



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Estancia Erasmus en la Universidad Católica de Lovaina.

Estudios sobre las hidrofobinas de clase II

Autor/es

Blanca Santa Cecilia Motilva

Director/es

Directores Universidad Católica de Lovaina: Prof. Guy Derdelinckx y
Prof. Christian Michiels

Tutora Universidad Zaragoza: Pilar Mañas Pérez

Facultad de Veterinaria

2014

Datos del estudiante

Apellidos: Santa Cecilia Motilva

Nombre: Blanca

DNI: 78756809 W

Dirección: Avenida de Navarra nº40 1ªA

C.P: 50500

Localidad: Tarazona

Provincia: Zaragoza

Teléfono: 625990429

e-mail: blancasantacecilia@gmail.com

Lista de abreviaturas

ΔD	Cambios de disipación
Δf	Cambios de frecuencia
ACN	Acetonitrilo
BCCM/MUCL	Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms
CMC	Concentración Micelar Crítica
FHB	Fusarium Head Blight
<i>F.avenaceum</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>
<i>F.culmorum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
FpHyd5	<i>Fusarium poae</i> hydrophobin
<i>F.poa</i>	<i>Fusarium poae</i>
HCl	Ácido clorhídrico
KCl	Cloruro de potasio
KDa	KiloDaltons
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight
MEB	Caldo de extracto de malta
MUCL	Micoteca Katholic University of Leuven
PDA	Agar de Patata Dextrosa
PDB	Caldo de Patata Dextrosa
QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo
RPC	Cromatografía de fase reversa
RP-FPLC	Cromatografía líquida rápida de fase reversa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
TMM	Medio mínimo de Trichoderma
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
WCA	Ángulo de contacto del agua

Indice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción y revisión bibliográfica	3
Justificación y objetivos	17
Materiales y métodos	18
Resultados y discusión	24
Conclusiones	32
Conclusions	33
Identificación de las aportaciones de la asignatura a nivel de aprendizaje	34
Evaluación asignatura y sugerencias de mejora	34
Bibliografía	35

Resumen

Las hidrofobinas son proteínas de superficie activa producidas por los hongos filamentosos, necesarias para el crecimiento aéreo y la dispersión de esporas de dichos microorganismos. Su característica más importante es su comportamiento anfílico debido a su estructura en parte hidrofóbica y en parte hidrofílica. Ello les permite interactuar con interfases disminuyendo la tensión superficial y cambiando el comportamiento de las superficies, de hidrófobas a hidrófilas y viceversa. Asimismo, estas proteínas son capaces de formar dímeros, tetrámeros y formas multiméricas. Las hidrofobinas presentan multitud de características interesantes que les permiten tener gran cantidad de posibles aplicaciones. No obstante, estas moléculas pueden interactuar con el CO₂ gaseoso de las bebidas carbonatadas y producir *gushing*. El objetivo de este trabajo es analizar las mejores condiciones para producir hidrofobina de clase II a partir del micelio de *Fusarium poae* (FpHyd5) y caracterizarla.

Los resultados mostraron que la mejor producción de FpHyd5 se llevó a cabo en Richard's minimal medium con glucosa y el mejor método de extracción fue el que se realizó utilizando tampón 170 mM Tris/HCl. En cuanto a la caracterización de FpHyd5, los datos indican que esta hidrofobina presentó mayor afinidad por las superficies hidrófobas que por las hidrófilas. El área superficial hidrofóbica dentro de su parche hidrofóbico tiene poca accesibilidad para interactuar con superficies sólidas y, por tanto, no forma interacciones hidrofóbicas fuertes. Mediante la medida de los cambios del ángulo de contacto con el agua, se observó que esta hidrofobina es capaz de cambiar el comportamiento de una superficie hidrofílica a hidrofóbica y viceversa. En el análisis microscópico se puso de manifiesto que FpHyd5 formaba cristales con estructuras poco ordenadas en forma de ramas. Además, FpHyd5 formaba polímeros debido a que las hidrofobinas presentan una gran tendencia a autoensamblarse por su carácter anfílico. Cuando su concentración disminuía, aparecían las formas monoméricas. La adición de FpHyd5 al agua carbonatada mostró la formación de partículas de 100nm que correspondían con la formación de nanoburbujas. Por lo tanto, se puede concluir que se produce la interacción entre FpHyd5 y el CO₂.

Abstract

Hydrophobins are surface active proteins produced by filamentous fungi necessary for aerial growth and spores dispersion. Their most important characteristic is their amphiphilic behaviour due to their structure hydrophobic on the one side and hydrophilic on the other side. This fact allows them to interact with interfaces and drop the surface tension, migrate to hydrophobic-hydrophilic interfaces changing the behaviour of a surface from hydrophobic to hydrophilic and vice versa. Hydrophobins also form dimers, tetramers and multimer forms. Those proteins present a lot of characteristics that permit them to have many possible applications. Despite all the positive properties of hydrophobins, these molecules can interact with gaseous CO₂ and cause gushing. The objective of this dissertation is to analyze the best conditions to produce class II hydrophobin from mycelium of *Fusarium poae* (FpHyd5) and characterize it.

Results show that the best production of FpHyd5 was realized in Richard's minimal medium with glucose and the best method of extraction with 170mM Tris/HCl buffer. In the case of characterization of FpHyd5, the data indicate that this hydrophobin has more affinity for hydrophobic surfaces than hydrophilic surfaces. The hydrophobic surface area of its hydrophobic patch is not uniform so this hydrophobic surface could be little accessible and prevent strong hydrophobic interactions. By measuring changes of WCA, it was obvious that this hydrophobin is able to change the behavior of hydrophilic surface to hydrophobic and vice versa. Microscopic analysis show that FpHyd5 can form crystals with branched structures. FpHyd5 forms polymers in agreement with hydrophobins tends to self-assemble by their amphiphilic character. When the concentration decreases, monomeric forms appear. When FpHyd5 was adding to carbonated water particles of 100nm appears corresponding to the formation of nanobubbles. Therefore, can be conclude that the interaction between FpHyd5 and CO₂ is produced.

1. Introducción y revisión bibliográfica

1.1 Hidrofobinas

Las hidrofobinas son proteínas de superficie activa producidas por hongos filamentosos que resultan necesarias para el crecimiento aéreo y la dispersión de esporas de dichos microorganismos, permitiendo la adhesión del hongo a superficies sólidas (Wösten, 2001). Las hidrofobinas son proteínas extracelulares, con forma globular y que tienen un peso molecular entre 7 y 15 KDa y un diámetro entre 2 y 3 nm. Las hidrofobinas son producidas por Ascomycetos y Basidiomicetos (Linder *et al.*, 2005). La característica más importante de las hidrofobinas es que son capaces de autoensamblarse formando membranas anfipáticas, lo que les permite interactuar con interfases y disminuir la tensión superficial (Linder *et al.*, 2005). El mecanismo de acción para la formación de estructuras fúngicas aéreas fue propuesto por Wösten (2001). (Figura 1)

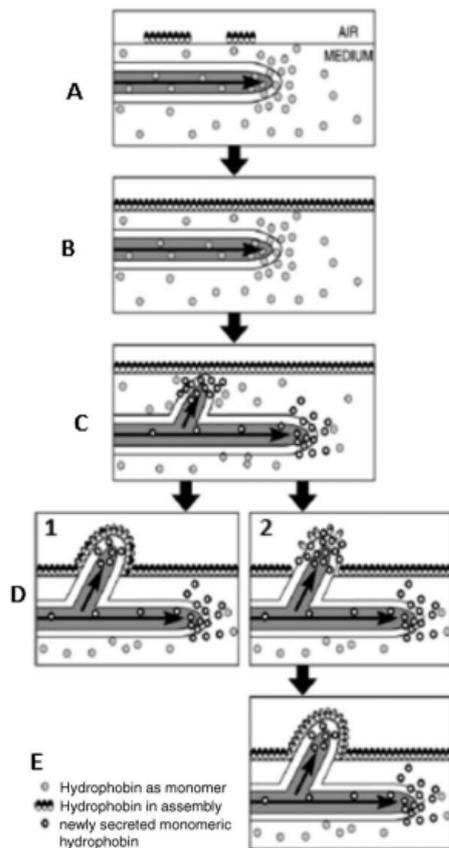


Figura 1. Mecanismo de formación de estructuras fúngicas aéreas (Wösten ,2001)

Después de que el micelio se forme sumergido en un medio líquido como medio de crecimiento, el hongo secreta las hidrofobinas al medio en forma de monómeros (Fig.1-A). En la figura 1-B se observa el auto ensamblaje de los monómeros en la interfase líquido-aire formando una membrana anfipática, lo cual hace que la tensión superficial disminuya. La Figura 1-C muestra la germinación de una nueva hifa. La capa de hidrofobinas cubre completamente la superficie de la hifa. El lado hidrofílico de la película de hidrofobinas contacta con la pared celular que es hidrofílica, mientras la parte hidrófoba de la capa de hidrofobinas se expone al aire, lo cual permite a la hifa crecer fuera del líquido sin contacto con el aire (Figura 1-D1). Alternativamente, puede suceder que la hifa rompa la membrana de hidrofobinas y la pared celular contacte con el aire (Figura 1-D2) para formar después una nueva monocapa de hidrofobinas que cubra la superficie de la hifa (Figura 1-E).

Todas las hidrofobinas comparten la misma estructura primaria que se muestra en la Figura 2. A lo largo de su secuencia de aminoácidos hay ocho residuos de cisteínas unidos por puentes disulfuro (líneas amarillas de la Figura 2). Las cisteínas 2, 3 y 6, 7 aparecen siempre juntas una al lado de la otra en la secuencia de aminoácidos (Linder *et al.*, 2005). El enlace entre la cisteína 1 y 6 y entre la 7 y 8 forma una primera y segunda horquilla β en forma de bucle, mientras que las cisteínas 4 y 5 forman una estructura de α -hélice (Kallio *et al.*, 2007; Kisko, 2008; Linder *et al.*, 2005).

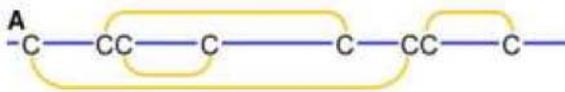


Figura 2. Estructura primaria de la hidrofobina de clase II (HFBII) producida por *T.reseei* (Linder *et al.*, 2005).

1.2 Clases de hidrofobinas

Las hidrofobinas se dividen en dos clases en base a su secuencia de aminoácidos y a la solubilidad de los agregados que forman (Linder *et al.*, 2005; Sarlin *et al.*, 2005).

Las hidrofobinas de clase I son producidas por ascomicetos y basidiomicetos y presentan una secuencia de aminoácidos más larga (100-125 aminoácidos) que las de clase II (50-100 aminoácidos). Además, la clase I presenta una mayor cantidad de

aminoácidos hidrofóbicos y por ello, esta clase de hidrofobinas es más hidrofóbica que la clase II (Hektor and Scholtmeijer, 2005). La estructura de la clase I de hidrofobinas no contiene α -hélice, en su lugar, presenta un gran bucle desordenado y mayor cantidad de láminas β en su parche hidrofóbico que la clase II, lo cual las hace más estables (Figura 4-a)(Kwan et.al, 2006) (Hektor and Scholtmeijer, 2005). La presencia de este bucle desordenado da a las hidrofobinas de clase I la capacidad de formar barritas cilíndricas de dimensiones entre 100-250 nm. Estas estructuras se unen entre sí formando películas muy estables y robustas (Figura 3-a), cambiando la configuración α de su estructura nativa, que es soluble, a una configuración β muy estable e insoluble. Estas estructuras son muy difíciles de disolver y sólo son solubles en ácidos fuertes tales como ácido fórmico (FA) y ácido trifluoroacético (TFA) debido a que forman autoensamblados muy compactos (Linder, *et al.*, 2009).

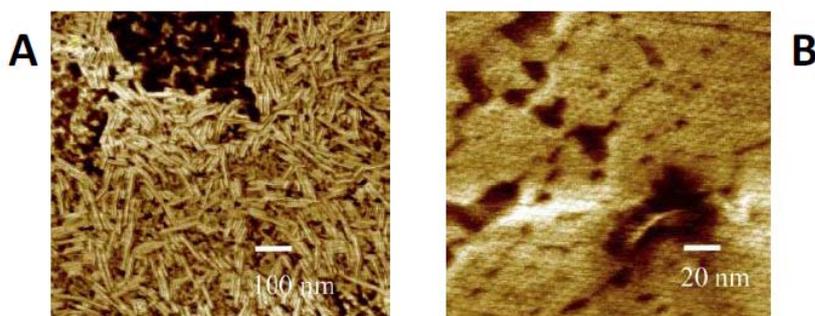


Figura 3. Imagen de microscopía de fuerza atómica de las estructuras de auto ensamblaje de las hidrofobinas (A) Barritas cilíndricas de *S. commune* (SC3) (hidrofobina de clase I) (B) Película formada por barras de *T. reesei* HFBI en la interfase aire / agua (hidrofobina de clase II) (Linder *et al.*, 2005)

Las hidrofobinas de clase II son producidas solamente por ascomycetos. La estructura de este tipo de hidrofobinas está formada por una α -hélice y cuatro láminas β . Esas láminas β forman una estructura central de β -barril que consta de dos bucles (Figura 4-b) (Linder *et al.*, 2005). La clase II forma agregados como agujas o fibrillas que se disocian muy fácilmente (figura 3-B), siendo solubles en etanol al 60% o en sodio dodecil sulfato (SDS) caliente al 2% (Linder *et al.*, 2005).

