

AISLAMIENTO, PURIFICACION Y  
COMPOSICION QUIMICA DE LA PARED  
CELULAR DE LOS ESPORANGIOFOROS  
DE *Phycomyces blakesleanus*

Por Jorge Mundo Cansino\*  
y José Ruíz-Herrera\*

ISOLATION, PURIFICATION AND CHEMICAL ANALYSIS  
OF THE SPORANGIOPHORES OF *Phycomyces blakesleanus*

SUMMARY

Cell walls from the sporangiophore of *Phycomyces blakesleanus* were isolated after mechanical breakage. Cell walls were purified by repeated washings with NaCl and water. Chemical analysis revealed a complex composition of the cell wall. Chitin, identified by X-ray diffraction, was the most abundant component. Polyuronides and chitosan were present also in large amounts. Chitosan was identified by cytochemical reactions and by its solubility in acid. Cell walls contained also proteins, lipids, phosphate and four neutral sugars: fucose, galactose, glucose and mannose in order of abundance.

RESUMEN

Se aislaron las paredes celulares del esporangióforo de *Phycomyces blakesleanus* obtenidas por rompimiento mecánico del hongo, y se purificaron por lavado con NaCl y agua destilada. El análisis químico reveló una compleja estructura de la pared. El componente más abundante fue la quitina, misma que se identificó por difracción de rayos X. Los siguientes componentes en orden de abundancia fueron los poliurónidos y la quitosana; esta se identificó por reacciones citoquímicas y por su solubilidad en ácido. Las paredes contienen además proteínas, lípidos, fosfatos y azúcares neutros. De ellos el más abundante fue la fucosa seguida de galactosa, glucosa y manosa.

\* Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas I.P.N. y Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, I.P.N., México, D. F.

## INTRODUCCION

El esporangióforo de *Phycomyces* (Zygomycetes, Mucorales) ha sido utilizado recientemente como un modelo sensorial ya que responde a diferentes estímulos tales como la luz, cercanía de objetos, gravedad, etc. (para una revisión consúltese Bergman *et al.*, 1967). Los estudios más detallados se han realizado sobre el efecto fototrópico y han revelado que el esporangióforo actúa como una lente cilíndrica condensando los rayos luminosos en su cara distal y estimulando un fotoreceptor, que de una manera desconocida, acelera el crecimiento de esa porción de la pared celular. Ello origina que el esporangióforo se curve en dirección al estímulo luminoso. Se ha conjeturado que la estimulación luminosa causa un aumento en la extensibilidad de la pared en la zona de crecimiento (véase revisión de Cerdá-Olmedo, 1977); aunque nosotros tenemos evidencias que la reacción inicial es una activación de la quitina sintetasa (L. Herrera y J. Ruiz-Herrera, observaciones no publicadas).

Es evidente que todas las alteraciones en la dirección y la velocidad de crecimiento del esporangióforo de *Phycomyces* dependen de la pared celular. Es por lo tanto sorprendente que no se haya realizado un estudio sobre la composición química de la pared celular de este hongo. Los únicos datos que pueden encontrarse en la literatura pertenecen a un informe publicado por Kreger (1954) sobre la determinación de quitina en diversos hongos por medio de difracción de rayos X. Dicho autor describió la presencia de quitina y quitosana en las paredes de *Phycomyces*.

Por todo lo anterior nosotros decidimos realizar un análisis de la composición química de la pared celular del esporangióforo de *P. blakesleanus* con el fin de correlacionar los datos químicos con los aspectos bioquímicos involucrados en el crecimiento del hongo y sus respuestas trópicas.

