

## Estudio de la actividad amilásica en varias especies del género *Verticillium*

M.<sup>a</sup> de las Nieves Villalobos

Departamento de Fisiología Vegetal  
Laboratorio de Fisiología de Hongos  
Facultad de Ciencias  
Salamanca

(Recibido el 16 de junio de 1972)

MARIA DE LAS NIEVES VILLALOBOS. *Essay on Amilasic Activity of Several Species of Verticillium Genus*. R. esp. Fisiol., 28, 273-280. 1972.

The utilization of starch for *V. tricorpus* and *V. nigrescens* is very rapid and for *V. dahliae* is slower. The former results seem to suggest that they are constitutive enzymic systems in *V. tricorpus* and *V. nigrescens* and an inducible enzymic system in *V. dahliae*. It seem to exist some amount of endocellular enzyme since there is a little increase of activity in the autolysis phase probably due to the liberation of enzyme into culture medium by the lysis of the cells. The pH optimum for the enzymic activity is 5 for *V. dahliae* and 7 for *V. tricorpus* and *V. nigrescens*. The temperature that permits the maximum of reaction rate is 50° C for the three species. The three enzymatic systems are thermostable since there is only an inactivation of the 30 % at 50° C for 10 minutes in the three species.

Los hongos no contienen clorofila, por lo que deben obtener el carbono de moléculas orgánicas (1). El almidón, principal polisacárido de reserva de los vegetales, es una fuente de carbono excelente para la mayoría de los hongos. Sólo se sabe de algunos hongos que sean incapaces de crecer sobre almidón como única fuente de carbono, tales como: *Ustilago violacea* (14), *Rhizophlyctis rosea* (12), *Tricholoma imbricatum* (11), *Penicillium digitatum* (6) y *Chalura quercina* (2).

El almidón es a veces mejor sustrato que la glucosa, y aunque ningún caso ha sido estudiado con detalle, esto se debe probablemente, bien a la contaminación del almidón utilizado con factores de cre-

cimiento, o bien a que la utilización de un compuesto lentamente hidrolizado es acompañado por una acumulación menor de ácidos orgánicos que cuando utilizan glucosa.

La forma más abundante en que las fuentes de carbono se encuentran es como polisacáridos que deben ser primero hidrolizados y transformados en azúcares simples para que después puedan ser metabolizados. La mayoría de los enzimas hidrolíticos de los hongos son constitutivos, algunos son inducibles y sólo se sintetizan en presencia del sustrato.

El almidón es hidrolizado por la amilasa. Este enzima ha sido encontrado en casi todas las especies de hongos estudia-

das. WOLF y WOLF (16) resumen en una lista las actividades enzimáticas de 23 hongos que viven sobre madera y todos ellos producen amilasa. Este enzima se encuentra bajo dos formas:  $\alpha$ -amilasa o endo-amilasa, que libera dextrinas y azúcares reductores, y la  $\beta$ -amilasa o exoamilasa, que libera maltosa al actuar sobre el almidón.

La mayoría de los datos sugieren que la amilasa producida por casi todos los hongos es del tipo  $\alpha$ -amilasa, aunque no faltan ejemplos de aparición de  $\beta$ -amilasa entre los hongos (7, 9).

La amilasa generalmente es segregada al medio de cultivo, y la cantidad de enzima corrientemente aumenta con la inclusión de almidón en el medio de cultivo, y es afectada por la fuente de nitrógeno y por las sales del medio.

Recientemente han aparecido en la literatura varios trabajos que estudian la actividad y localización de varios sistemas enzimáticos exocelulares en hongos (13, 4, 5). Muchos de estos sistemas enzimáticos son responsables de las enfermedades que estos hongos causan en plantas superiores. Un conocimiento exacto de su localización dentro de la célula fúngica podría ayudar a combatirlos mejor.

En este trabajo se ha pretendido estudiar la actividad amilásica de tres especies del *G. verticillium*, hongo perteneciente a los Deuteromycetos u hongos imperfectos y caracterizados por su capacidad para atacar plantas cultivadas.

Las especies elegidas para el presente trabajo son: *V. dahliae*, *V. tricorpus* y *V. nigrescens*, procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo. Estos microorganismos se mantuvieron por resiembra sucesivas en medio G.A.E.

Las distintas especies del *G. verticillium* se han hecho crecer en medios conteniendo como única fuente de carbono almidón, analizando los procesos de síntesis de amilasas y los factores ambientales que condicionan su actividad.