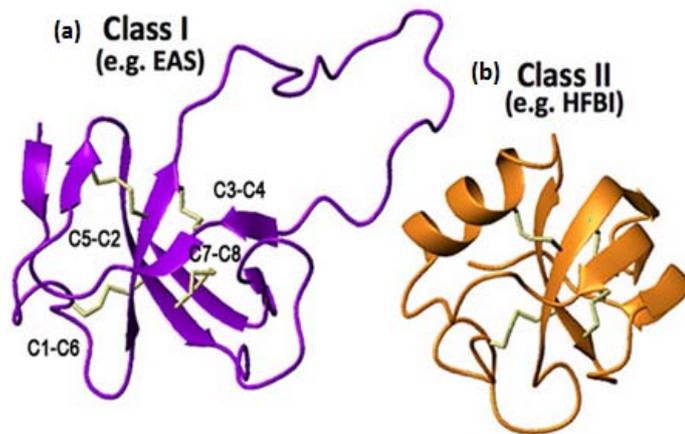


Figura 4. Diferencias en la estructura de hidrofobinas de clase I y clase II. a) Estructura de la hidrofobina de clase I (EAS producidos por *Neurospora crassa*) en el que las láminas β están representadas como flechas. El bucle largo del lado derecho se corresponde con la α -hélice de las hidrofobinas de clase II b) Estructura de hidrofobina de clase II (HFBI producida por *Trichoderma reesei*) con una α -hélice y dos bucles (formados por cuatro láminas β) (Bayry *et al.*, 2012).

1.3 Propiedades de las hidrofobinas

Las hidrofobinas presentan un "parche hidrofóbico" (Figura 5-b) que contiene cadenas laterales alifáticas hidrófobas (Linder *et al.*, 2005). Estas cadenas alifáticas están expuestas a la superficie debido a que la estructura formada por los puentes disulfuro es tan rígida que les impide estar dentro del núcleo de la proteína. Esta extensa red de enlaces disulfuro es la responsable de la estabilización de la estructura (Linder *et al.*, 2009). Como se muestra en la figura 5, en el caso de la clase II, el parche hidrofóbico (figura 5-b, parte verde) corresponde con las láminas β que forman los dos bucles de la estructura (Figura 5-a, horquillas de color amarillo).

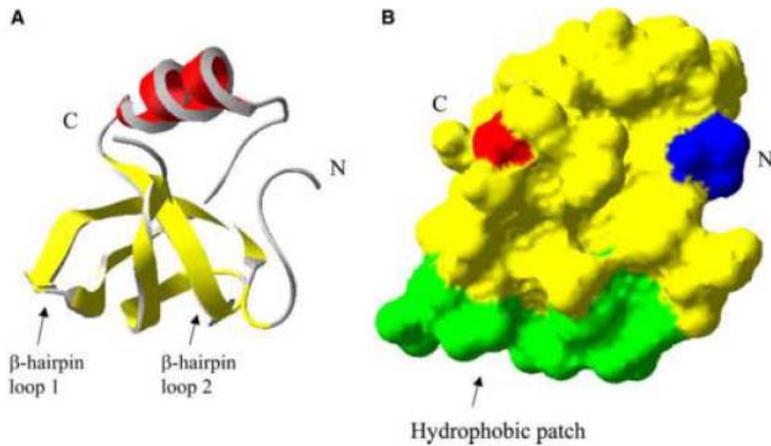


Figura 5. a) Estructura secundaria de hidrofobinas de clase II (HFBII producido por *T.reesei*). b) Parche hidrofóbico en verde, parche hidrofílico en amarillo y extremos N-y C-terminales que se indican en azul y rojo respectivamente (Linder *et al.*, 2005).

A concentraciones menores que la Concentración Micelar Crítica (CMC), las hidrofobinas se disuelven en agua y a altas concentraciones (por encima de la CMC), forman dímeros, tetrámeros y formas multiméricas (Kallio *et al.*, 2007). Las hidrofobinas se auto ensamblan porque la exposición del parche hidrofóbico no resulta energéticamente favorable. En un disolvente apolar, las hidrofobinas forman principalmente formas monoméricas, pero en un disolvente polar, las hidrofobinas se unen unas con otras para ocultar su parche hidrofóbico.

Como se muestra en la Figura 6, los monómeros de hidrofobinas pueden producir dos tipos de dímeros, dependiendo de su orientación: dímeros hidrófilos y dímeros anfífilicos. Cuando dos proteínas interactúan entre sí uniendo sus parches hidrófobos, se forman dímeros hidrofílicos (Figura 6-b). Mediante esta interacción, las proteínas tratan de proteger sus parches hidrofóbicos de las moléculas polares. Los dímeros anfífilicos, se forman por la unión de dos hidrofobinas una al lado de la otra. (Figura 6-a). Además, ambos tipos de dímeros pueden producir tetrámeros y polímeros en solución. Los monómeros, dímeros y tetrámeros son todos superficialmente activos (Szilvay *et al.*, 2007). Las hidrofobinas también pueden migrar a la interfase agua / aire y producir monocapas (figura 6-c). Los ensamblados de hidrofobinas son capaces de tolerar altas temperaturas y cambios en el pH. La adición de sales conduce a la formación de agregados más grandes (Christian *et al.*, 2009; Kisko, 2008), pero, sin embargo, la adición de etanol (65%) puede romper fácilmente esta estructura.

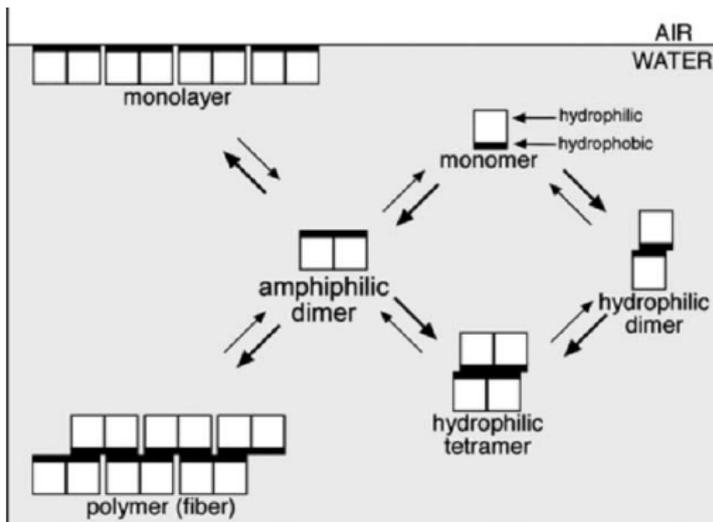


Figura 6. Formación de multímeros de hidrofobina en el agua y producción de películas superficiales en la interfase agua / aire (Kallio *et al.*, 2007)

Las hidrofobinas muestran un comportamiento anfílico porque presentan una estructura con una parte hidrófila y otra hidrófoba. Esta característica les permite reducir la tensión superficial del agua debido a que las hidrofobinas impiden que las moléculas de agua interactúen entre sí. Se ha demostrado que las hidrofobinas HFBII de *T. reesei* pueden reducir la tensión superficial del agua de 72 a 28 MJ m⁻² a una concentración de 0,02 mg ml⁻¹ (Hakanpää *et al.*, 2004). En las interfases aire-agua, la tensión superficial disminuye más que en las interfaces líquido-líquido (aceite en agua) (Lumsdom *et al.*, 2005). Las hidrofobinas pueden migrar a las interfases cambiando la hidropatía de una superficie (Figura 7). La estructura secundaria de la clase I cambia cuando las hidrofobinas se auto ensamblan en las interfases agua-aire (Kisko, 2008), formando mono y multi-capas, mientras que la clase II sólo produce monocapas. Este hecho podría ser la razón por la que el espesor de las películas formadas en las interfases por la clase I es mayor que el de la clase II (Kallio *et al.*, 2007; Kisko, 2008). Las hidrofobinas también son capaces de encapsular y disolver moléculas hidrófobas en medios acuosos (Linder *et al.*, 2005).

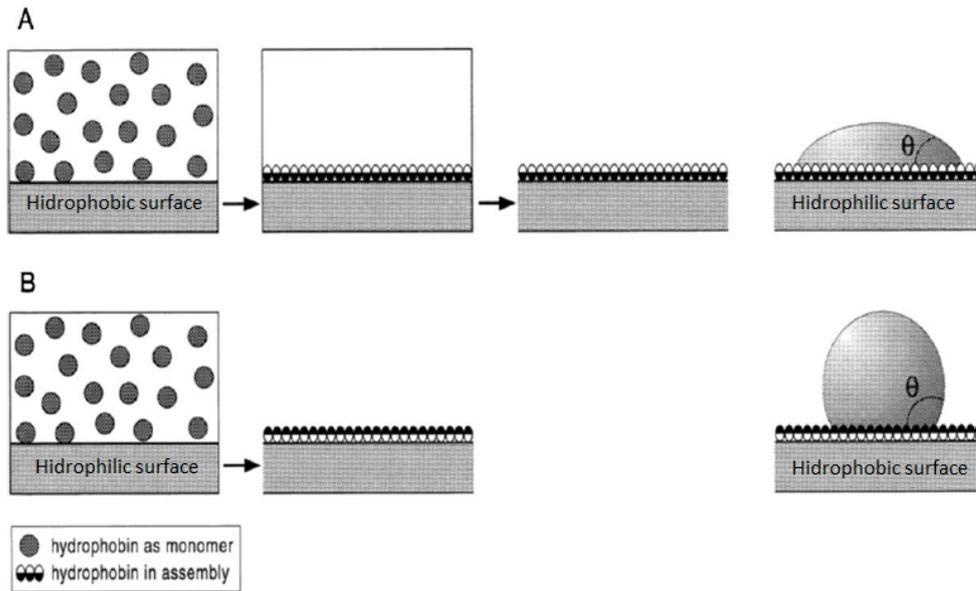


Figura 7. A) Cambio de una superficie hidrofóbica (teflón) a hidrófila B) Cambio de una superficie hidrófila (vidrio o papel) a hidrofóbica (Wösten y de Vocht, 2000)

Las hidrofobinas son las moléculas con mayor peso molecular conocido (7.000 a 15.000 g / mol) y su adsorción a las interfases aceite / agua o aire / agua supone más tiempo que en el caso de tensioactivos de bajo peso molecular (500-1000 g / mol). Sin embargo, la cantidad de hidrofobinas necesaria para llegar a una tensión superficial específica baja es mucho menor que la necesaria para otros tensioactivos de menor peso molecular (Lumsdon *et al.*, 2005).

Las hidrofobinas pueden utilizarse en medicina. Las hidrofobinas de clase I, debido a que forman estructuras muy estables y fuertes, pueden actuar como revestimiento de la superficie de biomateriales tales como materiales quirúrgicos e implantes médicos. Estas proteínas aumentan la biocompatibilidad de los implantes, ya que pueden reducir la hidrofobicidad de los materiales del implante disminuyendo las infecciones bacterianas utilizando revestimientos de hidrofobias junto con compuestos antibacterianos (Héctor *et al.*, 2005). Las hidrofobinas se pueden utilizar también como surfactantes y emulsionantes en la elaboración de alimentos, ya que son capaces de formar películas en la interfase que estabilizan las emulsiones (Hektor *et al.*, 2005). Otra de las aplicaciones de las hidrofobinas es la inmovilización de enzimas. Algunas enzimas (EGI, una endoglucanasa) se pueden inmovilizar mediante la acción de hidrofobinas para así evitar su desnaturalización y mantener su actividad. (Linder *et al.*, 2005).

Una de las características más importantes de las hidrofobinas es que son capaces de interactuar con moléculas gaseosas hidrófobas como el CO₂ provocando *gushing* en bebidas carbonatadas. El *gushing* lo provocan únicamente las hidrofobinas de clase II, debido a que éstas presentan una estructura elástica y flexible, mientras que las de clase I forman estructuras rígidas y cristalinas. Este tipo de hidrofobinas de clase II genera nanoburbujas al interactuar con el CO₂ de las bebidas carbonatadas. Cuando la botella de cerveza se abre, la presión disminuye, pero la presión interna de las nanoburbujas aumenta y estallan causando una reacción en cadena que produce *gushing* (Deckers *et al.*, 2013).

1.4 *Gushing*

Gushing es la producción descontrolada de espuma producida en las bebidas carbonatadas inmediatamente después de la apertura de la botella y sin que la botella haya sido agitada previamente (Figura 8). Este fenómeno afecta a la imagen de la marca de la cerveza y produce pérdidas económicas (Sarlin *et al.*, 2012).



