

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal



TESIS DOCTORAL

**Composición, estructura y fisiología de la producción de un
polisacárido extracelular producido por *Aspergillus*
*Nidulans***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Pilar Rupérez Antón

Madrid, 2015

María Pilar Rupérez Antón

TP
1992
024



X-53-013785-1

COMPOSICION, ESTRUCTURA Y FISILOGIA DE LA PRODUCCION
DE UN POLISACARIDO EXTRACELULAR PRODUCIDO POR ASPERGILLUS
NIDULANS

Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1982



BIBLIOTECA

© M^a Pilar Rupérez Antón
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-36662-1981

Autor: MARIA PILAR RUPEREZ ANTON

COMPOSICION, ESTRUCTURA Y FISILOGIA DE LA
PRODUCCION DE UN POLISACARIDO EXTRACELULAR
PRODUCIDO POR ASPERGILLUS NIDULANS

Director: Juan Antonio Leal Ojeda
Doctor en Farmacia, Ph. D. por la Universidad
de Hull.
Investigador científico del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Fisiología Vegetal
Año 1979

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. J.A. Leal Ojeda, Investigador Científico, Jefe de la Sección de Ecología Microbiana del Instituto de Inmunología y Biología Microbiana del C.S.I.C., bajo cuya dirección se ha realizado este trabajo, por sus continuas orientaciones y enseñanzas.

También deseo expresar mi mayor agradecimiento:

- Al Prof. Dr. Carlos Vicente Córdoba por su amabilidad al revisar esta Tesis Doctoral y aceptar ser ponente de la misma.
- A mis compañeros de laboratorio por su desinteresada colaboración.
- A la Dra. Bellanato del Instituto de Optica Daza Valdés por su ayuda y consejo en los espectros infrarrojos.
- Al Dr. Ramírez del Instituto Jaime Ferrán del C.S.I.C. por los aislamientos 1071 y 1701 de Aspergillus nidulans.
- Al Instituto de Inmunología y Biología Microbiana del C.S.I.C., por las facilidades dadas para realizar este trabajo.

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de una beca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

INDICE

INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	21
I.- <u>Microorganismo</u>	21
II.- <u>Medios de cultivo</u>	21
1.- Medio de mantenimiento	21
2.- Medio para la producción de polisacárido	21
III.- <u>Aislamiento y purificación del polisacárido</u>	22
1.- Aislamiento	22
2.- Purificación	23
a) Fraccionamiento del polisacárido por precipitación con sales de amonio cuaternario	23
b) Fraccionamiento del polisacárido con metanol	24
IV.- <u>Análisis químico</u>	24
1.- Determinación de carbohidratos totales..	24
2.- Determinación de proteína total	25
3.- Determinación del ion fosfato	26
4.- Determinación de aminoazúcares	27
5.- Determinación de N-acetilglucosamina ...	29
6.- Determinación de azúcares reductores ...	30
7.- Determinación de ácido hexurónicos	31

8.- Determinación del ion sulfato	32
9.- Determinación de grupos acetilo	33
a) Determinación de acetilo total	33
b) Determinación de O-acetilos	36
10.- Análisis de aminoazúcares y aminoácidos	36
11.- Determinación de nitrógeno	36
12.- Análisis elemental	39
V.- <u>Análisis estructural</u>	40
1.- Hidrólisis	40
a) Hidrólisis enzimática	40
b) Hidrólisis química	41
2.- Cromatografía en papel	42
3.- Oxidación del polisacárido con periodato sódico	44
a) Valoración de ácido fórmico en la mezcla de oxidación con periodato sódico	48
b) Determinación de formaldehído en la mezcla de oxidación con periodato sódico	48
4.- Reducción e hidrólisis del polisacárido oxidado con periodato sódico (degrada- ción de Smith)	49
5.- Espectros infrarrojos	51
VI.- <u>Obtención de paredes celulares a partir de micelio de Aspergillus nidulans</u>	51

VII.- <u>Valoración de enzimas en el líquido de cultivo de <i>Aspergillus nidulans</i></u>	52
1.- Precipitación de enzimas del líquido de cultivo	52
a) Acido tánico al 1%	52
b) Sulfato amónico al 60%	52
c) Etanol al 50%	52
d) Acetona al 30%	53
2.- Preparación de tampón borato-citrato-fosfato	53
3.- Actividades enzimáticas valoradas en el líquido de cultivo	53
4.- Extracción con piridina de los azúcares resultantes de la hidrólisis enzimática, para cromatografía en papel	55
Aparatos utilizados y productos	58
RESULTADOS	59
I.- <u>Caracterización del polisacárido extracelular de <i>Aspergillus nidulans</i></u>	59
1.- Análisis químico	59
2.- Análisis estructural	65
a) Oxidación con periodato sódico del polisacárido. Valoración de ácido fórmico y formaldehído en la mezcla de oxidación. Degradación de Smith. Identificación de los productos resultantes por cromatografía en papel	65

b) Espectroscopía infrarroja del polisacárido	67
c) Hidrólisis enzimática del polisacá- rido y actividades enzimáticas en el líquido de cultivo de <u>A. nidulans</u> ...	70
II.- <u>Fraccionamiento del polisacárido</u>	71
1.- Precipitación con bromuro de cetiltri- metilamonio al 5% (p/v)	71
2.- Precipitación con metanol	73
III.- <u>Solubilidad del polisacárido</u>	78
1.- Tratamiento con agua destilada a tempe- ratura ambiente	78
2.- Tratamiento con HCl 1N a temperatura ambiente	79
3.- Tratamiento con NaOH 1N a temperatura ambiente	82
4.- Composición de las fracciones de polisa- cárido obtenidas por tratamiento con agua destilada, HCl 1N y NaOH 1N	82
IV.- <u>Fisiología de la producción del polisacárido</u>	84
1.- Efecto de las condiciones de cultivo ...	84
a) Formación en cultivos sumergidos	84
b) Formación en cultivos estáticos: rela- ción superficie/volumen	84

2.- Efecto de la fuente de carbono	87
a) Efecto de la concentración de glucosa	87
b) Utilización de distintos azúcares ...	87
3.- Efecto de la fuente de nitrógeno	87
a) Utilización de distintas fuentes de nitrógeno	87
b) Adición de succinato a los medios con leucina o valina	99
c) Sustitución del 50% de la fuente nitrogenada por casaminoácidos	99
d) Efecto de la concentración de casaminoácidos	107
e) Efecto de la concentración de asparagina	115
4.- Efecto de la tiamina	115
5.- Efecto de la concentración del ion fosfato	115
6.- Efecto del pH inicial del medio de cultivo	118
V.- <u>Efecto del tiempo de incubación y de la fuente de nitrógeno en la composición del polisacárido</u>	130
VI.- <u>Producción de polisacárido por distintos aislamientos de Aspergillus nidulans</u>	134
VII.- <u>Composición de la pared celular de Aspergillus nidulans</u>	138

DISCUSION	144
CONCLUSIONES	153
BIBLIOGRAFIA	157

INTRODUCCION

El contenido de carbohidratos de los tejidos vivos se encuentra principalmente en la forma de polisacáridos (Horton y Wolfrom, 1963a).

Los polisacáridos son polímeros de elevado peso molecular formados a partir de n monosacáridos por eliminación de $n-1$ moléculas de agua. Cada enlace glicosídico entre dos monosacáridos implica la eliminación de una molécula de agua entre el grupo hidroxilo de la forma hemiacetal de un monosacárido (átomo de carbono reductor), y el grupo hidroxilo de cualquier otro átomo de carbono del segundo monosacárido (Bailey, 1965).

Los monosacáridos responden a la fórmula empírica $(CH_2O)_n$, y están constituidos por cadenas de átomos de carbono de longitud variable ($n \geq 3$), clasificándose según el número de estos átomos en la molécula en triosas, tetrosas, pentosas, etc., siendo el azúcar de mayor número de carbonos aislado de fuentes naturales una octosa (D-glicero-D-manooctulosa) (Percival, 1963).

La mayoría de los monosacáridos no están ramificados y pueden definirse como cadenas rectas de polihidroxi aldehidos (aldosas) o cetonas (cetosas); las aldosas tienen el grupo carbonilo en el átomo de carbono uno (C-1) y las cetosas en el C-2, estando hidroxilados los restantes átomos de carbono.

Esterequímicamente todos los azúcares se pueden relacionar con el D- 6 L-gliceraldehido, haciendo referencia estos símbolos a la posición relativa del grupo hidroxilo

unido al átomo de carbono segundo asimétrico. En los azúcares es la configuración del átomo de carbono asimétrico con numeración más alta la que define la serie configuracional a la cual pertenece un azúcar determinado. Las formas D- son las más frecuentes en la naturaleza (Percival, 1963).

Aunque los azúcares han sido considerados durante mucho tiempo compuestos de cadena abierta, es dudoso que alguna vez existan libres y sin sustituir en este estado, excepto en cantidades traza en solución. Así, los azúcares que poseen cadenas de 5 ó más átomos de carbono pueden formar anillos estables de seis miembros (anillo de piranosa) o de cinco (anillo de furanosa). Estos son hemiacetales cíclicos que poseen un átomo de carbono asimétrico adicional en el C-1 (C-2 en cetosas), pudiendo por tanto existir en dos formas isómeras denominadas α y β (Percival, 1963).

La hexosa más abundante en los polisacáridos es la D-glucosa, pero también son frecuentes la D-manosa, D-fructosa y D-galactosa; la L-galactosa se encuentra sólo ocasionalmente. Dentro de las pentosas la D-xilosa y L-arabinosa son comunes, mientras que la D-arabinosa es menos frecuente (Horton y Wolfrom, 1963b).

Las unidades estructurales de los polisacáridos no están limitadas únicamente a las aldosas o cetosas sencillas, sino que pueden incluir aminoazúcares y ácidos urónicos.

Los ácidos urónicos más frecuentes son los ácidos D-glucurónico y D-galacturónico. Los aminoazúcares más frecuentes son la D-glucosamina y D-galactosamina. Los polisa-

cáridos que contienen aminoazúcares, aunque poco frecuentes en las plantas superiores, se encuentran ampliamente repartidos en el Reino Animal y en las plantas saprofitas. Es quizás significativo que aquellas formas de vida que tienen abundancia de nitrógeno en su dieta alimenticia, utilicen azúcares nitrogenados en sus procesos metabólicos, mientras que las plantas superiores, que viven en un medio a menudo escaso en nitrógeno para la síntesis de proteínas vitales, utilizan azúcares no nitrogenados casi exclusivamente (Horton y Wolfson, 1963a).

El grupo amino de los polisacáridos que contienen aminoazúcares se encuentra generalmente acetilado. Los grupos hidroxilo en ciertos polisacáridos pueden estar parcialmente esterificados o esterificados por distintos sustituyentes. Algunos polisacáridos pueden presentar grupos sulfato, como por ejemplo los sulfatos de condroitina A, B y C y el queratosulfato, presentes en el tejido conectivo de animales superiores, o los carrageenanos de las algas Rodofceas; es curioso destacar que el grupo sulfato no aparece como sustituyente en los polisacáridos de origen microbiano ni de plantas superiores (Kirkwood, 1974; Sandford, 1979). Otros polisacáridos presentan grupos fosfato (Jeanes y col., 1961; Slodki y col., 1970) o sustituyentes O-acilo derivados de los ácidos acético (Lilly y col., 1958; Cadmus y col., 1963; Gorin y Spencer, 1963; Sloneker y col., 1964, Gasdorf, y col., 1965; Slodki y col., 1966 a y b; Carlson y Matthews, 1966; Linker y Jones, 1966; Slodki y col., 1970; Humphrey y col., 1974), fórmico (Sutherland, 1970), malónico (Kohama y col., 1974; Fujimoto y col., 1969; Raistrick y Rintoul, 1931), pirúvico

(Wheat y col., 1965), succínico (Harada, 1965), málico (Leal-Serrano y col., en prensa), etc.

Es importante notar que los azúcares constituyentes, los radicales acilo sustituyentes y los tipos de enlaces en tre ellos, son los que determinan la conformación y propieda des específicas de cada polisacárido (Sandford, 1979).

Debido a la diversidad de monosacáridos que pueden formar parte de los polisacáridos, a las numerosas posibili dades de los enlaces interglicosídicos ($1 \rightarrow 2$, $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$, $1 \rightarrow 5$ ó $1 \rightarrow 6$) y a la configuración espacial del carbono carbonílico (α ó β), no resulta difícil comprender la gran cantidad de polisacáridos distintos que pueden en contrarse en la naturaleza. Estas posibilidades además se ven aumentadas, ya que los polisacáridos pueden formar es tructuras de orden superior dependiendo de las conformaciones de los residuos de azúcar componentes, del peso molecular y de los puentes de hidrógeno inter- e intracatenarios.

Los polisacáridos se encuentran ampliamente distri buidos en los Reinos Animal y Vegetal, donde funcionan ge neralmente como sustancias de reserva o de sostén. Estos dos principales grupos biológicos de polisacáridos exhiben notables diferencias en sus propiedades físicas generales. Los polisacáridos de sostén poseen fuertes enlaces de hi drógeno intermoleculares, son bastante insolubles en agua y se hinchan poco en contacto con ésta. En los polisacá ridos de reserva debido a la falta de enlaces de hidróge no intermoleculares, los grupos hidroxilo de la molécula están libres para formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, permitiendo así la rápida dispersión de

las macromoléculas en un medio acuoso (Horton y Wolfrom, 1963b).

Dentro de los polisacáridos que actúan como sustancia de reserva se encuentran: almidón, glucógeno y dextranos. El almidón actúa como sustancia de reserva en plantas, depositándose en forma de grandes gránulos en el citoplasma celular. El glucógeno es un polisacárido de reserva de tejidos animales, abundando especialmente en el hígado y músculo, en cuyas células se deposita en forma de gránulos en el citoplasma. Los dextranos se encuentran como polisacáridos de reserva en levaduras y bacterias. Almidón, glucógeno y dextranos son polímeros exclusivamente de glucosa, que difieren unos de otros en el tipo de enlace glicosídico existente entre las unidades de glucosa y en el grado de ramificación.

Dentro de los polisacáridos que tienen función de sostén en animales y plantas se pueden distinguir dos tipos: los polisacáridos que forman parte de la matriz de las estructuras de sostén, y los que forman parte de las fibras de dichas estructuras. La matriz resiste la compresión y el material fibroso resiste la tensión (Kirkwood, 1974).

Los polisacáridos que forman parte de la matriz de las estructuras de sostén son: Pectina y hemicelulosas (plantas superiores), carrageenanos, fucoidano, porfirano, ácido algínico y agar (algas), ácido hialurónico, condroitina, sulfatos de condroitina, A, B y C y querato-sulfato (animales superiores), etc. (Kirkwood, 1974).

Pectina y hemicelulosas se encuentran en la matriz que une las fibrillas de celulosa de la pared de plantas superiores. La pectina es un polisacárido ácido, mientras que las hemicelulosas son un grupo heterogéneo de polisacáridos neutros (Towle y Whisler, 1973).

Los seis principales polisacáridos de los tejidos conectivos de animales superiores son: ácido hialurónico, condroitina, sulfatos de condroitina A, B y C y querato-sulfato. Un estudio sistemático de los tipos y cantidades de mucopolisacáridos ácidos que aparecen en muchos tejidos y fluidos ha sido realizado por Meyer y col., (1956). En todos estos polisacáridos existe una unidad disacáridica compuesta por un aminoazúcar N-acetilado y un ácido urónico (excepto el querato-sulfato que posee un azúcar neutro) que se repite a lo largo de la cadena. Todos ellos poseen grupos sulfato, excepto el ácido hialurónico y la condroitina.

Los carrageenanos, polisacáridos sulfatados presentes en algas marinas Rodofíceas, también poseen una unidad disacáridica compuesta por galactosa, que se repite a lo largo de la cadena, estando enmascarada por grupos sulfato o por la formación de 3,6-anhidridos (Rees y col., 1969). El fucoidano es un polímero de L-fucosa sulfatada. El porfirano es similar a los carrageenanos pero con distinto tipo de sustituyentes. El agar no es un polisacárido sulfatado pero posee muchas características estructurales comunes con los carrageenanos. El ácido algínico es producido por las algas Feofíceas y aparece en la pared celular como sus sales cálcicas y magnésicas.

Dentro del grupo de polisacáridos que componen la fase fibrosa de las estructuras de sostén están: celulosa, xilanos y quitina.

La celulosa es el principal componente estructural de las paredes celulares de plantas superiores, encontrándose también en algunos hongos, algas e invertebrados inferiores, casi siempre como material extracelular. Se trata de un polímero de la D-glucosa con uniones β -1,4.

Muchas algas poseen polisacáridos fibrosos, distintos a la celulosa, en sus paredes celulares, tales como los xilanos, que son polímeros de la D-xilosa con uniones β -1,3 (Frei y Preston, 1961).

La quitina es un homopolímero de la N-acetil-D-glucosamina con uniones β -1,4. Está muy relacionado estructuralmente con la celulosa, y sirve como una alternativa a la celulosa en los niveles evolucionarios más bajos del Reino Animal (Kirkwood, 1974). Es uno de los constituyentes más importantes de la pared celular de muchos hongos (Foster, 1949), y un elemento estructural principal del exoesqueleto de insectos y crustáceos (Richards, 1951).

Entre los polisacáridos que pueden formarse a partir de los diferentes monosacáridos, celulosa y quitina forman las estructuras más rígidas, y por tanto no es sorprendente que sean los polisacáridos estructurales más importantes de la naturaleza (Kirkwood, 1974).

Además de las funciones de reserva y sostén, los polisacáridos realizan muchas otras funciones en la naturaleza, menos conocidas, pero no por ello menos importantes.

Desde el punto de vista inmunológico son varios los aspectos en que el estudio de polisacáridos tiene una gran importancia.

Las sustancias responsables de la especificidad serológica de los grupos sanguíneos son principalmente carbohidratos que se encuentran en la superficie de los eritrocitos. Estas sustancias son antigénicas ya que inducen la formación de anticuerpos cuando los eritrocitos, conteniendo una sustancia de grupo sanguíneo determinada, son introducidos parenteralmente en individuos que no poseen esta misma sustancia de grupo sanguíneo.

Al hacer la hidrólisis ácida suave de estas sustancias, se liberan oligosacáridos con pérdida de la actividad de grupo sanguíneo. El reciente aislamiento de un cierto número de oligosacáridos inmunológicamente activos, a partir de tales hidrolizados, ha mostrado que la actividad inmunológica está asociada con la porción de carbohidratos de las sustancias de los grupos sanguíneos. Los monosacáridos identificados en estas sustancias han sido: L-fucosa, D-galactosa, 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa y 2-acetamido-2-deoxi-D-galactosa (Brimacombe y Webber, 1964).

Actualmente tienen un gran desarrollo los trabajos sobre polisacáridos presentes en la pared celular bacteriana debido a sus propiedades antigénicas, ya que son capaces de inducir la formación de anticuerpos tanto en el hombre como en animales. En este sentido es interesante la

revisión realizada por Jann y Jann (1977a).

En el tejido circulatorio de mamíferos se encuentra un polisacárido químicamente único, la heparina, que posee importantes propiedades biológicas, ya que actúa como agente anticoagulante y antilipémico. La heparina contiene cantidades equimoleculares de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, y se distingue por tener los aminoazúcares principalmente N-sulfatados, aunque posee también algunos N-acetilados, y por su alto contenido en O-sulfato. Posee enlaces glicosídicos con configuración α . En condiciones normales no existe en el cuerpo en estado libre, sino que está unida firmemente a proteínas del tejido (Brimacombe y Webber, 1964).

Una gran cantidad de polisacáridos procedentes de diversas fuentes (hongos, líquenes, levaduras, bacterias, plantas, algas, etc.) parecen poseer actividad antitumoral (Whistler y col., 1976). Estos polisacáridos difieren grandemente en su composición y por consiguiente en su estructura química y física.

Se sabe desde hace más de un siglo, que los tumores malignos humanos algunas veces sufren regresión después de una infección bacteriana aguda (Whistler y col., 1976).

El primer polisacárido antitumoral estudiado fue aislado en 1943 a partir de Serratia marcescens y se conoce como el "polisacárido de Shear" (Shear y Turner, 1943).

Aunque es difícil establecer relaciones entre estructura y actividad antitumoral en los polisacáridos complejos, se pueden establecer algunas relaciones comparando

el comportamiento de los polisacáridos más simples, y especialmente los homopolisacáridos.

En general se puede concluir que los D-glucanos solubles son agentes antitumorales, sobre todo si son principalmente lineales y si no son hidrolizados rápidamente por los D-glucanasas humorales. Así, los β -glucanos son antitumorales ya que no existen en el hombre β -glucanasas humorales, mientras que los α -glucanos, sobre todo si son α -1,4, no lo son ya que pueden ser hidrolizados por las amilasas humorales. Por otra parte, dentro de los β -glucanos los que poseen enlaces 1 \rightarrow 6 son agentes antitumorales menos efectivos que los que poseen enlaces 1 \rightarrow 3, y los que tienen un peso molecular elevado son más efectivos que los de bajo peso molecular (Whistler y col., 1976).

La desacetilación de los polisacáridos disminuye la actividad antitumoral, y la sustitución de los grupos O-acetilo por O-metilo o la completa acetilación del polisacárido, da lugar a productos inactivos (Nishikawa y col., 1969).

La naturaleza de la acción antitumoral de los polisacáridos no ha sido aún esclarecida, pero ciertos polisacáridos bacterianos pueden atacar directamente tumores, como se pone de manifiesto por la hemorragia intratumoral y necrosis resultantes. La mayoría de los polisacáridos aislados de otras fuentes no ejercen una acción directa sobre las células tumorales; su acción antitumoral debe, por tanto, considerarse dependiente de la reacción del huésped. Es posible que en algunos casos estos dos tipos de acción puedan estar superpuestos (Whistler y col., 1976).

Actualmente se reconoce que las caries son causadas por ácidos orgánicos, que son producidos por bacterias orales a partir de carbohidratos fermentables (Sidebotham, 1974).

No existe ninguna duda de que los dextranos están implicados en el desarrollo de la caries dental inducida por sacarosa, aunque el papel exacto que estos polisacáridos juegan en el proceso cariogénico es, por el momento, incierto.

Las evidencias obtenidas sugieren que los dextranos promueven la caries dental al facilitar la colonización de bacterias cariogénicas en la superficie del diente, y a través de su presencia como componentes estructurales, o carbohidratos de reserva, en placas cariogénicas. Estos estudios han llevado a la preparación de una vacuna para prevenir la caries.

Recientemente han sido propuestas una serie de funciones (Dudman, 1977) para los exo-polisacáridos microbianos, entre las que caben destacar las siguientes: protección contra la desecación y depredación, intervención en interacciones iónicas, importancia en la adhesión de microorganismos del suelo y de ciertos medios acuosos, participación en sistemas de desarrollo tales como los presentes en Mixobacterias, intervención en la virulencia de bacterias, barreras generales frente al medio, etc.

Desde el punto de vista industrial y comercial, la importancia de los polisacáridos aumenta día a día. Los polisacáridos que forman soluciones viscosas se emplean co-

mo agentes floculantes, agentes gelificantes, ingredientes bajos en calorías para alimentos dietéticos, films para recubrir y empaquetar alimentos, etc. Además los polisacáridos pueden ser transformados en adhesivos, láminas o fibras similares al nylon y en tejidos (Yuen, 1974).

Los microorganismos producen una gran variedad de polisacáridos, desde los más sencillos homopolisacáridos tales como celulosa, almidón y dextrano, que contienen un sólo monosacárido sencillo que se repite a lo largo de la cadena, hasta los heteropolisacáridos más complejos que pueden contener cinco monosacáridos diferentes. Además estos polisacáridos pueden aparecer formando complejos con lípidos o bien estar unidos a proteínas mediante enlace peptídico (Barker, 1963).

Se conocen más de 75.000 especies distintas de hongos y varios polisacáridos están a menudo asociados con cada especie, siendo estos polisacáridos fúngicos en la mayoría de los casos estructuralmente diferentes de los obtenidos de otras fuentes naturales.

Es por tanto poco sorprendente que se descubran con frecuencia nuevos polisacáridos, especialmente en vista de las técnicas utilizadas actualmente para la resolución de mezclas (Gorin y Spencer, 1968).

Los polisacáridos fúngicos pueden encontrarse en el citoplasma, en la pared celular o bien ser excretados al medio de cultivo (Foster, 1949). Hay evidencias que sugieren una conexión estructural entre las paredes celulares y el polisacárido que es producido extracelularmente (Buck y col., 1968). Probablemente hay un sistema de prioridades dentro

de la célula, sintetizándose primero los polisacáridos constituyentes de la pared celular y después los exopolisacáridos (Sutherland, 1977).

La síntesis de exopolisacáridos es aparentemente dependiente, al menos en muchas bacterias, de la disponibilidad de un lípido portador isoprenoide. En la síntesis del pullulano, polisacárido extracelular producido por el hongo levaduriforme Pullularia pullulans, también parece que interviene un lípido portador (Taguchi y col., 1973).

La relación entre la pared celular de los hongos y los polisacáridos exocelulares requiere un estudio más detallado a la vista de recientes trabajos que sugieren que ambos son sintetizados por un sistema enzimático común (Bull, 1972).

Químicamente la pared celular de los hongos está constituida por un 80 a 90% de polisacáridos, siendo el resto principalmente proteínas y lípidos.

Físicamente su pared celular está constituida por microfibrillas entrecruzadas, embebidas en una matriz amorfa. Los polisacáridos componentes de las microfibrillas de las paredes de la inmensa mayoría de los hongos son celulosa ó quitina, mientras que las sustancias que unen entre sí los diferentes componentes estructurales de la pared para formar complejos macromoleculares, son proteínas y varios tipos de polisacáridos entre los que están: glucanos, mananos, galactanos y heteropolisacáridos (Bartnicki-García, 1968).

Se han encontrado al menos once monosacáridos distintos formando parte de los polisacáridos de la pared celular de los hongos, pero sólo tres: D-glucosa, N-acetil-D-glucosamina y D-manosa, se encuentran en todos los hongos, aunque su proporción relativa varía enormemente de un microorganismo a otro. El resto de los monosacáridos se encuentran con menos frecuencia y con una distribución característica

entre ciertos grupos de hongos: D-galactosa y D-galactosamina en Ascomicetos, L-fucosa en Mucorales y Basidiomicetos, y ácido D-glucurónico en Mucorales y Ascomicetos. Ocasionalmente se han encontrado pequeñas cantidades de ramnosa, ribosa y arabinosa, aunque el papel de éstos azúcares minoritarios es incierto.

Existe una relación muy estrecha entre la composición química de la pared celular y los grupos taxonómicos principales elaborados sobre la base de criterios morfológicos. Así, los hongos pueden ser subdivididos en varias categorías según la naturaleza química de sus paredes teniendo en cuenta combinaciones duales de aquellos polisacáridos que parecen ser los principales componentes de las paredes vegetativas (Bartnicki-García, 1968).

La mayoría de los hongos, incluyendo todas las formas con micelio septado típico (Ascomicetos, Basidiomicetos y Deuteromicetos) tienen su pared celular compuesta por quitina y glucano. Este glucano no está completamente caracterizado pero probablemente posee enlaces β -1,3 y β -1,6.

El contenido de quitina de la pared celular oscila ampliamente desde Schizophyllum commune que posee un 3-5%, hasta Allomyces macrogynus o Sclerotium rolfsii, que poseen alrededor del 60% (Bloomfield y Alexander, 1967).

El tratamiento de la quitina con álcali concentrado da lugar a una mezcla de polímeros de glucosamina parcial o completamente desacetilados, que recibe el nombre de quitosano (Distler y Roseman, 1960). Algunos autores han sugerido que el quitosano existe en la naturaleza ya que por extracción ácida del micelio de Phycomyces blakesleeanus se obtuvo un material que mostró un modelo de difracción de rayos x similar al

obtenido para el clorhidrato de quitosano (Kreger, 1954).

Sorprendentemente y a pesar de la similitud entre la D-glucosamina y la D-galactosamina los polímeros de galactosamina puros son raros en la naturaleza y se encuentran casi siempre como componentes minoritarios de la pared celular de los Ascomicetos (Distler y Roseman, 1960; Harold, 1962; Crook y Johnston, 1962; Mahadevan y Tatum, 1965; Applegarth, 1967; Applegarth y Bozoian, 1967; Bartnicki-García, 1968; Bull, 1970). Excépciones a esto han sido descritas en muy pocas ocasiones. A continuación se citan por orden cronológico los polímeros fúngicos de galactosamina descritos en la bibliografía.

Blumenthal y col., en 1955 describieron la acumulación en el medio de cultivo de Aspergillus parasiticus de un material viscoso que contenía hexosamina no dializable, siendo caracterizado este material cinco años más tarde por Distler y Roseman (1960) como un polisacárido compuesto por residuos de galactosamina y N-acetil-galactosamina en la proporción 2:1, al que denominaron "galactosaminoglicano". A diferencia de la quitina, este polímero completamente acetilado era soluble en NaOH al 10% en caliente. Su rotación óptica positiva indicaba la existencia de enlaces glicosídicos de tipo α . Estos autores encontraron también galactosamina, asociada con el micelio de Aspergillus parasiticus, como un componente de la pared celular insoluble en ácido y no dializable. Después de la N-acetilación química del galactosaminoglicano, el producto tenía la misma solubilidad que el componente del micelio que contenía galactosamina. De once hongos estudiados, estos autores encontraron galactosamina en el micelio de seis, en concentraciones variables:

4% en A. parasiticus, 2,7% en A. oryzae, 2,3% en A. niger, 1,1% en Helminthosporium sativum, 0,6 y 0,4% en Neurospora tetrasperma y N. crassa, y 0,2% en Rhizopus sp. El contenido en galactosamina del micelio de A. parasiticus variaba con la edad del cultivo disminuyendo al envejecer éste. Este es el primer trabajo que aparece en la bibliografía de un polímero extracelular de N-acetil-D-galactosamina producido por un hongo.

Posteriormente Harold (1962) encontró un polímero de galactosamina en la pared celular de Neurospora crassa, el cual parecía responsable de la formación de un complejo, posiblemente de polifosfato, cuando se incubaba el micelio de este hongo con fosfato inorgánico.

La pared celular de una estirpe de Penicillium stoloniferum infectada por un virus estaba compuesta aproximadamente por partes iguales de glucosamina y galactosamina (Buck y col., 1969). Las paredes celulares de esta estirpe poseían de 18 a 45 veces más galactosamina que las estirpes no infectadas por virus.

Mc Cormick y col., (1970) aislaron y caracterizaron de la pared de las esporas y esférulas de Physarum polycephalum un polisacárido compuesto por un 80% aproximadamente de galactosamina; estos autores concluyeron que si éste es una característica general de los Mixomicetos o de algunos grupos de ellos, los situaría en un grupo taxonómico único, ya que los diferenciaría de los hongos que contienen polímeros de tipo-glucosamina (quitina y quitosano), como el principal material de la pared. También los diferenciaría de los Mixomicetos que poseen celulosa y glucogéno como constituyentes de la pared (Ward y Wright, 1965).

Las paredes de las esférulas de Physarum polycephalum han sido reexaminadas posteriormente por Farr y col., (1977), quienes han encontrado galactosamina (88% como galactosamina anhidra) como principal componente y una pequeña proporción de grupos acetilo (0,5%). Los estudios de metilación de este polisacárido indicaron que se trataba de un galactosaminoglicano de cadena larga unido exclusivamente por enlaces 1 → 4 y sin grupos fosfato. La rotación óptica específica de este polisacárido $[\alpha]_D^{25} + 118^\circ$ (6M HCl), indicó que los residuos de galactosamina tenían configuración $-\alpha$. En contraposición a los resultados de Mc Cormick y col., (1970), este galactosaminoglicano no era soluble en HCl 1M, y sólo se solubilizó en HCl 6M. La razón de esta diferencia no se conoce, pero puede ser atribuida o bien a una pureza menor del polisacárido aislado por Mc Cormick y colaboradores, o bien a un diferente modo de unión de las unidades de galactosamina.

Neurospora crassa puede excretar al medio de cultivo un homopolímero de elevado peso molecular conteniendo galactosamina parcialmente acetilada (Reissig, 1968; Reissig y Glasgow, 1971), que es similar al extraído de la pared celular de las hifas vegetativas de este microorganismo (Distler y Roseman, 1960; Harold, 1962; Reissig y Glasgow 1971). Este polisacárido extracelular inhibe el crecimiento del hongo, causa vacuolización y aglutinación de sus células, y precipita su proteína de membrana purificada. Su peso molecular es aproximadamente 10^6 ; cuando se acetila totalmente pierde sus actividades biológicas.

La cantidad de galactosamina en la pared celular varía con factores genéticos (Gratzner, 1972; Livingston, 1969; Trevithick y col., 1966).

Los polímeros conteniendo galactosamina y galactosa son todavía menos frecuentes que los que sólo contienen galactosamina.

White y Sussman (1963) encontraron un heteropolímero formado por un 54% de galactosa, un 25% de galactosamina y un 9% de ácido galactúronico en los sorocarpos de Dictyos-
telium discoideum; polisacáridos similares han sido descritos en otras especies de este Mixomiceto tales como D. muco-
roides y D. purpureum, así como en Polysphondilium viola-
ceum.

Trotter y Whisler (1965) encontraron evidencias cromatográficas de polímeros de galactosamina (30%) y de galactosa (10%) en la pared celular del Trichomiceto Amoebidium
parasiticum, no encontrando evidencias de quitina, ni de celulosa.

Gorin y Eveleigh (1970) aislaron del líquido de cultivo de Aspergillus nidulans un polisacárido compuesto por N-acetil-D-galactosamina y D-galactosa en la proporción 1:1,8, al que denominaron "2-acetamido-2-deoxi-D-galacto-D-galactano". Las unidades de azúcar estaban distribuidas al azar en la cadena, no siendo detectadas cantidades apreciables de unidades de N-acetil-D-galactosamina consecutivas. La proporción de galactosa a N-acetil-D-galactosamina se mantuvo constante en el polisacárido durante el periodo de incubación, por lo que parecía tratarse de un heteropolímero. Se le asignó configuración α , ya que mostró una ro

tación específica positiva alta. Según los resultados de la oxidación con periodato y posterior degradación de Smith, las unidades de hexosa y hexosamina estaban unidas por enlaces 1 → 4.

