

SOLUBILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD TREHALASA LIGADA A LA PARED CELULAR DE ASCOSPORAS DE *SCHIZOSACCHA- ROMYCES POMBE*

J. Vicente* y M. Gacto*

Recibido: 10 noviembre 1989

Aceptado: 8 marzo 1990

SUMMARY

Solubilization and characterization of the cell wall-linked trehalase from ascospores of *Schizosaccharomyces pombe*.

The location of trehalase in isolated ascospores from *Schizosaccharomyces pombe* has been investigated by a cytochemical method based on the formation by eugenol of insoluble complexes that are produced extracellularly during a reaction coupled to the trehalase activity. Most of the enzyme activity present in cell extracts is linked to the ascospore cell wall. A partial solubilization of the particulate trehalase was achieved by controlled treatment of isolated cell walls with the lytic system novozym. The elution pattern obtained by molecular filtration of the enzyme solubilized from the walls shows a broad molecular heterogeneity suggesting a possible glycoprotein nature of the enzyme. Assays for activation and analysis of kinetic properties revealed that this activity is due to a trehalase of the so-called nonregulatory type.

Key words: trehalase, cell wall, *Schizosaccharomyces pombe*, novozym.

RESUMEN

Se ha investigado la localización de la trehalasa en ascosporas aisladas de *Schizosaccharomyces pombe* mediante un método citoquímico basado en la formación de complejos insolubles de eugenol, producidos extracelularmente en una reacción acoplada a la actividad trehalasa. La mayor parte de la actividad enzimática detectable en extractos celulares está unida a la pared celular de las ascosporas. Por tratamiento controlado de paredes celulares con el sistema lítico novoenzima es posible lograr una solubilización parcial de la trehalasa particulada. El perfil de elución obtenido por filtración molecular del enzima solubilizado de paredes indica una amplia heterogeneidad molecular, lo que sugiere una posible naturaleza glicoproteica del enzima. Los ensayos de activación y el análisis de propiedades cinéticas revelan que esta actividad se debe a una trehalasa de las pertenecientes al tipo no regulador.

Palabras clave: trehalasa, pared celular, *Schizosaccharomyces pombe*, novoenzima.

* Unidad de Microbiología. Dep. de Genética y Microbiología. Fac. de Biología. Universidad de Murcia. 30100 Murcia.

INTRODUCCIÓN

La trehalosa (a-D-glucopiranosil-a-D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor que desarrolla importantes funciones fisiológicas de reserva en levaduras (PANEK, 1963). Las trehalasas (EC 3.2.1.28) son enzimas específicas capaces de desdoblar trehalosa en dos moléculas de glucosa y se clasifican en términos generales como "reguladoras" o "no reguladoras" dependiendo del tipo de control que determina su actividad (THEVELEIN, 1984). Las primeras coexisten con el sustrato en el citosol en forma críptica inactiva y pueden ser activadas mediante modificación covalente por fosforilación dependiente de AMP cíclico (ORTIZ *et al.*, 1983; UNO *et al.*, 1983; ARGÜELLES & GACTO, 1985). Las trehalasas no reguladoras carecen, en cambio, de modificaciones postraduccionales inducidas por AMP cíclico y se presentan en forma enzimática activa.

En levaduras con trehalasa reguladora, la hidrólisis enzimática de la trehalosa interna está controlada por los niveles de AMP cíclico intracelular y la actividad de fosfatasa endógena. La presencia de trehalasas reguladoras se ha puesto de manifiesto en *Saccharomyces cerevisiae* (VAN DER PLAAT & VAN SOLINGEN, 1974; LONDESBOROUGH, 1982; WIEMKEN & SCHELLENBERG, 1982) y en *Candida utilis* (ARGÜELLES & GACTO, 1985).

En sistemas con trehalasas no reguladoras, se ha sugerido que la compartimentalización entre enzima y sustrato podría controlar la hidrólisis del disacárido de reserva (HECKER & SUSSMAN, 1973; INOUE & SHIMODA, 1981a, 1981b; VICENTE *et al.*, 1985).

En este trabajo hemos desarrollado un método basado en un procedimiento fluorimétrico (KILLICK, 1980; KILLICK & WANG, 1980) que demuestra la localización externa de la trehalasa en *Schizosaccharomyces pombe* y se ha procedido a la solubilización y caracterización de la actividad particulada mediante un tratamiento enzimático capaz de degradar la pared celular de esta levadura.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMO Y MEDIOS DE CULTIVO

La cepa de *Schizosaccharomyces pombe* h⁹⁰

968 (homotálica) utilizada en este estudio deriva de la estirpe silvestre inicialmente descrita por LEUPOLD (1950) y caracterizada por ESPÓSITO & ESPÓSITO (1975). Los medios de mantenimiento (Winge) y de esporulación (MEL) han sido descritos previamente (VICENTE *et al.*, 1985).