## Material y métodos

**CONDICIONES DE CULTIVO.** Los microorganismos se mantuvieron por resiembra sucesivas en medio G.A.E. cuya composición química es la siguiente:

Glucosa, 10 g; asparragina, 1 g; extracto de levadura, 0,5 g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 0,5 g;  $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g;  $\text{SO}_4\text{Fe}$ , 0,01 g; agar-agar, 20 g; agua destilada, 1 l.

La glucosa, asparragina y el extracto de levadura se esterilizan en autoclave en corriente de vapor ( $100^\circ\text{C}$ ) durante 20 minutos tres días consecutivos; las sales con el agar-agar se esterilizan a una atmósfera ( $120^\circ\text{C}$ ) durante media hora.

Para el estudio de la actividad amilásica se utilizó el siguiente medio:

Almidón, 10 g;  $\text{NO}_3\text{Na}$ , 2 g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 1 g;  $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g;  $\text{ClK}$ , 0,25 g; agua destilada, 1 l.

Este medio se esteriliza en corriente de vapor ( $100^\circ\text{C}$ ) durante 20 minutos tres días consecutivos.

De este medio se colocaron 30 ml en matraces de 100 ml, inoculando cada matraz, con 0,1 ml de una suspensión de esporas obtenida a partir de los tubos de G.A.E. utilizados para mantener los cultivos. Estos matraces se colocaron posteriormente en un agitador de vaivén de 112 oscilaciones por minuto a una temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ .

A los dos días de incubación se empezó a tomar muestras para ensayar la actividad amilásica.

**OBTENCIÓN DEL PREPARADO ENZIMÁTICO.** Se centrifugó el cultivo a 4.000 r.p.m. en una centrífuga Christ, separando el micelio del caldo, detectando en éste la presencia o ausencia de almidón mediante la técnica del yodo-yoduro potásico.

**DETERMINACIONES CUANTITATIVAS.** La actividad amilásica se expresa como actividad relativa, es decir, miligramos de azúcares reductores liberados por acción de

1 ml de medio actuando sobre 1 ml de almidón al 1 % durante una hora a 40° C y pH 5,4, y como actividad específica (mg de azúcares reductores/mg de proteína/hora).

Los azúcares reductores se valoraron por el método de SOMOGYI (15) modificado por NELSON (10) y la cantidad de proteínas por el método de LOWRY *et al.* (8).

**EFFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD ENZIMÁTICA.** Los factores ambientales cuyo efecto sobre la actividad y estabilidad enzimática se han estudiado, fueron el pH y la temperatura.

*Efecto del pH.* Para ver la influencia del pH sobre la actividad amilásica se prepararon una escala de pH de 3 a 9; de 3 a 6 en tampón citrato 0,05 M; de 7 a 8 en tampón fosfato 0,05 M y el pH 9 en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M. Todos los tampones fueron preparados según las técnicas descritas en *Methods in Enzymology*. Las soluciones de almidón soluble al 1 % se prepararon también en estos tampones.

*Efecto de la temperatura.* El estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se realizó con una escala de temperaturas de 5 a 70° C, con lo cual se pudo ver a qué temperatura la velocidad de reacción es mayor.

Por último, se observó el efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática, calentando previamente el enzima durante 10 minutos a una escala de temperaturas de 20 a 70° C, pudiendo de esta forma conocer la termoestabilidad del preparado enzimático.

## Resultados y discusión

Los resultados de la actividad amilásica obtenidos con *Verticillium dahliae* pueden verse en la figura 1. Se observa que el peso seco aumenta lentamente hasta llegar al quinto día, en el que presenta un má-

ximo de crecimiento, disminuyendo después un poco y manteniéndose prácticamente constante a partir del octavo día. El máximo de peso seco en el quinto día coincide con la hidrólisis total del almidón. En el tercer día hay un aumento de azúcares reductores que disminuye coincidiendo con el aumento de peso seco. Es de señalar que a partir del quinto día se mantiene un nivel alto de azúcares reductores en el medio, a pesar de lo cual el hongo no es capaz de utilizarlo. Esto puede ser debido a la desaparición de la fuente nitrogenada o a la aparición de sustancias tóxicas en el medio.

