-quitina. Los geles de empaquetamiento no contenían el sustrato. Tras la electroforesis, los geles se lavaron varias veces a temperatura ambiente durante 3 h y en agitación suave con tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8.2 que contenía 2 mM de EDTA, 1 mM de NaN₃ y 1 % (p/v) de caseína (Merck, Alemania) con objeto de eliminar el SDS y renaturalizar las proteínas en el gel (McGrew y Green, 1990). Antes de añadir la azida sódica, el tampón se esterilizó durante 20 min a 120 °C. Posteriormente, los geles se lavaron con agua destilada y se incubaron 2 h con tampón acetato potásico 200 mM, pH 5.5 a temperatura ambiente y con agitación suave. En este tampón se desarrolló la actividad enzimática. Pasado este tiempo, los geles se incubaron 5 min con tampón Tris/HCl 500 mM, pH 8.9 que contenía 0.01 % (p/v) de calcofluor (*fluorescent brightener 28*, Sigma) y posteriormente se lavaron varias veces durante 2 ó 3 h con agua destilada. La unión

específica del calcofluor al sustrato permite detectar la presencia de éste por fluorescencia. Por tanto, la actividad, resultado de la degradación de la glicol-quitina en las zonas de las bandas de quitinasa, se detectó como ausencia de fluorescencia cuando se exponían los geles a iluminación con luz ultravioleta de 302 nm. Para ello se utilizó un transiluminador LKB modelo Macro Vue. Los geles se fotografiaron usando un equipo Polaroid modelo MP-4 (EE.UU.) con un filtro de color naranja delante del objetivo.

3.5.1.6. Detección de actividad β -1,6-glucanasa en réplicas de geles de poliacrilamida

Una vez terminada la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, los geles se lavaron varias veces con tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8.2 que contenía 2 mM de EDTA, 1 mM de NaN_3 y 1 % de caseína (Merck) y posteriormente con tampón acetato 50 mM, pH 5.5. Paralelamente, se preparó un gel de agarosa al 0.8 % que contenía 0.1 % de pustulan, con un espesor no mayor de 0.75 mm y sobre una placa de vidrio de 10.2 x 7.3 cm. Tras la solidificación del último, ambos geles se colocaron uno sobre otro entre dos placas de vidrio, se sometieron a una ligera presión para que hubiese contacto, y se incubaron a 37 °C en un ambiente húmedo durante toda la noche. A continuación, se separaron ambos geles, el gel de poliacrilamida se tiñó para detectar proteínas (apartado 3.5.1.2) y el de agarosa con una solución 0.1 % (p/v) del colorante Rojo Congo (Sigma). La tinción se llevó a cabo incubando durante 10 min con solución de colorante, lavando varias veces con 1 M de NaCl durante 30 min, tiñendo de nuevo 10 min con nueva solución de Rojo Congo y lavando con 1 M de NaCl varias veces. Finalmente, los geles se incubaron con tampón acetato potásico 50 mM, pH 5.5, que producía un cambio de color del gel de agarosa de rojo a azul. La actividad, resultado de la hidrólisis del sustrato durante la réplica, se detectó como una zona de clareamiento sobre un fondo azul. Los geles de actividad se fotografiaron inmediatamente usando un equipo Polaroid modelo MP-4.

3.5.1.7. Inmunotransferencia y detección de proteínas mediante el empleo de antisueros

La presencia de quitinasas o β -1,6-glucanasas en muestras proteicas se detectó por inmunoreacción con anticuerpos anti-quitinasas o anti- β -1,6-glucanasa obtenidos como se describe en el apartado 3.4. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Bio-Rad de 0.45 μm de poro, usando un equipo Mini Trans-blot suministrado por Bio-Rad y siguiendo las instrucciones del fabricante. El gel se situó frente

a la membrana de nitrocelulosa y se cubrió por ambos lados con trozos de papel de filtro Whatman nº 1 y dos esponjas Scott Britte suministradas por el fabricante. El conjunto se colocó en el equipo de transferencia que contenía tampón Tris (25 mM)/glicina (192 mM), pH 8.3 y metanol al 20 % (v/v) y se aplicó un voltaje de 40 V durante 2 h a temperatura ambiente. La transferencia de los patrones preteñidos al filtro de nitrocelulosa garantizó que el proceso había transcurrido satisfactoriamente.

Seguidamente, la membrana se incubó durante 2 h y con agitación constante en una solución bloqueante de 5 % (p/v) de leche desnatada (Molico-Sveltesse, Nestlé, España) y 1 mM de NaN₃ en tampón TBS (Tris/HCl 15 mM, pH 7.4, que contenía 0.2 M de NaCl). A continuación, la membrana se incubó con el antisuero diluido en solución bloqueante (dilución 1:500 para las quitinasas y 1:1000 para la β -1,6-glucanasa) durante toda la noche a temperatura ambiente. Tras la incubación, la membrana se lavó a intervalos de 15 min cuatro veces, con 50 ml de tampón TBS que contenía Tween 20 (Sigma) al 0.05 % (v/v) y posteriormente se incubó durante 2 h con 10 ml de una solución de Inmunoglobulina G de cabra anti-inmunoglobulina G de ratón, conjugados con fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano (Sigma) en una dilución 1:1000 en tampón TBS suplementado con Tween 20 al 0.05 % (v/v) o con 10 ml de una solución de Inmunoglobulina G de cabra anti-inmunoglobulina G de conejo, conjugados con peroxidasa de rábano a la misma dilución. Posteriormente, se repitieron los lavados con 50 ml de tampón TBS suplementado con Tween 20 al 0.05 % (v/v) y se reveló la actividad fosfatasa alcalina o la actividad peroxidasa. Para determinar la actividad fosfatasa alcalina la membrana se sumergió en una solución 0.05 % (p/v) de 5-bromo,4-cloro,3-indolfosfato, 0.01 % (p/v) de cloruro de nitroazul de tetrazolio, 1 mM de MgCl₂ y 0.1 mM de dietanolamina. Tras varios minutos en oscuridad, aparecían bandas oscuras de inmunoprecipitación; la reacción se detuvo por adición de 20 mM de EDTA. La actividad peroxidasa se detectó en los geles sumergiendo la membrana en una solución de cloronaftol (30 mg disueltos en 10 ml de metanol), H₂O₂ (250 μ l al 33 % v/v) y TBS (50 ml). Tras varios minutos de incubación en oscuridad, aparecían bandas oscuras sobre el fondo blanco de la membrana que se correspondían con la actividad peroxidasa del antisuero conjugado. La reacción se detuvo como en el caso anterior.

3.5.1.8. Transferencia a membranas de PVDF para microsecuenciación de proteínas

Para llevar a cabo la microsecuenciación de las proteínas, éstas, una vez purificadas, se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacríamida al 12 % con geles de empaquetamiento al 6 % de poliacrilamida, usando para ello un sistema

Hoefler modelo SE 600 (Hoefler Scientific Instruments, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los geles se polimerizaron sobre placas de 19.5 cm x 18 cm dispuestas paralelamente dejando un espacio entre ambas de 1.5 mm. Se usaron peines de 15 pocillos de 0.5 cm de ancho, 3 cm de largo y 1.5 mm de grosor. Las muestras se resuspendieron en un volumen de tampón de carga (apartado 3.5.1.1) que contenía 0.1 M de DTT en el caso de que fueran a ser usadas posteriormente para generar péptidos trípticos. Si las muestras eran para obtener secuencias amino terminales no se añadía DTT. El voltaje aplicado fue de 200 V hasta que el colorante llegó al final del gel.

Posteriormente, los geles se incubaron en ácido bórico 50 mM, pH 8.0, que contenía SDS al 0.1 % (p/v) durante 1 h con agitación constante suave y finalmente se transfirieron a membranas de Immobilon (Millipore) en un equipo Trans blot de Bio-Rad, usando para ello un tampón de transferencia que contenía 50 mM de ácido bórico y 50 mM de Trizma base. Antes de la transferencia, las membranas se incubaron 5 min en metanol absoluto y se lavaron 20 min con varios cambios de agua destilada. Durante toda la noche se aplicó un voltaje de 35 V. A continuación, las membranas se tiñeron sumergiéndolas en una solución 0.1 % (p/v) de colorante Amido black (Sigma) en 45 % (v/v) de metanol y 7 % (v/v) de ácido acético durante 30 min. Posteriormente, se lavaron abundantemente con agua destilada para eliminar los restos de colorante. Las proteínas se identificaron como bandas azules. Finalmente, las membranas se secaron y se recortaron las bandas.

Cuando las bandas de proteína se usaron para la determinación de secuencias amino terminales no se realizaron tratamientos posteriores, pero si se pretendía generar péptidos trípticos, las membranas se troceaban con un bisturí y se sumergían en un tubo Eppendorf con 200 μ l de una solución que contenía 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona (30 kDa) en metanol (solución de bloqueo).

3.5.2. Obtención y separación de péptidos trípticos

La solución de bloqueo que contenía las membranas se diluyó dos veces con agua destilada y transcurridos 30 min se retiró el líquido con una pipeta Pasteur. A continuación, las membranas se lavaron cuatro veces con 0.5 ml de agua y posteriormente con 0.5 ml de tampón de digestión (0.1 M de Tris/HCl, pH 8.5). Tras el lavado, se incubaron con el mínimo volumen de tampón de digestión capaz de sumergirlas (generalmente 50-100 μ l) y se añadió 1 μ l de tripsina (EC 3.4.21.4; grado de secuenciación, Sigma) recién preparada a una

concentración de 1 mg/ml en tampón de digestión. La reacción enzimática se llevó a cabo durante 4 h a 37 °C.

Tras la digestión, las membranas se transfirieron a otro tubo Eppendorf y se lavaron con 100 µl de una solución al 12 % (v/v) de ácido trifluoroacético en agua. Esta solución se añadió a la mezcla de digestión original y se conservó a -20 °C.

Los péptidos se separaron mediante la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en una columna de fase reversa C4 (Millipore) de 0.46 x 25 cm, equilibrada a un flujo de 1 ml/h con solvente A (0.1 % v/v de ácido trifluoroacético en agua), conectada en fase y sin volúmenes muertos a un detector de absorbancia a 214 nm. A continuación, se pasó durante 5 min solvente A y posteriormente un gradiente lineal de 100 % de solvente A hasta 100 % de solvente B (0.1 % v/v de ácido trifluoroacético en 70 % v/v de acetonitrilo) durante 1 h. Los péptidos se recogieron manualmente en tubos Eppendorf inmediatamente después de que la absorbancia comenzase a incrementar. Los péptidos se concentraron en una centrífuga Speed Vac Concentrator (Savant Instruments, EE.UU.) hasta un volumen de 50 µl y se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

3.5.3. Microsecuenciación de proteínas y péptidos trípticos

El análisis de secuencias se realizó siguiendo el método de degradación de Edman (Matsudaira, 1989) en un secuenciador automático Applied Biosystems modelo 473A (EE.UU.), equipado en fase con un analizador de PTH-aminoácidos y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias amino terminales se realizaron incluyendo las piezas de membrana directamente en el cartucho del microsecuenciador donde se llevaba a cabo la separación consecutiva de aminoácidos. Para secuenciar péptidos internos, se seleccionaron primordialmente aquellos de mayor resolución y más hidrófobos (generalmente a mitad de gradiente). A los péptidos seleccionados se les añadieron 30 µl de una solución de 0.1 % (v/v) de ácido trifluoroacético y 30 % (v/v) de acetonitrilo, se aplicaron en una membrana de fibra de vidrio tratada con polibreno (Applied Biosystem) y se introdujeron en el cartucho del microsecuenciador, donde se llevaba a cabo la separación consecutiva de aminoácidos.

3.6. ANALISIS DE PROTEINAS: CARACTERIZACION CINETICA

3.6.1. Determinación de K_m

Para determinar la afinidad de las enzimas purificadas por sus sustratos correspondientes, se realizaron representaciones de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk (1/V frente a 1/S).

En el caso de las quitinasas, se ensayaron concentraciones de quitina coloidal entre 0.2 y 6.5 mg/ml, o concentraciones de Np-(GlcNAc)₂ (Sigma) entre 0.25 mM y 5 mM. Estas concentraciones se ensayaron según los métodos descritos en los apartados 3.2.2 y 3.2.5 respectivamente, minimizando los tiempos de ensayo enzimático para obtener así los datos de las velocidades iniciales.

En el caso de las β -1,6-glucanasas, se ensayaron concentraciones de pustulan entre 0.5 y 20 mg/ml, según el método descrito en el apartado 3.2.4 y minimizando los tiempos de ensayo enzimático. La K_m de la β -1,3-glucanasa se obtuvo de manera similar, usando concentraciones de laminarina entre 0.5 y 20 mg/ml, mediante el ensayo descrito en el apartado 3.2.3 y minimizando igualmente los tiempos de ensayo enzimático para obtener así los datos de las velocidades iniciales.

3.6.2. Especificidades por sustrato

Para determinar la especificidad de las enzimas purificadas se han empleado diferentes sustratos.

En el caso de las quitinasas se ensayaron los siguientes sustratos poliméricos: quitina coloidal, glicol-quitina, glicol-quitosan (Sigma), laminarina, pustulan y carboximetilcelulosa (CMC, Merck), todos a una concentración de 5 mg/ml. La actividad frente a quitina coloidal se ensayó según el método descrito en el apartado 3.2.2. La actividad frente a la glicol-quitina y al glicol-quitosan, según el procedimiento de Schales (Uchida y Ohtakara, 1988), y la actividad frente a laminarina, pustulan y CMC, según el método usado para la actividad β -1,3-glucanasa (apartado 3.2.3), cuantificando los azúcares reductores liberados por el método de Somogyi-Nelson (apartado 3.2.3). Igualmente, se ensayó la actividad frente a 1 mM de los sustratos artificiales Np-(GlcNAc)₂, Np-GlcNAc, Np-GalNAc y MeUmb-(GlcNAc)₂ (Sigma). Los compuestos nitrofenilados se ensayaron según el método descrito

para la actividad quitobiasa (apartado 3.2.5) y el compuesto MeUmb-(GlcNAc)₂, según el método descrito por Robbins *et al.* (1988). La actividad lisozima de las quitinasas se ensayó siguiendo el método descrito en el apartado 3.2.6.

En el caso de las β -1,6-glucanasas se ensayaron los siguientes sustratos poliméricos: quitina coloidal, glicol-quitina, laminarina, pachiman (β -1,3-glucano; de *Poria cocos*, Calbiochem), glucano de levadura (apartado 3.2.1.F), CMC, pustulan, nigeran (de *Aspergillus nidulans*, Sigma), almidón soluble (α -1,4- α -1,6-glucano; Sigma) y dextrano (α -1,6-glucano; de *Leuconostoc mesenteroides*, Sigma). Salvo la quitina coloidal y la glicol-quitina que se ensayaron como se describe anteriormente, la actividad para el resto de los sustratos se analizó según el método usado para la actividad β -1,6-glucanasa (apartado 3.2.4), determinando los azúcares reductores liberados por el método de Somogyi (1952) y Nelson (1957) como se indica en el apartado 3.2.3. Se estimó igualmente la acción frente a paredes celulares de hongos (apartado 3.2.7).

La especificidad de la β -1,3-glucanasa se determinó sobre quitina coloidal, glicol-quitina, laminarina, pachiman, glucano de levadura, CMC, pustulan, nigeran, almidón soluble, dextrano y paredes celulares de hongos. La actividad se determinó como en el caso anterior.

Finalmente, la especificidad de la enzima que degrada paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100 se determinó sobre los siguientes sustratos: laminarina, pachiman, glucano de levaduras, pustulan, CMC, almidón soluble, nigeran, quitina coloidal, *Hide powder azure* (sustrato de proteasas tipo tripsina, Sigma) y paredes celulares de hongos. El ensayo de actividad proteasa, usando *Hide powder azure*, se realizó de forma idéntica a la descrita por Elad *et al.* (1982).

3.6.3. Determinación de la temperatura óptima de ensayo

La temperatura óptima para el ensayo de la actividad de cada proteína purificada se llevó a cabo incubando mezclas de reacción para cada proteína (ya descritas en sus apartados correspondientes) entre 20 y 80 °C y determinando posteriormente los productos de reacción a cada temperatura.

3.6.4. Determinación de la estabilidad térmica

La inactivación térmica para cada enzima se llevó a cabo incubando durante 30 min diluciones apropiadas de las enzimas en sus tampones de ensayo (tampón fosfato potásico 70 mM, pH 6.0 para las quitinasas y tampón acetato potásico 50 mM, pH 5.5 para las β -glucanasas) a temperaturas que variaron de 20 a 80 °C. La actividad se determinó posteriormente mediante adición de los sustratos correspondientes y la realización de los ensayos previamente descritos. La temperatura de inactivación se define como aquella temperatura a la que la actividad específica de la enzima empleada se reduce en un 50 %.

3.6.5. Determinación del modo de acción de las enzimas. Medida de productos de reacción por HPLC

Se incubaron 2 μ g de cada una de las quitinasas purificadas con 0.2 ml de quitina coloidal (5 mg/ml) o con 0.5 ml de los oligosacáridos (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₂ a una concentración 2 mg/ml, en agua destilada y en un volumen final de 0.7 ml, durante periodos de tiempo entre 10 min y 16 h. En paralelo, se llevaron controles de sustrato sin incluir las enzimas. Las reacciones enzimáticas se detenían hirviendo durante 7 min. Después de una centrifugación a 5000 x g en una centrífuga de rotor basculante durante 5 min, los productos solubles de la hidrólisis se separaron isocráticamente por HPLC. El sistema de HPLC usado fue el modelo Waters (EE.UU.), compuesto por un inyector Rheodyne modelo 7010 conectado a una bomba modelo Waters 501 que creaba un flujo constante de solvente. El flujo usado fue de 0.6 ml/min. La salida del inyector estaba conectada a una columna de cromatografía HPX-42A de análisis de carbohidratos (Bio-Rad) en un horno a 60 °C Waters, en serie con un detector de absorbancia Lambda Max 481 (Waters). Los productos de hidrólisis se detectaron por su absorbancia a 210 nm y se identificaron por comparación con una serie de oligosacáridos de quitina de grado de polimerización de 1 a 4. Los datos obtenidos se procesaron usando la aplicación *Baseline 810 chromatography workstation* de HPLC para ordenadores compatibles IBM.

De cada una de las β -1,6-glucanasas purificadas, se incubaron 0.2 μ g con 0.5 ml de una solución de pustulan a 5 mg/ml ó 2 mg/ml de gentibiosa (β -1,6-diglucósido), en agua destilada en un volumen final de 1 ml y a distintos tiempos desde 10 min a 16 h. Alternativamente, 2 μ g de la β -1,3-glucanasa purificada, se incubó con 0.5 ml de una solución 5 mg/ml de laminarina o con 2 mg/ml de laminarobiosa (β -1,3-diglucósido). En paralelo, se llevaron controles de sustrato sin incluir las enzimas. Las reacciones se

detuvieron hirviendo durante 7 min, se centrifugaron 10 min a 5000 x g en una centrífuga de rotor basculante y los sobrenadantes se analizaron por HPLC de manera similar a la descrita en el párrafo anterior. Los productos se detectaron por su absorbancia a 195 nm y se identificaron por comparación de los tiempos de retención de la glucosa, la gentibiosa, laminarobiosa y la serie de oligosacáridos de celulosa de grado de polimerización de 2 a 5.

3.7. OTROS METODOS ANALITICOS

3.7.1. Determinación de glucosa

La glucosa se determinó en un analizador YSI modelo 27 (Yellow Spring Instruments, EE.UU.) calibrado con concentraciones conocidas de glucosa de 2 y de 5 mg/ml.

3.7.2. Determinación del pH

El pH de las disoluciones se valoró con pH-metros Metrohm Herisau modelo 654 (EE.UU.) o Crison modelo micropH 2001 (EE.UU.).

3.7.3. Determinaciones espectrofotométricas

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Spectronic 601 (Milton Roy, EE.UU.) o en un espectrofotómetro Hitachi U-1100 (Japón).

3.7.4. Eliminación de sales y moléculas pequeñas de las preparaciones proteicas

Las sales y moléculas pequeñas se eliminaron de las preparaciones proteicas mediante diálisis, utilizando tubos de celulosa regenerada Sigma de diámetro de poro medio de 2.4 nm y límite de exclusión de 8 a 15 kDa. Las membranas se hirvieron durante 10 min en una solución de NaHCO₃ 30 mM que contenía Na-EDTA 0.5 mM y se lavaron exhaustivamente con agua destilada antes de su utilización.

En los casos de muestras de volumen inferior a 100 µl, la diálisis se realizó en la tapa cortada de un tubo Eppendorf, situando la membrana entre la tapa y su cierre.

3.7.5. Precipitación de pequeños volúmenes de proteína

La precipitación de pequeños volúmenes de proteína se realizó en tubos Eppendorf añadiendo 1/10 de volumen de una solución a 4 °C de TCA al 100 % (p/v) en agua destilada. La mezcla se incubó 10 min a 4 °C y posteriormente se centrifugó en una centrifuga Eppendorf a su máxima velocidad durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó y centrifugó sucesivamente con 1 ml de etanol, etanol:éter dietílico 1:1 y etanol:éter dietílico 1:3, las tres soluciones a -20 °C. El último precipitado se secó en una campana de flujo laminar. Generalmente, estas precipitaciones se realizaron como paso previo a posteriores electroforesis, por lo que el último precipitado se resuspendía en el volumen deseado de tampón de carga, descrito en el apartado 3.5.1.1.

3.8. METODOS INFORMATICOS

3.8.1. Programas utilizados en ordenador personal

Se usaron ordenadores Macintosh modelos FD, HD, SE ó IIfx (EE.UU.) dotados de un sistema operativo 6.0 X. Los programas usados fueron los que a continuación se describen:

- Procesadores de texto Word™, versión 4.0 y versión 5.0.
- Programa de representación gráfica Kaleidagraph™ versión 2.0.2 y Cricket Graph™ versión 1.3.
- Programa de diseño gráfico Canvas™ versión 2.0.

3.8.2. Programas utilizados en conexión con la red del Centro Informático Científico de Andalucía (CICA)

La conexión con el CICA permitió la utilización del paquete informático de *Genetic Computer Group* (GCG) versión 7.1, de la Universidad de Wisconsin (EE.UU.) (Devereaux *et al.*, 1984), el acceso al banco de secuencias del *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) en Heidelberg (Alemania) y al banco de secuencias *SwissProt* de la Universidad de Basilea (Suiza). La aplicación FastA de este paquete informático permitió la búsqueda de homologías y las aplicaciones Pileup y Bestfit el alineamiento de las secuencias de aminoácidos obtenidas y las disponibles en los bancos de datos.

4. RESULTADOS

4.1. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES NUTRICIONALES SOBRE LOS NIVELES DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS β -GLUCANASAS Y QUITINASA DE *T. harzianum* CECT 2413

4.1.1. Efecto de distintas fuentes de carbono sobre la producción de las enzimas estudiadas

Uno de los principales objetivos de este trabajo ha consistido en estudiar la fisiología de la producción de las actividades β -1,3 y β -1,6-glucanasa y quitinasa por la cepa micoparásita de *T. harzianum* CECT 2413. La selección de una fuente de carbono apropiada y su concentración idónea han sido los pasos necesarios para acometer la posterior purificación de las actividades enzimáticas citadas anteriormente.

En primer lugar, se ha estudiado la excreción al medio de cultivo de proteínas con actividad β -1,3 y β -1,6-glucanasa y quitinasa de *T. harzianum* CECT 2413 en diferentes fuentes de carbono. Igualmente, se ha intentado correlacionar los niveles enzimáticos de los sobrenadantes de cultivo con la capacidad lítica frente a paredes celulares de *S. cerevisiae* y de *B. cinerea* CECT 2100. La tabla 6 muestra los niveles de actividad detectados en presencia de diferentes fuentes de carbono. Los resultados sugieren que, mientras algunas fuentes de carbono pueden inducir, otras parecen reprimir las distintas actividades estudiadas y en distinta medida. La quitina fue elegida como la fuente de carbono óptima para realizar posteriores estudios.

4.1.2. Efecto de la concentración de sustratos sobre la producción de las enzimas estudiadas

La figura 6 muestra la cinética de excreción de las diferentes actividades enzimáticas en presencia de diferentes concentraciones de pustulan o de quitina. Se observa una clara dependencia entre la concentración de sustrato empleada y los niveles enzimáticos detectados. Los valores máximos de actividad quitinasa y quitobiasa se obtienen a la concentración máxima de quitina empleada. Una relación similar se observa entre las actividades β -1,3 y β -1,6-glucanasa y la concentración de pustulan.

TABLA 6. Efecto de la fuente de carbono sobre los niveles extracelulares de actividad β -1,3-glucanasa, β -1,6-glucanasa, quitinasa y actividad lítica en *T. harzianum* CECT 2413.

FUENTE DE CARBONO (a) (% p/v)	β -1,3-Glcasa (mU/mg prot.)	β -1,6-Glcasa (mU/mg prot.)	Quitinasa (mU/mg prot.)	Lisis en Levadura (mm halo hidrólisis)	Lisis en <i>Botrytis</i> (mm halo hidrólisis)
Glc 0.1%	10	15	0	0	0
Glc 2 %	75	10	0	0	0
Glc 10 %	0(b)	0	0	0	0
Gal 2 %	120	0	0	0	0
Fru 2 %	160	0	0	0	0
GlcN 2 %	120	0	5	0	0
GlcNAc 2 %	50	0	2	0	0
Glicerol 2 %	150	15	0	0	0
Quitina 1.5%	640	280	25	9	8
Quitosan 1 %	40	0	0	0	0
Laminarina 1%	5	0	0	0	0
Nigeran 1%	540	315	8	7	4
Pustulan 1%	340	100	0	2	3
Levadura 1%	1000	185	5	3	4
<i>Botrytis</i> 1%	1040	360	5	3	4
<i>Gibber.</i> 1 %	785	683	23	3	2
<i>Phyto.</i> 1 %	700	683	24	3	4
<i>Rhizo.</i> 1 %	748	600	17	2	2
<i>Tricho.</i> 1 %	666	617	22	3	2

(a). Glc, glucosa; Gal, galactosa; Fru, fructosa; GlcN, glucosamina; GlcNAc, N-acetilglucosamina; Levadura, paredes celulares de *S. cerevisiae*; *Botrytis*, paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100; *Gibber.*, micelio autoclavado de *G. fujikuroi* IMI 58289; *Phyto.*, micelio autoclavado de *P. syringae* CECT 2351; *Rhizo.*, micelio autoclavado de *R. solani* CECT 2815; *Tricho.*, micelio autoclavado de *T. harzianum* CECT 2413; Glcasa, glucanasa.

(b). 0; Debajo del nivel de detección (< 0.5 mU/mg proteína).

Las actividades se determinaron a las 48 h tras la incubación en las distintas fuentes de carbono. Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.1.3.2 y 3.1.3.4 para las condiciones de cultivo y de obtención de sobrenadantes y las descritas en los apartados 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 y 3.2.7 para las determinaciones de actividades enzimáticas. La proteína micelial se determinó como se describe en el apartado 3.2.9.

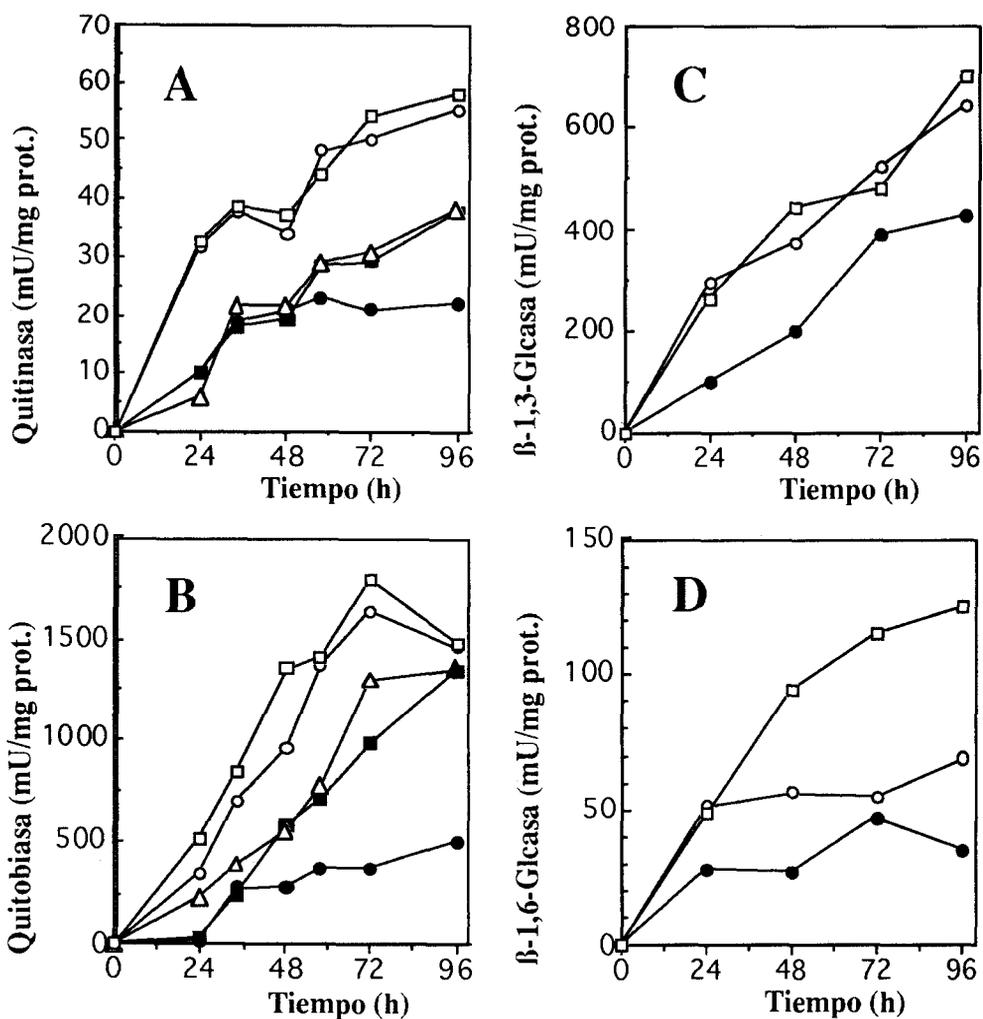


FIGURA 6. Cinética de excreción de las actividades quitinasa (A), quitobiasa (B), β -1,3-glucanasa (C) y β -1,6-glucanasa (D) por diferentes fuentes de carbono en *T. harzianum* CECT 2413. Los medios de cultivo contenían 1 % (□), 0.75 % (○), 0.5 % (△), 0.25 % (■) ó 0.1 % (●) de quitina (A y B) o de pustulan (C y D). Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.1.3.2 y 3.1.3.4. **Glcasa**, glucanasa.