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA

Las muestras recogidas por centrifugación de los cultivos se fijaron con 3% glutaraldehído en tampón 0.1M cacodilato pH 7.2 durante 5 h. Posteriormente se lavaron con 0.35% sacarosa en tampón cacodilato y se completó la fijación en 1% tetróxido de osmio en el mismo tampón durante 2 h a 4°C. Para aumentar el contraste de las diferentes estructuras celulares los fragmentos se introdujeron en 2% acetato de uranilo en tampón veronal pH 7.2 (2 h, 4°C) y la inclusión se realizó con una mezcla de resinas de epoxi. Los cortes ultrafinos se obtuvieron con un ultramicrotomo LKB III y se contrastaron de nuevo con 2% acetato de uranilo (20 min., 20°C) y solución de Reynolds de citrato de plomo (10 min, 30°C). El examen de los cortes fue efectuado en un microscopio electrónico Zeiss EM-10C.

AISLAMIENTO DE ASCOSPORAS

El aislamiento de las ascosporas se realizó sometiéndolas a alcuotas de cultivos esporulados a centrifugación isopícnica en gradiente lineal de densidad de Urografina (25-55%). La centrifugación se llevó a cabo a 25.000 xg durante 30 min. a 2°C (NISHI *et al.*, 1978; SHIMODA, 1980) en una ultracentrífuga Centrikon T-2050 (Kontron) con rotor basculante (TST 28.38).

Las ascosporas, separadas de las células vegetativas y restos de ascas, se localizaron en la fracción del 45-50% de Urografina y fueron posteriormente extraídas y lavadas mediante centrifugación a baja velocidad (figura 1).

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

En las pruebas que requirieron el uso de extractos celulares como fuente enzimática, se

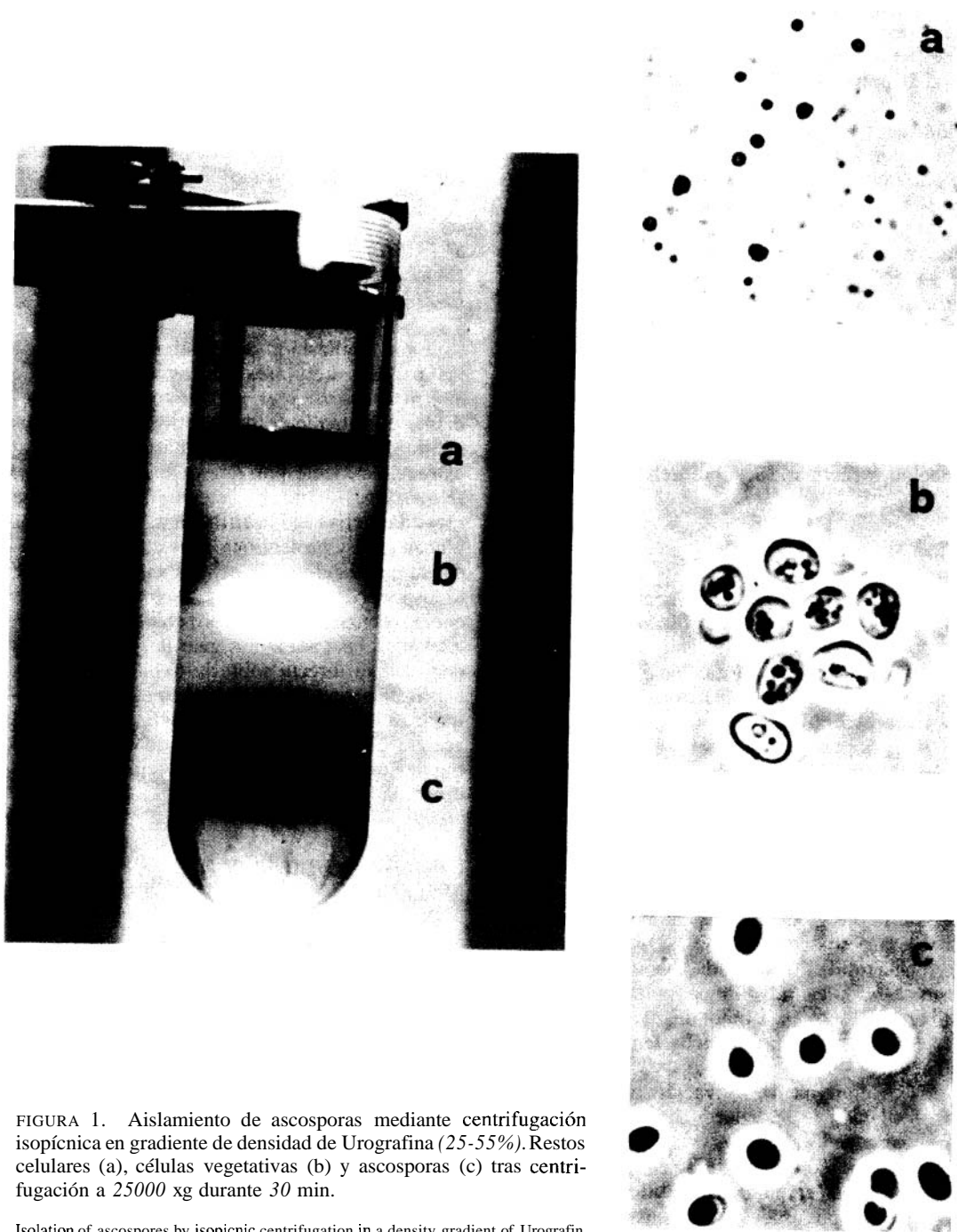


FIGURA 1. Aislamiento de ascosporas mediante centrifugación isopícnica en gradiente de densidad de Urografina (25-55%). Restos celulares (a), células vegetativas (b) y ascosporas (c) tras centrifugación a 25000 xg durante 30 min.