La actividad enzimática específica es muy débil durante los tres primeros días, coincidiendo con la hidrólisis lenta del almidón. Después va aumentando hasta alcanzar el máximo a los nueve días de incubación, produciéndose más tarde un descenso muy pronunciado de la actividad. Este hecho junto con la lenta aparición de la actividad amilásica parece sugerir que se trata de un sistema enzimático inducible, ya que el hongo necesita permanecer unos días en presencia del sustrato para comenzar la síntesis del enzima.

Los resultados de la actividad amilásica obtenidos con *Verticillium tricorpus* se indican en la figura 2. El crecimiento es más rápido que en el anterior, alcanzándose el máximo de peso seco a los cuatro días. La hidrólisis del almidón es también más rápida, ya que a los dos días ya ha sido hidrolizado, aproximadamente, el 50 por ciento de almidón, coincidiendo con el máximo de azúcares reductores liberados al medio.

Con este hongo se obtiene una curva de actividad específica muy particular, ya que esta actividad se mantiene a un nivel relativamente bajo durante los nueve primeros días de incubación, nivel que, sin embargo, es suficiente para causar una hidrólisis rápida y total del almidón. A los dos días la actividad específica casi se tri-

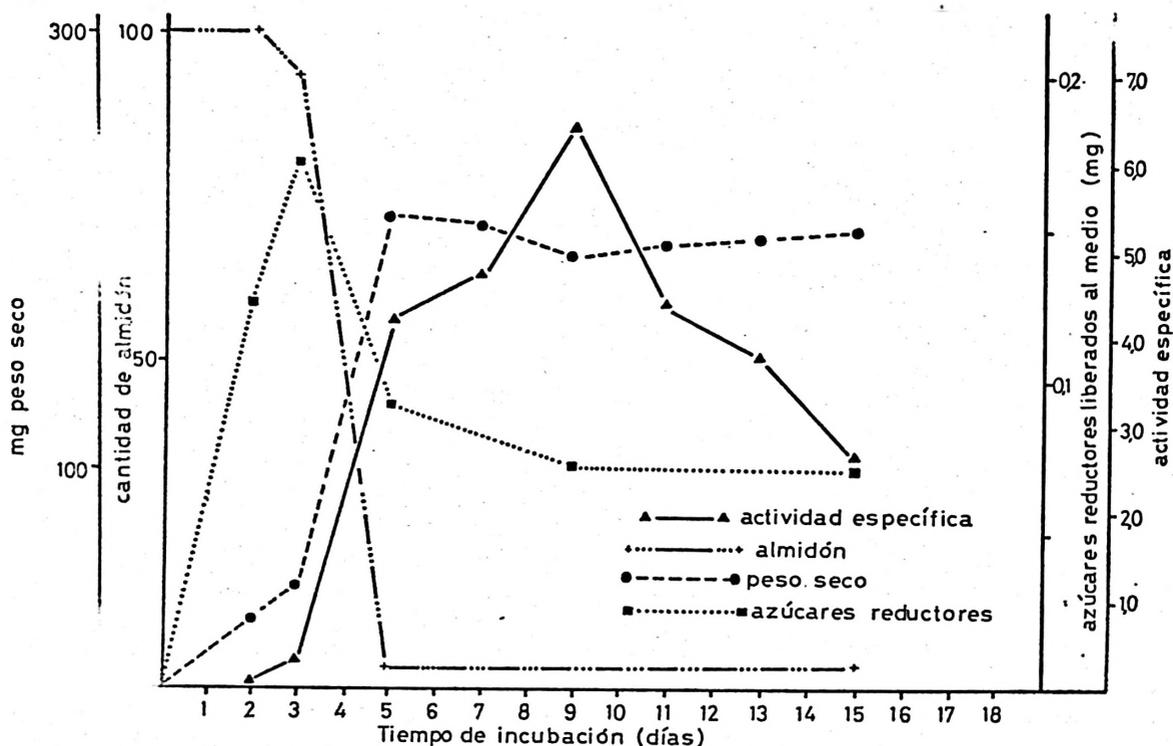


Fig. 1. Crecimiento sobre almidón y desarrollo de la actividad amilásica en *Verticillium dahliae*.

plica, manteniéndose prácticamente constante hasta el final; este brusco aumento puede deberse a la liberación de cierta cantidad de enzima endocelular, durante la autólisis de algunas células, ya que coincide con un ligero aumento de la cantidad de proteínas en el medio.