Figura 8. Hidrofobinas de clase II de *Trichoderma reesei* (HFBI) que producen *gushing* (Shokribousjein *et al.*, 2010).

Existen dos tipos de *gushing*:

- ***Gushing* primario:** provocado por las hidrofobinas de clase II. Se produce cuando la cebada u otros cereales utilizados como materias primas en la elaboración de la cerveza, se contaminan con hongos filamentosos durante la cosecha, almacenamiento o el cultivo de dicho cereal. Estos microorganismos producen hidrofobinas durante su

ciclo de vida normal, y éstas pasarán través de toda la cadena de producción de la cerveza hasta el producto final causando *gushing* (Lowe *et al.*, 2006). Las hidrofobinas pueden generarse también durante el malteado, especialmente durante las etapas de remojo y germinación (Sarlin *et al.*, 2005).

El género más importante de hongos que produce *gushing* es *Fusarium*, seguido de *Nigrospora*, *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Sarlin *et al.*, 2005). Dependiendo del hongo, se requiere una cantidad diferente de hidrofobina para que se produzca *gushing*, pero se sabe que una concentración de 1 mg/L, o incluso menos, es suficiente para producirlo (Garbe *et al.*, 2009;.. Sarlin *et al.*, 2005). Tomando como ejemplo de inductor de *gushing* la hidrofobina HFB producida por *T. reesei*, se estableció que 0,003 mg/L de esta hidrofobina son suficientes para provocar *gushing* a temperatura ambiente, mientras que si contaminamos artificialmente la malta con *T. reesei*, se necesitan 250 ppm (250 mg/kg de malta) para producir *gushing*. En el caso de *F. poae*, 0.15 mg/L de hidrofobina de *F.poa*e es suficiente para producir *gushing* (Garbe *et al.*, 2009).

La hipótesis sobre el mecanismo de producción de *gushing* primario fue establecida por Deckers *et al.* (2010) (Figuras 9 y 10).

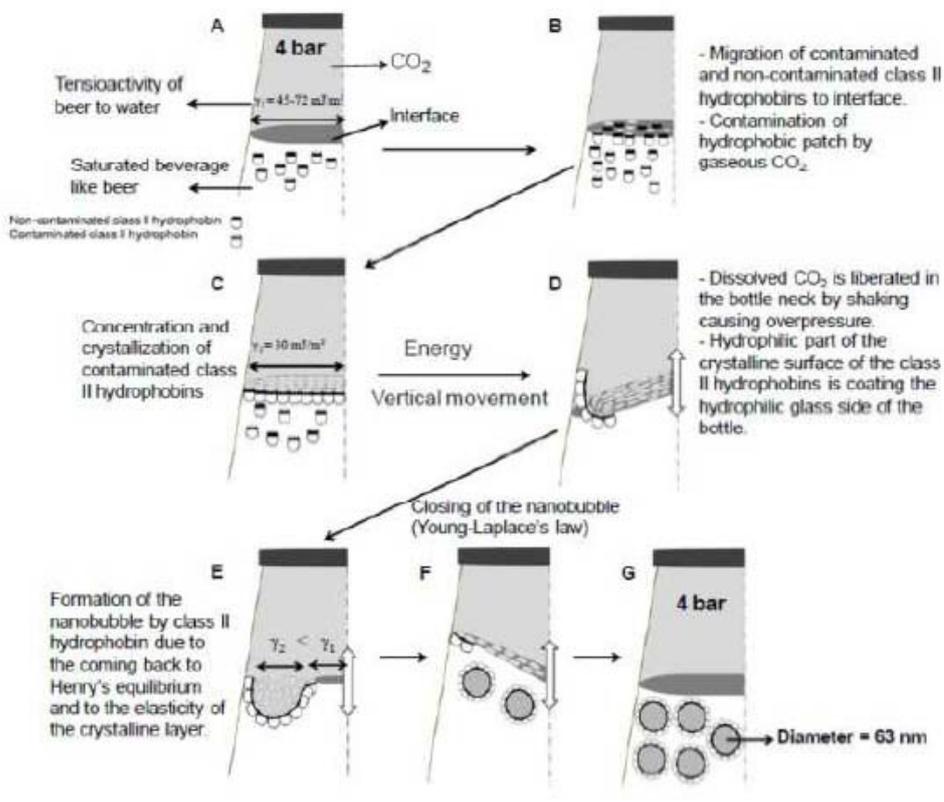


Figura 9. Hipótesis del mecanismo de producción de *gushing* basado en la formación de nanoburbujas (Deckers, 2013).

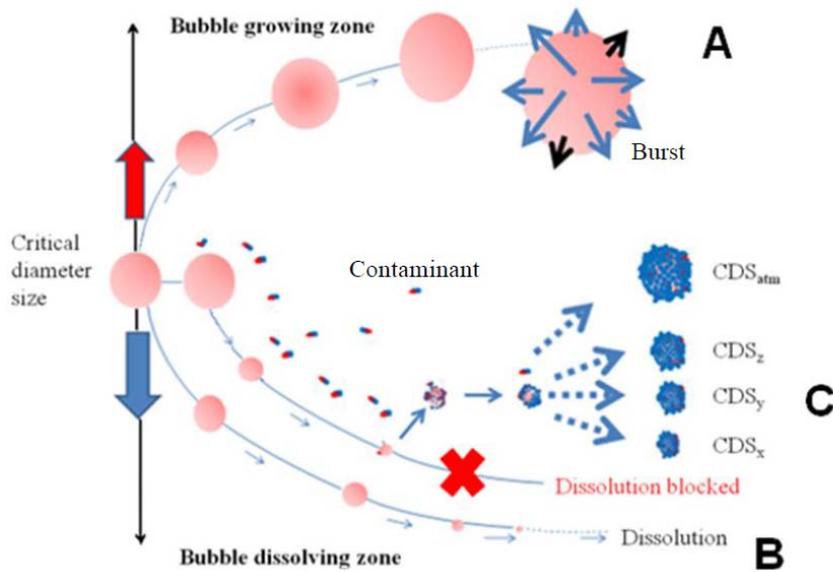


Figura 10. Representación del mecanismo de producción de *gushing*. Las hidrofobinas de clase II inhiben la disolución completa del CO₂ (gas) y forman nanoburbujas. (Decker *et al.*, 2010)

Esta hipótesis explica que en una bebida carbonatada que contiene hidrofobinas de clase II, la disolución completa del CO₂ gaseoso se ve inhibida por la presencia de estas proteínas. Este fenómeno es la base del *gushing* primario que se explica en detalle a continuación. Debido a la naturaleza anfifílica de las hidrofobinas, estas moléculas ascienden a la interfase agua-aire y forman una capa cristalina en la interfase. Esta propiedad de las hidrofobinas hace que la tensión superficial disminuya. Según la ley de Henry, en una botella de bebida carbonatada cerrada, las moléculas de CO₂ se encuentran en equilibrio entre la forma soluble y la gaseosa. Cuando el CO₂ (gas) intenta entrar a la solución, prefiere hacerlo por aquel sitio donde la tensión superficial sea menor, que será la superficie de la bebida cubierta por hidrofobinas. Dado que las moléculas de CO₂ gaseoso son hidrófobas, éstas interactuarán con el parche hidrófobo de las hidrofobinas y no se solubilizarán. Debido a los movimientos que sufre la botella, la monocapa de hidrofobinas formada en la interfase atrapa el CO₂ interactuado con él y dando lugar a unas formas esféricas llamadas nanoburbujas. Estas estructuras se estabilizan y dispersan en el líquido, manteniendo su forma hasta la apertura de la botella. La presión en el interior de una botella de cerveza es de alrededor de 4 bar, cuando se abre la botella, la presión desciende de repente (de 4 bar a 1 bar), lo cual provoca un aumento en el volumen de estas nanoburbujas dando lugar a su explosión. Este fenómeno se denomina nano-bomba. Esta explosión proporciona suficiente energía para romper los enlaces de hidrógeno entre el CO₂ y las moléculas de agua (Figura 11),

originando una reacción en cadena y provocando la salida espontánea de espuma de la botella. Este efecto es dependiente de la temperatura (a temperaturas bajas, la cantidad de *gushing* es mucho menor que a temperaturas altas) (Deckers , 2013).

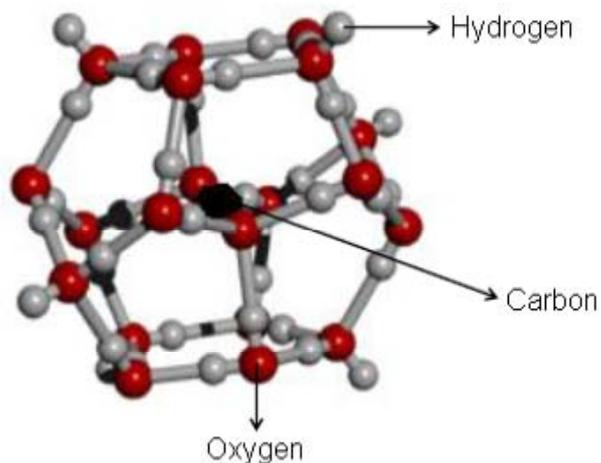


Figura 11. Enlace de hidrógeno entre las moléculas de CO₂ y de agua. Los átomos de oxígeno están representados en rojo, los de hidrógeno en gris y los de carbono en negro (adaptado de Chaplin, 2012).

El *gushing* se ha observado también en otras bebidas carbonatadas como el champán y el vino espumoso (Zoecklein,1999) así como en la sidra (Wilson *et al.*,1999), refrescos e incluso el agua mineral (Fischer, 2001). Sin embargo, el *gushing* que parece ser más relevante es el que sucede en la cerveza (Pellaud , 2002).

Se han estudiados varios métodos preventivos y curativos con el fin de controlar el *gushing* primario. Algunos métodos preventivos consisten en el tratamiento de los campos de cebada con fungicidas o el desarrollo de granos de cebada resistentes a hongos y a la fusariosis de la espiga FHB. Durante el proceso de malteado, la limpieza o clasificación por tamaño de los granos antes de malteado, así como la inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp. con tratamientos químicos o bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus plantarum* (Lowe & Arendt, 2004 ;Laitila *et al.*, 2002; Mauch *et al.*, 2010) y levaduras como *Pichia anomala* (Laitila *et al.*, 2007; Sarlin, 2012) se han probado, con resultados prometedores como métodos de prevención. Los métodos curativos consisten en reducir o eliminar la presencia de hidrofobinas en las bebidas carbonatadas. Se ha estudiado el uso de enzimas proteolíticas para resolver el problema del *gushing* (Aastrup *et al.*, 2003). También se ha demostrado que el *gushing* disminuye si se aumenta la concentración de lúpulo en la cerveza (Curtis *et al.*, 1961). Ácidos

grasos mono o poliinsaturados, como ácido linoleico también pueden inhibir el *gushing* (Sarlin, 2012), (Shokribousjein , Z. *et al.* , 2014).

- ***Gushing* secundario:** es un tipo de *gushing* con menor relevancia, causado por defectos durante la fabricación de la cerveza o tratamiento incorrecto de la misma. Este tipo de *gushing* se atribuye a una serie de factores que incluyen, oxalato de calcio, iones metálicos, agentes tensioactivos (compuestos que disminuyen la tensión superficial o tensión interfacial entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido) o isomerizado de lúpulo (Kitabatake, 1981; Carrington *et al.*, 1972; Franke, 1995; Gardner *et al.*, 1973; Kieninger, 1976; Outtrup, 1980;. Sandra *et al.*, 1973; Weideneder, 1992; Zepf, 1998).

En este trabajo, el *gushing* primario será el principal tipo de *gushing* estudiado.

1.5 Género *Fusarium*

Fusarium es un gran género de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y que crecen en asociación con las plantas. Algunas especies producen micotoxinas en cultivos de cereales que pueden afectar a la salud humana y animal si entran en la cadena alimentaria. Las principales toxinas producidas por esta especie son las fumonisinas y los tricotecenos . *Fusarium* se encuentra contaminando la cebada, el trigo y otros granos. Esta especie causa fusariosis de la espiga (FHB), La FHB es una enfermedad importante en el grano que aparece especialmente en las zonas húmedas y semi -húmedas (Schroeder y Christensen , 1963) . *Fusarium graminearum* es la especie más frecuentemente implicada en la FHB , pero hay otras especies como *F. avenaceum* , *F. culmorum* y *F. poae* que también pueden causarla. Las especies de *Fusarium* producen micotoxinas , tales como vomitoxina (deoxinivalenol , DON) (Bai *et al.*, 2001) y estas micotoxinas pueden pasar a la cerveza a través del proceso de elaboración produciendo pérdidas económicas (Schwarz *et al.*, 1995; Wolf- Hall y Schwarz, 2002) . También se sabe que las especies de *Fusarium* son capaces de producir hidrofobinas de clase II y por lo tanto capaces de provocar *gushing* (Sarlin *et al.*, 2005) .