## MATERIALES Y METODOS

*Obtención de las paredes celulares.* Se utilizó una cepa de *P. blakesleanus* Burg., que se hizo crecer a 22°C por 4 días en cajas de Petri de medio YPG (Bartnicki-Garja y Nickerson, 1962a), bajo la luz difusa de una lámpara fluorescente. Se cortaron los esporangióforos, se lavaron con agua destilada y las esporas se eliminaron por filtración a través de gasa. Los esporangióforos se resuspendieron en NaCl al 0.85%, se mezclaron con perlas de vidrio y se rompieron en un homogenizador Mixolabo. Las perlas de vidrio se eliminaron por decantación y las paredes se sedimentaron a 3000 x g por 10 min. Las paredes se lavaron exhaustivamente por centrifugación con NaCl al 0.85% y posteriormente con agua destilada hasta que aparecieron libres de material citoplásmico por observación microscópica de muestras teñidas con azul algodón. Las paredes celulares que aparecían como un polvo grisáceo se liofilizaron y se guardaron en congelación en un desecador con CaCl<sub>2</sub> hasta su uso.

*Fraccionamiento de las paredes celulares.* Las paredes se extrajeron en forma secuencial por 30 min. con HCl 1N frío seguido de HCl 1N en ebullición, KOH 1N frío y KOH en ebullición. Posteriormente el orden se invirtió extrayendo primero con KOH 1N frío, seguido de KOH en ebullición, HCl frío y HCl en ebullición. Después de cada extracción las paredes se recuperaron por centrifugación.

*Análisis químicos.* Los carbohidratos neutros se determinaron con antrona (Dimler *et al.*, 1952) usando glucosa como patrón. Los análisis se realizaron en dos tipos muestras: a) paredes disueltas en  $H_2SO_4$  al 65% frío y b) paredes hidrolizadas con  $H_2SO_4$  2 N por 5 h a 105°C. La determinación cuantitativa de los azúcares individuales se realizó de la siguiente manera: las paredes se hidrolizaron con HCl 1N a 105°C durante 4 h, las muestras se neutralizaron con resina de intercambio aniónico AG1-X10 (Bio Rad) en fase  $HCO_3^-$ , se desionizaron pasándolas por una columna de resina de intercambio catiónico AG-50W-X4 (Bio Rad) en fase  $H^+$ , se evaporaron y se analizaron por cromatografía en papel empleando como solvente, butanol-piridina-agua (60:40:30 por vol). Los cromatogramas se revelaron con ftalato de anilina comparándose la movilidad de los problemas con azúcares conocidos, y se cuantificaron por un método descrito anteriormente (Ruiz-Herrera, 1967). Los ácidos urónicos se midieron con carbazol (Ashwell, 1957) empleando muestras disueltas en  $H_2HO_4$  al 65%. Los resultados obtenidos se corrigieron de acuerdo con el contenido de azúcares neutros, mismos que dan una débil reacción con el carbazol. Los aminoazúcares se determinaron por el método de Elson-Morgan (Ashwell, 1957) en muestras hidrolizadas con HCl 6N por 8 h a 105°C. Las proteínas se midieron por el método de Lowry *et al.* (1951) usando albúmina bovina como patrón. Los lípidos se extrajeron por el método descrito por Bartnicki-García y Nickerson (1962b). El fosfato se midió en las muestras extraídas con HCl ó N KOH por el método de Fiske y Subbarow (Umbreit *et al.*, 1949). La quitina se purificó por el método descrito anteriormente (Ruiz-Herrera, 1967) y se obtuvo su diagrama de refracción de rayos X con un instrumento Norelco-Philips equipado con una cámara de polvos Debye-Scherrer de 114.6 mm, usando radiación  $CuK\alpha$ . La quitosana se extrajo por calentamiento con HCl 1N a 100°C por min.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores de carbohidratos neutros fueron similares al emplear muestras de paredes disueltas en  $H_2SO_4$  al 65% o hidrolizados con  $H_2SO_4$  2N; en tanto que la determinación cuantitativa por cromatografía en papel dio valores más bajos (tabla 1). Este último resultado es normal, ya que la metodología empleada involucra varios pasos en las que puede ocurrir pérdida del azúcar.