Los resultados de la actividad amilásica observados en *Verticillium nigrescens* (figura 3) son muy similares a los obtenidos con *V. tricorpus*, variando únicamente en el descenso del nivel de azúcares reductores en el medio, los cuales, en lugar de desaparecer prácticamente del medio, permanecen a un nivel relativamente elevado, al igual que ocurría con *V. dahliae*.

La actividad específica se mantiene, en principio, relativamente baja al igual que ocurría en *V. tricorpus*, siendo, sin embargo, también suficiente para producir una hidrólisis total del almidón. En este

caso la baja actividad específica parece ser debida a un efecto inhibitorio del alto nivel de azúcares reductores en el medio,

Tabla 1. Efecto del pH sobre la actividad amilásica de las tres especies de *Verticillium*. El intervalo de pH de 3,0 a 6,0 se conseguía con tampón citrato 0,05 M; el de 7 a 8, con tampón fosfato 0,05 M y el pH 9, con tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M.

pH	ACTIVIDAD RELATIVA (mg de azúcares reductores/mg de proteína/hora)		
	<i>V. dahliae</i>	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. nigrescens</i>
3,0	0,23	0,03	0,06
4,0	0,65	0,09	0,20
5,0	1,00	0,24	0,36
6,0	0,62	0,27	0,60
7,0	0,60	0,48	0,78
8,0	0,20	0,14	0,30
9,0	0,20	0,06	0,08

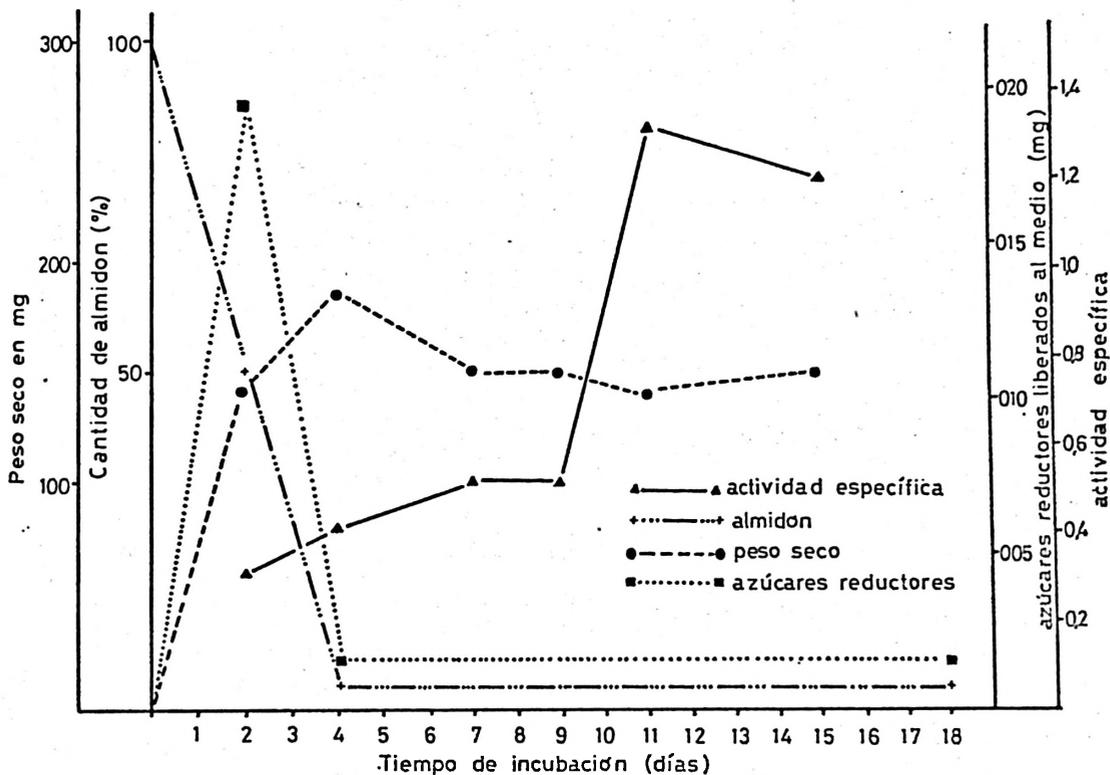


Fig. 2. Crecimiento sobre almidón y desarrollo de la actividad amilásica en *Verticillium tricorpus*.

ya que cuando éste baja, aumenta bruscamente la actividad específica.

La rápida hidrólisis del almidón por *V. tricorpus* y *V. nigrescens* parece indicar que se trata de sistemas enzimáticos constitutivos.