Fusarium poae crece con mayor frecuencia en lugares fríos y húmedos, pero produce mayor cantidad de biomasa en zonas más cálidas. Este hecho sugiere que *Fusarium poae* se adapta más a las condiciones agroambientales durante la formación del grano que otras especies de *Fusarium* como *F. graminearum* y *F. culmorum* . (Rohácik y Hudec , 2005) . *F. poae* produce un micelio aéreo denso en PDA (agar patata dextrosa),

que presenta un color que va de blanco a rosado (Figura 12). El color de la parte inferior de la colonia es generalmente blanco o amarillo. El hongo suele producir un aroma afrutado característico similar al acetato de amilo (Stenglein ,S.A. , 2009) .

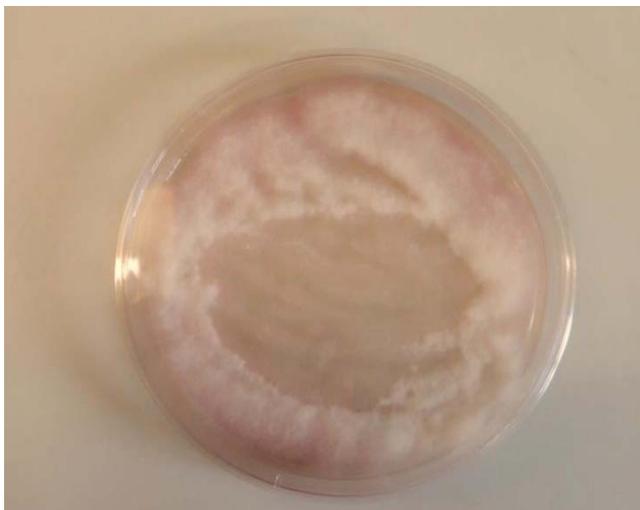


Figura 12. *Fusarium poae* en PDA

1.6 Hidrofobinas de *Fusarium*

Se han identificado cinco genes que codifican hidrofobinas en *Fusarium verticillioides*. HYD1, HYD2 y HYD3 codifican hidrofobinas de clase I, mientras que HYD4 y HYD5 codifican la clase II. (Fuch, U.U *et al.*, 2004). En el caso de *Fusarium graminearum*, cinco genes no caracterizados se analizaron con el fin de demostrar que presentaban una secuencia similar a la de otras hidrofobinas conocidas. Cuatro de ellos, FG01763.1, FG01764.1, FG03960.1 y FG09066.1, fueron clasificados como genes que codifican hidrofobinas de clase I y uno, FG01831.1, como un gen que codifica una hidrofobina de clase II (Sarlin *et al.*, 2011). En este trabajo se estudia *Fusarium poae*, ya que se ha identificado un gen putativo correspondiente con la producción de las hidrofobinas de clase II (Figura 13) (Sarlin *et al.*, 2012).

FpHyd5	QAYVPCTGLYGSSQCCATDVLGVANLDCGTPPSVPANATDFSAVCAEIGQRRARCCVLPILDQGILCNTPTGVQD
FgHyd5	QAYIPCSGLYGTSQCCATDVLGVADLDCGNPPSSPTDADNFSAVCAEIGQRRARCCVLPILDQGILCNTPTGVQD
FvHyd5	QAYIPCSGLYGTSQCCATDVLGVADLDCGNPPSTPANATDFSAVCSAIGQRRARCCVLPILDQGILCNTPTGVQD

Figura 13. Secuencia de aminoácidos de la hidrofobina de *Fusarium poae* (FpHyd5), *Fusarium graminearum* (FgHyd5) y *Fusarium verticillioides* (FvHyd5) (Sarlin *et al.*, 2011;.. Fuch *et al.*, 2002)

De momento no hay información en la literatura científica acerca de la producción y caracterización de hidrofobinas de *Fusarium poae*. En esta investigación se tratará de extraer, purificar y caracterizar una hidrofobina de clase II producida por el hongo filamentoso *Fusarium poae*. Se determinarán los parámetros de producción, así como los métodos de extracción. La hidrofobina purificada se caracterizará realizando los siguientes análisis: adsorción de FpHyd5 a superficies hidrófobas e hidrófilas utilizando la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), ángulo de contacto con el agua (WCA), microscopía óptica y electrónica de barrido, análisis del tamaño de partícula en solución acuosa y en agua carbonatada.

2. Justificación y objetivos

Dentro de las hidrofobinas de clase II, las que mejor se han estudiado y caracterizado son las HFBI y HBII producidas por *Trichoderma reesei* (Askolin *et al.*, 2001, 2004, 2005; Bailey *et al.*, 2002; Hakanpää *et al.*, 2004, 2006; Kisko *et al.*, 2005, 2008; Linder *et al.*, 2002; Nakari-Setälä *et al.*, 1996, 1997; Paananen *et al.*, 2003; Szilvay *et al.*, 2007). Otras hidrofobinas de clase II de la especie *Fusarium* como las hidrofobinas de *Fusarium verticillioides* (Fuch, UU *et. al.*, 2004) y *Fusarium graminearum*, también han sido investigadas (Sarlin *et.al.*, 2011). Sin embargo, apenas hay estudios sobre la caracterización de la hidrofobina de clase II de *Fusarium poae* (FpHyd5).

Por ello, el **objetivo general** de este trabajo fue producir y caracterizar FpHyd5. Para ello se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

- Estudiar las condiciones de producción y de extracción de FpHyd5. Para ello, *F. poae* se cultivó en diferentes medios de cultivo y las hidrofobinas se extrajeron mediante dos métodos, con el fin de estudiar en qué condiciones experimentales se producía y detectaba hidrofobina.
- Caracterizar algunas propiedades de interés de la hidrofobina de clase II de *Fusarium poae* (FpHyd5), incluyendo:
 - su capacidad de adhesión a superficies hidrófobas e hidrófilas
 - su capacidad de modificar el comportamiento de una superficie de hidrófoba a hidrófila y vice versa
 - su capacidad de formar polímeros y estructuras cristalinas
 - su capacidad de interaccionar con el CO₂ formando nanoburbujas y teniendo potencial para producir *gushing*.

3. Materiales y métodos

3.1 Cepas de hongos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Fusarium poae MUCL 6114, de la colección de microorganismos BCCM / MUCL, se inoculó en diferentes caldos de cultivo: caldo de patata dextrosa (PDB), extracto de malta (MEB), medio mínimo de *Trichoderma* (TMM) (Nakari-Setälä *et al.*, 1997) con glucosa, TMM con fructosa, TMM con lactosa, TMM con celulosa, el caldo de cebada y medio mínimo de Richard con glucosa, lactosa o quitina en Erlenmeyer de 75 mL con agitación a 75 rpm durante 4-6 días a una temperatura de 25 °C. *Fusarium poae* también se cultivó en diferentes medios sólidos: agar de patata dextrosa (PDA), agar de cebada y agar de cerveza. La composición de todos los medios de cultivo se muestra en el anexo 1. Todos estos medios de cultivo fueron autoclavados a 121 °C durante 15 minutos a una presión de 1,5 bares.

3.2 Extracción de las hidrofobinas

El micelio se separó del cultivo líquido por centrifugación ($8000 \times g$ durante 15 min a 4 °C; modelo Beckman J2-21). A continuación, las hidrofobinas se extrajeron a partir del micelio usando dos métodos diferentes: tampón 170 mM Tris / HCl (pH 9) con un 1% de SDS y etanol al 60%. La extracción con Tris/HCl se llevó a cabo mezclando el micelio con tres veces el peso del micelio de tampón con 1% de SDS, a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación continua a 40 rpm. Después, el SDS se precipitó añadiendo 10 ml de una solución 2 M de KCl. La mezcla se centrifugó ($8.000 \times g$ durante 15 min a 4 °C; modelo Beckman J2-21) y se desechó el precipitado para obtener el **extracto de micelio crudo**.

La extracción etanólica se realizó añadiendo al micelio tres veces el peso del micelio de etanol al 60%, a una temperatura de 25 °C durante 1 hora con agitación ocasional. Por último, el micelio se descartó por centrifugación ($8000 \times g$ durante 15 min a 4 °C; modelo Beckman J2-21) para obtener finalmente el extracto de micelio.

En la Figura 14 se muestra un esquema de los dos procedimientos utilizados.

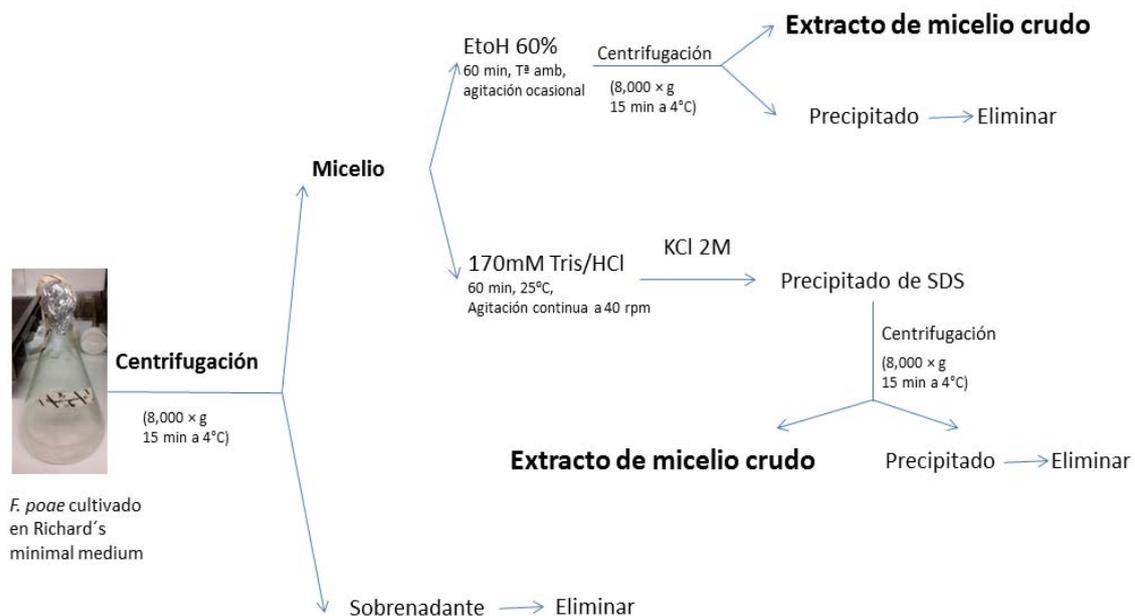


Figura 14. Métodos para la extracción de FpHyd5 del micelio

3.3 Purificación de hidrofobinas

La muestra de extracto de micelio crudo se filtró a través de un filtro hidrófilo de polietersulfona (Millipore) y después se inyectó (50 ml) en una columna de fase inversa RP-FPLC (cromatografía líquida de fase inversa). La resina de la columna grande fue de 30 RPC y la columna pequeña de 15 RPC. La elución se realizó con un gradiente lineal de ACN que contenía 0,1% de TFA a una velocidad de flujo de 10 mL/min. La elución se controló por detección ultravioleta a 214 nm. Los procedimientos cromatográficos se realizaron en el sistema de flujo Bio-Rad Biologic Duo. Las fracciones positivas (entre 35-50% de ACN) se recogieron, se liofilizaron y redisolviéron en agua desionizada para realizar el resto de los experimentos.

3.4 Identificación de hidrofobinas

La identificación se llevó a cabo con el quipo MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Ultraflex, GmbH). MALDI-TOF es una técnica de ionización suave usada en espectrometría de masas, que permite el análisis de biomoléculas (Figura 15).

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)

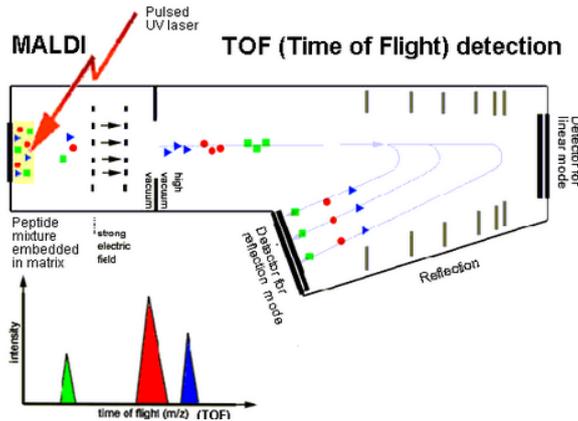
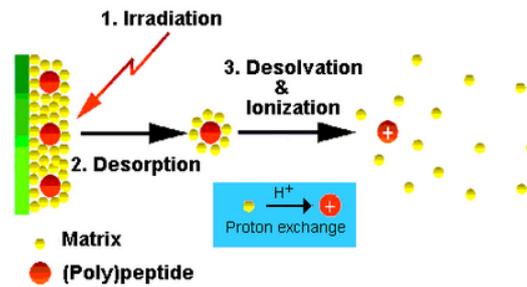


Figura 15. Fundamento del MALDI-TOF

En esta técnica, la muestra se mezcla con una solución matriz en exceso (matriz de ácido α -ciano-hidroxicinámico) sobre una superficie de metal. Cuando el disolvente se evapora, la muestra y la matriz cocrystalizan. Esta preparación se somete a pulsos cortos de láser en alto vacío, provocando la ionización de la muestra. Después de esto, TOF lleva a cabo la determinación de la masa en una región de alto vacío por una medida muy precisa del período de tiempo que les cuesta a los iones atravesar el espacio desde la fuente que los genera hasta su impacto con el detector.