4.1.3. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de las enzimas estudiadas

Los experimentos del apartado 4.1.1 indicaron que la presencia de glucosa en los cultivos afecta negativamente a los niveles de actividad de las enzimas. Con objeto de profundizar más en este efecto, se estudió la cinética de producción de las actividades quitinasa y quitobiasa en cultivos inducidos con quitina al 1.5 % y en presencia o ausencia de glucosa al 2 %. Las muestras se obtuvieron y trataron como se describe en el apartado 3.1.3.4, incluyendo el paso de diálisis que eliminaba, entre otras sustancias, la glucosa añadida a los cultivos. Como se observa en las figuras 7A y 7B, no se detecta actividad cuando hay glucosa presente. De un modo similar, cuando tras 24 h de inducción con quitina al 1.5 % se añaden distintas concentraciones de glucosa a los cultivos (de 0 a 10 %), se observa una reducción de los niveles enzimáticos de quitinasa y quitobiasa proporcional a la concentración empleada de glucosa (figuras 7C y 7D). La reducción de actividad fue paralela y proporcional al consumo del azúcar.

Como se aprecia en las figuras 7E y 7F, los resultados obtenidos para las actividades β -glucanasas, usando en este caso cultivos inducidos con pustulan al 1 %, son similares a los anteriores.

Para averiguar si la glucosa inactiva las enzimas de forma irreversible, muestras con actividad quitinasa, quitobiasa, β -1,3-glucanasa o β -1,6-glucanasa obtenidas en las mismas condiciones anteriores se incubaron toda una noche con las distintas concentraciones de glucosa empleadas en la figura 7C ó 7D. A continuación, las muestras se dializaron y se determinaron los niveles de actividad. La recuperación de actividad fue del 90 al 100 % respecto a los controles no tratados con glucosa. Así pues, el efecto de la glucosa no es atribuible a una inactivación enzimática irreversible, lo que sugiere que ésta podría ejercer un efecto represor sobre la síntesis.

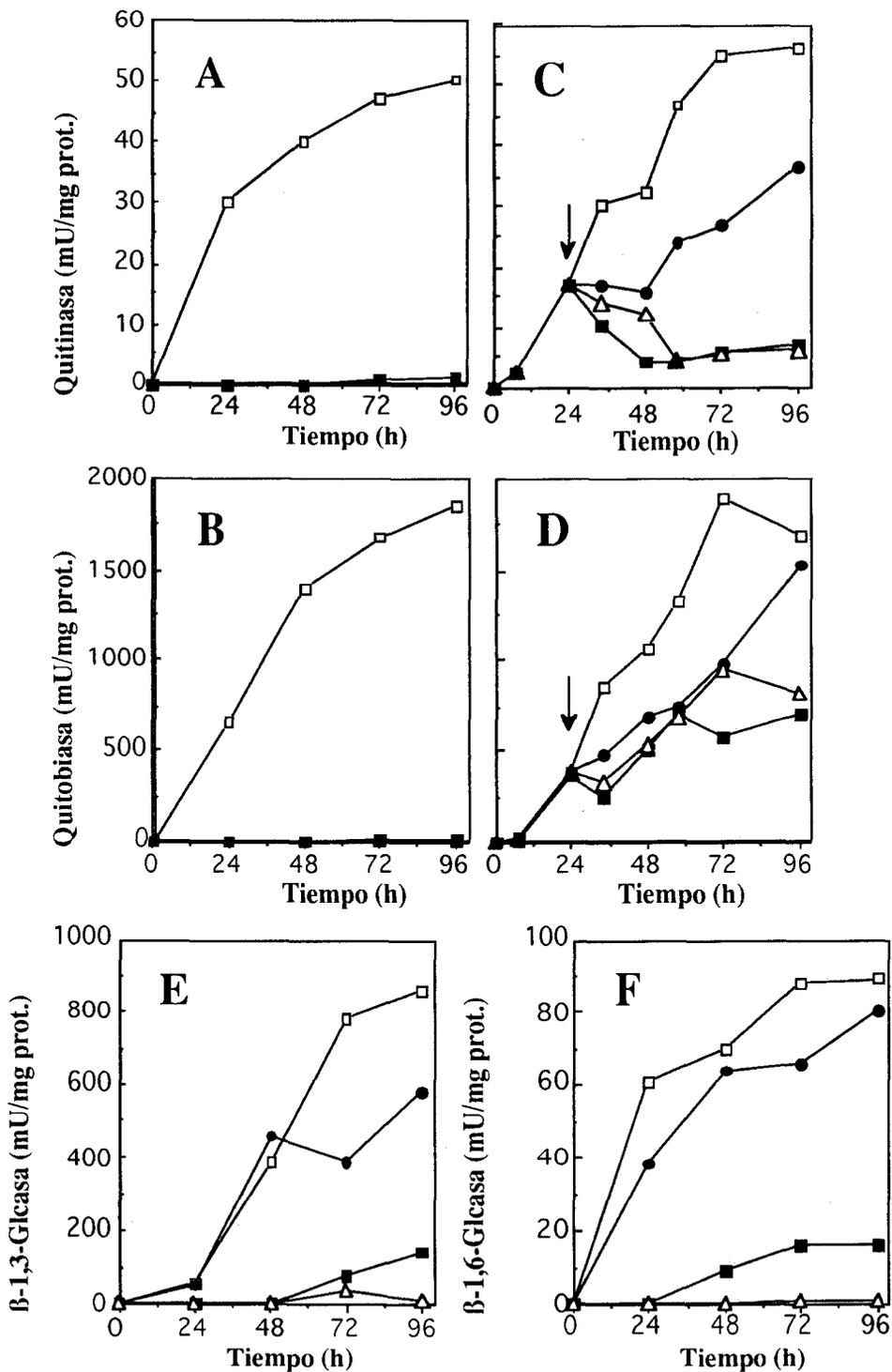


FIGURA 7. Efecto de la glucosa sobre la producción de las actividades quitinasa (A y C), quitobiosasa (B y D), β -1,3-glucanasa (E) y β -1,6-glucanasa (F) en *T. harzianum* CECT 2413. Los medios de cultivo contenían 0 % (□), 0.5 % (●), 2 % (■) ó 10 % (△) de glucosa en presencia de quitina al 1.5 % (A-D) o de pustulan al 1 % (E y F). La adición de las diferentes concentraciones de glucosa se realizó a tiempo cero, salvo en C y D, donde la adición se señala con una flecha. Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.1.3.2 y 3.1.3.4. **Glicosa**, glucanasa.

4.1.4. Efecto de inhibidores de la traducción y de la transcripción sobre la producción de las enzimas estudiadas

La adición de inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida a 50 $\mu\text{g/ml}$) o de síntesis de RNA (8-hidroxiquinolina a 100 $\mu\text{g/ml}$) a cultivos inducidos con pustulan al 1 % como fuente de carbono, detuvo la producción de las actividades enzimáticas β -1,3-glucanasa y β -1,6-glucanasa (figura 8A y 8C). El efecto fue similar cuando la adición se produjo a las 12 h de la inducción (figura 8B y 8D). En este último caso, se observó que los niveles de actividad se mantenían después de la adición de los inhibidores debido a la estabilidad de las enzimas al tratamiento.

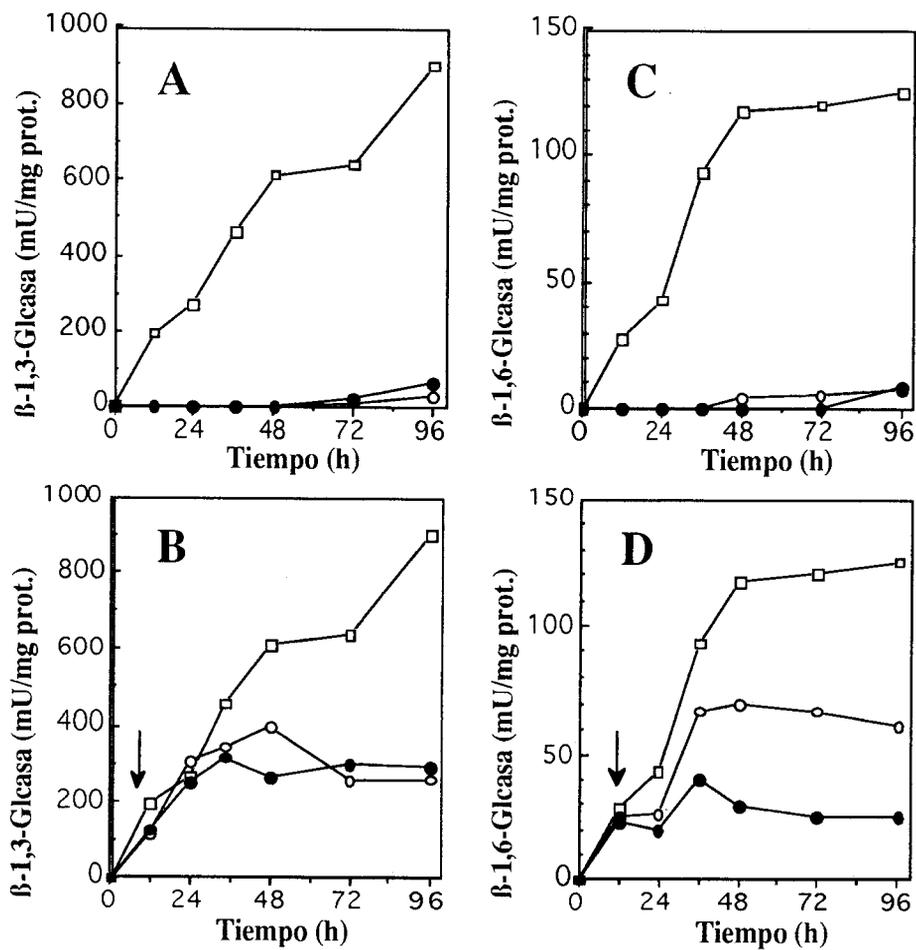


FIGURA 8. Efecto de la cicloheximida y 8-hidroxiquinolina sobre los niveles enzimáticos de β -1,3-glucanasa (A y B) y de β -1,6-glucanasa (C y D) de *T. harzianum* CECT 2413. El medio de cultivo contenía 1 % de pustulan. Producción de enzima en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida (O) o de 100 $\mu\text{g/ml}$ de 8-hidroxiquinolina (\bullet); producción en ausencia de los inhibidores (\square). En A y C los inhibidores se añaden a tiempo cero. En B y D la adición se señala con una flecha. Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.1.3.2 y 3.1.3.4. **Glcasa**, glucanasa.

Para las actividades quitinasa y quitobiasa (tabla 7) se obtuvieron resultados similares, en estos casos empleando cultivos inducidos con quitina al 1.5 %.

TABLA 7. Efecto de la adición de cicloheximida u 8-hidroxiquinolina en los niveles extracelulares e intracelulares de actividad quitinasa y quitobiasa de *T. harzianum* CECT 2413.

Actividad		inhibidor (a)		
		Ninguno	CX	8-HQ
extracelular:				
quitinasa	(mU/mg prot.)	24	0	0
quitobiasa	(mU/mg prot.)	870	55	15
proteína	(µg/mg prot.)	125	60	70
intracelular:				
quitinasa	(mU/mg prot.)	85	15	9
quitobiasa	(mU/mg prot.)	2100	300	200

(a). **CX**, cicloheximida a 50 µg/ml; **HQ**, 8-hidroxiquinolina a 100 µg/ml.

Las actividades se determinaron a las 48 h de la incubación en medio inducido con quitina al 1.5 %. Las condiciones experimentales son las descritas en la tabla 6.

Para distinguir entre inactivación enzimática y represión de la síntesis de las enzimas por el uso de los inhibidores, muestras que contenían las actividades enzimáticas estudiadas se incubaron toda la noche con concentraciones de cicloheximida u 8-hidroxiquinolina equivalentes a las empleadas anteriormente. A continuación, se cuantificaron las actividades en presencia de estos inhibidores, no encontrándose reducción significativa en los niveles enzimáticos respecto a los controles no tratados. Este resultado indica que, el efecto de los inhibidores no consiste en una inactivación enzimática. Igualmente, para distinguir entre un efecto sobre la síntesis o sobre el mecanismo de secreción, se realizaron medidas de los niveles enzimáticos intracelulares. Dado que también se observó una reducción de las actividades intracelulares (tabla 7 para las actividades quitinasa y quitobiasa, datos no mostrados para las β-glucanasas) los efectos de los inhibidores deben atribuirse a efectos en la síntesis.

4.2. ANALISIS POR CROMATOENFOQUE DEL NUMERO MINIMO DE ISOENZIMAS DISTINTAS PARA LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESTUDIADAS

Es muy frecuente la presencia de distintas isoenzimas en los sistemas de degradación de polisacáridos (Deshpande, 1986). Por otra parte, la técnica de cromatoenfoco es una herramienta potente para la identificación de distintas isoenzimas con diferentes pIs.

Con objeto de determinar el número mínimo de enzimas con actividad quitinasa, β -1,3-glucanasa y β -1,6-glucanasa presentes en los sobrenadantes de cultivos de *T. harzianum* CECT 2413 inducidos con quitina, 3 ml de un concentrado de sulfato amónico (1 mg proteína/ml) de un sobrenadante de cultivo de 48 h en medio con quitina al 1.5 % se sometieron a cromatoenfoco ácido siguiendo las condiciones descritas en el apartado 3.3.5.1. En las figuras 9, 10 y 11 se representan los perfiles obtenidos para las actividades β -1,3-glucanasa, β -1,6-glucanasa y quitinasa frente a la absorbancia a 280 nm y el pH de elución. Cuando se sometieron a cromatoenfoco ácido muestras de 4 mg/ml de Novozym™ 234, preparado comercial de enzimas extracelulares de *T. harzianum* de la marca comercial Novo Industries (Dinamarca), se observó un comportamiento análogo al obtenido con sobrenadantes de cultivo de *T. harzianum* CECT 2413 en quitina al 1.5 %.

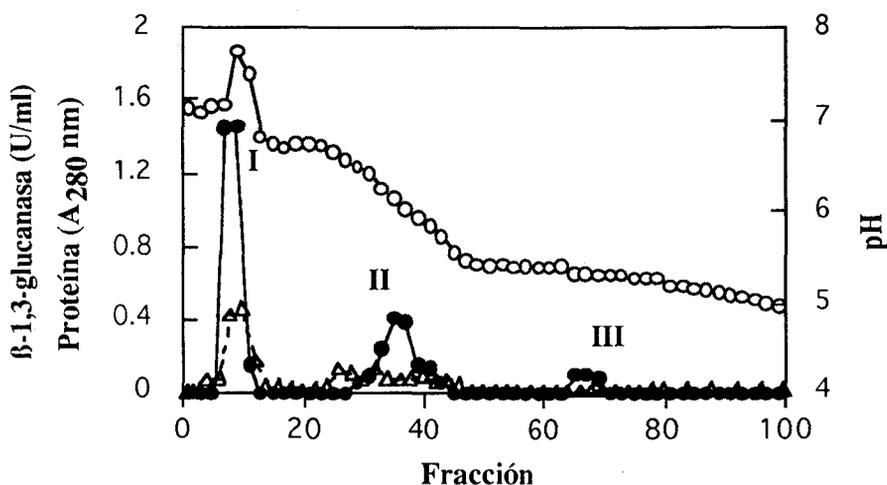


FIGURA 9. Análisis mediante cromatoenfoco del número de isoenzimas con actividad β -1,3-glucanasa presentes en cultivos de *T. harzianum* CECT 2413 inducidos en quitina al 1.5 %. Se aplicó una preparación concentrada con sulfato amónico que contenía 13 U de actividad β -1,3-glucanasa. Actividad β -1,3-glucanasa (●), proteína (Δ) y pH (○). I, II y III, β -1,3-I, β -1,3-II y β -1,3-III, respectivamente. Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.1.3.3, 3.1.3.5 y 3.3.5.1.

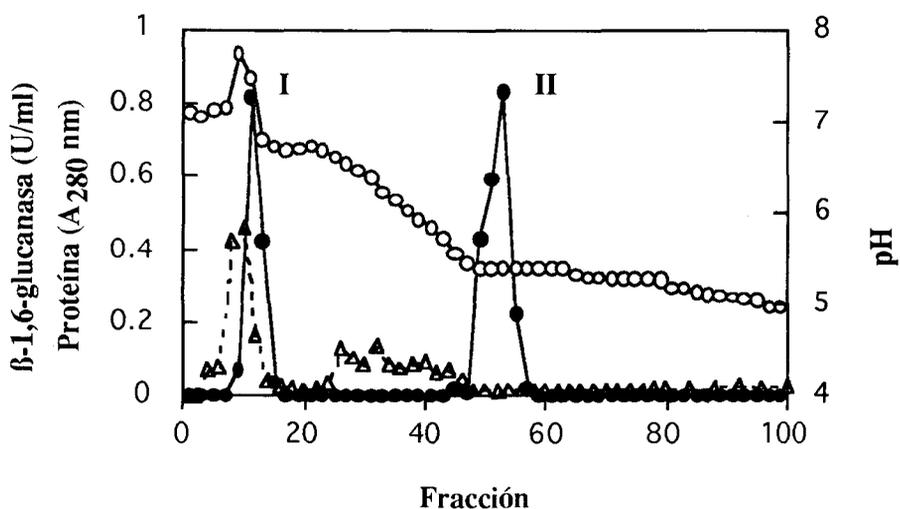


FIGURA 10. Análisis mediante cromatoenfoco del número de isoenzimas con actividad β-1,6-glucanasa presentes en cultivos de *T. harzianum* CECT 2413 inducidos en quitina al 1.5 %. Se aplicó una preparación concentrada con sulfato amónico que contenía 7 U de actividad β-1,6-glucanasa. Actividad β-1,6-glucanasa (●), proteína (Δ) y pH (O). I y II, β-1,6-I y β-1,6-II, respectivamente. Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.1.3.3, 3.1.3.5 y 3.3.5.1.

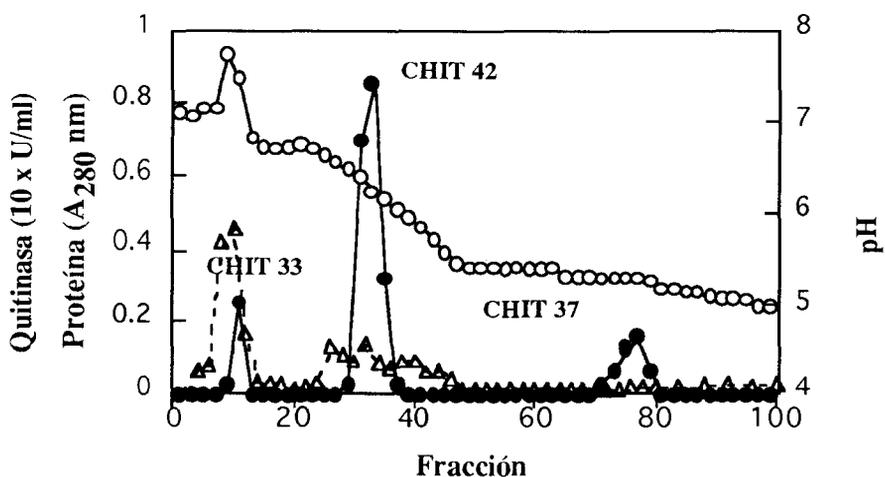


FIGURA 11. Análisis mediante cromatoenfoco del número de isoenzimas con actividad quitinasa presentes en cultivos de *T. harzianum* CECT 2413 inducidos en quitina. Se aplicó una preparación concentrada con sulfato amónico que contenía 3 U de actividad quitinasa. CHIT 33, CHIT 42 y CHIT 37, quitinasas de 33 kDa, 42 kDa y 37 kDa, respectivamente. Actividad quitinasa (●), proteína (Δ) y pH (O). Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.1.3.3, 3.1.3.5 y 3.3.5.1.

Estos resultados pueden resumirse de la siguiente manera: existen tres picos de actividad β -1,3-glucanasa, uno básico (pI > 7.0) y dos ácidos (pI 6.5 y pI 5.3). Existen dos picos de actividad β -1,6-glucanasa, uno básico (pI > 7.0) y otro ácido (pI 5.8). Finalmente, se detectan tres picos de actividad quitinasa, uno básico (pI > 7.0) y otros dos ácidos (pI 6.5 y pI 5.0). Cada pico obtenido puede interpretarse *a priori* como una isoenzima diferente. Así pues, *T. harzianum* CECT 2413 parece excretar al medio, en presencia de quitina, al menos tres isoenzimas con actividad β -1,3-glucanasa (abreviadamente, β -1,3-I, β -1,3-II y β -1,3-III), dos isoenzimas con actividad β -1,6-glucanasa (abreviadamente, β -1,6-I y β -1,6-II) y tres isoenzimas con actividad quitinasa (abreviadamente, CHIT 42, CHIT 37 y CHIT 33).

Dado que la resolución obtenida por la técnica de cromatofoco fue muy elevada, las purificaciones que se describen a continuación incluyeron cromatofocos preparativos como pasos críticos fundamentales.

4.3. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS QUITINASAS DE *T. harzianum* CECT 2413

4.3.1. Purificación de las quitinasas y criterios de homogeneidad

Con objeto de estudiar sus parámetros físico-químicos, cinéticos y líticos, se procedió a la purificación de las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413. El método que se describe a continuación está basado en dos pasos fundamentales: por un lado, la alta afinidad de las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413 por quitina coloidal y por otro, la resolución de la técnica de cromatoenfoco. El método completo de purificación fue el siguiente:

Sobrenadantes de 48 h de cultivo de *T. harzianum* CECT 2413 (800 ml) de medio con quitina al 1.5 % se filtraron a través de papel Whatman nº 1 y se centrifugaron a 6000 x g durante 10 min según las condiciones experimentales descritas en el apartado 3.1.3.3. Al sobrenadante se le añadió con agitación suave y a 4 °C, sulfato amónico hasta el 80 % de saturación. Después de 30 min tras la completa disolución del sulfato amónico y posterior centrifugación a 12000 x g durante 20 min, se obtuvo un precipitado que se resuspendió en la mínima cantidad de agua destilada y que finalmente se dializó tres veces frente a 2 l de tampón fosfato potásico 70 mM, pH 6.0 durante 16 h. La solución dializada se centrifugó a 12000 x g y el sobrenadante se sometió a adsorción a quitina coloidal siguiendo una modificación del método descrito por Jeaniaux (1966).

La adsorción a quitina coloidal se realizó de la siguiente manera: se añadieron alícuotas de 2.5 ml de solución dializada a 0.8 ml de quitina coloidal (10 mg/ml) en tubos de centrifuga de rotor SE12 (Sorvall). Las preparaciones se incubaron 20 min a 4 °C en agitación continua (mediante pequeñas barras magnéticas) y a continuación se centrifugaron en rotores SE12 a 12000 x g (Sorvall) durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes (fracción no absorbida a quitina) se incubaron nuevamente con 0.8 ml de quitina coloidal y el proceso completo se repitió dos veces. Todos los precipitados se lavaron tres veces con 3 ml de tampón fosfato potásico 70 mM, pH 6.0 suplementado con NaCl 1 M y finalmente se resuspendieron cada uno en 300 µl de tampón fosfato potásico 70 mM, pH 6.0 suplementado con 1 mM de PMSF y 1 mM de NaN₃. Estas muestras se incubaron al menos 16 h a 37 °C, obteniéndose una solución clarificada, resultado de la digestión de la quitina. Esta última solución se centrifugó a 12000 x g durante 10 min y el sobrenadante se dializó frente a 2 l de tampón imidazol/HCl 25 mM, pH 7.4 para eliminar los productos solubles de la digestión de quitina y para equilibrar la solución en el tampón utilizado en el siguiente

paso. El tampón se cambió tres veces y la diálisis duró 16 h. La solución anterior se adsorbió a una columna de cromatoenfoco (1 x 20 cm) equilibrada en tampón imidazol/HCl 25 mM, pH 7.4. La elución se realizó con una mezcla diluída de Polybuffer/HCl, pH 4.0 (figura 12). Las fracciones con alta actividad quitinasa se mezclaron, lavaron y concentraron en aparatos Centricon PM-10 (Amicon) y se analizaron por electroforesis analítica de proteína en condiciones desnaturalizantes y de actividad (figura 13). Las tres proteínas con actividad quitinasa resultantes se denominaron abreviadamente CHIT 42, CHIT 37 y CHIT 33 debido a sus masas moleculares (apartado 4.3.2.1).

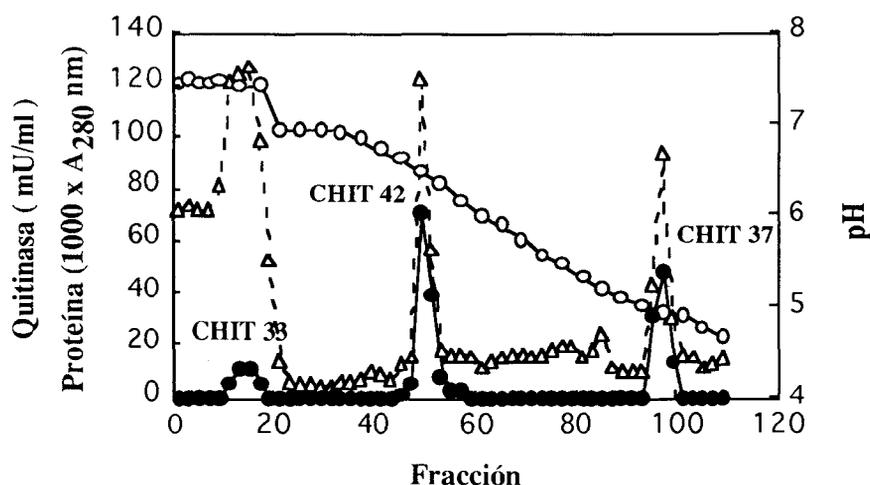


FIGURA 12. Perfil de elución en una columna de cromatoenfoco de las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413. Actividad quitinasa (●), proteína (Δ) y pH (○). Se aplicó una preparación procedente de una digestión de quitina que contenía 2.8 U de actividad quitinasa. Las condiciones experimentales se detallan en los apartados 3.1.3.3, 3.1.3.5 y 3.3.5.1.

La tabla 8 resume los resultados de un proceso típico de purificación. Las tres proteínas presentaron un alto grado de purificación siguiendo como criterios de homogeneidad la constancia de la actividad específica en las fracciones resultantes de la cromatografía y las bandas de proteína y actividad observadas en las electroforesis en condiciones desnaturalizantes y de actividad, respectivamente (figura 13).

TABLA 8. Purificación de las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413.

Paso de purificación	Vol. (ml)	Prot. (mg)	Act. (U)	Act.esp. (U/mg)	Rend. (%)	Purif. (veces)
80% (NH ₄) ₂ SO ₄	20.0	16.0	13.17	0.82	100	1.0
Digestión quitina	8.9	3.2	2.81	0.89	21	1.1
Cromatofoco:						
CHIT 33	0.50	0.20	0.22	1.10	2	1.3
CHIT 37	0.44	0.13	0.87	6.54	6	8.0
CHIT 42	0.50	0.25	0.67	2.78	5	3.4

Las preparaciones concentradas se usaron para determinar las propiedades que se explican a continuación y para generar los antisueros anti-quitinasa. Para la obtención de secuencias parciales de aminoácidos, las quitinasas purificadas se sometieron a filtración molecular en Sephacryl S-200 HR (apartado 4.3.2.1).

4.3.2. Propiedades físico-químicas

4.3.2.1. Masa molecular

Para la determinación de las masas moleculares de las quitinasas en condiciones nativas, se suplementaron muestras totales de quitinasas purificadas y concentradas hasta volúmenes aproximados de 0.5 ml con sacarosa a 20 mg/ml y se aplicaron a una columna de filtración en gel de Sephacryl S-200 HR (1.6 x 40 cm), previamente calibrada con proteínas marcadoras de masas moleculares conocidas. Cuando se representaron los valores de K_{av} frente al logaritmo decimal de las masa moleculares de las proteínas marcadoras se obtuvo una relación lineal (figura 14) de la que se puede deducir el valor de las masas moleculares de las quitinasas purificadas. Estos valores fueron de 32 kDa y 30 kDa para las quitinasas CHIT 33 y CHIT 37, respectivamente. Cuando esta relación se aplicó para la quitinasa CHIT 42 se obtuvo un valor de 8-15 kDa. Este valor no se modificó incluso cuando se incrementó la concentración de KCl en el tampón de elución desde 100 mM a 750 mM.

