

BIOSINTESIS DE POLIURÓNIDOS EN *Phycomyces blakesleeanus*: CARACTERIZACION DE LA GLUCURONOSIL TRANSFERASA

por Martha A. Avalos Lozano\* y Arturo Flores-Carreón\*\*

BIOSYNTHESIS OF POLYURONIDES IN *Phycomyces blakesleeanus*: CHARACTERIZATION OF GLUCURONOSYL TRANSFERASE

## SUMMARY

Cell-free extracts from *Phycomyces blakesleeanus* possess glucuronosyl transferase activity. Most of the activity was present in a membrane fraction that sedimented at 54,000 x g. Addition of mucoric acid or mucoran stimulated the transfer of glucuronosyl residues. Similarly non-ionic detergents stimulated the incorporation of glucuronosyl residues but ionic detergents inhibited this activity. Treatment of membrane preparations with neutral detergents did not extract any transferase activity, but the insoluble enzyme became dependent on the addition of an exogenous primer, mucoric acid being more efficient than mucoran. Optima temperature and pH were 22°C and 7.5 respectively in 22 mM Pipes buffer. Glucuronosyl transferase required divalent cations for activity such as: Mn<sup>++</sup> > Fe<sup>++</sup> > Co<sup>++</sup> > Cu<sup>++</sup> > Mg<sup>++</sup> > Ca<sup>++</sup> at 8 mM of concentration. Km for UDP-GlcUA was 0.3 mM. The effect of sugars, nucleotides and sugar nucleotides on the activity of the glucuronosyl transferase was studied.

## RESUMEN

Extractos libres de células de *Phycomyces blakesleeanus* presentaron actividad de glucuronosil transferasa. La mayor parte de esta actividad se encontró en forma particulada en una fracción mixta de membranas (FMM) que sedimentó a 54,000 x g. La adición de ácido mucórico o mucorana a la fracción membranal incrementó la actividad enzimática. Por otro lado, la presencia de detergentes no iónicos también la estimuló. Sin embargo, los detergentes iónicos la inhibieron. Cuando

\* Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Apartado Postal 187, Guanajuato, Gto. CP 36000, México.

\*\* Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV, IPN, Apartado Postal 14-740, México, D.F. 07000, México.

se trató la fracción mixta de membranas con detergentes no iónicos y luego se recuperó el sedimento por centrifugación, éste presentó actividad enzimática y además se hizo dependiente de la presencia de los aceptores exógenos, ácido mucórico y mucorana, siendo el primero el más efectivo. La temperatura y el pH óptimos de la enzima fueron de 22°C y 7.5 respectivamente en regulador de Pipes 22 mM. La enzima se activó con los cationes divalentes  $Mn^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$  a una concentración de 8 mM. La  $K_m$  para UDP-ácido glucurónico fué de 0.3 mM. También se estudió el efecto de azúcares, nucleótidos y azúcares nucleótidos sobre la actividad enzimática.

### INTRODUCCIÓN

*Ph. blakesleeanus* es un hongo que pertenece a la clase Zygomycetes. Una de las características más importantes que distinguen a esta clase es la presencia de elevadas cantidades de polisacáridos ácidos en sus paredes celulares, constituidos fundamentalmente de ácido glucurónico (AGlu) (Bartnicki-García, 1970). En *Mucor rouxii* se han aislado y caracterizado dos tipos de poliurónidos, uno conocido como ácido mucórico, que es un homopolisacárido constituido de AGlu y otro denominado mucorana que es un heteropolímero formado de manosa, fucosa, galactosa y glucosa, además de AGlu (Bartnicki-García y Reyes, 1968; Bartnicki-García y Lindberg, 1972). En *M.ucedo* sólo se ha podido aislar el heteropolímero conocido como glicuromanana (Datema *et al.*, 1977). Estudios sobre la composición química de las paredes celulares de *Ph. blakesleeanus*, también han puesto en evidencia la presencia de AGlu en estas estructuras (Van Laere *et al.*, 1977). Cansino y Ruiz-Herrera (1979) encontraron que el 25% del peso seco de la pared celular de los esporangióforos de *Phycomyces* está constituido por AGlu. Los polímeros ácidos constituyen la fracción amorfa de la pared celular en estos hongos, además de otras moléculas tales como glicoproteínas, proteínas, lípidos y quitosana. Existen informes en la literatura sobre la síntesis de poliurónidos en *M. rouxii* (Flores-Carreón y Bartnicki-García, 1982; Dow *et al.*, 1982; Flores-Carreón *et al.*, 1985). La glucuronosil transferasa es la enzima responsable de la polimerización del AGlu y utiliza como sustrato uridina difosfato ácido glucurónico (UDP-AGlu). En *M. rouxii* esta actividad se ha encontrado presente en preparaciones de membranas crudas (Flores-Carreón y Bartnicki-García, 1982; Dow *et al.*, 1982). Cuando se adicionan al sistema enzimático ácido mucórico o mucorana, estos compuestos activan ligeramente la glucuronosil transferasa. Estos resultados han sugerido que en las preparaciones de membranas crudas existen aceptores endógenos de residuos glucuronosilo y que estos polímeros también actúan como aceptores y funcionan independientemente de los primeros. Flores-Carreón *et al.* (1985) estudiaron las propiedades de la glucuronosil transferasa de *M. rouxii* presente en una fracción mixta de membranas tratada previamente con detergentes neutros. Los mismos autores sugirieron