Para los experimentos, 1 μl de muestra se colocó sobre la placa diana y se mezcló con 1 μl de la solución matriz. El peso molecular teórico de FpHyd5 (7,534KDa) (www.uniprot.org) se comparó con el peso molecular obtenido en los resultados de MALDI-TOF de nuestra muestra.

3.5 Cuantificación

Las concentraciones de proteína de las fracciones purificadas se cuantificaron midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro ND-2000 (Thermo Scientific), llamado Nanodrop.

3.6 Adsorción de FpHyd5 a superficies hidrofílicas e hidrofóbicas usando QCM

Esta técnica se basa en la habilidad del cristal de cuarzo de vibrar cuando se pasa a través de él una corriente eléctrica. En el caso de la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), el cristal se introduce dentro de una cámara cerrada donde una solución ya sea de proteínas, azúcares o ácidos grasos se inyecta con un flujo y una temperatura constante. El cristal de cuarzo puede ser hidrofóbico o hidrofílico, lo cual es muy útil para saber cómo interactúan las moléculas al hacer contacto con esta superficie. Al pasar la solución por el cristal, estas moléculas van a interactuar con el cristal adsorbiéndose a la superficie de este. Al adsorberse las moléculas al cristal estas hacen que la frecuencia fundamental del cristal cambie, las variaciones en la frecuencia se usan para saber con bastante precisión la cantidad de masa adsorbida en el cristal. En conjunto con la medición de la frecuencia, la microbalanza también mide la disipación de energía durante el proceso de adsorción. La disipación en este caso nos dice de que manera se está disipando la energía durante el proceso, una mayor disipación se traducirá como una adsorción en forma de monocapa de tipo elástico y flexible, mientras que una disipación pequeña representa una monocapa rígida.

La correlación entre la masa de proteína adsorbida a superficies hidrofílicas o hidrofóbicas y la frecuencia se obtiene por la ecuación de Sauerbrey (Sauerbrey, 1959):

$$\Delta m = -C \Delta f / n,$$

donde Δm es la masa adsorbida, n es el número de armónicos ($n = 3$), y C ($17,7 \text{ ng/cm}^2/\text{Hz}$) es la sensibilidad de masa constante (Hook *et al.*, 1998).

Todas las mediciones se realizaron en modo estático a una velocidad de flujo de $50 \mu\text{L}/\text{min}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ con una concentración de hidrofobinas de $0,3 \text{ mg}/\text{mL}$. Las medidas de los cambios de la frecuencia y la disipación se controlaron a diferentes armónicos (del 3 al 9).

3.7 Modelo de homología

Los modelos estructurales de las hidrofobinas se elaboraron a partir de su secuencia aminoacídica utilizando el programa PyMol. Este programa predice la conformación más probable de una proteína. En este caso se realizó la simulación del parche

hidrofóbico de FgHyd5 y de HFBI y HFBI a efectos comparativos. Este modelo indica las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas dentro del parche hidrófobo.

3.8 Ángulo de contacto del agua (WCA)

Después de la adsorción de las proteínas a los dos tipos de cristales (hidrófobo e hidrófilo) realizado en la microbalanza de cristal de cuarzo, se llevó a cabo la medición del ángulo de contacto del agua con el fin de evaluar si la superficie de los cristales había cambiado de hidrófobo a hidrófilo y viceversa.

Los cristales se secaron a temperatura ambiente y la medida se realizó utilizando el dispositivo Dataphysics OCA 15, Dataphysics, Alemania. Este equipo determina el ángulo de contacto del agua por análisis de imagen. Se colocaron 2 μ l de agua MiliQ en los cristales a temperatura ambiente y se midieron los ángulos de contacto del agua antes y después de la adsorción de la proteína al cristal. Se colocaron varias gotas de agua mili Q en diferentes partes de los cristales y se registraron los diferentes ángulos obtenidos.

3.9 Microscopía óptica

La hidrofobina pura de *Fusarium poae* obtenida mediante RP-HPLC se liofilizó y se disolvió en agua destilada a una concentración de 0,3 mg/mL. 20 μ L de la muestra se extendieron sobre un porta de vidrio para microscopio. La muestra se secó a temperatura ambiente en una caja cerrada para evitar la contaminación de partículas y de polvo. Después, la muestra se sometió a microscopía óptica (Leica SFL 4000, Leica Microsystems GmbH CMS) para obtener las imágenes.

3.10 Análisis de tamaño de partículas

El análisis del tamaño de partículas se realizó con el equipo Microtrac Nanotrak Ultra (Particle Metrix GmbH, Meerbusch, Alemania). Se determinó el rango de tamaño y el tamaño medio de las partículas frente a la concentración utilizando una solución de hidrofobinas de *Fusarium poae* purificada (0,3 mg/mL). Este equipo mide los diámetros de partícula comprendidos entre 0,8 y 6500 nm. El experimento se llevó a cabo para diferentes concentraciones de hidrofobina: 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL y 0,3 mg/mL. Se

hicieron 20 mediciones individuales ($n = 20$) para ver la distribución del tamaño de las partículas.

Con el fin de ver si se producía la interacción entre el CO_2 y las hidrofobinas, y como consecuencia la formación de nanoburbujas que desencadenan el *gushing*, se midió el tamaño de partícula después de mezclar 2 ml de FpHyd5 (1,8 mg/mL) con 100 mL de agua con CO_2 (concentración final de la disolución 0,03 mg/mL). La solución se preparó en embudo de decantación y después de tres días, la muestra se dividió en dos partes bien diferenciadas (interfaz y resto del líquido). Por último, estas dos muestras se analizaron en el Nanotrak.

3.11 Prueba de *gushing*

Para llevar a cabo la prueba de *gushing* se utilizó el test de Carlsberg doblemente modificado. Diferentes cantidades (5,10 mL) de la hidrofobina pura de *Fusarium poae* de concentración 1,8 mg / ml se añadieron a botellas de agua con gas (4 ° C). Las botellas se agitaron en un agitador rotativo horizontal a 150 rpm (SM30 Buhler, Alemania) durante 3 días a 25 ° C. Después de esos 3 días, las botellas se pesaron y se colocaron de pie durante 10 minutos y luego se volvieron del revés dos veces con intervalos de 10 segundos. Por último se giraron del revés una vez con 30 segundos de intervalo y se procedió a la apertura de las botellas. Después de la apertura, el *gushing* obtenido se calculó como la diferencia de peso entre la botella antes y después de ser abierta.

4. Resultados y discusión

4.1 Producción, extracción, purificación y detección de la hidrofobina FpHyd5

Fusarium poae se cultivó en todos los medios de cultivo mencionados anteriormente y las hidrofobinas se extrajeron llevando a cabo dos métodos distintos (Etanol 60% y tampón 170mM Tris/HCL). Después, el extracto se purificó mediante RP-FPLC. Se considera que las fracciones eluidas entre el 35 y el 50% de ACN, pueden corresponder a estas proteínas, debido a la hidrofobicidad de su parche hidrofóbico. En aquellos casos en los que existió una fracción positiva, se recolectó, se liofilizó, se volvió a disolver y se analizó por espectrometría de masas MALDI-TOF, con objeto de comprobar si el peso molecular se correspondía con el teórico para la hidrofobina FpHyd5. Este peso molecular es de 7,534 KDa predicho teóricamente a partir de su aminoácida (Sarlin *et al.*, 2012).

Para todos los medios de cultivo estudiados y los dos métodos de extracción, tan solo en el caso del medio mínimo de Richard's con glucosa y extracción con tampón Tris/HCl (pH 9,0) con 1% de SDS se obtuvo una fracción que pudo ser identificada como FpHyd5.

Los resultados correspondientes a la purificación e identificación de la hidrofobina en estas condiciones experimentales se muestran en las Figuras 16 y 17. Como se puede apreciar en el cromatograma (Figura 16), sólo apareció un pico que eluyó a un porcentaje de ACN entre el 38,20% y el 38,21%, que corresponde con el rango de elución de las hidrofobinas. Las fracciones positivas obtenidas en la cromatografía se confirmaron por MALDI-TOF. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 17, en la cual se puede observar que el peso molecular determinado para nuestra muestra fue de 7,514 y 7,516 KDa (dos réplicas individuales). Estos resultados obtenidos en la espectrometría se correlacionaban adecuadamente con el peso teórico de la hidrofobina de *Fusarium poae* (7,534 KDa). Por lo tanto, podemos concluir que FpHyd5 estaba presente en nuestra muestra. La concentración se midió por absorbancia a 280 nm, y el valor obtenido fue de 0,3 mg/mL.

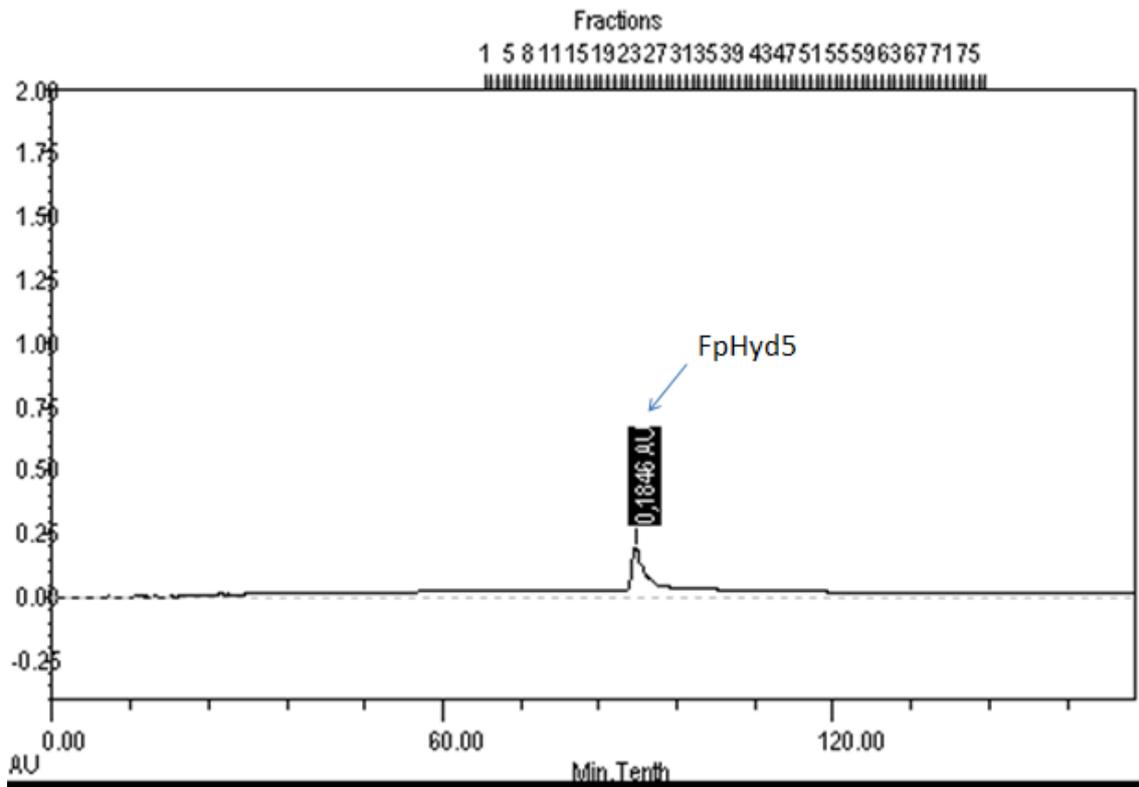


Figura 16. Cromatograma RP-HPLC del extracto del micelio de FpHyd5

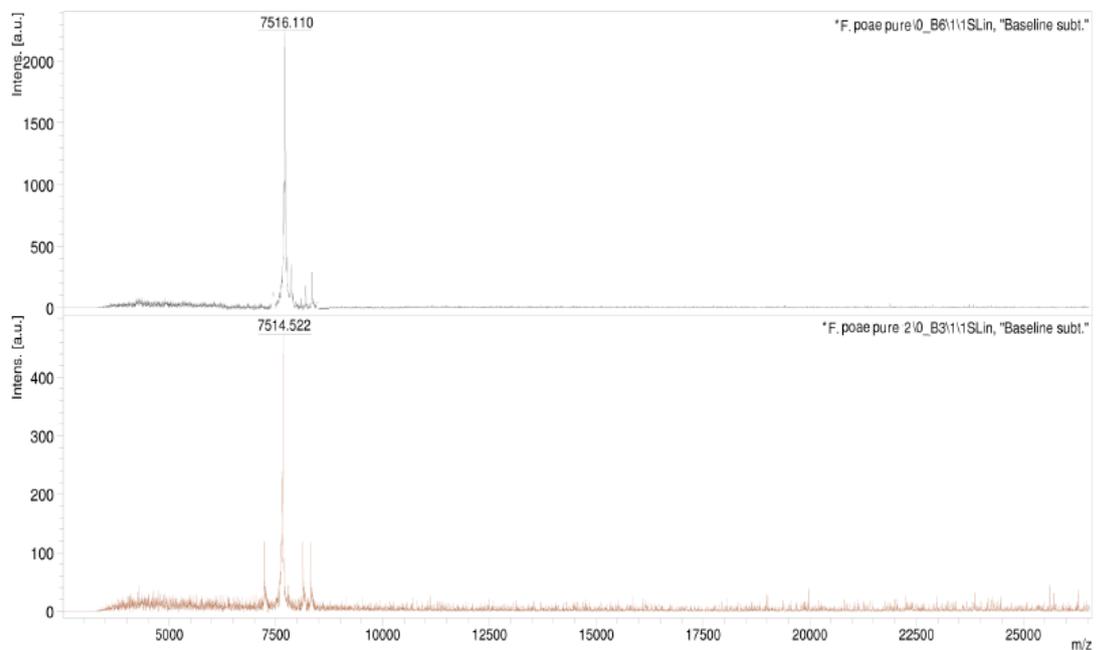


Figura 17. Identificación en Maldi-Tof. Cromatograma del peso molecular de la hidrofobina de *Fusarium poae* producida en medio mínimo de Richard's y extraída con tampon Tris/HCl (pH 9.0) con 1% SDS. Se muestran dos repeticiones.