Isolation of ascospores by isopycnic centrifugation in a density gradient of Urografin (25-55%). Cell debris (a), vegetative cells (b) and ascospores (c) after centrifugation at 25000 xg for 30 min.

procedió a lavar repetidamente las células o ascosporas aisladas y a resuspenderlas finalmente en tampón 0.1M acetato pH 5.6. Las suspensiones se sometieron a rotura mecánica en presencia de polvo de vidrio Ballotini (0.45-0.50 mm.) en un desintegrador Braun MKS con refrigeración acoplada, durante 3 pulsos intermitentes de 30 segundos. Para obtener la fracción de paredes celulares, los extractos obtenidos se centrifugaron seguidamente a baja velocidad (3.000 xg, 30 min.) en una centrífuga MSE y los precipitados resultantes fueron lavados repetidamente con soluciones decrecientes de ClNa y recentrifugados para eliminar posibles restos celulares contaminantes según el método de CASSONE *et al.* (1979). Finalmente, las paredes se lavaron exhaustivamente con agua destilada y se resuspendieron en tampón acetato. Los extractos totales y la fracción particulada de paredes celulares se utilizaron directamente en las determinaciones enzimáticas sobre trehalosa.

ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Los ensayos enzimáticos se realizaron en un volumen final de 0.50 ml utilizando 0.25 ml de fuente enzimática (células enteras, extractos celulares o fracciones particuladas) y 0.25 ml de una solución de 200 mM trehalosa en tampón 0.1M acetato pH 5.6. Las mezclas se incubaron a 30°C durante tiempos variables y se detuvieron mediante desnaturalización enzimática por calor (100°C, 3 min.). Paralelamente se desarrollaron controles en los que se impidió la reacción enzimática por inactivación térmica de la fuente enzimática antes de la adición del sustrato. La glucosa liberada en la reacción se determinó siguiendo el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa (LLOYD & WHELAN, 1969).

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar del sustrato 1 nmol de glucosa por minuto en las condiciones de pH y temperatura establecidas.

Los ensayos de activación enzimática por fosforilación se realizaron como se ha descrito previamente (VICENTE *et al.*, 1985) excepto que el AMP cíclico fue sustituido en los ensayos por 25 µg de la subunidad catalítica de proteína quinasa (0.65 unidades) reconstituida previamente en agua desionizada con ditiotreitol al 5%. Como control, se realizó una prueba para-

lela utilizando extractos celulares obtenidos de la levadura *Candida utilis* ATCC 60459 cuya actividad trehalasa de tipo regulador resulta activada en tales condiciones (ARGUELLES & GACTO, 1985).

La inactivación *in situ* de la trehalasa por tratamientos con ácidos diluidos y la determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo como ya ha sido indicado (VICENTE *et al.*, 1985).

SOLUBILIZACIÓN DE LA TREHALASA DE LA PARED CELULAR POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

La solubilización de la trehalasa a partir de las paredes celulares de las ascosporas de *Schizosaccharomyces pombe* fue posible mediante el tratamiento de las mismas con novoenzima, un complejo enzimático producido extracelularmente por *Trichoderma harzianum* (Novozym, Sigma). El sistema lítico posee una elevada actividad quitinásica, mananásica, glucanásica y proteolítica, y es capaz de degradar la pared celular de células vegetativas y de ascosporas de esta levadura. En los tratamientos con novoenzima se incorporó el inhibidor PMSF a las mezclas para amortiguar la posible acción degradativa directa sobre la trehalasa por proteasas presentes en el preparado enzimático comercial. Las incubaciones se realizaron en 0.1M acetato pH 5.6 conteniendo 1 mM PMSF y 4 mg de novoenzima por cada fracción de paredes derivada de 10⁹ ascosporas.

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Se utilizaron columnas de Sephadex G-200 (40 × 2.5 cm.) equilibradas con 0.1M acetato pH 5.6. El desarrollo de la cromatografía se realizó en el mismo tampón. Se cromatografió 1 ml de muestra y se recogieron fracciones de 3.5 ml en un colector Gilson TDC 80, ensayando actividad trehalasa en la forma antes mencionada y determinando la proteína eluida por absorción espectrofotométrica a 280 nm.

