



PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE 4 ENZIMAS β -1,3-GLUCANASAS DE *Trichoderma harzianum* Y SU EFECTO EN HONGOS FITOPATÓGENOS

Aidee Ramos García, Flora Estela Muñiz Lozano, Montserrat Ramírez Suero y Mario Ramírez-Lepe
Instituto Tecnológico de Veracruz Av. M.A. de Quevedo No. 2779 Col. Formando Hogar C.P. 91897 Veracruz,
Ver. Fax: (2299) 34 57 01. E. Mail: lepe@itver.edu.mx

Palabras clave: Purificación, *Trichoderma harzianum*, glucanasa

Introducción. Las β -1,3- glucanasas producidas por algunos microorganismos inhiben el crecimiento de hongos patógenos. Estas enzimas desempeñan un papel de suma importancia: en los vegetales, se expresan como un mecanismo de defensa hacia los hongos que lo parasitan. Los hongos (saprofitos y micoparasitos) intervienen en la degradación de los materiales circundantes para utilizarlos como fuente de carbono, por lo que pueden ser de gran apoyo para el control biológico. Entre los hongos utilizados para el biocontrol de fitopatógenos, varias especies de *Trichoderma* han tenido especial atención por su capacidad de producir β -1,3- glucanasas a las que se les atribuyen los diversos cambios estructurales a nivel celular que se presentan en el huésped, tales como vacuolación, desintegración del citoplasma y lisis. Dentro de estas especies, las de *Trichoderma* han sido probadas como agentes de biocontrol, entre ellas *Trichoderma harzianum*. Este microorganismo tiene actividad sobre varias especies de hongos fitopatógenos del suelo que son de gran importancia agrícola. A pesar del éxito alcanzado, los tratamientos con *Trichoderma harzianum* no han sido tan eficientes como cuando son utilizados los fungicidas sintéticos (1).

El objetivo de este trabajo es purificar, caracterizar y evaluar el efecto sobre hongos fitopatógenos de enzimas β -1,3- glucanasas de *Trichoderma harzianum*.

Metodología. La enzima fué producida en medio mínimo mineral suplementado con paredes celulares de *Macrophomina phaseolina* al 0.1%, a 30 C, 180 rpm y 72 hrs de incubación; el extracto crudo se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min., se precipitan las proteínas con sulfato de amonio al 80 %, a 0-4°C y agitación constante, se concentró por centrifugación y se dializó por membrana de 10 kDa, se empleó cromatografía de exclusión molecular G-75, cromatografía de intercambio aniónico DEAE con gradiente de NaCl 0-200 mM y se colectaron las fracciones que presentaron actividad glucanolítica. El estudio se realizo de las fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico.

Resultados y discusión El sistema glucanolítico de *Trichoderma harzianum* esta conformado por al menos 4 enzimas de tipo monoméricas, cuyos pesos moleculares son de 32, 58, 87 y 98 a 100 Kda. Se determinó que tres de ellas exhiben actividad exoglucanasas. Las temperaturas y pHs óptimos de actividad se encuentra en 50°C y pH 5; es estable

en el rango de pH de 5-9 y a las temperaturas de 30-50°C; los iones Mn²⁺, Ca²⁺ y Co²⁺ incrementan la actividad de las enzimas; Zn²⁺, Na²⁺, Cu²⁺, K⁺, Mg²⁺ casi no afectan la actividad; EDTA y SDS, reducen ligeramente la actividad enzimática; Hg²⁺ inhibe completamente. La enzima purificada tiene actividad sobre la celulosa y laminarina soluble, pero no sobre los sustratos de quitina coloidal, pululan y carboximetilcelulosa. Dos de las enzimas purificadas son capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium sp.* en un 30% .

Cuadro 1. En el cuadro se muestra la producción de azúcares reductores obtenidos por la hidrólisis de las paredes celulares utilizando las enzimas purificadas de T. harzianum

Hongos fitopatógenos (0.1%)	Endo-1,3-1,4- glucanasa	F9	F23	F33
<i>Macrophomina phaseolina</i>	13.5	16.2	16.0	16.9
<i>Pestalotia sp.</i>	14.2	47.0	67.2	19.0
<i>Fusarium sp.</i>	20.7	38.3	55.0	22.1
<i>Helminthosporium sp.</i>	16.9	49.8	69.1	28.0
<i>Aspergillus sp.</i>	19.2	13.5	26.3	19.5
<i>Alternaria sp.</i>	19.3	18.4	30.4	25.4
<i>Sclerotium rolfsii</i>	28.8	34.5	40.0	25.6
<i>Colletotrichum sp.</i>	27.3	28	48.7	20.5

Conclusiones. Se purificaron y caracterizaron 4 enzimas β -1,3- glucanasas de *Trichoderma harzianum* con actividad sobre hongos fitopatógenos..

Agradecimiento. El trabajo fue financiado por SEP-Conacyt No. De Convenio 44752. Aidee Ramos García, Flora Estela Muñiz Lozano y Montserrat Ramírez Suero son becarias de Conacyt.

Bibliografía.

1. Benitez, T, Rincon, A.M, Limón, M.C, y Codon A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7: 240-260.