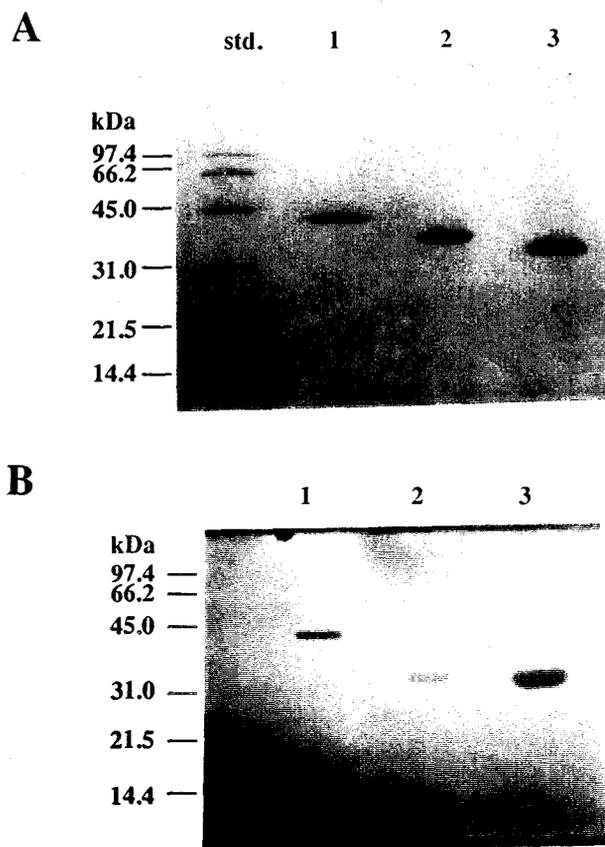


FIGURA 13. Análisis mediante electroforesis analítica (A) y de actividad (B) de las quitinasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413. Las condiciones de electroforesis son las descritas en los apartados 3.5.1.1 y 3.5.1.5. Calle std., marcadores de masa molecular; calle 1, CHIT 42 purificada (10 μ g); calle 2, CHIT 37 purificada (10 μ g); calle 3, CHIT 33 purificada (10 μ g).

Para determinar la masa molecular de las quitinasas en condiciones desnaturalizantes, alícuotas de 5-10 μ g de proteína purificada se sometieron a electroforesis en presencia de SDS. En la figura 15 se representa el logaritmo decimal de la masa molecular frente a los valores Rf de las proteínas marcadoras. Por interpolación a partir de la movilidad relativa de las bandas de quitinasa se calculan masas moleculares de 42 kDa, 37 kDa y 33 kDa para CHIT 42, CHIT 37 y CHIT 33, respectivamente.

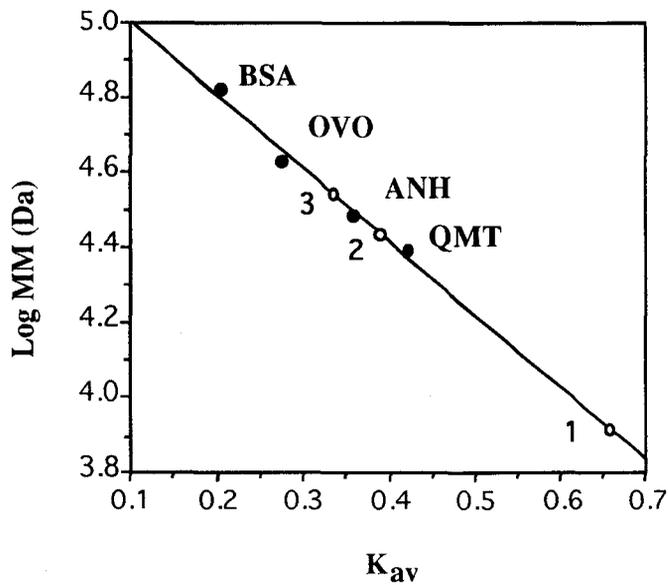


FIGURA 14. Determinación de la masa molecular de las quitinasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413 en estado nativo mediante cromatografía de filtración en gel. Las condiciones experimentales son las descritas en el apartado 3.3.5.2. BSA, seroalbúmina; OVO, ovoalbúmina; ANH, anhidrasa carbónica; QMT, quimotripsinógeno; MM, masa molecular; 1, CHIT 42; 2, CHIT 37; 3, CHIT 33.

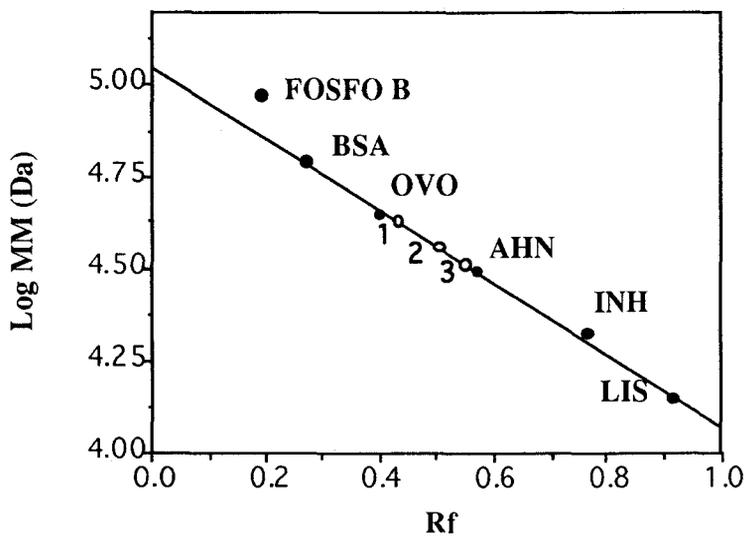


FIGURA 15. Determinación de la masa molecular de las quitinasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Las condiciones experimentales son las descritas en el apartado 3.5.1.1. FOSFO B, fosforilasa B; BSA, seroalbúmina; OVO, ovoalbúmina; ANH, anhidrasa carbónica; INH, inhibidor de tripsina; LIS, lisozima; MM, masa molecular; 1, CHIT 42; 2, CHIT 37; 3, CHIT 33.

Los valores de las masas moleculares de las quitinasas CHIT 37 y CHIT 33 obtenidos en condiciones desnaturalizantes son muy similares a los calculados por cromatografía de filtración en gel, indicando que ambas quitinasas son probablemente proteínas monoméricas. El valor tan pequeño de masa molecular (8-15 kDa) obtenido para CHIT 42, probablemente por su retención en el soporte cromatográfico, no permite determinar si esta proteína es monomérica. No obstante, en los geles de poliácridamida desnaturalizantes que contienen glicol-quitina se obtiene una banda de actividad de 42 kDa, lo que sugiere que esta proteína es monomérica o que se trata de una proteína homomultimérica con una subunidad activa de 42 kDa, aunque esto último es menos probable.

4.3.2.2. Radio de Stokes

El radio hidrodinámico (radio de Stokes) de las proteínas purificadas se determinó por cromatografía de filtración en gel siguiendo el método de Siegel y Monty (1966) descrito en el apartado 3.3.5.2. A partir de los resultados que se muestran en la figura 16 se interpolan valores de 2.6 nm y 2.3 nm para CHIT 33 y CHIT 37, respectivamente. El radio de Stokes de CHIT 42 no se pudo calcular por su retención en la columna de filtración en gel.

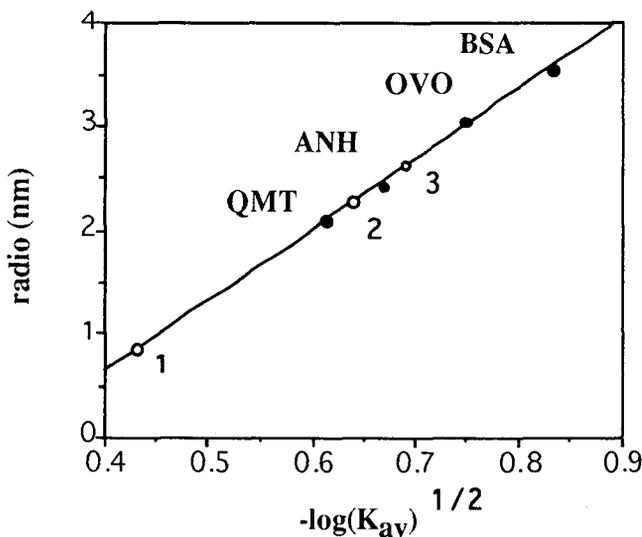


FIGURA 16. Determinación del radio de Stokes de las quitinasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413 mediante cromatografía de filtración en gel. Las condiciones experimentales son las descritas en el apartado 3.3.5.2. BSA, seroalbúmina; OVO, ovoalbúmina; ANH, anhidrasa carbónica; QMT, quimotripsinógeno; 1, CHIT 42; 2, CHIT 37; 3, CHIT 33.

4.3.2.3. Punto isoelectrico

El pI de las quitinasas purificadas se determinó mediante las técnicas de isoelectroenfoque (Robertson *et al.*, 1987) y de cromatoenfoque. Al emplear la primera de estas técnicas, los valores de pIs estimados se obtuvieron interpolando la movilidad electroforética de las quitinasas purificadas a la relación lineal que existe entre los valores de pIs de las proteínas marcadoras y los valores de Rf de las mismas. Estos valores fueron de 7.8, 4.6 y 6.2 para CHIT 33, CHIT 37 y CHIT 42, respectivamente. Los valores obtenidos por cromatoenfoque fueron muy similares a los anteriores, pI > 7.0, pI 5.0 y pI 6.5 para CHIT 33, CHIT 37 y CHIT 42, respectivamente.

4.3.2.4 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad

Las quitinasas de casi todos los organismos suelen caracterizarse por su estabilidad térmica (Cabib, 1987). La figura 17 muestra el perfil de inactivación de las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413 después de 30 min de tratamiento a las temperaturas indicadas. La temperatura media de inactivación, definida como la temperatura a la que se reduce la actividad el 50 % tras 30 min de calentamiento, fue de 55 °C para CHIT 33 y CHIT 37 y de 45 °C para CHIT 42.

Las enzimas fueron estables al menos durante un mes a la temperatura de -20 °C, o en soluciones diluídas entre 0 y 4 °C sin pérdida notable de actividad.

4.3.2.5. Carácter glucoproteico

En la literatura se ha descrito que las proteínas extracelulares de hongos están generalmente glicosiladas (Correa *et al.*, 1982). Sin embargo, los experimentos que se describen a continuación muestran que las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413 no están glicosiladas o que la glicosilación es tan reducida que no es detectable con las técnicas experimentales usadas.

Ninguna de las quitinasas purificadas se tiñó, tras la electroforesis desnaturalizante, con los procedimientos de detección de proteínas glicosiladas usadas en este trabajo como son el procedimiento descrito por Dubray y Bezard (1982), o el procedimiento del ácido peryódico-base de Schiff (Sigma). En cambio, si se obtuvieron resultados positivos usando invertasa extracelular de *S. cerevisiae* (Sigma), proteína altamente glicosilada.

Por otra parte, los tratamientos con endoglicosidasa H o α -manosidasa, enzimas que liberan respectivamente los residuos de GlcNAc o de manosa unidos a polipéptidos, y la posterior electroforesis en condiciones desnaturalizantes, indicaron que no se produjeron cambios de movilidad electroforética respecto a los controles no tratados, mientras que si se obtuvieron resultados positivos usando invertasa extracelular de *S. cerevisiae* (Sigma).

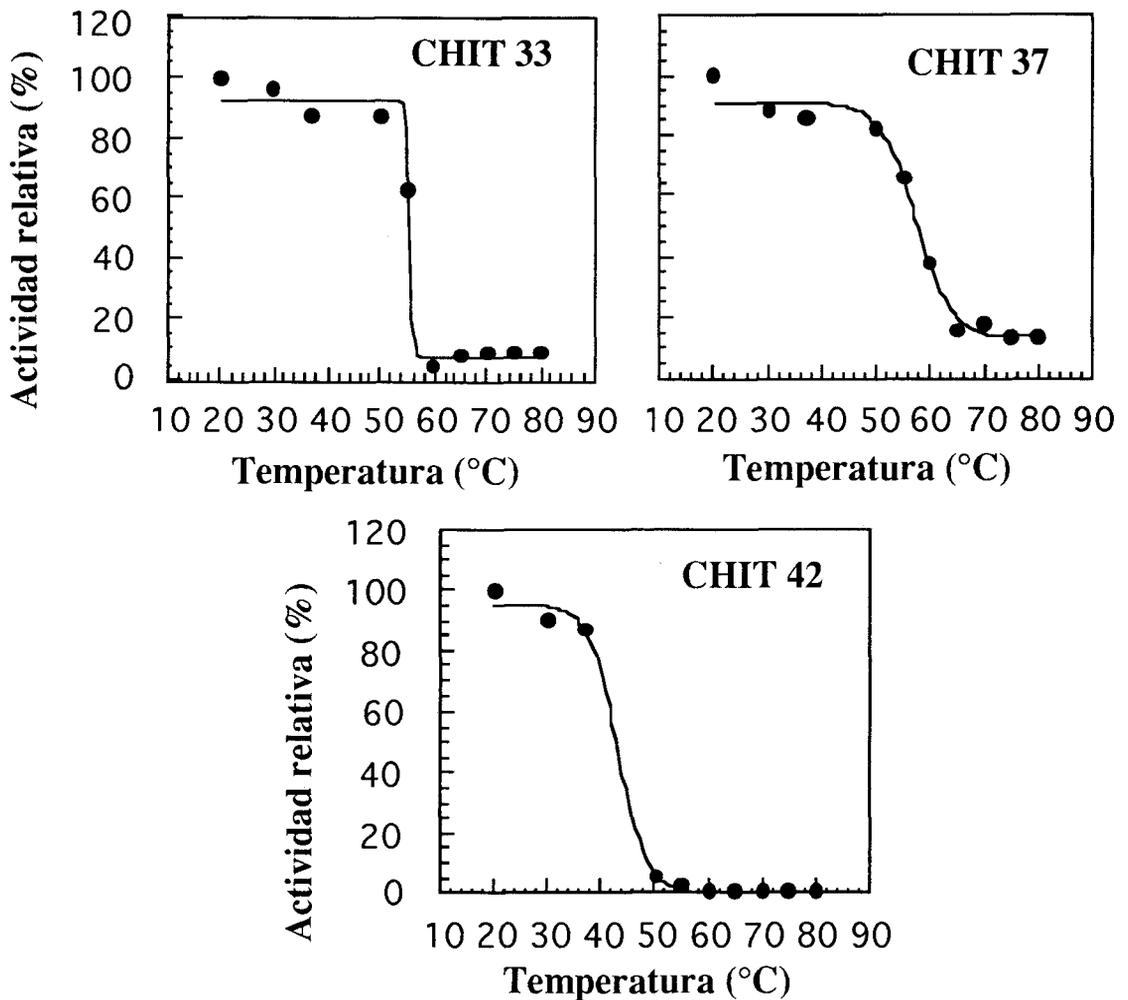


FIGURA 17. Perfil de inactivación térmica de las quitinasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado 3.6.4. Se muestra el porcentaje de actividad remanente tras 30 min de incubación a las temperaturas indicadas.

4.3.2.6. Obtención de secuencias parciales de aminoácidos

La secuenciación parcial de las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413 se realizó con un doble objetivo. Por un lado, comparar las quitinasas con las secuencias de otras quitinasas disponibles en las bases de datos y, por otro lado, disponer de secuencias que pudieran servir para obtener oligonucleótidos degenerados a fin de clonar los genes correspondientes.

En la tabla 9 se muestran las secuencias de los péptidos trípticos y las secuencias amino terminales obtenidas.

TABLA 9. Secuencias parciales de aminoácidos de las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413.

Proteína	Péptido	Secuencia
CHIT 42	amino	ANGYANSVYFTN _x GIYDR
	pep 11	(A/Q)YADD(S)(S)NDVG _x NAYG
	pep 13	ALGGLDTTQNLLSYPNSK
	pep 16	SLGLGGSMFWEASADKK
	pep 20	xQL _x AYA(A)
CHIT37	amino	Bloqueado
	pep 6	VATPAEM
	pep 13	(G/S/N)WTFADNLLTR
	pep 17	VPYNMQVPGLPAQSGAGGGYMTPALVGQA _x (D) (H)(Y)(N)
CHIT 33	amino	(S/G)NVNSKQ _N IA(V/A)(Y/D)
	pep 6	Q _N IAVYWGQ _N SANSQSTQQR
	pep 7	LLVGIPAGPGAGRR
	pep 8	(G)YV _x G _x QLT _x VFQY _x K

Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.5.1.8, 3.5.2 y 3.5.3. Los aminoácidos se nombran en nomenclatura de una letra, siendo x un aminoácido indefinido. Los aminoácidos entre paréntesis son los más probables.

El análisis de las secuencias denota, por una parte, que el péptido 6 obtenido para CHIT 33 es probablemente contiguo al extremo amino terminal obtenido para la misma proteína. Por otra parte, la comparación de las secuencias obtenidas para las distintas quitinasas con las secuencias contenidas en los bancos de datos del Laboratorio Europeo de

Biología Molecular (EMBL) y la de la Universidad de Basilea (Swiss-Prot), muestra que no existen homologías significativas de las secuencias obtenidas con las quitinasas presentes en estos bancos, con las siguientes excepciones: el péptido 16 de CHIT 42 (figura 18A) muestra homologías con regiones centrales de las secuencias de ciertas quitinasas bacterianas; el péptido 6 de CHIT 33 (figura 18B) muestra homologías con determinadas regiones de las secuencias de la quitinasa de *S. cerevisiae*, las acídicas de *Arabidopsis thaliana* y *Cucumis sativus* y con la lectina hevamina A de *Hevea brasiliensis*, que contiene actividad quitinasa. Además, los péptidos obtenidos para CHIT 42 muestran una alta homología con la secuencia de quitinasa descrita para el hongo filamentoso *Aphanocladium album* (figura 19).

A

Chit 42 (pep 16)	SLGLGGSMFWEASADKK
	: :: :
<i>S. marcescens</i> Chi B	430 YIKQQQLGGVMFWHLGQDNRNGDLLA 455
Chit 42 (pep 16)	SLGLGGSMFWEASADKK
	: :
<i>S. plicatus</i> Chi 63	635 MDWAEQQGLGGAFFWFEFSGDTTNGEL 660
Chit 42 (pep 16)	SLGLGGSMFWEASADKK
	: : :
<i>B. circulans</i> Chi A1	500 AYIKSKGLGGAMFWELSGDRNKTLQN 525

B

Chit 33 (pep 6)	QNIAVYWGQNSANSQSTQQR
	: : :
<i>S. cerevisiae</i>	175 NTNIAVYWGQNSAGTQESLAT 195
Chit 33 (pep 6)	QNIAVYWGQNSANSQSTQQR
	: : : :
<i>A. thaliana</i>	410 ASRGGIAIYWGQNGNEGNSATCATG 435
Chit 33 (pep 6)	QNIAVYWGQNSANSQSTQQR
	: : : :
<i>C. sativus</i>	30 DAAGIAIYWGQNGNEGSLASTCATGN 55
Chit 33 (pep 6)	QNIAVYWGQNSANSQSTQQR
	: : : :
<i>H. brasiliensis</i>	1 GGIAIYWGQNGNEGLTQTQC 20

FIGURA 18. Alineamiento en los bancos de secuencias de las secuencias de los péptidos 16 de CHIT 42 (A) y 6 de CHIT 33 (B). Comparación de las secuencias de los péptidos anteriores con las quitinasas de los siguientes organismos: *Serratia marcescens* Chi B, *S. marcescens* Chi B (Harpster y Dunsmuir, 1989); *Streptomyces plicatus* Chi 63, *S. plicatus* Chi 63 (Robbins *et al.*, 1992); *Bacillus circulans* Chi A1, *B. circulans* Chi A1 (Watanabe *et al.*, 1990); *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae* (Kuranda y Robbins, 1991); *Arabidopsis thaliana*, *A. thaliana* (Samac *et al.*, 1990); *Cucumis sativus*, *C. sativus* (Metraux *et al.*, 1989); *Hevea brasiliensis*, *H. brasiliensis* (Jekel *et al.*, 1991). La búsqueda de homologías se llevó a cabo con la aplicación FastA y los alineamientos con la aplicación Bestfit (apartado 3.8.2). Las identidades se indican con una línea y los cambios conservativos con dos puntos.

```

GSGFANAVYFTNWGIYGRNFQPADLPASEITHVLYSFMNWRADGTIFSGD 50
.:|:|.|.||||| |||:|
ANGYANSVYFTNxGIYDR (amino)

TYADYEKHYAGDSWNDVGTNAYGCVKQLYLLKKQNRNMKVMLSIGGWTS 100
||:|.|.||||| ||||
YADDSSNDVGxNAYG (pep 11)

TNFPAAASSAATRKTFAQSAVGFMDWGFDDGIDIDWEYPADATQAQNMVL 150

LLQAVRSELD SYAAQYAKGHHFLLSIAAPAGPDNYNKLFKFAELGKVL DYI 200

NLMAYDYAGSWSNYTGHDANIYANPQNPATPYNTDDAVQAYINGGVPAN 250

KIVLGMPYIGRSFQQTEGIGKPYNGIGSGSWENGIWDYKALPKAGATVKC 300

DDTAKGCYSYDPSTKELISFDTPAMISTKVSWLKGKGLGGS MFWEASADK 350
: |||||
SLGLGGS MFWEASADK

KGS D S L I S T S H G L G S Q D S T Q N Y L D Y P N S K Y D N I K K G M N 389
| :||:|.|||||.|||||
K (pep 16) ALGGLDTTQNLLSY PNSK (pep 13)

```

FIGURA 19. Alineamiento de los péptidos obtenidos de CHIT 42 con la secuencia de aminoácidos de la quitinasa Chi 1 de *A. album*. Secuencia de *A. album* tomada de Blaiseau y Lafay (1992). La búsqueda de homologías se llevó a cabo con la aplicación FastA y los alineamientos con las aplicaciones Bestfit y Pileup (apartado 3.8.2). Las identidades se indican con una línea y los cambios conservativos con uno o dos puntos.

4.3.2.7. Reacción antigénica de las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413

Utilizando los antisueros monoespecíficos anti-quitinasa obtenidos en ratón contra las quitinasas CHIT 42 y CHIT 37, se procedió a comprobar la existencia de inmunoreacción de las quitinasas entre si. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20. Los antisueros reconocen específicamente a las proteínas que sirvieron para generarlos. Además, se observa que no existe reacción cruzada del antisuero anti-CHIT 42 con CHIT 37 ni con CHIT 33, ni del antisuero anti-CHIT 37 con CHIT 42 ni con CHIT 33. Así pues, de los resultados se deduce que, al menos CHIT 42 y CHIT 37 son muy distintas desde el punto de vista inmunológico y por tanto, que las tres quitinasas son proteínas probablemente codificadas por genes diferentes.

Cuando se empleó suero preinmune o cuando se utilizaron antisueros de conejo contra la quitinasa básica de judía (Boller *et al.*, 1983), cedidos por el Dr. T. Boller, del *Botanisches Institut* de la Universidad de Basilea (Suiza) no existió inmunoreacción.

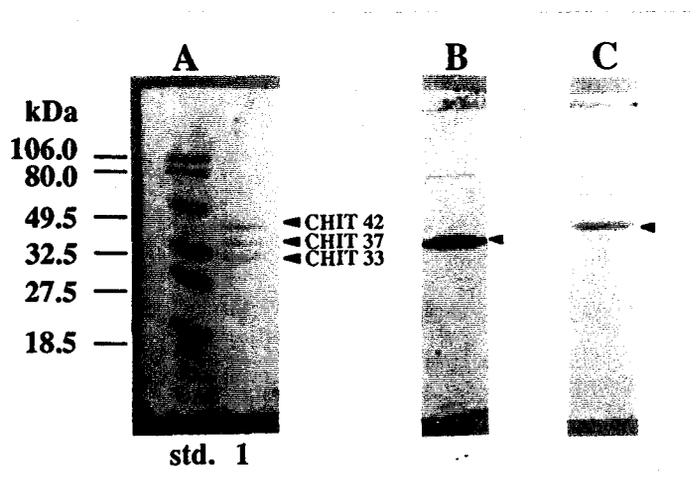


FIGURA 20. Análisis antigénico de las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413. Las condiciones experimentales se describen en el apartado 3.5.1.7. (A) calle std., marcadores de masa molecular; calle 1, digestión de quitina (20 µg); (B) digestión de quitina (20 µg) revelada con anti-CHIT 37 y el procedimiento de fosfatasa alcalina; (C) digestión de quitina (20 µg) revelada con anti-CHIT 42 y el procedimiento de fosfatasa alcalina.

4.3.3 Propiedades catalíticas

4.3.3.1. Temperatura óptima

Se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las quitinasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413, usando las condiciones experimentales descritas en el apartado 3.6.3. Las temperaturas óptimas de ensayo fueron de 45-50 °C para CHIT 33 y CHIT 37 y de 40-45 °C para CHIT 42. Dado que a 37 °C las enzimas presentan un buen grado de actividad (aproximadamente el 75 % de la óptima), por razones prácticas, en los ensayos posteriores se ha utilizado rutinariamente esta temperatura.

4.3.3.2. Especificidad para los sustratos

Con objeto de establecer la especificidad de las quitinasas purificadas por distintos sustratos, se estudió la capacidad de estas enzimas de hidrolizar diferentes carbohidratos con enlaces β -glucosídicos. La tabla 10 muestra los resultados obtenidos. Los resultados indican que CHIT 33 es activa frente a quitina coloidal y glicol-quitina, mientras que CHIT 42 y CHIT 37 son activas frente a quitina coloidal, glicol-quitina, Np-(GlcNAc)₂ y, en menor medida, sobre glicol-quitosan. Ninguna de las tres enzimas muestra actividad lisozima sobre células de *M. lysodeikticus*, ni actividad quitobiosa sobre Np-GlcNAc o actividad β -N-acetil hexosaminidasa (EC 3.2.1.52) sobre Np-GalNAc. Igualmente, tanto CHIT 42 como CHIT 37 son capaces de hidrolizar el sustrato MeUmb-(GlcNAc)₂.

En conjunto, los resultados obtenidos indican alta especificidad de las tres enzimas sobre polímeros que contienen GlcNAc de grado de polimerización igual o superior a tres.

4.3.3.3. Constantes de Michaelis-Menten

Con objeto de estudiar la afinidad de las quitinasas por distintos sustratos y, aún cuando las enzimas que actúan sobre polisacáridos no muestran cinéticas típicas de Michaelis-Menten, se realizaron ensayos seriados variando la concentración de cada sustrato. Los sustratos empleados fueron quitina coloidal y Np-(GlcNAc)₂. Tras realizar representaciones de dobles inversos (Lineweaver-Burk) se interpretaron los resultados obtenidos y se calcularon las constantes respectivas (tabla 11).

TABLA 10. Especificidad de las quitinasas para los distintos sustratos.

Sustratos	CHIT33 (U/mg)	CHIT37 (U/mg)	CHIT42 (U/mg)
Laminarina	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Pustulan	< 0.001	< 0.001	< 0.001
CMC	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Quitina coloidal	1.44	2.47	4.62
Glicol-quitosan	< 0.001	0.08	0.07
Glicol-quitina	0.22	0.80	0.78
Np-(GlcNAc) ₂	0.002	4.082	0.206
Np-(GlcNAc)	< 0.0003	< 0.0002	< 0.0003
Np-(GalNAc)	< 0.0003	< 0.0002	< 0.0003
Células de <i>M.lysodeikticus</i>	ND(a)	ND	ND

(a) ND. No detectado. Las condiciones experimentales son las descritas en el apartado 3.6.2.

TABLA 11. Constantes cinéticas (K_m) de las quitinasas purificadas.

Quitinasa	K_m quit. coloidal (mg/ml)	K_m Np-(GlcNAc) ₂ (mM)
CHIT 42	1.0	0.85
CHIT 37	0.5	0.70
CHIT 33	0.3	ND(a)

(a) No determinado. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado 3.6.1.

4.3.3.4. Productos de reacción y mecanismos de acción

Con objeto de determinar si el mecanismo de acción de las quitinasas purificadas es de tipo exo o endohidrolítico, se han estudiado sus productos de reacción mediante HPLC. Para ello, se usaron como sustratos quitina coloidal u oligosacáridos de quitina de grados de

polimerización igual o inferior a cuatro. La figura 21 muestra el análisis de los productos solubles formados por las quitinasas purificadas tras la incubación durante distintos periodos de tiempo con quitina coloidal. Como se aprecia en la figura, la acción enzimática de CHIT 42 y CHIT 37 generó los productos finales (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₂ y GlcNAc, siendo el mayoritario (GlcNAc)₂. En presencia de los sacáridos anteriores, el producto mayoritario resultante de la acción de CHIT 33 fue (GlcNAc)₄.