OTROS PRODUCTOS Y REACTIVOS

Trehalosa fue obtenida de Merck. Glucosa

oxidasa (EC 1.1.3.4.) tipo V, peroxidasa (EC 1.11.1.7.) tipo II, o-dianisidina, ATP, proteína quinasa (EC 2.7.1.37., subunidad catalítica), las proteínas de calibración de peso molecular conocido (ferritina, aldolasa y catalasa) y fenil-metilsulfonilfluoruro (PMSF) fueron de Sigma. El resto de los productos y reactivos utilizados fue de calidad analítica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

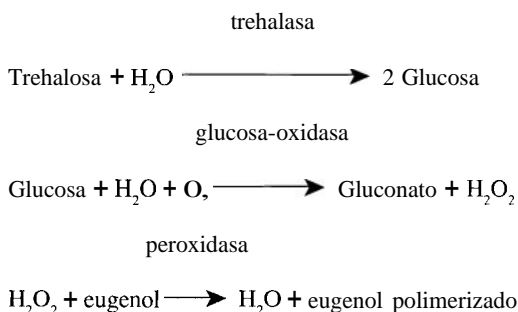
Schizosaccharomyces pombe h⁹⁰ en medio MEL desarrolla un ciclo vegetativo completo con transición morfológica desde formas vegetativas a ascosporas. Las primeras originan zigotos mediante conjugación isógama y estas formas, junto a células vegetativas no conjugadas, predominan en el cultivo durante las primeras 40 h. de incubación. Los zigotos evolucionan hasta ascas y hacia las 70 h. empiezan a liberar las cuatro ascosporas contenidas en cada asca. El nivel final de ascosporas se estabiliza en medio MEL cuando se alcanza una concentración próxima a 2×10^8 ascosporas/ml., que es equivalente a un 50% de esporulación (VICENTE *et al.*, 1985). La figura 2 muestra microfotografías de cortes finos de células en diferentes estadios del proceso de esporulación del cultivo.

Previamente se ha descrito que la actividad trehalasa a lo largo de la curva de crecimiento en medio MEL sólo es detectable en células a partir de las 70 h. de cultivo y nula hasta dicho momento, lo que se corresponde temporalmente con la aparición de las ascosporas (VICENTE *et al.*, 1985). Estos resultados se vieron confirmados en este trabajo mediante la valoración de la actividad trehalasa en extractos preparados a partir de las diversas formas y restos celulares que se obtienen por centrifugación isopícnica de los cultivos (ver fig. 1). El análisis de dicha actividad reveló que tanto la fracción de restos celulares (conteniendo fundamentalmente fragmentos de ascas vacías y células lisadas) como la de células vegetativas no conjugadas carecían de trehalasa y demostró, por otra parte, la asociación de la actividad trehalasa con las ascosporas (tabla 1).

Estudios previos indicaron también que, tras tratamientos con ácidos diluidos bajo condiciones controladas, la actividad trehalasa recuperada de cultivos conteniendo ascosporas (70 h.) es tan sólo el 4% de la actividad obtenida en culti-

vos paralelos no pretratados (VICENTE *et al.*, 1985). Como tales tratamientos no afectan a enzimas internos ni a la viabilidad celular, dichos resultados sugirieron que la mayor parte de la actividad en ascosporas debía ser pericelular. Para apoyar esta evidencia se abordó otra vía alternativa a la anteriormente descrita, basada en un modificación de un procedimiento fluorimétrico originariamente empleado por KILLICK & WANG (1980) en la localización de actividad trehalasa en geles de poliacrilamida. El método consiste en realizar de forma acoplada la reacción enzimática mediada por la trehalasa y someter la glucosa generada a la acción subsecuente de glucosa-oxidasa y peroxidasa usando como sustrato oxidable de la peroxidasa el compuesto fluorigénico eugenol (2-metoxi-4-alil-fenol). El fundamento del método se basa en el hecho de que, adicionalmente a su carácter fluorigénico, el eugenol oxidado, que se genera en la reacción, condensa formando un complejo fácilmente reconocible como precipitado blanco.

El siguiente esquema resume la secuencia de reacciones enzimáticas acopladas:



Ensayos iniciales permitieron comprobar que sólo en presencia de glucosa, glucosa-oxidasa, peroxidasa y eugenol se formaba *in vitro* el depósito de eugenol, mientras que la omisión de alguno de estos componentes impedía la polimerización.

Para la determinación de la localización enzimática mediante esta aproximación citoquímica, se realizaron ensayos utilizando tanto una matriz sólida de soporte en placa como un medio líquido en suspensión.

En el primer caso se establecieron series de ensayos en placa. La primera serie estaba constituida por placas que contenían ascosporas in-