Los resultados obtenidos acerca de la influencia de los factores ambientales sobre la actividad amilásica fueron los siguientes.

En *V. dahliae* (tabla I) se observa un máximo de actividad a pH 5,0, lo que puede indicar que se trata de un sistema amilásico ácido que, además, se inactiva rápidamente a pH alcalinos.

Respecto a la influencia de la temperatura, se observa que la velocidad de reacción es máxima a los 50° C, lo que ocurre también con las amilasas de las otras dos especies (tabla II). Se trata de

sistemas enzimáticos termorresistentes, puesto que a 70° C aún no están totalmente inactivados.

En *V. tricorpus* y *V. nigrescens* (tabla I), el máximo de actividad se alcanza

Tabla II. Efecto de la temperatura sobre la actividad amilásica de las tres especies de *Verticillium*.

T	ACTIVIDAD RELATIVA (mg de azúcares reductores/mg de proteína/hora)		
	<i>V. dahliae</i>	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. nigrescens</i>
5	0.11	0.06	0.07
20	0.22	0.08	0.11
28	0.35	0.09	0.16
40	0.56	0.22	0.31
50	0.80	0.31	0.48
60	0.16	0.21	0.16
70	0.14	0.20	0.13

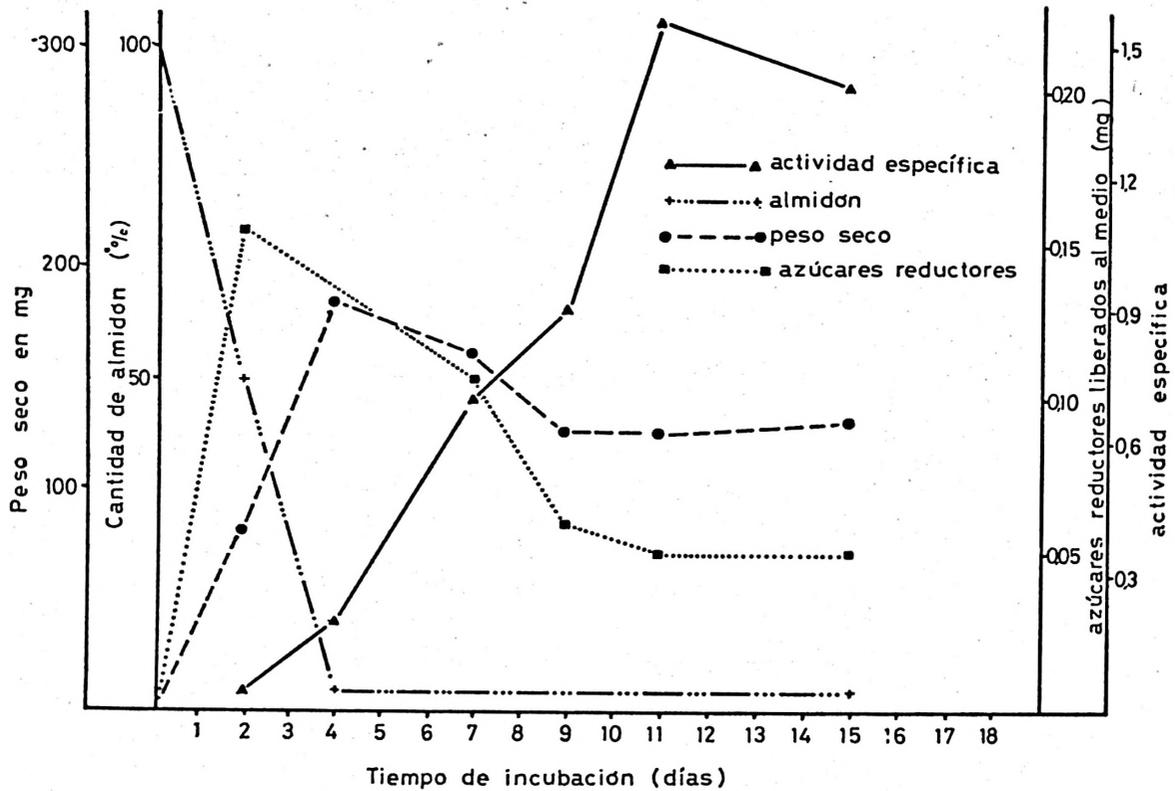


Fig. 3. Crecimiento sobre almidón y desarrollo de la actividad amilásica en *Verticillium nigrescens*.