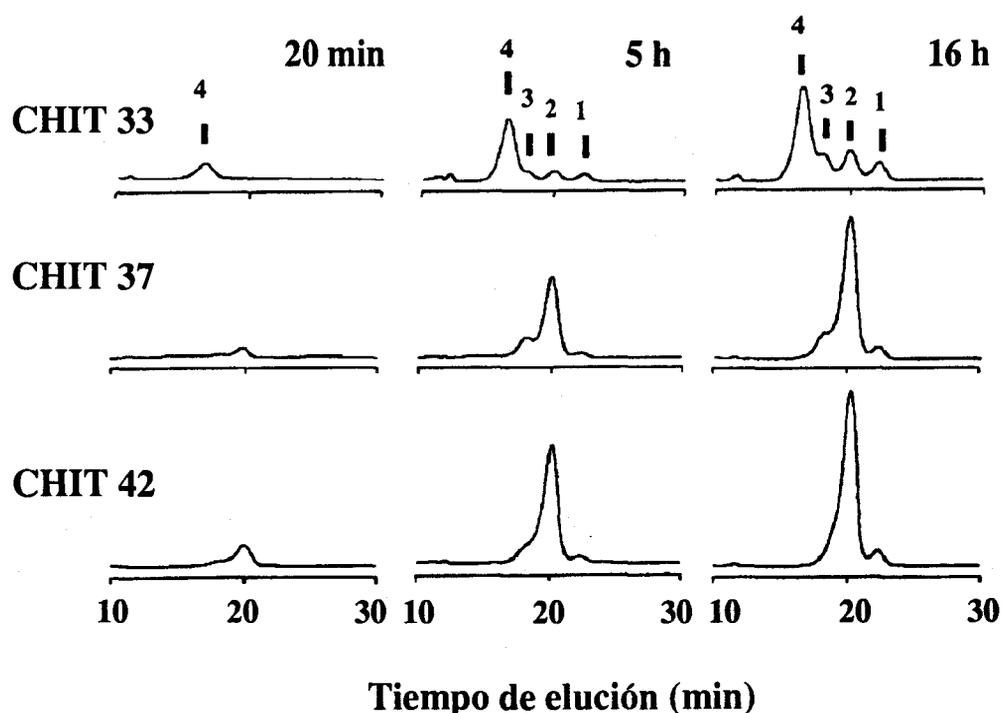


FIGURA 21. Análisis de los productos de reacción de las quitinasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413 mediante HPLC. Las condiciones experimentales son las descritas en el apartado 3.6.5. Se indican el grado de polimerización de los productos de reacción (1, 2, 3 y 4), el tiempo de incubación enzimática previo a cada análisis y la quitinasa utilizada en cada caso.

Cuando se empleó (GlcNAc)₄ como sustrato, las quitinasas CHIT 42 y CHIT 37 produjeron predominantemente (GlcNAc)₂ y pequeñas cantidades de (GlcNAc)₃ y de GlcNAc. Ambas enzimas degradan el oligosacárido (GlcNAc)₃ generando (GlcNAc)₂ y GlcNAc. La quitinasa CHIT 33 no hidroliza ninguno de los dos sustratos anteriores, (GlcNAc)₄ y (GlcNAc)₃; además, ninguna de las enzimas hidroliza (GlcNAc)₂.

Todos estos resultados confirman el carácter endohidrolítico que poseen las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413 en la hidrólisis de los polímeros de GlcNAc y el diferente mecanismo de acción que posee CHIT 33 frente a los de CHIT 42 o CHIT 37.

4.3.4. Propiedades líticas

En la acción micoparásita de *Trichoderma* se ha sugerido un papel esencial para las quitinasas (Elad *et al.*, 1982). En una primera aproximación, para comprobar este fenómeno, se estudió la capacidad de las quitinasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413 de degradar paredes celulares del hongo fitopatógeno *B. cinerea* CECT 2100. Los ensayos se realizaron en cajas de Petri que contenían una suspensión de paredes del fitopatógeno, como se indica en el apartado 3.2.7. La figura 22 muestra los resultados obtenidos. Sólo la quitinasa CHIT 42 es capaz por si sola de degradar paredes celulares, potenciándose su acción cuando se combina con las otras dos quitinasas. Este resultado sugiere una interesante acción sinérgica de las quitinasas durante la acción lítica.

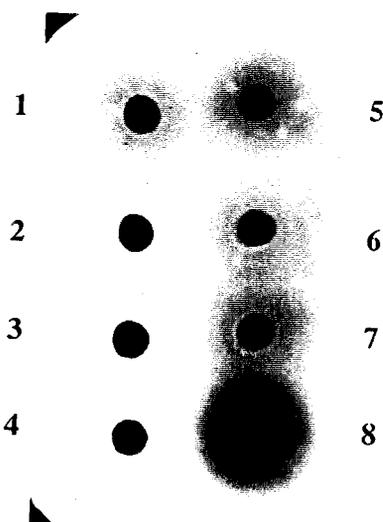


FIGURA 22. Actividad lítica sobre paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100 asociada a las quitinasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413. Las condiciones experimentales se describen en el apartado 3.2.7. Calle 1, CHIT 42 (10 µg); calle 2, CHIT 37 (10 µg); calle 3, CHIT 33 (10 µg); calle 4, combinación de CHIT 37 y CHIT 33 (10 µg de cada una); calle 5, combinación de las tres quitinasas (10 µg de cada una); calle 6, combinación de CHIT 42 y CHIT 37 (10 µg de cada una); calle 7, combinación de CHIT 42 y CHIT 33 (10 µg de cada una); calle 8, precipitado de sulfato amónico de un cultivo en quitina (10 µg).

4.3.5. Resumen de propiedades

Las propiedades expuestas anteriormente se exponen en la tabla 12.

TABLA 12. Resumen de las propiedades de las quitinasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413.

PARAMETRO	CHIT 42 (valor)	CHIT 37 (valor)	CHIT 33 (valor)
Masa molecular (SDS)	42 kDa	37 kDa	33 kDa
Masa molecular (S-200 HR)	8-15 kDa	30 kDa	32 kDa
Radio de Stokes	ND (a)	2.3 nm	2.6 nm
pI (isoelectroenfoque)	6.2	4.6	7.8
pI (cromatoenfoque)	6.5	5.0	>7.0
Temperatura de inactivación	45 °C	55 °C	55 °C
Glicosilación	No	No	No
Temperatura óptima	40-45 °C	45-50 °C	45-50 °C
Km (quitina)	1.0 mg/ml	0.5 mg/ml	0.3 mg/ml
Km [Np-(GlcNAc) ₂]	0.85 mM	0.70 mM	ND
Modo de acción	Endo	Endo	Endo
Halos de lisis en paredes	Sí	No	No

(a) ND. No determinado.

4.4. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS β -1,6-GLUCANASAS y DE UNA β -1,3-GLUCANASA DE *T. harzianum* CECT 2413

4.4.1. Purificación de las β -1,6-glucanasas y criterios de homogeneidad. Purificación de una β -1,3-glucanasa

El método de purificación de estas enzimas de *T. harzianum* CECT 2413 está basado en la utilización de dos técnicas fundamentales la afinidad al sustrato, pustulan, y la técnica de cromatoenfoco. El proceso, como se verá a continuación, es bastante similar al usado para la purificación de las quitinasas del mismo microorganismo.

La purificación comenzó con la obtención de una preparación concentrada, resultado de la precipitación con sulfato amónico del sobrenadante de cultivo como se describe en el apartado 4.3.1. Alícuotas de 3 ml de esta preparación se adsorbieron a 0.6 ml de pustulan particulado durante 20 min a 4 °C y con agitación magnética continua, tras lo cual se centrifugaron a 12000 x g. Los sobrenadantes (fracción no adsorbida a pustulan) se volvieron a adsorber a alícuotas de 0.6 ml de pustulan, repitiéndose el proceso completo dos veces. A continuación, todos los precipitados se lavaron tres veces con 3 ml de tampón fosfato potásico 70 mM, pH 6.0 que contenía 1 M de NaCl y se resuspendieron cada uno en 200 μ l de tampón acetato potásico 50 mM, pH 5.5 que contenía 1 mM de PMSF y 1 mM de NaN₃. Las suspensiones obtenidas se incubaron al menos 16 h a 37 °C para que se llevase a cabo la hidrólisis del pustulan. Las soluciones clarificadas obtenidas, resultado de la acción enzimática de las β -1,6-glucanasas adsorbidas, se centrifugaron a 12000 x g durante 10 min y el sobrenadante final se dializó tres veces frente a 2 l de tampón imidazol/HCl 25 mM, pH 7.4.

La solución dializada se aplicó a una columna de cromatoenfoco (1 x 20 cm) equilibrada con tampón imidazol/HCl 25 mM, pH 7.4 y las muestras se eluyeron con un gradiente de pH de 7.4 a 4.0, dado por una solución de Polybuffer/HCl, pH 4.0 diluída ocho veces con agua destilada. El resultado de la elución se muestra en la figura 23. Las fracciones con alta actividad β -1,6-glucanasa se mezclaron, se concentraron en aparatos Centricon PM-10 (Amicon) y se analizaron por electroforesis analítica en condiciones desnaturalizantes. La figura 24 muestra dos bandas de proteína con masas moleculares de 66 kDa y 51 kDa, en el pico más básico y una única banda de 43 kDa en el pico más ácido.

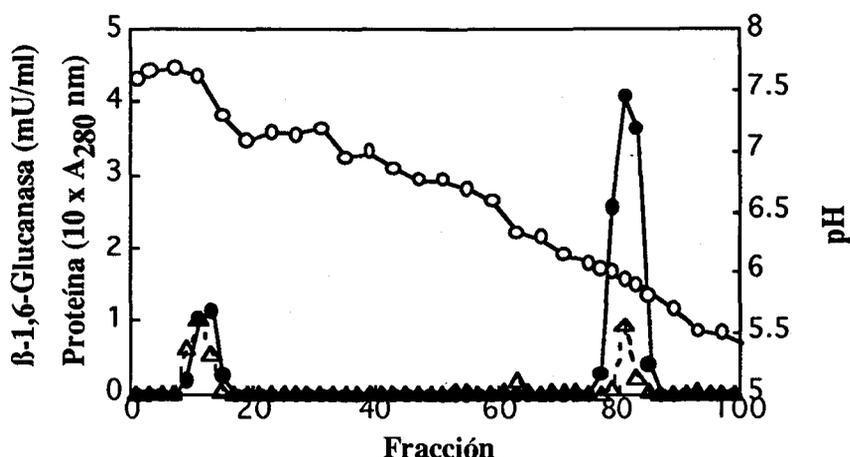


FIGURA 23. Perfil de elución en una columna de cromatoenfoco de las β -1,6-glucanasas de *T. harzianum* CECT 2413. Se aplicó una preparación procedente de una digestión de pustulan que contenía 18.3 U de actividad β -1,6-glucanasa. Actividad β -1,6-glucanasa (●), proteína (Δ), pH (○). Las condiciones de cromatografía se detallan en el apartado 3.3.5.1.

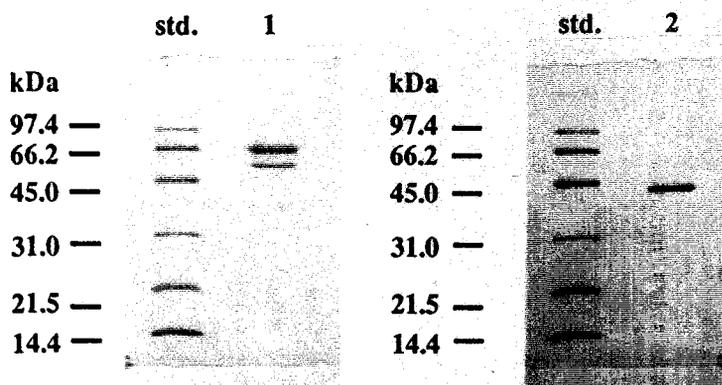


FIGURA 24. Electroforesis analítica de los picos de actividad β -1,6-glucanasa obtenidos mediante cromatoenfoco. Las condiciones de electroforesis son las descritas en el apartado 3.5.1.1. Calle std., marcadores de masa molecular; calle 1, pico I del cromatoenfoco anterior (10 μ g); calle 2, pico II del cromatoenfoco anterior (10 μ g).

Finalmente, las fracciones concentradas del segundo pico se purificaron mediante cromatografía de filtración en gel en una columna de Sephacryl S-200 HR (1.6 x 40 cm) equilibrada con tampón acetato potásico 100 mM, pH 5.5 que contenía 100 mM de KCl. Las fracciones más activas se concentraron y se lavaron con 50 mM de tampón acetato potásico 50 mM, pH 5.5 usando aparatos Centricon PM-10 (Amicon) hasta un volumen final aproximado de 0.5 ml y finalmente se conservaron a 4 °C ó -20 °C, condiciones en las que no se pierde actividad de forma significativa, al menos durante un mes. Tras el análisis de la preparación final por electroforesis analítica en condiciones desnaturalizantes y por tinción de actividad (apartado 3.5.1.6), se observó en ambos casos una banda homogénea de 43 kDa (figura 25). El segundo criterio de homogeneidad empleado fue la constancia de la actividad específica en las fracciones activas de la filtración en gel. Esta preparación, denominada β -1,6-II, se utilizó para los estudios que se describen más adelante.

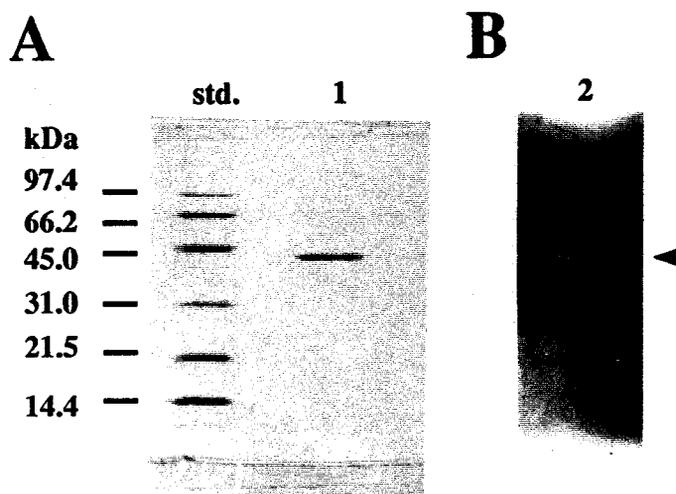


FIGURA 25. Análisis mediante electroforesis analítica (A) y réplica de actividad (B) de la β -1,6-glucanasa (β -1,6-II) purificada de *T. harzianum* CECT 2413. Las condiciones de electroforesis y de actividad se describen en los apartados 3.5.1.1 y 3.5.1.6, respectivamente. Calle std., marcadores de masa molecular; calle 1, β -1,6-II (5 μ g); calle 2, actividad correspondiente a β -1,6-II (5 μ g).

Las fracciones concentradas del primer pico se purificaron igualmente mediante filtración en gel en una columna de Sephacryl S-200 HR (1.6 x 40 cm) equilibrada con tampón acetato potásico 100 mM, pH 5.5 que contenía esta vez 1 M de KCl. La elución de esta columna (figura 26) rinde dos picos mayoritarios de proteína (A₂₈₀ nm) que se corresponden con una β -1,6-glucanasa y con una β -1,3-glucanasa, respectivamente. Al igual que en el caso anterior, las fracciones más activas para cada actividad se concentraron y se lavaron con 50 mM de tampón acetato potásico 50 mM, pH 5.5 en aparatos Centricon PM-10 hasta volúmenes aproximados de 0.5 ml. El análisis por electroforesis en condiciones desnaturalizante de estas preparaciones muestra bandas altamente purificadas de proteína y de actividad de 51 kDa para la β -1,6-glucanasa (figura 27) y de 66 kDa para la β -1,3-glucanasa (figura 28). Estas preparaciones, denominadas β -1,3-I y β -1,6-I, se usaron para los estudios que se describen posteriormente.

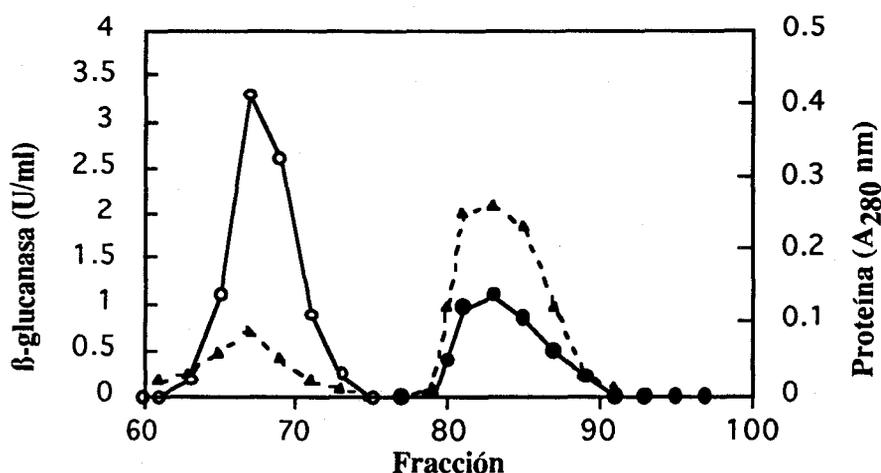


FIGURA 26. Perfil de elución en una columna de filtración en gel de la β -1,6-glucanasa (β -1,6-I) y de la β -1,3-glucanasa (β -1,3-I) de *T. harzianum* CECT 2413. Se aplicó una preparación procedente de un cromatofoco que contenía 11.6 U de actividad β -1,6-glucanasa y 10 U de actividad β -1,3-glucanasa. Actividad β -1,6-glucanasa (O), actividad β -1,3-glucanasa (●), proteína (Δ). Las condiciones de cromatografía se detallan en el apartado 3.3.5.2.

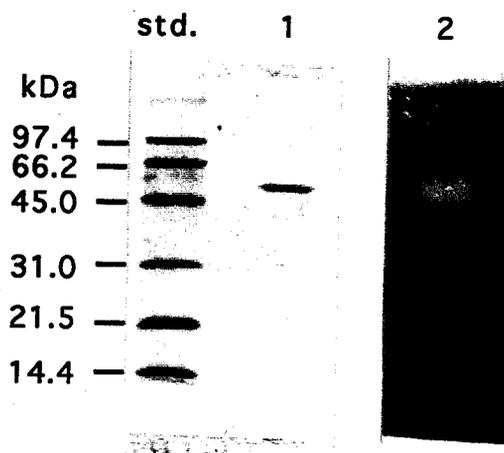


FIGURA 27. Análisis mediante electroforesis analítica y réplica de actividad de la β -1,6-glucanasa (β -1,6-I) purificada de *T. harzianum* CECT 2413. Las condiciones de electroforesis son las descritas en el apartado 3.5.1.1. Calle std., marcadores de masa molecular; calle 1, β -1,6-I (5 μ g); calle 2, actividad correspondiente a β -1,6-I (5 μ g).

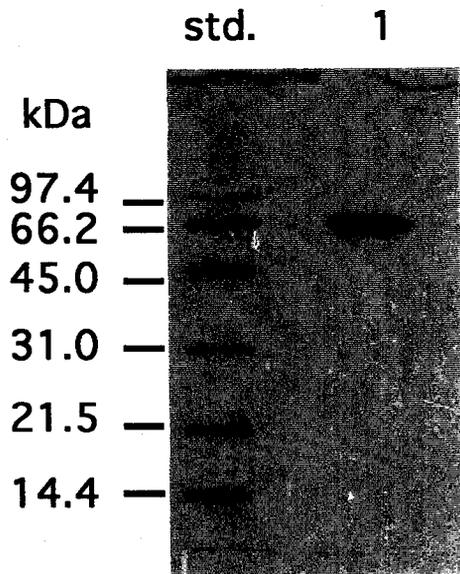


FIGURA 28. Análisis de la β -1,3-glucanasa (β -1,3-I) purificada de *T. harzianum* CECT 2413 mediante electroforesis analítica. Las condiciones de electroforesis son las descritas en el apartado 3.5.1.1. Calle std., marcadores de masa molecular, calle 1, β -1,3-I (5 μ g).

Las tablas 13 y 14 resumen los resultados de una purificación típica de β -1,6-glucanasas y de β -1,3-glucanasa.

TABLA 13. Purificación de las β -1,6-glucanasas de *T. harzianum* CECT 2413.

Paso de purificación	Vol. (ml)	Prot. (mg)	Act. (U)	Act.esp. (U/mg)	Rend. (%)	Purif. (veces)
80% (NH ₄) ₂ SO ₄	16.0	64.0	62.2	0.97	100	1
Digestión pustulan	9.0	5.1	18.3	3.58	30	4
Cromatoenfoque:						
β -1,6-I	0.32	0.08	6.0	75.0	14	77
β -1,6-II	0.45	0.16	11.6	72.5	18	75
Sephacryl S-200 HR:						
β -1,6-I	0.35	0.05	2.1	157.7	3	162
β -1,6-II	0.42	0.10	7.7	77.0	12	80

TABLA 14. Purificación de una β -1,3-glucanasa de *T. harzianum* CECT 2413.

Paso de purificación	Vol. (ml)	Prot. (mg)	Act. (U)	Act.esp. (U/mg)	Rend. (%)	Purif. (veces)
80% (NH ₄) ₂ SO ₄	18.0	121	428	3.5	100	1
Digestión pustulan	9.0	4.5	29	6.4	7	2
Cromatoenfoque:						
β -1,3-I	0.4	0.6	10	16.6	2.3	5
Sephacryl S-200 HR:						
β -1,3-I	0.4	0.05	2	40.0	0.5	12

4.4.2. Propiedades moleculares

4.4.2.1. Masa molecular

Las masas moleculares de las dos β -1,6-glucanasas se estimaron tanto por electroforesis analítica en condiciones desnaturizantes como por cromatografía en filtración en gel. Mediante la primera técnica, se obtuvieron los valores ya mencionados de 51 kDa para la β -1,6-I y de 43 kDa para la β -1,6-II. Cuando se calcularon las masas moleculares nativas por la técnica de filtración en gel en una columna de Sephacryl S-200 HR (1.6 x 40 cm) calibrada con las proteínas marcadoras indicadas en el apartado 3.3.5.2, se obtuvieron valores semejantes de 20-25 kDa para ambas β -1,6-glucanasas, probablemente consecuencia de una retención de ambas enzimas por la matriz de Sephacryl. El incremento en la concentración de KCl en el tampón de elución desde 100 mM a 1 M no produjo cambios en el valor de la masa molecular calculado por este método.

Aún cuando los datos de masa molecular estimados por filtración en gel no se corresponden con las masas nativas reales, es muy probable que las dos β -1,6-glucanasas sean proteínas monoméricas. Esta sugerencia se basa, por una parte, en el carácter extracelular de las mismas y por otra, al hecho de que las bandas de actividad β -1,6-glucanasa, detectadas en las réplicas con el sustrato, se corresponden con masa moleculares idénticas a las calculadas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (figuras 25B y 27). Menos probable es que estas proteínas fuesen homomultiméricas con un número desconocido de subunidades activas.

Para la β -1,3-glucanasa se obtuvieron masas moleculares aparentes, calculadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y por filtración en gel, de 66 kDa y de 5-10 kDa, respectivamente. Al igual que en el caso anterior, la filtración en gel produjo una retención de la proteína, probablemente por interacción con la matriz que constituye el gel de Sephacryl. En este caso, todos los intentos por determinar actividad en réplicas de agarosa con laminarina de los geles de poliacrilamida fueron infructuosos. Por tanto, no existen datos experimentales que apoyen el carácter monomérico de esta proteína.

4.4.2.2. Punto isoelectrónico

Para estimar los puntos isoelectrónicos de las dos β -1,6-glucanasas y de la β -1,3-glucanasa se han empleado las técnicas de isoelectroenfoque y de cromatoenfoque.

Mediante isoelectroenfoque se calcularon pIs de 7.4 para la β -1,6-I, 5.8 para la β -1,6-II y 7.7 para la β -1,3-I. Mediante cromatoenfoque ácido (intervalo de pH entre 7.4 y 4.0) se calculó un pI de 5.8 para la β -1,6-II y mediante cromatoenfoque básico (intervalo de pH entre 9.4 y 6.0) se calcularon pIs de 7.7 para la β -1,6-I y de 8.0 para la β -1,3-I. Por tanto, las enzimas β -1,6-I y β -1,3-I son proteínas básicas, mientras que la β -1,6-II es ácida.

4.4.2.3. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad

Con objeto de conocer la estabilidad de estas enzimas frente a la temperatura, se determinaron las actividades enzimáticas tras 30 min a diferentes temperaturas entre 20 y 80 °C. La temperatura media de inactivación, calculada como aquella a la que tras el tratamiento las actividades se reducen al 50 %, fue de 50 °C para la β -1,6-I y para la β -1,6-II y de 55 °C para la β -1,3-I.

Las enzimas fueron estables a la temperatura de -20 °C, o en soluciones diluidas entre 0 y 4 °C sin pérdida significativa de actividad, al menos durante un mes.

4.4.2.4. Carácter glucoproteico

Como se indicó anteriormente, la presencia de carbohidratos asociados a las proteínas es una característica común para la mayoría de las proteínas extracelulares de hongos. La glicosilación determina en numerosos casos, cambios en las propiedades físicas (masa molecular, estabilidad a la temperatura, pI, etc.) o en las propiedades cinéticas (K_m , especificidad de sustrato, etc.), por lo que proteínas consideradas como isoenzimas diferentes pueden poseer la misma estructura primaria de aminoácidos. Este fenómeno se observa por ejemplo en dos β -1,3-glucanasas de *S. cerevisiae* (Vázquez de Aldana *et al.*, 1991).

Para determinar la naturaleza glucoproteica de las β -glucanasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413, se realizaron experimentos análogos a los descritos para las quitinasas en el apartado 4.3.2.5. No se obtuvo ninguna evidencia de contenido de carbohidratos para las β -1,6-glucanasas ni para la β -1,3-glucanasa tras tinciones específicas de carbohidratos en geles de poliacrilamida (técnicas de ácido peryódico-base de Schiff de Sigma o de plata descrita por Dubray y Bezard, 1982). Tampoco se obtuvieron cambios de movilidad electroforética en geles de poliacrilamida tras tratamientos con enzimas

desglicosilantes (endoglicosilasa-H o α -manosidasa). Como control positivo se llevaron a cabo los mismos experimentos con la invertasa extracelular de *S. cerevisiae* (Sigma).

4.4.2.5. Obtención de secuencias parciales de aminoácidos

En la tabla 15 se muestran las secuencias de aminoácidos determinadas para dos de las proteínas purificadas, a saber, β -1,6-II y β -1,3-I.

TABLA 15. Secuencias parciales de aminoácidos de las β -glucanasas de *T. harzianum* CECT 2413.

Proteína	Péptido	Secuencia
β -1,6-II	amino	FEPALAS(G/E)KTIKR(G/E)V
	pep 5	(G/F)QN(H)YR
	pep 12	(F/G)GPALA(S)GFTF
	pep 18	xLxWMTNR
	pep 19	(I/G)ETNPAYSTVGMIGVLN(G)PV
β -1,3-I	amino	ATSFRRP(P/N)(N/M)(M/D)(D/H)(H/V)(V)
	pep 5	NPTYGDVTSSNTRPSALAPG
	pep 12	LGxGTFINTQNGYTGGxTPGGGDVxP
	pep 13	FNTDTILMGDPTN
	pep 14	xVGEA(M)ATITGNGNFFK

Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.5.1.8, 3.5.2. y 3.5.3. Los aminoácidos se nombran en nomenclatura de una letra, siendo x aminoácido indefinido. Los aminoácidos entre paréntesis son los más probables.

Hay que destacar que, las secuencias obtenidas para la β -1,6-II son las primeras secuencias descritas para proteínas con actividad β -1,6-glucanasa específica. Cuando las secuencias se compararon con las disponibles en las bases de datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) o de la Universidad de Basilea (Swiss-Prot) no se encontraron homologías significativas con otras β -glucanasas, ni con otras proteínas que degradan polisacáridos.

4.4.2.6. Reacción antigénica de las β -glucanasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413

Para definir la relación inmunológica entre las β -glucanasas de *T. harzianum* CECT 2413, se ensayaron suero preinmune y suero que contenía antisuero anti- β -1,6-II frente a un sobrenadante precipitado con sulfato amónico obtenido en condiciones de inducción con quitina, frente a Novozym™ 234, frente a preparaciones de cromatoenfoque que contenían las proteínas β -1,6-I y β -1,3-I y frente a preparaciones purificadas de β -1,6-II. El suero preinmune no dió inmunoreacción. Sin embargo, como se aprecia en la figura 29, al usar suero anti- β -1,6-II, se produjo inmunoreacción con una banda de una masa molecular de 43 kDa que se correspondía con la β -1,6-II purificada. La ausencia de inmunoreacción cruzada con la β -1,6-I indica la inexistencia de epítomos comunes entre ambas β -1,6-glucanasas. Tampoco hubo inmunoreacción cruzada con el resto de β -glucanasas, incluyendo las tres β -1,3-glucanasas detectadas en cultivos inducidos con quitina (apartado 4.2) y las celulasas presentes al menos en el preparado comercial Novozym™ 234.

Con objeto de observar similitudes entre las β -glucanasas de *T. harzianum* CECT 2413 con las β -glucanasas de plantas, se hicieron reaccionar precipitados de sulfato amónico obtenidos de cultivos inducidos en quitina y preparaciones purificadas de β -1,3-I con antisueros contra una β -1,3-glucanasa ácida y con antisueros contra una β -1,3-glucanasa básica de tabaco (Kauffmann *et al.*, 1987) cedidos por el profesor Dr. B. Fritig (C.N.R.S., Francia). No se encontró ninguna inmunoreacción con estos antisueros lo que pone de manifiesto las diferencias antigénicas entre ambos grupos de β -glucanasas.

4.4.3. Propiedades catalíticas

4.4.3.1. Temperatura óptima

Las temperaturas óptimas de las tres enzimas purificadas se determinaron mediante los ensayos usuales descritos en los apartados 3.2.3 y 3.2.4, a pH 5.5 y variando las temperaturas desde 20 a 80 °C. Las temperaturas óptimas obtenidas fueron de 50 °C para la β -1,6-I y para la β -1,6-II y de 40 °C para la β -1,3-I.

