

Estudio comparativo de la composición química de las paredes celulares de la cepa natural y el mutante osmótico del hongo *neurospora crassa*

Dr. Ernesto Barbosa M. M.D., Ph.D. *

INTRODUCCION

Una revisión de la literatura sobre la composición química de las paredes celulares del hongo *Neurospora crassa* (1,2,3,4,5,) muestran solamente un conocimiento parcial e incompleto de las mismas. Lo anterior debido principalmente a la falta de métodos adecuados de hidrólisis, y a fallas en la determinación cuantitativa de los monosacáridos liberados.

Se ha sugerido que las paredes celulares de *N. crassa* varían en su composición según el medio donde el hongo sea cultivado, así como si se agrega el azúcar sorbosa, el cual induce el crecimiento en forma de

colonias. La observación de que el mutante osmótico de la *Neurospora crassa* (Os) es más susceptible a las concentraciones de sorbosa que la cepa natural (C.N.), sugiere que la mutación podría envolver algún paso específico en la biosíntesis de la pared celular.

El presente trabajo tiene por objeto determinar la composición química de las paredes celulares de la *N. crassa* en CN y OS, obtenidas tanto de cultivo en medio mínimo, como de este adicionado de diferentes compuestos particularmente monosacáridos como fuente de carbono, utilizando métodos especiales tanto de hidrólisis como de análisis de los azúcares liberados.

* *Profesor Asociado de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional. Jefe del Subgrupo de Bioquímica del Instituto para programas Especiales de Salud.*

MATERIAL Y METODOS

a) Organismos y medios de cultivo:

Los estudios fueron hechos en dos cepas de *Neurospora crassa*, la cepa natural No. J. T. 1.960 obtenida de "The Genetics Foundation of the University of Texas", y el mutante osmótico allele M 16 No. F. G. S. C. - 812 obtenido de "The Fungal Genetics Stock Center, Darmouth College, Hanover, N. H."

Los cultivos se almacenaron en medio sólido a 4°C. La composición de este medio fué la dada por Vogel para medio mínimo (6) agregándole a gar Difco al 2%. Cada dos o tres meses los cultivos se reinocularon en medio sólido fresco, a temperatura ambiente por dos o tres días, y se guardaron de nuevo a 4°C.

b) Purificación de las paredes celulares: Para aislar y purificar las paredes celulares se efectuaron cultivos de ambas cepas en medio mínimo de Vogel (6), en cantidades de 100 ml. colocados en fioles de 250 ml., esterilizadas a 120°C. por 15 minutos, inoculándolas e incubando a temperatura ambiente por tres días. Los micelios se colectaron por filtración, se lavaron cuatro o cinco veces con agua destilada, se cortaron en fragmentos pequeños y rompieron por sonicación o por perlas de vidrio. Se efectuó control microscópico de la disrupción celular por la técnica de Bianchi (7). Cuando los controles mostraron total ruptura micelial, se centrifugaron las paredes celulares a 2.000 g. y resuspendieron en una solu-

ción al 1% de dodecil sulfato de sodio, lavándolas con agitación por 12 horas. En seguida se centrifugaron a 2.000 g. y se lavaron con agua destilada. Estos lavados y centrifugaciones se repitieron quince veces, usando examen microscópico de una muestra cada vez para controlar la pureza de la preparación. Finalmente fueron liofilizadas, pesadas y almacenadas en tubos de ensayo con tapa de teflón.

c) Efecto de la fuente de carbono y presión osmótica sobre la composición de las paredes celulares: Para efectuar este estudio se cultivaron las cepas en medio mínimo de Vogel el cual incluía 2% de sacarosa como medio de referencia. Los otros compuestos usados como fuente de carbono se agregaron a medio mínimo sin azúcares en fioles por separado así: glucosa 2%, fructosa 2%, galactosa 2%, manosa 2%, glicerol 2%, y glucosa 1% más fructosa 1%. Estos medios fueron esterilizados por filtración. Para aumentar la presión osmótica se utilizó sorbosa, azúcar no metabolizable por el hongo, en cantidades de 2, 4, 8, 10, y 15% agregadas al medio mínimo con sacarosa al 2%. Un grupo de experimentos se efectuó con el mutante osmótico solamente en el cual la concentración de sacarosa se aumentó progresivamente en medio mínimo con 4% de sorbosa así: 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 y 2.00%. Los medios con sorbosa fueron esterilizados también por filtración. Todas las fioles se inocularon y cultivaron a tempe-

ratura ambiente por tres días, y fueron procesadas de la manera descrita antes.