Bardalaye y Nordin (1976) aislaron por extracción alcalina de las paredes de las hifas de Aspergillus niger, (crecido en cultivo en superficie) un heteropolisacárido al que denominaron "galactosaminogalactano", cuya composición en peso determinada por cromatografía en papel y de gases y por análisis colorimétricos era galactosa 70%, galactosamina 20%, glucosa 6% y acetilo 1%. Los cálculos realizados a partir del % de acetilo, indicaban que alrededor del 20% de la galactosamina estaría N-acetilada. Los resultados de la degradación de Smith, metilación, desaminación oxidativa con ácido nitroso y rotación óptica, indicaron que el galactosaminogalactano era un polímero lineal cuyas unidades de hexopiranosas estaban unidas casi exclusivamente por enlaces α -(1 → 4). La hexosamina estaría distribuida al azar en la cadena, y el grado de polimerización sería alrededor de 100. El galactosaminogalactano representó alrededor del 0,6 a 0,8% del peso seco de la pared de las hifas. Era insoluble en agua, álcali 1N caliente, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y urea 8M, pero se disolvió lentamente en cloruro de guanidinio 6M. El modelo de difracción de rayos X obtenido para el galactosaminogalactano de A. niger indicaba una estructura no cristalina para las cadenas del polímero.

En nuestro laboratorio se observó una alta viscosidad en el medio de cultivo del hongo filamentoso Aspergillus nidulans en un experimento inicial. La alta viscosidad difi

cultaba la filtración a través de la tela de algodón, utilizada para separar el micelio del líquido de cultivo, e indicó la presencia de un polímero de elevado peso molecular. Un polisacárido extracelular fue aislado del medio de cultivo al añadir etanol o metanol (v/v), resultando ser un polímero bastante puro de galactosamina parcialmente acetilada y galactosa, unidas por enlaces α -1,3 predominantemente, lo que le diferenciaba del galactosaminogalactano α -1,4, descrito por Gorin y Eveleigh (1970).

El objeto de esta Tesis es el estudio de la composición, estructura y fisiología de la producción de este polisacárido extracelular de A. nidulans. El galactosaminogalactano descrito en este trabajo y los descritos previamente constituyen una nueva clase de polisacáridos fúngicos.

Su posible interés comercial dependerá de sus características de viscosidad y otras propiedades reológicas, ya que las diferencias existentes en la composición química de polisacáridos potencialmente útiles, junto con las diferencias encontradas en polímeros excretados por distintos aislamientos de la misma especie, hacen imposible predecir las propiedades físicas de un polisacárido nuevo (Sutherland, 1972).

Clasificación de Aspergillus nidulans

División : Eumycota
Subdivisión : Ascomycotina
Clase : Plectomycetes
Orden : Eurotiales
Familia : Eurotiaceae
Género : Aspergillus (sinónimo de Emericella en la fase
ascospórica o estado perfecto).
Especie: A. nidulans (sin. E. nidulans).

Actualmente se aplica el género Emericella a todos los Eurotiales del grupo Aspergillus que poseen cleistotecios rodeados por una masa de células de Hülle. Dentro de este grupo se encuentra Aspergillus nidulans que tiene cleistotecios de color rojizo o púrpura rodeados por hifas estériles y células de Hülle (Ainsworth, 1973).

MATERIALES Y METODOS

I.- MICROORGANISMO

Se ha utilizado el hongo filamentoso Aspergillus nidulans Eidam (Wint.) n°2544 de la Colección Española de Cultivos Tipo. Otros aislamientos utilizados de A. nidulans han sido los n°1701 y 1071 de la colección del Dr. Ramírez.

II.- MEDIOS DE CULTIVO

1.- Medio de mantenimiento. El microorganismo se mantuvo en tubos inclinados preparados con el medio Bacto patata dextrosa agar (Difco) 39 g/l y extracto de levadura (Difco) 1 g/l, pH final 5,6. Los cultivos se incubaron a 25°C[±] 1.

2.- Medio para la producción de polisacárido. El medio de cultivo sintético utilizado tenía la siguiente composición : Glucosa, 20 g; asparagina, 2 g; casaminoácidos (Difco), 2 g; KH_2PO_4 , 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,02 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,02 mg; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02 mg; tiamina, 1 mg; agua destilada hasta completar 1 litro. Los cambios en las fuentes de nitrógeno y carbono utilizadas, así como su concentración y otros detalles se darán junto con los experimentos individuales.

El medio se ajustó a pH 6,5, fue repartido en matraces Erlenmeyer que se taparon con algodón y fue esterilizado en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

Como inóculo se empleó una gota de una suspensión de conidios de A. nidulans preparada añadiendo agua destilada estéril al tubo donde previamente se creció el hongo.

Para los estudios fisiológicos se utilizaron matraces de 250 ml con 25 ml de medio y se incubaron estáticamente a 25°C[±] 1, tomándose muestras por duplicado a distintos tiempos de incubación.

Para los estudios de composición y purificación del polisacárido se utilizaron matraces de 1 litro con 500 ml de medio y se incubaron en agitación a 100-150 r.p.m., recogiendo los cultivos entre los 6 y 10 días de incubación, una vez agotada la glucosa del medio.

III.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL POLISACARIDO

1.- Aislamiento. El micelio formado se recogió por filtración a través de tela de algodón y se desecó a 60°C hasta peso constante.

En los caldos metabólicos se midió el pH y se determinó la glucosa residual.

Para el aislamiento del polisacárido los caldos de cultivo fueron tratados con etanol o metanol (v/v), formando un precipitado fibroso y cohesivo que se recogió con una espátula. Este material se lavó dos veces con etanol o metanol y se desecó a 60°C hasta peso constante. En cultivos viejos el precipitado no se adhirió a la espátula, y tuvo que ser recogido por centrifugación. Una vez seco el polisacárido se pulverizó en mortero.

2.- Purificación

a) Fraccionamiento del polisacárido por precipitación con sales de amonio cuaternario

Se utilizó el método de Scott (1965). Este método se basa en que los cationes detergentes, tales como cetiltrimetilamonio (CTA), forman sales con los polianiones, las cuales son muy insolubles en agua. Los polisacáridos neutros no reaccionan con estos reactivos, excepto como complejos de borato, o a un pH muy alto, cuando algunos grupos hidroxilo se ionizan.

Los polisacáridos ácidos y neutros pueden ser fácilmente separados precipitando los primeros directamente con reactivos tales como bromuro de cetiltrimetilamonio (BCTA) en solución ácida, neutra o ligeramente alcalina. Los precipitados son solubles en algunos solventes orgánicos y en soluciones salinas.

Reactivos: - Na_2SO_4 1,5M
- Solución acuosa de bromuro de cetiltrimetilamonio (BCTA) al 5% (p/v)
- NaCl 4M

Procedimiento: A 100 ml de solución de polisacárido (1 mg/ml) se le añade 1 ml de solución de Na_2SO_4 1,5M, para aumentar la capacidad de agregación del polisacárido. A continuación se añaden 7,1 ml de la solución de BCTA al 5% y se deja que tenga lugar la agregación en baño a 37°C durante 30 minutos.

En caso de que exista polisacárido ácido, el precipitado formado se recoge por centrifugación. Para disociar

el complejo y recobrar el polisacárido se añade NaCl 4M poco a poco, agitando, a 37°C. El material con peso molecular elevado necesita 24 a 48 horas para disolverse completamente. Una vez disuelto se añaden 3 a 4 volúmenes de metanol, precipitando el polisacárido ácido como la sal del catión y quedando en el sobrenadante la sal de amonio cuaternario. Es aconsejable repetir varias veces la disolución en NaCl 4M y la precipitación con metanol para eliminar bien restos de la sal de amonio cuaternario.

b) Fraccionamiento del polisacárido con metanol

A 1000 ml de líquido de cultivo de Aspergillus nidulans se le añadió metanol poco a poco hasta que se observó la aparición de polisacárido precipitado. Se centrifugó a continuación. El sedimento se lavó dos veces con metanol y se desecó a 60°C en estufa hasta peso constante. Al sobrenadante se le siguió añadiendo metanol poco a poco, hasta la aparición de un nuevo precipitado. Esta fracción insoluble se aisló como anteriormente y el procedimiento de precipitación se repitió hasta obtener una concentración de metanol del 50%.

IV.- ANALISIS QUIMICO

1.- Determinación de carbohidratos totales. Se ha utilizado el método de la Antrona (Loewus, 1952). El ácido sulfúrico concentrado en caliente hidroliza los carbohidratos presentes en la muestra, produciendo además deshidratación intramolecular de los monosacáridos formados.

Las pentosas dan lugar a furfural y las hexosas a 5-hidroxi-metil-2-furfural, que reaccionan con los grupos fenólicos de la antrona para dar lugar a complejos coloreados cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de carbohidratos del problema.

Reactivo:

Consiste en una solución de antrona (9,10-dihidro-9-oxo-antraceno) al 0,2% en H_2SO_4 concentrado (p/v); el H_2SO_4 concentrado se añade agitando y enfriando en baño de hielo. El reactivo no es estable en solución por lo que se prepara en el momento de ser utilizado.

Procedimiento:

La muestra a analizar conteniendo de 20-200 μg de carbohidratos, se completa con agua destilada a 1,5 ml. Se añaden 3 ml del reactivo, en frío, y los tubos se agitan fuertemente para mezclar bien su contenido. Inmediatamente se meten en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, después de lo cual se enfrían y se mide la absorbancia a 540 nm.

Para la curva patrón se utiliza una solución de glucosa o del azúcar que contiene el problema a la concentración de 200 $\mu g/ml$. 100 μg de una solución de galactosa dieron una lectura de 0,39.

2.- Determinación de proteína total. Se ha utilizado el método de Lowry y col. (1951). La reacción se basa en la oxidación, catalizada por el cobre, de los aminoácidos aromáticos y otros grupos presentes en la proteína,

por un reactivo de tipo heteropolifosfato (reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico).

Reactivos:

- A) Carbonato sódico al 10% en hidróxido sódico al 0,1%
- B) Sulfato de cobre al 0,5%
- C) Tartrato sódico-potásico al 1%
- D) Mezcla de 50 ml de A + 0,5 ml de B + 0,5 ml de C.

Se prepara en el momento de ser utilizado.

E) Reactivo de Folin-Ciocalteu en proporción 1:1 con agua destilada.

Procedimiento:

La muestra a analizar conteniendo de 20 a 100 μg de proteína se completa a 0,6 ml con agua destilada y se añaden 3 ml del reactivo D. Se dejan 10 minutos de reposo a temperatura ambiente y a continuación se agitan los tubos y se les añaden 0,3 ml del reactivo E; se agitan en el momento y se dejan a temperatura ambiente 30 minutos. Se mide la absorbancia a 750 nm frente a un blanco en el que se ha sustituido el problema por agua destilada.

La curva patrón se hace con seroalbúmina bovina, (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a partir de la cual se toman de 0,1 a 0,5 ml, completando hasta 0,6 ml de agua destilada; 40 μg de la solución patrón dieron una lectura de 0,14. La concentración de proteínas se calcula por comparación del problema con la curva estándar.

3.- Determinación de ion fosfato. Se ha utilizado el método de Lowry y López (1946). La reacción colorimétrica se basa en que al añadir el molibdato se forma fosfomolibdato que reacciona con el ácido ascórbico

(sustancia reductora), dando óxidos de molibdeno de color azul, cuya densidad óptica depende de la concentración de fosfato presente en la muestra. La reacción se hace en tampón acetato a pH 4.

Reactivos:

- Acido ascórbico 0,1 g en 10 ml de agua destilada (preparar en el momento y mantener en baño de hielo).
- Molibdato amónico 1 g en 100 ml de H_2SO_4 0,05 N.
- Tampón acetato. Para preparar el tampón acetato se prepara primero la solución de ácido acético 0,1 N y se añade acetato sódico 0,025 N hasta llevarlo a pH 4.

Procedimiento: La muestra conteniendo de 10 a 100 μg de fosfato, se completa a 1 ml con agua destilada, se añaden 4 ml de tampón acetato y a continuación 0,5 ml de ácido ascórbico y 0,5 ml de molibdato amónico. Se deja reposar 15 minutos y se lee la absorbancia a 700 nm frente a un blanco con agua.

La curva patrón se hace con $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 138 mg/100 ml (10 $\mu moles/ml$) diluyendo a 1/10 y tomando concentraciones de 0,1 a 0,9 $\mu moles$; 0,30 $\mu moles$ de solución patrón dieron una lectura de 0,235.

4.- Determinación de amineazúcares. Se empleó el método de Rondle y Morgan (1955), algo modificado.

El método se basa en la formación de un material cromogénico cuando los derivados N-acetilados de los aminoazúcares se calientan en baño a 100°C en solución alcalina.

El cromógeno produce un cromóforo o cromóforos al

tratarlo en solución ácida con p-dimetilaminobenzaldehído etanólico. Las condiciones de pH durante la condensación con acetyl-acetona, conducen a marcadas diferencias en la intensidad del color final. Por esta razón es conveniente eliminar bien el HCl de los hidrolizados de polisacáridos antes de hacer una determinación de aminoazúcares.

Reactivos:

- Reactivo de acetyl-acetona. 1 ml de acetyl-acetona se disuelve en 50 ml de carbonato sódico 0,5N. El reactivo se prepara antes de cada determinación y es estable por 2 o 3 horas a 18°C.

- Reactivo de Ehrlich. 0,8g de p-dimetilaminobenzaldehído se disuelven en 30 ml de etanol y se añaden 30 ml de HCl concentrado. La solución deberá ser de color amarillo pálido y carecer de material insoluble. Se mantiene bien a temperatura ambiente en frasco topacio.

Procedimiento: La muestra conteniendo de 20 a 200 µg de aminoazúcar, se completa a 1 ml con agua destilada y se le añade 1 ml del reactivo de acetyl-acetona. El contenido de los tubos se mezcla bien y la pared de cada tubo se lava con 1 ml de agua destilada.

Los tubos se cierran con ampollas o canicas, que actúan como tapones evitando pérdidas de acetyl-acetona, y se calientan en baño de agua hirviendo durante 20 minutos.

Se enfrían a temperatura ambiente y se añaden 2 ml de etanol, seguidos por 1 ml del reactivo de Ehrlich (volumen total 6 ml). El contenido del tubo se mezcla suavemente y se calienta 10 minutos en baño a 65-70°C para

acelerar la liberación de CO_2 . El calentar por encima de 70°C conduce a disminución de la intensidad final del color. Después de enfriar a temperatura ambiente, el contenido de los tubos se mezcla nuevamente y se mide la absorbancia a 530 nm frente a un blanco con agua. La curva patrón se hace con una solución de aminoazúcar (1 mg/ml) tomando concentraciones de 50 μg a 200 μg . 50 μg de una solución de galactosamina dieron una lectura de 0,29.

Las intensidades de color guardan una relación lineal con la cantidad de aminoazúcar presente entre 50 y 200 μg . El método descrito sólo es apropiado para la estimación de aminoazúcares libres.

5.- Determinación de N-acetilglucosamina. Se utilizó el método de Tracey (1955). La N-acetilglucosamina ha sido determinada por la formación de un cromógeno, que reacciona con el reactivo de Ehrlich al calentar en solución saturada de borato sódico, en ausencia de acetilacetona.

Reactivos:

- Solución saturada de borato sódico.
- Reactivo de Ehrlich: 2 g de p-dimetilaminobenzaldehído disueltos en 100 ml de ácido acético y 5 ml de HCl concentrado.
- Acido acético glacial.

Procedimiento:

La muestra conteniendo 1 a 10 μg de N-acetilglucosamina se completa a 0,2 ml con agua destilada, se añaden 0,1 ml de una solución saturada de borato sódico y se calienta en baño de agua hirviendo 7 minutos. Se deja enfriar y se añaden

3 ml de ácido acético y 0,3 ml del reactivo de Ehrlich. Se esperan 20 minutos aproximadamente para que se desarrolle un color violeta, que será más o menos intenso según la cantidad de N-acetilglucosamina presente en el problema. Se lee la absorbancia a 540 nm frente a un blanco que tiene agua en lugar del problema. La concentración de N-acetilglucosamina presente en la muestra se obtiene por comparación con una curva patrón, hecha tomando distintos volúmenes (0,05 ml a 0,3 ml) de una solución 0,1 mM (2,21 mg%) de N-acetilglucosamina. (6,63 µg de N-acetilglucosamina dieron una lectura de 0,10).

6.- Determinación de azúcares reductores. Se determinaron azúcares reductores por el método de Somogyi (1952) y Nelson (1944).

El método se basa en la reducción del reactivo de cobre en medio alcalino por los azúcares reductores, y en la determinación del cobre reducido por reacción con reactivos de arsenomolibdato, que dan compuestos coloreados. El color obtenido es proporcional a la concentración de azúcares reductores presentes en el problema.

Reactivos: A) Reactivo de Somogyi

- 24 g de Na_2CO_3 anhidro + 12 g de tartrato sódico-potásico (sal de Rochelles) y disolver en 250 ml de agua destilada.

- 4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, disueltos en 40 ml de agua.

Agregarle la primera solución agitando.

- Sobre la mezcla agregar lentamente 16 g de NaHCO_3

- 180 g de Na_2SO_4 anhidro se disuelven en 500 ml de

agua caliente y se hierve para expulsar el aire. Una vez frío mezclar. Dejar a 30°C y en la obscuridad una semana, filtrar y guardar en frasco topacio.

B) Reactivo de Nelson

- 25 g de molibdato amónico disueltos en 450 ml de agua + 21 ml de H_2SO_4 concentrado.
- 3 g de arseniato disódico ($Na_2HASO_4 \cdot 7H_2O$) en 25 ml de H_2O .

Mezclar ambas soluciones agitando.

Dejar en estufa a 37°C, 48 horas; guardar en frasco topacio.

Procedimiento: Completar la muestra conteniendo de 10 a 80 μg de azúcar reductor a 0,4 ml con agua destilada y añadirle 0,4 ml del reactivo de Somogyi. Meter en baño de agua hirviendo 15 minutos, enfriar y añadir 0,4 ml del reactivo de Nelson. Enrasar a 6 ml con H_2O , agitar bien los tubos y leer la absorbancia a 540 nm. (El Zn interfiere en la determinación).

La curva patrón se hace con solución de glucosa 1 mM (18 mg/100 ml), tomando varias cantidades (0,1 - 0,4 ml); 36 μg de glucosa dan una lectura de 0,36 aproximadamente.

7.- Determinación de ácidos hexurónicos. Se empleó el método de Dische (1947). Este método se basa en dos reacciones: 1) la descomposición del ácido hexurónico presente en la muestra por el H_2SO_4 concentrado, formándose productos intermedios (ácido 5-formilfurfólico parece ser el principal), y 2) la reacción coloreada de estos productos intermedios, que aún conservan el carbono carbo-

nilfco, con carbazol.

Reactivos:

- H_2SO_4 concentrado
- Solución alcohólica al 0,1% de carbazol

Procedimiento: A 1 ml de la solución problema conteniendo 5 a 100 μg de ácido urónico se le añaden enfriando 6 ml de H_2SO_4 concentrado y se calienta 20 minutos en un baño de agua hirviendo. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se añaden 0,2 ml de una solución alcohólica al 0,1% de carbazol puro, agitando.

Después de unos minutos aparece un color rosa, cuya intensidad aumenta hasta unas 2 horas y permanece invariable al menos por 1 hora más. Después el color disminuye lentamente y pierde 1/3 de su intensidad en 24 horas.

Se lee la absorbancia a 530 nm. Se pusieron controles de ácidos glucurónico y galacturónico, dando 100 μg unas lecturas de 0,35 y 0,46 respectivamente.

La absorción debida a la reacción de los azúcares verdaderos con el carbazol puede ser fácilmente deducida, cuando se conocen la naturaleza del azúcar y su concentración aproximada, poniendo un estándar de azúcar en cada determinación.

8.- Determinación del ion sulfato. Se empleó el método de sulfato de bario (Casares, 1954). El método se basa en la insolubilidad del sulfato bórico formado a partir de los iones sulfato de la muestra y el cloruro bórico añadido.

Reactivos:

- Cloruro bórico, 0,70 a 0,75 g disueltos en 200 ml de agua destilada caliente
- HCl diluido

Procedimiento: A 150 ml de muestra se le añaden 5 ml de HCl diluido. Se calienta el líquido hasta principio de ebullición y se mezcla con la solución de cloruro bórico también caliente, o se añade mediante una bureta gota a gota, evitando añadir un exceso, para lo cual se espera a que el líquido se aclare y se comprueba si la precipitación es completa añadiendo un poco más de $BaCl_2$.

El líquido caliente se deja enfriar completamente. Se decanta el líquido claro sobre un filtro, se añade un poco de agua caliente al vaso que contiene el sulfato, se decanta el agua y se repite la decantación 2 ó 3 veces más. Finalmente se pasa el precipitado al filtro, y se termina el tratamiento con agua caliente hasta que los líquidos filtrados no precipiten con el nitrato argéntico (prueba de que no existen iones cloruro).

El precipitado de sulfato bórico se calcina y se pesa.

9.- Determinación de grupos acetilo. Se ha seguido el método de Ludowieg y Dorfman (1960) algo modificado.

a) Determinación de acetilo total (O-y N-acetilo).

Los grupos N-acetilo de los polisacáridos por poseer uniones fuertes requieren para su liberación una metanolisis ácida previa. En estas condiciones los posibles grupos O-acetilo también son liberados, determinándose el contenido total de acetilo.

En ambos casos se obtiene acetato de metilo que reacciona a temperatura ambiente con la hidroxilamina alcalina para dar ácido aceto-hidroxiámico; éste con sales férricas da lugar a un complejo de color púrpura que puede ser determinado colorimétricamente.

Reactivos:

A) Clorhidrato de hidroxilamina, 0,35 M

B) NaOH 1,5 M

C) Hidroxilamina alcalina (reactivo de Hestrin).

Esta solución se prepara en el momento de usar mezclando volúmenes iguales de A) y B).

D) Acido perclórico, 0,75 M

E) Solución de perclorato férrico (solución de Hill).

Se prepara disolviendo 1,9 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 5 ml de HCl concentrado. A esta solución se añaden 5 ml de ácido perclórico al 70%. Se evapora entonces casi hasta la sequedad y se diluye a 100 ml con H_2O . El pH de esta solución debe estar entre 0,18 y 0,22, si no lo está se ajusta añadiendo ácido perclórico.

F) Solución de HCl 2M-metanol (reactivo para la desacetilación). El HCl seco se obtiene añadiendo lentamente 70 ml de H_2SO_4 concentrado sobre 35 ml de HCl concentrado. El gas desprendido, después de pasarlo por un frasco lavador conteniendo H_2SO_4 , se recoge sobre 100 ml de metanol absoluto refrigerado con una mezcla de CO_2 sólido-metanol. Una alícuota de la solución HCl-metanol se valora con álcali estándar (indicador fenolftaleína) y se prepara una solución 2 M por dilución. La solución es estable algunos

meses en la nevera y protegida de la humedad.

Las soluciones de clorhidrato de hidroxilamina 0,35 M y perclorato férrico son estables hasta 1 mes en nevera.

Procedimiento:

1) Metanolisis ácida (desacetilación). Una cantidad de polisacárido conteniendo de 1 a 10 μ moles de acetilo se coloca en un tubo de ensayo, y se deseca en cámara desecadora con CaCl_2 donde se ha hecho vacío. Se añaden 0,5 ml de solución HCl 2M-metanol. La solución se enfría algunos segundos con una mezcla de CO_2 sólido-metanol y rápidamente se cierra el tubo a la llama. El tubo se calienta en estufa a 100°C durante 4 horas, se enfría y se abre cerca del extremo.

2) Determinación del acetato de metilo. Se toman de 0,1 a 0,5 ml de la solución del producto resultante de la metanolisis, completando a 2 ml con metanol- H_2O (v/v). A continuación se añaden 2 ml de la solución de hidroxilamina alcalina. Se agita el tubo y se deja reposar 10 minutos. Se añaden 2 ml de ácido perclórico 0,75 M, se agita bien y se añade 1 ml de solución de perclorato férrico. Pasados 5 a 10 minutos la absorbancia es leída a 520 nm. La cantidad de acetato de metilo es estimada por comparación con una curva estándar de acetato de etilo.

La solución estándar es acetato de etilo 0,005 M en metanol- H_2O (v/v). Alícuotas apropiadas de este estándar se diluyen a 2 ml con metanol- H_2O (v/v) para proporcionar cantidades que varían entre 1 a 10 μ moles. Se usa también un blanco de HCl-metanol.

b) Determinación de O-acetilos

Los grupos O-acetilo de los polisacáridos por poseer uniones débiles se liberan con facilidad al tratarlos con soluciones alcalinas diluidas a temperatura ambiente. El ion acetato así liberado reacciona con la hidroxilamina, dando lugar a ácido aceto-hidroxámico.

El ácido aceto-hidroxámico se determina colorimétricamente como en el apartado anterior.

Reactivos:

Fueron los mismos utilizados para la determinación de acetilo total, excepto la solución de HCl 2M-metanol.

Procedimiento: En un tubo de ensayo se pesa una cantidad de polisacárido que contenga de 1 a 10 μ moles de O-acetilo, y se añaden 2 ml de metanol-H₂O (v/v). La determinación se hace como la descrita anteriormente para el acetato de metilo.

Por diferencia entre el contenido total de acetilo y el de O-acetilos se puede obtener el de N-acetilos.

10.- Análisis de aminoazúcares y aminoácidos. Fueron determinados en el polisacárido hidrolizado con HCl con un analizador automático de aminoácidos Jeol JLAC-5AH (Spackman y col., 1958).

11.- Determinación de nitrógeno. El nitrógeno presente en el polisacárido se determinó mediante el método de Kjeldahl, usando el sistema de digestión DS-6 y la unidad de destilación 1001 de TECATOR. Las ventajas que presenta

este sistema son: fácil manejo, gran velocidad en las determinaciones, técnica química ya conocida, economía y poco espacio de trabajo.

Reactivos y productos:

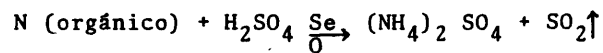
- H₂SO₄ concentrado
- H₂O₂ 30%
- Tabletas Kjeltabs de Tecator (compuestas por K₂SO₄ y Se)

Procedimiento:

1°) Preparación de la muestra: En tubo de digestión añadir por este orden:

- 50 mg de polisacárido pulverizado
- 1/4 de tableta Kjeltabs de Tecator
- H₂SO₄ concentrado, 2 ml
- H₂O₂ 30%, 1 ml

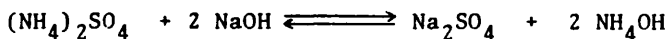
2°) Mineralización de la muestra: El tubo de digestión con la muestra se coloca en la unidad de digestión (digestor) a 390°C durante 30 minutos. Los vapores de SO₂ formados son eliminados mediante una bomba de vacío. La reacción que tiene lugar es la siguiente:



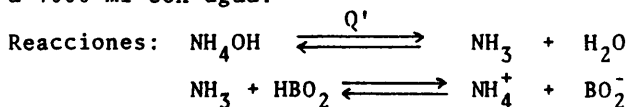
(Se = catalizador; Q = calor)

Pasados 30 minutos se enfrían los tubos de digestión. Se añaden 50 ml de agua destilada y se agitan bien los tubos para disolver las sales. Se conecta el tubo de digestión a la unidad destiladora.

3°) Destilación: a) Ataque con álcali: Añadir sobre la muestra digerida 12,5 ml de NaOH al 40%. La reacción que tiene lugar es:



b) Arrastre de vapor, y recolección de 100 ml de NH_3 destilado sobre 25 ml de una solución preparada disolviendo 40 g de ácido bórico en 600 ml de agua, a la que se añade una mezcla indicadora compuesta por 10 ml de verde de bromocresol al 0,1% en alcohol y 7 ml de rojo de metilo al 0,1% en alcohol; el volumen final se ajusta a 1000 ml con agua.



(Q' = calor)

4°) Valoración. El borato amónico formado es valorado con HCl 0,01 N. El ácido bórico por ser extremadamente débil es desplazado del borato amónico por el HCl, según la siguiente ecuación: $\text{HCl} + \text{BO}_2^- \longrightarrow \text{HBO}_2 + \text{Cl}^-$

Miliequivalentes de HCl = miliequivalentes de NH_4^+ .

El indicador más adecuado es verde de bromocresol + rojo de metilo, que fue añadido previamente al matraz donde se recogió el destilado.

5°) Cálculo del porcentaje de nitrógeno presente en la muestra. Se hace mediante la fórmula:

$$(\%) \text{ N} = 100 \times \frac{(\text{A}-\text{B}) \times 14,007 \times 0,01}{\text{mg muestra}}$$

Donde: A= ml de HCl 0,01 N consumidos por la muestra

B= " " " " consumidos por un blanco con agua

14,007 = peso atómico nitrógeno

0,01 = normalidad HCl

12.- Análisis elemental. El análisis elemental del polisacárido se realizó con un Analizador Elemental Perkin-Elmer 240.

La combustión de la muestra tiene lugar en una atmósfera de oxígeno en presencia de tungstato de plata y óxido de magnesio, en un tubo de combustión. Los productos gaseosos resultantes de la combustión son arrastrados por una corriente de helio a un tubo de reducción donde, los óxidos de nitrógeno son reducidos a nitrógeno molecular y es retenido el exceso de oxígeno. La mezcla, compuesta ahora por vapor de agua, dióxido de carbono, nitrógeno y helio, se recoge en un recipiente esférico de cristal de 300 ml de capacidad, ajustando la presión a 2 atmósferas aproximadamente y manteniendo la temperatura constante.

Alcanzado el equilibrio la mezcla de la muestra se expande en un sistema de muestra elongado, y pasa a continuación por 3 pares de células de conductividad térmica en serie. Entre el primer par de células hay una trampa de adsorción con un material deshidratante (perclorato de magnesio), donde queda retenida el agua. La diferencia de conductividad térmica antes y después de la trampa, leída en un registrador potenciométrico, refleja la concentración de agua, y por tanto la cantidad de hidrógeno en la muestra original.

Una medida similar se hace de la salida de señal del segundo par de células de conductividad, entre las cuales hay una trampa que retiene el dióxido de carbono.

El gas restante, compuesto sólo por nitrógeno y helio, pasa por una célula de conductividad cuya salida es comparada con la de una célula de referencia, por la cual fluye helio puro, obteniéndose de esta forma la concentración de nitrógeno.

Para el análisis de oxígeno, el tubo de combustión es sustituido por un tubo de pirolisis de cuarzo, conteniendo carbono platinizado, y el de reducción es sustituido por otro conteniendo óxido de cobre. Las temperaturas de operación se ajustan y se corta el suministro de oxígeno. La muestra es pirolizada en una atmósfera de helio, formándose CO que es oxidado por el óxido de cobre a CO₂, el cual es detectado y medido de la misma forma que se analizó el carbono.

V.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL

1.- Hidrólisis

a) Hidrólisis enzimática

El polisacárido se trató enzimáticamente con el líquido de cultivo y con enzimas comerciales (quitinasa y α -galactosidasa).

Reactivos:

- Tampón borato-citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,5
(Teorell y Stenhagen, 1938)
- Sustrato. Se prepara una solución con 1 a 2 mg de polisacárido por 0,9 ml de tampón borato-citrato-fosfato.

Procedimiento: En un tubo de ensayo se tomaron 0,9 ml de sustrato y 0,1 ml de líquido de cultivo o bien 0,1 ml de una solución de enzimas comerciales (1-5 mg/ml) ó de enzimas precipitadas del líquido de cultivo por cualquiera de los siguientes procedimientos : 1) Acido tánico al 1 % (Shibata y Nisizawa, 1965), 2) Sulfato amónico al 60%, 3) etanol al 50% ó 4) acetona al 30%. Los tubos se agitaron suavemente y se incubaron a 37°C por distintos períodos de tiempo; cuando el tiempo de incubación fue superior a 6 horas, los tubos se taparon con un algodón impregnado en tolueno y papel de plata. Paralelamente se incubaron blancos de enzima y sustrato. La reacción se paró metiendo los tubos en baño a 100°C, 5 minutos.

En caso de producirse hidrólisis enzimática del polisacárido, el poder reductor liberado se determina con el método de Somogyi (1952) y Nelson (1944).

b) Hidrólisis química

5-7 mg de polisacárido se hidrolizaron con ácido clorhídrico de distintas concentraciones y por distintos períodos de tiempo en estufa a 105°C. En los tubos de hidrólisis se hizo vacío con bomba de agua (-60 cm) para evitar oxidación de los productos resultantes. El exceso de ácido se eliminó lavando los hidrolizados con 1 ml de agua destilada 2-3 veces, calentando a 40-50°C en desecador con vacío, sobre pentóxido de fósforo y lentejas de sosa. Una vez neutralizados, los hidrolizados se resuspendieron en 0,5-0,7 ml de agua, de modo que la concentración final fuera en todos los casos 10 mg/ml.

2.- Cromatografía en papel. De las soluciones anteriores de polisacárido hidrolizado en agua (10 mg/ml), se tomaron 50-100 microlitros con micropipeta y se aplicaron al papel de cromatografía. Se utilizaron como control soluciones de azúcares y aminoazúcares (1 mg/ml), aplicando sobre el papel 40 microlitros de cada una.

Los azúcares y aminoazúcares presentes en los hidrolizados fueron identificados por cromatografía descendente en papel Whatman n°1. Para conseguir una mejor separación de los azúcares neutros el papel se tamponó con tampón fosfato sódico-potásico 0,066 M, pH 5,5.

Solventes:

1) Para azúcares: n-butanol-acetona-agua (4:5:1). Tiempo de elución 48 horas.

2) Para aminoazúcares: n-butanol-piridina-HCl 0,1N (5:3:2). Tiempo de elución 24-48 horas.

Reactivos para revelado:

1) Ftalato de anilina. Se utilizó para la identificación de azúcares neutros. Se disuelven 0,93 g de anilina y 1,66 g de ácido ftálico en 100 ml de n-butanol saturado de agua. Se pulveriza el cromatograma y se calienta en estufa a 105°C durante 5 minutos. Los azúcares neutros dan mancha color marrón (Dawson y col., 1962).

2) p-dimetilaminobenzaldehído. Se utilizó para identificación de aminoazúcares.