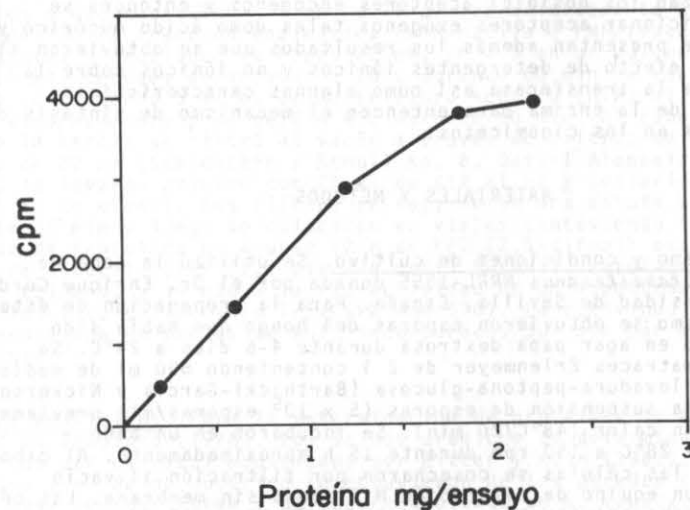


Fig. 1. Efecto de la concentración de enzima. La mezcla de reacción contenía: UDP-AGlu- $C^{14}$  0.33 mM; 0.2 mg de ácido mucórico;  $MnCl_2$  4 mM y cantidades variables de FMM Tritón X-100 al 1%. Se llevó a un volumen final de 0.15 ml con regulador de Pipes 22 mM pH 7.5. Las muestras se incubaron a 28°C durante 60 min y la radiactividad presente en el precipitado con ATA se determinó según Materiales y Métodos.

que este tratamiento extrae los aceptores endógenos y por lo tanto es posible estudiar las características de la transferasa, utilizando aceptores exógenos purificados. En el presente trabajo nosotros también observamos que *Ph. blakesleeana* presenta actividad de glucuronosil transferasa y que ésta se encuentra localizada en una fracción mixta de membranas. De la misma manera que ocurre en *M. rouxii*, cuando la fracción membranal se trata con detergentes neutros, se solubilizan los posibles aceptores endógenos y entonces se requiere adicionar aceptores exógenos tales como ácido mucórico y mucorana. Se presentan además los resultados que se obtuvieron al analizar el efecto de detergentes iónicos y no iónicos sobre la actividad de la transferasa así como algunas características bioquímicas de la enzima para entender el mecanismo de síntesis de poliuronidos en los cigomicetos.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

**Microorganismo y condiciones de cultivo.** Se utilizó la cepa de *Phycomyces blakesleeana* NRRL-1555 donada por el Dr. Enrique Cerdá de la Universidad de Sevilla, España. Para la propagación de este microorganismo se obtuvieron esporas del hongo que había sido desarrollado en agar papa dextrosa durante 4-6 días a 24°C. Se inocularon matraces Erlenmeyer de 2 l conteniendo 600 ml de medio de extracto de levadura-peptona-glucosa (Bartnicki-García y Nickerson, 1962) con una suspensión de esporas ( $5 \times 10^5$  esporas/ml) previamente activadas con calor (48°C/20 min). Se incubaron en un baño metabólico a 28°C a 150 rpm durante 15 h aproximadamente. Al cabo de este tiempo las células se cosecharon por filtración al vacío utilizando un equipo de filtración Millipore sin membrana. Las células se lavaron exhaustivamente con regulador de Pipes (ácido 1,4-piperazina-dietano-sulfónico) 22 mM de pH 7.5 y se utilizaron inmediatamente para obtener la fracción enzimática o bien se guardaron a -70°C hasta su procesamiento.

**Obtención de la fracción enzimática.** La masa celular obtenida, como se mencionó anteriormente, se resuspendió en 10 ml de regulador de Pipes 22 mM de pH 7.5 y se colocó en una botella de Braun conteniendo perlas de vidrio de 0.45-0.5 mm de diámetro. Las células se rompieron en un homogenizador Braun MSK durante 2 períodos de 1 min cada uno. El homogenado (extracto crudo) se centrifugó a 3,020 x g durante 5 min. El residuo se separó y el sobrenadante se centrifugó a 64,000 x g durante 45 min. El residuo conteniendo la fracción membranal (fracción mixta de membranas, FMM) se resuspendió en el mismo regulador. El tratamiento de la FMM con detergente se realizó de la siguiente manera: a la FMM se le adicionó un volumen igual del detergente no iónico Tritón X-100 al 2% y se dejó incubar a 4°C durante 2 h. Posteriormente se centrifugó a 154,000 x g durante 60

min. El residuo obtenido se resuspendió en el mismo regulador. A esta fracción se le denominó fracción mixta de membranas tratada con detergente.

**Método para determinar actividad de glucuronosil transferasa.** La mezcla típica de reacción contenía: 0.33 mM de UDP-AGlu- $C^{14}$  (UDP-GlcUA- $C^{14}$  actividad específica, 0.33 Ci/mol), 0.2 mg de ácido mucórico o mucorana;  $MnCl_2$ , 4 mM, y 75  $\mu$ l (aproximadamente 1 mg de proteína) de la fracción enzimática (FMM-nativa o FMM-tratada con detergente) y regulador de Pipes 22 mM, pH 7.5 en un volumen final de 0.15 ml. Después de incubar a 28°C durante 60 min la reacción se detuvo adicionando 5 ml de ácido tricloro acético (ATA) al 10%, se agitó vigorosamente y se dejó a 4°C durante 60 min. Al cabo de este tiempo la mezcla se filtró al vacío a través de filtros de fibra de vidrio de 27 mm (Schleicher y Schull No. 8, Dassel Alemania) los cuales se lavaron primero con 25 ml de ATA al 5% y posteriormente con 25 ml de etanol. Los filtros se secaron en una estufa a 70°C durante 30 min y luego se colocaron en viales conteniendo 5 ml de líquido de centelleo no acuoso (2 g de PPO (2,5-difenil oxazolil) y 0.1 g de dimetil POPOP (1,4 bis 2-4 metil 5-fenil oxazol-benceno) en 1 l de tolueno) y se midió la radiactividad en un espectrómetro de centelleo líquido (Packard Tri-Carb Mod 576). La actividad específica está expresada en pmoles de AGlu incorporados por min por mg de proteína.