d) Hidrólisis y estudio de carbohidratos: Para hidrolizar las paredes celulares se modificó una técnica descrita para hidrólisis de lípidos y gangliosidos (8), la cual fué determinada luego de varios ensayos comparativos de esta con otras técnicas descritas antes (2, 4, 9). Para realizarla se tomaron 10 mgs. de paredes celulares purificadas y se colocaron en ampollitas con HCL 1.0 N. en metanol, sellaron y colocaron en un horno a 85°C. por 38 horas temperatura y tiempo de metanólisis encontrados como ideales experimentalmente. En seguida el residuo se centrifugó y el sobrenadante se secó bajo nitrógeno en baño de María a 45°C. Los glicósidos de metilo formados en la metanólisis se estudiaron por cromatografía de gases. Para este estudio se prepararon los éteres de trimetilsilano modificando la técnica de Sweeley (10). Las muestras secas se disolvieron en 0.2 ml. de sulfóxido de dimetilo, se agregaron 2.0 mgs de galactitol usado como patrón interno dado que este azúcar alcohol no hace parte de las paredes celulares, da relación lineal con los otros azúcares, y en las condiciones de trabajo empleadas su tiempo de retención es distinto del de los azúcares identificados en las paredes celulares en ensayos preliminares. A la anterior mezcla se añadieron 0.8 ml, de piridina, 0.2 ml. de hexametildisilazano y

0.1 ml. de trimetilclorosilano. Los tubos se taparon y agitaron mecánicamente por 10 minutos, se centrifugaron y 5.0 microlitros del sobrenadante, fueron inyectados en un cromatógrafo de gases Barber Colman con una columna de 6 piés por 3 mms. empacada con 3% de SE-30. La temperatura fué isotérmica de 145°C. con una presión de 18 lbs por pulgada cuadrada.

e) Estudio de residuos no metanolizables: Para este estudio se utilizaron dos técnicas de hidrólisis. HCl 6.0 N. según técnica de Boas (11), colocando el residuo de la metanólisis de 10 mgs. de paredes celulares en 2.0 ml. de HCl 6.0 N. en un tubo con tapa de teflón, hidrolizando a 100°C. por 10 horas retirando la humina formada con carbón activado y liofilizando los azúcares liberados. La determinación de estos se efectuó por dos métodos i) Cromatografía de gases con un patrón de N-acetilglucosamina tratado en la forma ya descrita y ii) Por método calorimétrico según técnica de Dische y Borenfreund (12). El segundo método de estudio de estos residuos no metanolizables fue una hidrólisis enzimática para la cual se empleó una cepa de *Streptomyces* sp. 11238 HM Levinson (QMRD-C) B. Reese Tarpaulin (Nueva Guinea) obtenida de la "American Type Culture Collection", la cual se cultivó en medio de Reynolds (13) con 0.25% de quitina, para inducir la formación de quitinasa la que se purificó según la técnica de Berger y Reynolds (14). Para esta hidrólisis

el residuo de la metanólisis fue incubado con 2.0 mgs. de la preparación enzimática, en 2.0 ml. de buffer de fosfatos 0.05 M. pH 6.3, a 37°C. por tres días. Se centrifugó y el sobrenadante se pasó a través de una columna de Dowex 1, eluyendo con 5.0 ml. de agua. El eluido se liofilizó y estudió por cromatografía de gases usando un patrón de N-acetilglucosamina.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se ve la composición en hexosas de las paredes celulares de las dos cepas cultivadas en medio mínimo con sacarosa. Las cantidades de hexosas liberadas de la C.N. son un 10% mayores que las liberadas de la Os. Esto es debido a un mas bajo contenido de glucosa en las paredes celulares del mutante, mientras que el contenido de manosa

TABLA 1. Comparación del contenido de hexosas de las paredes celulares de la cepa natural (C.N.) y el mutante osmótico (Os.) de la *Neurospora crassa* cultivados en sacarosa-medio mínimo.*