Se preparan 3 soluciones:

- a) 0,5 ml de acetyl-acetona en 50 ml de n-butanol
- b) 5 ml de KOH al 50% en 20 ml de etanol
- c) Reactivo de Ehrlich. A 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído se añaden 30 ml de etanol, 30 ml de HCl concentrado y 180 ml de n-butanol. La solución se agita bien y se guarda en frasco tapado a temperatura ambiente.

Se mezclan 10 ml de la solución a) y 0,5 ml de la solución b) y se pulveriza el papel. A continuación se calienta a 105°C, 5 minutos. Se pulveriza con el reactivo de Ehrlich y se calienta el papel a 90°C 5 minutos.

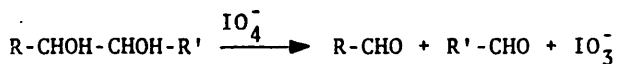
Para la identificación de N-acetilhexosaminas no es necesaria la condensación previa con la acetylacetona.

Las hexosaminas dan manchas de color rojo cereza y N-acetilhexosaminas de color púrpura (Dawson y col., 1962).

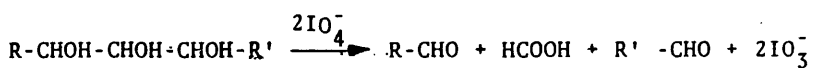
3) Nitrato de plata amoniacal-NaOH (Hough y Jones, 1962).
Para identificar azúcares y aminoazúcares. A 0,5 ml de una solución acuosa saturada de nitrato de plata se le añaden 100 ml de acetona; se forma un precipitado blanco que se disuelve por la adición de agua destilada gota a gota. El papel se sumerge en este reactivo y se deja secar 3 a 4 minutos. A continuación los papeles se pulverizan con NaOH 0,5N en etanol acuoso preparado diluyendo una solución acuosa al 40% de NaOH con etanol. Los azúcares reductores forman rápidamente manchas marrones a negras; muchos carbohidratos o derivados de carbohidratos pueden ser detectados con este reactivo. Después de 5 a 10 minutos el papel se sumerge en amoníaco con agua (proporción 1:3), se lava rápidamente con agua corriente de 15 a 30 minutos y a continuación se seca.

3.- Oxidación del polisacárido con periodato sódico

Cuando los glicoles vecinos se tratan con ácido periódico o sus sales, tiene lugar la ruptura de la cadena carbonada entre los dos grupos hidroxilo formándose dos grupos aldehídicos y consumiéndose una molécula de periodato.



En el caso de $\alpha\beta$ -trioles ocurre una doble ruptura de la cadena carbonada con la formación de dos grupos aldehídicos, liberándose una molécula de ácido fórmico y consumiéndose 2 moléculas de periodato.



Consecuentemente, en un polisacárido las unidades terminales no reductoras, o las unidades no terminales con uniones (1 \rightarrow 6) teniendo 3 grupos hidroxilo adyacentes, serán rotas por 2 moléculas de periodato, para dar 1 molécula de ácido fórmico (Fig. 1).

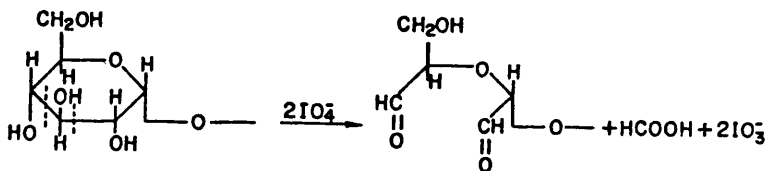


Fig. 1. Unidad terminal no reductora

Las unidades no terminales unidas por enlaces (1→2) ó (1→4) sufren ruptura por 1 molécula de periodato, no liberándose ácido fórmico (Fig. 2).

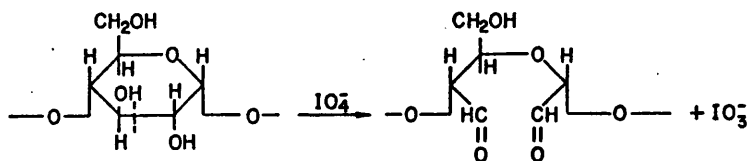


Fig. 2 Unidad no terminal con unión en C₄

Las unidades que no poseen grupos hidroxilo adyacentes, tales como unidades no terminales unidas por enlaces (1→3) o unidades implicadas en ramificaciones en los carbonos 2 y 4 no son afectadas por periodato.

Las unidades terminales reductoras unidas por enlaces (1→2) ó (1→3) sufren ruptura por 1 molécula de periodato, no liberándose ácido fórmico (Fig. 3).

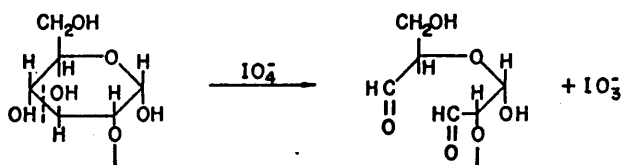


Fig. 3. Unidad terminal reductora con unión en C₂

Las unidades terminales reductoras unidas por enlace (1→4), consumen 2 moléculas de periodato, produciendo 1 molécula de ácido fórmico (Fig. 4).

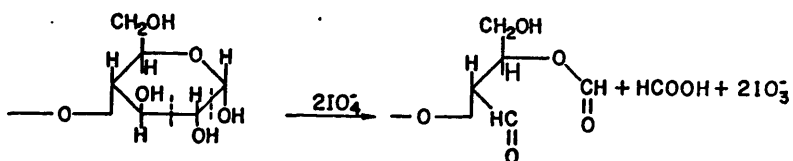


Fig. 4. Unidad terminal reductora con unión en C₄

Las unidades terminales reductoras unidas por enlace (1→6) consumen 3 moléculas de periodato, produciendo 2 moléculas de ácido fórmico (Fig. 5).

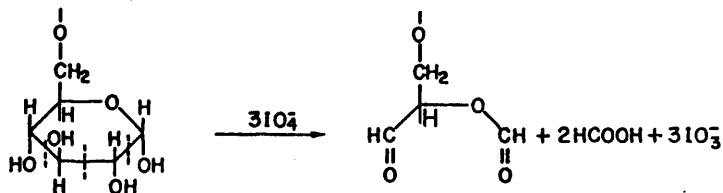
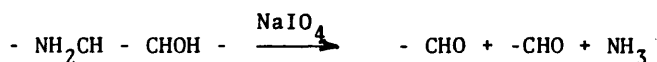


Fig. 5. Unidad terminal reductora con unión en C₆

El periodato oxida los aminoazúcares con la liberación de amoníaco y la ruptura del enlace carbono-carbono.



En el caso de estar N-acetilados, los grupos acetilo dificultan la oxidación entre los carbonos 1-2 y 2-3 (Bardalaye y Nordin, 1976).

Así, la oxidación de un polisacárido y la determinación cuantitativa de los moles de periodato consumidos, el ácido fórmico liberado y la proporción de las unidades de azúcar no atacadas, nos dan información sobre la naturaleza y proporción de los enlaces glicosídicos presentes en el polisacárido.

La oxidación del polisacárido de A. nidulans y la determinación del periodato consumido se hizo siguiendo el método de Aspinall y Ferrier (1957). El consumo de periodato se determinó espectrofotométricamente midiendo a lo largo de la oxidación la disminución en absorbancia a 223 nm del ion periodato, que es proporcional a la concentración de dicho ion.

Reactivos:

- Solución de periodato sódico 0,03 M
- Solución patrón de glucosa $3,33 \mu\text{moles/ml}$

Procedimiento: 100 ml de una suspensión de polisacárido (1 mg/ml) se mezclan con 100 ml de la solución 0,03 M de periodato sódico (quedando la solución 0,015 M) y se incubaba a temperatura ambiente en la obscuridad.

Cada cierto tiempo se toman 20 μ l de los problemas y de la solución de glucosa control, y se diluyen 250 veces. Se mide a continuación absorbancia a 223 nm frente a un blanco con periodato sódico.

a) Valoración de ácido fórmico en la mezcla de oxidación con periodato sódico (Hay y col., 1965).

El ácido fórmico producido en la oxidación del polisacárido con periodato sódico, se determinó por titulación directa con NaOH estándar.

Previamente a la determinación destruimos el exceso de periodato añadiendo a 10 ml de la mezcla de oxidación del polisacárido, y a un blanco de reactivo, 1 ml de etilén-glicol, dejándolo en reposo 1 hora.

Para la valoración de ácido fórmico utilizamos NaOH 0,002M (previamente titulada con ftalato ácido de potasio, indicador fenolftaleína) usando como indicador rojo de metilo. La diferencia de acidez entre el blanco y la muestra representa el ácido fórmico liberado en la oxidación del polisacárido.

b) Determinación de formaldehído en la mezcla de oxidación con periodato sódico (Kabat y Mayer, 1961).

El exceso de periodato se destruye por la adición de arsenito y formaldehído producido en la oxidación del polisacárido es determinado con ácido cromotrópico (ácido-1,8-dihidroxi-naftalén-3,6-disulfónico).

Reactivos:

- Ácido cromotrópico. A 100 mg de ácido cromotrópico se le añaden 25 ml de agua destilada y 30 ml de

H₂SO₄ concentrado. Guardar en botella tapado y preparar solución nueva cada dos o tres semanas.

- HCl 4N
- Arsenito 0,4M

Procedimiento: A 50 µl de solución de polisacárido que ha sido oxidado con periodato, se la añaden 10 µl de HCl 4N, y 40 µl de arsenito 0,4M. Al añadir el arsenito se forma color amarillo por la liberación de iodo. Se deja reposar 5 minutos. Se añade 1 ml del reactivo de ácido cromotrópico, se agita y se meten los tubos en baño a 100°C durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se lee la absorbancia frente a un blanco con agua a 570 nm. Se pone también un blanco con periodato. El color rosa-violeta formado es estable por más de 4 horas.

Para la curva patrón se prepara una solución de formaldehído (25 µg/ml) a partir de la cual se toman de 10 a 30 µl completando a 0,1 ml con 25 µl de periodato sódico 0,03M, 5 µl de HCl 4N, 40 µl de arsenito 0,4M y agua destilada. 0,50 µg dieron una lectura de 0,164. La concentración de formaldehído en el problema se calcula por comparación con la curva estándar.

4.- Reducción e hidrólisis del polisacárido oxidado con periodato sódico (degradación de Smith). Tiene por objeto convertir los dialdehídos resultantes de la oxidación con periodato en alcoholes, por ser éstos más estables a la hidrólisis ácida. Se siguió el método de Sietsma y Wessels (1977).

Reactivos:

- Tetrahiduro borato de sodio (NaBH_4)
- Acido acético glacial
- HCl concentrado

Procedimiento: La suspensión de polisacárido oxidado con periodato sódico se dializa durante 24 horas, frente a agua destilada, para eliminar sales inorgánicas.

A 100 ml de la solución dializada, conteniendo el polisacárido oxidado, se le añaden 75 mg de NaBH_4 y se deja que tenga lugar la reducción durante 16 horas a 18°C (temperatura ambiente).

A continuación se añade ácido acético para neutralizar la solución y se dializa de nuevo frente a agua destilada durante 24 horas.

La solución dializada se concentra a la mitad de su volumen en rotavapor, se añade etanol (v/v), y el polisacárido precipitado es recogido por centrifugación, lavado con etanol y acetona, y desecado en estufa a $40-50^\circ\text{C}$ hasta peso constante.

El polisacárido, oxidado y reducido, se hidroliza con HCl 2N y 4N (10 mg/ml), durante 4 horas en estufa a 105°C habiendo hecho el vacío en el tubo de hidrólisis para evitar oxidación de los productos resultantes.

El HCl se elimina de los hidrolizados por evaporación en cámara desecadora a 40°C con vacío, y se lavan con H_2O hasta pH neutro.

Para eliminar restos de sales, se hizo extracción de azúcares y aminoazúcares del hidrolizado con piridina

(0,5 ml), y cromatografía en papel para identificar los productos resultantes de la hidrólisis. Como control se utilizaron soluciones de: glucosa, manosa, galactosa, galactosamina (1 mg/ml), glicerol (4 mg/ml), y treitol (2 mg/ml). El solvente utilizado fué n-butanol-acetona-H₂O (4:5:1); el tiempo de elución 24 y 72 horas. Se revelaron con nitrato de plata amoniacal-NaOH (Hough y Jones, 1962).

5.- Espectros infrarrojos. Fueron obtenidos por la técnica del bromuro potásico en un espectrofotómetro infrarrojo Perkin-Elmer 457. La presencia de sustituyentes en polisacáridos, tales como grupos acetamido, carboxilo, y sulfato, puede ser reconocida a partir de sus picos de absorción característicos en el espectro infrarrojo. En muchos casos también puede ser determinada la configuración de los enlaces interglucosídicos existentes en un polisacárido, por análisis del espectro infrarrojo (Brimacombe y Webber, 1964).

VI.- OBTENCION DE PAREDES CELULARES A PARTIR DE MICELIO DE A. NIDULANS

Se siguió el método de Bull (1970). El micelio, una vez separado del líquido de cultivo, se macera durante una hora en 400 ml de agua destilada. Se filtra y exprime el micelio, y se resuspende en 200 ml de tampón fosfato sódico-potásico (6 de Sorensen) 0,033 M, pH 6,8. A continuación se tritura en Omni-Mixer durante 2 minutos en baño de hielo. Se centrifuga y se lava 3 veces con 200 ml de tampón fosfato sódico-potásico (hasta que no de precipitado de polisacárido al añadir un volumen de metanol). Se determina el peso húmedo obtenido de paredes y se ponen en SDS al 1% (10 ml/g de paredes). Se trituran 2 minutos en Omni-Mixer y se dejan macerar durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugan y lavan 5 veces con 200 ml de tampón sódico-potásico a 4°C. Después se lavan con concentraciones crecientes de etanol: 25, 50, 75 y 96%. Por último se lavan con acetona y se desecan en estufa a 50°C hasta peso constante.

VII.- VALORACION DE ENZIMAS EN EL LIQUIDO DE CULTIVO
DE A. NIDULANS.

1.- Precipitación de enzimas del líquido de cultivo.

Se utilizaron varios procedimientos para la precipitación:

a) Acido tánico al 1% .

A 50 ml del líquido de cultivo se añaden 5,5 ml de ácido tánico al 10% (el ácido tánico queda al 1%). Se deja sedimentar el precipitado formado, durante 1-2 horas, a 4°C. A continuación se centrifuga y el sedimento se lava 3 veces con acetona fría, para eliminar el ácido tánico residual. Se seca con corriente de aire y se guarda a 4°C (Shibata y Nisizawa, 1965).

b) Sulfato amónico al 60%.

A 50 ml del líquido de cultivo se le añaden 19,5 g de sulfato amónico. El precipitado formado se deja sedimentar 24 horas en nevera (4°C). A continuación se centrifuga, y el sedimento se disuelve en 1 ml de tampón borato-citrato-fosfato 0,1M, pH 5,5 y se dializa 24 horas a 4°C frente a agua destilada, para eliminar restos de sulfato amónico. La solución dializada se conserva a 4°C para posterior utilización.

c) Etanol al 50%.

A 50 ml del líquido de cultivo se le añade igual volumen de etanol. El precipitado formado se deja sedimentar 24 horas a 4°C. A continuación se centrifuga y el sedimento se lava 3 veces con etanol frío. Se seca con corriente de aire y se guarda a 4°C.

d) Acetona al 30%.

A 50 ml del caldo de cultivo se le añade acetona hasta llegar a una concentración del 30%. Se deja sedimentar el precipitado formado durante 1 a 2 horas a 4°C. Se centrifuga y se lava el sedimento 2-3 veces con acetona fría. Se seca con corriente de aire y se guarda a 4°C.

2.- Preparación de tampón borato-citrato-fosfato
(Teorell y Stenhagen, 1938)

Este tampón es válido para un rango de pH entre 2 y 12.

Reactivos: - Solución A

- a) 7 g de ácido cítrico diluidos a 100 ml con agua destilada.
- b) 2 ml de ácido fosfórico, diluidos a 100 ml con agua destilada.
- c) A la mezcla de a) y b) se añaden 3,54 g de ácido ortobórico cristalizado y 343 ml de NaOH 1N, diluyendo la mezcla a 1 litro.

- Solución B. 1 litro de HCl 0,1N

Para obtener solución tamponada a distintos pH, a 20 ml de solución A se añade poco a poco solución B hasta conseguir el pH deseado. Después el volumen se ajusta a 100 ml. (El volumen exacto que hay que añadir de la solución B para cada pH, viene dado en las tablas Geigy o Teorell y Stenhagen, 1938).

3.- Actividades enzimáticas valoradas en el líquido de cultivo. Las enzimas fueron precipitadas del líquido de cultivo con ácido tánico al 1% (Shibata y Nisizawa, 1965).

Reactivos:

- En todas las reacciones enzimáticas se utilizó un tampón de borato-citrato-fosfato 0,1M pH 5,5, excepto en la valoración de la β -1,3-glucanasa (EC 3.2.1.6) que el pH se ajustó a 4,5 (Mc Lellan y col., 1970).

- Las soluciones de sustrato utilizadas se prepararon disolviendo 1-2 mg de sustrato, en 0,9 ml de tampón.

La solución de laminarina, sustrato de la β -1,3-glucanasa (EC 3.2.1.6), se calentó en baño de agua a 50°C para ayudar a su disolución.

La quitina coloidal, sustrato de la quitinasa (EC 3.2.1.14), se preparó de la siguiente forma: A 200 mg de quitina se le añaden 5 ml de agua y 6,4 ml de H₂SO₄ concentrado, agitando y enfriando. Una vez disuelta la quitina, se agregan 108 ml de etanol frío al 50% agitando. La quitina precipitada, se centrifuga y se lava con agua destilada fría hasta que el pH sea 5, después de lo cual se centrifuga de nuevo. El sedimento formado por finas partículas de quitina se guarda en nevera para diluir en el momento oportuno. Determinando el peso seco de 0,5 a 1 ml de una suspensión de quitina coloidal y leyendo a 660 nm diluciones de esta suspensión, se puede hacer una equivalencia de peso seco a densidad óptica (absorbancia). Determinación en 3 ml:

<u>Concentración</u>	<u>Absorbancia</u>
53,3 µg	0,013
106,6 "	0,026
266,6 "	0,062

Procedimiento: En un tubo de ensayo se tomaron 0,9 ml de una solución de sustrato y 0,1 ml de líquido de cultivo o bien 0,1 ml de una solución de enzimas en tampón (1 mg/ml). Los tubos se agitaron suavemente y se incubaron a 37°C un tiempo determinado, según la actividad que se estuviera valorando. Cuando el tiempo de incubación fue superior a 6 horas, los tubos se taparon con un algodón impregnado en tolueno, para evitar contaminaciones. Para parar la reacción enzimática los tubos se metieron en baño de agua a 100°C 5 minutos. Paralelamente a los problemas se incubaron blancos de enzima y sustrato. En la Tabla 1 se detallan las actividades ensayadas, los sustratos empleados, el tiempo de incubación y el producto resultante de la hidrólisis enzimática.

La glucosa y el ácido galacturónico, se determinaron por el método de Somogyi (1952) y Nelson (1944). La N-acetilglucosamina resultante de la hidrólisis enzimática de la quitina, se determinó por el método de Tracey (1955).

4.- Extracción con piridina de los azúcares resultantes de la hidrólisis enzimática para cromatografía en papel.

Tiene por objeto eliminar de los hidrolizados enzimáticos el tampón borato-citrato-fosfato. Para ello los hidrolizados se ponen en cápsulas de porcelana y se evaporan

Tabla 1. Actividades enzimáticas valoradas en el líquido de cultivo

<u>Actividad ensayada</u>	<u>Sustrato</u>	<u>T° incubación</u> <u>(horas)</u>	<u>Producto</u> <u>hidrólisis</u>
exo- β -1,3 (4)-glucanasa (EC 3.2.1.6)	Laminarina	0,5-1	Glucosa
Invertasa (EC 3.2.1.26)	Sacarosa	" "	"
β -1,4-galactosidasa (EC 3.2.1.23)	Lactosa	" "	"
α -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.20)	Maltosa	" "	"
α -1,6-galactosidasa (EC 3.2.1.22)	Melibiosa	" "	"
β -1,3 (6)-glucanasa	β -glucano (1)	24	"
β -1,6-glucanasa	Pustulano (2)	"	"
β -1,3-glucanasa	β -glucano (3)	"	"
Amilasa (EC 3.2.1.1)	Almidón soluble	"	"
Celulasa (EC 3.2.1.4)	Celulosa	"	"
Pectinasa (EC 3.2.1.15)	Pectina	"	ácido galacturónico
Quitinasa (EC 3.2.1.14)	Quitina coloidal	3-5	N-acetilglucosamina
(1) β -1,3(6)-glucano obtenido de <u>Pullularia pullulans</u> en nuestro laboratorio			
(2) β -1,6-glucano	" <u>Umbilicaria pustulata</u>	"	"
(3) β -1,3-glucano	" <u>Botrytis cinerea</u>	"	"

en cámara desecadora con vacío, pentóxido de fósforo y sosa, calentando primero a 60°C y luego a 30°C hasta el secado total para evitar caramelización de los azúcares; a continuación se añaden 0,5 ml de piridina, a cada cápsula, se introducen a baño de agua a 50°C, se agita bien el contenido, y el líquido se vierte en un tubo y se tapa. Se añaden otros 0,5 ml y se repite la misma operación. Si quedara después de la segunda extracción sedimento del tampón, se filtra el contenido de los tubos a través de papel de filtro, previamente humedecido con piridina. Los hidrolizados enzimáticos así tratados se cromatografían a continuación.

APARATOS UTILIZADOS

- Incubador orbital Gallenkamp IH-465
- pH-metro Crison mod. digit 74
- Espectrofotómetro visible-ultravioleta Perkin-Elmer 55B
- Espectrofotómetro infrarrojo Perkin-Elmer 457
- Centrifuga Sorvall SS-3, rotor GSA
- Balanza analítica Mettler H-35 AR
- Estufa Selecta mod. 200
- Omni-Mixer Ivan Sorvall Inc., Norwalk, Connecticut, USA
- Rotavapor Büchi R.
- Incubador estático Mazzali IONOS 102
- Analizador elemental Perkin-Elmer 240
- Sistema Kjeltac I compuesto por la unidad de digestión DS-6 (Digestor 1007) y la unidad de destilación 1001 de Tecator Instruments
- Analizador automático de aminoácidos Jeol JLAC-5AH

PRODUCTOS

Los productos utilizados en este trabajo proceden preferentemente de las casas Merk y Riedel- de Haen AG, Seelze-Hannover. Cuando no, son de grado analítico.

Las enzimas comerciales utilizadas proceden de las casas Koch-Light (quitinasa fúngica EC 3.2.1.14) y Boehringer (α-galactosidasa de semillas de café EC 3.2.1.22)

RESULTADOS

I.- CARACTERIZACION DEL POLISACARIDO EXTRACELULAR DE ASPERGILLUS NIDULANS

1.- Análisis químico

La composición del polisacárido extracelular de Aspergillus nidulans se muestra en la Tabla 2.

Los aminoazúcares (60-70%) se determinaron por el método de Rondle y Morgan (1955) en el polisacárido hidrolizado con HCl 4N durante 2 horas (condiciones óptimas para la liberación de aminoazúcares), y se identificaron por cromatografía en papel como galactosamina y trazas de glucosamina (Fig. 6), utilizando para el revelado p-dimetilaminobenzaldehído (Dawson y col., 1962).

Para la determinación de carbohidratos totales (15-20%) se pesaron en un tubo de ensayo unos miligramos de polisacárido, diluyendo en caso necesario con $H_2SO_4-H_2O$ (2:1) una vez acabada la reacción. En el polisacárido hidrolizado con HCl 2N durante 2 horas (condiciones óptimas para la liberación de azúcares), los azúcares se identificaron por cromatografía en papel como galactosa y trazas de glucosa (Fig. 7), utilizando para el revelado ftalato de anilina (Dawson y col., 1962).

Para la determinación de proteína total (1,5-3%), a 6 mg de polisacárido se le añadió 1 ml de NaOH 1N, dejando que tuviera lugar la extracción de proteínas a temperatura ambiente durante toda la noche. De esta solución se tomaron alícuotas para hacer la determinación de proteína.

El ion fosfato (0,9-1,3) se determinó en el polisacárido hidrolizado con HCl 0,2N y 2N durante 2 horas.

TABLA 2. Composición del polisacárido extracelular de Aspergillus nidulans (%)

Galactosamina	60-70
Carbohidratos	15-20
Proteína	1,5-3
Ion fosfato	0,9-1,3
Ion acetato	11-13
Acidos urónicos	negativo
Ion sulfato	negativo

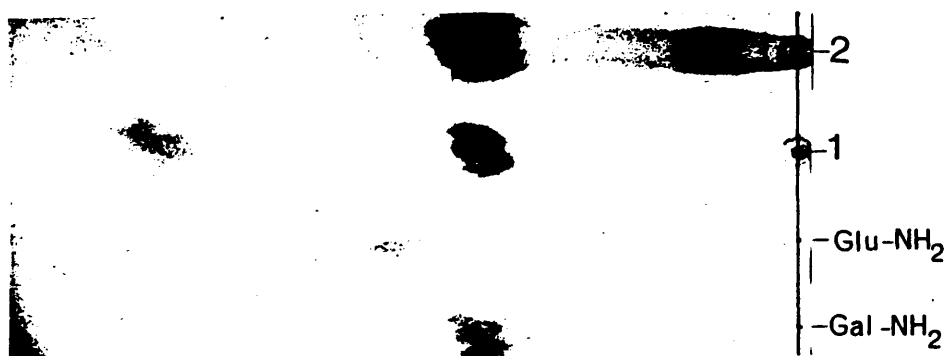


FIGURA 6

Cromatograma de aminoazúcares del polisacárido de

A. nidulans

Controles de galactosamina (Gal-NH₂) y glucosamina (Glu-NH₂)

1= Hidrolizado con HCl 0,2N 2h

2= " " " 4N 2h

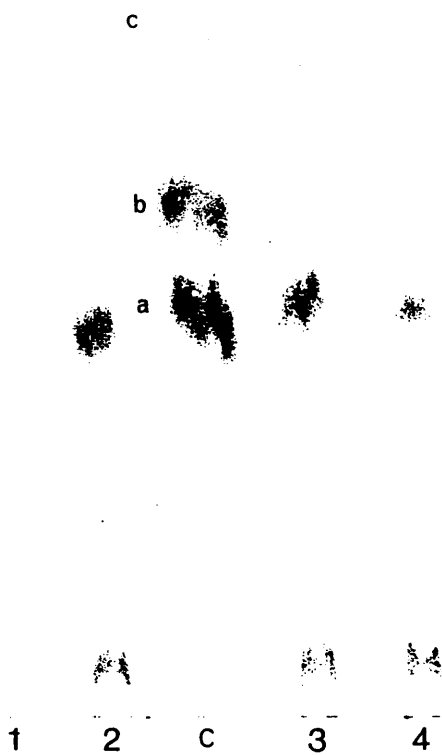


FIGURA 7

Cromatograma de azúcares del polisacárido de A. nidulans.

C= Controles de galactosa (a), glucosa (b) y manosa (c).

1= Hidrolizado con HCl 0,2N 2h

2= " " " 2N 2h

3= " " " 4N 2h

4= " " " 4N 4h

El ion acetato (11-13%) acetilaría aproximadamente el 45-50% de la galactosamina.

Acidos urónicos e ion sulfato no se detectaron en el polisacárido.

Para el análisis de aminoácidos y de galactosamina con el analizador automático de aminoácidos, 6 mg de polisacárido se hidrolizaron con 1 ml de ácido clorhídrico 4N y 6N por distintos periodos de tiempo en estufa a 105°C. En los tubos de hidrólisis se hizo el vacío con una bomba de agua (-60 cm) para evitar la oxidación de los productos resultantes. El HCl se eliminó de los hidrolizados utilizando rotavapor, y éstos se resuspendieron en 4 ml de HCl 0,01N y se llevaron al analizador automático de aminoácidos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. El triptófano no se detectó ya que este aminoácido se destruye al hidrolizar con HCl 4N ó 6N.

El aumento en la cantidad de amoniaco con la concentración del ácido clorhídrico y con el tiempo de hidrólisis es debido a la destrucción de algunos aminoácidos.

Para los aminoácidos que son liberados lentamente tomamos el valor más alto obtenido.

Esta proteína parece una contaminación arrastrada al precipitar el polisacárido del medio de cultivo.

El tiempo de hidrólisis y la concentración de ácido clorhídrico óptimas para la liberación de la galactosamina presente en el polisacárido es 2 horas HCl 4N, obteniéndose un 73% de galactosamina. Estos resultados están de acuerdo con el contenido de galactosamina determinado por el método de Rondle y Morgan (1955) y con el contenido de galactosami

TABLA 3. Composición de aminoácidos y galactosamina del polisacárido hidrolizado con HCl 4N y 6N por distintos tiempos

Aminoácidos	4N 2h (%)	4N 4h (%)	4N 6h (%)	6N 6h (%)	6N 24h (%)	valor medio (%)
Trp	-	-	-	-	-	-
Lys	-	0,256	0,315	1,370	0,709	1,370
His	-	-	0,133	-	trazas	0,133
NH ₃	0,102	0,178	0,243	0,442	1,456	1,456
Arg	-	trazas	trazas	trazas	trazas	trazas
Asp	0,234	0,212	0,226	0,247	0,274	0,274
Thr	0,060	0,067	0,083	0,113	0,116	0,116
Ser	0,114	0,112	0,121	0,143	0,130	0,143
Glu	0,124	0,127	0,148	0,150	0,199	0,199
Pro	0,048	trazas	trazas	trazas	trazas	trazas
Gly	0,147	0,238	0,129	0,123	0,128	0,238
Ala	0,140	0,251	0,115	0,101	0,098	0,251
Cys	-	-	-	-	-	-
Val	trazas	trazas	trazas	0,077	0,135	0,135
Met	trazas	trazas	trazas	trazas	trazas	trazas
Ile	trazas	0,014	0,026	0,062	0,079	0,079
Leu	0,013	0,061	0,078	0,131	0,144	0,144
Tyr	-	0,027	0,029	trazas	-	0,028
Phe	-	0,081	0,101	0,134	0,130	0,134
Gal-NH ₂	73,00	64,00	67,00	57,71	37,62	73,00

na calculado a partir del porcentaje de nitrógeno (4,82%), obtenido por análisis elemental del polisacárido. En la Tabla 4 se muestran los resultados del análisis elemental del polisacárido. El oxígeno se ha calculado por diferencia.

TABLA 4. Análisis elemental del polisacárido (%)

Carbono	41,59
Hidrógeno	6,39
Nitrógeno	4,82
Oxígeno	47,20

2.- Análisis estructural

- a) Oxidación con periodato sódico del polisacárido. Valoración de ácido fórmico y formaldehído en la mezcla de oxidación. Degradación de Smith. Identificación de los productos resultantes por cromatografía en papel.

En la Tabla 5 se muestra el consumo de periodato sódico para la glucosa y el polisacárido a distintos tiempos.

El polisacárido apenas consumió periodato a las 192 horas, lo que podría indicar una predominancia de enlaces 1→3, que no consumen periodato. Sin embargo, hay que tener en cuenta que un 45-50% de la galactosamina está N-acetilada, y que por tanto será resistente a la oxidación con periodato, incluso estando sustituida en el carbono 4.

Los resultados de la valoración de ácido fórmico en la mezcla de oxidación con periodato se muestran en la Tabla 6. La baja producción de ácido fórmico obtenida in-

TABLA 5. Moles de NaIO_4 consumidos por mol de hexosa anhidra oxidada

T° INCUBACION (horas)	GLUCOSA	POLISACARIDO
0,5	2,25	0,06
1	2,49	0,10
2	3,40	0,24
4	3,84	0,28
7	3,74	0,22
24	4,20	0,32
30	4,02	0,33
48	4,50	0,29
192	4,44	0,26

dica un bajo contenido de enlaces 1→6.

La determinación de formaldehído en la mezcla de oxidación con periodato dió resultados negativos.

Conociendo los moles de periodato consumidos y el ácido fórmico producido, se puede calcular el porcentaje de enlaces 1→6, 1→4 y 1→3 en el polisacárido, de acuerdo con la siguiente relación (Jeanes, 1965):

$$\begin{aligned} (\%) \text{ Enlaces } 1 \rightarrow 6 &= n^\circ \text{ moles ácido fórmico} \times 100 \\ \text{" " } 1 \rightarrow 4 &= n^\circ \text{ moles periodato} \times 100 - (2 \times 100 \times \\ &\quad n^\circ \text{ moles de ácido fórmico)} \\ \text{" " } 1 \rightarrow 3 &= 100 - \% \text{ enlaces } (1 \rightarrow 4 + 1 \rightarrow 6) \end{aligned}$$

En la Tabla 7 se muestra el porcentaje de cada tipo de enlace en el polisacárido de A. nidulans.