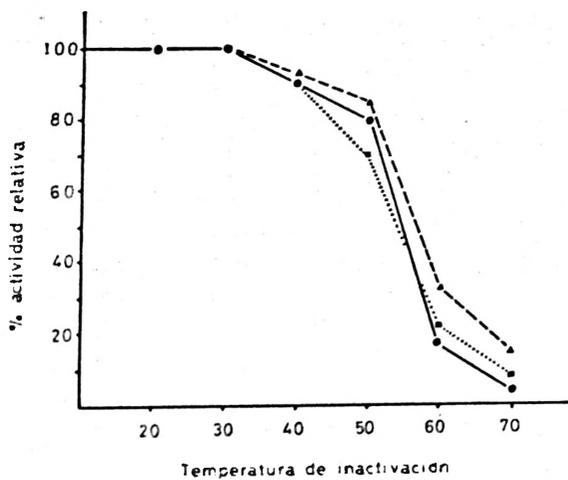


Fig. 4. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la amilasa de *Verticillium*. ●—● *Verticillium dahliae*; ▲---▲ *Verticillium tricorpus*, y ■.....■ *Verticillium nigrescens*. Las condiciones experimentales se especifican en el texto.

a pH 7,0, tratándose, por lo tanto, de amilasas neutras.

En cuanto a los resultados obtenidos acerca del efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática, los resultados son muy similares para las tres especies.

*V. dahliae* (fig. 4) produce amilasas que presentan un 20 % de inactivación a 50° C, habiendo un 15 % de inactivación para las de *V. tricorpus* y un 30 % para las de *V. nigrescens* a la misma temperatura.

### Resumen

La utilización de almidón es muy rápida en *V. tricorpus* y *V. nigrescens* y más lenta en *V. dahliae*.

Los resultados anteriores parecen indicar que en *V. tricorpus* y *V. nigrescens* se trata de sistemas enzimáticos constitutivos y en *V. dahliae* de un sistema enzimático inducible.

Parace existir cierta cantidad de enzima endocelular ya que en la fase de autólisis hay un ligero aumento de actividad, debido probablemente a la liberación de enzima al medio de cultivo al lisarse las células.

El pH óptimo para la actividad enzimática es de 5,0 en *V. dahliae* y de 7,0 en las otras dos especies.

La temperatura a la cual la velocidad de reacción es máxima es de 50° C para las tres especies.

Los sistemas enzimáticos son termoestables, ya que después de tratado el enzima durante 10 minutos a 50° C, la inactivación en las tres especies oscila solamente entre el 15 y el 30 %.

### Bibliografía

1. ALEXANDER, M.: *Soil microbiology*. Wiley and Sons, Nueva York, 1961.
2. BECKMAN, C. H., KUNTZ, J. E. y RIKER, A. J.: *Phytopathology*, **43**, 441, 1953.
3. COLOWICK, S. P. y KAPLAN, N. O.: *Methods in Enzymology* (Vol. I). Academic Press, Nueva York, 1957, p. 138.
4. CHUNG, P. L., THE VITHICK, J. R.: *J. of Bacteriol.*, **102**, 423, 1970.
5. EBERHART, B. M. y BECK, R. S.: *J. of Bacteriol.*, **101**, 408, 1970.
6. FERGUS, C. L.: *Mycologia*, **44**, 183, 1952.
7. LEOPOLD, H., STARBANOW, M. P.: *Biochem. Z.*, **314**, 232, 1943.
8. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. Y., FARR, A. L. y RANDALL, R. I.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
9. MEEUSE, B. J. D.: *J. Exp. Botany*, **3**, 52, 1952.
10. NELSON, N. J.: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375, 1944.
11. NORCRANS, B.: *Symbolae Botan. Upsalienses*, **2**, 5, 1950.
12. QUANTZ, L.: *Jhrb. wiss. Botan.*, **91**, 120, 1943.
13. ROCK, G. D. y JOHNSON, B. F.: *Can. J. Microbiol.*, **16**, 187, 1970.
14. SCHOPFER, W. H. y BLUMER, S.: *Ark. Mikrobiol.*, **9**, 305, 1938.
15. SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, **117**, 771, 1937.
16. WOLF, F. A., WOLF, F. T.: *The fungi* (Vol. 2). John Wiley, Nueva York, 1947.