	C.N.	Os.
Manosa	0.38**	0.53
Galactosa	0.19	0.22
Glucosa	6.54	5.73
Acetilglucosamina	1.12	0.93
TOTAL	8.23	7.41
Relación de Glucosa/ manosa+galactosa	11.47	7.64

* Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

** Los resultados son expresados como mg. de hexosas por 10 mg. de paredes celulares secas.

en estas es mayor que en C.N. El contenido de galactosa es aproximadamente similar en las dos cepas. El anterior fenómeno es más notorio si se efectúa la relación glucosa a manosa más galactosa.

Las cantidades de N-acetilglucosamina determinadas por hidrólisis enzimática y cromatografía de gases es un 10% mayor en la C.N. al comparlas con la Os.

Los resultados del estudio comparativo de la composición de las paredes celulares del hongo cultivado en medio mínimo con fuentes de carbono distintas de sacarosa se presentan en la tabla 2. La cantidad total de hexosas liberadas por metanolisis de las paredes celulares de la C.N. no cambia significativamente cuando la sacarosa es reemplazada por hexosas, mientras que la Os. muestra una baja consistente en el contenido de hexosas principalmente por disminución de glucosa, exopto cuando es cultivada en medio con glucosa y fructuosa como fuente de carbono. El contenido de galactosa y manosa no varía significativamente. Cuando el glicerol es usado como fuente de carbono la cantidad de glucosa de las paredes celulares tanto de la C.N. como de la Os. disminuye acentuadamente, mientras que el contenido de galactosa y manosa aumentan en la C.N. y no varía en la Os.

TABLA 2. Comparación del contenido de hexosas de las paredes celulares de la cepa natural (C.N.) y el mutante osmótico (Os.) de la *Neurospora crassa* cultivados en medios con distintas fuentes de carbono. Todas las hexosas usadas lo fueron a una concentración del 2%.*

Manosa	9.28**	0.32	0.30	0.43	0.37	0.52	0.33	0.31	0.40	0.85	0.66		
	Gluc.		Gal.		Fruc.		Gluc+Fruc.		Man.		Glic.		
	C.N.	Os.	C.N.	Os.	C.N.	Os.	C.N.	Os.	C.N.	Os.	C.N.	Os.	
Manosa	0.28**	0.32	0.30	0.43	0.37	0.52	0.33	0.31	0.31	0.40	0.58	0.66	
Galactosa	0.18	0.14	0.12	0.18	0.19	0.29	0.17	0.18	0.13	0.15	0.28	0.30	
Glucosa	5.52	4.26	4.42	3.23	5.62	3.78	6.15	5.28	5.65	4.15	3.81	3.87	
TOTAL	5.98	4.72	4.84	3.84	6.18	4.59	6.65	5.77	6.09	4.70	4.67	4.83	
Relación Gluc/ Man+Gal	12.00	9.26	10.52	5.30	10.04	4.67	12.30	10.78	12.84	7.55	4.43	3.91	

* Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes

** Los resultados son expresados como mg. de hexosas por 10 mg. de paredes celulares secas.

Los resultados experimentales obtenidos del estudio de la composición de las paredes celulares de las dos cepas cultivadas en sacarosa medio mínimo con cantidades crecientes de sorbosa, muestran que el contenido de glucosa no cambia en ninguna de las dos cepas, mientras que el de

manosa disminuye progresivamente especialmente en la Os. Tabla 3 y Figuras 1 y 2. La galactosa en C.N. disminuye paralelamente a la manosa pero no cambia significativamente en la Os. Estos hechos se manifiestan claramente al hacer la relación glucosa a galactosa más manosa. Tabla 3.