Dado que a 37 °C las enzimas presentan un buen grado de actividad (entre un 85 y un 90 % de las máximas) se ha utilizado rutinariamente esta temperatura en los ensayos por razones prácticas.

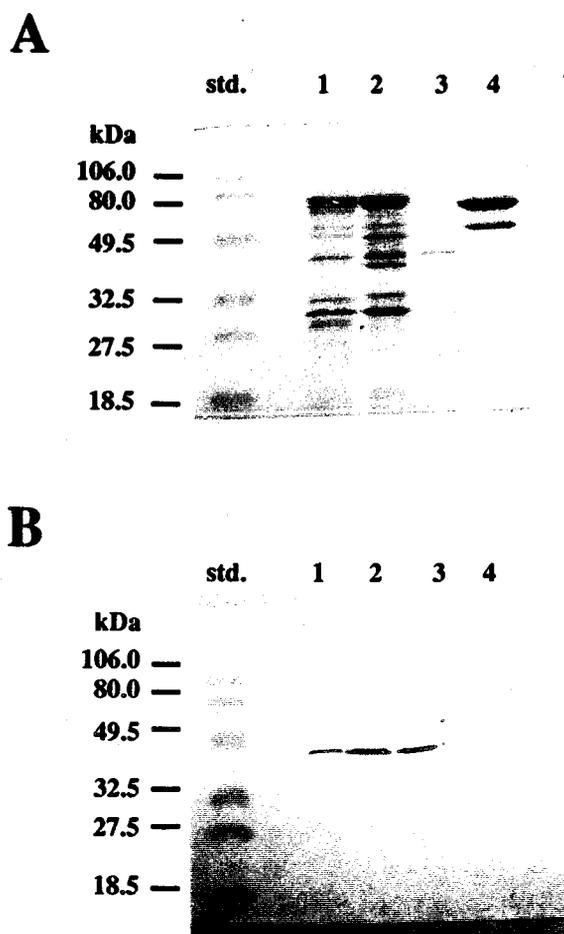


FIGURA 29. Análisis antigénico de la β -1,6-glucanasa (β -1,6-II) de *T. harzianum* CECT 2413. Las condiciones experimentales se describen en los apartados 3.5.1.1 y 3.5.1.7. (A) Electroforesis analítica. (B) *Western blot*. El revelado se llevó a cabo con anti- β -1,6-II y con el procedimiento de peroxidasa. Calle std., marcadores de masa molecular; calle 1, precipitado de sulfato amónico de un cultivo en quitina (40 μ g); calle 2, Novozym™ 234 (40 μ g), calle 3, β -1,6-II (5 μ g); calle 4, β -1,3-I y β -1,6-I (40 μ g).

4.4.3.2. Especificidad para los sustratos

Se han descrito dos tipos de β -1,6-glucanasas, aquellas específicas de β -1,6-glucanos y aquellas que poseen igualmente actividad β -1,3-glucanasa y β -glucosidasa (Vázquez de Aldana *et al.*, 1991). Para estudiar la especificidad para los sustratos de las tres enzimas purificadas, se ensayaron sus actividades enzimáticas frente a diversos sustratos. La tabla 16 muestra los resultados obtenidos en porcentaje respecto al máximo de actividad alcanzado en cada caso.

TABLA 16. Especificidad de las β -glucanasas purificadas para los distintos sustratos.

Sustratos(a)	β -1,6-I (%)	β -1,6-II (%)	β -1,3-I (%)
Laminarina	22	0	100
Pachiman	0	0	46
Pustulan	100	100	5
Glucano (<i>S. cerevisiae</i>)	73	36	97
CMC	0	0	0
Quitina coloidal	0	0	0
Glicol-quitina	0	0	0
Nigeran	0	0	0
Almidón	0	0	0
Dextrano	0	0	0

(a) Las condiciones experimentales son las descritas en el apartado 3.6.2. El 100 % de actividad corresponde a 170 U/mg proteína para la β -1,6-I, 86 U/mg proteína para la β -1,6-II y de 28 U/mg proteína para la β -1,3-I.

Como puede apreciarse, la actividad de la enzima β -1,6-II es altamente específica de enlaces tipo β -1,6-glucosídicos, hidrolizando pustulan y glucanos de levaduras. La enzima β -1,6-I es específica de su sustrato, el pustulan, actúa en menor medida sobre el glucano de levadura y exhibe una actividad reducida frente a la laminarina; este porcentaje puede explicarse en los siguientes términos: la laminarina es un polisacárido formado fundamentalmente por enlaces β -1,3-glucosídicos que posee un 15 % de enlaces tipo β -1,6-glucosídicos, siendo estos últimos los que serían atacados; la ausencia de actividad en pachiman, polímero lineal formado exclusivamente por enlaces β -1,3-glucosídicos se explica en los mismos términos. La β -1,3-I hidroliza específicamente moléculas que contienen enlaces tipo β -1,3-glucosídicos, como la laminarina, el pachiman y el glucano de levadura. También se observa un porcentaje reducido de actividad frente a pustulan, actividad que sólo se pone de manifiesto tras incubaciones prolongadas y que podría deberse a ligeras contaminaciones de la β -1,6-I en las preparaciones purificadas de la β -1,3-I.

4.4.3.3. Constante de Michaelis-Menten (K_m)

Para estudiar la afinidad de las β -glucanasas por sus sustratos, se realizaron ensayos usando diferentes concentraciones de cada sustrato. Los sustratos empleados fueron

laminarina en los ensayos de la β -1,3-I y pustulan en los ensayos de las β -1,6-glucanasas. Las constantes de Michaelis-Menten se calcularon representando los inversos de los datos obtenidos de la hidrólisis inicial de los sustratos frente a los inversos de las concentraciones de sustrato empleadas. Las K_m obtenidas fueron de 0.8 mg pustulan/ml para la β -1,6-I, de 2.4 mg pustulan/ml para la β -1,6-II y de 3.3 mg laminarina/ml para la β -1,3-I.

4.4.3.4. Productos de reacción y mecanismos de acción

Para determinar si el mecanismo de acción de las β -glucanasas purificadas es de tipo exo o endohidrolítico se ha llevado a cabo el análisis a distintos tiempos de los productos de la hidrólisis de los sustratos por las distintas β -glucanasas purificadas mediante HPLC. Las figuras 30, 31 y 32 muestran los cromatogramas obtenidos a los distintos tiempos ensayados. Como se aprecia en las figuras 30 y 31, la incubación con pustulan de cualquiera de las dos β -1,6-glucanasas purificadas genera una serie de oligosacáridos de menor peso molecular que se hidrolizan a oligosacáridos aún menores cuando se incrementa el tiempo de incubación enzimática. El producto final de hidrólisis de pustulan por la β -1,6-II fue la gentibiosa (Glc2) y en el caso de la β -1,6-I, gentibiosa y glucosa. Ninguna de las dos enzimas hidrolizaron, en ensayos independientes, gentibiosa, por lo que ninguna de ellas posee actividad β -glucosidasa. El conjunto de resultados obtenidos indican que las β -1,6-glucanasas purificadas tienen un modo de acción endohidrolítico.

Cuando se incubó laminarina con la β -1,3-glucanasa purificada (figura 32) se formaron igualmente oligosacáridos de menor peso molecular, siendo la laminarotetraosa (Glc4), la laminarobiosa (Glc2) y la glucosa los productos finales de hidrólisis. Cuando se ensayó la acción de la enzima sobre laminarobiosa no se observó hidrólisis. Por tanto, esta enzima tampoco posee actividad β -glucosidasa. Los resultados obtenidos indican que la β -1,3-glucanasa purificada tiene un modo de acción endohidrolítico. Este resultado fue posteriormente confirmado al determinar el mismo grado de hidrólisis sobre laminarina que sobre laminarina oxidada en su extremo no reductor con ácido peryódico, sustrato cedido por el Dr. A. Durán (Universidad de Salamanca). Este último sustrato sólo es susceptible de hidrólisis por las endo- β -1,3-glucanasas (Nelson, 1975).

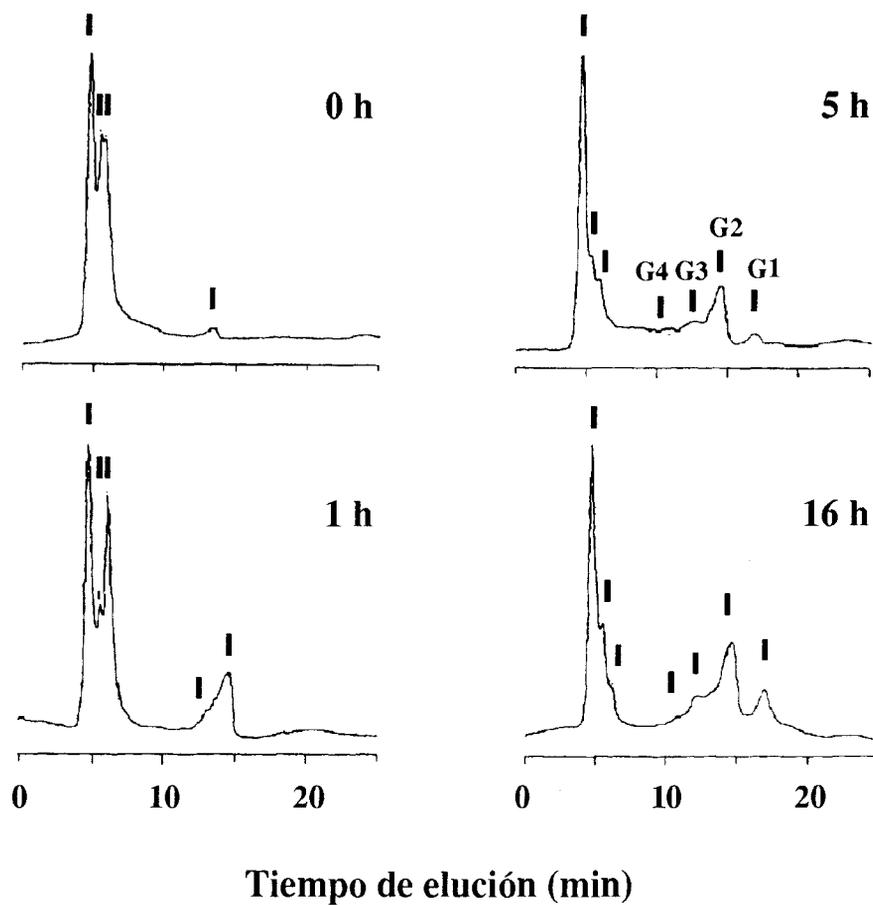


FIGURA 30. Análisis de los productos de reacción de la β -1,6-I purificada de *T. harzianum* CECT 2413 mediante HPLC. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado 3.6.5. Se indican el grado de polimerización de los productos de reacción (G1, G2, G3 y G4) y el tiempo de incubación enzimática previo a cada análisis.

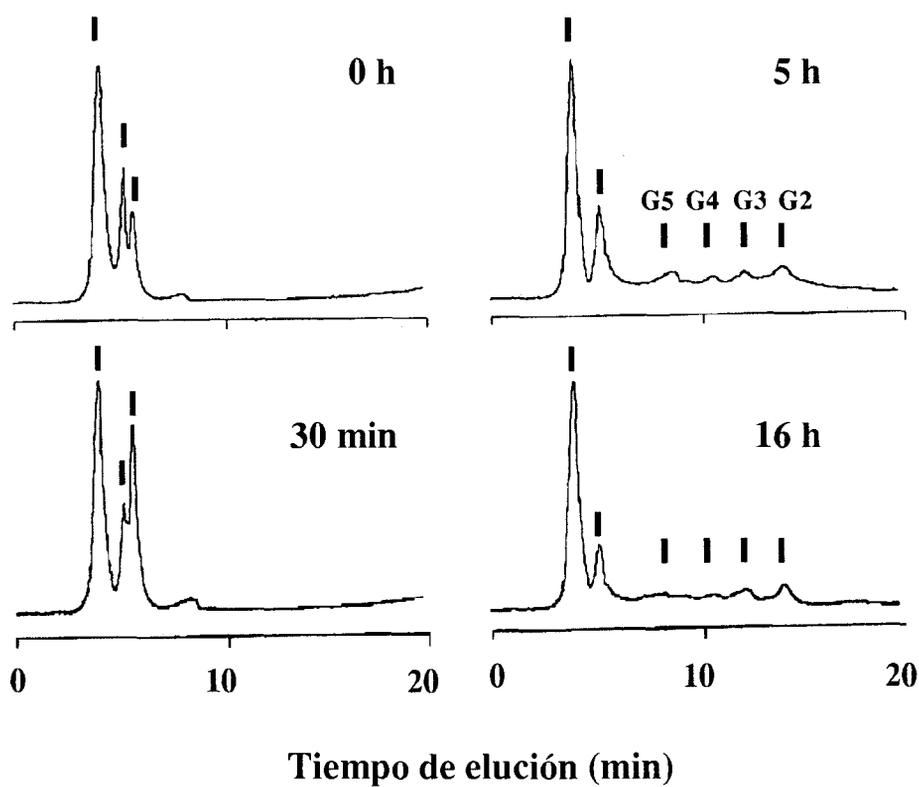


FIGURA 31. Análisis de los productos de reacción de la β -1,6-IG purificada de *T. harzianum* CECT 2413 mediante HPLC. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado 3.6.5. Se indican el grado de polimerización de los productos de reacción (G2, G3, G4 y G5) y el tiempo de incubación enzimática previo a cada análisis.

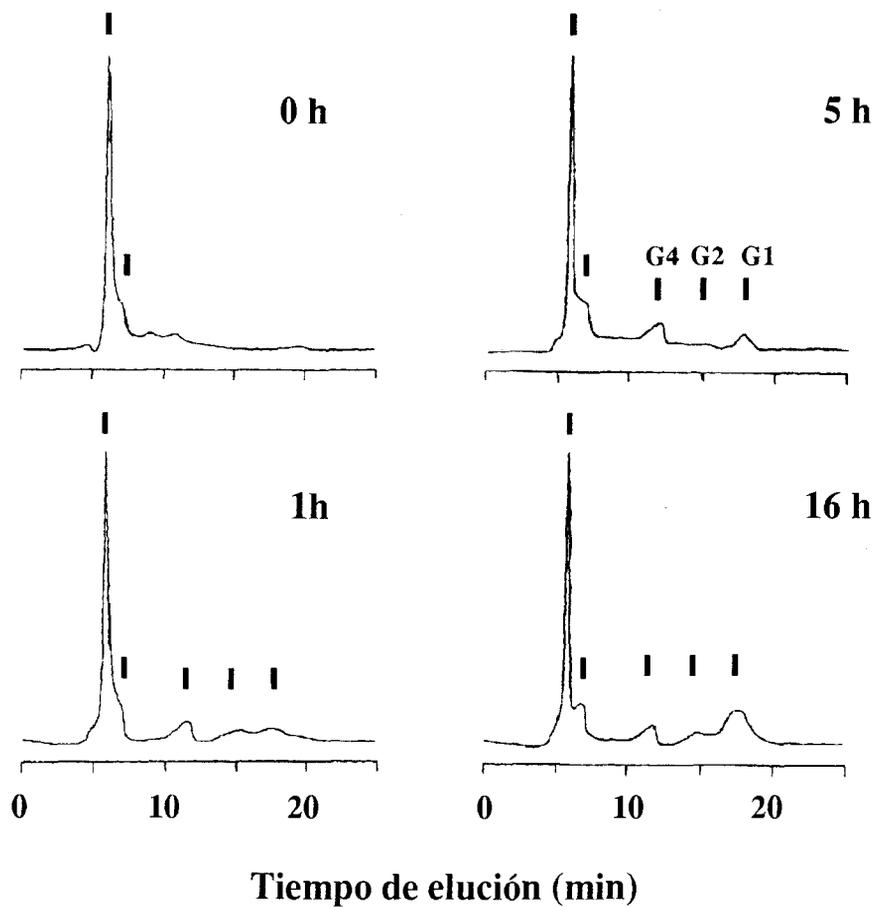


FIGURA 32. Análisis de los productos de reacción de la β -1,3-l purificada de *T. harzianum* CECT 2413 mediante HPLC. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado 3.6.5. Se indican el grado de polimerización de los productos de reacción (G1, G2 y G4) y el tiempo de incubación enzimática previo a cada análisis.

4.4.4. Propiedades líticas

Se ha estudiado la capacidad que poseen las β -glucanasas purificadas para degradar paredes celulares de hongos, incluyendo *B. cinerea* CECT 2100, *G. fujikuroi* IMI 58289, *P. blakesleeanus* NRRL 1555, *P. syringae* CECT 2351 y *S. cerevisiae*. En estos ensayos, se incubaron preparaciones de las enzimas purificadas con las paredes de los hongos anteriores, determinándose posteriormente el contenido de azúcares reductores liberados. Como muestra la tabla 17, las β -1,6-glucanasas sólo ejercen actividad enzimática sobre paredes celulares de *S. cerevisiae*, mientras que la β -1,3-glucanasa hidroliza fundamentalmente paredes de *P. syringae* CECT 2351 y de *S. cerevisiae*.

TABLA 17. Acción lítica sobre paredes celulares de las β -glucanasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413.

Paredes celulares(a)	β -1,6-I (%)	β -1,6-II (%)	β -1,3-I (%)
<i>B. cinerea</i>	0	0	0.5
<i>G. fujikuroi</i>	0	0	0.5
<i>P. blakesleeanus</i>	0	0	0
<i>P. syringae</i>	0	0	4
<i>S. cerevisiae</i>	20	2	2

(a) Los ensayos se realizaron según se especifica en el apartado 3.2.7. Las actividades se muestran como porcentaje de actividad siendo 100 % las actividades obtenidas en pustulan (β -1,6-glucanasas) y en laminarina (β -1,3-glucanasa) correspondientes a las actividades específicas ya descritas en la tabla 16.

La actividad lítica sobre paredes celulares se determinó igualmente usando ensayos en cajas de Petri que contenían suspensiones de paredes de los hongos anteriores y siguiendo el método que se indica en el apartado 3.2.7. Ninguna de las proteínas originó halos de clareamiento en estos ensayos.

4.4.5. Resumen de propiedades

La tabla 18 resume las parámetros que se han expuesto en los apartados anteriores.

TABLA 18. Resumen de las propiedades de las β -glucanasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413.

PARAMETRO	β -1,6-I (valor)	β -1,6-II (valor)	β -1,3-I (valor)
Masa molecular (SDS)	51 kDa	43 kDa	66 kDa
Masa molecular (S-200 HR)	20-25 kDa	20-25 kDa	5-10 kDa
Radio de Stokes	ND (a)	ND	ND
pI (isoelectroenfoque)	7.4	5.8	7.7
pI (cromatoenfoque)	7.7	5.8	8.0
Temperatura de inactivación	50 °C	50 °C	55 °C
Glicosilación	No	No	No
Temperatura óptima	50 °C	50 °C	40 °C
Km (pustulan)	0.8 mg/ml	2.4 mg/ml	ND
Km (laminarina)	ND	ND	3.3 mg/ml
Modo de acción	Endo	Endo	Endo
Halos de lisis en paredes	No	No	No

(a) ND. No determinado.

4.5. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA ENZIMA DE *T. harzianum* CECT 2413 QUE DEGRADA PAREDES CELULARES DE *B. cinerea* CECT 2100

4.5.1. Purificación y criterios de homogeneidad

Siguiendo el esquema de purificación por absorción a los sustratos enzimáticos (apartados 4.3.1 y 4.4.1), se ha abordado la purificación de proteínas que degradan paredes celulares de hongos filamentosos fitopatógenos. Como modelo se han utilizado paredes purificadas del hongo fitopatógeno *B. cinerea* CECT 2100 (apartado 3.2.1.E).

Durante la purificación, tras la concentración con sulfato amónico al 80 % de saturación de sobrenadantes de cultivo inducidos en quitina (apartado 4.3.1), alícuotas de 0.4 ml de concentrado, se adsorbieron a 0.1 ml de una solución 20 mg/ml de paredes celulares purificadas y liofilizadas de *B. cinerea* CECT 2100, en tubos Eppendorf durante 1 h, a 0 °C y con agitación. Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron durante 10 min a la velocidad máxima de una centrífuga Eppendorf. Los sobrenadantes se volvieron a adsorber a alícuotas de 0.1 ml de paredes celulares. Finalmente, todos los precipitados se lavaron dos veces con 1 ml de tampón fosfato potásico 70 mM, pH 6.0, suplementado con 1 M de NaCl y se resuspendieron cada uno en 50 µl de tampón fosfato potásico 70 mM, pH 6.0, que contenía 1 mM de NaN₃ y 1 mM de PMSF y se incubaron al menos 16 h a 37 °C.

Los sobrenadantes, resultado de la clarificación de las paredes celulares, contenían actividad β-1,3-glucanasa y actividad clarificadora de paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100. Seguidamente, los sobrenadantes se concentraron hasta un volumen aproximado de 0.3 ml y se aplicaron a una columna de filtración en gel en Sephacryl S-200 HR (1.6 x 40 cm) equilibrada en tampón acetato 100 mM, pH 5.5 que contenía 100 mM de KCl. La actividad enzimática capaz de degradar paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100 se determinó en las fracciones de la columna, ensayando la liberación de grupos reductores en suspensiones de paredes celulares (apartado 3.2.7). La actividad β-1,3-glucanasa se determinó según el método descrito en el apartado 3.2.3. El perfil de elución obtenido para las dos actividades se muestra en la figura 33. Las fracciones más activas de la actividad clarificadora de paredes celulares se concentraron por Centricon PM-10 y se sometieron a electroforesis desnaturante en presencia de SDS. La figura 34 muestra la banda de proteína obtenida que resultó estar altamente purificada.

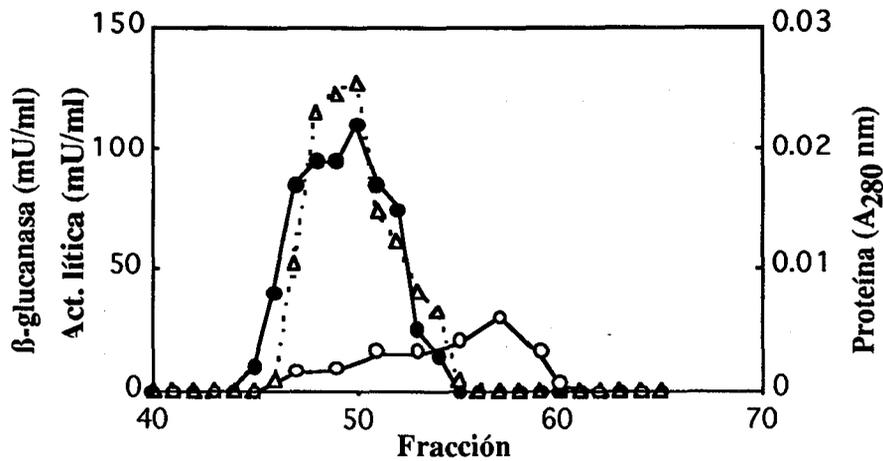


FIGURA 33. Perfil de elución en una columna de filtración en gel de la actividades β-1,3-glucanasa y clarificadora de paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100 de *T. harzianum* CECT 2413. Se aplicó una preparación procedente de una digestión de paredes celulares que contenía 0.5 U de actividad β-1,3-glucanasa y 1 U de actividad lítica sobre paredes. Actividad β-1,3-glucanasa (○), actividad lítica sobre paredes (●), proteína (Δ). Las condiciones de cromatografía se detallan en el apartado 3.3.5.2.

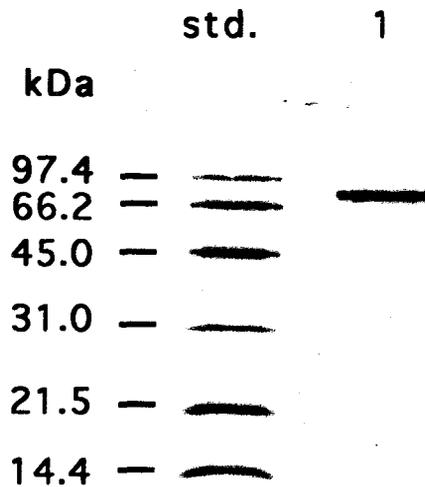


FIGURA 34. Análisis de la proteína clarificadora de paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100, purificada de *T. harzianum* CECT 2413 mediante electroforesis analítica. Las condiciones de electroforesis son las descritas en el apartado 3.5.1.1. Calle std., marcadores de masa molecular; calle 1, proteína clarificadora de paredes celulares de *B. cinerea* (5 μg).

En los siguientes apartados se describe la caracterización preliminar realizada para esta proteína.

4.5.2. Propiedades moleculares

4.5.2.1. Masa molecular

La masa molecular de la proteína se determinó en condiciones desnaturalizantes mediante electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS, resultando ser de 72 kDa. La masa molecular en condiciones nativas se determinó mediante filtración en gel resultando ser de 67 kDa. La comparación de ambos resultados confirma el carácter monomérico de esta proteína.

4.5.2.2. Punto isoelectrónico

El pI de la proteína purificada se estimó por la técnica de isoelectroenfoque en un valor de 6.7. Todos los intentos de determinar el pI de la proteína por cromatoenfoque resultaron infructuosos, por pérdida de la actividad tras la elución de la muestra por la columna.

4.5.2.3. Carácter glucoproteico

Al igual que para el resto de las proteínas caracterizadas en este trabajo, se ha determinado el carácter glucoproteico de la enzima que degrada paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100. Los resultados obtenidos, tras la utilización de métodos de detección de proteínas glicosiladas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (apartado 3.5.1.4), resultaron negativos.

Igualmente, los intentos para observar cambios de movilidad electroforética en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y tras tratamientos con enzimas desglicosilantes (endoglicosilasa-H o α -manosidasa, apartado 3.5.1.4) resultaron negativos.

El conjunto de resultados indica que, nuevamente, esta proteína extracelular no está glicosilada o que la glicosilación es tan reducida que no puede observarse con las técnicas de detección empleadas.

4.5.3. Propiedades catalíticas

4.5.3.1. Especificidad para los sustratos

Como única propiedad catalítica, y con el objeto de establecer la especificidad por sustrato de la enzima, se ha estudiado la capacidad de ésta para hidrolizar diferentes carbohidratos con enlaces β -glucósidos y distintas paredes celulares purificadas de diferentes hongos. La tabla 19 muestra los resultados obtenidos. Estos resultados indican que la proteína únicamente hidroliza, de los sustratos ensayados, paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100.

TABLA 19. Especificidad para los distintos sustratos de la enzima clarificadora de paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100 purificada.

Sustratos (a)	Actividad (U/mg prot.)
Laminarina	> 0.5
Glucano (<i>S. cerevisiae</i>)	0
Pachiman	0
Pustulan	0
CMC	0
Quitina coloidal	0
Nigeran	0
Almidón	0
<i>Hide powder azure</i>	0
Paredes celulares <i>B. cinerea</i>	6
Paredes celulares <i>G. fujikuroi</i>	0
Paredes celulares <i>P. blakesleeanus</i>	0
Paredes celulares <i>P. syringae</i>	0
Paredes celulares <i>S. cerevisiae</i>	0

(a) Las condiciones experimentales son las descritas en el apartado 3.6.2.

4.5.4. Propiedades líticas

Se han realizado ensayos en cajas de Petri que contenían suspensiones de paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100 solidificadas en agarosa (apartado 3.2.7). Datos no mostrados indican que el enzima produce halos de hidrólisis en las paredes celulares del hongo patógeno.

4.6. QUITINASAS, β -1,3-GLUCANASAS Y β -1,6-GLUCANASAS EN OTRAS ESPECIES DE *Trichoderma*

Se ha considerado que las actividades quitinasa y β -glucanasas son esenciales durante la fase de penetración en el proceso micoparasitario de *Trichoderma*. Por una parte, en numerosas ocasiones, se han establecido correlaciones entre la capacidad de excretar enzimas con actividad quitinasa y β -glucanasa y la capacidad micoparásita de distintas cepas de *Trichoderma* (Elad *et al.*, 1982). Por otra parte, Ridout *et al.* (1986) estudiando la presencia de actividades quitinasa y β -1,3-glucanasa en distintas cepas de *T. harzianum* y *T. viride* y usando como fuentes de carbono glucosa o paredes celulares de *R. solani*, encontraron que las paredes celulares de este patógeno inducían las enzimas anteriores y que sus actividades específicas se distribuían de una manera irregular.

En este apartado del trabajo, se han comparado la producción de actividades quitinasa, β -glucanasa y lítica sobre paredes celulares de *S. cerevisiae* y *B. cinerea* CECT 2100 en distintas cepas micoparásitas (*T. harzianum* CECT 2413, *T. viride* CECT 2423, *G. virens* CECT 2460, *T. harzianum* IMI 206040) y no micoparásitas (*T. longibrachiatum* CECT 2606, *T. reesei* CECT 2414 y *T. koningii* CECT 2412) de *Trichoderma* o de *Gliocladium*.

Igualmente, utilizando los antisueros disponibles, se ha estudiado la presencia de las quitinasas y de la β -1,6-glucanasa (β -1,6-II) en las distintas cepas. La fuente de carbono elegida fue quitina al 1.5 %, usando como control negativo glucosa al 2 %.