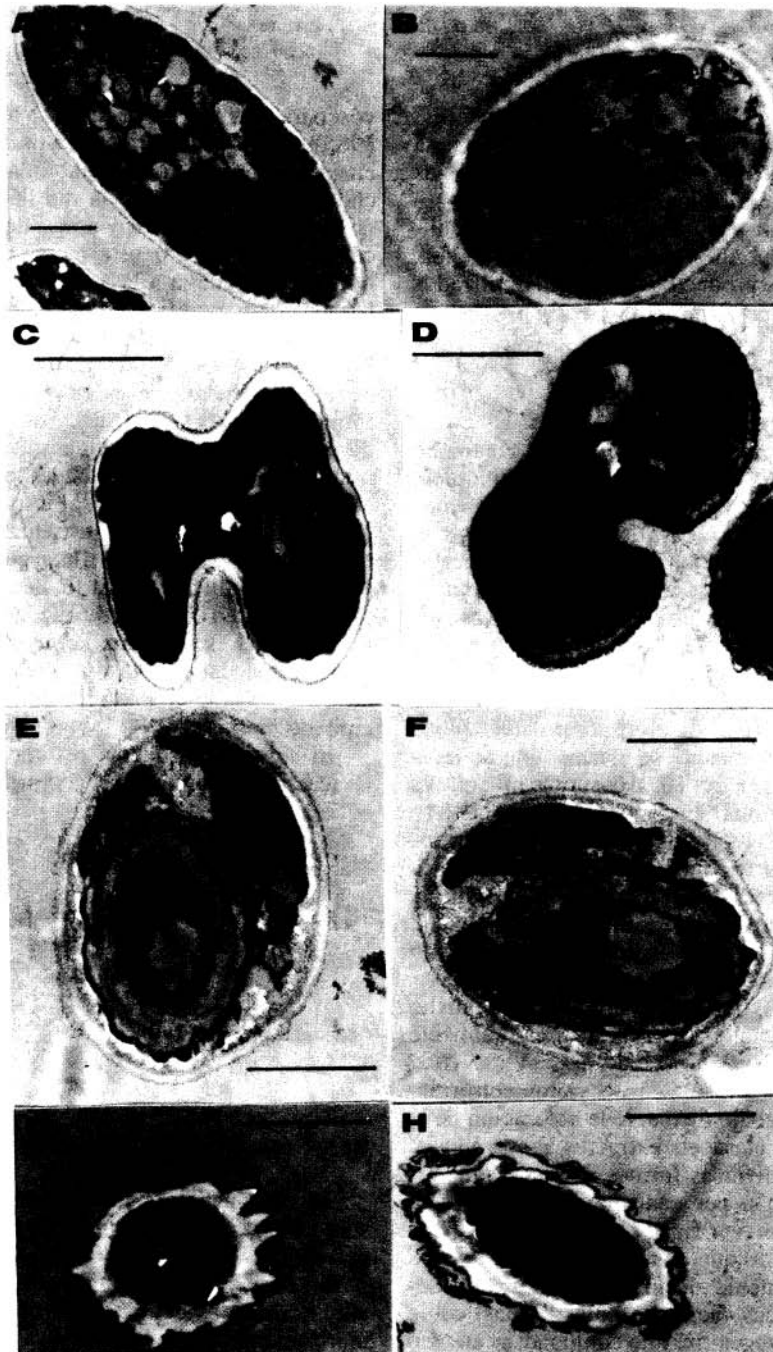


FIGURA 2. Microfotografías de cortes finos de células de *Schizosaccharomyces pombe* en diferentes estadios del proceso de esporulación. A y B: corte longitudinal (x10000) y transversal (x12500) de células vegetativas. C y D: cortes transversales de zigotos (x20000). E y F: cortes transversales de ascas (x20000). G y H: secciones de ascosporas (x20000). La línea indica 1 μm en cada caso.

Electron micrograph of thin sections of *Schizosaccharomyces pombe* cells at different stages of the sporulation process. A and B: longitudinal (x10000) and transverse (x12500) thin sections of vegetative cells. C and D: transverse sections of zygotes (x20000). E and F: transverse sections of asci (x20000). G and H: sections of ascospores (x20000). The bar indicates 1 μm .

TABLA 1. Distribución de la actividad trehalasa en cultivos sometidos a centrifugación isopónica.

	UNIDADES/ENSAYO	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (UNIDADES/10 ⁷ células)
Fracción a	0	0
Fracción b	0	0
Fracción c	2.7	28.4

TABLA 2. Detección de trehalasa pericelular en ensayos con eugenol en medio líquido.

	CONTROL	SIN SUSTRATO	SIN ENZIMA	SIN EUGENOL
Reacción de trehalasa (1ml):				
Trehalosa	50mM	-(manosa)	50mM	50mM
Ascosporas	2×10 ⁸	2×10 ⁸	-(inactiv. por calor)	2×10 ⁸
Tampón acetato pH 5.6	5mM	5mM	5mM	5mM
NaN ₃	1mM	1mM	1mM	1mM
Reacción acoplada (1ml):				
Glucosa-oxidasa	6 U	6 U	6 U	6 U
Peroxidasa	0.9 U	0.9 U	0.9 U	0.9 U
Eugenol	6mM	6mM	6mM	6mM
Tampón fosfato pH 7.0	100mM	100mM	100mM	100mM
Presencia de precipitado	Sí	No	No	No

tactas e inmovilizadas en un gel de agarosa (0.6%) conteniendo 10 mM trehalosa en tampón 5 mM acetato pH 5.6. Tras incubación a 30°C durante 45 min., para favorecer la acción enzimática de la trehalasa, las placas recibieron los ingredientes de la reacción acoplada. La solución se distribuyó uniformemente por la superficie de las placas y éstas se incubaron adicionalmente durante 6-8 h. a 37°C lavando finalmente con agua destilada. Otra serie paralela de ensayos constaba de placas con los componentes anteriores, pero donde las ascosporas incluidas en la agarosa habían sido previamente calentadas durante 3 min. a 100°C y, por tanto, presentaban la trehalasa inactivada. Una tercera serie fue igual a la primera pero, como control adicional, las placas carecían de trehalosa que

fue sustituida por manosa. Finalmente se desarrolló una serie idéntica a la primera en la que los reactivos de la reacción acoplada no incluían eugenol. Los resultados observados en las series de placas pusieron de manifiesto que los depósitos de eugenol polimerizado sólo se observan cuando las placas contienen tanto trehalosa como ascosporas intactas. Esta evidencia se manifiesta al comparar la opacidad blanquecina que se desarrolla en las placas control, tras las reacciones, frente al aspecto traslúcido inicial, que se mantiene en las placas que carecen de trehalosa o trehalasa activa (figura 3).