**Métodos analíticos.** Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976). Los ácidos urónicos se determinaron por el método del carbazol modificado por Bitter y Muir (1962). La mucorana y el ácido mucórico se obtuvieron de las paredes celulares de la fase levaduriforme y de esporangióforos de *M. rouxii*, respectivamente, según el procedimiento descrito por Bartnicki-García y Reyes (1968).

#### ABREVIATURAS USADAS

Pipes, ácido 1,4-piperazina-dietano-sulfónico; ATA, ácido tricloro acético; FMM, fracción mixta de membranas; AGlu, ácido glucurónico; UDP-AGlu, uridina difosfato ácido glucurónico; ATP, adenosina trifosfato; UTP, uridina trifosfato; GTP, guanosina trifosfato; CTP, citidina trifosfato; NADPH, dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reducido; NADH, dinucleótido de nicotinamida adenina reducido; UDP, uridina difosfato; GDP, guanosina difosfato y ADP, adenosina difosfato.

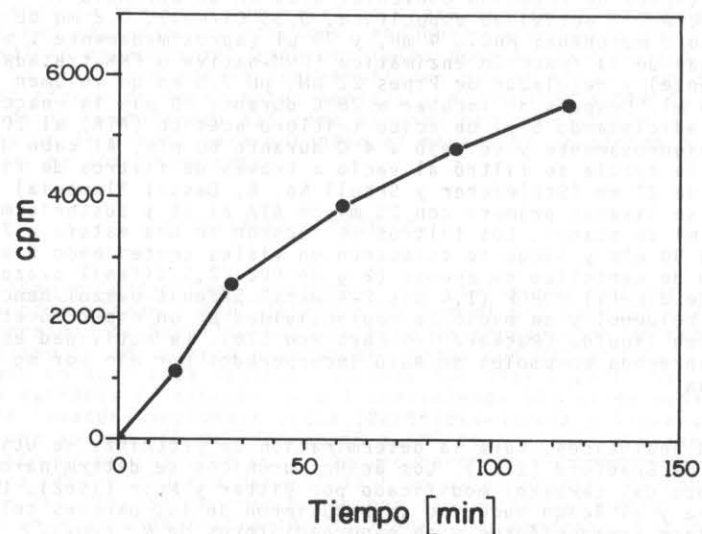


Fig. 2. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la glucuronosil transferasa. Se prepararon varios tubos con la mezcla de incubación típica conteniendo 0.8 mg de proteína y se incubaron a 28°C a diferentes intervalos de tiempo y se les determinó radiactividad.

## RESULTADOS

Distribución de la glucuronosil transferasa en extractos libres de células. En la tabla 1 se muestra la capacidad que tiene cada una de las diferentes fracciones obtenidas para incorporar AGLu a partir de UDP-AGlu. La fracción que sedimentó a 54,000 x g presentó la máxima actividad específica y en ella se recuperó el 67% de la actividad total.

Efecto del ácido mucórico y de la mucorana sobre la actividad de la glucuronosil transferasa. La actividad de la glucuronosil transferasa presente en la FMM-nativa incrementa variablemente su actividad cuando se le adiciona ácido mucórico al sistema (datos no mostrados). También se ha observado que el tratamiento de la FMM-nativa con Tritón X-100, posiblemente solubiliza a los aceptores endógenos y esto hace que la enzima ahora requiera de aceptores exógenos para expresar su actividad. En la tabla 2 se pueden observar los resultados obtenidos al analizar el requerimiento de mucorana y de ácido mucórico por la glucuronosil transferasa. En este caso el ácido mucórico fué mejor estimulador que la mucorana y prácticamente no se observó actividad en ausencia de cualesquiera de los polímeros.

Efecto de detergentes sobre la glucuronosil transferasa. Se conoce que algunas enzimas particuladas generalmente unidas a membranas son activadas cuando están en presencia de detergentes o bien algunas de ellas pueden ser solubilizadas. Nosotros intentamos primeramente ver el efecto que tienen algunos detergentes iónicos y no iónicos sobre la actividad de la enzima. Para ello se incubaron alícuotas de la FMM-nativa en presencia de diferentes concentraciones de cada detergente, 0.2 mg de ácido mucórico por ensayo, 4 mM de MnCl<sub>2</sub> y UDP-AGlu-C<sup>14</sup> 0.33 mM (actividad específica 0.3 Ci/mol) a 28°C<sup>2</sup> durante 60 min y se determinó la radiactividad incorporada en el precipitado con ATA como se mencionó en materiales y métodos. Los resultados se muestran en la tabla 3. Se observa que todos los detergentes no iónicos incrementaron la actividad enzimática a diferente nivel y dependiendo en algunos casos de su concentración. Por ejemplo el Tritón X-100 al 0.5% incrementó la actividad 1.8 veces, al 1% 2.6 veces y al 2% de 3.6. Por otro lado, el Brij 98 incrementó la actividad enzimática al mismo nivel independientemente de la concentración empleada. Por otro lado los detergentes iónicos inhibieron la actividad a las concentraciones empleadas, con excepción del sarcosil NL-30 que solamente inhibió el 33% de la actividad. Enseguida se probó si alguno de los detergentes neutros o el mismo sarcosil podrían solubilizar a la glucuronosil transferasa. Para ello una FMM-nativa se incubó en presencia ya sea de Tritón X-100, Brij 98, tergitol o sarcosil a 4°C durante 1 h y posteriormente se centrifugó a alta velocidad. Al sobrenadante (2 ml) y al residuo (este último resuspendido en el mismo volumen que el sobrenadante)