Los resultados del análisis cuantitativo de las paredes de los esporangióforos se muestran en la tabla 2. Puede verse que la quitina es el componente más abundante. La presencia de quitina en la pared celular del micelio vegetativo

TABLA 1

Determinación cuantitativa de azúcares neutros por varios métodos

METODO	% AZUCAR NEUTRO*
Disolución en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 65%	12.5
Hidrólisis con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N	12.6
Cromatografía en papel	8.3

\* Forma anhidra.

y los esporangióforos de *P. blakesleanus* fue descrita originalmente por Kröger (1954). Nosotros confirmamos este resultado por difracción de rayos X. El resultado encontrado en nuestro trabajo constituye el valor más alto de quitina descrito en los zigomicetos; por ejemplo, el contenido de quitina de los esporangióforos de *Mucor rouxii* constituye el 18% del peso total de la pared (Bartnicki-García y Reyes, 1968a); en tanto que el micelio vegetativo, la forma de levadura y la esporangiospora del mismo hongo contienen cantidades de quitina aún más bajas: 9.4, 8.4 y 2.1% del peso total respectivamente (Bartnicki-García, 1968).

TABLA 2

Composición química de la pared de los esporangióforos de *P. blakesleanus*

COMPUESTO	PORCENTAJE
Polisacáridos neutros*	12.5
Proteínas	9.9
Quitina*	31.1
Quitosana*	10.6
Poliurónicos*	21.2
Lípidos	4.0
Fosfatos (HPO <sub>3</sub> )	4.5
Cenizas	5.5
Total:	93.3

\* Forma anhidra.

El segundo componente en orden de abundancia lo constituyen los poliuronidos, las cuales son el componente más abundante en las paredes celulares de los esporangióforos de *Mucor rouxii* (Bartnicki-García y Reyes, 1968a). En las paredes de *M. rouxii* se describió la existencia de dos poliuronidos: un homopolímero de ácido glucurónico denominado ácido mucórico, y un heteropolímero (mucorana) constituido por ácido glucurónico, fucosa, manosa y galactosa (Bartnicki-García y Reyes, 1968a). Datema *et al.* (1977) sugirieron que ambos compuestos: el homo y el heteropolímero comprendían una misma macromolécula en la pared de *Mucor mucedo*, y que su separación era producto de la hidrólisis durante el proceso de extracción. En *Phycomyces blakesleanus* encontramos que los azúcares neutros presentes, son los mismos descritos en los heteropolímeros de ácido glucurónico presentes en las paredes celulares de *M. rouxii* y *M. mucedo*: fucosa, galactosa y manosa (tabla 3) en una relación molar aproximada 7:3:3. Esto sugiere que dichos azúcares constituyen junto con el ácido glucurónico un heteropolímero semejante a la mucorana. Es interesante señalar que nosotros encontramos una cantidad significativa de glucosa en la pared celular de *P. blakesleanus*. Este azúcar se halla ausente en las paredes celulares del micelio vegetativo, el esporangióforo y la forma de levadura de *M. rouxii* (Bartnicki y Nickerson, 1962b; Bartnicki-García y Reyes, 1968a; Dow y Rubbery, 1977) y del micelio de *M. mucedo* (Datema *et al.*, 1977); y sólo ha sido descrito en la pared celular de la esporangiospora de *M. rouxii* (Bartnicki-García y Reyes, 1964).

La quitosana fue originalmente encontrada en la naturaleza por Kreger (1954) en la pared celular de *Phycomyces blakesleanus*. Nosotros confirmamos este resultado. El dato cuantitativo aquí descrito se basó en la extracción selectiva de este polisacárido con ácido caliente. Otro resultado que merece ser señalado es el bajo contenido de lípidos, que contrasta con el dato semicuantitativo del 20-25% mencionado por Kreger (1954).