Los productos resultantes de la degradación de Smith del polisacárido oxidado con periodato, fueron identificados por cromatografía en papel como galactosa y galactosamina, utilizando para el revelado nitrato de plata amoniacal (Hugh y Jones, 1962). No fueron detectados glicerol, ni treitol, confirmando la existencia de un polisacárido con uniones 1→3, predominantemente.

b) Espectroscopía infrarroja del polisacárido

En el espectro infrarrojo (Fig. 8A) las bandas de absorción a 820 y 850 cm^{-1} y la ausencia de absorción a 890 cm^{-1} , indican la existencia de enlaces glicosídicos con configuración α entre los residuos de hexosa (Barker, Bourne, y Whiffen, 1956). Las bandas a 1560 y 1650 cm^{-1} son características del enlace -CO-NH- presente en proteínas y en grupos N-acetilo. La intensidad de estas bandas disminuyó al calentar el polisacárido a 100°C con NaOH al 50% por distintos períodos de tiempo (Figs. 8B y 8C), indicando la

TABLA 6. Valoración de ácido fórmico en la mezcla de oxidación con periodato sódico

	moles de HCOOH/ resíduo hexosa anhidra
Glucosa	4,90
Polisacárido	0,035

TABLA 7. Porcentaje de enlaces en el polisacárido

Tipo de enlace	(%)
1→6	3,5
1→4	22,0
1→3	74,5

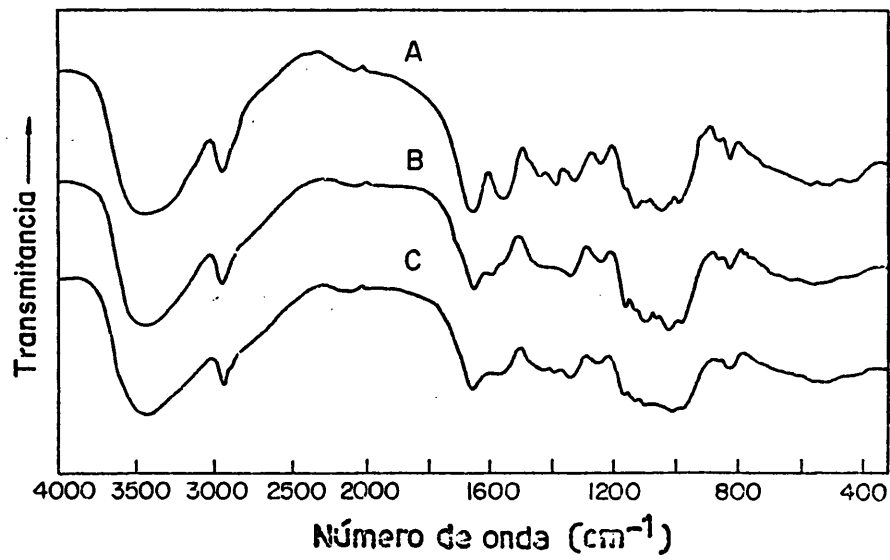


Fig. 8. Espectros infrarrojos. (A) Polisacárido extracelular de *A. nidulans*, (B) 50 minutos de tratamiento a 100°C con NaOH al 50%, (C) 3 horas de tratamiento a 100°C con NaOH al 50%.

existencia de grupos N-acetilo en el polisacárido. La ausencia de absorción a 1750 cm^{-1} indica la no existencia de grupos O-acetilo.

c) Hidrólisis enzimática del polisacárido y actividades enzimáticas en el líquido de cultivo de *A. nidulans*

Con el fin de aislar la enzima o enzimas responsables de la degradación del polisacárido se emplearon matraces Erlenmeyer de 1 litro conteniendo 100 ml del medio base con 4 g/l de casaminoácidos como fuente de nitrógeno. Los cultivos se incubaron estáticamente y se tomaron muestras a los 30, 60 y 90 días de incubación. Las enzimas se precipitaron del líquido de cultivo con ácido tánico al 1% (Shibata y Nisizawa, 1965). El precipitado enzimático así obtenido no fue activo frente al polisacárido extracelular en ninguna de las tres formas en que se trató de hidrolizar éste: a) seco y pulverizado, b) en el líquido de cultivo dializado y c) en forma coloidal, es decir después de aplicarle el tratamiento aplicado a la quitina para obtener quitina coloidal.

En vista de los resultados negativos obtenidos en la hidrólisis enzimática del polisacárido cuando se trató con el precipitado obtenido con ácido tánico, se emplearon el líquido de cultivo junto con micelio triturado, el líquido de cultivo filtrado, o bien enzimas líticas obtenidas del líquido de cultivo por precipitación con sulfato amónico al 60%, etanol al 50% ó acetona al 30%, no obteniendo resultados positivos en ninguno de los casos, a pesar de que se llegó hasta períodos de incubación de 10 días, y a que se aumentó cinco veces la concentración enzimática.

Tampoco fueron activas frente al polisacárido las enzimas comerciales que se utilizaron: α -galactosidasa (Boehringer), ni quitinasa (Koch-Light).

Sin embargo, se detectaron otra serie de actividades enzimáticas utilizando frente a distintos sustratos los extractos enzimáticos obtenidos del líquido de cultivo por precipitación con ácido tánico al 1%. Los resultados se muestran en la Tabla 8. En general se observa que la actividad específica máxima se obtiene cuando se utilizan líquidos de cultivo de 60 días. En el caso de la quitinasa y la β -1,6-glucanasa, la actividad específica máxima se obtiene en los líquidos de cultivo de 90 días.

Los valores más altos de actividad específica se obtuvieron para la β -1,3-glucanasa que actúa sobre el β -1,3 glucano producido por Botrytis cinerea (1643 μ moles de glucosa/mg proteína/minuto) y los más bajos para la pectinasa (0,77); la actividad específica de esta última enzima por tanto es aproximadamente 2000 veces menor.

No se detectó actividad enzimática frente a lactosa, maltosa, melibiosa, o celulosa.

II.- FRACCIONAMIENTO DEL POLISACARIDO

1.- Precipitación con bromuro de cetiltrimetilamonio al 5% (p/v)

Por este método tratamos de averiguar la naturaleza del polisacárido extracelular producido por A. nidulans. Este no precipitó con el bromuro de cetiltrimetilamonio, confirmando que se trataba de un polisacárido neutro.

TABLA 8. Actividades enzimáticas detectadas en el líquido de A. nidulans de diferentes tiempos de incubación

Sustrato	T° de incubación del cultivo (1)			Actividad ensayada
	30 días	60 días	90 días	
Laminarina	376,00	458,00	380,00	exo- β -1,3 (4)-glucanasa (EC 3.2.1.6)
Sacarosa	53,30	60,00	10,00	Invertasa (EC 3.2.1.26)
Lactosa	0,00	0,00	0,00	β -1,4-galactosidasa (EC 3.2.1.23)
Maltosa	0,00	0,00	0,00	α -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.20)
Melibiosa	0,00	0,00	0,00	α -1,6-galactosidasa (EC 3.2.1.22)
Quitina coloidal	43,00	27,00	47,70	Quitinasa (EC 3.2.1.14)
β -glucano (2)	0,96	2,50	0,05	β -glucanasa
β -1,6-glucano (3)	1,42	2,50	4,29	β -1,6-glucanasa
Pectina	0,21	0,77	0,55	Pectinasa (EC 3.2.1.15)
Almidón soluble	1,87	2,50	1,47	Amilasa (EC 3.2.1.1)
Celulosa	0,00	0,00	0,00	Celulasa (EC 3.2.1.4)
β -glucano (4)	1046,00	1643,00	1448,00	β -glucanasa

(1) Actividad específica: μ moles de glucosa/mg proteína/min. En el caso de la quitina valoramos μ moles de N-acetilglucosamina

(2) Obtenido en nuestro laboratorio de Pullularia pullulans (Leal-Serrano y col., 1980)

(3) Pustulano preparado según Reese y col., 1962

(4) Obtenido en nuestro laboratorio de Botrytis cinerea (Leal y col., 1979)

2.- Precipitación con metanol

Para tratar de fraccionar el polisacárido de A. nidulans, al líquido de cultivo se le añadieron distintas concentraciones de metanol, y se obtuvieron cuatro fracciones.

El peso seco de polisacárido de cada una de las fracciones y el porcentaje que representa con respecto al total, se muestran en la Tabla 9.

Cada una de las fracciones obtenidas se hidrolizó con HCl 2N y 4N durante 2 horas. También se hidrolizó polisacárido precipitado con metanol (v/v), sin fraccionar, para que sirviera como control. En la Tabla 10 se muestra la composición de cada una de las fracciones y del polisacárido sin fraccionar (F_t). El polisacárido total (F_t) es el que presenta un mayor contenido de aminoazúcares. De la fracción 1 a la 4 se observa una disminución en el contenido de aminoazúcares y un aumento en el contenido de carbohidratos. El contenido en iones fosfato y acetato es similar en todas las fracciones.

Los azúcares fueron identificados por cromatografía en papel como glucosa y galactosa (Fig. 9) en las fracciones de polisacárido hidrolizadas con HCl 2N durante 2 horas. La intensidad de las manchas de azúcar aumenta de la fracción 1 a la 4, confirmando los resultados cuantitativos obtenidos por el método de la Antrona (Loewus, 1952).

En el solvente utilizado para la separación de azúcares los aminoazúcares quedan retenidos cerca del origen.

TABLA 9. Peso seco de las fracciones obtenidas al precipitar el polisacárido de A. nidulans con distintas concentraciones de metanol, y porcentaje de cada fracción con respecto al total

<u>Fracción</u> §	<u>Peso seco de polisacárido* (mg)</u>	<u>(%)</u>
F ₁	130,1	12,220
F ₂	540,8	50,817
F ₃	345,7	32,480
F ₄	47,6	4,473

* Estas cifras corresponden al polisacárido precipitado de un litro de líquido de cultivo de 6 días de crecimiento en agitación.

§ Fracción 1 (F₁) precipitó con metanol al 12,5%
 Fracción 2 (F₂) " " " 25,0%
 Fracción 3 (F₃) " " " 37,5%
 Fracción 4 (F₄) " " " 50,0%

TABLA 10. Composición del polisacárido total (sin fraccionar) de A. nidulans y de las distintas fracciones obtenidas con metanol

Fracción	(%) Aminoazú- cares	(%) Carbohidra- tos totales	(%) Ion fosfato	(%) Ion acetato
F _t	67,29	23,065	1,28	12,60
F ₁	64,84	21,740	0,94	13,68
F ₂	53,23	31,425	0,90	11,39
F ₃	43,97	41,755	0,94	10,51
F ₄	38,95	45,480	1,19	12,32

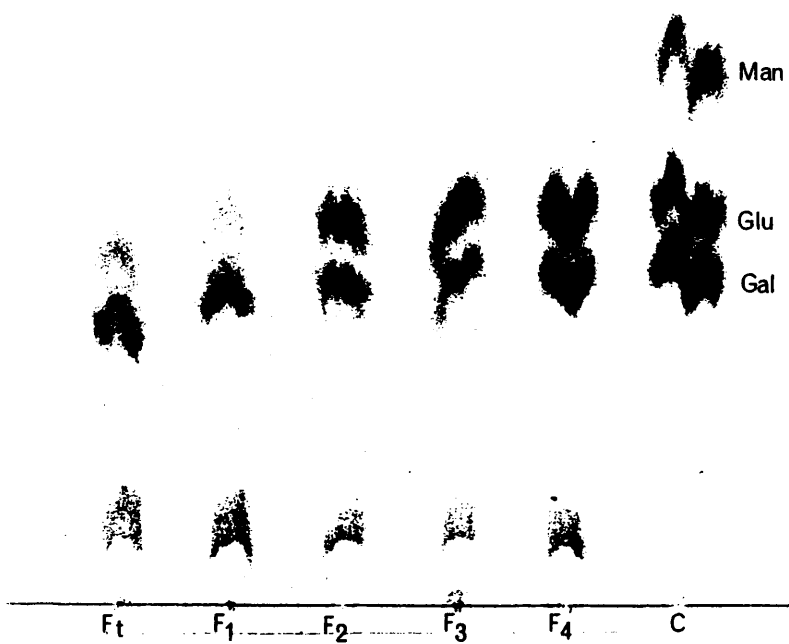


FIGURA 9

Cromatograma de azúcares de las distintas fracciones de polisacárido precipitadas con metanol e hidrolizadas con HCl 2N durante 2 horas. C = controles de galactosa, glucosa y manosa.

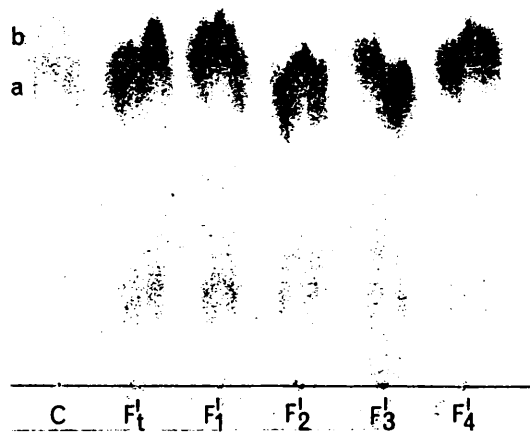


FIGURA 10

Cromatograma de aminoazúcares de las distintas fracciones de polisacárido precipitadas con metanol e hidrolizadas con HCl 4N durante 2 horas. C = controles de galactosamina(a) y glucosamina (b)

Los aminoazúcares fueron identificados por cromatografía en papel como galactosamina (Fig. 10) en las fracciones de polisacárido hidrolizadas con HCl 4N durante 2 horas. Se observa una disminución en el contenido de galactosamina de la fracción 1 a la 4, confirmando los resultados cuantitativos obtenidos por el método de Rondle y Morgan (1955).

Los resultados obtenidos al precipitar con distintas concentraciones de metanol el líquido de cultivo de A. nidulans indican que es posible obtener una serie de fracciones de polisacárido, cuyo contenido en aminoazúcares disminuye según aumenta la concentración de metanol utilizada en la precipitación. Por otra parte, al no existir diferencias significativas en el contenido de acetato de las distintas fracciones, y haberlas en el contenido de aminoazúcares, las fracciones precipitadas con mayor concentración de metanol tienen un mayor porcentaje de galactosamina N-acetilada. Estos porcentajes son los siguientes:

$F_t = 45,77\%$, $F_1 = 51,58\%$, $F_2 = 52,32\%$, $F_3 = 58,45\%$, $F_4 = 77,33\%$.

III.- SOLUBILIDAD DEL POLISACARIDO

1.- Tratamiento con agua destilada a temperatura ambiente

A 200 mg de polisacárido se le añadieron 50 ml de agua destilada poco a poco, utilizando el mortero y el homogenizador potter hasta conseguir una suspensión homogénea. A continuación se centrifugó. Al sobrenadante se le añadió

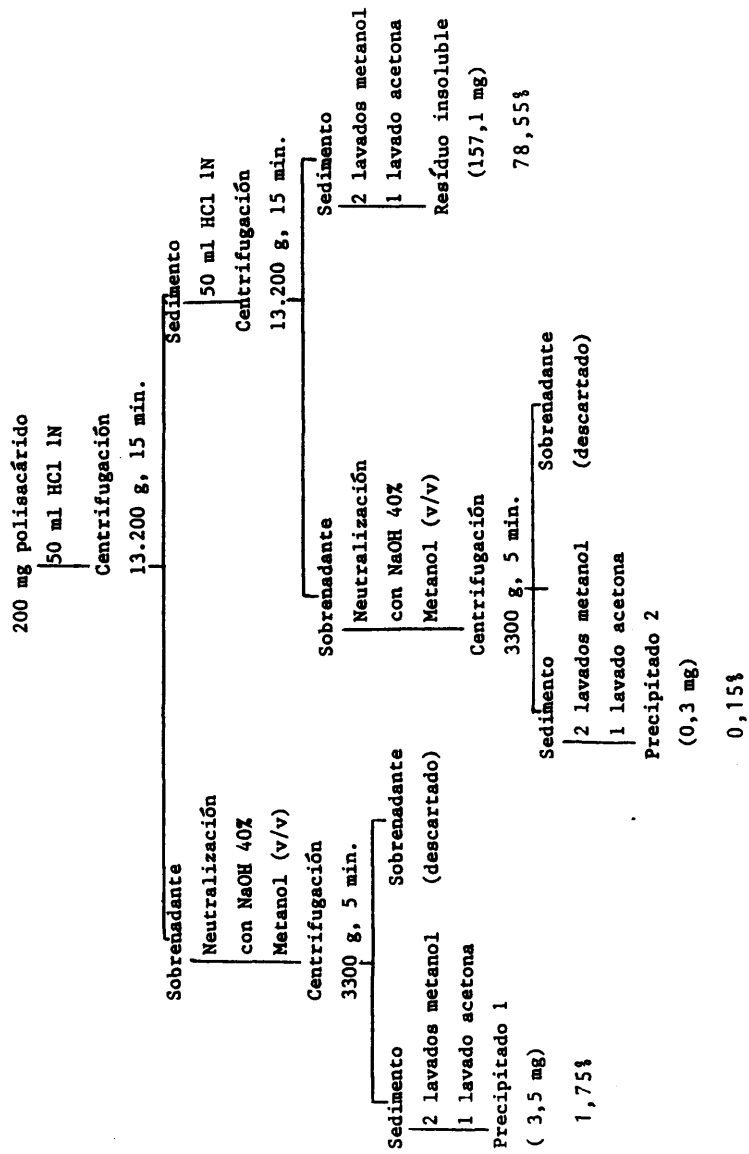
metanol (v/v) obteniéndose un precipitado que se recogió por centrifugación, se lavó dos veces con metanol y una vez con acetona y se desecó a 60°C hasta peso constante. Esta operación se repitió en el sedimento hasta que al añadir metanol (v/v) al sobrenadante no se observó la aparición de precipitado de polisacárido. El esquema seguido se muestra en la Fig. 11, junto con el peso seco de cada fracción y el porcentaje que representan con respecto al peso seco inicial del polisacárido.

El polisacárido de A. nidulans una vez precipitado del líquido de cultivo por la adición de alcohol (v/v) pierde su solubilidad en agua. El porcentaje de polisacárido que se disolvió en agua fue del 3,3% y la recuperación fue del 75,2%.

2.- Tratamiento con HCl 1N a temperatura ambiente

A 200 mg de polisacárido se le añadieron poco a poco 50 ml de HCl 1N, utilizando como en el tratamiento anterior el mortero y el homogeneizador potter. A continuación se centrifugó. El sobrenadante obtenido se neutralizó con NaOH al 40% y se le añadió metanol (v/v) obteniéndose un precipitado que se recogió por centrifugación, se lavó dos veces con metanol y una con acetona y se desecó a 60°C hasta peso constante. El sedimento se trató de nuevo con HCl 1N hasta que al añadir metanol al sobrenadante no se observó la aparición de precipitado, señal de que no se disolvía más polisacárido en HCl 1N (Fig. 12). El porcentaje de polisacárido disuelto fue del 1,9%, y la recuperación obtenida del 80,45%. El polisacárido por tanto es menos soluble en HCl 1N que en agua.

Fig.12. Tratamiento del polisacárido con HCl 1N a temperatura ambiente: Peso seco de las fracciones obtenidas



3.- Tratamiento con NaOH 1N a temperatura ambiente

Sobre 100 mg de polisacárido extracelular de Aspergillus nidulans finamente pulverizado se añadieron poco a poco 50 ml de NaOH 1N utilizando un mortero y un homogenizador potter hasta conseguir una suspensión homogénea. A continuación se centrifugó. El sobrenadante se neutralizó con HCl concentrado y se le añadió metanol (v/v), obteniendo un precipitado que se recogió por centrifugación y se lavó dos veces con metanol y una vez con acetona y se desecó hasta peso constante a 60°C. El sedimento se volvió a tratar con NaOH 1N hasta que al añadir metanol (v/v) al sobrenadante no se observó la aparición de precipitado, indicando la ausencia de polisacárido disuelto en NaOH 1N. El esquema seguido fue similar al de los tratamientos anteriores, utilizándose un volumen total de NaOH 1N de 155 ml.

El porcentaje de polisacárido disuelto en NaOH 1N fue del 44,1%, el porcentaje de material insoluble 31% y la recuperación fue del 75,1%.

4.- Composición de las fracciones de polisacárido obtenidas por tratamiento con agua destilada, HCl 1N y NaOH 1N

Las fracciones de polisacárido obtenidas por tratamiento con agua destilada, HCl y NaOH 1N se hidrolizaron con HCl 2N y 4N durante 2 horas.

En la Tabla 11 se muestran el contenido de aminoazúcar y carbohidratos de dichas fracciones. El aminoazúcar fue identificado por cromatografía en papel como galactosamina. Los carbohidratos fueron identificados por cromatografía en papel como galactosa.

TABLA 11. Composición de las fracciones de polisacárido obtenidas por tratamiento con agua destilada, HCl 1N y NaOH 1N

<u>Fracción</u>	<u>Cantidad*</u>	<u>Aminoazúcar (%)</u>	<u>Carbohidratos (%)</u>
Soluble H ₂ O	3,3	59,44	18,63
Insoluble H ₂ O	71,9	67,25	17,37
Soluble HCl 1N	1,9	58,42	16,69
Insoluble HCl 1N	78,5	63,86	16,45
Soluble NaOH 1N	44,1	56,04	20,00
Insoluble NaOH 1N	31,0	75,40	15,61

* Los valores se refieren al % de las fracciones en el polisacárido seco

Las fracciones insolubles parecen poseer un contenido mayor en galactosamina, que las fracciones solubles. En cuanto al contenido de carbohidratos, tienen un porcentaje mayor las fracciones solubles que las insolubles, excepto en el caso de las fracciones soluble e insoluble en HCl 1N que tienen un contenido similar.

En el espectro infrarrojo no se detectaron estas diferencias cuantitativas en la composición del polisacárido.

IV.- FISILOGIA DE LA PRODUCCION DEL POLISACARIDO

1.- Efecto de las condiciones de cultivo

a) Formación en cultivos sumergidos

Matraces de 1 litro conteniendo 500 ml del medio base fueron incubados en un incubador orbital Gallenkamp IH-465 a distintas velocidades de agitación. Se formó polisacárido a 50, 100, 120 y 150 r.p.m., observándose poca o ninguna producción a 200 ó 250 r.p.m. La producción de polisacárido en cultivos sumergidos varía con la velocidad de agitación.

b) Formación en cultivos estáticos: relación superficie/volumen

Matraces de 250 ml conteniendo 25 ó 100 ml del medio base fueron incubados estáticamente. En las Figs. 13 y 14 pueden observarse producción de polisacárido, crecimiento y cambios en el medio de cultivo. La máxima producción de polisacárido fue 100 mg/100 ml en los cultivos de 25 ml, y 30 mg/100 ml en los de 100 ml. La producción de polisacárido disminuye con la relación superficie/volumen.

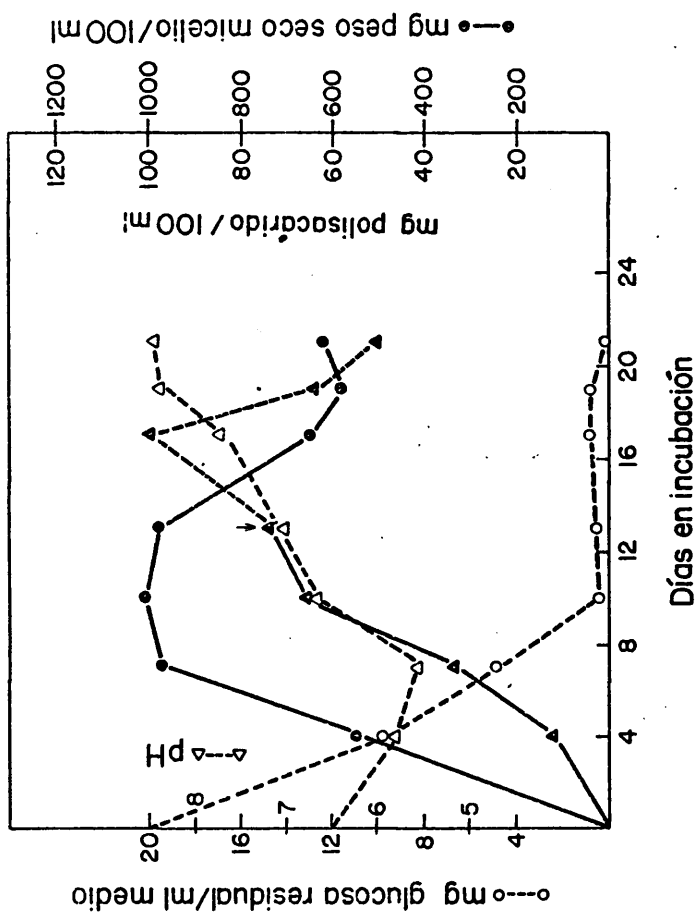


Fig. 13. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido, cuando *A. nidulans* se cultiva en matraces de 250 ml con 25 ml del medio base. A partir de los 13 días el polisacárido fue recogido por centrifugación.

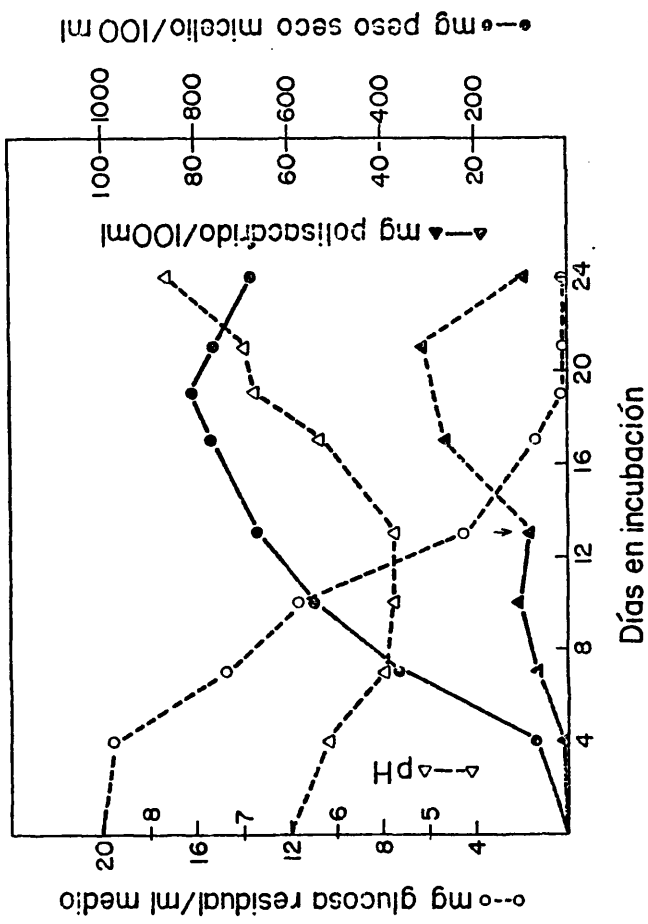


Fig. 14. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción del polisacárido, cuando *A. nidulans* se cultiva en matraces de 250 ml con 100 ml del medio base. A partir de los 13 días el polisacárido fue recogido por centrifugación.

2.- Efecto de la fuente de carbono

a) Efecto de la concentración de glucosa

La glucosa en el medio base fue ajustada a las siguientes concentraciones: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 g/l. Los medios se distribuyeron en porciones de 25 ml en matraces de 250 ml y se incubaron estáticamente. A los 5 días de incubación la glucosa ha sido completamente utilizada en los cultivos que contienen 5 y 10 g de glucosa, y la degradación de polisacárido ha empezado en los cultivos de 5 g/l, como lo demuestra la gran cantidad de polisacárido recogido por centrifugación. A los 9 días la glucosa ha sido agotada en todos los cultivos, obteniéndose una producción similar de polisacárido entre 15 y 30 g/l de glucosa, mayor que la obtenida a los 5 días. A los 14 días el polisacárido es recogido totalmente por centrifugación para 5, 10 y 15 g/l de glucosa parcialmente para las concentraciones restantes (Fig. 15). El polisacárido se forma en todas las concentraciones de glucosa ensayadas.

b) Utilización de distintos azúcares

En el medio base con 4 g/l de casaminoácidos como única fuente de nitrógeno, la glucosa es sustituida por el azúcar que se quiere ensayar (20 g/l). 500 ml de medio en matraces de 1 litro fueron incubados a 100 r.p.m. durante 6 días. Se produjo polisacárido con todos los azúcares ensayados; fructosa y galactosa fueron los mejores azúcares para la producción de polisacárido y crecimiento (Tabla 12).

3.- Efecto de la fuente de nitrógeno

a) Utilización de distintas fuentes de nitrógeno

Se han ensayado distintos aminoácidos, tartrato diamónico y nitrato potásico en concentraciones equivalentes a

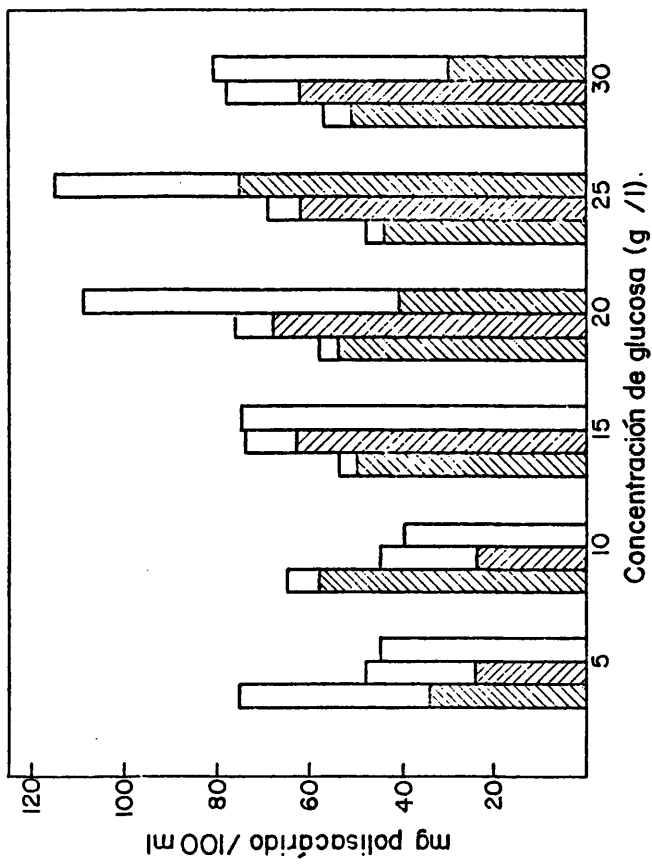


Fig. 15. Producción de polisacárido con diferentes concentraciones de glucosa. De izquierda a derecha para cada concentración 5, 9 y 14 días en incubación. ▨ Recogido con espátula. □ Recogido por centrifugación.

TABLA 12. Efecto de la fuente de carbono en la producción de polisacárido

Fuente de carbono *	pH	Polisacárido (mg/100 ml)	Micelio (mg/100 ml)
Glucosa	4,82	23	236
Sacarosa	4,98	23	243
Fructosa	5,37	38	313
Galactosa	5,20	33	300
Celobiosa	6,75	23	229
Maltosa	5,71	24	270

(* Todos los azúcares utilizados fueron de la serie D)

0,74 g/l de nitrógeno (cantidad presente en 4 g/l de asparagina monohidrato). Con L-alanina hubo buen crecimiento (1130 mg/100 ml) y se alcanzó la máxima producción de polisacárido a los 10 días de incubación (89 mg/100 ml), antes del comienzo de la autólisis (Fig. 16). Con ácido L-aspartico el crecimiento fue similar al obtenido con L-alanina (1140 mg/100 ml). El pH aumentó rápidamente llegando a 7,45 a los 3 días de incubación, y se obtuvo una baja producción de polisacárido 14 mg/100 ml (Fig. 17). Con L-glutamina el crecimiento máximo se observó a los 14 días de incubación (850 mg/100 ml); el rendimiento obtenido de polisacárido fue 36,5 mg/100 ml (Fig. 18).

El ácido L-glutámico fue la mejor fuente de nitrógeno para la producción de polisacárido (105,0 mg/100 ml) y crecimiento (1390 mg/100 ml). El pH inicial fue 3,22 (Fig. 19).

Con L-leucina y L-valina hubo poco crecimiento y no se formó polisacárido (Figs. 23 y 24). Con L-fenilalanina crecimiento (194 mg/100 ml) y producción de polisacárido (10,4 mg/100 ml) fueron bajos, el pH se mantuvo entre 3,5-4,0 y la glucosa apenas se consumió (Fig. 20).

Con tartrato diamónico y nitrato potásico el máximo crecimiento fue de 660 mg/100 ml en ambos y la producción de polisacárido 61 y 35 mg/100 ml respectivamente (Figs. 21 y 22).

La fuente de nitrógeno utilizada afecta la producción de polisacárido. En la Tabla 13 se muestra un resumen de las gráficas anteriores. Las cifras de pH, micelio y días en incubación corresponden al día de máxima producción de polisacárido.

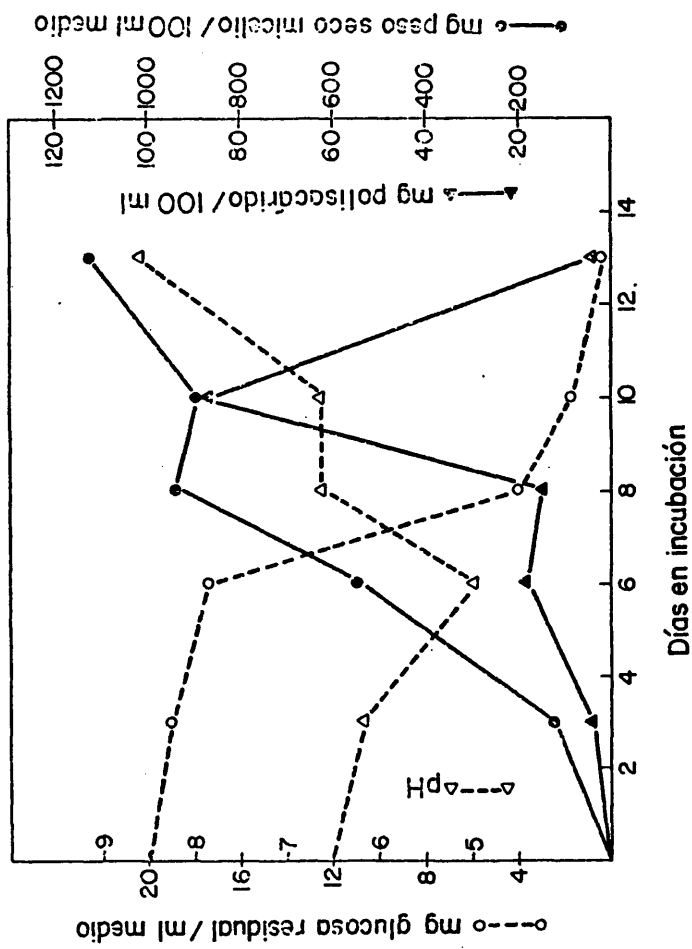


Fig. 16. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando A. nidulans crece sobre L-alanina.