4.2 Adsorción de FpHyd5 a superficies hidrofílicas e hidrofóbicas

Las mediciones de Δf y ΔD del tercer armónico en cristales hidrófilos e hidrófobos a lo largo del tiempo se muestran en la figura 18-a y 18-b respectivamente. En ambos gráficos se observaba una disminución en la frecuencia y un aumento en la disipación. La unión de la proteína al cristal está representada por una caída significativa en el valor de la frecuencia al principio. Después, la señal se estabilizaba debido a la formación de una monocapa de la proteína sobre el cristal. En el caso del cristal hidrófilo se producía una pérdida de masa entre los 800 y 900 segundos. Esto puede deberse a que el flujo de agua pudo arrastrar parte de la muestra que no se adhirió fuertemente al cristal. En el caso del cristal hidrófobo, la señal de la frecuencia se estabilizaba a valores más bajos que en el caso de la superficie hidrófila y este hecho representa una mayor afinidad de la proteína por superficies hidrófobas.

Por otro lado, los valores de disipación muestran la rigidez o elasticidad de la monocapa formada. En el caso de los cristales hidrófilos estos valores fueron más bajos que en los cristales hidrófobos, lo cual denota que la capa de proteína adsorbida era más rígida en el caso de cristales hidrófobos.

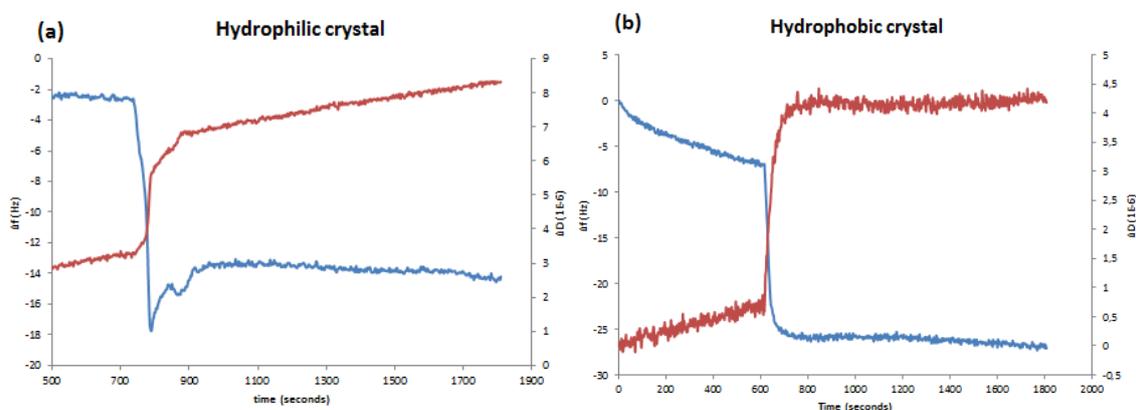


Figure 18. Gráfica obtenida a partir de los datos del QCM. Variación de la frecuencia (Δf) y variación de la disipación (ΔD) versus tiempo (segundos) en cristal hidrofílico (a) e hidrofóbico (b). La frecuencia está representada en azul y la disipación en rojo.

Para calcular la masa de proteína adsorbida en los diferentes tipos de cristales se utilizó la ecuación de Sauerbrey, y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. La masa de FpHyd5 adsorbida fue mayor para superficies hidrofóbicas, lo cual indica que esta hidrofobina presenta más afinidad por las superficies hidrófobas que por las hidrófilas. Al comparar estos valores con los determinados para la hidrofobina HFBI de *T. reesei*,

se observa que el valor de masa de HFBI adsorbida (Szilvay *et al.*, 2007) en poliestireno (superficie hidrófoba) es superior, de 243 ng/cm². Concentraciones de HFBI diez veces menores que de FpHyd5 muestran mucha mayor cantidad de masa adsorbida, por lo tanto, se puede deducir que HFBI presenta mucha más afinidad por las superficies hidrofóbicas que FpHyd5.

Tabla 1. Masa de FpHyd5 adsorbida en superficies hidrofílicas e hidrofóbicas y la comparación con la masa de HFBI adsorbida en ambos tipos de cristales.

Hidrofobina	Peso molecular (KDa)	Concentración (mg/mL)	Masa de hidrofobina adsorbida al cristal (ng/cm ²)	
			Cristal hidrofóbico	Cristal hidrofílico
FpHyd5	7,534	0,3	159,84	82,75
HFBI (Szilvay, 2007)	7,540	0,03	243	-

4.3 Modelo de homología

Con objeto de interpretar estos resultados, se utilizaron los modelos estructurales elaborados de acuerdo a la secuencia aminoacídica de la hidrofobina FgHyd5 (de *Fusarium graminearum*) y las HFBI y HFBI (de *T. reesei*), a efectos comparativos. Se escogió la hidrofobina FgHyd5 *Fusarium graminearum*, ya que no existe modelo de homología para la hidrofobina de *Fusarium poae* (FpHyd5), pero si se compara la secuencia de aminoácidos de la hidrofobina de *Fusarium poae* (FpHyd5) y la de la hidrofobina de (FgHyd5), se puede observar que ambas son muy similares (Figura 19). Por lo tanto, el modelo de homología de FgHyd5 fue elegido en este estudio como posible modelo para FpHyd5. Los modelos estructurales, elaborados con el programa Pymol, se muestran en la Figura 20.

FgHyd5 QAYIPC SGLYGTSQCC ATDVLGVADL DCGNPPSSPT DADNFSAVCA EIGQRARCCV LPILDQGILC NTPTGVQD
 FpHyd5 QAYVPC TGLYGSSQCC ATDVLGVANL DCGTPPSVPA NATDFAVCA EIGQRARCCV LPILDQGILC NTPTGVQD

Figura 19. Comparación de la secuencia de aminoácidos de FgHyd5 y FpHyd5 (Sarlin *et al.*, 2011). Ambas difieren solo en diez aminoácidos.

El parche hidrofóbico de FgHyd5 se diferencia de los parches hidrofóbicos de HFBI y HFBI (Figura 19) en la cantidad de aminoácidos hidrófobos que presenta (menos para FgHyd5) y en la uniformidad de la superficie hidrófoba (en FgHyd5 aparecen manchas

hidrófilas en la superficie hidrofóbica, representado en rojo en la figura 19). Aunque el área de la superficie hidrofoba dentro del parche hidrofobo (228 nm^2) no difiere demasiado de la superficie de HFBI (216 nm^2) y de HFBII (248 nm^2), la distribución de ese área en el parche hidrofóbico de FgHyd5 no es uniforme, lo que hace que estas pequeñas islas hidrófilas (flechas moradas figura 19) en la zona hidrofoba resten fuerza al parche hidrofóbico. Esto podría explicar el resultado obtenido anteriormente en el que se muestra que la adsorción de masa para FpHyd5 es menor en comparación con la masa adsorbida por HFBII sobre superficies hidrofóbicas.

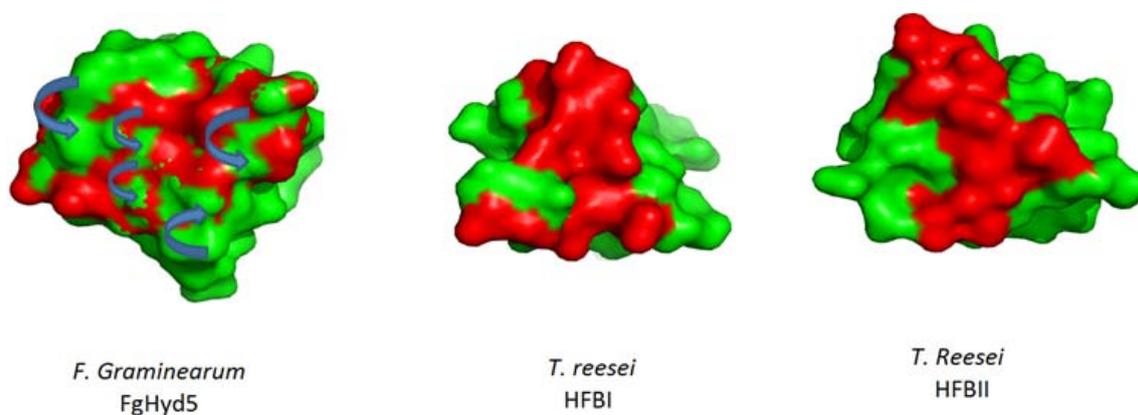


Figura 20. Diferencias en los parches hidrofóbicos de FgHyd5, HFBI y HFBII. Los aminoácidos hidrofóbicos del parche hidrofóbico se representan en color rojo y los aminoácidos hidrófilos en verde. Los modelos se hicieron usando Pymol.

4.4 Ángulo de contacto del agua

Dependiendo de la naturaleza del cristal donde se deposita la gota de agua, la gota tenderá a contraerse o extenderse para minimizar o maximizar su área de contacto con la superficie y así obtener un estado energético favorable. Una superficie es hidrófila cuando una gota de agua depositada sobre ella se expande para maximizar la superficie de contacto. Sin embargo, si la gota de agua se contrae y adquiere una forma esférica repeliendo la superficie, dicha superficie será hidrofoba. Los resultados obtenidos de las medidas de los ángulos de contacto del agua antes y después de la adsorción de la hidrofobina FpHyd5 aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2. Ángulo de contacto del agua en cristales hidrófilos e hidrófobos antes y después de la adsorción de FpHyd5.

	Cristal hidrófilo		Cristal hidrófobo	
Hidrofobina	Ángulo antes de la adsorción	Ángulo después de la adsorción	Ángulo antes de la adsorción	Ángulo después de la adsorción
FpHyd5	20,5 ⁰	45,3 ⁰	74,7 ⁰	41,4 ⁰

La hidrofobina de *Fusarium poae* (FpHyd5) fue capaz de cambiar el comportamiento de una superficie hidrofóbica a hidrofílica y viceversa, debido a su carácter anfipático. Como puede verse en la Tabla 2, en el caso del cristal hidrófilo, el ángulo de contacto del agua aumentó después de la adsorción de la hidrofobina, lo que muestra que la superficie se volvía más hidrófoba, debido a que la hidrofobina se uniría a la superficie por el lado hidrófilo, dejando su lado hidrófobo hacia el exterior. En los cristales hidrófobos, el ángulo disminuyó debido a que la superficie se volvía más hidrofílica, siguiendo el mismo mecanismo explicado para el cristal hidrófilo. El cambio de ángulo fue más grande en el caso del cristal hidrofóbico que para el cristal hidrófilo, ya que FpHyd5 tiene más afinidad por las superficies hidrofóbicas.

4.5 Análisis microscópico

Las Figura 21 muestra las fotografías de microscopía óptica de la hidrofobina FpHyd5 (a) y la de la hidrofobina HFBI (b) (Shokribousjein,Z, 2014) a efectos comparativos.