4.6.1. Actividades quitinasa y β -glucanasa en las distintas cepas de *Trichoderma*

Las tabla 20 muestran los resultados del ensayo de actividad quitinasa procedentes de cultivos en glucosa al 2 % o en quitina al 1.5 % como fuentes de carbono. Los resultados obtenidos indican, en los cultivos en quitina, la marcada presencia de la actividad quitinasa en aquellas cepas descritas como micoparásitas y la casi ausencia en las descritas como no micoparásitas.

TABLA 20. Actividad quitinasa en distintas especies de *Trichoderma* y de *Gliocladium*.

Especie	Quitinasa (a) (mU/mg prot.)	
	Glucosa 2%	Quitina 1.5%
<i>T. harzianum</i> CECT 2413	0	26
<i>T. viride</i> CECT 2423	0	23
<i>G. virens</i> CECT 2460	0	19
<i>T. harzianum</i> IMI 206040	0	10
<i>T. longibrachiatum</i> CECT 2606	0	2
<i>T. reesei</i> CECT 2414	0	4
<i>T. koningii</i> CECT 2412	0	2

(a) Las actividades se determinaron a las 48 h. Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.1.3.2 y 3.1.3.4.

Las actividades β -1,3-glucanasa (tabla 21) y β -1,6-glucanasa (tabla 22) varían entre las distintas cepas, con valores más altos para las cepas micoparásitas *T. harzianum* CECT 2413 y *T. viride* CECT 2423.

TABLA 21. Actividad β -1,3-glucanasa en distintas especies de *Trichoderma* y de *Gliocladium*.

Especie	β -1,3-glucanasa (a) (mU/mg prot.)	
	Glucosa 2%	Quitina 1.5%
<i>T. harzianum</i> CECT 2413	10	550
<i>T. viride</i> CECT 2423	10	600
<i>G. virens</i> CECT 2460	10	315
<i>T. harzianum</i> IMI 206040	10	100
<i>T. longibrachiatum</i> CECT 2606	15	60
<i>T. reesei</i> CECT 2414	45	300
<i>T. koningii</i> CECT 2412	25	60

(a) Las actividades se determinaron a las 48 h. Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.1.3.2 y 3.1.3.4.

TABLA 22. Actividad β -1,6-glucanasa en distintas especies de *Trichoderma* y de *Gliocladium*.

Especie	β -1,6-glucanasa (a) (mU/mg prot.)	
	Glucosa 2%	Quitina 1.5%
<i>T. harzianum</i> CECT 2413	5	250
<i>T. viride</i> CECT 2423	10	260
<i>G. virens</i> CECT 2460	10	210
<i>T. harzianum</i> IMI 206040	10	80
<i>T. longibrachiatum</i> CECT 2606	10	80
<i>T. reesei</i> CECT 2414	20	180
<i>T. koningii</i> CECT 2412	5	70

(a) Las actividades se determinaron a las 48 h. Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.1.3.2 y 3.1.3.4.

Cuando se detectó, la actividad lítica sobre paredes celulares de levaduras o de *B. cinerea* CECT 2100 (tabla 23) fue más acusada en las dos cepas micoparásitas anteriores, *T. harzianum* CECT 2413 y *T. viride* CECT 2423.

TABLA 23. Actividad lítica en distintas especies de *Trichoderma* y de *Gliocladium*.

Especie	Act. lítica (a,b) (mm halo hidrólisis)	
	Glucosa 2%	Quitina 1.5%
<i>T. harzianum</i> CECT 2413	0/0	9/8
<i>T. viride</i> CECT 2423	0/0	9/9
<i>G. virens</i> CECT 2460	0/0	3/6
<i>T. harzianum</i> IMI 206040	0/0	1/1
<i>T. longibrachiatum</i> CECT 2606	0/0	1/3
<i>T. reesei</i> CECT 2414	0/0	1/1
<i>T. koningii</i> CECT 2412	0/0	1/2

(a) Las actividades se determinaron a las 48 h. (b) El primer dato indica la actividad lítica sobre paredes celulares de levaduras y el segundo sobre *B. cinerea* CECT 2100. Las condiciones experimentales son las descritas en los apartados 3.1.3.2 y 3.1.3.4.

4.6.2. Detección inmunológica de quitinasas y β -1,6-glucanasas en las distintas cepas de *Trichoderma*

Tras la separación por electroforesis en presencia de SDS de precipitados de sulfato amónico al 80 % de saturación (apartado 3.1.3.5) de cultivos inducidos en quitina al 1.5 %, se procedió a la detección de polipéptidos en las distintas cepas micoparásitas y no micoparásitas de *Trichoderma* y de *Gliocladium* que inmunoreaccionaran con los antisueros obtenidos en conejo contra las quitinasas CHIT 42, CHIT 37 y CHIT 33 y los obtenidos en ratón contra la β -1,6-glucanasa, β -1,6-II de *T. harzianum* CECT 2413 (apartado 3.4).

Los antisueros ensayados contra las quitinasas CHIT 42 y CHIT 33 sólo dieron inmunoreacción en las muestras de tres de las cepas descritas como micoparásitas, *T. harzianum* CECT 2413, *T. viride* CECT 2423 y más débilmente de *G. virens* CECT 2460 (figuras 35 y 37), mientras que el antisuero anti-CHIT 37 dió una inmunoreacción fuerte con polipéptidos de 37 kDa en las cepas *T. harzianum* CECT 2413 y *T. viride* CECT 2423, con un polipéptido de 35 kDa en *G. virens* CECT 2460 y una inmunoreacción débil con polipéptidos de 37 kDa y 35 kDa en las cepas *T. harzianum* IMI 206040 y *T. koningii* CECT 2412, respectivamente (figura 36). El resto de bandas débiles observadas fueron resultado de reacciones inespecíficas, pues tanto la intensidad como la distribución de las mismas no fueron reproducibles de un experimento a otro.

El empleo del antisuero anti- β -1,6-II (figura 38) puso de manifiesto la ubicuidad de la proteína β -1,6-II en todas las cepas.

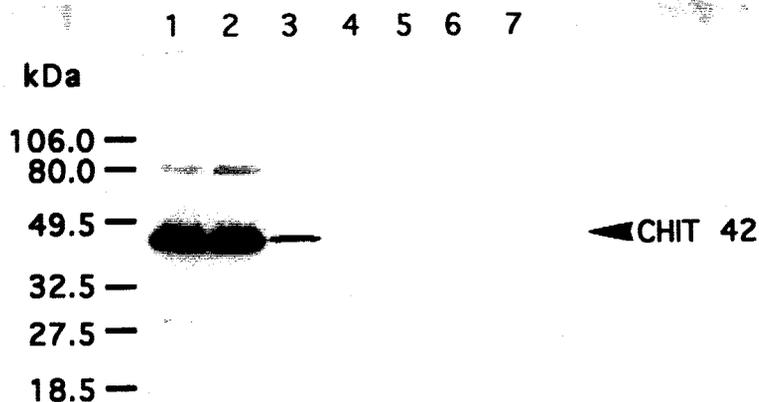


FIGURA 35. Análisis antigénico de la quitinasa CHIT 42 en distintas cepas de *Trichoderma* y en *Gliocladium*. Se siguió el procedimiento experimental descrito en el apartado 3.5.1.7 utilizando anti-CHIT42 y el procedimiento de revelado de peroxidasa. Se cargó una cantidad de precipitados de sulfatos amónicos de cultivos de cada cepa inducidos en quitina al 1.5 %, equivalente a 50 μ g de proteína por pocillo. Calle 1, *T. harzianum* CECT 2413; calle 2, *T. viride* CECT 2423; calle 3, *G. virens* CECT 2460; calle 4, *T. harzianum* IMI 206040; calle 5, *T. longibrachiatum* CECT 2606; calle 6, *T. reesei* CECT 2414; calle 7, *T. koningii* CECT 2412.

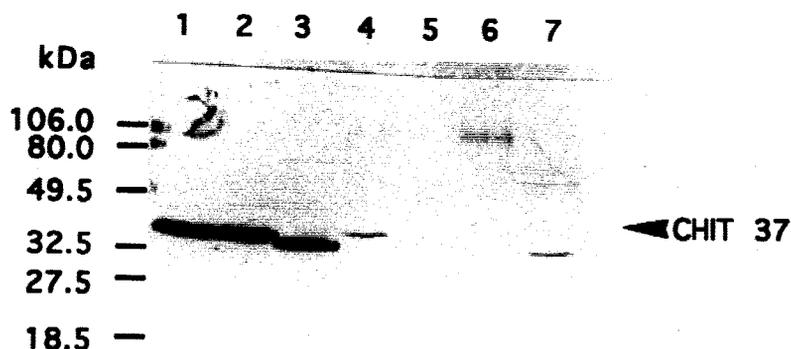


FIGURA 36. Análisis antigénico de la quitinasa CHIT 37 en distintas cepas de *Trichoderma* y en *Gliocladium*. Se siguió el procedimiento experimental descrito en el apartado 3.5.1.7 utilizando anti-CHIT 37 y el procedimiento de revelado de peroxidasa. Se cargó una cantidad de precipitados de sulfatos amónicos de cultivos de cada cepa inducidos en quitina al 1.5 %, equivalente a 50 μ g de proteína por pocillo. Calle 1, *T. harzianum* CECT 2413; calle 2, *T. viride* CECT 2423; calle 3, *G. virens* CECT 2460; calle 4, *T. harzianum* IMI 206040; calle 5, *T. longibrachiatum* CECT 2606; calle 6, *T. reesei* CECT 2414; calle 7, *T. koningii* CECT 2412.

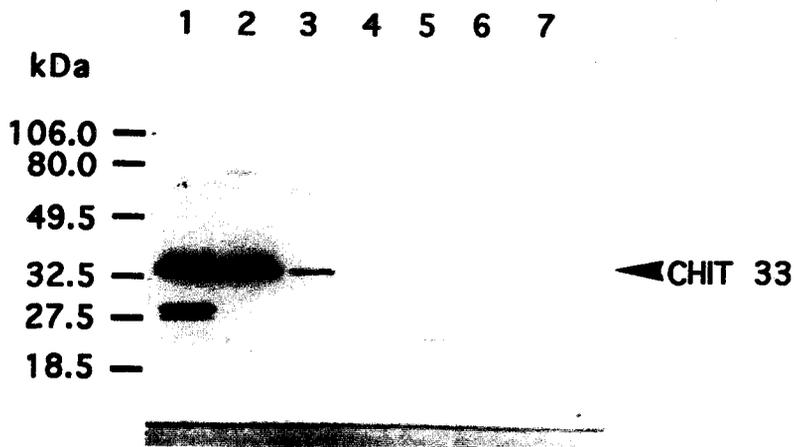


FIGURA 37. Análisis antigénico de la quitinasa CHIT 33 en distintas cepas de *Trichoderma* y en *Gliocladium*. Se siguió el procedimiento experimental descrito en el apartado 3.5.1.7, utilizando anti-CHIT33 y el procedimiento de revelado de peroxidasa. Se cargó una cantidad de precipitados de sulfatos amónicos de cultivos de cada cepa inducidos en quitina al 1.5 %, equivalente a 50 µg de proteína por pocillo. Calle 1, *T. harzianum* CECT 2413; calle 2, *T. viride* CECT 2423; calle 3, *G. virens* CECT 2460; calle 4, *T. harzianum* IMI 206040; calle 5, *T. longibrachiatum* CECT 2606; calle 6, *T. reesei* CECT 2414; calle 7, *T. koningii* CECT 2412.

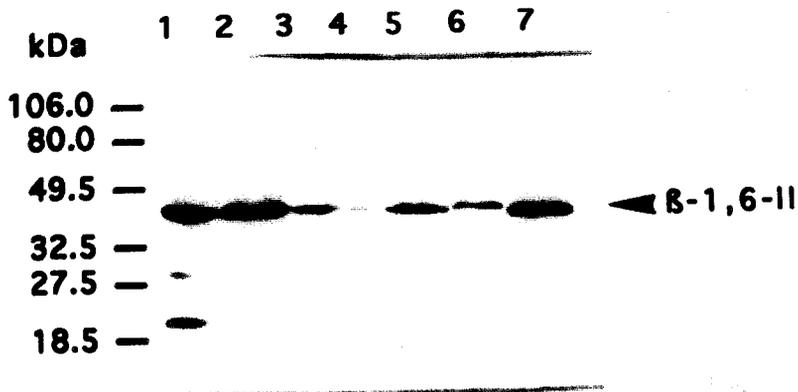


FIGURA 38. Análisis antigénico de la β-1,6-glucanasa β-1,6-II en distintas cepas de *Trichoderma* y en *Gliocladium*. Se siguió el procedimiento experimental descrito en el apartado 3.5.1.7 utilizando anti-β-1,6-II y el procedimiento de revelado de peroxidasa. Se cargó una cantidad de precipitados de sulfatos amónicos de cultivos de cada cepa inducidos en quitina al 1.5 %, equivalente a 50 µg de proteína por pocillo. Calle 1, *T. harzianum* CECT 2413; calle 2, *T. viride* CECT 2423; calle 3, *G. virens* CECT 2460; calle 4, *T. harzianum* IMI 206040; calle 5, *T. longibrachiatum* CECT 2606; calle 6, *T. reesei* CECT 2414; calle 7, *T. koningii* CECT 2412.

5. DISCUSSION

En los últimos años, las especies del género *Trichoderma* están siendo objeto de numerosos estudios debido, entre otras razones, a sus propiedades de agente de control biológico contra diversas enfermedades de naturaleza fúngica que afectan a las plantas cultivadas (Papavizas, 1985). De los tres modos de acción propuestos para explicar el efecto antifúngico de *Trichoderma* (competencia por nutrientes, antibiosis y micoparasitismo), se ha sugerido que el proceso micoparasitario es el principal mecanismo por el que estas especies controlan y combaten a los hongos patógenos de plantas (Elad *et al.*, 1982).

La acción micoparásita de *Trichoderma* comprende diversas etapas (Chet, 1990): localización, reconocimiento, unión al hospedador, penetración y digestión de los contenidos intracelulares de los hongos parasitados (apartado 1.3). La excreción en las zonas de interacción hospedador-parásito de enzimas capaces de degradar las paredes celulares y las membranas plasmáticas de los hongos hospedadores, se ha considerado esencial durante la fase de penetración (Elad *et al.*, 1982; Ridout *et al.*, 1988; Sivan y Chet, 1989). Puesto que la quitina y los β -glucanos son los polímeros más abundantes de la pared celular de los hongos, en este trabajo se ha estudiado la regulación por la fuente de carbono y la purificación y caracterización de diversas enzimas con actividad quitinasa, β -1,3 y β -1,6 glucanasa que podrían participar en el proceso micoparasitario de *T. harzianum* CECT 2413. Igualmente, se ha iniciado el aislamiento y caracterización de otras enzimas con capacidad para degradar paredes celulares de hongos fitopatógenos, comenzando por una enzima capaz de degradar específicamente paredes celulares del hongo *B. cinerea* CECT 2100. Finalmente, se ha analizado en distintas cepas micoparásitas y no micoparásitas de *Trichoderma* y *Gliocladium*, la presencia de las actividades estudiadas y de algunas de las enzimas purificadas con el fin de determinar la posible contribución de las mismas en el micoparasitismo de *T. harzianum* CECT 2413.

A continuación, se discuten los resultados obtenidos.

5.1. REGULACION DE LA SINTESIS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESTUDIADAS EN *T. harzianum* CECT 2413

La actividad específica extracelular de las enzimas hidrolíticas quitinasa, β -1,3 y β -1,6-glucanasa varía considerablemente cuando *T. harzianum* CECT 2413 se cultiva en distintas fuentes de carbono (tabla 6). Los datos obtenidos sugieren que la síntesis de las actividades extracelulares β -1,3 y β -1,6-glucanasa, quitinasa y quitobiasa está modulada por la fuente de carbono y sujeta a inducción por sustrato y represión por glucosa.

Los experimentos de cinética de excreción a diferentes concentraciones de sustratos inductores (figura 6) y el efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre la excreción de estas actividades (figura 7), apuntan favorablemente a que esta hipótesis sea cierta. En cultivos sometidos a inducción por sustrato, los resultados obtenidos utilizando inhibidores de la traducción (cicloheximida) o de la transcripción (8-hidroxiquinolina) a concentraciones empleadas en otros hongos filamentosos (Ulhoa y Peberdy, 1991; Santos *et al.*, 1977) indican que se requiere síntesis de proteína y de RNA para el incremento extracelular e intracelular de las actividades específicas de las enzimas estudiadas (figura 8 y tabla 7). Dado además que los efectos son similares para ambos tipos de inhibidores, la inducción o modulación por sustrato debe operar a nivel transcripcional. Estos resultados se han confirmado al menos para la quitinasa CHIT 42, cuyo cDNA ha sido clonado, secuenciado y caracterizado por Irene García (Tesis Doctoral en realización, Universidad de Sevilla). Análisis de Northern con el cDNA correspondiente y RNA extraído de *T. harzianum* CECT 2413 en distintas fuentes de carbono, que incluyen entre otras, quitina al 2 %, quitina al 2 % suplementada con glucosa al 2 % y glucosa al 10 %, al 2 % o al 0.1 %, ponen de manifiesto la presencia abundante del mensajero sólo en presencia de quitina al 2 % y una débil presencia en glucosa al 0.1 %.

Ejemplos de mecanismos regulatorios semejantes se han puesto de manifiesto en distintas especies de *Trichoderma* para otras actividades como las celulasas (Montenecourt, 1983), xilanasas (Royer y Nakas, 1990), quitobiasas (Ulhoa y Peberdy, 1993) o proteasas (Geremia *et al.*, 1993) y en otros hongos filamentosos; así, y tras un análisis de Northern similar al previamente mencionado, se postula igualmente la inducción por quitina y la represión catabólica para la quitinasa Chi 1 de *A. album* (Blaiseau *et al.*, 1992). Por otra parte, la represión catabólica es un fenómeno frecuente en enzimas que degradan polisacáridos. Por ejemplo, la síntesis de β -1,3 y de β -1,6-glucanasas de *Neurospora crassa* (del Rey *et al.*, 1979) y la síntesis de β -1,3-glucanasas de *Penicillium italicum* (Santos *et al.*, 1978b, Santos *et al.*, 1979) o de *Sclerotium glucanicum* (Rapp, 1992) son reprimibles por fuentes de carbono fácilmente asimilables, como también lo son la β -1,3-glucanasa descrita en *B. cinerea* (Stahman *et al.*, 1992) o la descrita en *P. oxalicum* (Copa-Patiño *et al.*, 1989). En los ejemplos anteriores, las actividades β -glucanasas se desreprimen en situaciones de limitación de fuente de carbono (Glc 0.1 %), fenómeno asociado a la autólisis del micelio o a la degradación del β -1,3-1,6-glucano que algunos de estos hongos excretan a los medios de cultivo y que se utiliza como fuente de carbono cuando otras más fácilmente metabolizables no están disponibles. En nuestro caso, y al menos durante las primeras 48 h de limitación de

la fuente de carbono, no se pone de manifiesto el fenómeno de desrepresión de las β -glucanasas de *T. harzianum* CECT 2413 (tabla 6).

En este trabajo no se han realizado un análisis exhaustivo para identificar los verdaderos inductores de las actividades estudiadas. Los polímeros son macromoléculas demasiado grandes para considerarlos como verdaderos inductores moleculares. En el caso de las quitinasas, se ha apuntado la posible función de la quitobiosa como inductor, por analogía al modelo descrito para las celulasas de *T. reesei*, especie donde la entrada de la celobiosa desencadena la inducción de las CBHs (Kubicek *et al.*, 1993). En nuestro caso, se produce la excreción de la actividad quitinasa en presencia de GlcNAc y de GlcN (tabla 6) y al menos para CHIT 42, el mensajero también se induce en presencia de GlcNAc (Irene García, Tesis Doctoral en realización, Universidad de Sevilla).

5.2. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS ENZIMAS ESTUDIADAS EN *T. harzianum* CECT 2413

La presencia de distintas isoenzimas en los sistemas de degradación de polisacáridos es un fenómeno frecuente encontrado en numerosos microorganismos (Deshpande, 1986) y es consecuencia de la existencia de diferentes genes (Watanabe *et al.*, 1992a) o de modificaciones post-traduccionales del producto de un mismo gen, como por ejemplo, proteólisis o diferentes estados de glicosilación (Watanabe *et al.*, 1990; Nebreda *et al.*, 1987). Esta diversidad de enzimas para una misma actividad se ha interpretado como una optimización molecular para la degradación más efectiva de los sustratos atacados (Deshpande, 1986; Ridout *et al.*, 1988).

Como paso previo a la purificación de las enzimas de este trabajo, a partir de preparaciones extracelulares concentradas de cultivos de *T. harzianum* CECT 2413 en quitina al 1.5 %, se han llevado a cabo experimentos de cromatoenfoco que han permitido distinguir analíticamente, tres isoenzimas con actividad β -1,3-glucanasa de pIs >7.0, 6.5 y 5.3 (figura 9), dos isoenzimas con actividad β -1,6-glucanasa de pIs >7.0 y 5.8 (figura 10) y tres isoenzimas con actividad quitinasa de pIs >7.0, 6.5 y 5.0 (figura 11). Como se sugerirá posteriormente, algunas de estas isoenzimas no parecen ser el resultado de modificaciones post-traduccionales de un mismo producto génico, sino que están codificadas por genes diferentes.

Además de las identificadas en presencia de quitina, *T. harzianum* CECT 2413 podría excretar otras isoenzimas cuando se cultiva en otras fuentes de carbono. Resultados preliminares no mostrados en este trabajo, indican la presencia de otra isoenzima con actividad β -1,3-glucanasa de pI 6.0 cuando *T. harzianum* CECT 2413 se cultiva con paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100 como fuente de carbono.

5.2.1. Quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413

Aunque se conoce bastante sobre las quitinasas de bacterias (Jones *et al.*, 1986; Watanabe *et al.*, 1992a), levaduras (Correa *et al.*, 1982; Kuranda y Robbins, 1991) y plantas (Collinge *et al.*, 1993), los trabajos de purificación y caracterización en hongos filamentosos son muy escasos y en numerosos casos las purificaciones descritas son sólo de carácter parcial (di Pietro *et al.*, 1993; Harman *et al.*, 1993; Kunz *et al.*, 1992; Ohtakara, 1988; Pedraza-Reyes y López-Romero, 1989; Pegg, 1988; Reyes *et al.*, 1989; Ulhoa y Peberdy, 1992; Usui *et al.*, 1990; Yanai *et al.*, 1992; Zarain-Herzberg y Arroyo-Begovich, 1983).

En este trabajo, siguiendo un procedimiento rápido, fácil y extremadamente específico, se ha conseguido la purificación a homogeneidad electroforética de las tres isoenzimas con actividad quitinasa de *T. harzianum* CECT 2413 (CHIT 42, CHIT 37 y CHIT 33) procedentes de cultivos con quitina como única fuente de carbono. El método desarrollado incluye la concentración de los sobrenadantes libres de células con sulfato amónico y como pasos únicos y críticos, la afinidad a quitina coloidal, que retiene primordialmente las tres proteínas con actividad quitinasa y la técnica de cromatoenfoque, que aprovecha los diferentes puntos isoeléctricos de las mismas (básico para CHIT 33, casi neutro para CHIT 42 y ácido para CHIT 37) para su posterior separación. Es de destacar que, con la excepción de una quitinasa de *T. reesei* (Usui *et al.*, 1990), éste es el primer trabajo donde se purifican a homogeneidad electroforética quitinasas del género *Trichoderma* y en particular de hongos micoparásitos. Con posterioridad, otros grupos han descrito la purificación de una quitinasa de *T. harzianum* que suponemos se corresponde con CHIT 42 (Ulhoa y Peberdy, 1992; Harman *et al.*, 1993) y una quitinasa del hongo micoparásito *A. album* (Kunz *et al.*, 1992). En ninguno de los trabajos anteriores, salvo en el caso de la quitinasa de *T. reesei* que incluye un paso por una columna de (GlcNAc)₂-Sephrose CL-4B, se incluyen etapas de purificación por afinidad.

Los rendimientos de cada proceso completo de purificación (tabla 8) son relativamente bajos (2-5 % de la actividad total) pero suficientes para poder abordar estudios

cinéticos, inmunológicos y de microsecuenciación con las proteínas purificadas. Estos valores tan reducidos en los rendimientos pueden deberse a una sobreestimación de la actividad específica en las preparaciones iniciales, por efectos cooperativos de las tres quitinasas en combinación con otras enzimas quitinolíticas como las quitobiasas. De hecho, se han observado efectos sinérgicos sobre paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100 al ensayar la actividad lítica de CHIT 42 con CHIT 37 o CHIT 33 (figura 22). La existencia de efectos sinérgicos afecta también a los rendimientos en el proceso de purificación de las celulasas de *T. reesei* (Béguin, 1990) y de la quitinasa Chi 1 de *A. album* (Kunz *et al.*, 1992).

En general, las quitinasas son proteínas monoméricas de masas moleculares comprendidas entre 30 y 50 kDa. Las purificadas en este trabajo son también proteínas monoméricas de masas moleculares 42 kDa (CHIT 42), 35-40 kDa (CHIT 37) y 35-30 kDa (CHIT 33). La masa molecular de CHIT 42 deducida de su secuencia de aminoácidos es aproximadamente de 43 kDa (Irene García, Tesis Doctoral en realización, Universidad de Sevilla). El carácter monomérico queda confirmado tras la comparación de las masas obtenidas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida que contenían SDS, tinciones de actividad en geles de poliacrilamida que contenían SDS y glicol-quitina, y cromatografía de filtración en gel. El comportamiento anómalo observado cuando CHIT 42 se sometió a cromatografía de filtración en gel (masas moleculares de 8-15 kDa) puede deberse a un fenómeno de afinidad por el soporte cromatográfico puesto que, tras su elución, si se somete de nuevo a electroforesis en condiciones desnaturalizantes la proteína recupera una masa molecular de 42 kDa. La retención sufrida no pudo eliminarse incrementando la fuerza iónica del tampón de elución de la columna. Se han observado fenómenos similares de afinidad por soportes de Sephacryl (un α -1,6-alil dextrano unido a bisacrilamida) para otras hidrolasas que degradan polímeros de las paredes celulares de los hongos, entre ellas una β -1,3-glucanasa extracelular de *T. longibrachiatum* (Tangarone *et al.*, 1989), dos quitinasas de cebada (Jacobsen *et al.*, 1990) y como se describirá más tarde, para las β -glucanasas purificadas y caracterizadas en este trabajo. Masas moleculares similares a las obtenidas aquí se han descrito para quitinasas de otros hongos filamentosos: *A. album* 40 kDa (Kunz *et al.*, 1992), *Aspergillus nidulans* 27 kDa (Reyes *et al.*, 1989), *G. virens* 41 kDa (di Pietro *et al.*, 1993), *M. rouxii* 30 y 25 kDa (Pedraza-Reyes y López-Romero, 1989), *N. crassa* 21 kDa (Zarain-Herzberg y Arroyo-Begovich, 1983), *Picnoporus cinnabarinus* 38 kDa (Ohtakara, 1988), *R. oligosporus* 50 y 52 kDa (Yanai *et al.*, 1992) *T. harzianum* 40 kDa (Ulhoa y Peberdy, 1992), *T. harzianum* 41 kDa (Harman *et al.*, 1993), *T. reesei* 58 kDa (Usui *et al.*, 1990) y *Verticillium albo-atrum* 64-58 kDa (Pegg, 1988).

La mayoría de las quitinasas descritas son estables en condiciones de desnaturalización térmica. El caso extremo es el de la quitinasa de *Streptomyces thermoviolaceus* que, cuando se somete a periodos de 30 min a temperaturas entre 60 y 90 °C mantiene el 100 % de la actividad, siendo su temperatura óptima de ensayo de 80 °C (Tsujiyo *et al.*, 1993). Las quitinasas purificadas en este trabajo son medianamente termoestables; las temperaturas de inactivación térmica obtenidas están comprendidas entre los 40 y 55 °C, con temperaturas óptimas de ensayo comprendidas entre 40 y 50 °C. La glicosilación es una característica común de las enzimas que degradan polisacáridos (Montenecourt, 1983; Yoshizumi y Ashikari, 1987) y en numerosos casos es el fenómeno determinante de variaciones de algunas de sus propiedades como la estabilidad a la temperatura. Así por ejemplo, la glicosilación determina la estabilidad térmica de la invertasa de levaduras (Brown *et al.*, 1979) o de dos β -1,3-1,4-glucanasas de cebada (Doan y Fincher, 1992). Se han descrito quitinasas glicosiladas en levaduras (Correa *et al.*, 1982; Kuranda y Robbins, 1991), en algunos hongos filamentosos (Kunz *et al.*, 1992; Yanai *et al.*, 1992) y en algunas plantas (Collinge *et al.*, 1993). No obstante, cuando se determinó el carácter glicoproteico de las quitinasas purificadas de *T. harzianum* CECT 2413 no se obtuvo ninguna evidencia de unión de carbohidrato a los polipéptidos de las mismas. Estos resultados se han confirmado al menos para CHIT 42 puesto que, en su secuencia deducida de aminoácidos sólo se halló un sitio posible de N-glicosilación (Irene García, Tesis Doctoral en realización, Universidad de Sevilla) que probablemente no esté ocupado o si lo está, contiene poca representación de carbohidrato. Esta enzima, al igual que las dos quitinasas restantes, no cambia su movilidad electroforética relativa tras someterla a tratamientos con endoglicosidasa H (enzima que elimina las uniones N-glicosílicas en las glicoproteínas). En numerosos casos, diferentes estados de glicosilación de un mismo polipéptido determinan cambios físico-químicos (masa molecular, pI, estabilidad, etc.) y cinéticos (K_M , especificidad por sustrato, etc.) tales que implican la existencia de diferentes isoenzimas productos de un mismo gen (Nebreda *et al.*, 1987). La ausencia de glicosilación obtenida para las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413 indican que éste no es nuestro caso.