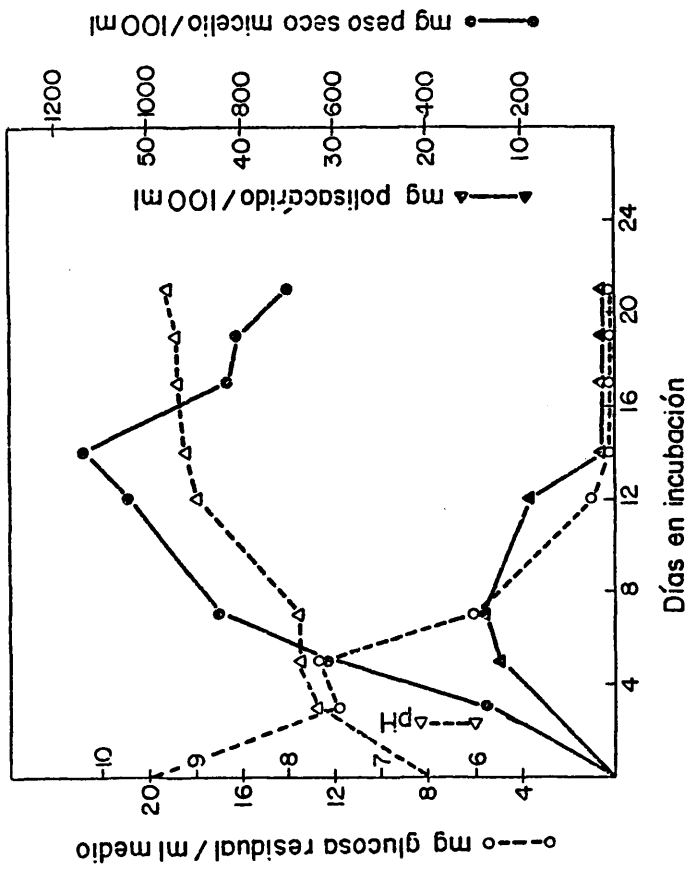


Fig. 17. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *A. nidulans* crece sobre ácido L-aspártico.

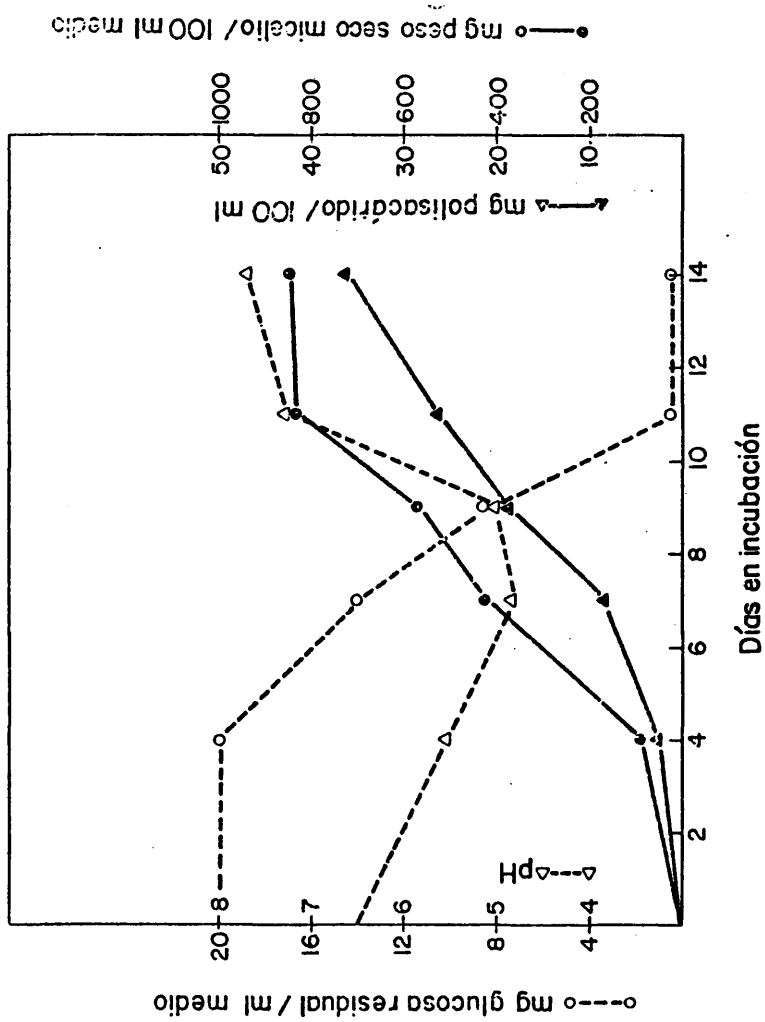


Fig. 18. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *A. nidulans* crece sobre L-glutamina.

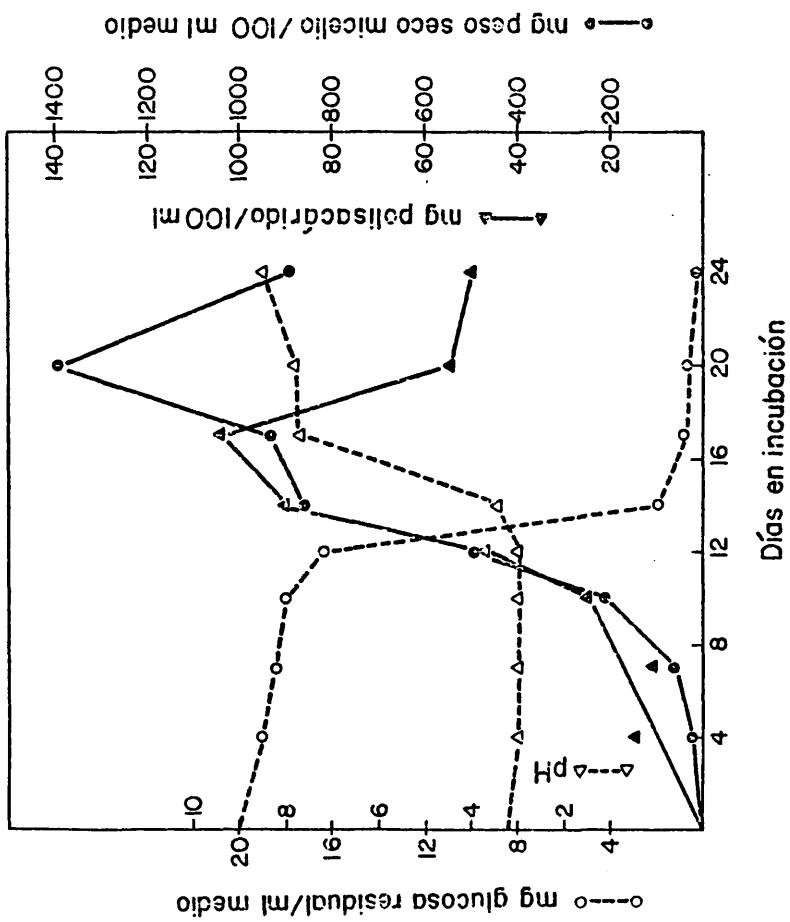


Fig. 19. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando A. nidulans crece con ácido L-glutámico; pH inicial 3,22.

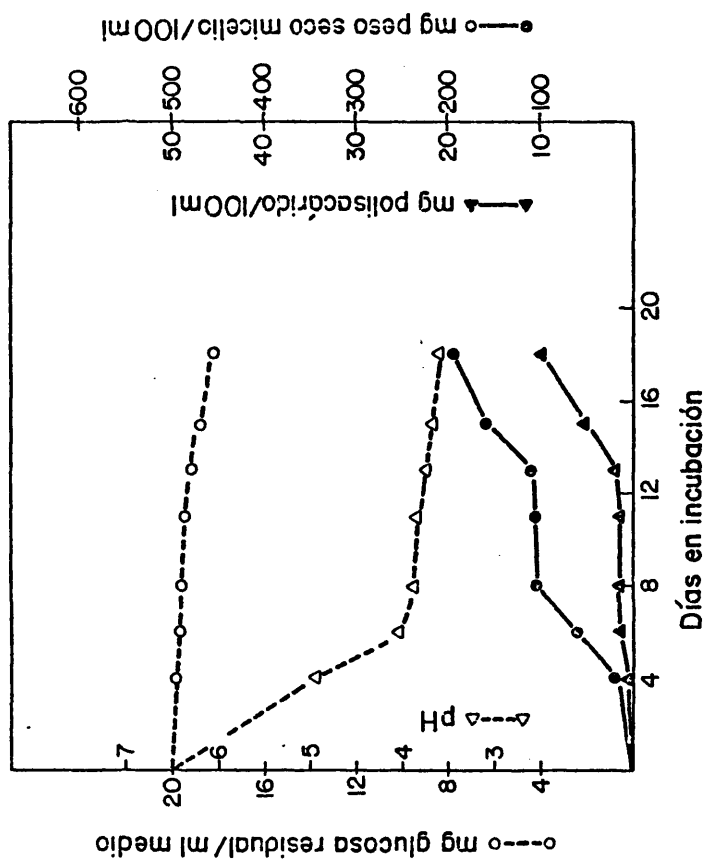


Fig. 20. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando A. nidulans crece con L-fenilalanina.

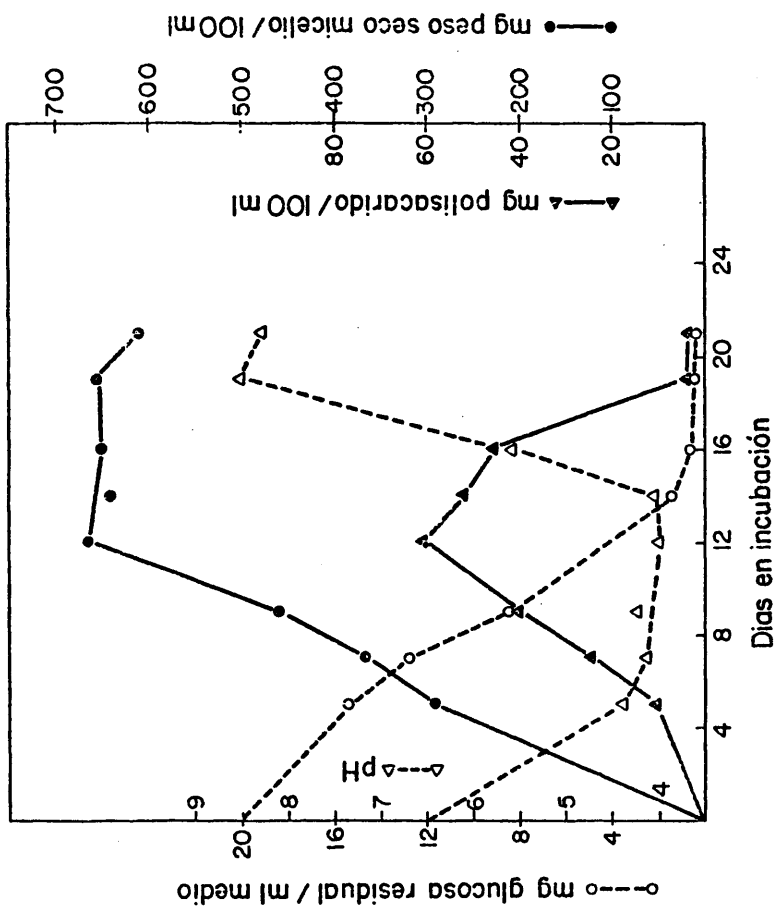


Fig. 21. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *A. nidulans* crece con Tartrato diamónico.

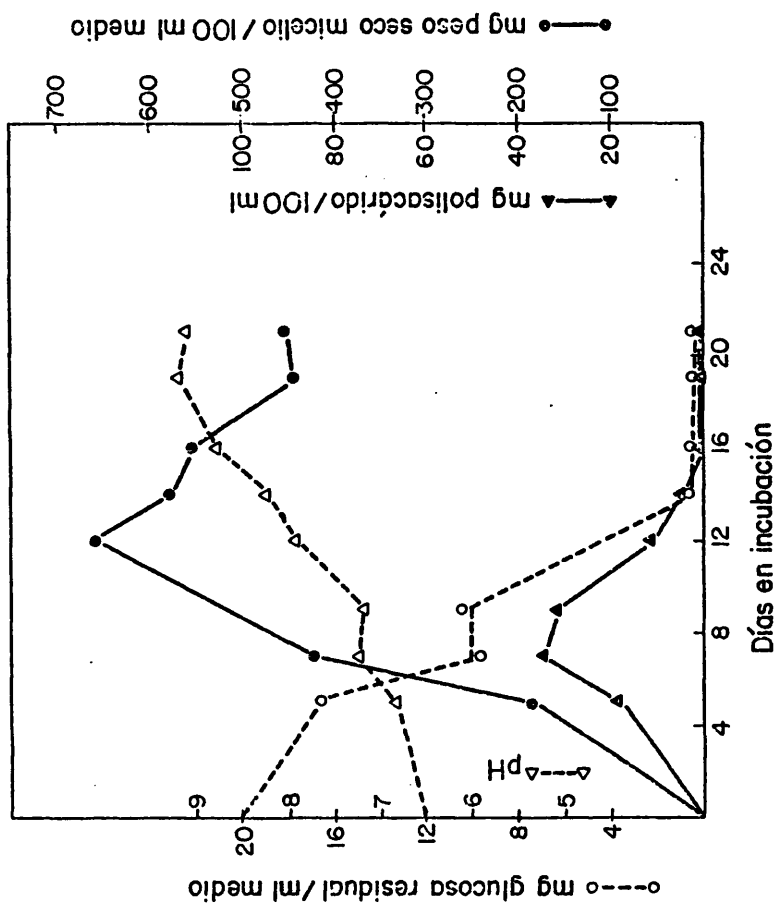


Fig. 22. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando A. nidulans crece con nitrato potásico.

TABLA 13. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de polisacárido

Fuente de nitrógeno * (0,74 g N/l)	pH	Polisacárido (mg/100 ml)	Días en incubación	Micelio (mg/100 ml)
Alanina	6,66	89,0	10	870
Asparagina	8,64	11,6	13	812
Acido aspártico	7,92	14,3	7	845
Glutamina	7,70	36,5	14	844
Acido glutámico	7,67	105,0	17	928
Leucina	4,22	—	9	89
Fenilalanina	3,61	10,4	18	194
Valina	3,98	—	9	88
Nitrato potásico	7,25	34,7	7	424
Tartrato diamónico	4,00	61,2	12	666

(* Todos los aminoácidos utilizados fueron de la serie L)

b) Adición de succinato a los medios con leucina o valina

El crecimiento de A. nidulans sobre L-leucina (230 mg/100 ml) y L-valina (100 mg/100 ml) fue muy bajo. El pH de los medios de cultivo descendió a 4,0 y permaneció constante a lo largo del periodo de incubación. La utilización de la glucosa fue del 33% con leucina y del 11% con valina, y no se produjo polisacárido con ninguno de los dos aminoácidos (Figs. 23 y 24). Cuando se añadió succinato sódico (4g/l) a los medios de cultivo, el peso seco de micelio aumentó a 600 mg/100 ml (leucina) y 450 mg/100 ml (valina). Para leucina el pH se estabilizó en 5,5 hasta que se agotó la glucosa del medio aumentando entonces a 9,0; para valina un 25% de la glucosa permaneció sin ser consumida y el pH no cambió. Con leucina se recogieron 55 mg de polisacárido/100 ml, y con valina se obtuvieron 14,5 mg de polisacárido/100 ml, a los 22 días de incubación (Figs. 25 y 26). Estos resultados prueban que A. nidulans utiliza el N de L-leucina y L-valina para crecer y formar polisacárido siempre que se neutralice el ácido formado en el metabolismo de dichos compuestos.

c) Sustitución del 50% de la fuente nitrogenada por casaminoácidos

Sustituyendo el 50% de la fuente nitrógeno por 2 g/l de casaminoácidos (hidrolizado ácido de la caseína), se produjo polisacárido en todos los casos ensayados, obteniéndose el máximo rendimiento para alanina (87 mg/100 ml), ácido glutámico (68 mg/100 ml) y glutamina (54,8 mg/100 ml) + casaminoácidos (Figs. 27, 28 y 29). En todos los casos el día de máximo crecimiento fue anterior al día de máxima producción de polisacárido y osciló entre 900-1100 mg/100 ml.

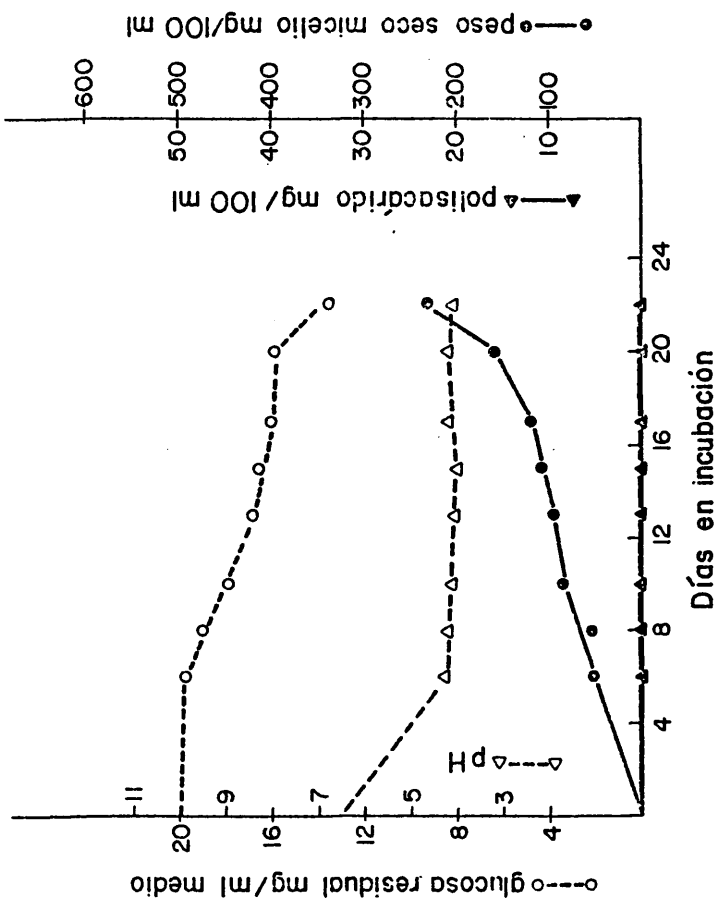


Fig. 23. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando A. nidulans crece con L-leucina

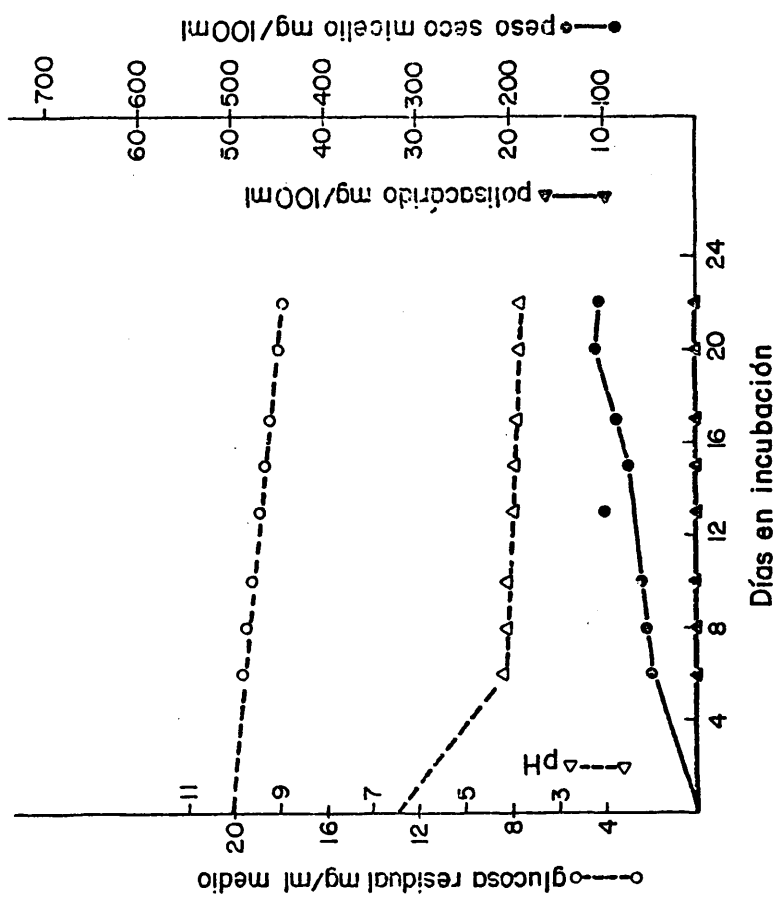


Fig. 24. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando A. nidulans crece con L-valina

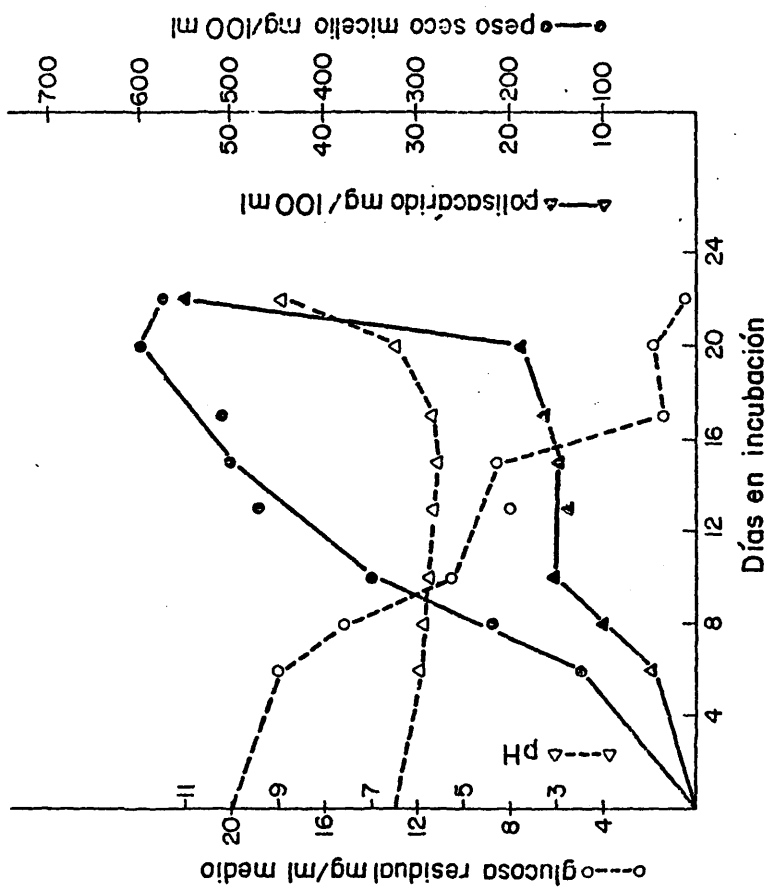


Fig. 25. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *A. nidulans* crece con L-leucina + succinato.

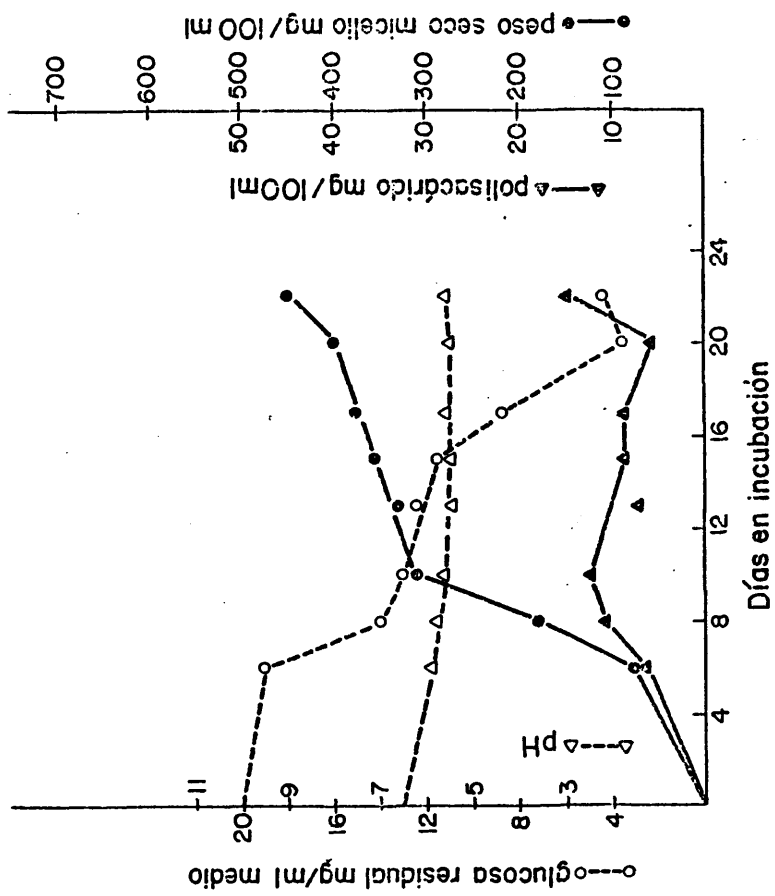


Fig. 26. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *A. nidulans* crece con L-valina + succinato.

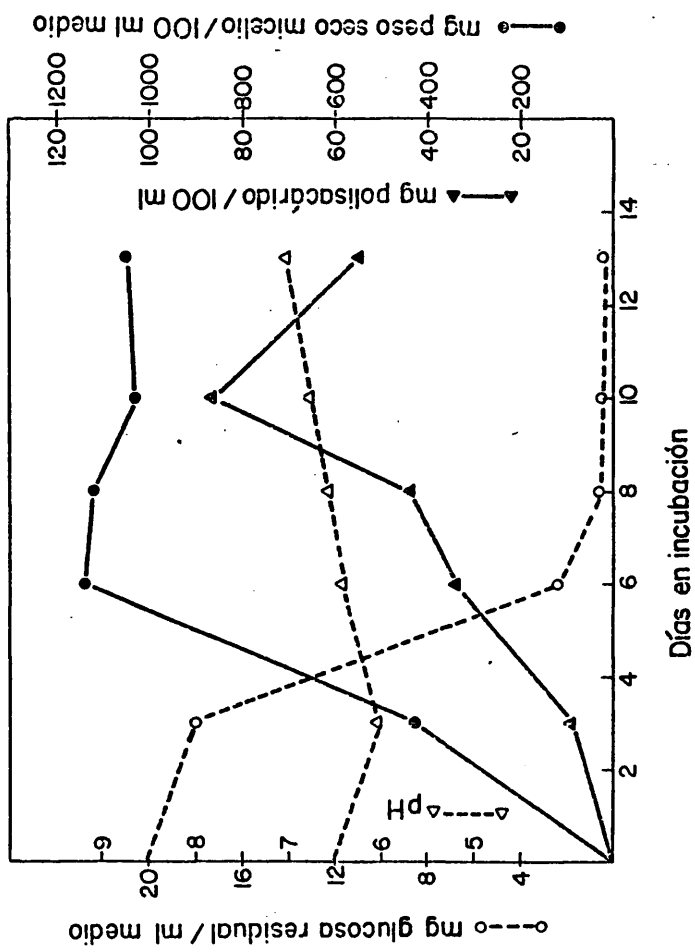


Fig. 27. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *A. nidulans* crece con L-alanina + casaminoácidos.

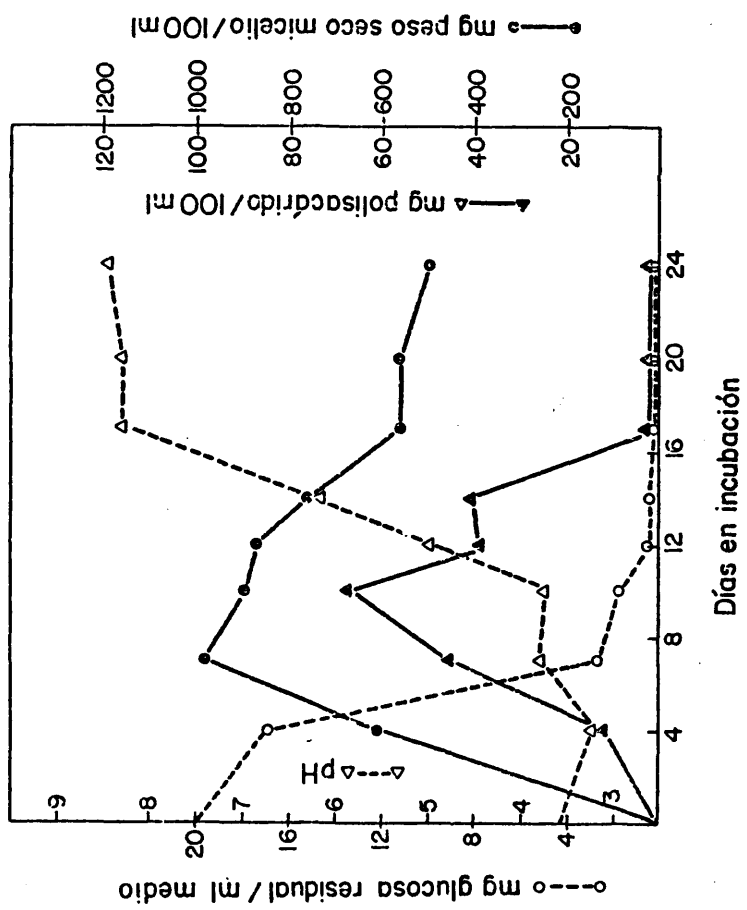


Fig. 28. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *A. nidulans* crece con ácido L-glutámico + casaminoácidos; pH 3,5.

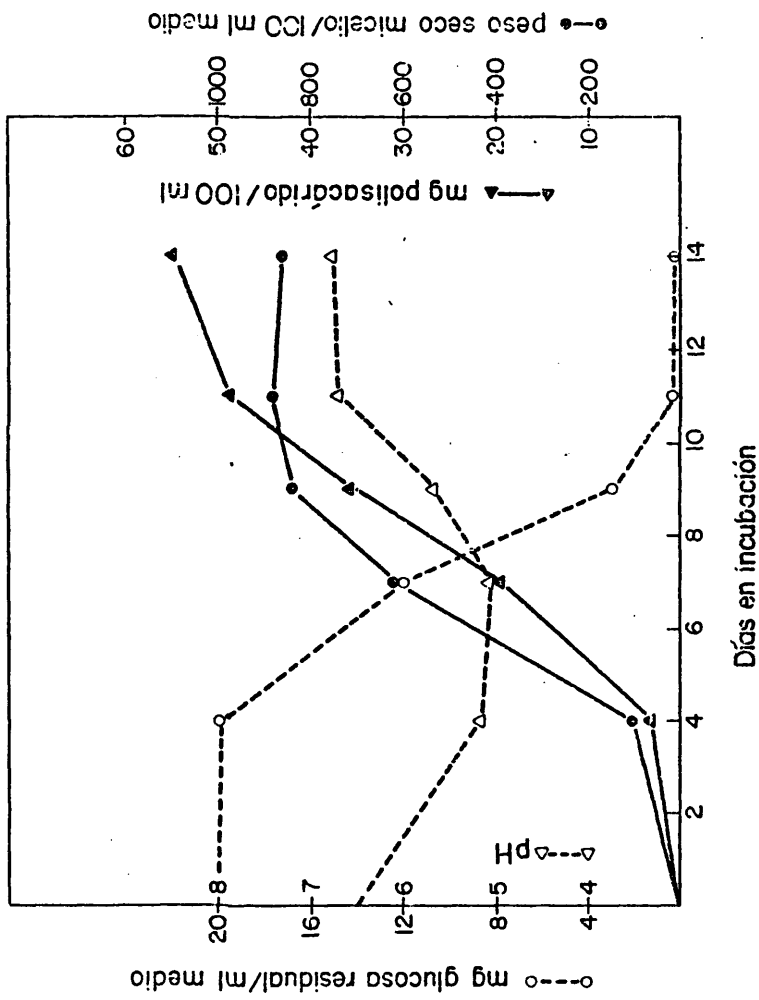


Fig. 29. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *A. nidulans* crece con L-glutamina + casaminoácidos...

Con ácido L-aspártico + casaminoácidos la producción máxima de polisacárido fue afectada por el pH inicial. Con pH inicial 3,0 se obtuvo mayor cantidad de polisacárido (37,5 mg/100 ml) que con pH inicial 6,5 (20,0 mg/100 ml); el crecimiento máximo fue similar en ambos casos (900-940 mg/100 ml) (Figs. 30 y 31).

Con leucina y valina + casaminoácidos (Figs. 32 y 33), se obtuvo una buena producción de polisacárido (35 y 41,5 mg/100 ml, respectivamente). El crecimiento obtenido también fue mayor en ambos casos con casaminoácidos que con el aminoácido sólo. La glucosa no se consumió totalmente quedando alrededor de 1 mg/ml a los 21 días de cultivo. Para valina + casaminoácidos el pH del medio de cultivo descendió a 4,2 manteniéndose constante todo el periodo de incubación; para leucina + casaminoácidos el pH inicialmente descendió a 4,0 pero aumentó después hasta 7,0.

Con fenilalanina + casaminoácidos (Fig. 34) se obtuvieron 40 mg de polisacárido/100 ml. El crecimiento máximo fue bajo (600 mg/100 ml) y se produjo antes del día de mayor producción de polisacárido. El pH se mantuvo bajo (3,5-4,5) y la glucosa no se consumió totalmente.

La Tabla 14 es un resumen de los gráficos anteriores. Las cifras de pH, días en incubación y micelio corresponden al día de máxima producción de polisacárido.

d) Efecto de la concentración de casaminoácidos

Se utilizaron diferentes concentraciones de casaminoácidos como única fuente de nitrógeno en el medio base. Los resultados se muestran en la Fig. 35. La producción de polisacárido aumentó con la concentración de casaminoácidos

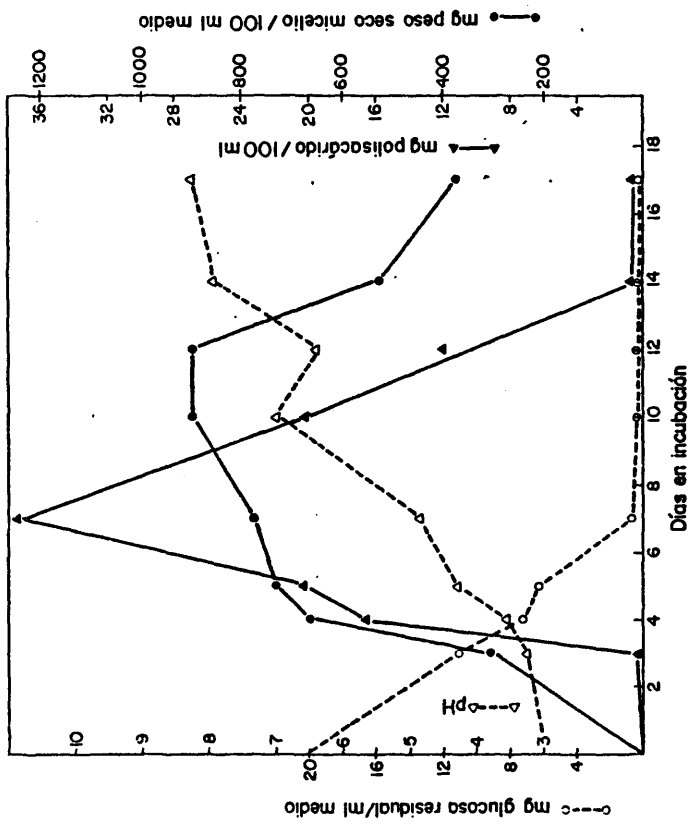


Fig. 30. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando A. nidulans crece con ácido L-aspártico + casaminoácidos; pH 3.