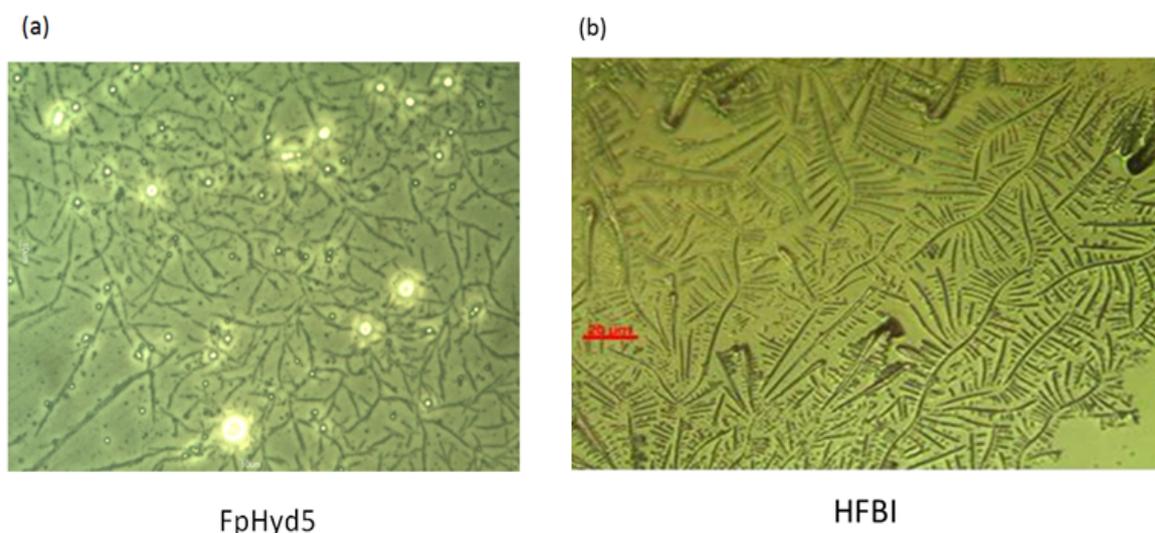


Figura 21. Imágenes de microscopio óptico de FpHyd5 (a) y HFBI (b) (Shokribousjein,Z, 2014). Las barras de escala indican un tamaño de 10µm para FpHyd5 y 20 µm para HFBI .

Como se muestra en la figura 20, FpHyd5 formaba estructuras cristalinas ramificadas. La concentración de FpHyd5 era de 0,3 mg/mL, mientras que la de HFBI fue de 0,15mg/mL. HFBI forma cristales más compactos que FpHyd5 y además, estos cristales están más unidos en el caso de HFBI aunque su concentración es menor que en el caso de FpHyd5.

4.6 Análisis del tamaño de partícula

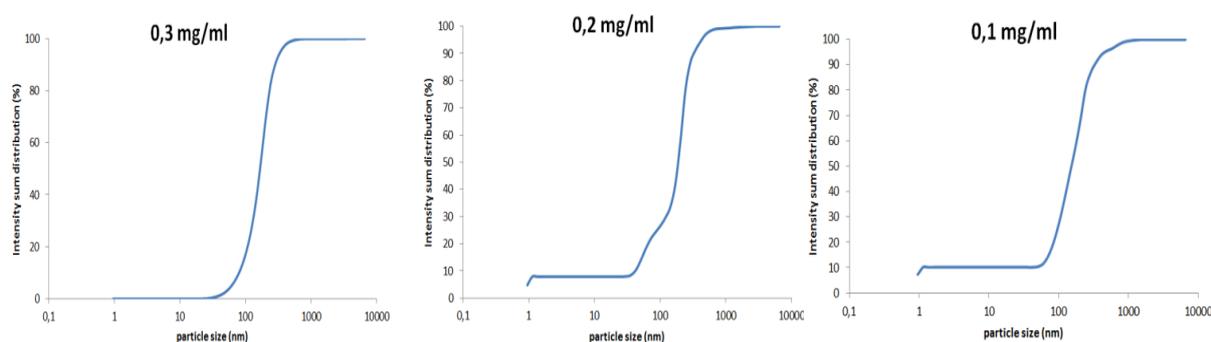


Figura 22. Análisis del tamaño de partícula de FpHyd5 en agua destilada a diferentes concentraciones

Se prepararon diferentes concentraciones de FpHyd5 en agua destilada para estudiar su influencia en la distribución del tamaño de partícula (Figura 22). Para concentraciones de 0,1 mg/mL de FpHyd5, el 10% de las partículas presentaron un tamaño entre 1 y

100 nm y el resto de las partículas se encontraron formando polímeros (tamaño de partícula > 100nm). A concentraciones de 0,2 mg/mL de FpHyd5, el 10% de las partículas se encontraban en forma de monómeros y el resto de las partículas formaron formas intermedias y polímeros. Por último, a concentraciones de 0,3 mg/mL de FpHyd5, el 100% de las partículas aparecían como polímeros. Se puede observar que en todas las concentraciones hubo formas poliméricas presentes (tamaño de partícula > 100nm) debido a que las hidrofobinas presentan una gran tendencia a autoensamblarse por su carácter anfifílico. Cuando la concentración disminuye, aparecen las formas monoméricas.

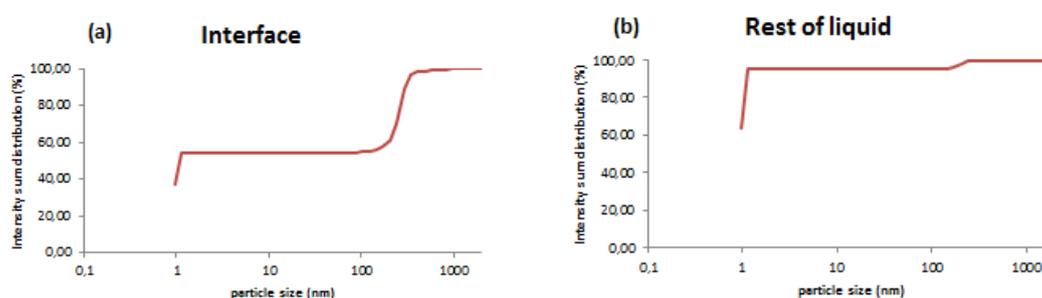


Figura 23. Análisis del tamaño de partícula de FpHyd5 en agua con CO₂ en las dos partes diferentes en que se dividió la muestra (interfase y resto del líquido).

Como puede verse en la figura 23, las muestras de FpHyd5 en agua carbonatada mostraron que en la parte de la interfase existió formación de algunos polímeros (de acuerdo con la idea de que las hidrofobinas tienden a migrar a la interfase), y formación de partículas de 100nm que corresponden con la formación de nanoburbujas (Deckers, 2013). Por lo tanto, puede concluirse que existe interacción entre la hidrofobina FpHyd5 y el CO₂.

4.7 Prueba del *gushing*

La prueba del test de Calsberg doblemente modificado arrojó resultados negativos para la muestra de FpHyd5, a todas las concentraciones utilizadas. Es decir, tras el tiempo de agitación establecido, no se produjo la salida masiva de espuma, y con ello, la pérdida de peso esperable. Estos resultados indicarían que, aunque la interacción entre la hidrofobina y el CO₂ se produce, de acuerdo a los resultados anteriormente mostrados, ésta sería de una intensidad insuficiente para formar el número de nanoburbujas necesario para producir *gushing*.

Conclusiones

Este estudio se puede dividir en dos partes: la primera parte trata sobre la optimización de la producción, extracción del micelio y purificación de la clase II de hidrofobinas de *Fusarium poae* y la segunda parte, consiste en el estudio de algunas propiedades de esta hidrofobina con el fin de caracterizarla. Las conclusiones más importantes de este estudio son las siguientes:

- *Fusarium poae* produce hidrofobina FpHyd5 cuando crece en medio mínimo de Richard's con glucosa. De los dos métodos utilizados, la extracción con tampón 170 mM Tris/HCl y 1% de SDS fue más eficaz.
- La hidrofobina FpHyd5 presenta una mayor afinidad por superficies hidrófobas que por superficies hidrófilas ya que los valores de masa de FpHyd5 adsorbida son mayores para superficies hidrófobas que para superficies hidrófilas.
- La hidrofobina FpHyd5 probablemente tiene un parche hidrofóbico menos uniforme (con islas hidrofílicas dentro del área hidrófoba), comparado con otras hidrofobinas como HFBI o HFBII. Este hecho podría explicar que FpHyd5 presente menor afinidad por superficies hidrofóbicas que HFBI y HFBII.
- Esta hidrofobina es capaz de cambiar el comportamiento de una superficie hidrófila a hidrófoba y viceversa, debido a su carácter anfipático.
- La hidrofobina FpHyd5 puede formar cristales con estructuras ramificadas.
- En medio líquido y a bajas concentraciones, las hidrofobinas FpHyd5 forman monómeros y cuando la concentración aumenta, las hidrofobinas son capaces de formar polímeros y formas intermedias.
- Existe interacción entre la hidrofobina FpHyd5 y el CO₂ formándose nanoburbujas, ya que se observa aparición de nanopartículas de 100nm.

Las hidrofobinas presentan propiedades interesantes que les permiten tener muchas posibles aplicaciones. FpHyd5 mostró una buena capacidad para interactuar con las superficies sólidas y la posibilidad de autoensamblarse en las interfases agua-aire. Esta hidrofobina presenta más afinidad por superficies hidrófobas por lo que podría ser utilizado como un buen agente tensioactivo y emulsionante en la elaboración de alimentos, así como para el recubrimiento de materiales quirúrgicos e implantes médicos o para la inmovilización de enzimas (Linder *et al.*, 2005).

Conclusions

This study can be divided in two parts: the first part about optimization of production, extraction from mycelium and purification of class II hydrophobin from *Fusarium poae* and the second one some properties of this hydrophobin were studied in order to characterize it. The most important conclusions of this study are:

- *Fusarium poae* produces hydrophobins when it is grown in Richard's minimal medium with glucose. The best extraction of FpHyd5 was performed with 170 mM Tris/HCl buffer.
- The FpHyd5 hydrophobin has more affinity for hydrophobic surfaces than hydrophilic surfaces because the values of mass of FpHyd5 adsorbed to hydrophobic surfaces are higher than hydrophilic surfaces.
- FpHyd5 probably has a less uniform hydrophobic patch (with hydrophilic islands within the hydrophobic area) compared with other hydrophobins such as HFBI or HFBII. This fact could explain that FpHyd5 shows lower affinity for hydrophobic surfaces than HFBII and HFBI.
- This hydrophobin is able to change the behavior of a hydrophilic surface to hydrophobic and viceversa, due to its amphipathic character.
- FpHyd5 hydrophobin can form crystals with branched structures.
- In liquid medium at low concentrations, FpHyd5 forms monomers and when the concentration increases, the hydrophobins are capable of forming polymers and intermediate forms.
- Interaction between FpHyd5 and CO₂ is produced and the nanobubbles formed because 100nm nanoparticles were observed.

Hydrophobins present interesting properties which permit them to have many possible applications. FpHyd5 showed a good ability to interact with solid surfaces and self-assembling at water-air interface. This hydrophobin present more affinity for hydrophobic surfaces so it could be used like a good surfactant and emulsifier in food processing as well for coating of surgical materials and medical implants, and immobilization of enzymes (Linder *et al.*, 2005).

Identificación de las aportaciones de la asignatura a nivel de aprendizaje

Esta estancia en el extranjero realizando mi trabajo de fin de grado ha supuesto para mí un gran enriquecimiento tanto académico como personal. El aprendizaje ha sido muy positivo a todos los niveles: trabajo en equipo, formación multidisciplinar, perfeccionamiento del inglés, conocimiento más amplio en temas de investigación, resolución de diversos problemas e integración en otro país con gente de diversos lugares del mundo entre otros.

Para la realización de este trabajo, ha sido fundamental el conocimiento adquirido en las asignaturas de Microbiología de los Alimentos y Biotecnología Alimentaria, así como el Análisis de Alimentos, cursadas a lo largo del Grado. He aprendido a buscar y clasificar gran cantidad de bibliografía, así como numerosas nuevas técnicas analíticas. También he aprendido a ser mucho más independiente y a saber trabajar en equipo así como a organizar y planificar el trabajo de manera eficiente.

Evaluación asignatura y sugerencias de mejora

Es una asignatura que requiere mucho trabajo, esfuerzo y dedicación pero, bajo mi punto de vista, es una de las asignaturas más interesantes y más imprescindibles de la carrera, donde te sometes a una situación lo más cercana posible a la realidad laboral e integras los distintos conocimientos adquiridos durante todo el grado. Además, en la Universidad de Lovaina esta asignatura me ha obligado a redactar el trabajo científico en inglés y exponerlo y defenderlo públicamente, también en inglés, ante un tribunal, lo cual ha supuesto un reto personal importante.