Existen evidencias de que las tres quitinasas purificadas son productos de diferentes genes, entre ellas los resultados derivados del análisis de las secuencias parciales de aminoácidos (tabla 9) y los análisis de inmunoreacción cruzada con los antisueros obtenidos en este trabajo (figura 20). Con respecto al análisis de secuencias, ni los extremos amino terminales ni los péptidos internos que se obtuvieron fueron idénticos. La comparación de

las secuencias de aminoácidos obtenidas con los bancos de datos demuestra que CHIT 42 posee regiones semejantes a las descritas para algunas quitinasas bacterianas (figura 18A), mientras que CHIT 33 posee regiones conservadas con la quitinasa de *S. cerevisiae* y las acídicas de algunas plantas (figura 18B). Además, mientras que las secuencias obtenidas para CHIT 42 son altamente homólogas a la secuencia disponible de la quitinasa Chi 1 de *A. album* (figura 19), no existe tal homología para las secuencias obtenidas para CHIT 37 y CHIT 33. Las secuencias de los péptidos 11 (codificante) y 6 (no codificante) han servido para construir oligonucleótidos degenerados que han permitido la clonación del cDNA correspondiente a la quitinasa CHIT 42 (Irene García, Tesis Doctoral en realización, Universidad de Sevilla). Finalmente, en la secuencia deducida de aminoácidos de CHIT 42 no pudieron alinearse ninguno de los péptidos obtenidos para CHIT 37 y para CHIT 33 (Irene García, Tesis Doctoral en realización, Universidad de Sevilla). Todos estos resultados, descartan la posibilidad de que CHIT 37 y CHIT 33 sean productos proteolíticos de CHIT 42 y apuntan a la existencia de distintos genes para las tres proteínas.

La obtención de antisueros dirigidos contra CHIT 42 y CHIT 37 han permitido realizar ensayos de inmunoreacción cruzada, concluyéndose que ninguno de los antisueros obtenidos contra una de las quitinasas reaccionaba con las otras dos (figura 20) y demostrándose las distintas propiedades inmunológicas de las quitinasas purificadas. De nuevo, se descarta que alguna de las tres quitinasas sean productos proteolíticos de las restantes, y se refuerza la evidencia de que las tres quitinasas estén codificadas por diferentes genes. Las proteínas purificadas tampoco inmunoreaccionaron con antisueros anti-quitinasa básica de judía (Boller *et al.*, 1983). La imposibilidad de disponer de antisueros contra las quitinasas acídicas de las plantas *A. thaliana* y *C. sativus*, proteínas con las que al menos un péptido de CHIT 33 muestra un alto grado de identidad (figura 18B), impidió realizar ensayos de inmunoreacción que mostrasen mayores grados de similitud entre CHIT 33 y este grupo de quitinasas de origen vegetal.

Las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413 son específicas para sustratos oligoméricos de GlcNAc (tabla 10) y no poseen actividad lisozima, ausente en las quitinasas de origen bacteriano y fúngico pero presente en numerosas quitinasas de origen vegetal (Collinge *et al.*, 1993). CHIT 42 y CHIT 37 presentan también una débil actividad (aproximadamente el 2 % de la obtenida en quitina) frente a glicol-quitosan (tabla 10). Dado que el quitosan es el polímero parcialmente desacetilado de la quitina, la actividad obtenida debe interpretarse no como actividad inherente a las quitinasas purificadas, sino como

resultado de la acción enzimática de estas quitinasas en las zonas con GlcN acetiladas del glicol-quitosan.

Dada la heterogeneidad y la insolubilidad de la quitina y de aquellos compuestos más susceptibles a la acción enzimática de las quitinasas, glicol-quitina, quitina regenerada y quitina coloidal, los estudios cinéticos son difíciles de interpretar. No obstante, en numerosos casos, se han realizado medidas de las constantes de Michaelis-Menten (Cabib, 1987). Como es frecuente en las quitinasas en las que se han estudiado estos parámetros, las quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413 también muestran una alta afinidad por la quitina coloidal, encontrándose comprendidos los valores calculados de K_m entre concentraciones de 0.3 a 1 mg de quitina coloidal/ml (tabla 11). Más difícil es el análisis de las K_m de orden micromolar calculadas usando $Np-(GlcNAc)_2$ puesto que, en nuestro conocimiento, ningún otro trabajo de caracterización de quitinasas ha descrito este parámetro para este sustrato.

Las tres quitinasas purificadas degradan polímeros de GlcNAc mediante un mecanismo de tipo endohidrolítico, mecanismo característico de las quitinasas de origen vegetal y fúngico. No obstante, existen diferencias entre el modo de acción de CHIT 33 y el de CHIT 42 y CHIT 37 (figura 21). Por una parte, mientras que CHIT 33 rinde como producto final de hidrólisis mayoritariamente $(GlcNAc)_4$, CHIT 42 y CHIT 37 rinden $(GlcNAc)_2$. Por otra parte, CHIT 42 y CHIT 37 degradan oligosacáridos de un grado de polimerización superior o igual a 3, mientras que CHIT 33 debe degradar oligosacáridos de un grado de polimerización superior a 4, puesto que el oligosacárido $(GlcNAc)_4$ no es susceptible de hidrólisis. La transglicosilación es una actividad enzimática asociada a algunas quitinasas y lisozimas (quitinasa de *T. reesei* y lisozima de huevo de gallina, Usui *et al.*, 1990) que da como resultado la formación de oligosacáridos de mayor grado de polimerización a partir de oligosacáridos de menor grado de polimerización [$(GlcNAc)_6$ a partir de la transglicosilación de $(GlcNAc)_2$, cuando se usa como sustrato $(GlcNAc)_4$]. En ningún caso, se han detectado reacciones de transglicosilación al utilizar los oligosacáridos $(GlcNAc)_3$ y $(GlcNAc)_4$. Finalmente, ninguna de las tres enzimas degrada la quitobiosa, $(GlcNAc)_2$, sustrato éste último de las enzimas con actividad quitobiosa o β -N-acetilhesoxaminidasa (Ulhoa y Peberdy, 1993).

5.2.2. β -glucanasas de *T. harzianum* CECT 2413

A diferencia de las β -1,3-glucanasas, que se han estudiado exhaustivamente en bacterias y plantas y cuyas propiedades moleculares y bioquímicas se conocen perfectamente

(Watanabe *et al.*, 1992b; Carvalho *et al.*, 1992), los trabajos con β -1,6-glucanasas son muy escasos. Además, mientras que abundan los trabajos de levaduras sobre la caracterización de las diferentes β -1,3-glucanasas específicas e inespecíficas con actividades adicionales β -1,6-glucanasa y β -glucosidasa (Vázquez de Aldana *et al.*, 1991), los estudios referentes a purificaciones y caracterizaciones de las enzimas β -1,3-glucanasa y β -1,6-glucanasa de hongos filamentosos son relativamente escasos.

En este trabajo, se ha conseguido la purificación a homogeneidad electroforética de las dos β -1,6-glucanasas (β -1,6-I y β -1,6-II) y de una de las tres β -1,3-glucanasas (β -1,3-I) que *T. harzianum* CECT 2413 excreta al medio cuando utiliza quitina como fuente de carbono. El procedimiento de purificación empleado, similar al descrito previamente para las quitinasas del mismo microorganismo, incluye un método de adsorción específica de las enzimas a β -1,6-glucano (pustulan) y la técnica de cromatofoco como pasos críticos. La separación final de las proteínas β -1,6-I y β -1,3-I se consiguió mediante cromatografía de filtración en gel, aprovechando para ello las diferentes retenciones de las enzimas en el soporte cromatográfico. Esta es la primera vez que se purifican a homogeneidad electroforética dos β -1,6-glucanasas de hongos micoparásitos y también la primera vez que se caracteriza una endo- β -1,3-glucanasa de *T. harzianum*.

El método de purificación ofrece rendimientos bajos (tablas 13 y 14) pero suficientes para llevar a cabo estudios cinéticos, inmunológicos y de microsecuenciación con las proteínas purificadas. Como se ha discutido para las quitinasas, los valores tan reducidos en los rendimientos (del orden del 5 al 10 % para las β -1,6-glucanasas y del orden del 1 % para la β -1,3-glucanasa) pueden ser consecuencia de una sobreestimación de la actividad específica en las preparaciones iniciales, debido a efectos cooperativos con otras actividades como las β -1,3-glucanasas no purificadas o las β -glucosidasas.

En general, las β -glucanasas son proteínas monoméricas de masas moleculares distribuidas entre 30 y 80 kDa y de pIs básicos, neutros y ácidos. Las β -1,6-glucanasas purificadas en este trabajo son probablemente monoméricas de masas moleculares y pIs de 51 kDa y pI 7.4-7.8 (β -1,6-I) y de 43 kDa y pI 5.8 (β -1,6-II). El carácter monomérico se deduce al hecho de que estas enzimas son extracelulares y a la actividad, que se aprecian en las réplicas de agarosa que contenían pustulan, a masas moleculares idénticas a las calculadas en los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (figuras 25 y 27). Este planteamiento no excluye el que las proteínas sean homomultiméricas con subunidades activas. El criterio de comparaciones de las masas moleculares obtenidas mediante

electroforesis desnaturalizantes y cromatografía de filtración en gel no fue válido, puesto que, al igual que sucedió para CHIT 42, ambas β -1,6-glucanasas mostraron afinidad por el soporte cromatográfico de Sephacryl, afinidad que no pudo solventarse aumentando la fuerza iónica del tampón de elución en la columna. Las masas moleculares para otras β -1,6-glucanasas descritas en hongos filamentosos son similares a las obtenidas en este trabajo: *G. fujikuroi* 37 kDa (Shibata y Fukimbara, 1973), *N. crassa* 47 kDa (Hiura *et al.*, 1987) y *R. chinensis* 30 kDa (Yamamoto *et al.*, 1974).

Por otra parte, la β -1,3-glucanasa purificada en este trabajo (β -1,3-I) posee una masa molecular de 66 kDa y un pI de 7.7-8.0. La ausencia de un ensayo de actividad en geles o en réplicas de agarosa conteniendo laminarina y la retención observada en la columna de filtración en gel, en este caso algo más acentuada que la previamente descrita para las β -1,6-glucanasas, impiden asignar un carácter monomérico para esta enzima. El fenómeno de retención en soportes de Sephacryl se ha descrito previamente para una β -1,3-glucanasa de *T. longibrachiatum* (Tangarone *et al.*, 1989) de masa molecular y pI similares a los calculados para la β -1,3-glucanasa de este trabajo. Masas similares también se han descrito en otros hongos filamentosos, algunas de ellas de carácter monomérico: *Basydiomicete aphyllophorales* 73 kDa (Tsujisaka *et al.*, 1981), *N. crassa* 82 kDa (Hiura *et al.*, 1986), *P. italicum* 65-68 kDa (Sánchez *et al.*, 1982b), *S. glaucanicum* 85 y 78 kDa (Rapp, 1992), *T. longibrachiatum* 70 kDa (Tangarone *et al.*, 1989) y *T. reesei* 70 kDa (Bamforth, 1980).

Las β -glucanasas purificadas en este trabajo presentan temperaturas óptimas de ensayo de 50 °C y de inactivación térmica comprendidas entre 50 y 55 °C, ambas semejantes a las previamente descritas para otras β -1,6-glucanasas (Hiura *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1973) y otras β -1,3-glucanasas (Hiura *et al.*, 1986; Tangarone *et al.*, 1989; Tsujisaka *et al.*, 1981). Al igual que sucede para las quitinasas descritas en este trabajo y a diferencia de otras β -1,6-glucanasas (Hiura *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1973) y otras β -1,3-glucanasas (Nebreda *et al.*, 1987; Sánchez *et al.*, 1982b), las β -glucanasas purificadas en este trabajo no están glicosiladas o la glicosilación existente es tan reducida que no puede detectarse con las técnicas empleadas. Diferentes estados de glicosilación en distintas posiciones del producto del gen *EXG1*, es la causa de la existencia de dos exo- β -glucanasas en *S. cerevisiae* con diferentes masas moleculares y diferentes propiedades cinéticas pero relacionadas inmunológicamente (Nebreda *et al.*, 1987). En nuestro caso, las diferencias observadas para las β -glucanasas estudiadas no se deben a diferentes estados de glicosilación.

El análisis de las secuencias parciales de aminoácidos obtenidas para la β -1,6-II y para la β -1,3-I (tabla 15) con las secuencias disponibles en las bases de datos no ofreció ninguna información acerca de la identidad de los péptidos obtenidos con otras β -glucanasas, ni con otras proteínas que degradan polisacáridos de otros organismos.

Los antisueros anti- β -1,6-II han permitido realizar ensayos de inmunoreacción cruzada con el resto de las β -glucanasas incluyendo las celulasas presentes al menos en las preparaciones de Novozym™ 234. Los resultados obtenidos indican la distinta naturaleza antigénica de las β -glucanasas ensayadas (figura 29) y evidencia que la β -1,6-II (43 kDa) no es un producto proteolítico de la β -1,6-I (51 kDa) y por tanto, que ambas enzimas están probablemente codificadas por genes distintos. Igualmente, las β -glucanasas purificadas en este trabajo son diferentes inmunológicamente a las β -1,3-glucanasas ácidas y básicas de tabaco pues tampoco inmunoreaccionaron con los antisueros disponibles contra estas enzimas vegetales (Kauffmann *et al.*, 1987).

Las β -glucanasas purificadas, con ligeras diferencias entre ellas, son específicas para sus sustratos (tabla 16). La β -1,6-II es altamente específica para los β -1,6-glucanos lineales (pustulan) y para los β -1,3-1,6-glucanos ramificados (glucano de levadura). La β -1,6-I hidroliza también estos dos sustratos, pero su acción hacia el glucano de levadura es más eficiente; además esta enzima hidroliza laminarina (β -1,3-glucano con ramificaciones β -1,6-glucosídicas) pero no pachiman (β -1,3-glucano), por lo que la actividad frente a laminarina puede ser consecuencia de la acción sobre los enlaces β -1,6-glucosídicos. Finalmente, la β -1,3-I hidroliza con la misma eficiencia laminarina y glucano de levadura, y menos eficientemente pachiman, todos ellos conteniendo enlaces β -1,3-glucosídicos; esta enzima posee una actividad minoritaria frente a pustulan que podrían ser resultado de una débil actividad frente a este sustrato inherente al enzima o bien a pequeñas contaminaciones de la β -1,6-I durante el proceso de purificación.

En cuanto a la afinidad de las enzimas purificadas por sus sustratos, las constantes de Michaelis-Menten calculadas para las β -1,6-glucanasas, si bien la obtenida para la β -1,6-I es algo inferior, son del orden de las encontradas para estas enzimas (Hiura *et al.*, 1987). La K_m calculada para la β -1,3-glucanasa es del orden de 10 veces inferior a las generalmente descritas (Fleet y Phaff, 1974; Sánchez *et al.*, 1982b; Tangarone *et al.*, 1989), salvo en casos excepcionales donde la K_m es similar a la calculada en nuestro caso (Rapp, 1992).

Tanto las β -1,6-glucanasas como la β -1,3-glucanasa de este trabajo, presentan mecanismos de tipo endohidrolítico, con ligeras diferencias en los productos de hidrólisis (figuras 30, 31 y 32). Ambas β -1,6-glucanasas generan a partir de pustulan series de oligosacáridos de menor masa molecular, pero mientras que los productos finales mayoritarios de la hidrólisis por la β -1,6-I fueron la gentibiosa (Glc₂) y la glucosa, el producto mayoritario de la hidrólisis por la β -1,6-II fue únicamente la gentibiosa. Con respecto a la β -1,3-glucanasa, los productos mayoritarios de hidrólisis fueron la laminarotetraosa (Glc₄), la laminarobiosa (Glc₂) y la glucosa. Ninguna de las enzimas presentó actividad β -glucosidasa, propia de algunas exo- β -glucanasas (Fleet y Phaff, 1975; Nebreda *et al.*, 1987), pues ni la gentibiosa en el caso de las β -1,6-glucanasas ni la laminarobiosa en el caso de la β -1,3-glucanasa fueron susceptibles de hidrólisis. Así pues, tanto las dos β -1,6-glucanasas como la β -1,3-glucanasa son semejantes a otras β -glucanasas de tipo endohidrolítico como algunas β -1,3-glucanasas de levaduras (Reichelt y Fleet, 1981; Villa *et al.*, 1979), las β -1,6-glucanasas de *G. fujikuroi* (Shibata y Fukimbara, 1973), *N. crassa* (Hiura *et al.*, 1987) y de *R. chinensis* (Yamamoto *et al.*, 1974) o la β -1,3-glucanasa I de *S. glaucum* (Rapp, 1992) y la β -1,3-glucanasa de *T. longibrachiatum* (Tangarone *et al.*, 1987) y distintas de las β -glucanasas descritas en levaduras, que muestran actividad β -1,3 y β -1,6-glucanasa y actividad β -glucosidasa, siendo su mecanismo de acción exohidrolítico (Fleet y Phaff, 1975; Vázquez de Aldana *et al.*, 1991). En particular, la β -1,3-glucanasa purificada en este trabajo, es diferente a las descritas en *T. harzianum* (Kitamoto *et al.*, 1987) y en *T. reesei* (Bamforth, 1980) que, como el resto de las exo- β -1,3-glucanasas descritas (Jeffcoat y Kirkwood, 1987), presentan mecanismos de tipo exohidrolítico, liberando glucosa desde el extremo no reductor de la laminarina. En estos casos, la oxidación con ácido peryódico de este extremo, imposibilita la acción enzimática de las exo- β -1,3-glucanasas (Nelson, 1975) pero no la de las endo- β -1,3-glucanasas, como es nuestro caso.

5.2.3. Enzima que degrada paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100 purificada de *T. harzianum* CECT 2413

En las paredes celulares de los hongos filamentosos, la quitina, los β -glucanos y otros compuestos (α -glucanos, proteínas, etc.; apartado 1.4.1) se diferencian en estructura, distribución y disposición en los diferentes grupos taxonómicos (Garraway y Evans, 1984; Peberdy, 1990). Con objeto de profundizar en el análisis de otras enzimas que *T. harzianum* CECT 2413 pudiera excretar en presencia de quitina y que fuesen importantes en su acción micoparasitaria, se ha procedido a la identificación de enzimas que pudieran unirse y

degradar paredes celulares de hongos fitopatógenos. El estudio se ha iniciado aislando y purificando una proteína con capacidad lítica sobre paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100, utilizando como pasos de purificación, la adsorción específica a paredes de este hongo, la posterior hidrólisis de las mismas y finalmente, la técnica de filtración en gel (apartado 4.5).

La proteína purificada es monomérica de unos 70 kDa de masa molecular, de pI casi neutro y aparentemente no está glicosilada. La única característica cinética determinada fue su especificidad por sustrato, propiedad que resultó interesante puesto que, de entre todos los sustratos ensayados incluidos paredes celulares de otros hongos, la enzima hidroliza única y específicamente paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100 (tabla 19). Además, la enzima no posee actividad frente a sustratos aislados como la quitina coloidal, los β -1,3 ó β -1,6-glucanos o sustratos comerciales de proteasas (*Hide powder azure*) a diferencia de otras enzimas con capacidad para hidrolizar paredes celulares de levaduras u hongos o de lisar estos mismos organismos, como son las quitinasas (Collinge *et al.*, 1993), las β -1,3-glucanasas (Usui *et al.*, 1985; Andrews y Asenjo, 1987), las β -1,6-glucanasas (Rombouts y Phaff, 1976), las proteasas (Scott y Schekman, 1980; Geremia *et al.*, 1993) o combinaciones de las mismas actuando sinérgicamente (Scott y Schekman, 1980; Andrews y Asenjo, 1987; Mauch *et al.*, 1988). Dado que la pared celular de los hongos pertenecientes al género *Botrytis* contiene en sus paredes celulares β -glucanos y quitina como polímeros mayoritarios (Peberdy, 1990) y dada la actividad clarificadora que la enzima purificada posee frente a estas paredes (apartado 4.5.4), no se descarta la posibilidad de que esta enzima sea una β -glucanasa o una quitinasa altamente específica de la pared celular de *B. cinerea* CECT 2100, incapaz de actuar sobre los mismos polímeros purificados de otros organismos y utilizados en nuestros ensayos.

5.3. PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS ENZIMAS ESTUDIADAS

Puesto que, las quitinasas y las β -glucanasas cumplen diferentes funciones en los diferentes hongos filamentosos que presentan una o varias de estas actividades (apartados 1.4.2, 1.4.3 y 1.4.4) y que el papel directo de estas hidrolasas en el proceso micoparasitario de *Trichoderma* no ha sido establecido de forma definitiva (Chet *et al.*, 1993), se discute a continuación la función de las enzimas estudiadas en este trabajo.

Son varios los bloques de resultados que implican a las enzimas estudiadas en el saprofitismo o en el micoparasitismo de *T. harzianum* CECT 2413. Entre ellas, se incluyen

el carácter extracelular y la regulación observada para las mismas (apartado 5.1), la presencia de actividades líticas asociadas a las proteínas purificadas (apartados 4.3.4, 4.4.4 y 4.5.4) y la distribución de algunas de ellas en distintas cepas micoparásitas y no micoparásitas de *Trichoderma* y *Gliocladium* (apartado 4.6).

En cuanto al primer bloque, las β -glucanasas y quitinasas estudiadas son extracelulares, inducibles por sustrato y reprimibles por fuentes de carbono fácilmente asimilables. Las β -glucanasas y quitinasas de origen fúngico que son constitutivas y que generalmente se localizan en los espacios periplásmicos o en las paredes celulares, participan en los procesos morfogenéticos de extensión de la pared celular y están asociadas frecuentemente con las sintetetasas de β -glucanos o de quitina (Bamforth, 1980; Hiura *et al.*, 1986; Pedraza-Reyes y López-Romero, 1989; Tangarone *et al.*, 1989). Otras, generalmente localizadas en la pared celular, aunque también las hay de carácter extracelular, son reprimibles por fuentes de carbono fácilmente asimilables y se desreprimen cuando se agotan estas fuentes de carbono; la desrepresión en estos casos, está asociada habitualmente a la autólisis de los micelios o a una degradación de los β -glucanos que algunos de estos hongos excretan (Copa-Patiño *et al.*, 1989; Rapp, 1992; Reyes *et al.*, 1989; Sánchez *et al.*, 1982b). En nuestro caso, se observa inducción por sustrato, represión catabólica y una ligera desrepresión en situaciones de carencia de fuente de carbono (apartado 4.1). Probablemente, la inducción por sustrato implica una función nutricional de las enzimas para utilizar los sustratos como fuentes de carbono, la represión catabólica implica que otras fuentes de carbono mejor asimilables están disponibles y que estas enzimas no cumplen papeles durante la extensión de la pared celular que acompaña al crecimiento de las hifas y la casi ausencia de desrepresión en concentraciones de fuente de carbono bajas o nulas implica que estas enzimas tampoco cumplen un papel crucial durante la autólisis de *T. harzianum*. Más sorprendente, es la aparición de actividades β -1,3-glucanasa y β -1,6-glucanasa (este trabajo) y proteasa (Geremia *et al.*, 1993) en presencia de quitina, sustrato no hidrolizable por las actividades enzimáticas anteriores. Esta observación puede poner de manifiesto la existencia de un sistema de regulación o de coordinación global de estas enzimas, junto a otras no determinadas y las quitinasas, con un papel biológico relevante puesto que en la Naturaleza los sustratos para éstas se encuentran todos presentes por ejemplo, en las paredes celulares de los hongos. Procesos de respuesta coordinada suceden de hecho para los sistemas de defensa de plantas frente a sus patógenos (Ward *et al.*, 1991) y no es extraño que pueda suceder de una manera análoga en los procesos de ataque de los hongos micoparásitos, incluyendo los del género *Trichoderma* (Papavizas, 1985; Harman *et al.*, 1993). Así pues, la quitina, como previamente se ha sugerido (Goldman, 1993), puede servir como una fuente

de carbono adecuada que simule las condiciones que desencadenan el proceso micoparasitario de *Trichoderma*.

Los estudios de actividades líticas realizados en este trabajo indican que la mayoría las enzimas estudiadas son capaces de hidrolizar paredes celulares de hongos filamentosos y fitopatógenos (figura 22, tablas 17 y 19) y que algunas de ellas cuando actúan en combinación tienen actividades sinérgicas (figura 22). En este sentido, los experimentos referidos a los efectos de preparaciones enzimáticas sobre la inhibición del crecimiento y la germinación de hongos filamentosos y fitopatógenos (Ludwig y Boller, 1990), realizados con quitinasas y β -1,3-glucanasas de plantas (Mauch *et al.*, 1988; Collinge *et al.*, 1993) y con quitinasas de hongos (di Pietro *et al.*, 1993; Lorito *et al.*, 1993), no se han podido optimizar, hasta la fecha, en nuestro caso.

Finalmente, se ha estudiado la presencia de las actividades quitinasa, β -glucanasa y lítica en distintas cepas micoparásitas y no micoparásitas de *Trichoderma* y *Gliocladium* cultivadas en glucosa o quitina como fuente de carbono (tablas 20, 21, 22 y 23). Los resultados obtenidos sugieren que las actividades anteriores juegan un papel en el micoparasitismo puesto que, en general, los valores de las actividades, en quitina como fuente de carbono, fueron superiores en las cepas micoparásitas que en las no micoparásitas, incluidas las actividades líticas que fueron significativamente superiores en dos de las cepas micoparásitas respecto al resto (tabla 23). Cuando se ensayaron los antisueros obtenidos contra las quitinasas y la β -1,6-glucanasa (β -1,6-II) se encontraron diferencias significativas en el patrón de inmunoreacción (figuras 35, 36, 37 y 38). Los antisueros obtenidos contra las quitinasas sólo reconocieron las quitinasas correspondientes (a las 48 h de cultivo) en tres de las cepas descritas como micoparásitas indicando pues que, la síntesis y excreción de estas enzimas pueden estar más relacionadas con el micoparasitismo que con el saprofitismo. Los resultados obtenidos con el antisuero anti-CHIT 42 se han confirmado mediante análisis de Northern con RNA extraído de las distintas cepas e hibridación con el cDNA correspondiente de CHIT 42 (Irene García, Tesis Doctoral en realización, Universidad de Sevilla). El antisuero anti- β -1,6-glucanasa dió inmunoreacción cruzada en todas las cepas, por lo que esta enzima además de una función micoparasitaria puede tener también una función saprofitica.

6. CONCLUSIONES

1. Los niveles de actividad quitinasa, β -1,3-glucanasa y β -1,6-glucanasa de *Trichoderma harzianum* CECT 2413 están modulados por la fuente de carbono empleada en el cultivo. Este fenómeno parece ser debido a un proceso de regulación transcripcional de inducción por sustrato y represión catabólica.
2. *T. harzianum* CECT 2413 presenta tres isoenzimas extracelulares con actividad quitinasa cuando crece en quitina como única fuente de carbono. Las tres isoenzimas presentan propiedades físico-químicas, cinéticas e inmunológicas distintas y probablemente están codificadas por genes diferentes.
3. *T. harzianum* CECT 2413 presenta también dos isoenzimas extracelulares con actividad β -1,6-glucanasa cuando crece en quitina como única fuente de carbono. Las dos isoenzimas presentan propiedades físico-químicas, cinéticas e inmunológicas distintas y probablemente están codificadas por genes diferentes.
4. *T. harzianum* CECT 2413 excreta a los medios de cultivo con quitina como única fuente de carbono tres isoenzimas con actividad β -1,3-glucanasa. Las características físico-químicas y cinéticas correspondientes a la isoenzima purificada son muy similares a las indicadas para la β -1,3-glucanasa descrita en *T. longibrachiatum* pero diferentes a la descrita en otras estirpes de *T. harzianum*.
5. Los preparaciones extracelulares de los cultivos de *T. harzianum* CECT 2413 crecidos en quitina como única fuente de carbono presentan actividad lítica sobre paredes celulares de *S. cerevisiae* y de hongos filamentosos. La acción lítica sobre paredes celulares de *B. cinerea* CECT 2100 es consecuencia de, al menos, la participación de una proteína que se adsorbe selectivamente a las paredes celulares del mismo.
6. Los niveles de actividad quitinasa, β -1,3-glucanasa y β -1,6-glucanasa en medios con quitina son más elevados en cepas micoparásitas de *Trichoderma* y *Gliocladium*. Dada su distribución en las diferentes cepas micoparásitas y no micoparásitas, las tres quitinasas de *T. harzianum* CECT 2413 parece estar directamente implicadas en la acción micoparasitaria de éste, mientras que la β -1,6-glucanasa (β -1,6-II) no parece estar relacionada únicamente con este proceso.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abuja, P., Pilz, I., Claeysens, M. y Tomme, P.** 1988. Domain structure of cellobiohydrolase II as studied by small angle X-ray scattering: close resemblance to cellobiohydrolase I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 180-185.
- Ahmad, J. S. y Baker, R.** 1987. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* **77**, 358-362.
- Anderson, J. R. y Ullrich, R. C.** 1979. Biological species of *Armillaria mellea* in North America. *Mycologia* **71**, 402-414.
- Andrews, B. A. y Asenjo, J. A.** 1987. Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. *Trends Biotechnol.* **5**, 273-277.
- Andrews, P.** 1965. The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem J.* **96**, 595-606.
- Ary, M. B., Richardson, M y Shewry, P. R.** 1989. Purification and characterization of an insect α -amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's tears (*Coix lachryma-jobi*). *Biochim. Biophys. Acta* **993**, 260-266.
- Baker, R.** 1989. Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. *Trends Biotechnol.* **7**, 34-38.
- Bamforth, C. W.** 1980. The adaptability, purification and properties of exo- β -1,3-glucanase from the fungus *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* **191**, 863-866.
- Barak, R., Elad, Y. y Chet, I.** 1986. The properties of L-fucose binding agglutinin associated with the cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* **144**, 346-349.
- Barak, R., Elad, Y., Mirelman, D. y Chet, I.** 1985. Lectins: a possible basis for specific recognition in *Trichoderma-Sclerotium rolfii* interaction. *Phytopathology* **75**, 458-462.