Cuando el método anterior se ensayó sin agarosa como soporte sólido, es decir, con ascosporas en suspensión, se obtuvo el mismo tipo de resultados. En este caso se establecieron

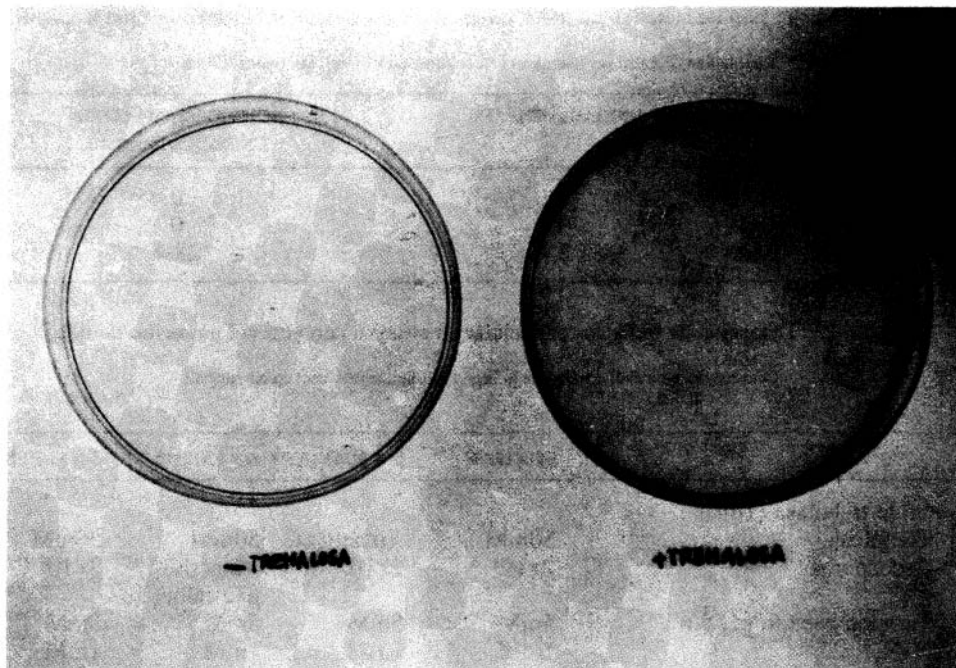


FIGURA 3. Detección en placa de trehalasa externa de ascosporas mediante la formación de complejos insolubles de eugenol en reacción acoplada (véase texto).

Plate detection of the external trehalase from ascospores by the formation of insoluble eugenol complexes during the coupled reaction (see text).

igualmente cuatro series de ensayos en tubo. La primera incorporaba todos los componentes de la reacción enzimática y del sistema acoplado ya indicados (tabla 2). De modo similar, la segunda serie carecía de trehalosa, mientras la tercera presentaba ascosporas inactivadas por calor y la cuarta se desarrolló en ausencia de eugenol. Solamente en el primer tipo de ensayos se observó depósito de eugenol polimerizado en el fondo de los tubos, que fue un efecto claramente diferenciable de la sedimentación de la suspensión celular en ausencia de agitación. Estos resultados indicaron asimismo que la ausencia de ascosporas intactas, trehalosa o eugenol, como componentes del ensayo, impide la formación del precipitado y sólo pueden ser interpretados admitiendo que la hidrólisis de trehalosa ocurre externamente. En consecuencia, la generación externa de glucosa a partir de trehalosa, que es el proceso inicial de las reacciones que conducen a dicha polimerización, demuestra que la

enzima está localizada in vivo en la pared celular. De otro modo, el eugenol polimerizado no podría detectarse fuera de las células.

Por otra parte, la distribución de la actividad enzimática de extractos de ascosporas, tras fraccionamiento por centrifugación diferencial a baja velocidad (3.000xg) indicó una localización mayoritaria (más del 90%) en la fracción particulada del precipitado, lo que confirma que la trehalasa se encuentra asociada a la pared celular de las ascosporas como un posible componente estructural:

Como paso previo a las pruebas de solubilización de la trehalasa particulada por la acción de novoenzima se comprobó que las preparaciones enzimáticas comerciales de este complejo lítico carecían de actividad trehalasa que pudiera interferir con la valoración de la actividad propia de las ascosporas.

Las ascosporas aisladas, resuspendidas en 0.1M acetato pH 5.6, se sometieron a rotura

mecánica con el fin de obtener la fracción de paredes celulares y favorecer en lo posible la degradación de paredes celulares aisladas, facilitando el acceso de novoenzima a sus componentes estructurales tanto por la cara externa como interna de estas formaciones.