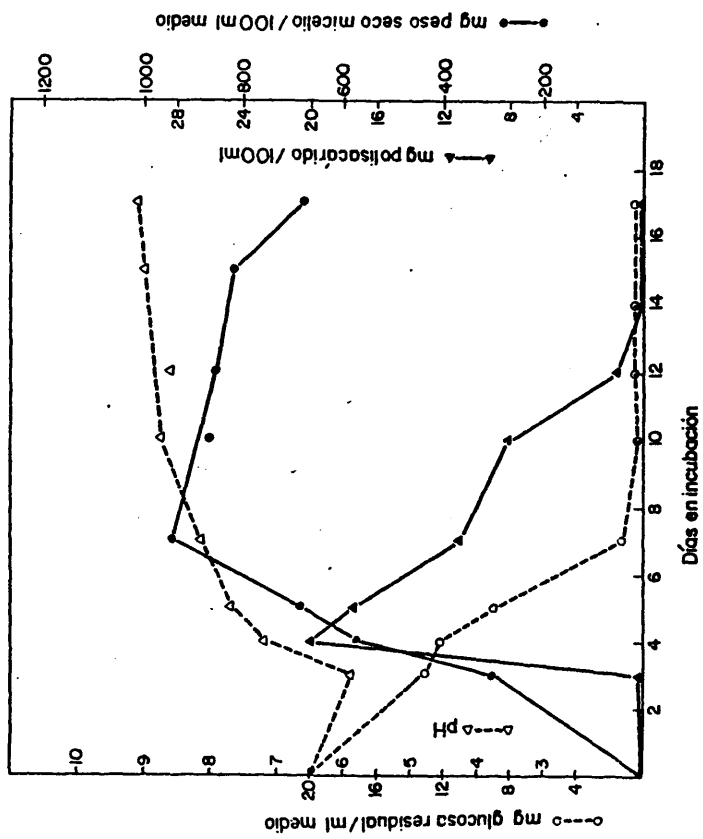


Fig. 31. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando A. nidulans crece con ácido-L-aspartico + casaminoácidos; pH 6,5.

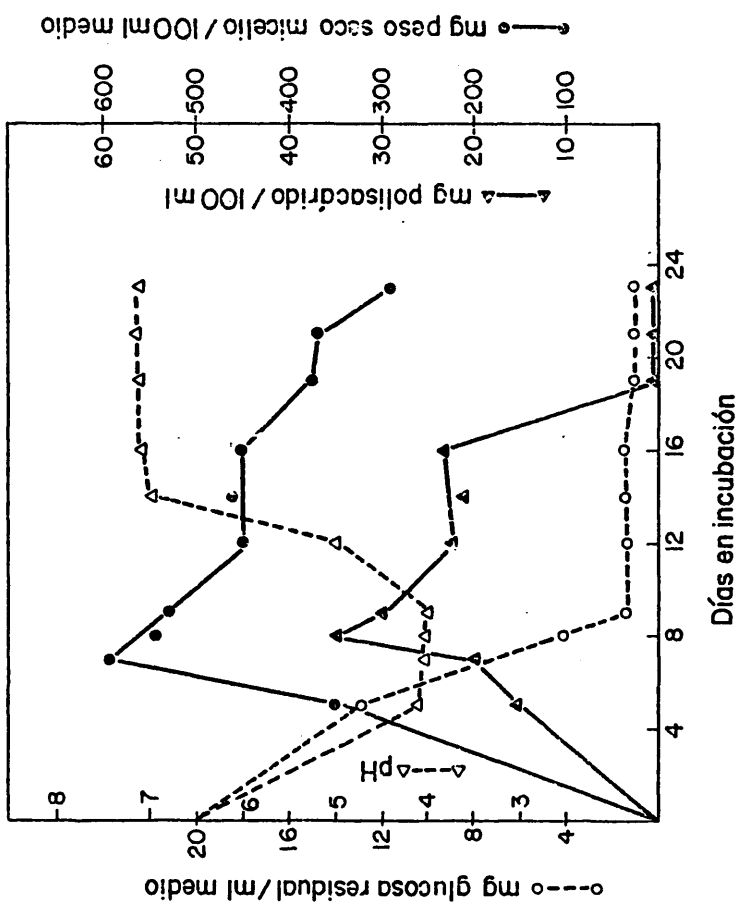


Fig. 52. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *A. nidulans* crece con L-leucina + casaminoácidos.

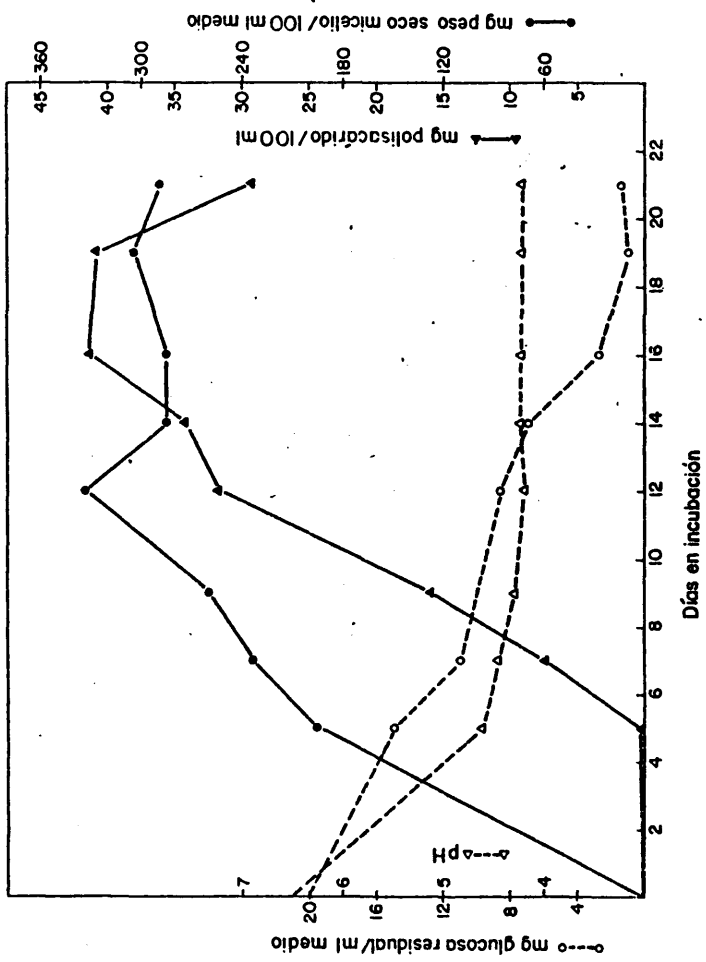


Fig. 33. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *A. nidulans* crece con L-leucina + casaminoácidos.



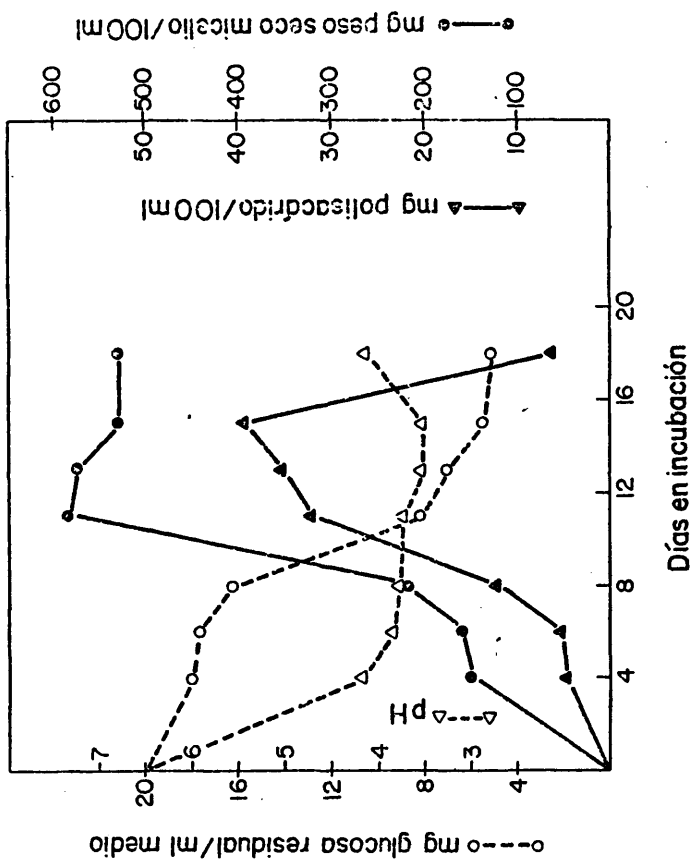


Fig. 34. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido cuando *A. nidulans* crece con L-fenilalanina + casaminoácidos.

TABLA 14. Efecto de la sustitución del 50% de la fuente de nitrógeno por casaminoácidos

Fuente de nitrógeno * (1)	pH	Polisacárido (mg/100 ml)	Días en incubación	Micelio (mg/100 ml)
Alanina	6,78	87,0	10	1030
Asparagina	8,34	20,5	14	747
Acido aspártico (2)	4,86	37,5	7	778
Acido aspártico	7,19	20,0	4	572
Glutamina	6,77	54,8	14	858
Acido glutámico	3,75	68,2	10	896
Leucina	4,12	35,0	8	545
Fenilalanina	3,56	39,6	15	528
Valina	4,24	41,5	16	286

(1) Aminoácidos 0,37 g N/l + casaminoácidos 2 g/l

(2) pH inicial 3,0

(* Todos los aminoácidos utilizados fueron de la serie L)

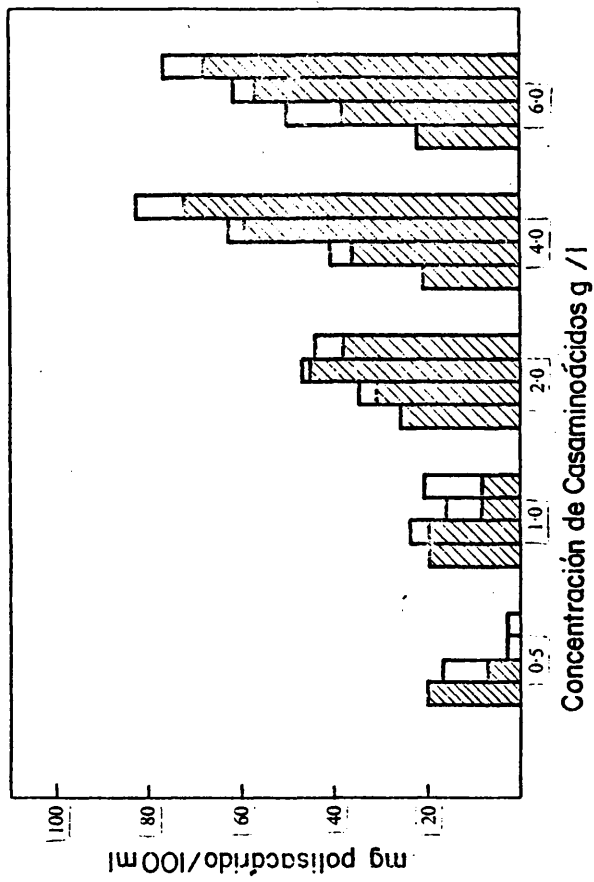


Fig. 35. Producción de polisacárido con diferentes concentraciones de casaminoácidos. De izquierda a derecha para cada concentración 2,5, 9 y 12 días en incubación. ▨ Recogido con espátula. □ Recogido por centrifugación.

hasta 4 g/l y con el tiempo de incubación, con la excepción de los cultivos con 0,5 y 1,0 g/l en los cuales la producción disminuyó con el tiempo.

e) Efecto de la concentración de asparagina

Se substituyó la fuente de nitrógeno del medio base por las siguientes concentraciones de asparagina: 2, 3, 4, 5, 6 y 10 g/l. La producción de polisacárido aumentó con la concentración de asparagina hasta 4 g/l. A los 10 días de incubación el polisacárido fue recogido por centrifugación y su concentración disminuyó mucho a los 18 días (Fig. 36).

4.- Efecto de la tiamina

El efecto de la tiamina fue ensayado en matraces de 1 litro con 500 ml de medio base y 4 g/l de asparagina, ó 2 g/l de asparagina + 2 g/l de casaminoácidos, como fuente de nitrógeno. Estos medios se prepararon con y sin tiamina. Los cultivos se incubaron 3 días a 120 r.p.m. En el caso de asparagina, crecimiento y producción de polisacárido fueron similares con y sin tiamina. En el caso de asparagina + casaminoácidos, la presencia de tiamina estimuló el crecimiento y la producción de polisacárido (Tabla 15).

5.- Efecto de la concentración del ion fosfato

En el medio base conteniendo 4 g/l de asparagina como fuente de nitrógeno, se ensayaron las siguientes concentraciones de fosfato monopotásico (g/l): 0,25, 0,5, 1,0 y 2,0. La producción de polisacárido aumentó con la concentración de fosfato hasta 2 g/l obteniéndose 20, 20,5, 54,5 y 68,5 mg de polisacárido/100 ml, respectivamente. El crecimiento obtenido no se vio afectado por la concentración de fosfato utilizada, pues en todos los casos osciló entre 900-1000 mg/100 ml, y fue anterior al día de máxima produc

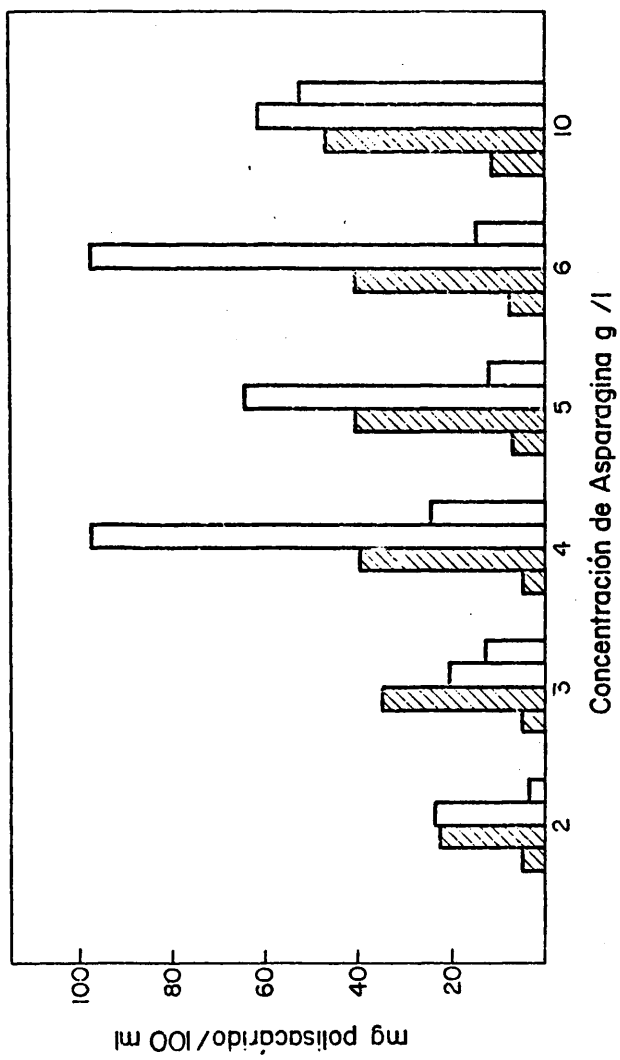


Fig. 36. Producción de polisacárido con diferentes concentraciones de asparagina. De izquierda a derecha para cada concentración 3, 6, 10 y 18 días en incubación. ▨ Recogido con espátula. □ Recogido por centrifugación.

TABLA 15. Efecto de la tiamina en la producción del polisacárido

Fuente de nitrógeno (4 g/l)	Tiamina*	pH	Polisacárido (mg/100 ml)	Micelio (mg/100 ml)
Asparagina	+	5,30	3,1	136
"	-	5,21	3,3	125
Asparagina + casaminoácidos	+	5,35	7,8	187
"	-	4,95	4,6	144

Incubación a 120 r.p.m., 3 días.

* La concentración de tiamina en el medio que la contiene es la del medio base 1 mg/l

ción de polisacárido (Figs. 37, 38, 39 y 40).

A partir de los 15 días de incubación el polisacárido fue recogido por centrifugación.

6.- Efecto del pH inicial del medio de cultivo

En el medio base se ajustó el pH inicial a 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Se hicieron recolecciones de cada cultivo a los 5, 9, 15 y 20 días de incubación. Los resultados obtenidos se muestran en las Figs. 41 a 47.

A los 15 días la glucosa ha sido utilizada en todos los cultivos y es cuando se alcanza la producción máxima de polisacárido, excepto en los cultivos con pH inicial 5, que posiblemente estaban algo atrasados pues a este pH la glucosa no se utiliza más lentamente que a los otros pHs ensayados.

La producción de polisacárido varía con el pH inicial del medio, obteniéndose la máxima producción con el pH 3 (139,35 mg/100 ml). Existe una relación inversa entre producción de polisacárido y crecimiento, observándose un crecimiento menor para el pH 3 (777 mg/100 ml).

El crecimiento máximo para el resto de los pH ensayados oscila entre 900 y 1000 mg/100 ml y tiene lugar a los 9 días de incubación en todos los cultivos, siendo por tanto anterior al día de máxima producción de polisacárido.

Los pHs extremos retrasan el crecimiento, favoreciendo la producción de polisacárido extracelular.

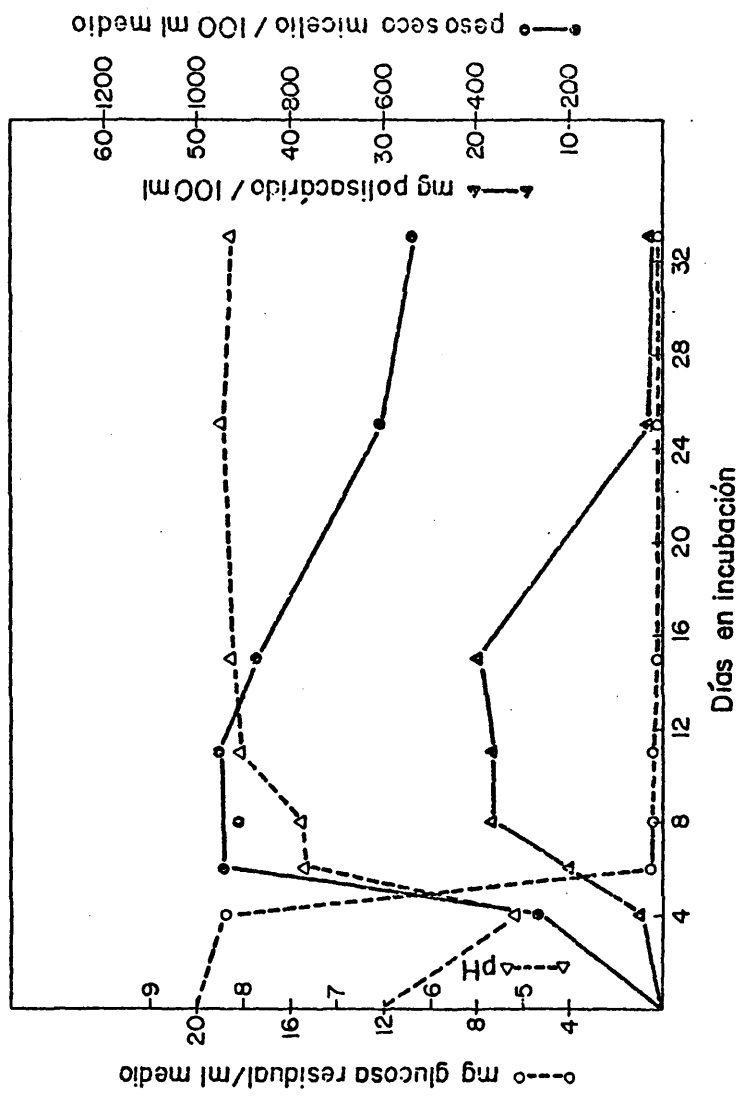


Fig. 37. Crecimiento. cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido con 0,25 g/l de fosfato.

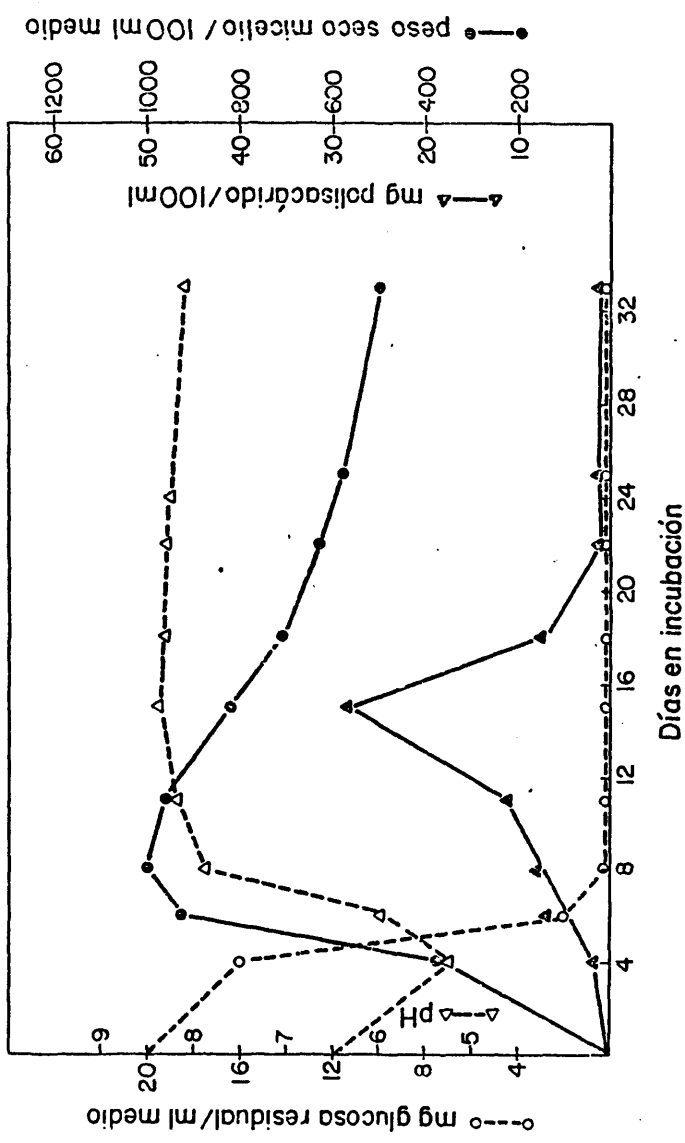


Fig. 38. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido con 0,5 g/l de fosfato.

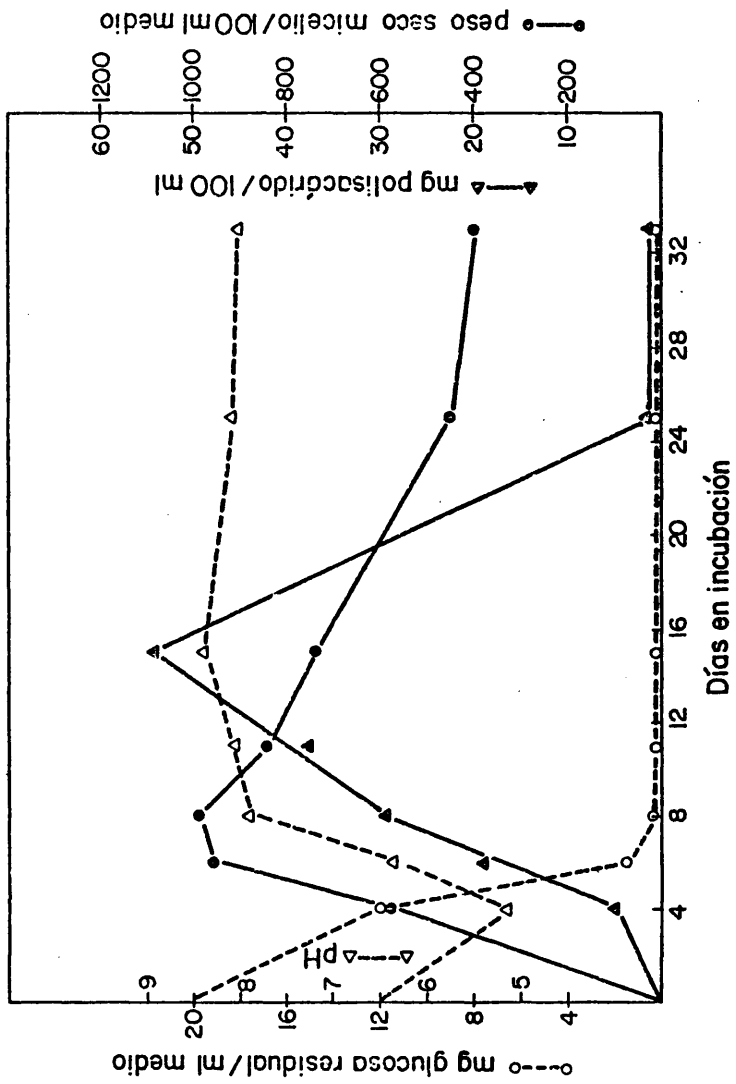


Fig. 39. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido con 1,0 g/l de fosfato.

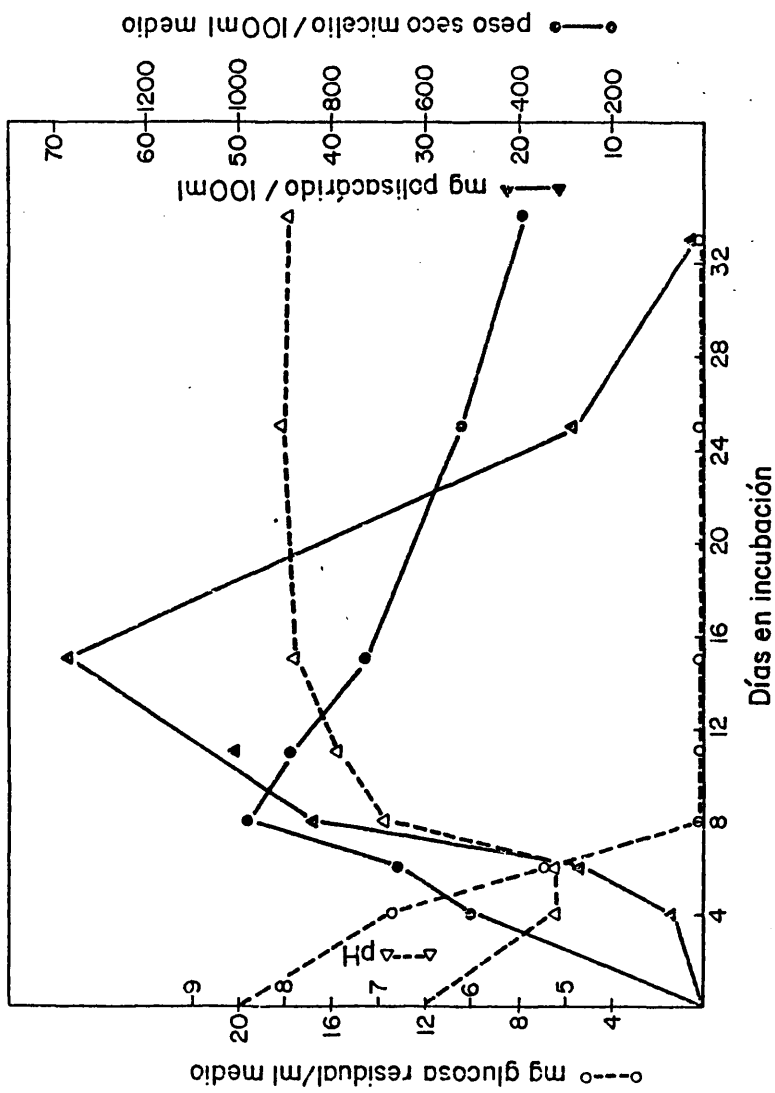


Fig. 40. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido con 2,0 g/l de fosfato.

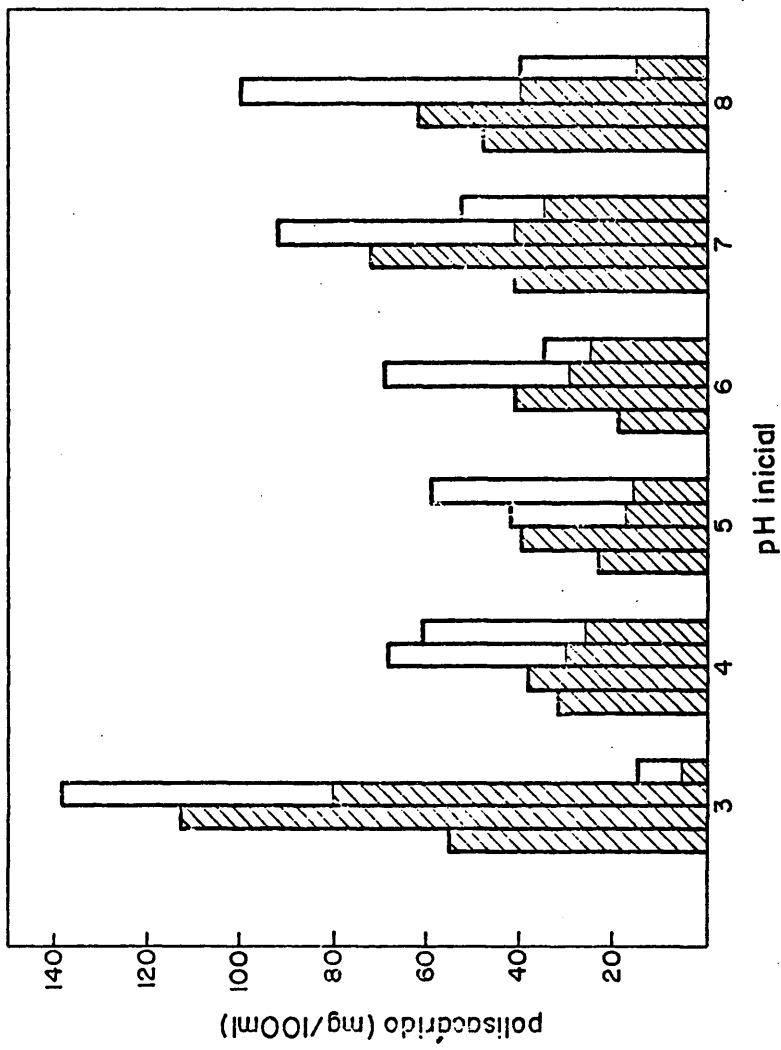


Fig. 41. Producción de polisacárido con distinto pH inicial en el medio de cultivo. De izquierda a derecha para cada pH inicial 5,9,15 y 20 días en incubación. ▨ Recogido con espátula. □ Recogido por centrifugación

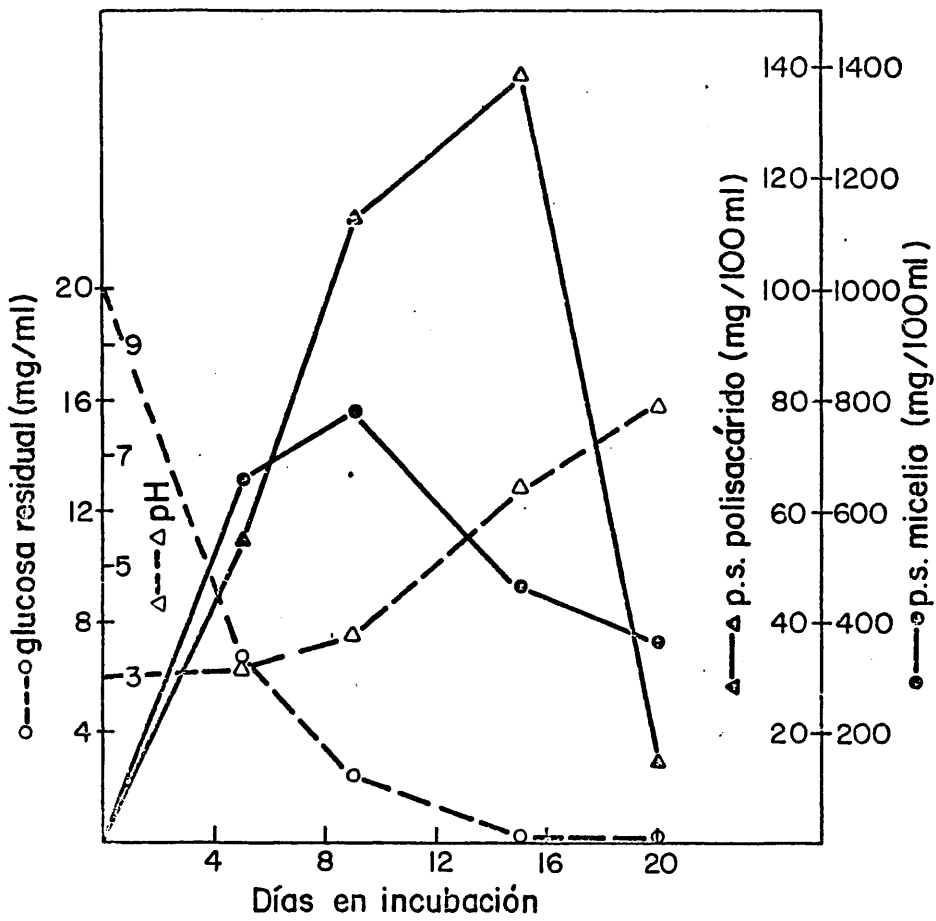


Fig. 42. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido con pH inicial 3.