Barnett, C. C., Berka, R. M. y Fowler, T. 1991. Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Bio/Technology* **9**, 562-567.

Béguin, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Ann. Rev. Microbiol.* **44**, 219-248.

Benítez, T. 1976. Estudios analíticos y morfogénicos en paredes celulares de *Trichoderma viride*. *Tesis Doctoral*; Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca.

Blaiseau, P. L. y Lafay, J. F. 1992. Primary structure of a chitinase-encoding gene (*chl*) from the filamentous fungus *Aphanocladium album*: similarity to bacterial chitinases. *Gene* **120**, 243-248.

Blaiseau, P. L., Kunz, C., Grison, R., Bertheau, Y. y Brygoo, Y. 1992. Cloning and expression of a chitinase gene from the hyperparasitic fungus *Aphanocladium album*. *Curr. Genet.* **21**, 61-66.

Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. y Vögeli, U. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* **157**, 22-31.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **62**, 248-254.

Brewer, J. M., Pesce, A. J. y Spencer, T. E. (eds.). 1974. *Experimental techniques in Biochemistry*. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs. New Jersey.

Brown, P. A., Segal, E. L., Maley, F., Trimble, R. B. y Chu, F. 1979. Effect of deglycosylation of yeast invertase on its activity and digestion in rat yolk sacs. *J. Biol. Chem.* **254**, 3689-3691.

Butler, A. R., O'Donnell, R. W., Martin, V. J., Gooday G. W. y Stark, M. J. R. 1991. *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Eur. J. Biochem.* **199**, 483-488.

- Cabib, E.** 1987. The synthesis and degradation of chitin. En *Advances in Enzymology and related areas of Molecular Biology*. pp. 59-101. A. Meisler (ed.). Wiley. New York.
- Carvalho, F., Gheysen, G., Kushnir, S., van Montagu, M., Inzé, D. y Castresana, C.** 1992. Suppression of β -1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J.* **11**, 2595-2602.
- Chen, C. M., Gritzali, M. y Stafford, D. W.** 1987. Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* **5**, 274-278.
- Chet, I.** 1990. Mycoparasitism: recognition, physiology and ecology. En *New Directions in Biological Control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. pp. 725-733. R. Baker y P. E. Dum (eds.). Alan R. Liss, Inc. New York.
- Chet, I., Barak, Z. y Oppenheim, A.** 1993. Genetic engineering of microorganisms for improved biocontrol activity. En *Biotechnology in plant disease control*. pp. 211-235. I. Chet (ed.). Wiley Liss, Inc. New York.
- Chet, I., Harman, G. E. y Baker, R.** 1981. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora* spp. *Microbiol. Ecol.* **7**, 29-38.
- Chirico, W. J. y Brown, R. D. Jr.** 1987. Purification and characterization of a β -glucosidase from *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Biochem.* **165**, 333-341.
- Chrispeels, M. J. y Raiknel, N. V.** 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* **3**, 1-9.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U. y Vad, K.** 1993. Plant chitinases. *Plant J.* **3**, 31-40.
- Copa-Patiño, J. L., Reyes, F. y Pérez-Leblic, M. I.** 1989. Purification and properties of a 1,3- β -glucanase from *Penicillium oxalicum* autolysates. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**, 285-292.

- Correa, J. U., Elango, N., Polacheck, I. y Cabib, E. 1982. Endochitinase, a mannan-associated enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **257**, 1392-1397.
- Correa, J. U., Vazquez de Aldana, C. R., San Segundo, P. y del Rey, F. 1992. Genetic mapping of 1,3- β -glucanase-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **22**, 283-288.
- Danielson, R. M. y Davey, C. B. 1973. Effects on nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma in vitro*. *Soil Biol. Biochem.* **5**, 517-524.
- Davet, P. 1990. La utilización de *Trichoderma* en la lucha de los hongos del suelo. *Cuadernos de Fitopatología* **26**, 223-232.
- de Jong, A. K., Cordewener, J., lo Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerckhove, J. van Kammen, A. y de Vries, S. C. 1992. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* **4**, 425-433.
- del Rey, F., García-Acha, I. y Nombela, C. 1979. The regulation of β -glucanase synthesis in fungi and yeast. *J. Gen. Microbiol.* **110**, 83-89.
- Delic, I., Robbins, P. y Westpheling, J. 1992. Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. *Proc. Natl. Acad. USA* **89**, 1885-1889.
- Dennis, C. y Webster, J. 1971a. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **57**, 25-39.
- Dennis, C. y Webster, J. 1971b. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **57**, 41-48.
- Dennis, C. y Webster, J. 1971c. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interactions. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **57**, 363-369.
- Deshpande, M. V. 1986. Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *J. Scient. Ind. Res.* **45**, 273-281.

Devereux, J., Haeberli, P. y Smithies, O. 1984. A comprehensive set of sequences analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.

di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C. K., Broadway, R. M. y Harman, G. E. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with Gliotoxin. *Phytopathology* **83**, 308-313.

Doan, D. N. P. y Fincher, G. B. 1992. Differences in the thermostabilities of barley (1-3, 1-4)- β -glucanases are only partly determined by N-glycosilation. *FEBS Lett.* **309**, 265-271.

Dubray, G. y Bezar, B. 1982. A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glicoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**, 325-329.

El-Gogary, S., Leite, A., Crivellaro, O., Eveleigh, D. E. y El-Dorry, H. 1989. Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6138-6141.

Elad, Y., Barak, R. y Chet, I. 1983a. Possible role of lectins in mycoparasitism. *J. Bacteriol.* **154**, 1431-1435.

Elad, Y., Barak, R. y Chet, I. 1984. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. *Soil. Biol. Biochem.* **16**, 381-386.

Elad, Y., Chet, I. y Henis Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* **28**, 719-725.

Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. y Henis Y. 1983b. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* **73**, 85-88.

Elango, N., Correa, J. U. y Cabib, E. 1982. Secretory character of yeast chitinase. *J. Biol. Chem.* **257**, 1398-1400.

Fassatiova, O. 1986. Moulds and filamentous fungi in technical microbiology. En *Progress in industrial microbiology* (vol. 22). pp. 81-83. O. Fassatiova (ed.). Elsevier. Amsterdam.

Fincher, G. B. 1989. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 305-46.

Fleet, G. y Phaff, H. J. 1975. Glucanases in *Schizosaccharomyces*. Isolation and properties of an exo- β -glucanase from the cell extracts and culture fluid of *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **401**, 318-332.

Fleet, G. y Phaff, H., J. 1974. Glucanases in *Schizosaccharomyces*: isolation and properties of the cell wall-associated β -1,3-glucanases. *J. Biol. Chem.* **249**, 1717-1728.

Fowler, T. y Brown, R.D. Jr. 1992. The *bgl1* gene encoding extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulose complex. *Mol. Microbiol.* **6**, 3225-3235.

Garraway, M. O. y Evans, R. C. 1984. *Fungal nutrition and physiology*. Wiley-interscience publications. J. Wiley (ed.). New York.

Geremia, R. A., Goldman, G. H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S. B., van Montagu, M. y Herrera-Estrella, A. 1993. Molecular characterization of a proteinase-encoding gene, *pbr1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* **8**, 603-613.

Goldman, G. 1993. Molecular genetics studies of mycoparasitism by *Trichoderma* spp. *Tesis Doctoral*; Laboratorium voor Genetica. Universidad de Gante; Gante, Bélgica.

Gooday, G. W., Humphreys, M. y McIntosh, W. H. 1985. Roles of chitinases in fungal growth. En *chitin in nature and technology*. pp. 83-91. R. Muzarelli, C. Jeuniaux y G. W. Gooday (eds.). Plenum Press, New York.

- Harkki, A., Uusitalo, J., Bailey, M., Penttilä, M. y Knowles, J. 1987. Efficient secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* **7**, 596-603.
- Harman, G. E., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadway, R. M., di Prieto, A., Peterbauer, C. y Tronswo, A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* **83**, 313-318.
- Harpster, M. H. y Dunsmuir, P. 1989. Nucleotide sequence of the chitinase B gene of *Serratia marcescens* QMB1466. *Nucleic Acids Res.* **17**, 5395-5395.
- Herrera-Estrella, A., Goldman, G., van Montagu, M. y Geremia, R. 1993. Electrophoretic karyotype and gene assignment to resolved chromosomes of *Trichoderma* spp. *Mol. Microbiol.* **7**, 515-521.
- Hiura, N., Kobayashi, M., Nakajima, T. y Matsuda, K. 1986. Purification and some properties of two wall-associated β -1,3-glucanases from *Neurospora crassa* cells. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2461-2467.
- Hiura, N., Nakajima, T. y Matsuda, K. 1987. Purification and some properties of an endo- β -1,6-glucanase from *Neurospora crassa*. *Agric. Biol. Chem.* **12**, 3315-3321.
- Hofer, F., Weissinger, E., Mischak, H., Messner, R., Meixner-Moroni, B., Blaas, D., Visser J. y Kubicek, C. P. 1989. A monoclonal antibody against the alkaline extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: reactivity with other *Trichoderma* β -glucosidases. *Biochim. Biophys. Acta* **992**, 298-306.
- Horwith, B. A., Gressel, J. y Malkin, S. 1985. Photoperception mutants in *Trichoderma*: mutants that sporulate in response to stress but not light. *Curr. Genet.* **9**, 605-613.
- Håkansson, U., Fägerstam, L. G., Pettersson, G. y Andersson, L. 1974. A 1,4- β -glucan glucanohydrolase from the cellulolytic fungus *Trichoderma viride* QM 9414. *Biochem. J.* **179**, 141-149.

- Inbar, J. y Chet, I.** 1992. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *J. Bacteriol.* **174**, 1055-1059.
- Jacobsen, S., Mikkelsen, J. D. y Hejgaard, J.** 1990. Characterization of two antifungal endochitinases from barley grain. *Physiol. Plant.* **79**, 554-562.
- Jeaniaux, C.** 1966. Chitinases. *Methods Enzymol.* **8**, 644-650.
- Jeffcoat, R. y Kirkwood, S.** 1987. Implication of histidine at the active site of exo- β -(1-3)-D-glucanase from *Basidiomycete* sp. QM 806. *J. Biol. Chem.* **262**, 1088-1091.
- Jekel, P. A., Hartmann, J. B. H. y Beintema, J. J.** 1991. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. *Eur. J. Biochem.* **200**, 123-130.
- Jones, J. D. G., Grady, K. L., Suslow, T. V. y Bedbrook, J. R.** 1986. Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. *EMBO J.* **5**, 467-473.
- Joshi, S., Kozlowski, M., Srulovicz, M. y Davies, R. W.** 1987. Chitinase and chitobiase overproduction from genetically engineered *Serratia liquefaciens*. En *Industrial polysaccharides: genetic engineering, structure-properties relations and applications*. pp. 95-99. M. Yalpani (ed.). Elsevier. Amsterdam.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. y Fritig, B.** 1987. Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO J.* **6**, 3209-3212.
- Keen N. T. y Yoshikawa.** 1983. β -1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. *Plant Physiol.* **71**, 460-465.
- Kitamoto, Y., Kono, R., Shimotori, A., Mori, N. e Ichikawa, Y.** 1987. Purification and some properties of an exo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 3385-3386.

- Knowles, J., Lehtovaara, P. y Teeri, T. T.** 1987. Cellulase families and their genes. *Trends Biotechnol.* **8**, 255-261.
- Kubicek, C. P., Messner, R., Gruber, F., Mandels, M. y Kubicek-Pranz, E. M.** 1993. Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*: involvement of a constitutive, sophorose-inducible, glucose-inhibited β -diglucoside permease. *J. Biol. Chem.* **268**, 19364-19368.
- Kunz, C., Sellan, O. y Bertheau, Y.** 1992. Purification and characterization of a chitinase from the hyperparasitic fungus *Aphanocladium album*. *Physiol. Mol. Pathol.* **40**, 117-131.
- Kuranda, M. J. y Robbins P. W.** 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, 19758-19767.
- Lamb, C. J., Ryals, J. A., Ward, E. R. y Dixon, R. A.** 1992. Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. *Bio/Technology* **10**, 1436-1444.
- Laurent, T. C. y Kilander, J.** 1964. A theory of gel filtration and its experimental verification. *J. Chromatog.* **14**, 317-330.
- Lewis, J. A. y Papavizas, G. C.** 1984. Chlamydospore formation by *Trichoderma* spp. in natural substrates. *Can. J. Microbiol.* **30**, 1-7.
- Lewis, K., Whipps, J. M. y Cooke, R. C.** 1989. Mechanisms of biological disease control with special reference to the case study of *Phytophthora oligandrum* as an antagonist. En *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. pp. 191-217. British Mycological Society Series. Cambridge.
- Linthorst, H. J. M., Melchers, L. S., Mayer, A., van Roekel, J. S. C., Cornelissen, B. J. C. y Bol, J. F.** 1990. Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3-glucanases of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8756-8760.
- Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L., di Pietro, A.** 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma*

harzianum, antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* **83**, 302-307.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Ludwig, A. y Boller, T. 1990. A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**, 61-66.

Malcolm, B. A., Rosenberg, S., Corey, M. J., Allen J. S., Baetselier, A. y Kirsch, J. F. 1989. Site-directed mutagenesis of the catalytic residues Asp-52 and Glu-35 of chicken egg white lysozyme. *Proc. Natl. Acad. USA* **86**, 133-137.

Mäntylä, A., Rossi, H., Vanhanen, S., Penttilä, M., Suominen, P. y Nevalainen, H. 1991. Electrophoretical karyotyping of wild type and mutant *Trichoderma reesei* strains. En *EMBO Workshop on molecular biology of filamentous fungi*. Abstract A 15. Berlin.

Markwell, M. A., Hass, S. M., Bieber, L. L. y Tolbert, N. E. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **87**, 206-210.

Matsudaira, P. T. (ed.). 1989. *A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing*. Academic Press, Inc. New York.

Mauch, F., Mauch-Mani, B. y Boller T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* **88**, 936-942.

Mc Grew, B. R. y Green M. D. 1990. Enhanced removal of detergent and recovery of enzymatic activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: use of casein in gel wash buffer. *Anal. Biochem.* **189**, 68-74.

Metraux, J. P., Burkhart, V., Mayer, M., Dincher, S., Middlesteadt, W., Willians, S., Payne, G., Carnes, M. y Ryals, J. A. 1989. Isolation of a

complementary DNA encoding a chitinase with structural homology to a bifunctional lysozyme/chitinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 896-900.

Meyer, R. J. 1991. Mitochondrial DNAs and plasmids as taxonomic characteristics in *Trichoderma viride*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2269-2276.

Meyer, R. J., Morawetz, R., Börner, T. y Kubicek, C. P. 1992. The use of DNA-fingerprint analysis in the classification of some species of the *Trichoderma* aggregate. *Curr. Genet.* **21**, 27-30.

Molano, J., Durán, A. y Cabib, E. 1977. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal. Biochem.* **83**, 648-656.

Montenecourt, B. S. 1983. *Trichoderma reesei* cellulases. *Trends Biotechnol.* **1**, 156-161.

Mrsa, V., Klebl, F. y Tanner, W. 1993. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 gene product, a cell wall endo- β -1,3-glucanase. *J. Bacteriol.* **175**, 2102-2106.

Muthukumar, G., Suhng, S. Magee, P. T., Jewell, R. y Primerano, D. A. 1993. The *Saccharomyces cerevisiae* SPRI gene encodes a sporulation-specific exo-1,3- β -glucanase which contributes to ascospore thermoresistance. *J. Bacteriol.* **175**, 386-394.

Nakas, J. P. y Hagedorn, C. (eds.). 1990. *Environmental Biotechnology: Biotechnology of plant-microbe interactions*. McGraw-Hill Publishing Co. New York.

Nebreda, A. R., Vazquez C. R., Villa, T. G., Villanueva, J. R. y del Rey, F. 1987. Heterogeneous glycosylation of the EXG1 gene product accounts for the two extracellular exo- β -glucanases of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **220**, 27-30.

Nelson, N. J. 1957. Colorimetric analysis of sugars. *Methods Enzymol.* **3**, 85-86.

Nelson, T. E. 1975. The attack mechanism of an exo-1,3- β -glucosidase from *Basidiomycete* sp. QM 806. *Biochim. Biophys. Acta* **377**, 139-145.

- Neuhaus, J. M., Sticher, L., Meins, F. y Boller, T. 1991. A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc. Natl. Acad. USA* **88**, 10362-10366.
- Nevalainen, H., Penttilä, M. E., Harkki, A., Teeri, T. T. y Knowles, J. 1991. The molecular biology of *Trichoderma* and its application to the expression of both homologous and heterologous genes. En *Molecular Industrial Mycology. Systems and Applications for filamentous fungi*. pp. 129-148. S. A. Leong y R. M. Berka (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York.
- Nummi, M., Niku-Paavola, M. L., Lappalainen, A., Enari, T. M. y Raunio, V. 1983. Cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* **215**, 677-683.
- Ohtakara, A. 1988. Chitinase and β -N-acetyl hexosaminidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Methods Enzymol.* **161**, 462-470.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* **23**, 23-54.
- Peberdy, J. F. 1990. Fungal cell walls- A review. En *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. pp. 5-24. P. J. Kuhn, A. P. J. Trinci, M. J. Jung, M. W. Goosey y L. G. Copping (eds.). Springer-Verlag. Heidelberg.
- Pedraza-Reyes, M. y López-Romero, E. 1989. Purification and some properties of two forms of chitinase from mycelial cells of *Mucor rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 211-218.
- Pegg, G. F. 1988. Chitinase from *Verticillium albo-atrum*. *Methods Enzymol.* **161**, 474-479.
- Penttilä, M. E., André, L., Lehtovaara, P., Bailey, M., Teeri, T. T. y Knowles, J. K. C. 1988. Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **63**, 103-112.

Penttilä, M. E., André, L., Saloheimo, M., Lehtovaara, P. y Knowles, J. K. C. 1987. Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **3**, 175-185.

Penttilä, M. E., Lehtovaara, P., Nevalainen, H., Bhikhabhai, R. y Knowles, J. K. C. 1986. Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene* **45**, 253-263.

Rapp, P. 1992. Formation, separation and characterization of three β -1,3-glucanases from *Sclerotium glaucanicum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1117**, 7-14.

Reese, E. T. y Mandels, M. 1959. β -D-1,3 glucanases in fungi. *Can. J. Microbiol.* **5**, 173-185.

Reese, E. T., Parrish, F. W. y Mandels, M. 1962. β -D-1,6-glucanases in fungi. *Can. J. Microbiol.* **8**, 327-334.

Reichelt, B. Y. y Fleet, G. 1981. Isolation, properties, function, and regulation of endo-1,3- β -glucanases in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **147**, 1085-1094.

Reissig, J. L., Strominger, J. L. y Leloir, L. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* **27**, 959-966.

Reyes, F., Calatayud, J. y Martínez, M. J. 1989. Endochitinase from *Aspergillus nidulans* implicated in the autolysis of its cell wall. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**, 119-124.

Ridout, C. J., Coley-Smith, J. R. y Lynch, J. M. 1986. Enzyme activity and electrophoretic profile of extracellular protein induced in *Trichoderma* spp. by cell walls of *Rhizoctonia solani*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2345-2352.

Ridout, C. J., Coley-Smith, J. R. y Lynch, J. M. 1988. Fractionation of extracellular enzymes from a mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 180-187.

Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* **116**, 1-56.

Robbins, P. W., Albright, C. y Benfield, B. 1988. Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase-63) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 443-447.

Robbins, P. W., Overbye, K., Albright, C., Benfield, B., y Pero, J. 1992. Cloning and high-level expression of the chitinase-encoding gene of *Streptomyces plicatus*. *Gene* **111**, 69-76.

Roberts, W. S. y Selitrennikoff, C. P. 1988. Plant and bacterial chitinase differs in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 169-176.

Robertson, E. F., Danielly, H. K., Malloy, P. J. y Reeves, H. C. 1987. Rapid isoelectrofocusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **167**, 290-294.

Rombouts, F. M. y Phaff, H. J. 1976. Lysis of yeast cell walls. Lytic β -1,6-glucanase from *Bacillus circulans* WL-12. *Eur. J. Biochem.* **63**, 109-120.

Rosen, D., Edelman, M., Galun, E. y Danon, D. 1974. Biogenesis of mitochondria in *Trichoderma viride*. Structural changes in mitochondria and other spore constituents during conidium maturation and germination. *J. Gen. Microbiol.* **83**, 31-49.

Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K. C. y Jones, T. A. 1990. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* **249**, 380-386.

Royer, J. C. y Nakas, J. P. 1990. Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2535-2539.

Saloheimo, M., Lehtovaara, P., Penttilä, M. E., Teeri, T. T., Ståhlberg, J., Johansson, G., Pettersson, G., Claeyssens, M., Tomme P. y Knowles, J. K. C. 1988. EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme. *Gene* **63**, 11-21.

- Samac, D. A., Hironaka, C. N., Yallaly, P. E. y Shah, D. M. 1990. Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **93**, 907-914.
- Sánchez, A., Villanueva, J. R., y Villa, T. G. 1982a. *Saccharomyces cerevisiae* secretes two exoglucanases. *FEBS Lett.* **138**, 209-212.
- Sánchez, M., Nombela, C., Villanueva, J. R. y Santos T. 1982b. Purification and partial characterization of a developmentally regulated 1,3- β -glucanase from *Penicillium italicum*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2047-2053.
- Santandreu, R., Ruiz-Herrera, J. y Elorza, M. V. 1983. La pared celular de los hongos. *Investigación y Ciencia* **76**, 93-104.
- Santos, T., Sánchez, M., Villanueva, J. R. y Nombela, C. 1978a. Regulation of β -1,3-glucanase synthesis in *Penicillium italicum*: glucose repression of the various enzymes. *J. Bacteriol.* **133**, 466-471.
- Santos, T., Sánchez, M., Villanueva, J. R. y Nombela, C. 1979. Derepression of β -1,3-glucanase in *Penicillium italicum*: localization of the various enzymes and correlation with cell wall glucan mobilization and autolysis. *J. Bacteriol.* **137**, 6-12.
- Santos, T., Villanueva, J. R. y Nombela, C. 1977. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* β -glucanase. *J. Bacteriol.* **129**, 52-58.
- Santos, T., Villanueva, J. R. y Nombela, C. 1978b. Regulation of β -1,3-glucanase system in *Penicillium italicum*. *J. Bacteriol.* **133**, 542-548.
- Scott, J. H. y Schekman, R. 1980. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. *J. Bacteriol.* **142**, 414-423.
- Shibata, Y. y Fukimbara, T. 1972. Enzymic hydrolysis of glucans containing β -1,3 and β -1,6-linkages: β -1,6-glucan hydrolase of fungi. *J. Ferment. Technol.* **50**, 388-396.
- Shibata, Y. y Fukimbara, T. 1973. A β -1,6-glucan 6-glucanohydrolase from *Gibberella fujikuroi*. *J. Ferment. Technol.* **51**, 216-226.

Shoemaker, S., Schweickart, V., Ladner, M., Gelfand, D., Kwok, S., Myambo, K. e Innis, M. 1983. Molecular cloning of the exo-cellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/Technology* **1**, 691-696.

Siegel, L, M. y Monty, K. J. 1966. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxyalanine reductases. *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 346-362.

Sivan, A. y Chet, I. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 675-682.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.

Sprey, B. 1986. Localization of β -glucosidase in *Trichoderma reesei* cell walls with immunoelectron microscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* **36**, 287-292.

Stahman, K. P., Pielken, P., Schimz, K. L. y Sahn, H. 1992. Degradation of extracellular β -(1,3)-(1,6)-D-glucan by *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3347-3354.

Tanaka, H. y Phaff, H. J. 1965. Enzymatic hydrolysis of yeast cell walls. I. Isolation of wall-decomposing organisms and separation and purification of lytic enzymes. *J. Bacteriol.* **89**, 1570-1580.

Tangarone, B., Royer, J. C. y Nakas, J. P. 1989. Purification and characterization of an endo-1,3- β -D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 177-184.

Teeri, T. T., Lehtovaara, P., Kauppinen, S., Salovuori, I. y Knowles, J. K. C. 1987. Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene* **51**, 43-52.

Teeri, T. T., Salovuori, I. y Knowles, J. K. C. 1983. The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* **1**, 696-699.

Tsujibo, H., Minoura, K., Miyamoto, K., Endo, H., Moriwalli, M. y Inamori, Y. 1993. Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 620-622.

Tsujisaka, Y., Hamada, N. y Kobayashi, R. 1981. Purification and some properties of an exo- β -1,3-glucanase from *Basidiomycete* species. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1201-1208.

Uchida, V. y Ohtakara, A. 1988. Chitosanase from *Bacillus* species. *Methods Enzymol.* **161**, 501-510.

Ulhoa, C. J. y Peberdy J. F. 1991. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2163-2169.

Ulhoa, C. J. y Peberdy, J. F. 1992. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 236-240.

Ulhoa, C. J. y Peberdy, J. F. 1993. Effect of carbon source on chitobiase production by *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* **97**, 45-48.

Usui, T., Matsui, H. e Isobe, K. 1990. Enzymic synthesis of useful chito-oligosaccharides utilizing transglycosylation by chitinolytic enzymes in a buffer containing ammonium sulfate. *Carbohydr. Res.* **203**, 65-67.

Usui, T., Tonani, K., Totsuka, A. y Oguchi, M. 1985. Purification of endo- β -D-1,3-glucanase lysing yeast cell walls from *Rhizoctonia solani*. *Biochim. Biophys. Acta* **840**, 255-263.

van Arsdell, J. N., Kwok, S., Schweickart, V., Ladner, M., Gelfand, D. e Innis, M. 1987. Cloning, characterization, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* **5**, 60-64.

van Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeysens, M., Bhikhabhai, R. y Pettersson, G. 1986. Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett.* **204**, 223-227.

Vanhanen, S. 1991. Isolation and characterization of genes involved in basic metabolism of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Tesis Doctoral*; Technical Research Centre of Finland; Espoo, Finlandia.

Vázquez de Aldana, C. R., Correa, J., San Segundo, P., Bueno, A., Nebrada, A. R., Mendez, E. y del Rey, F. 1991. Nucleotide sequence of the exo- β -1,3-glucanase-encoding gene, *EXG1*, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **97**, 173-182.

Villa, T. G., Notario, V. y Villanueva, J. R. 1979. Occurrence of an endo-1,3- β -glucanase in culture fluids of the yeast *Candida utilis*. *Biochem. J.* **177**, 107-114.

Ward, E. R., Uknes, S. J., Willians, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Metraux, J. P. y Ryals, J. A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systematic acquired resistance. *Plant Cell* **3**, 1085-1094.

Watanabe T., Suzuki, K., Oyanagi, W., Ohnishi, K. y Tanaka, H. 1990. Gene cloning of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinase and to the type III homology units of fibronectin. *J. Biol. Chem.* **265**, 15659-15665.

Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., Ohnishi, K. y Tanaka, H. 1992a. Structure of the gene encoding chitinase D of *Bacillus circulans* WL-12 and possible homology of the enzyme to other prokaryotic chitinases and class III plant chitinases. *J. Bacteriol.* **174**, 408-414.

Watanabe, T., Kasahara, N., Aida, K. y Tanaka, H. 1992b. Three N-terminal domains of β -1,3-glucanase A1 are involved in binding to insoluble β -1,3-glucan. *J. Bacteriol.* **174**, 186-190.

Weber, K. y Osborn, M. 1975. Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. En *The proteins*. (vol. 1), pp. 179-221. H. Neurath y R. L. Hill (eds.). Academic Press, Inc. New York.

Weidling, R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* **24**, 1153-1179.

Wood, T. M. 1989. Mechanisms of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi. En *Enzyme System for Lignocellulose Degradation; Commission of the European Communities*. pp. 17-56. M. P. Coughlan (ed.). Elsevier. Amsterdam.

Yamamoto, S., Kobayashi, R. y Nagasaki S. 1974. Purification and properties of an endo β -1,6-glucanase from *Rhizopus chinensis* R-69. *Agric. Biol. Chem.* **38**, 1493-1500.

Yanai, K., Takaya, N., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A. y Takagi, M. 1992. Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes. *J. Bacteriol.* **174**, 7398-7406.

Yoshizumi, H. y Ashikari, T. 1987. Expression, glycosilation and secretion of fungal hydrolases in yeast. *Trends Biotechnol.* **5**, 277-281.

Zarain-Herzberg, A. y Arroyo-Begovich, A. 1983. Chitinolytic activity from *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 3319-3326.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Jesús de la Cruz Díaz titulada Purificación y Caracterización de Hidrolasas implicadas en el micoparasitismo de Trichodaxus horresum acordó otorgarle la calificación de APTO Com Laude por UNANIMIDAD

Sevilla, 11 de Febrero 1994

El Vocal,



El Presidente



El Vocal,

M. Isabel González

El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,