Bibliografía

- Aastrup, S. (2004) Gushing factors are already present in barley allowing early detection of gushing risk. Proc. Eur. Brew. Con. Congr, Dublin, Fachverlag Hans Carl: Nürnberg.
- Askolin, S., Nakari-Setälä, T., and Tenkanen, M. (2001). Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 124–130.
- Askolin, S., Penttilä, M., Wosten, H.A.B., Nakari-Setälä, T., (2005). The *Trichoderma reesei* hydrophobin genes *hfb1* and *hfb2* have diverse functions in fungal development. FEMS Microbiol. Lett. 253, 281–288
- Askolin, S., Turkenburg, J.P., Tenkanen, M., Uotila, S., Wilson, K.S., Penttilä, M., and Visuri, K. 2004. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60: 1903–1905
- Bai G.H., Platter R., Desjardins A., Kolb F.L., (2001). Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. Plant Breeding 120: 1-6.
- Bailey, M.J., Askolin, S., Hörhammer, N., Tenkanen, M., Linder, M., Penttilä, M., Nakari-Setälä, T., (2002). Process technological effects of deletion and amplification of hydrophobin I and II in transformants of *Trichoderma reesei*. Applied Microbiology and Biotechnology 58, 721-727.
- Bayry, J., Aïmanianda, V., Guijaro, J.I., Sunde, M., Latgé, J-P., (2012). Hydrophobins: unique fungal proteins. PloS Pathogens 8 (5).
- Carrington, R., Collett, C. R., Dunkin, I. R. and Halek, G. (1972) Gushing promoters and suppressants in beer and hops. Journal of the Institute of Brewing, 78, 243 – 254
- Christian, M.; Ilberg, V.; Titze, J.; Friess, A.; Jacob, F.; Parlar, H.; (2009). Gushing laboratory tests as successful methods for obtaining new cognitions on gushing. Brewing Science 62, 83-89.
- Curtis, N. S., and Martindale, L. (1961) Studies on gushing-I. Introduction. J. Inst. Brewing. 67: 417-421.

- Deckers, S. M., Gebruers, K., Baggerman, G., Lorgouilloux, Y., Delcour, J. A., Michiels, C., Neven, H. (2010). CO₂-Hydrophobin Structures Acting as Nano- bombs in Beer, 63(April), 54–61.
- Deckers, S. (2013). Modeling and biophysical characterisation of the primary gushing mechanism in beer interaction between gaseous carbon dioxide and class II hydrophobins. Doctoral thesis. KU Leuven
- Fischer, S., (2001). Blasenbildung von in flüssigkeiten gelösten gasen. Dissertation, Technische Universität Munchen, Germany, 134p.
- Franke, D., Pahl, M. and Vesting, M. (1995) Theorie zur Existenz von Mikroblasen in Getränken Brauwelt, 38/39, 1944 – 1949
- Fuchs, U., Czymbek, K. J., Sweigard, J. a. (2004). Five hydrophobin genes in *Fusarium verticillioides* include two required for microconidial chain formation. *Fungal Genetics and Biology*: FG & B, 41(9), 852–64.
- Garbe, L. A., Schwarz, P., Ehmer, A., (2009). Beer Gushing, in: Bamforth, Charles W., Russell, I., Stewart, G. Eds., *Handbook of Alcoholic Beverages Series, Beer A Quality perspective*, Chapter 6. Elsevier Ltd., 185-212.
- Gardner, R.J., (1973). The mechanism of gushing – a review. *Journal of the Institute of Brewing* 79, 275-283.
- Hakanpää, J., Linder, M., Popov, A. (2006). Hydrophobin HFBII in detail: ultrahigh-resolution structure at 0.75 Å, 62(April), 356–367.
- Hakanpää, J., Linder, M., Popov, A., Schmidt, A., Rouvinen, J., (2006). Hydrophobin HFBII in detail: ultrahigh-resolution structure at 0.75Å. *Acta Crystallographica D62*, 356-367
- Hakanpää, J., Paananen, A., Askolin, S., Nakari-Setälä, T., Parkkinen, T., Penttilä, M., Linder, M.B. and Rouvinen, J. (2004). Atomic resolution structure of the HFBII hydrophobin, a self-assembling amphiphile. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 534–9.
- Hektor, H. J., & Scholtmeijer, K. (2005). Hydrophobins: proteins with potential. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(4), 434–9.
- Hook, F., Rodahl, M., Kasemo, B., Brzezinski, P., (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- Kallio, J.M., Linder, M.B., Rouvinen, J., (2007). Crystal structures of hydrophobin hfbii in the presence of detergent implicate the formation of fibrils and monolayer films. *Journal of Biological Chemistry* 282 (39), 28733-28739

- Kieninger , H. (1976) Gushing des Flaschenbieres. Derzeitiger Forschungsstand . Brauwelt , 116 , 1633 – 1636
- Kisko, K., (2008). Characterization Of Hydrophobin Proteins at Interfaces and in Solutions Using X Rays, Academic Dissertation, University of Helsinki, Faculty of Science, Department of Physics.
- Kisko, K., Torkkeli, M., Vuorimaa, E., Lemmetyinen, H., Seeck, O.H., Linder, M., Serimaa, R., (2005). Langmuir-Blodgett films of hydrophobins HFBI and HFBII. Surface Science 584, 35-40
- Kitabatake , K. , Fukushima , S. , Kawasaki , I. and Amaha , M. (1981) Gushing-active peptides in beer produced by *Penicillium chrysogenum* . In: Peptide Chemistry 1980 (H. Yonehara ed.) , pp. 7 – 12 . Protein Research Foundation : Osaka, Japan
- Kwan, A., Winefield, R.D., Sunde, M., Matthews, J.M., Haverkamp, R.G., Templeton, M.D., Mackay, J.P., (2006). Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 3621-3626.
- Laitila , A. , Alakomi , H.-L. , Rasca , L. , Mattila-Sandholm , T. and Haikara , A. (2002) Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against moulds in vitro and in malting of barley . Journal of Applied Microbiology , 93 , 566 – 576 .
- Laitila, A.; Sarlin, T.; Kotaviita, E.; Huttunen, T.; Home, S.; Wilhelmson, A.; (2007). Yeasts isolated from industrial maltings can suppress *Fusarium* growth and formation of gushing factors. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34, 701-713.
- Linder, M. B. (2009). Hydrophobins: Proteins that self-assemble at interfaces. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 14(5), 356–363.
- Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T., Penttilä, M. E. (2005). Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. FEMS Microbiology Reviews, 29(5), 877–96.
- Linder, M., Szilvay, G.R., Nakari-Setälä, T., Soderlund, H., Penttilä, M., (2002). Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei*. Protein Science 11, 2257-2266
- Lowe, D.P.; Arendt, E.K.; (2004). The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing : a review. Journal of the Institute of Brewing 110 (3), 163-180.
- Lowe, D.P.; Ulmer, H.M.; Graser, K.; Arendt, A.K.; (2006). The influence of starter cultures on barley contaminated with *Fusarium culmorum* TMW 4.0754. Journal of the American Society of Brewing Chemists 64 (3), 158-165

- Lumsdon, S.O., Green, J. and Stieglitz, B. (2005). Adsorption of hydrophobin proteins at hydrophobic and hydrophilic interfaces. *Colloids Surf., B* 44, pp. 172-178
- Mauch, a., Dal Bello, F., Coffey, a. Arendt, E. K. (2010). The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *International journal of food microbiology*, 141(1-2):116–21
- Nakari-Setälä, T., Aro, N., Ilmen, M., Munoz, G., Kalkkinen, N., Penttilä, M., (1997). Differential expression of the vegetative and spore-bound hydrophobins of *Trichoderma reesei* cloning and characterization of the hfb2 gene. *European Journal of Biochemistry* 248, 415-423
- Nakari-Setälä, T., Aro, N., Kalkkinen, N., Alatalo, E., Penttilä, M., (1996). Genetic and biochemical characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *European Journal of Biochemistry* 235, 248-255
- Outtrup , H. (1980) The relation between the molecular structure and gushing potential of dehydrated humulonic acid . *Carlsberg Research Communication* ,45, 381 – 388 .
- Paananen, A., Vuorimaa, E., Torkkeli, M., Penttilä, M., Kausanen, M., Ikkala, O., Lemmetyinen, H., Serimaa, R., Linder, M.B., (2003). Structural hierarchy in molecular films of two class II hydrophobins. *Biochemistry* 42 (18), 5253-5258
- Pellaud, J., (2002). Gushing: State of the art. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing and Biotechnology* 27 (4), 189-205.
- Rohácik T., Hudec K., (2005). Influence of agro-environmental factors on *Fusarium* infestation and population structure in wheat kernels. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 12: 39-45.
- Sandra, P.; Claus, H. and Verzele, M.: „Fatty acids in isomerized hop extracts and gushing“, *Journal of the Institute of Brewing* 79, no. 2, pp. 142-147, 1973.
- Sarlin, T. (2012). Detection and characterisation of *Fusarium* hydrophobins inducing gushing in beer. Ph.D. thesis, Aalto University School of Chemical Technology (Espoo, Finland).
- Sarlin, T., Kivioja, T., Kalkkinen, N., Linder, M. B., Nakari-Setälä, T. (2011). Identification and characterization of gushing-active hydrophobins from *Fusarium graminearum* and related species. *Journal of Basic Microbiology*, 52(2), 184–94.

- Sarlin, T., Linder, M., Penttilä, M., Haikara, A., Brew, J. I. (2005). Fungal Hydrophobins as Predictors of the Gushing Activity of Malt, 111(2), 105–111.
- Schroeder H.W., Christensen J.J., (1963). Factors affecting resistance of wheat scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53: 831-838.
- Schroeder H.W., Christensen J.J., (1963). Factors affecting resistance of wheat scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53: 831-838.
- Schwarz P.B., Casper H.H., Beattie S., (1995). Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemistry* 53: 121-127.
- Shokribousjein, Z.; Deckers, S.M.; Gebruers, K.; Lorgouilloux, Y.; Baggerman, G.; Verachtert, H.; Delcour, J.A.; Etienne, P.; Rock, J-M.; Michiels, C.; Derdelinckx, G.; (2010). Hydrophobins, beer foaming and gushing. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing and Biotechnology* 35, 85-101.
- Shokribousjein, Z., An Philippaerts, David Riveros, Jean Titze, Yannick Ford, Sylvie M. Deckers, Mohammadreza Khalesi, Jan A. Delcour, Kurt Gebruers, Hubert Verachtert, Vladimir Ilberg, Guy Derdelinckx, Bert Sels. (2014). A Curative Method for Primary Gushing of Beer and Carbonated Beverages: Characterization and Application of Antifoam Based on Hop Oils. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*
- Shokribousjein, Z. (2014). Interaction of class II hydrophobins with hydrophilic / hydrophobic interfaces as a basis for solving primary gushing problems of carbonated beverages.
- Stenglein, S.A. (2009). *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *J. Plant Pathol.* 91(1), pp. 25–36.
- Szilvay, R., Paananen, A., Laurikainen, K., Vuorimaa, E., Lemmetyinen, H., Peltonen, J., Linder, M. B. (2007). Self-Assembled Hydrophobin Protein Films at the Air-Water Interface: Structural Analysis and Molecular Engineering, 2345-2454.
- Weideneder, A. (1992) Untersuchungen zum malzverursachten Wildwerden (Gushing) des Bieres. Doctoral thesis. Technical University Munich.
- Wilson, S.M., (1999). A study of gushing in ciders: its mechanism and causative effect. Dissertation, University of Guelph, Canada, 168p.
- Wolf-Hall C.E., Schwarz P.B., 2002. Mycotoxins and fermentation-beer production. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504: 217-226.
- Wösten, H.A.B., (2001). Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Review in Microbiology* 55, 625-646.

- Wösten, H.A.B., de Vocht, M.L., (2000). Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469, 79-86.
- Zepf, M. (1998) Gushing. Ursachenfindung anhand von Modellversuchen. Doctoral thesis. Technical University Munich
- Zoecklein, B., (1999). A review of méthode champenoise production. Virginia Polytechnic Institute and State University (USA), Publication number 463-017

Anexo

Anexo-1: medios de cultivo

Caldo de patata y glucosa (PDB)

- Glucosa (g/L) 20
- Extracto de patata(g/L) 4

Caldo de extracto de malta (MEB)

- Extracto de malta (g/L) 17
- Peptona (g/L) 3

Medio mínimo de Trichoderma (TMM)

- Peptona (g/L) 5
- Extracto de levadura (g/L) 1,25
- KH_2PO_4 (g/L) 5
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L) 3,5
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L) 0,75
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g/L) 0,75
- Glucosa, lactose o sacarosa (g/L) 40 o quitina 15
- $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g/L) $4 \cdot 10^{-3}$
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (g/L) $3,2 \cdot 10^{-3}$
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L) $6,9 \cdot 10^{-3}$
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L) $10 \cdot 10^{-3}$

Caldo de cebada

- Cebada (g/L) 30

Medio mínimo de Richard´s

- KNO_3 (g/L) 10
- MgSO_4 (g/L) 1,3
- FeCl_3 (g/L) 0,02
- KH_2PO_4 (g/L) 5
- Glucosa, lactosa o celulosa (g/L) 8

Agar de patata y glucosa (PDA)

- Dextrosa (g/L) 20
- Extracto de patata (g/L) 4
- Agar bacteriológico (g/L) 14

Agar de cebada

- Cebada (g/L) 30
- Agar bacteriológico (g/L) 14

Agar de cerveza

- Agar (ml/L) 250
- Agar bacteriológico (g/L) 55