La fracción particulada de las paredes celulares obtenidas por el método de CASSONE *et al.* (1979) se lavó exhaustivamente con agua destilada y se incubó a 30° C en presencia y ausencia de novoenzima como se indica en Materiales y Métodos. Las mezclas se mantuvieron en agitación y a diversos tiempos se recentrifugaron alcuotas de muestras tratadas y de muestras control. El seguimiento de la solubilización de la trehalasa particulada se realizó de modo indirecto, analizado el descenso de actividad trehalasa en los precipitados resultantes tras el tratamiento con novoenzima, ya que la elevada interferencia de la glucosa presente en la fracción soluble (procedente de la degradación de componentes de pared tales como el glucano estructural) impidió la cuantificación directa de la actividad.

La figura 4 representa una cinética del descenso de actividad trehalasa en los precipitados de las muestras tratadas con novoenzima. Transcurridas 4 h. de tratamiento a 30° C, frente a muestras control no tratadas, aproximadamente el 44% de la actividad trehalasa permanecía asociada a la fracción particulada, lográndose la liberación de un 56% de actividad a la fracción soluble.

Cuando se sometieron a filtración molecular muestras de la fracción soluble de paredes obtenida por pretratamiento con novoenzima se observó un amplio pico con actividad trehalasa, apuntando la posibilidad de que la enzima presentara una naturaleza glicoproteica con amplia heterogeneidad en lo que respecta a su fracción de carbohidrato. Para analizar esta cuestión, se estudiaron distintas fracciones (números 20, 25 y 30, figura 5) en cuanto a propiedades enzimáticas con objeto de averiguar si la actividad presente en cada una de ellas correspondía a una misma trehalasa con peso molecular variable debido a un diferente contenido en carbohidrato.

Las pruebas de activación por fosforilación realizadas en distintas fracciones con la enzima parcialmente purificada por filtración molecular mostraron en todos los casos ausencia de dicha activación. Por otra parte, el estudio de

parámetros tales como Km. y pH óptimo mostró valores coincidentes entre sí (Km. para trehalasa = 10.9×10^{-6} M y pH óptimo = 5.5) y con los anteriormente descritos utilizando suspensiones de células del cultivo (ascosporas) como preparación enzimática en vez de enzima solubilizado (VICENTE *et al.*, 1985).

Estos resultados, en su conjunto, apoyan la idea de que la trehalasa está ligada a la pared celular por enlaces de tipo covalente, o bien retenida por el entramado de los componentes de la pared. La solubilización de éstos en uno u otro caso, por la acción del complejo lítico utilizado, acarrearía la solubilización paralela de la trehalasa, cuya heterogeneidad molecular podría derivar de cortes diferenciales en su porción hidrocarbonada llevados a cabo por las hidrolasas presentes.

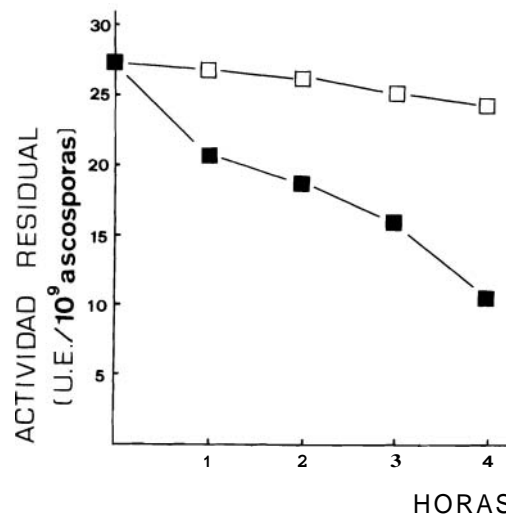


FIGURA 4. Tratamiento con novoenzima de la fracción particulada de paredes celulares obtenidas de extractos de ascosporas. Muestras tratadas (■) y control (□) se incubaron a 30 °C en presencia o ausencia, respectivamente, de 4 mg de novoenzima y 1mM PMSF. A varios tiempos, se valoró la trehalasa residual asociada a paredes lavadas tras centrifugación.

Treatment with novozym of the cell wall particulate fraction from ascospores extracts. Treated (■) and control (□) samples were maintained at 30 °C in the presence or absence of 4 mg novozym and 1mM PMSF, respectively. At various intervals, the trehalase remaining linked to the washed cell walls was determined.