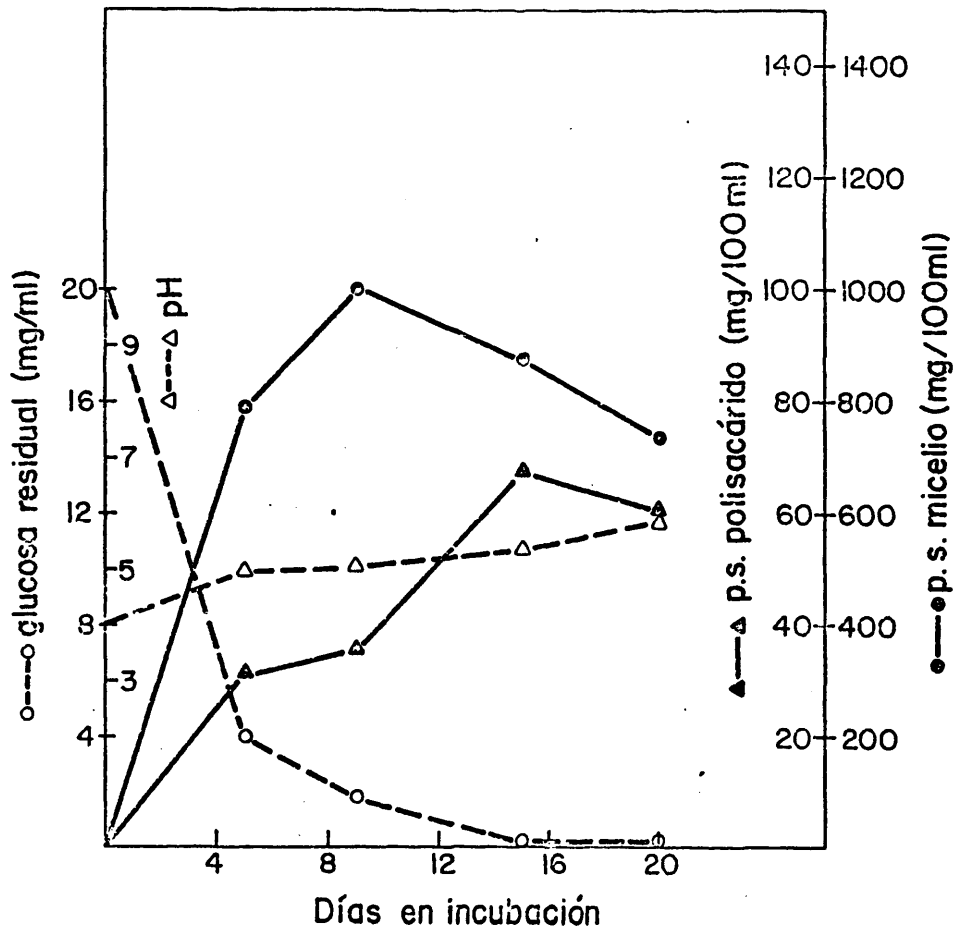


Fig. 43. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido con pH inicial 4.

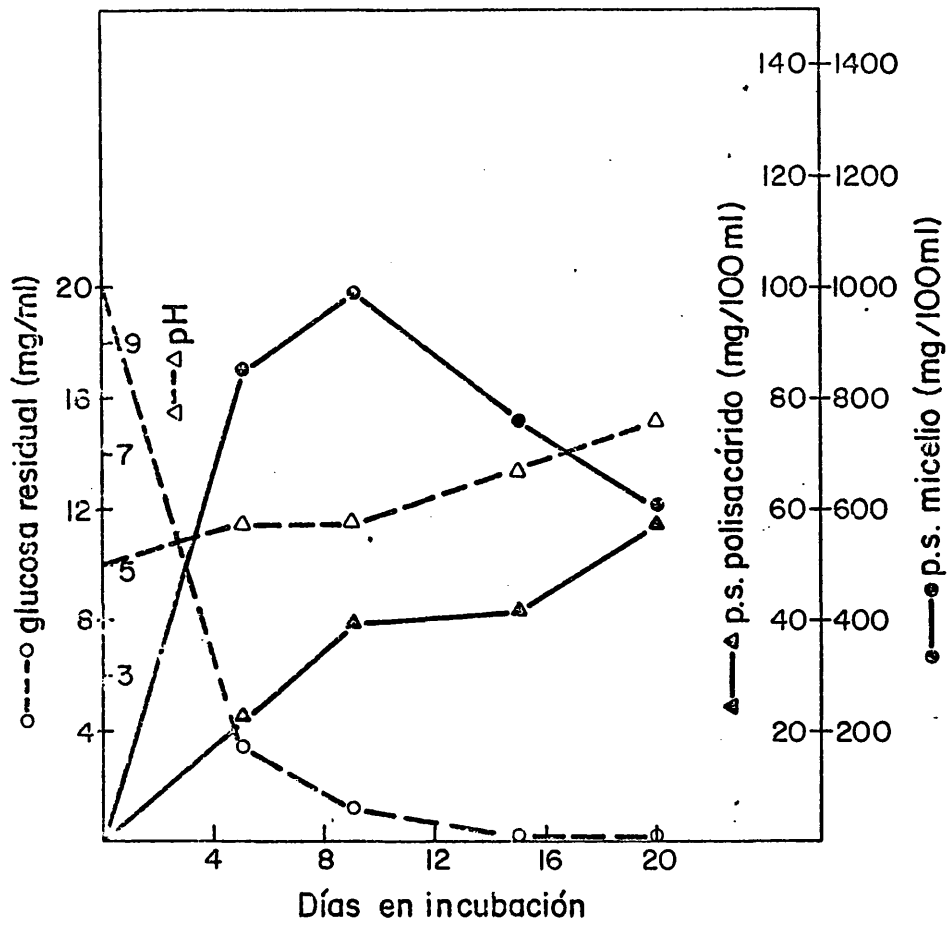


Fig. 44. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido con pH inicial 5.

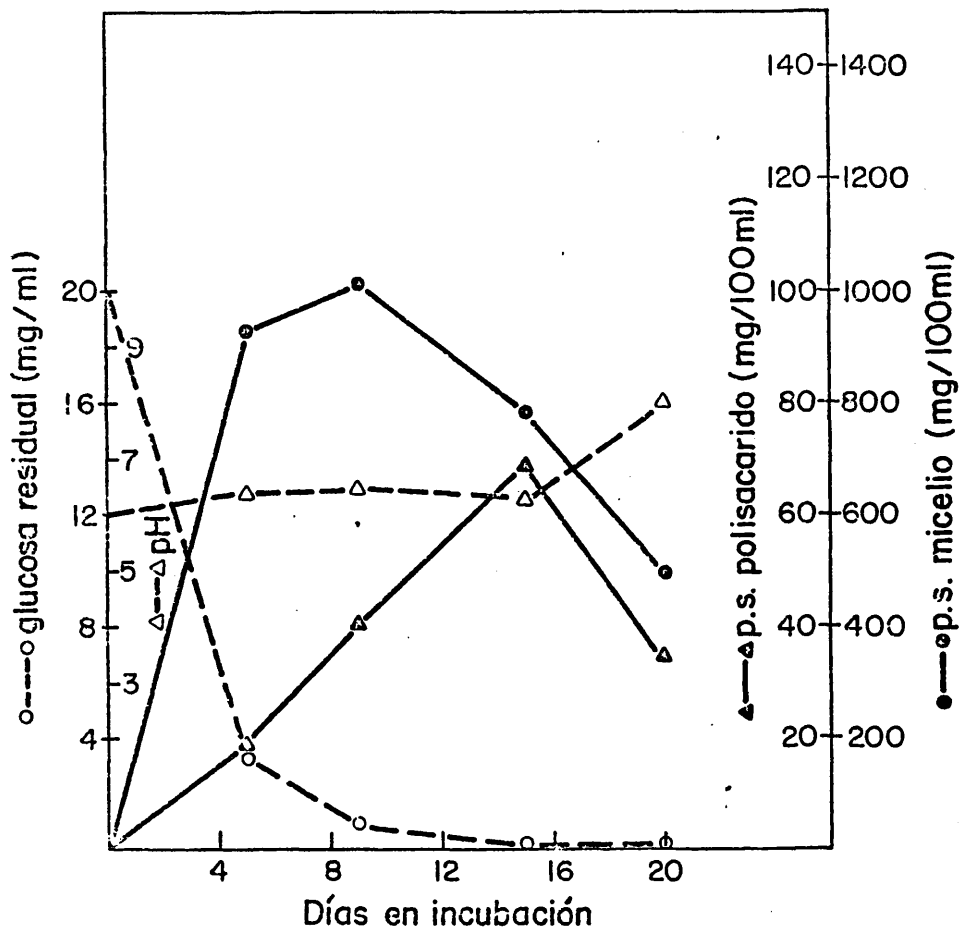


Fig. 45. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido con pH inicial 6.

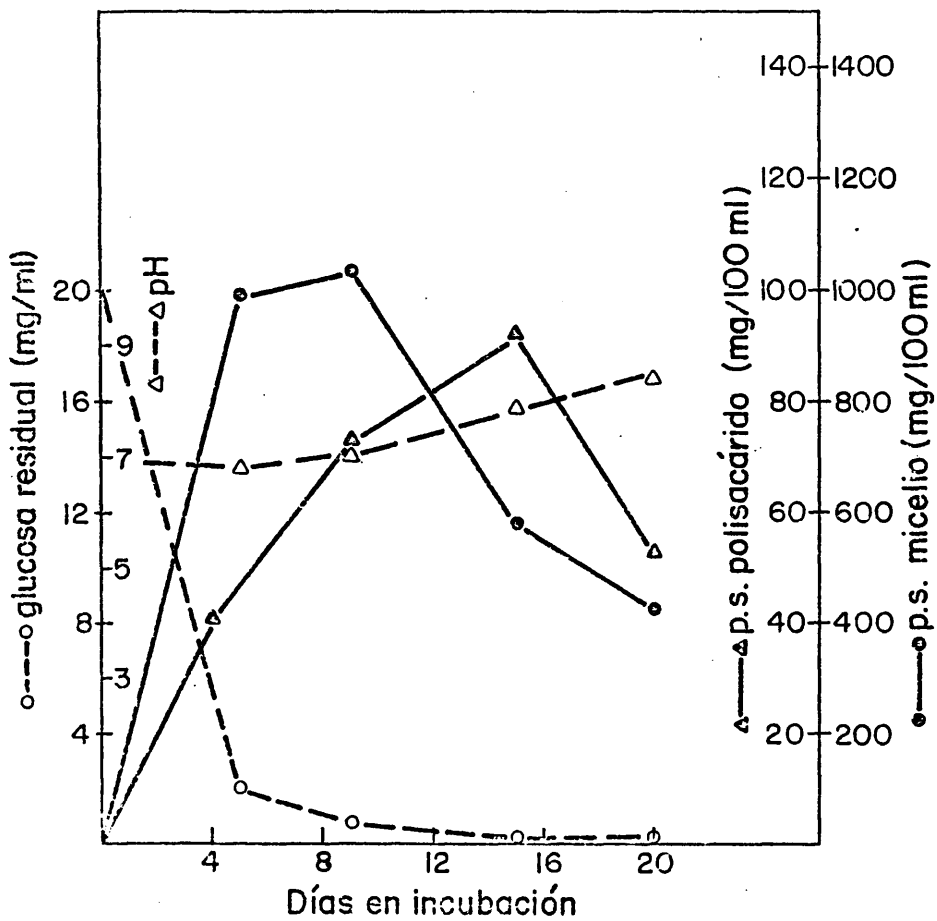


Fig. 46. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido con pH inicial 7.

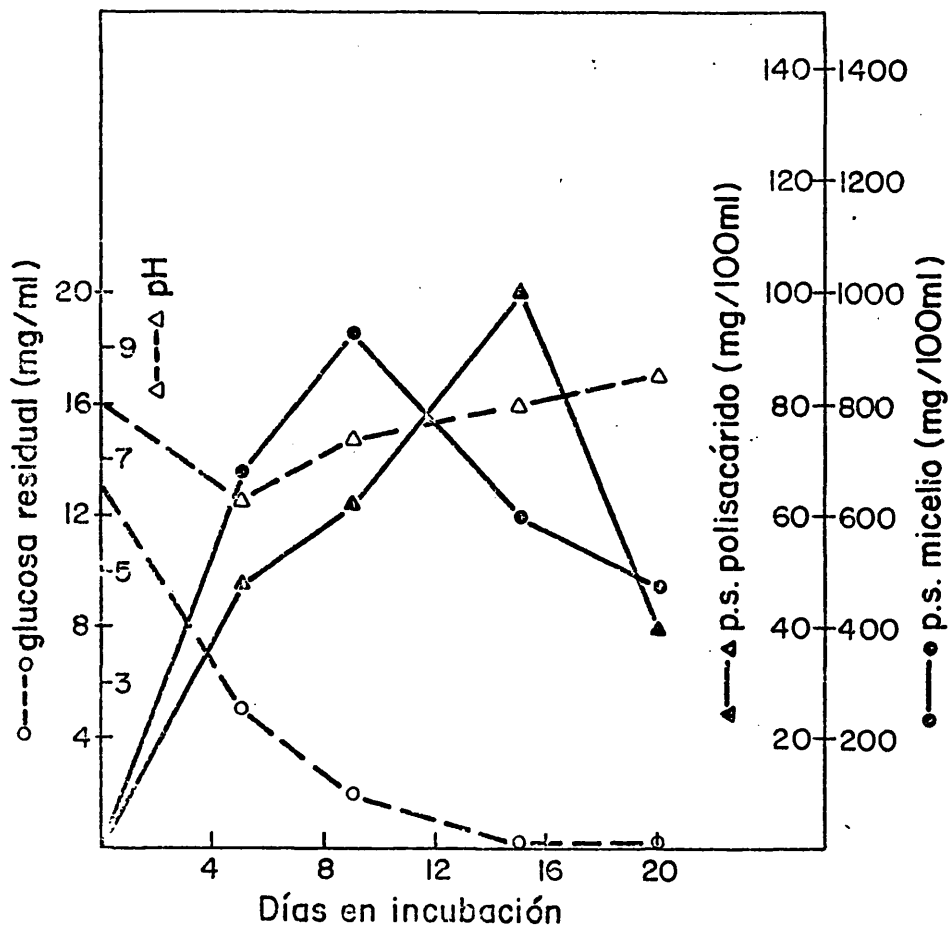


Fig. 47. Crecimiento, cambio en pH del medio, glucosa residual y producción de polisacárido con pH inicial 8.

V.- EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION Y DE LA FUENTE DE NITROGENO EN LA COMPOSICION DEL POLISACARIDO

Matraces Erlenmeyer de 1 litro conteniendo 500 ml de medio fueron incubados a 100-120 r.p.m.

Para investigar el efecto del tiempo de incubación, se utilizó como fuente de nitrógeno 2 g/l de asparagina + 2 g/l de casaminoácidos. Se tomaron muestras a los 5, 10, 15 y 20 días de incubación.

El contenido en carbohidratos totales y galactosamina del polisacárido no cambió con el tiempo de incubación, como puede observarse en la Tabla 16. Estos resultados confirman que el polisacárido de A. nidulans es un heteropolímero.

Para estudiar el efecto de la fuente de nitrógeno en la composición del polisacárido, se sustituyó este nutriente del medio base por los compuestos relacionados en la Tabla 17. El polisacárido formado en el medio que contenía casaminoácidos dió el contenido más alto de nitrógeno (4,58%) y el formado en el medio con ácido glutámico el más bajo (2,26%). La hidrólisis ácida y posterior identificación por cromatografía en papel de los productos resultantes indicaron que el polisacárido producido con diferentes fuentes de nitrógeno estaba compuesto por galactosamina, galactosa y trazas de glucosa.

Los espectros infrarrojos del polisacárido producido con diferentes fuentes de nitrógeno son muy similares (Fig. 48). A 850 cm^{-1} aparece una banda característica de polisacáridos con uniones α , y 2 bandas a 1560 y 1650 cm^{-1}

TABLA 16. Efecto del tiempo de incubación en la composición del polisacárido

Días en incubación	Carbohidratos totales (%)	Nitrógeno total (%)	Galactosamina * (%)
5	22,25	5,01	64,43
10	19,53	4,74	60,91
15	16,00	5,23	67,21
20	21,05	5,25	67,46

* Calculado a partir del nitrógeno total determinado por Kjeldahl.

TABLA 17. Efecto de la fuente de nitrógeno en la composición del polisacárido

Fuente de nitrógeno (0,74 g N/l)	Carbohidratos totales (%)	Nitrógeno total (%)	Galactosamina *
L-alanina	55,55	3,15	40,46
Tartrato diamónico	40,00	4,22	54,22
L-asparagina	22,10	4,14	53,20
Casaminoácidos	28,32	4,58	58,85
Acido L-glutámico	51,66	2,26	29,04
Extracto de levadura	38,68	3,96	50,88

(*) Calculado a partir del nitrógeno total determinado por Kjeidahl.

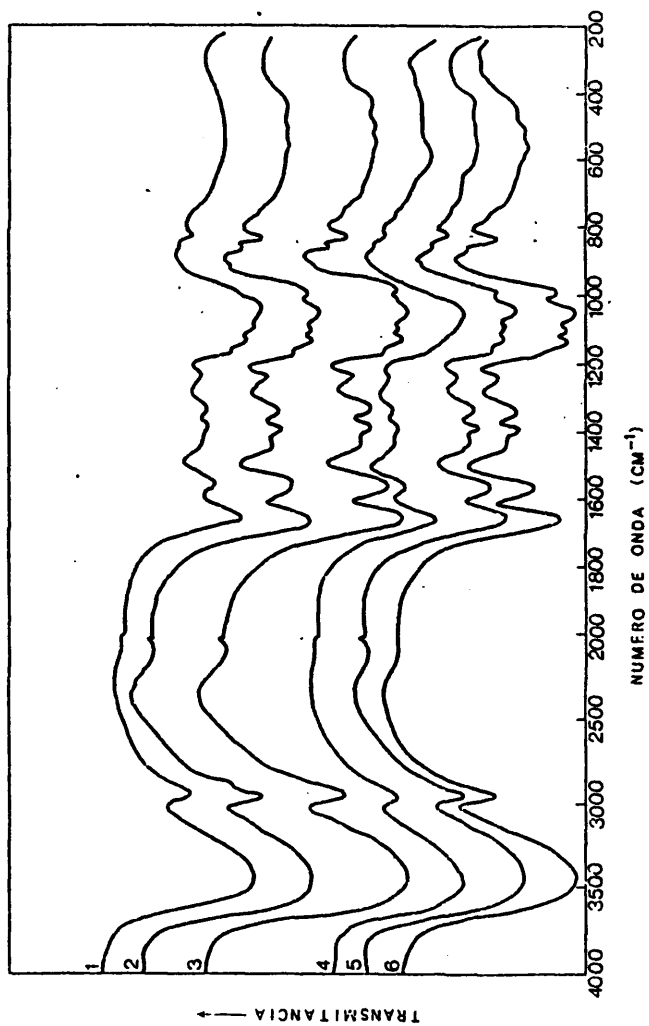


Fig. 48. Espectros infrarrojos del polisacárido de *A. nidulans* producido con distintas fuentes de nitrógeno: 1, tartrato diamónico; 2, asparagina; 3, caso aminoácidos; 4, alanina; 5, ácido glutámico; 6, extracto de levadura.

del enlace-CO-NH- de la N-acetil-galactosamina.

VI.- PRODUCCION DE POLISACARIDO POR DISTINTOS AISLAMIENTOS DE ASPERGILLUS NIDULANS

Para estudiar la formación de polisacárido extracelular por otros aislamientos de A. nidulans, se utilizaron los n^{os} 1071 y 1701 de la colección del Dr. Ramírez.

Una suspensión de conidios de estos microorganismos se inoculó en matraces Erlenmeyer de 1 litro conteniendo 500 ml del medio base. Los cultivos se incubaron a 120 r.p.m. a 30°C, y se recolectaron a los 11 días, una vez agotada la glucosa del medio.

En la Tabla 18 se muestran crecimiento, producción de polisacárido y cambios en el medio de cultivo para cada aislamiento. El rendimiento obtenido de polisacárido en ambos casos fue menor que el obtenido con el aislamiento n° 2544 en idénticas condiciones (alrededor de 50 mg/100 ml).

La composición de los polisacáridos extracelulares producidos por los aislamientos 1071 y 1701 de A. nidulans se muestra en la Tabla 19.

Los aminoazúcares (Rondle y Morgan, 1955) y el ion fosfato fueron determinados en los polisacáridos hidrolizados con HCl 0,2 N y 4 N durante 2 horas.

El aislamiento 1701 contiene un 68,45% de aminoazúcares, mientras que el 1071 contiene sólo un 28,95%. Estos aminoazúcares fueron identificados por cromatografía descendente en papel como galactosamina, y trazas de glucosamina (Fig. 49), utilizando para el revelado p-dimetilamino benzaldehído (Dawson y col., 1962).

TABLA 18. Crecimiento, producción de polisacárido, pH y glucosa residual del medio de cultivo para los aislamientos 1071 y 1701 de A. nidulans

N° aislamiento	pH	Micelio (mg/100 ml)	Polisacárido (mg/100 ml)	Azúcar residual (mg/ml)
1071	4,86	714,4	11,8	0,225
1701	6,75	903,4	25,1	0,180

TABLA 19. Composición de los polisacáridos extracelulares producidos por los aislamientos 1071 y 1701 de A. nidulans (3)

	<u>N° aislamiento</u>	
	<u>1071</u>	<u>1701</u>
Aminoazúcares	28,95	68,45
Carbohidratos totales	72,75	22,10
Ion fosfato	1,94	0,69
Ion acetato	6,33	9,60
Acidos urónicos	—	—
Proteína total	2,45	3,50

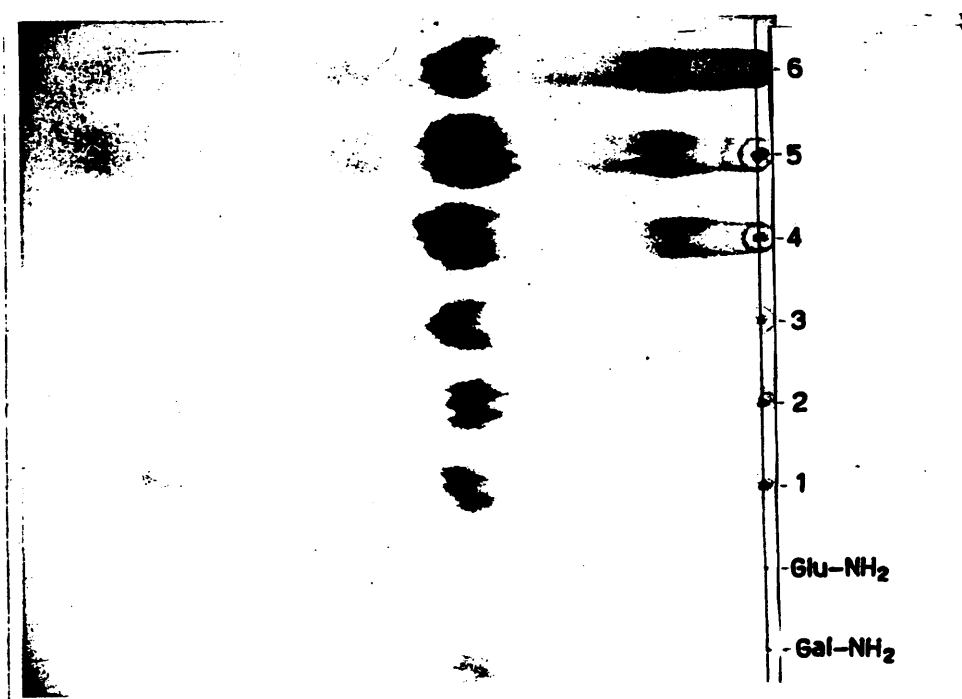


FIGURA 49

Cromatograma de aminoazúcares

Controles de galactosamina (Gal-NH₂) y glucosamina (Glu-NH₂)

1=	Polisacárido de <u>A. nidulans</u>	2544	hidrolizado con HCl 0,2N	2h				
2=	"	"	"	1071	"	"	"	"
3=	"	"	"	1701	"	"	"	"
4=	"	"	"	2544	"	"	"	4N 2h
5=	"	"	"	1071	"	"	"	"
6=	"	"	"	1701	"	"	"	"

El ion acetato 6,33% (aislamiento 1071), y 9,60% (aislamiento 1701) acetilaría un 53,46% y un 34,28% de la galactosamina, respectivamente.

Los carbohidratos totales supusieron un 72,75% (aislamiento 1071) y un 22,10% (aislamiento 1701). En los polisacáridos hidrolizados con HCl 0,2N y 4N durante 2 horas los azúcares se identificaron por cromatografía en papel como galactosa y trazas de glucosa (Fig. 50), utilizando ftalato de anilina como reactivo (Dawson y col., 1962).

En ninguno de los dos polisacáridos se detectaron ácidos urónicos.

El polisacárido producido por el aislamiento 1701 de A. nidulans es el que presenta una composición más parecida al aislamiento por nosotros estudiado (2544), mientras que el producido por el aislamiento 1071 tiene una composición similar al descrito por Gorin y Eveleigh (1970).

Por tanto los distintos aislamientos de A. nidulans utilizados producen polisacáridos con idénticos azúcares constituyentes, pero que se encuentran en distinta proporción.

VII.- COMPOSICION DE LA PARED CELULAR DE ASPERGILLUS NIDULANS

Para conocer si el polisacárido extracelular es un componente importante de la pared celular de A. nidulans, esta fracción celular fue hidrolizada con HCl 0,2N, 0,6N, 1N, 2N, 4N, 6N y 8N durante 2 horas.

La composición de la pared celular de A. nidulans con respecto a los componentes principales, se muestra en la Tabla 20.

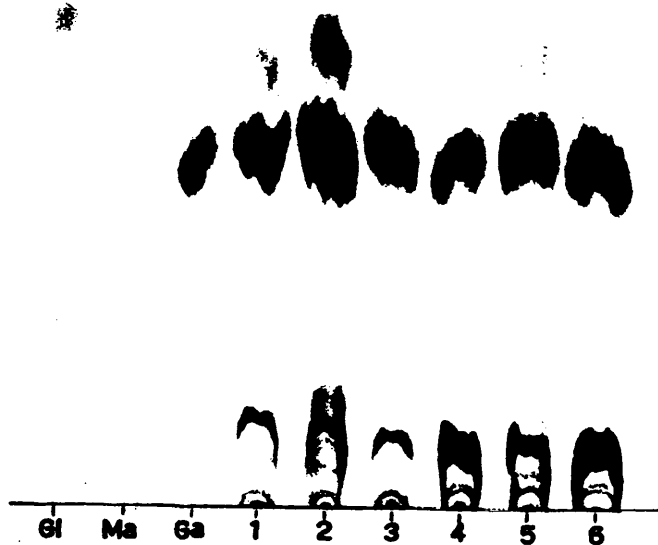


FIGURA 50

Cromatograma de azúcares

Controles de glucosa (Gl), manosa (Ma) y galactosa (Ga)

1=	Polisacárido de <u>A. nidulans</u>	2544	hidrolizado con HCl	0,2N	2h				
2=	"	"	"	1071	"	"	"	"	"
3=	"	"	"	1701	"	"	"	"	"
4=	"	"	"	2544	"	"	"	4N	2h
5=	"	"	"	1071	"	"	"	"	"
6=	"	"	"	1701	"	"	"	"	"

TABLA 20. Composición de la pared celular de A. nidulans (%)

Aminoazúcares (1)	15,23
Carbohidratos totales (2)	77,77
Proteína total	5,42

(1) Identificados como galactosamina y glucosamina.

(2) Identificados como glucosa y trazas de galactosa.

En los hidrolizados se determinaron aminoazúcares (Rondle y Morgan, 1955) obteniéndose la hidrólisis total para aminoazúcares en el hidrolizado con HCl 6-8N (15,23% de aminoazúcar). Los aminoazúcares fueron identificados por cromatografía descendente en papel como galactosamina y glucosamina, siendo algo más intensa la mancha de galactosamina en todos los hidrolizados (Fig. 51).

En las paredes celulares sin hidrolizar se determinaron carbohidratos totales (77,77%). Los azúcares fueron identificados por cromatografía descendente en papel de los hidrolizados de pared celular, como glucosa y trazas de galactosa (Fig. 52).

La pared celular se trató con NaOH 1N durante 16 horas a temperatura ambiente, de aquí se tomaron alícuotas para la determinación de proteína (5,42%). De estos resultados podemos asumir que si el polisacárido extracelular forma parte de la pared se encuentra en una proporción muy baja.

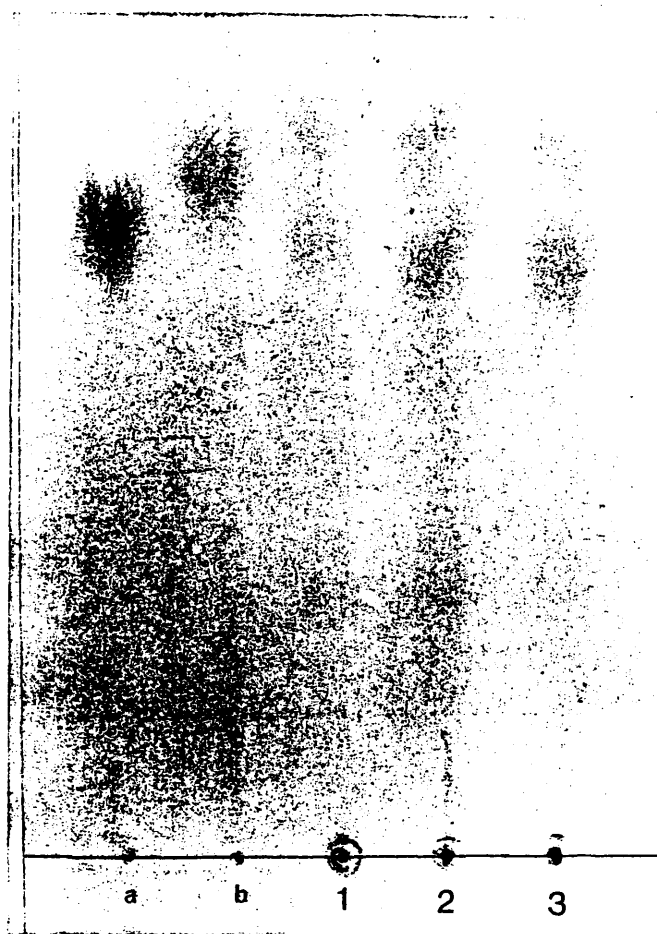


FIGURA 51

Cromatograma de aminoazúcares

Controles de galactosamina (a) y glucosamina (b)

1= Paredes celulares de A. nidulans hidrolizadas con HCl 4N 2h
 2= " " " " " " 6N 2h
 3= " " " " " " 8N 2h



FIGURA 52

Cromatograma de azúcares

C= Controles de galactosa (Ga), glucosa (Gl) y manosa (Ma)

1= Paredes celulares de A. nidulans hidrolizadas con HCl 0,2N 2h

2= " " " " " " 0,6N "

3= " " " " " " 1N "

4= " " " " " " 2N "

DISCUSION

El polisacárido extracelular aislado en nuestro laboratorio es diferente del estudiado por Gorin y Eveleigh (1970), pues aunque ambos están compuestos por galactosa y galactosamina las proporciones de estos azúcares son distintas en los dos polisacáridos. Nuestro polisacárido contiene un 70% de galactosamina parcialmente N-acetilada y un 20% de galactosa, mientras que el descrito por Gorin y Eveleigh está compuesto por un 35% de galactosamina totalmente N-acetilada y un 65% de galactosa. Por otra parte ambos difieren en el modo de unión de los residuos de azúcar, que en el polisacárido estudiado por nosotros es predominantemente α -1,3, y en el descrito por Gorin y Eveleigh, predominantemente α -1,4. Sin embargo, no podemos descartar que las diferencias entre uno y otro polisacárido, sean debidas a diferencias entre aislamientos.

El polisacárido por nosotros estudiado también difiere del galactosaminogalactano aislado por extracción alcalina del micelio de Aspergillus niger (Bardalaye y Nordin, 1976), por su origen distinto, su composición cuantitativa (galactosamina parcialmente acetilada 20%, y galactosa 70%) y por el tipo de enlace que es α -1,4 predominantemente.

Por lo tanto el heteropolisacárido por nosotros aislado es un polímero nuevo.

Son muchos los trabajos que estudian la composición y estructura de polisacáridos fúngicos, pero muy pocos son los que estudian con detalle la fisiología de la producción de estas sustancias, sin embargo, las condiciones de culti_

vo pueden alterar no sólo la cantidad de polisacárido producido, sino también su composición cuantitativa e incluso cualitativa (Martin y Adams, 1956).

Es interesante destacar que el intercambio gaseoso, velocidad de agitación en cultivos sumergidos o relación superficie/volumen en cultivos estáticos, juega un importante papel en la producción del polisacárido extracelular de A. nidulans. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Ono y col., (1977a), quienes han observado que la producción del pullulano, polisacárido extracelular elaborado por Pullularia pullulans, también se ve favorecida por la aireación. Monilia fructigena también produjo mayor cantidad de polisacárido extracelular en cultivos agitados que en cultivos estacionarios (Santamaría y col., 1978).

A. nidulans creció y formó polisacárido extracelular con todas las fuentes de carbono utilizadas, obteniéndose los mejores rendimientos con fructosa (38 mg/100 ml) y galactosa (33 mg/100 ml).

En otros microorganismos también se han estudiado el crecimiento y la producción de polisacárido extracelular cuando se utilizan distintas fuentes de carbono. Así, en Plectania occidentalis y Helotium sp. (Davis y col., 1965), Claviceps fusiformis (Buck y col., 1968), P. pullulans (Catley, 1971), Botrytis cinerea (Leal y col., 1979), etc. Podemos concluir de todos estos trabajos, que la habilidad para crecer y formar polisacárido extracelular con distintas fuentes carbonadas, varía enormemente de un microorganismo a otro. En general, los azúcares que proporcionan poco o ningún crecimiento no son buenos precursores para la

formación del polisacárido. Por otra parte, a igualdad de utilización de dos azúcares por un determinado microorganismo, el rendimiento obtenido de polisacárido puede ser diferente, dependiendo éste del complejo(s) enzimático(s) implicado en la síntesis del polisacárido extracelular.

El aumento de la concentración de glucosa hasta 25 g/l favorece la producción de polisacárido en A. nidulans, aunque este factor parece jugar un papel más importante en la degradación, ya que en los cultivos con menor concentración de azúcar (5, 10 y 15 g/l) el polisacárido es degradado más rápidamente que en los otros, como se deduce de la gran cantidad de polisacárido recogido por centrifugación.