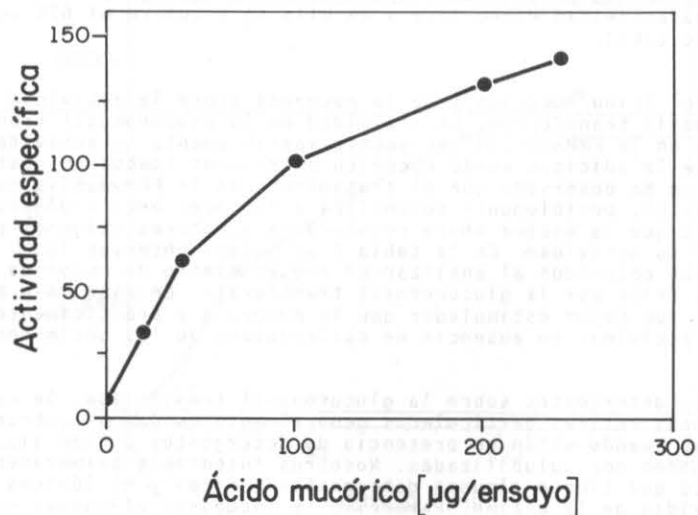


Fig. 3. Efecto de la concentración de ácido mucórico sobre la actividad de la glucuronosil transferasa. Se prepararon tubos con la mezcla de incubación típica (0.8 mg de proteína), y cantidades variables de ácido mucórico (0-0.24 mg), se incubaron a 28°C por 60 min y luego se les determinó radiactividad.

se les determinó actividad enzimática en presencia y en ausencia de ácido mucórico. Los resultados se muestran en la tabla 4, en donde se observa que la mayor parte de la actividad enzimática está presente en el residuo y que sólo en algunos casos pudo detectarse una actividad muy baja en el sobrenadante, solamente en presencia de ácido mucórico. Sin embargo cuando se analizó el comportamiento de la enzima solubilizada en una columna de Bio-Gel A-5m ésta eluyó con el volumen vacío de la columna (datos no mostrados), sugiriendo por lo tanto que se trata de una fracción de elevado peso molecular.

Características bioquímicas de la glucuronosil transferasa. Los estudios bioquímicos que a continuación se detallan fueron realizados con preparaciones mixtas de membranas tratadas con diferentes detergentes neutros. En la figura 1 se observa el efecto de la concentración de proteína sobre la actividad enzimática, encontrándose la máxima a 1.8 mg de proteína. Por otro lado, cuando se analizó el tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima se observó que aún después de 120 min de incubación la actividad seguía aumentando (Fig. 2); sin embargo, en la mayoría de los experimentos el tiempo de incubación utilizado fue de 60 min. Como ya habíamos indicado anteriormente, la FMM tratada con detergente requiere de la presencia de aceptores exógenos. En la figura 3 se observan los resultados obtenidos al analizar el efecto de la concentración de ácido mucórico y se aprecia que a las concentraciones ensayadas no se alcanzó la saturación. La temperatura óptima de actividad se obtuvo a 22°C (Fig. 4). Para determinar el pH óptimo de la actividad enzimática, la FMM tratada con Brij 98 se resuspendió en regulador de Pipes 22 mM de diferentes valores de pH y se tomaron alícuotas para determinar la actividad enzimática. Los resultados se muestran en la figura 5 en donde se observa que el valor óptimo de actividad se obtuvo a pH 7.5. También observamos que la actividad enzimática fue casi indetectable en ausencia de cationes divalentes. Los iones  $Mn^{++}$  a una concentración de 8 mM mostraron la máxima estimulación de la actividad enzimática la cual dio un valor de 58 de actividad específica (Tabla 5). Si consideramos este incremento como un 100%, los cationes divalentes  $Fe^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$  a la misma concentración que los iones  $Mn^{++}$  incrementaron la actividad 35, 24, 17, 11 y 8%, respectivamente. Los iones  $Zn^{++}$  no tuvieron ningún efecto sobre la actividad. La constante de Michaelis por el UDP-AGlu calculada por los dobles recíprocos de Lineweaver y Burk dio un valor de 0.3 mM.

Efecto de azúcares, nucleótidos y azúcares nucleótidos sobre la actividad de la glucuronosil transferasa. En la tabla 6 se aprecian los resultados obtenidos al analizar el efecto que tienen algunos azúcares sobre la actividad de la enzima en presencia de ácido mucórico o mucorana como aceptores exógenos. Se observa que en presencia de ácido mucórico, la L-fucosa y la glucosa muestran una



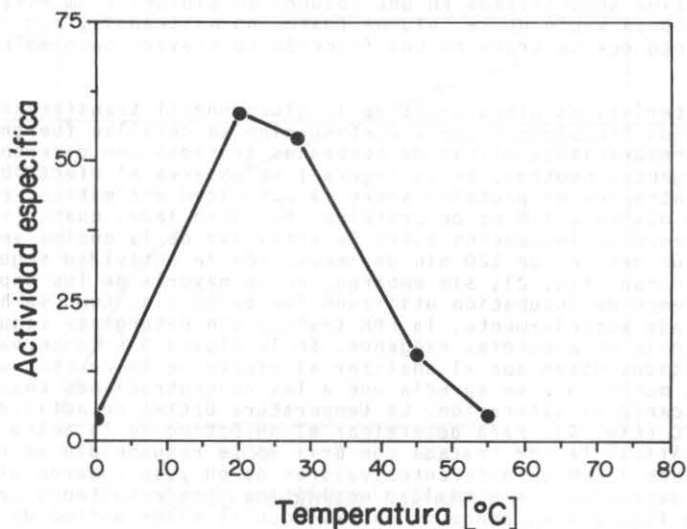


Fig. 4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. Se prepararon tubos con la mezcla de incubación típica y se incubaron a diferentes temperaturas durante 60 min. Posteriormente se les determinó radiactividad.