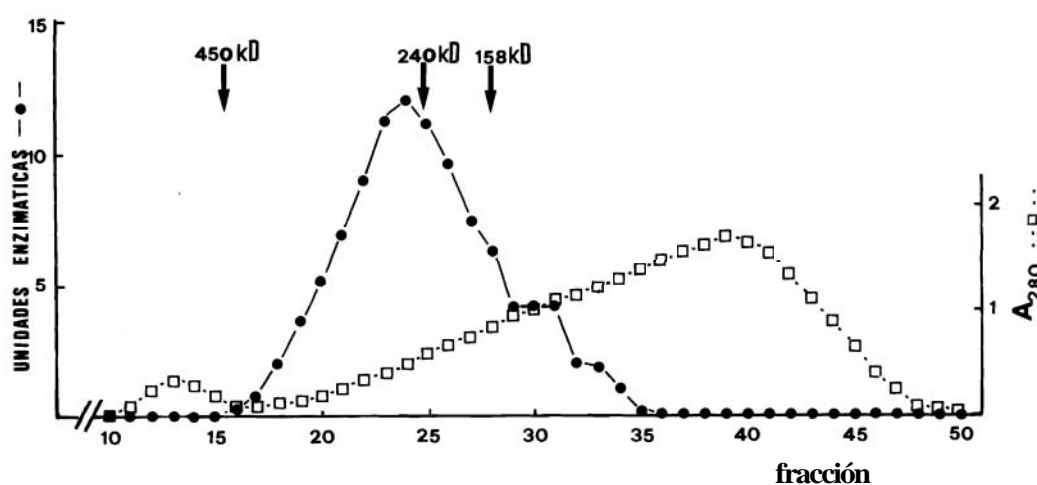


FIGURA 5. Elución por Sephadex G-200 de la trehalasa solubilizada de la pared celular de ascosporas tras 4 h de tratamiento con novoenzima. Los picos de elución de proteínas marcadoras de referencia (ferritina, 450 kD; catalasa, 240 kD; aldolasa, 158 kD) se indican mediante flechas. Se realizaron ensayos control sin sustrato para cada fracción eluida.

Elution pattern by Sephadex G-200 of the trehalase solubilised from the ascospore cell walls after a 4 h treatment with novozym. The elution of protein markers of known molecular weight are indicated by arrows (ferritin, 450 kD; catalase, 240 kD; aldolase, 158 kD). Blank controls without substrate were performed in the assays of each recovered fraction.

BIBLIOGRAFÍA

- ARGÜELLES, J. C. & GACTO, M. 1985. Evidence for regulatory trehalase activity in *Candida utilis*. *Can. J. Microbiol.*, 31: 529-537.
- CASSONE, A.; KERRIDGE, D. & GALE, E. F. 1979. Ultrastructural changes in the cell wall of *Candida albicans* following cessation of growth and their possible relationship to the development of polyene resistance. *J. Gen. Microbiol.*, 110: 339-349.
- ESPÓSITO, M. & ESPÓSITO, R. 1975. Mutants of meiosis and ascospore formation. In: PRESCOTT, D. M. (Ed.), *Methods in Cell Biology*, XI: 303-325. Academic Press. New York.
- HECKER, L. I. & SUSSMAN, A. S. 1973. Localization of trehalase in the ascospores of *Neurospora*: relation to ascospore dormancy and germination. *J. Bacteriol.*, 115: 592-599.
- INOUE, H. & SHIMODA, C. 1981a. Induction of trehalase activity on a nitrogen-free medium: a sporulation-specific event in the fission yeast. *Mol. Gen. Gen.*, 183: 32-36.
- 1981b. Changes in trehalose content and trehalase activity during spore germination in fission yeast. *Arch. Microbiol.*, 129: 19-22.
- KILLICK, K. A. 1980. Coupled, continuous and discontinuous fluorometric assays for trehalase activity. *Anal. Biochem.*, 105: 291-298.
- KILLICK, K. A. & WANG, L-W. 1980. The localization of trehalase in polyacrylamide gels with eugenol by a coupled enzyme assay. *Anal. Biochem.*, 106: 367-372.
- LEUPOLD, U. 1950. Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *Ctes. rend. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.*, 24: 381-480.
- LOYD, J. B. & WHELAN, W. J. 1969. An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. *Anal. Biochem.*, 30: 467-470.
- LONDESBOROUGH, J. 1982. Cyclic nucleotide-dependent inactivation of yeast fructose-1, 6-bisphosphatase by ATP. *FEMS Lett.*, 44: 269-272.
- NISHI, K., SHIMODA, C. & HAYASHIBE, M. 1978. Germination and outgrowth of *Schizosaccharomyces pombe* ascospores isolated by Urografin density gradient centrifugation. *Can. J. Microbiol.*, 24: 893-897.
- ORTIZ, C. H., MAIA, J. C. C., TENAN, M. N., BRAZ-PADRAO, G. R., MATTOON, J. R. & PANEK, A. D. 1983. Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic-AMP dependent phosphorylation-

- dephosphorylation cascade system. *J. Bacteriol.*, 153: 644-651.
- PANEK, A. D. 1963. Function of trehalose in baker's yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, 100: 422-425.
- SHIMODA, C. 1980. Differential effects of glucose and fructose on spore germination in the fission yeast. *Can. J. Microbiol.*, 26: 741-745.
- THEVELEIN, J. M. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Rev.*, 48: 42-59.
- UNO, I., MATSUMOTO, K., ADACHI, K. & ISHIKAWA, T. 1983. Genetic and biochemical evidence that trehalase is a substrate of AMP-dependent protein kinase in yeast. *J. Biol. Chem.*, 258: 10867-10872.
- VAN DER PLAAT, J. B. & VAN SOLINGEN, P. 1974. Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 56: 580-586.
- VICENTE, J. ARGUELLES, J. C. & GACTO, M. 1985. Papel de la trehalasa en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*: distribución durante el ciclo de desarrollo, caracterización y localización. *Anales de Biología Univ. Murcia*, 5: 25-37.
- WIEMKEN, A. & SCHELLENBERG, M. 1982. Does a cyclic AMP-dependent phosphorylation initiate the transfer of trehalase from the cytosol into the vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*? *FEBS Lett.* 150: 329-331.