Así mismo en B. cinerea (Leal y col., 1979), Polyporus circinatus (Pinotti y Zancan, 1972) y Claviceps fusiformis (Buck y col., 1968) también se observa un aumento en la producción de polisacárido cuando se aumenta la concentración de la fuente carbonada hasta un cierto límite, a partir de éste posteriores adiciones de azúcar producen una disminución en la cantidad de polisacárido recogido. Esto indicaría que el factor limitante de la producción de polisacárido es un nutriente esencial distinto del azúcar.

La fuente nitrogenada parece tener mayor importancia que la de carbono en la formación del polisacárido de A. nidulans, lo cual parece lógico si tenemos en cuenta que el polisacárido está formado principalmente por galactosamina. El aumento de la concentración de la fuente nitrogenada hasta 4 g/l favorece la producción de polisacárido cuando se utilizan asparagina o casaminoácidos, sin embargo, pa

rece que el polisacárido producido en el medio con asparagina se produce en menor proporción y es degradado más rápidamente por las enzimas líticas del hongo, que el formado en el medio con casaminoácidos, como se deduce de la gran cantidad de polisacárido recogido por centrifugación a los 10 días de incubación en el primer medio. Estas diferencias podrían deberse a las diferencias cuantitativas existentes en la composición del polisacárido producido en ambos medios, pues el formado en el medio con casaminoácidos dio el contenido más alto de nitrógeno (4,58%) correspondiente a un 58,8% de galactosamina, y el formado con asparagina dio un 4,1% de nitrógeno, correspondiente a un 53,2% de galactosamina.

En el polisacárido producido por B. cinerea, compuesto exclusivamente por glucosa, el aumento de la concentración de la fuente de nitrógeno disminuyó la producción de polisacárido, favoreciendo por tanto su formación una relación C/N alta (Leal y col., 1979). En A. nidulans ocurre justamente lo contrario, y la formación de polisacárido se ve favorecida por una relación C/N baja.

A. nidulans produjo polisacárido extracelular cuando se utilizaron nitrato potásico o tartrato diamónico como fuente de nitrógeno, y también lo produjo con todos los aminoácidos ensayados excepto con leucina y valina. Para Leal, Gallegly y Lilly (1971) la diferencia entre aminoácidos buenos y pobres, está en la habilidad del hongo de que se trate para utilizar los esqueletos carbonados de los aminoácidos. Si el hongo convierte un aminoácido en un ácido orgánico que no es posteriormente metabolizado, será una fuente pobre de nitrógeno. Coll y Leal (1972) en-

contraron acumulación de ácido isovalérico en los líquidos de cultivo de A. nidulans cuando utilizaban leucina como única fuente de nitrógeno, y concluyeron que el ácido isovalérico podía inhibir la incorporación de varias sustancias.

En nuestro caso, la producción de polisacárido en los medios conteniendo leucina o valina + casaminoácidos, indicó que el hongo utilizaba preferentemente la mezcla de aminoácidos existentes en los casaminoácidos. Por otra parte, en los medios con leucina o valina suplementados con succinato sódico se produjo polisacárido, demostrando que las moléculas del ácido orgánico no ionizadas eran los agentes tóxicos limitantes del crecimiento y de la producción de polisacárido, de acuerdo con la revisión de Simon y Beevers (1952), y el trabajo de Neal, Weinstock y Lampen (1965).

El aumento en la concentración del ión fosfato estimuló la producción del polisacárido de A. nidulans; estos resultados coinciden con los obtenidos por Leal-Serrano (comunicación personal) estudiando una cepa de P. pullulans que produce un β -glucano. En la síntesis del pullulano (α -glucano) producido también por P. pullulans parece existir un intermedio de tipo glucolípido, que posee fósforo unido a él mediante enlaces débiles (Ono y col., 1977b); esto explicaría la estimulación de la síntesis del polisacárido al aumentar la concentración de fosfato del medio.

La producción de polisacárido extracelular en A. nidulans varía con el pH inicial, siendo el pH 3 el ópti

mo. A este pH, sin embargo, el crecimiento fue menor que a los otros pHs ensayados (4 a 8) y el consumo de glucosa fue algo más lento. Parece que el pH inicial 3 retrasa el crecimiento, favoreciendo la producción de polisacárido. En otros microorganismos también se ha estudiado la influencia del pH inicial del medio en la producción de polisacárido. Así, en P. pullulans (Ono y col., 1977 a), Helotium sp., Plectania occidentalis (Davis y col., 1965) y Claviceps fusiformis (Buck y col., 1968) la habilidad para producir polisacárido depende del pH inicial del medio de cultivo, estando en todos ellos el pH óptimo entre 5 y 6.

La gran mayoría de microorganismos productores de polisacáridos son incapaces de utilizar sus propios polisacáridos extracelulares como fuente de carbono y por tanto no sirven como fuente de reserva de carbono y energía (Dudman, 1977). A. nidulans llegó a utilizar totalmente el polisacárido extracelular cuando el periodo de incubación fue suficientemente largo (por encima de 30 días); en periodos de incubación más cortos y una vez agotada la glucosa del medio el polisacárido dejó de ser cohesivo y hubo de recogerse por centrifugación. Es posible que debido a la acción de alguna(s) enzima(s) del medio, el polisacárido en un primer paso hubiera sido degradado a fragmentos más cortos de menor peso molecular, y que estos fragmentos fueran posteriormente atacados hasta desaparecer por completo el polisacárido. Sin embargo, una vez agotada la glucosa del medio no se observó aumento en la cantidad de micelio recogido, señal inequívoca de que el polisacárido sería una sustancia de reserva de carbono y nitrógeno. Por otra par-

te, no hemos conseguido aislar la enzima o enzimas del líquido de cultivo, capaces de hidrolizar "in vitro" el polisacárido de A. nidulans, pero sin embargo este experimento nos ha permitido valorar una serie de actividades enzimáticas en el líquido de cultivo de A. nidulans, principalmente quitinasa y β -glucanasa. Las β -glucanasas del líquido de cultivo de A. nidulans degradaron parcialmente (entre 25 y 30% de hidrólisis) dos β -glucanos que no son degradados por los microorganismos que los producen en ausencia de otra fuente de carbono: B. cinerea (Leal y col., 1979) y P. pullulans (Leal-Serrano y col., en prensa).

El periodo de incubación no afectó la composición del polisacárido de A. nidulans con respecto a los componentes principales (galactosamina y galactosa), asumiendo que se trata de un heteropolímero. Sin embargo, se encontraron importantes variaciones en la cantidad relativa de estas sustancias en el polisacárido producido con diferentes fuentes de nitrógeno, por lo cual teniendo en cuenta que se trata de un heteropolímero de N-acetil-galactosamina y galactosa deben cambiar la concatenación secuencial de estas moléculas, a menos que como Gorin y Eveleigh (1970) señalaron las unidades de α -D-galactopiranosas puedan ser convertidas en unidades de 2-deoxi-2-acetamido- α -D-galactosapiranosas al nivel polimérico, en vez de serlo a partir de un nucleótido de aminoazúcar.

Varios investigadores (Carmo-Sousa y Barroso-Lopes, 1970 ; Northcote, 1963; Buck y col., 1968; Santamaría y col., 1978) han sugerido correspondencia entre polisacári-

dos extracelulares y la estructura de las paredes celulares del microorganismo que los elabora.

La proporción de N-acetilglucosamina a galactosamina en la pared celular de una cepa de A. nidulans estudiada por Bull (1970) es 1,32, y las dos hexosaminas pertenecen a polímeros distintos, ya que el polímero de galactosamina se extrajo por tratamiento de la pared celular con NaOH 2N, mientras que la quitina fue resistente a tratamientos con álcali y ácido.

En la cepa de A. nidulans por nosotros estudiada galactosamina + glucosamina constituyen sólo un 9,23% del total de la pared celular, por consiguiente si el polisacárido extracelular forma parte de la pared su concentración es muy baja.

Probablemente hay un sistema de prioridades dentro de la célula sintetizándose primero los polisacáridos constituyentes de la pared celular y después los exopolisacáridos (Sutherland, 1977).

La síntesis de exopolisacáridos es aparentemente dependiente, al menos en muchas bacterias, de la disponibilidad de un lípido portador isoprenoide. Se pueden aplicar según Sutherland (1977) dos posibles mecanismos de síntesis a los exopolisacáridos: los producidos en la membrana citoplásmica utilizando precursores formados intracelularmente, o los producidos a partir de precursores específicos en el medio extracelular. En general, el primer tipo de síntesis se encuentra en la producción de heteropolisacáridos, mientras que el segundo es característico de ciertos homopolisacáridos.

La producción de polisacáridos extracelulares compuestos por galactosamina y galactosa, por otros aislamientos de A. nidulans (1071 y 1701), nos confirman por una parte la utilidad de los polisacáridos fúngicos en taxonomía, y por otra la posibilidad de obtener toda una gama de polisacáridos con la misma composición cualitativa y distinta composición cuantitativa.

Un estudio sistemático de los polisacáridos producidos por diferentes aislamientos y diferentes condiciones de cultivo, podría permitir un mejor entendimiento del efecto de estos factores en la producción de polisacáridos y posiblemente conduciría al aislamiento de nuevos polisacáridos.

CONCLUSIONES

- 1) Aspergillus nidulans (C.E.C.T. n° 2544) produce en el medio de cultivo un polisacárido extracelular compuesto casi exclusivamente por galactosa y galactosamina parcialmente acetilada.
- 2) El espectro infrarrojo del polisacárido muestra absorción a 820 y 850 cm^{-1} y ausencia de absorción a 890 cm^{-1} lo que indica la existencia de enlaces glicosídicos con configuración α .
- 3) Los residuos de azúcar se encuentran unidos en el polisacárido mediante enlaces 1 \rightarrow 3 predominantemente (74,5%), habiendo un pequeño porcentaje de enlaces 1 \rightarrow 4 (22%) y 1 \rightarrow 6 (3,5%); estos resultados han sido obtenidos mediante la oxidación del polisacárido con NaIO_4 y confirmados por la degradación de Smith.
- 4) Se trata de un polisacárido neutro, ya que no precipita con las sales de amonio cuaternario (BCTA).
- 5) El polisacárido se puede fraccionar utilizando concentraciones crecientes de metanol. Las fracciones así obtenidas difieren en las proporciones relativas de galactosamina y galactosa, precipitando con menor concentración de metanol las fracciones de mayor contenido en galactosamina.
- 6) El polisacárido una vez precipitado del líquido de cultivo por la adición de alcohol pierde su solubilidad en agua, es parcialmente soluble en NaOH 1N, y apenas soluble en HCl 1N.

- 7) La producción de polisacárido en cultivos sumergidos varía con la velocidad de agitación, aumentando al aumentar ésta hasta un cierto límite.
- 8) La producción de polisacárido en cultivos estáticos disminuye con la relación superficie/volumen.
- 9) A. nidulans produce polisacárido extracelular con todas las fuentes de carbono utilizadas, obteniéndose los mejores rendimientos con fructosa y galactosa.
- 10) El aumento de la concentración de la glucosa hasta 25 g/l estimula la producción de polisacárido.
- 11) La fuente de nitrógeno juega un papel más importante que la de carbono en la formación de polisacárido.
- 12) Una relación C/N baja favorece la formación de polisacárido.
- 13) Se obtiene polisacárido con todas las fuentes de nitrógeno ensayadas, excepto con leucina y valina. El máximo rendimiento se obtiene con ácido L-glutámico.
- 14) La adición de casaminoácidos a los medios que contienen aminoácidos estimula la producción de polisacárido en la mayoría de los casos.
- 15) Cuando se añade succinato sódico a los medios con leucina o valina, se produce polisacárido en ambos casos, lo que demuestra que las moléculas de ácido orgánico no ionizadas son los agentes tóxicos limitantes de la producción de polisacárido y crecimiento.
- 16) La producción de polisacárido aumenta al aumentar la concentración de casaminoácidos y asparagina.
- 17) El polisacárido formado en el medio con casaminoáci-

dos se produce en mayor proporción y es más estable a las enzimas líticas del propio hongo, que el formado con asparagina.

18) El aumento en la concentración del ion fosfato no afecta al crecimiento del hongo pero favorece la producción de polisacárido.

19) La tiamina no es indispensable para la producción de polisacárido.

20) La producción de polisacárido varía con el pH inicial, siendo el pH óptimo para la producción de polisacárido el pH 3.

21) El periodo de incubación no afecta la composición del polisacárido con respecto a los componentes mayoritarios galactosamina y galactosa.

22) La composición cuantitativa del polisacárido varía con la fuente de nitrógeno utilizada, aunque estas diferencias no se detectan en el espectro infrarrojo.

23) Los aislamientos de A. nidulans 1071 y 1701 producen también polisacáridos extracelulares conteniendo galactosamina y galactosa, aunque sus proporciones relativas son distintas a las del aislamiento n° 2544.

24) En el líquido de cultivo de A. nidulans se han detectado las siguientes enzimas: β -1,3-glucanasa, β -1,6-glucanasa, quitinasa, invertasa, pectinasa y amilasa.

25) Exceptuando la quitinasa y la β -1,6-glucanasa, las actividades enzimáticas ensayadas son máximas cuando se utilizan líquidos de cultivo de 60 días.

26) El polisacárido de A. nidulans es degradado en el líquido de cultivo al agotarse la glucosa del medio, pero no se han podido aislar la(s) enzima(s) responsables de su degradación.

27) Teniendo en cuenta la composición de azúcares de la pared celular de A. nidulans podemos concluir que si el polisacárido extracelular forma parte de la misma, se encuentra en una proporción muy baja.

28) Las diferencias entre el polisacárido estudiado en nuestro laboratorio y el polisacárido de Aspergillus nidulans descrito por Gorin y Eveleigh (1970), compuesto por galactosa y N-acetilgalactosamina en la proporción 1 a 1,8 parecen ser debidas a diferencias entre aislamientos, aunque no puede descartarse que sean debidas a variaciones en el medio de cultivo o a factores ambientales.

BIBLIOGRAFIA

- AINSWORTH, G.C. (1973). The Fungi, vol. IV A. A taxonomic review with keys: Ascomycetes and fungi imperfecti. XVIII + 621 pp. Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K. & Sussman, A.S. eds. New York Academic Press.
- APPLEGARTH, D.A. (1967). The cell wall of Penicillium notatum. Archives of Biochemistry and Biophysics 120, 471-478.
- APPLEGARTH, D.A. & BOZOIAN, G. (1967). Presence of chitin in the cell wall of a griseofulvin species of Penicillium. Journal of Bacteriology 94, 1787-1788.
- APPLEGARTH, D.A. & BOZOIAN, G. (1969). Cell wall of Helminthosporium sativum. Archives of Biochemistry and Biophysics 134 (2), 285-289.
- ASPINALL, G.O. & FERRIER, R.J. (1957). A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrates. Chemistry and Industry 1216.
- BAILEY, R.W. (1965). Oligosaccharides. Pergamon Press Ltd. pp. 179.
- BARDALAYE, P.C. & NORDIN, J.H. (1976). Galactosaminogalactan from cell walls of Aspergillus niger. Journal of Bacteriology 125 (2), 655-669.
- BARKER, S.A. (1963). Polysaccharides of bacteria, moulds, yeasts and protozoa. En: Comprehensive Biochemistry, Vol.5, Carbohydrates, pp. 246-261, edited by Florin, M. & Stotz, E.H., Elsevier Publishing Company, Amsterdam London, New York.
- BARKER, S.A., BOURNE, E.J. & WHIFFEN, D.H. (1956). Use of Infrared Analysis in the determination of Carbohydrate structure. Methods of Biochemical Analysis 3, 213-245.

- BARTNICKI-GARCIA, S. (1968). Cell wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi. *Annual Review of Microbiology* 22, 87-108.
- BLOOMFIELD, B.J. & ALEXANDER, M. (1967). Melanins and resistance of fungi to lysis. *Journal of Bacteriology* 93, 1276-1280.
- BLUMENTHAL, H.J., HOROWITZ, S.T., HEMERLINE, A. & ROSEMAN, S. Biosynthesis of glucosamine and glucosamine polymers by molds. *Bacteriological Proceedings* 137.
- BRIMACOMBE, J.S. & WEBBER, J.M. (1964). Mucopolysaccharides: Chemical Structure, Distribution and isolation. BBA Library Vol. 6. Elsevier.
- BUCK, K.W., CHEN, A.W., DICKERSON, A.G. & CHAIN, E.B. (1968). Formation and structure of extracellular glucans produced by Claviceps Species. *Journal of General Microbiology* 51, 337-352.
- BUCK, K.W., CHAIN, E.B. & DARBYSHIRE, J.E. (1969). High cell wall galactosamine content and virus particles in Penicillium stoloniferum. *Nature (London)* 223, 1273.
- BULL, A.T. (1970). Chemical composition of wild-type and mutant Aspergillus nidulans cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. *Journal of General Microbiology* 63, 75-94.
- BULL, A.T. (1972). Environmental Factors Influencing the Synthesis and Excretion of Exocellular Macromolecules. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology* 22, 261-292.

- CADMUS, M.C., GASDORF, H., LAGODA, A.A., ANDERSON, R.F. & JACKSON, R.W. (1963). New bacterial polysaccharide from Arthrobacter. Applied Microbiology 11, 488-492.
- CARLSON, D.M. & MATTHEWS, L.W. (1966). Polyuronic acids produced by Pseudomonas aeruginosa. Biochemistry 5, 2817-2822.
- CARMO-SOUSA, L. & BARROSO-LOPES, C. (1970). A comparative study of the extracellular and cell-wall polysaccharides of some Candida species. Antonie van Leeuwenhoek 36, 209-216.
- CASARES, R. (1954). Tratado de análisis químico. Vol. II p. 36.
- CATLEY, B.J. (1971). Utilization of carbon sources by Pullularia pullulans for the elaboration of extracellular polysaccharides. Applied Microbiology 22, 641-649.
- COLL, J. & LEAL, J.A. (1972). Utilization of L-Leucine as nitrogen source by fungi. Transactions of the British mycological Society 59 (1), 107-114.
- CROOK, E.M. & JOHNSTON, I.R. (1962). The qualitative analysis of the cell walls of selected species of Fungi. Biochemical Journal 83, 325-330.
- DAVIS, E.N., RHODES, R.A. & SHULKE, H.R. (1965). Fermentative production of exocellular glucans by fleshy fungi. Applied of Microbiology 13, 267-271.
- DAWSON, R.M.C., ELLIOT, D.C., ELLIOT, W.H., & JONES, K.M. (1962). Data for Biochemical Research. Oxford University Press (pp. 299).

- DIEM, K. (Ed.) (1962). Documenta Geigy, Scientific Tables.
Published by Geigy Pharmaceutical Company Limited,
Manchester.
- DISCHE, Z. (1947). A new specific color reaction of hexuronic
acids. *Journal of Biological Chemistry* 167, 189-198.
- DISTLER, J.J. & ROSEMAN, S. (1960). Galactosamine polymers
produced by Aspergillus parasiticus. *Journal of Biological
Chemistry* 235, 2538-2541.
- DUDMAN, W.F. (1977). The role of surface polysaccharides in
natural environments. En: *Surface Carbohydrates of the
prokaryotic cell*, pp. 357-414. Ed. by Sutherland I.W.
Academic Press. London, New York and San Francisco.
- FARR, D.R., SCHULER-HOVANESSIAN, A., HORISBERGER, M. (1977).
Structure of an -D-galactosaminoglycan from
Physarum polycephalum spherule walls. *Carbohydrate
Research* 59 (1), 151-154.
- FOSTER, J.W. (1949). *Chemical activities of Fungi*. Academic
Press Inc. publishers. New York, pp. 648.
- FREI, E. & PRESTON, R.D. (1961). Variants in the structural
polysaccharides of algal cell walls. *Nature* 192, 939-943.
- FUJIMOTO, M., KUNINAKA, A., YONEY, S., KOHAMA, T. & YOSHINO, H.
(1969). Occurrence of malonogalactan in the nuclease
preparation from Penicillium citrinum. *Agricultural
Biological Chemistry* 33, 1666-1668.
- GASDORF, H.J., BENEDICT, R.G., CADMUS, M.C., ANDERSON, R.F.
& JACKSON, R.W. (1965). Polymer producing species of
Arthrobacter. *Journal of Bacteriology* 90 (1), 147-150.

- GORIN, P.A.J. & EVELEIGH, D.E. (1970). Extracellular 2-acetamido-2-deoxy-D-galacto-D-galactan from Aspergillus nidulans. Biochemistry 9, 5023-5027.
- GORING, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. (1963). Structural relationships of extracellular polysaccharides from phytopathogenic Xanthomonas spp. Part II. X. hyacinthi, X. translucens, and X. Maculofoliogardeniae. Canadian Journal Chemistry 41, 2357-2361.
- GORING, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. (1968). Structural chemistry of fungal polysaccharides. Advances in Carbohydrate Chemistry 23, 367-417.
- GRATZNER, H.G. (1972). Cell wall alterations associated with the hyperproduction of extracellular enzymes in Neurospora crassa. Journal Bacteriology 111, 443-446.
- HARADA, T. (1965). Succinoglucan 10C3. A new acidic polysaccharide of Alcaligenes faecalis var. myxogenes. Archives of Biochemistry and Biophysics 112, 65-69.
- HAROLD, F.M. (1962). Binding of inorganic polyphosphate to the cell wall of Neurospora crassa. Biochimica et Biophysica Acta 57, 59-66.
- HAY, G.W., LEWIS, B.A. & SMITH, F. (1965). Periodate oxidation of polysaccharides: General procedures. Methods in Carbohydrate Chemistry V, 357-361.
- HORTON, D. & WOLFROM, M.L. (1963 a). Polysaccharides. Section a. General. En: Comprehensive Biochemistry, Carbohydrates. Vol. 5, pp.185-188. Florin, M. & Stotz, E.H. ed. Elsevier Publishing Company. Amsterdam, London, New York.

- HORTON, D. & WOLFROM, M.L. (1963 b). Polysaccharides. Section b. Excluding glycuronans, bacterial polysaccharides and mucopolysaccharides. En: Comprehensive Biochemistry, Carbohydrates. Vol. 5, pp. 189-232. Florkin, M. & Stotz, E.H. ed. Elsevier Publishing Company. Amsterdam, London, New York.
- HOUGH, L. & JONES, J.K.N. (1962). Chromatography on paper. En: Methods in Carbohydrate Chemistry I, 21-31.
- HUMPHREY, B., EDGLEY, M. & VINCENT, J.M. (1974). Absence of mannose in the extracellular polysaccharide of fast-growing Rhizobia. Journal of General Microbiology 81, 267-270.
- JANN, K. & JANN, B. (1977). Bacterial polysaccharide antigens. En: Surface carbohydrates of the prokaryotic cell, pp. 247-288. ed. by Sutherland, I.W. Academic Press. London, New York, San Francisco.
- JEANES, A. (1965). Dextrans. Preparation of dextrans from growing Leuconostoc cultures. Methods in Carbohydrate Chemistry 5, 118-127.
- JEANES, A., PITTSLEY, J.E., WATSON, P.R. & DIMLER, R.J. (1961). Characterization and Properties of the phosphomannan from Hansenula hostii NRRL Y-2448. Archives of Biochemistry and Biophysics 92 (2), 343-350.
- KABAT, E.A. & MAYER, M.M. (1961). Periodate oxidations. En: Kabat y Mayer's, Experimental Immunochemistry, pp. 542-550. Thomas, C.C. Publisher. Springfield. Illinois. U.S.A.

- KIRKWOOD, S. (1974). Unusual polysaccharides. Annual Review of Biochemistry 43, 401-417.
- KOHAMA, T., FUJIMOTO, M., KUNINAKA, A. & YOSHINO, H. (1974). Structure of malonogalactan, an acidic polysaccharide of Penicillium citrinum. Agricultural Biological Chemistry 38, 127-134.
- KREGER, D.R. (1954). Observations on cell wall of yeasts and some other fungi by x-ray diffraction and solubility tests. Biochimica et Biophysica Acta 13, 1-9.
- LEAL, J.A., GALLEGLY, M.E. & LILLY, V.G. (1971). The value of 21 amino acids as nitrogen sources for Phytophthora cactorum and P. haveae. Canadian Journal of Microbiology 17 (10), 1319-1325.
- LEAL, J.A., RUPEREZ, P. & GOMEZ-MIRANDA, B. (1979). Extracellular β -glucan production by Botrytis cinerea. Transactions of the British mycological Society 72 (1), 172-176.
- LEAL-SERRANO, G., RUPEREZ, P. & LEAL, J.A. (1980). A new acidic polysaccharide elaborated by Pullularia pullulans. Transactions of the British mycological Society. (En prensa).
- LILLY, V.G., WILSON, H.A., & LEARCH, J.C. (1958). Bacterial polysaccharides. II. Laboratory-scale production of polysaccharides by species of Xanthomonas. Applied Microbiology 6, 105-108.

- LINKER, A. & JONES, R.S. (1966). A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from Pseudomonads. *Journal of Biological Chemistry* 241, 3845-3851.
- LIVINGSTON, L.R. (1969). Locus-specific changes in cell wall composition characteristic of osmotic mutants of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* 99, 85-90.
- LOEWUS, F.A. (1952). Improvement in the anthrone method for determination of Carbohydrates. *Analytical Chemistry* 24, 219.
- LOWRY, O.H. & LOPEZ, J.A. (1946). The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *Journal of Biological Chemistry* 162, 421-428.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- LUDOWIEG, J. & DORFMAN, A. (1960). A micromethod for the colorimetric determination of N-acetyl groups in acid mucopolysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta* 38, 212-218.
- MAHADEVAN, P.R. & TATUM, E.L. (1965). Relationship of the major constituents of the *Neurospora crassa* cell wall to wild type and colonial morphology. *Journal of Bacteriology* 90, 1073-1081.
- MARTIN, S.M. & ADAMS, G.A. (1956). A survey of fungal polysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology* 2, 715-721.

- MCCORMICK, J.J., BLOMQUIST, J.C., & RUSCH, H.P. (1970).
Isolation and characterization of a galactosamine
wall from spores and sphaerules of Physarum polycephalum.
Journal of Bacteriology 104, 1119-1125.
- Mc-LELLAN, W., Mc-DANIEL, L.E. & LAMPEN, J.O. (1970).
Purification of phosphomannanase and its action on the
yeast cell wall. Journal of Bacteriology 102, 261-270.
- MEYER, K., DAVIDSON, E., LINKER, A. & HOFFMAN, P. (1956).
The acid mucopolysaccharides of connective tissue.
Biochimica et Biophysica Acta 21, 506-518.
- NEAL, A.L., WEINSTOCK, J.O. & LAMPEN, J.D. (1965). Mechanism
of fatty acid toxicity for yeast. Journal of Bacteriology
90, 126-131.
- NELSON, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi
method to the determination of glucose. Journal of
Biological Chemistry 153, 375-380.
- NISHIKAWA, Y., TAKEDA, T., SHIBATA, S. & FUKUOKA, F. (1969).
Polysaccharides in lichens and fungi. III. Further
investigation on the structures and the antitumor activity
of the polysaccharides from Gyrophora esculenta Myhoshi
and Lasallia populosa Llano. Chemical Pharmacological
Bulleting (Tokyo) 17 (9), 1910-1916.
- NORTHCOTE, D.H. (1963). The structure and organization of
the polysaccharide of yeast. En: Proceeding of the
symposium on the Chemistry and Biochemistry of Fungi
and Yeast, pp. 669-675. I.V.P.A.C. Dublin. Butterworth's
Press, London.

- ONO, K., YASUDA, N. & UEDA, S. (1977 a). Effect of pH on pullulan elaboration by Aureobasidium pullulans S-1. Agricultural Biological Chemistry 41, (11), 2113-2118.
- ONO, K., KAWAHARA, Y. & UEDA, S. (1977 b). Effect of pH on the content of glycolipids in Aureobasidium pullulans S-1. Agricultural Biological Chemistry 41 (12), 2313-2317.
- PERCIVAL, E. (1963). The monosaccharides. 1. General structure of monosaccharides, pp. 1-66. En: Comprehensive Biochemistry vol. 5 Carbohydrates. ed. Florkin, M. & Stotz, E.H. Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York.
- PINOTTI, M.H. & ZANCAN, G.T. (1972). Polysaccharides production by Polyporus circinatus. Fr. Review of Microbiology 3, 35-38.
- RAISTRICK, H. & RINTOUL, M.L. (1931). Studies in the biochemistry of microorganisms. XIII. On a new type of mucilaginous material, luteic acid, produced from glucose by Penicillium luteum Zukal. Transactions of the Royal Society 220, 255-367.
- REES, D.A., STEELE, I.W. & WILLIAMSON, F.B. (1969). Conformational analysis of polysaccharides. III. The relation between stereochemistry and properties of some natural polysaccharide sulfates (1). Journal of Polymer Science C28, 261-276.
- REESE, E.T., PARRISH, F.W. & MANDELS, M. (1962). β -D-1,6-glucanases in Fungi. Canadian Journal of Microbiology 8, 327-334.

- REISSIG, J.L. (1968). Role of a mucopolysaccharide in growth regulation. *Genetics* 60, 214.
- REISSIG, J.L. & GLASGOW, J.E. (1971). Mucopolysaccharide which regulates growth in *Neurospora*. *Journal of Bacteriology* 106, 882-889.
- RICHARDS, G.A. (1951). The integument of arthropods. University of Minnesota Press. Minneapolis, p. 47.
- RONDLE, C.J.M. & MORGAN, W.T.J. (1955). The determination of glucosamine and galactosamine. *Biochemical Journal* 61, 586-589.
- SANDFORD, P.A. (1979). Exocellular, microbial polysaccharides. In: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 36, 265-303.
- SANTAMARIA, F., REYES, F. & LA HOZ, R. (1978). Extracellular glucan containing (1→3)- β and (1→6) linkages isolated from *Monilinia fructigena*. *Journal of General Microbiology* 109, 287-293.
- SCOTT, J.E. (1965). Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. *Methods in Carbohydrate Chemistry* Vol. V, 38-44.
- SHEAR, M.J. & TURNER, F.C. (1943). Chemical treatment of tumor. V. Isolation of the hemorrhage-producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. *Journal of Natural Cancer Institute* 4, 81-97.
- SHIBATA, Y. & NISIZAWA, K. (1965). Microheterogeneity of β -Glycosidases in Apricot Emulsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 109, 516-521.

- SIDEBOTHAM, R.L. (1974). Dextrans. *Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry* 30, 371-444.
- SIETSMA, J.H. & WESSELS, J.G.H. (1977). Chemical analysis of the hyphal wall of Schizophyllum commune. *Biochimica et Biophysica Acta* 496, 225-239.
- SIMON, E.W. & BEEVERS, H. (1952). The effects of pH on the biological activities of weak acids and bases. I. The most usual relationship between pH and activity. *New Phytology* 51, 163-190.
- SLODKI, M.E. (1966 a). Hydrolysis products from an extracellular Tremella polysaccharide. *Canadian Journal of Microbiology*, 12, 495-499.
- SLODKI, M.E., WICKERHAM, L.J. & BANDONI, R.J. (1966 b). Extracellular heteropolysaccharides from Cryptococcus and Tremella: A possible taxonomic relationship. *Canadian Journal of Microbiology* 12, 489-494.
- SLODKI, M.E., SAFRANSKI, M.J., HENSLEY, D.E. & BABCOCK, G.E. (1970). Variation in composition of yeast phosphohexosans. *Applied Microbiology* 19, 1019-1020.
- SLONEKER, J.H., ORENTAS, D.G. & JEANES, A. (1964). Exocellular bacterial polysaccharide from Xanthomonas campestris NRRLB-1459 Par. III. Structure. *Canadian Journal of Chemistry* 42 (6), 1261-1269.
- SOMOGYI, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195, 19-23.

- SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. & MOORE, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Analytical Chemistry* 30, 1190-1206.
- SUTHERLAND, I.W. (1970). Formate, a new component of bacterial expolysaccharides. *Nature* 228, 280.
- SUTHERLAND, I.W. (1972). Microbial exopolysaccharides: potential. *Process Biochemistry* 7 (11), 27-30.
- SUTHERLAND, I.W. (1977). Bacterial exopolysaccharides. Their nature and production. En: *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell*. pp. 27-96. Ed. by Sutherland, I.W. Academic Press. London, New York, San Francisco.
- TAGUCHI, R., SAKANO, Y., KIKUCHI, Y., SAKUMA, M. & KOBAYASHI, T. (1973). Synthesis of pullulan by acetone-dried cells and cell-free enzyme from *Pullularia pullulans*, and the participation of lipid intermediate. *Agricultural Biological Chemistry* 37 (7), 1635-1641.
- TEORELL, T. & STENHAGEN, E. (1938). Ein Universal puffer für den pH Bereich 2,0 bis 12,0. *Biochemische Zeitschrift* 299, 416-419.
- TOWLE, G.A. & WHISTLER, R.L. (1973). *Phytochemistry* 1, 198-248. Ed. L.P. Miller.
- TRACEY, M.V. (1955). Chitin. En: *Modern Methods of Plant Analysis* 2, 272- . Paech, K. & Tracey, M.V., eds. Springer-Verlag, Berlin.
- TREVITHICK, J.R., METZENBERG, R.L. & COSTELLO, D.F. (1966). Genetic alteration of pore size and other properties of the *Neurospora* cell wall. *Journal of Bacteriology* 92, 1016-1020.

- TROTTER, M.J. & WHISLER, H.C. (1965). Chemical composition of the cell wall of Amoebidium parasiticum. Canadian Journal of Botany 43, 869-876.
- WARD, C. & WRIGHT, B.E. (1965). Cell wall synthesis in Dictyostelium discoideum. Biochemistry 4, 2021-2027.
- WHEAT, R.W., DORSCH, C. & GODOY, J. (1965). Occurrence of pyruvic acid in the capsular polysaccharide of Klebsiella rhinoscleromatis. Journal of Bacteriology 80, 539.
- WHISTLER, R.L., BUSHWAY, A.A., SINGH, P.P., NAKAHARA, W. & TOKUZEN, R. (1976). Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 32, 235-275.
- WHITE, G.J. & SUSSMAN, M. (1963). Polysaccharides involved in slime-mold development. II. Water-soluble acid mucopolysaccharide (s). Biochimica et Biophysica Acta 74, 179-187.
- YUEN, S. (1974). Pullulan and its applications. Process Biochemistry 9 (9), 7-9.