inhibición ligera en la actividad enzimática y la glucuronolactona incrementó la actividad en un 15%. Por otro lado, en presencia de mucorana el AGlu, la D-manosa, la glucuronolactona y la D-glucosa a 2 mM inhibieron la actividad 43,34,33% y 34% respectivamente. También se estudió el efecto que pudieran tener algunos nucleótidos sobre la actividad enzimática y en la tabla 7 se observan los resultados obtenidos. En presencia de ácido mucórico, el UTP, el GTP, el CTP, el ADP y el NADH inhibieron ligeramente la actividad a una concentración de 0.48 mM (el ADP se utiliza 0.05 mM); el UDP (0.66 mM) inhibió el 35% y elevadas concentraciones de NADPH (12 mM) inhibieron el 39%. Por otro lado, en presencia de mucorana, el UTP y el GTP inhibieron la actividad 19 y 17% respectivamente a una concentración de 0.48 mM, el NADPH 12 mM la inhibió 47% y el UDP 0.66 mM la inhibió el 56%. Los azúcares nucleótidos no mostraron ningún efecto significativo sobre la actividad enzimática, sin embargo la adición de un exceso de UDP-AGlu como se esperaba, disminuyó la incorporación de la radiactividad en el producto sintetizado, pero se incrementó la incorporación neta de GlcUA (resultados no mostrados).

#### DISCUSION

Los poliurónidos son polímeros ácidos constituidos fundamentalmente de ácido glucurónico y los cuales se hayan presentes en gran proporción en la pared celular de los cigomicetos (Bartnicki-García, 1970). Sin embargo, existen pocos informes en la literatura sobre la glucuronosil transferasa en hongos, la cual es la enzima responsable de la polimerización de AGlu a partir de UDP-AGlu (Flores-Carreón y Bartnicki-García, 1982; Dow et al., 1982; Flores-Carreón et al., 1985). La mayoría de los estudios sobre esta enzima se han realizado en sistemas de animales, por ejemplo en el hígado de cerdo (Berry et al., 1978; Hochman y Zakim, 1983, 1984), en el hígado de rata (Burchell, 1977, 1978; Gigon y Bichet, 1979; Bansal et al., 1981; Kitchin, 1982; Watkins y Klaassen, 1982), en el hígado de conejo (Yost y Finley, 1983) y en el hígado de pollo (Roth y Levine, 1983; Burchell et al., 1983).

En un trabajo previo demostramos que la glucuronosil transferasa de *M. rouxii* es una enzima particulada (Flores-Carreón y Bartnicki-García, 1982). En este trabajo presentamos evidencias de que un gran porcentaje de la enzima en *Ph. blakesleeana* se localiza en una fracción membranal. El tratamiento de la fracción membranal de *M. rouxii* con detergentes no iónicos no extrajo la actividad enzimática, lo cual sugiere que se encuentra firmemente unida a la membrana (Flores-Carreón et al., 1985). Resultados similares se obtuvieron cuando se intentó solubilizar la enzima de *Ph. blakesleeana*. Burchell (1977, 1978) purificó la UDP-Glucuronosil transferasa de hígado de

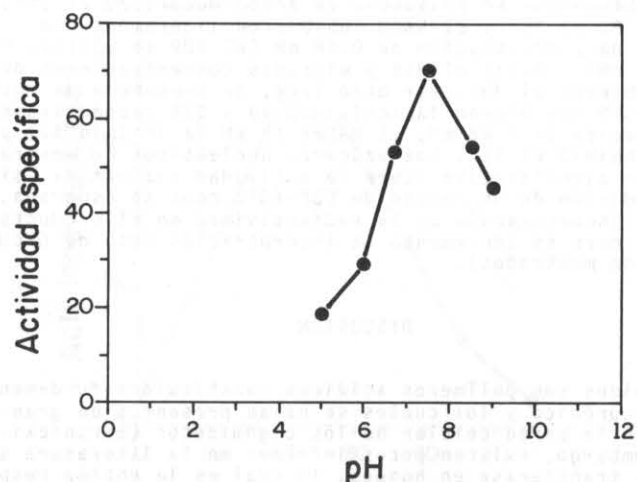


Fig. 5. Efecto del pH sobre la actividad enzimática. Se prepararon tubos con la mezcla de incubación típica y ajustada a diferente valor de pH con regulador de Pipes 22 mM. Se incubaron a 28°C por 60 min y se les determinó la radiactividad incorporada.

rata y Singh et al. (1981) la de hígado de cobayo utilizando Lubrol 12A9 al 1%. Por otro lado, el tratamiento de las fracciones membranales de *Ph. blakesleeanus* con detergentes iónicos inhibieron la actividad enzimática irreversiblemente. Sin embargo, se ha informado que el tratamiento combinado y secuencial de las membranas con Tritón X-100 al 0.2% y desoxicolato al 0.18% como concentraciones finales, han permitido a Hochman et al. (1981) solubilizar la UDP-glucuronosil transferasa de hígado de cerdo.