Las paredes celulares del esporangióforo de *P. blakesleanus* aparecían de color grisáceo. El pigmento que poseen es seguramente del tipo de las melaninas que se han descrito en los esporangióforos de *Mucor rouxii* (Bartnicki-García y

TABLA 3

Proporción de los azúcares neutros en la pared de *P. blakesleanus*

AZUCAR	PORCENTAJE DEL TOTAL	RELACION MOLAR
Manosa	14.10	1.0
Glucosa	19.15	1.36
Galactosa	21.75	1.56
Fucosa	45.0	3.51

TABLA 4

Extracción de diferentes componentes de la pared de *P. blakesleanus*

METODO	FRACCION	% DEL TOTAL		
		POLISACARIDOS NEUTROS	PROTEINAS	FOSFATOS
1	HCl frío	10.1	11.4	8.8
	HCl caliente	28.2	32.7	21.2
	KOH frío	15.7	41.1	0.1
	KOH caliente	2.2	14.8	20.0
	Residuo	43.6	0.0	50.0
2	KOH frío	15.6	43.3	42.6
	KOH caliente	41.4	41.9	44.4
	HCl frío	4.8	4.5	9.3
	HCl caliente	0.5	10.1	1.5
	Residuo	35.3	0.2	0.0

Reyes, 1968a); sin embargo, aquí no se hizo su identificación. En la tabla 4 se muestra la extracción de los polisacáridos neutros, las proteínas y los fosfatos por KOH y HCl. Puede verse que en general los tres componentes son más solubles en KOH; y que dependiendo del orden de extracción; primero álcali y después ácido o viceversa varía su solubilización.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo económico del PNCB del CONACYT, México.

#### LITERATURA CITADA

- Ashwell, G., 1957. Colorimetric analysis of sugars. En: S. P. Colowick y N. O. Kaplan (Ed.) *Methods in Enzymology, Vol. III*. Academic Press, Nueva York.
- Bartnicki-García, S., 1968. Cell wall chemistry, morphology and taxonomy. *Ann. Rev. Microbiol.* 22:87-108.
- , y W. J. Nickerson, 1962a. Induction of yeast-like development in *Mucor* by carbon dioxide. *J. Bacteriol.* 81:829-840.
- , ———, 1962b. Isolation, composition and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochim. Biophys. Acta* 58:102-119.

- \_\_\_\_\_, y E. Reyes, 1964. Chemistry of spore wall differentiation in *Mucor rouxii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 108:125-133.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, 1968a. Chemical composition of sporangiophore walls of *Mucor rouxii*. *Biochim. Biophys. Acta* 165:32-42.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, 1968b. Polyuronides in the cell walls of *Mucor rouxii*. *Biochim. Biophys. Acta* 170:54-62.
- Bergman, K., P. V. Burke, E. Cerdá-Olmedo, C. N. David, M. Delbruck, K. W. Foster, E. W. Goodell, M. Heisenberg, G. Meissner, M. Zalokar, D. S. Dennison y W. Shropshire, 1969. *Phycomyces*. *Bacteriol. Rev.* 35:99-157.
- Cerdá-Olmedo, E. 1977. Behavioral genetics of *Phycomyces*. *Ann. Rev. Microbiol.* 31:535-547.
- Datema, R., H. Van Den Ende y J. G. H. Wessels, 1977. The hypall wall of *Mucor mucedo*. I. Polyanionic polymers. *Eur. J. Biochem.* 80:611-619.
- Dimler, R. J., W. C. Schaeffer, C. S. Wise y C. E. Rist, 1952. Quantitative paper chromatography of D-glucose and its oligosaccharides. *Anal. Chem.* 24:1411-1414.
- Dow, J. M. y P. H. Rubbery, 1977. Chemical fractionation of the cell walls of mycelial and yeast-like forms of *Mucor rouxii*: a comparative study of the polysaccharide and glycoprotein components. *J. Gen. Microbiol.* 99:29-41.
- Kreger, D. R., 1954. Observation on cell walls of yeasts and some other fungi by X-ray diffraction and solubility tests. *Biochim. Biophys. Acta* 13:1-9.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:68-90.
- Ruiz-Herrera, J., 1967. Chemical components of the cell wall of *Aspergillus species*. *Arch. Biochem. Biophys.* 122:118-125.
- Umbreit, W. W., R. H. Burris y J. F. Stauffer, 1949. *Manometric techniques and tissue metabolism*. Burgess Publishing, Minneapolis.