Un aspecto interesante observado con la enzima de *M. rouxii*, y que también fue posible observar con la enzima de *Ph. blakesleeanus*, fue el hecho de que el tratamiento de la FMM con detergentes neutros solubiliza material que actúa como aceptor endógeno de residuos glucuronosilo. Las membranas tratadas con detergente requieren ahora de la adición de poliurónidos (ácido mucórico o mucorana) para expresar su actividad, siendo el ácido mucórico el más efectivo. En *M. rouxii* se ha demostrado que el ácido mucórico y la mucorana actúan como aceptores de residuos glucuronosilo y no como activadores de la glucuronosil transferasa (Flores-Carreón, et al., 1985). En sistemas de animales se han utilizado fenoles sustituidos y otros compuestos tóxicos como aceptores de residuos glucuronosilo (Berry et al., 1978); Burchell, 1978).

La caracterización de la glucuronosil transferasa de *Ph. blakesleeanus* se llevó al cabo con una FMM tratada con detergente neutro. Se encontró una temperatura óptima de 22°C. El pH óptimo fue de 7.5 con regulador de Pipes 22 mM. La constante de Michaelis para UDP-AGlu calculada por las dobles recíprocas de Lineweaver y Burk fue de 0.3 mM. Además se pudo observar que la enzima requiere de cationes divalentes tales como  $Mn^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$  a una concentración de 8 mM. Si la actividad detectada en presencia de  $Mn^{++}$  8 mM se le asigna un valor de 100%. Los demás iones activaron: 35, 24, 17, 11 y 8% respectivamente. Flores-Carreón y Bartnicki-García (1982), encontraron para *M. rouxii* valores de pH óptimo de 7.0, una constante de Michaelis para UDP-AGlu de 0.2 mM y requerimiento de iones  $Mn^{++}$  y  $Mg^{++}$  con preparaciones de membranas nativas. Cuando se utilizaron preparaciones de membranas tratadas con detergente se encontraron valores de temperatura óptima a 26°C y una constante de Michaelis para UDP-AGlu de 0.73 mM a bajas concentraciones de sustrato ya que se presentó una cinética con un comportamiento bifásico (Flores-Carreón et al., 1985).

Se estudió el efecto de algunos azúcares sobre la actividad de la enzima en presencia de ácido mucórico o de mucorana. Con ácido mucórico no se observó ningún efecto sobre la actividad, con excepción de la glucuronolactona, la cual la activó ligeramente. En presencia de mucorana, los azúcares; AGlu, manosa, glucuronolactona y glucosa inhibieron la actividad enzimática en 43, 34, 33 y 34%,

respectivamente. También se analizó el efecto de nucleótidos y se encontró que en presencia de ácido mucórico o mucorana el UDP inhibió la actividad enzimática 35% y 56% respectivamente. El NADPH también inhibió la actividad en presencia de ambos aceptores. Este comportamiento parece ser importante desde el punto de vista del mecanismo de regulación de la síntesis de los poliuronidos. La UDP-glucuronosil transferasa presente en los microsomas de cerdo no tratados con detergentes es activada por UDP-N-acetil glucosamina a bajas concentraciones. Esta propiedad se pierde cuando los microsomas de cerdo son tratados con detergentes o fosfolipasas y también es característica de la enzima pura y delipidada. Sin embargo, el efecto de la UDP-N-acetil glucosamina se reconstituyó cuando la enzima pura se colocó en una bicapa unilamelar de fosfatidil colina que estuviera en fase de gel. Esto ha sugerido que el medio ambiente lipídico en los microsomas intactos está en fase de gel a 37°C y es así como los microsomas no tratados pueden modular la sensibilidad de la enzima a la activación alostérica por la UDP-N-acetil glucosamina (Hochman y Zakim, 1983). En *M. rouxii*, la actividad de glucuronosil transferasa presente en la FMM-nativa no se vio afectada por la presencia de azúcares nucleótidos, sin embargo, cuando se utilizó una FMM tratada con detergente varios azúcares nucleótidos (UDP-AGlu, UDP-glucosa y UDP-galactosa) estimularon su actividad. En *Ph. blakesleeanus* estos mismos azúcares no tuvieron ningún efecto. Es posible que las enzimas involucradas en la síntesis del heteropolímero y que pudieran actuar en forma coordinada con la glucuronosil transferasa, no se encuentren activas en las condiciones del ensayo, o bien que éstas hayan sido solubilizadas durante el tratamiento con el detergente.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Everardo López-Romero las valiosas críticas y sugerencias hechas a este trabajo. También agradecen el apoyo parcial de la DIGICySA de la Sub-secretaría de Educación Superior e Investigación Científica de la SEP y a la Dirección Adjunta de Desarrollo Científico del CONACyT.

Tabla 1. Distribución subcelular de la actividad de la glucuronosil transferasa en *Ph. blakesleeanus*

Fracción	Actividad		Recuperación %
	Específica	Total	
Extracto crudo	7.3	3836	100
Residuo 1000 x g	9.7	87	2
Sobrenadante 1000 x g	12.0	4388	114
Residuo 54,000 x g	35.0	2579	67
Sobrenadante 54,000 x g	8.8	1584	41

Se obtuvo un extracto libre de células y se centrifugó a 1000 x g durante 5 min. El sobrenadante se centrifugó a 54,000 x g durante 45 min. En cada centrifugación se obtuvo un sobrenadante y un residuo. De estos se tomaron alícuotas y se les determinó proteína y actividad enzimática de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos.



Tabla 2. Efecto de aceptores exógenos sobre la actividad de la glucuronosil transferasa de *Ph. blakesleeanus*

Adición	Actividad específica
Ninguna	4
Mucorana (0.2 mg)	68
Acido mucórico (0.2 mg)	107

Tabla 3. Efecto de detergentes sobre la actividad de la glucuronosil transferasa de *Ph. blakesleeanus*

Detergente	Actividad específica			
	0%	0.5%	1.0%	2.0%
Control	33			
Brij 35		58	103	113
Brij 36 T		83	106	121
Brij 58		110	108	123
Brij 98		83	83	71
Lubrol PX		83	121	118
Lubrol WX		95	81	95
Tergitol		55	70	106
Tritón X-100		61	88	120
Tween 80		31	88	105
Desoxicolato de sodio		5	0	0
Dodecil sulfato de sodio		0	0	0
Sarcosil NL-30		23	0	0

A la mezcla de incubación se le adicionaron 0.2 mg de ácido mucórico y cantidades variables de los detergentes para dar las concentraciones que se indican.

Tabla 4. Efecto de detergentes sobre la solubilización de la glucuronosil transferasa de *Ph. blakesleeanus*

Detergente	Fracción	Acido mucórico	Actividad específica
Sarcosil (0.5%)	Sobrenadante	-	0
		+	0
	Residuo	-	1.5
		+	19.7
Tergitol (2%)	Sobrenadante	-	0
		+	9.3
	Residuo	-	3.0
		+	84.7
Brij 98 (0.5%)	Sobrenadante	-	0
		+	0
	Residuo	-	7.6
		+	74.0
Tritón X-100 (1%)	Sobrenadante	-	0
		+	3.5
	Residuo	-	9.0
		+	113.8

Se tomaron alícuotas de la FMM-nativa (1 ml) y se mezclaron con un volumen igual de los diferentes detergentes para obtener las concentraciones indicadas. Las mezclas se incubaron durante 1h a 4°C y enseguida se centrifugaron a 160,000 x g durante 1h. El sobrenadante se separó y el residuo se resuspendió en 2 ml de regulador de Pipes 22 mM de pH 7.5. Se les determinó actividad enzimática a ambas fracciones en ausencia y presencia de ácido mucórico (0.2 mg/ensayo).

Tabla 5. Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de la glucuronosil transferasa de *Ph. blakesleeanus*

Cati6n	Concentraci6n (mM)	A c t i v i d a d	
		Específica	%*
Sin adici6n	-	0	0
Manganeso	2	34.5	59.5
	4	50.0	86.2
	8	58.0	100
Fierro	2	0.4	0.7
	4	7.7	13.3
	8	20.5	35.3
Cobalto	2	5.0	8.6
	4	9.0	15.5
	8	14.0	24.0
Cobre	2	0.3	0.5
	4	0.8	1.4
	8	10.0	17.2
Magnesio	2	1.3	2.2
	4	5.6	9.7
	8	6.2	10.7
Calcio	2	2.6	4.5
	4	2.6	4.5
	8	4.9	8.4
Zinc	2	0	0
	4	0	0
	8	0	0

\* Calculado con base en que la máxima actividad específica que se obtuvo con manganeso 8 mM se consideró el 100%.

Tabla 6. Efecto de algunos azúcares sobre la actividad de la glucuronosil transferasa de *Ph. blakesleeanus* en presencia de ácido mucórico o mucorana

Azúcar	(mM)	Actividad específica			
		Acido mucórico	Inhibición %	Mucorana	Inhibición %
--		45.2	0	43.9	0
L-Fucosa	1	33.7	25	45.9	0
	2	35.4	22	42.3	4
D-Galactosa	1	45.5	0	42.3	4
	2	37.2	18	43.9	0
D-Glucosa	1	33.8	25	33.8	23
	2	39.7	12	29.1	34
D-Acido Glucurónico	1	44.0	3	25.2	43
	2	39.7	12	25.0	43
D-Manosa	1	42.8	5	32.4	26
	2	36.8	19	28.9	34
Glucuronolactona	1	45.9	0	34.2	22
	2	52.4	0	29.3	33

Alícuotas de la FMM tratada con Brij 36T al 1% se incubaron en presencia de UDP-AGlu-C<sup>14</sup> 0.33 mM, MnCl<sub>2</sub> 4 mM, 0.2 mg de ácido mucórico o mucorana y los azúcares mencionados a una concentración final de 1 y 2 mM, se llevaron a un volumen final de 150 µl con regulador de Pipes 22 mM pH 7.5 y se dejaron a 28°C durante 60 min. Enseguida se determinó la radiactividad incorporada en el precipitado con TCA como se describió en Materiales y Métodos.

Tabla 7. Efecto de nucleótidos sobre la actividad de la glucuronosil transferasa de *Ph. blakesleeanus*

Nucleótido	(mM)	Actividad específica			
		Mucórico	Inhibición %	Mucorana	Inhibición %
--		60.2	0	22.7	0
ATP	0.24	62.3	0	20.8	8.4
	0.48	60.4	0	20.7	9.0
UTP	0.24	63.2	0	17.9	21
	0.48	49.4	18	18.3	19
GTP	0.24	62.3	0	19.9	12
	0.48	51.9	14	18.9	17
CTP	0.24	61.9	0	21.3	6
	0.48	50.1	17	23.0	0
NADPH	6	50.2	17	21.0	7
	12	36.7	39	12.2	46
NADH	6	55.9	7	ND	-
	12	48.9	19	ND	-
UDP	0.33	43.0	29	15.6	31
	0.66	39.0	35	10.1	56
GDP	0.31	54.9	9	ND	-
	0.62	44.9	25	ND	-
ADP	0.29	58.5	3	ND	-
	0.58	48.9	19	ND	-

Alícuotas de la FMM tratada con Brij 36T al 1% se incubaron en presencia de UDP-AGlu-C<sup>14</sup> 0.33 mM, MnCl<sub>2</sub> 4 mM, 0.2 mg de ácido mucórico o mucorana y los nucleótidos a las concentraciones finales arriba indicadas, se llevaron a un volumen final de 150 µl con regulador de Pipes 22 mM de pH 7.5 y se dejaron a 28°C durante 60 min. La radiactividad incorporada en el precipitado con ATA se determinó como se indicó en Materiales y Métodos.

ND = No determinado.

## LITERATURA CITADA

- Bansal, S.K., J. Saleski y T. Gessner, 1981. Glucuronidation of oxygenated benzo (a) pyrene derivatives by UDP-glucuronosyl transferase of nuclear envelope. Biochem. Biophys. Res. Commun. 98: 131-139.
- Bartnicki-García, S., 1970. Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. In: J.B. Harborne (ed.). Phytochemical Phylogeny pp. 81-103. Academic Press, Nueva York.
- Bartnicki-García, S. y B. Lindberg, 1972. Partial characterization of mucoran: The glucuromannan component. Carbohydr. Res. 23: 75-85.
- Bartnicki-García, S. y W.J. Nickerson, 1962. Induction of yeast-like development in *Mucor rouxii* by carbon dioxide. J. Bacteriol. 84: 829-840.
- Bartnicki-García, S. y E. Reyes, 1968. Polyuronides in the cell walls of *Mucor rouxii*. Biochim. Biophys. Acta 170: 54-62.
- Berry, C., J. Allistone y T. Hallinan, 1978. Phospholipid dependence of UDP-glucuronosyl transferase. Biochim. Biophys. Acta 507: 198-206.
- Bitter, T. y H.M. Muir, 1962. A modified uronic acid carbazol reaction. Anal. Biochem. 4: 330-334.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method of quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Burchell, B., 1977. Studies on the purification of rat liver uridine diphosphate glucuronosyl transferase. Biochem. J. 161: 543-549.
- Burchell, B. 1978. Substrate specificity and properties of uridine diphosphate glucuronosyl transferase purified to apparent homogeneity from phenobarbital-treated rat liver. Biochem. J. 173: 749-757.
- Burchell, B., G.J. Pratt, I. Duffy y L. West, 1983. Identification of increased amounts of UDP-glucuronosyl transferase protein in phenobarbital-treated chick-embryo liver cells. Biochem. J. 214: 517-523.
- Cansino, J.M. y J. Ruiz-Herrera, 1979. Aislamiento, purificación y composición química de la pared celular de los esporangióforos de *Phycomyces blakesleeianus*. Bol. Soc. Mex. Mic. 13: 39-45.
- Datema, R., H. Van Den Ende y J.G.H. Wessels, 1977. The hyphal wall of *Mucor mucedo* 1, Polyanionic polymers. Eur. J. Biochem. 80: 611-619.
- Dow, J.M., P.M. Olona y V.D. Villa, 1982. Glucuronosyl transferase from the dimorphic fungus *Mucor rouxii* Exp. Mycol. 6: 329-334.
- Flores-Carreón, A. y S. Bartnicki-García, 1982. Polyuronide biosynthesis by cell-free extracts of *Mucor rouxii*. J. Gen. Microbiol. 128: 2023-2027.
- Flores-Carreón, A., R. Balcazar y J. Ruiz-Herrera, 1985. Characterization of glucuronosyl transferase from *Mucor rouxii*: Requirement for polyuronide acceptors. Exp. Mycol. 9: 294-301.
- Gigon, P.L. y M.H. Bickel, 1979. Interference of UDP-glucuronosyl transferase and  $\beta$ -glucuronidase activity in rat liver microsomes at pH 7.5 with p-nitrophenol and p-nitrophenylglucuronide as substrates. Enzyme 24: 230-238.
- Hochman, Y. y D. Zakim, 1983. Evidence that UDP-glucuronosyl transferase in liver microsomes at 37°C is in a gel phase lipid environment. J. Biol. Chem. 258: 11758-11762.
- Hochman, Y. y D. Zakim, 1984. Studies of the catalytic mechanism of microsomal UDP-glucuronosyl transferase. J. Biol. Chem. 259: 5521-5525.
- Hochman, Y., D. Zakim y D.A. Vessey, 1981. A kinetic mechanism for modulation of the activity of microsomal UDP-glucuronosyl transferase by phospholipids. J. Biol. Chem. 256: 4783-4788.
- Kitchin, K.T., 1982. Failure of phenobarbital to induce rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyl transferase toward phenolphthalein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 109: 709-715.
- Roth, S. y J.B.F. Levine, 1983. A new assay and cellular localization for an inducible glucuronosyl transferase in the embryonic chick liver. Exp. Cell. Res. 143: 217-225.
- Singh, O.M.P., A.B. Graham y G.C. Wood, 1981. The phospholipid-dependence of UDP-glucuronosyl transferase. Purification, delipidation and reconstitution of microsomal enzyme from guinea-pig liver. Eur. J. Biochem. 116: 311-316.
- Van Laere, A.L., A.R. Carlier y J.A. Van Assche, 1977. Cell wall carbohydrates in *Phycomyces blakesleeianus* Burgeff. Arch. Microbiol. 112: 303-306.
- Watkins, J.B. y C.D. Klaassen, 1982. Induction of UDP-glucuronosyl transferase activities in guinea, heterozygous, and wistar rat livers by pregnenolone-16  $\alpha$ -carbonitrile. Amer. Soc. Pharmacol. Exp. Ther. 10: 590-594.
- Yost, G.S. y B.L. Finley, 1983. Ethanol as an inducer of UDP-glucuronosyl transferase: A comparison with phenobarbital and 3-methylcholanthrene induction in rabbit hepatic microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 111: 219-223.