TABLA 3. Comparación del contenido de hexosas de las paredes celulares de la cepa natural (C.N.) y el mutante osmótico (Os.) de la *Neurospora crassa* cultivadas en sacarosa-medio mínimo con concentraciones ascendentes de sorbosa.*

Manosa	0.33**	0.41	0.36	0.19	0.23					
	Cantidad de sorbosa en sacarosa-medio mínimo (g/100g)									
	2		4		8		10		15	
	C.N.	Os.	C.N.	Os.	C.N.	Os.	C.N.	Os.	C.N.	Os.
Manosa	0.33**	0.41	0.36	0.19	0.23	0.16	0.29	0.24		
Galactosa	0.21	0.15	0.20	0.15	0.10	0.18	0.13	0.12		
Glucosa	7.54	5.50	7.26	5.69	6.36	5.59	5.79	5.92		
TOTAL	8.08	6.06	7.82	6.03	6.69	5.93	6.21	6.28		
Relación Gluc/ manosa+galact.	13.96	8.82	12.96	16.73	19.27	16.44	13.79	16.44		

* Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

** Los resultados son expresados como mg. de hexosas por 10 mg. de paredes celulares secas.

El experimento efectuado con la Os. en medio con 4% de sorbosa con concentraciones crecientes de glucosa del 0.25 al 2.0% muestran un contenido constante de glucosa en las paredes comparable al observado cuando se cultiva en sacarosa medio mínimo sin sorbosa, mientras que el contenido de manosa es mas bajo, y disminuye aun mas cuando la concentración de sacarosa se aumenta en el medio. Estos resultados se expresan gráficamente en las figuras 3 y 4.

La hidrólisis con HCl 6.0 N. del

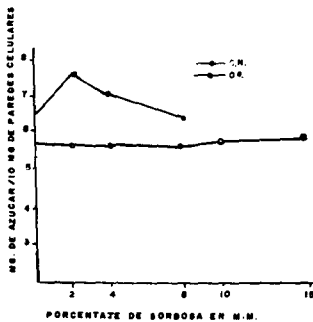


FIGURA 1. Representación gráfica de la cantidad de glucosa metanolizada de 10.0 mg. de paredes celulares secas de la cepa natural (C.N.) y el mutante osmótico (Os.) de *Neurospora crassa* cultivada en sacarosa-medio mínimo con concentraciones ascendentes de sorbosa.

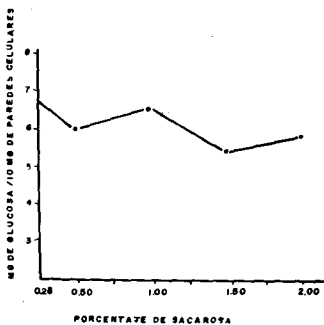


FIGURA 3. Representación gráfica de la cantidad de glucosa metanolizada de 10 mg. de paredes celulares secas del mutante osmótico de *Neurospora crassa* cultivado en un medio con 4% de sorbosa y concentraciones ascendentes de sacarosa.

residuo metanolizable en ambas cepas libera solamente glucosamina, mientras que la hidrólisis enzimática libera N-acetilglucosamina y una pequeña cantidad de glucosa, dejando todavía residuo, el cual sujeto a hidrólisis con HCl 6.0 N. libera solamente glucosamina.

Aunque la quitinasa hidroliza completamente quitina purificada, solamente un 70% de la "quitina" de las paredes celulares es hidrolizada. En ninguno de los experimentos efectuados se encontró galactosamina.

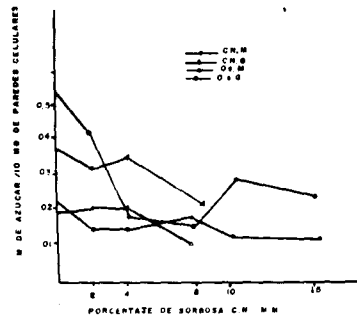


FIGURA 2. Representación gráfica de la cantidad de manosa y galactosa metanolizadas de 10 mg. de paredes celulares secas de la cepa natural (C.N.) y el mutante osmótico (Os.) de *Neurospora crassa* cultivada en sacarosa medio mínimo con concentraciones ascendentes de sorbosa. M, manosa. G, galactosa.

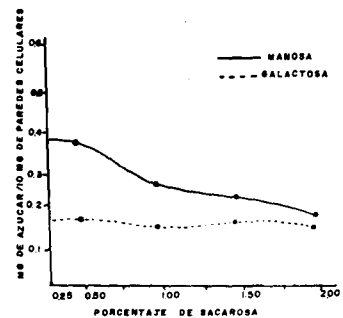


FIGURA 4. Representación gráfica de la cantidad de manosa y galactosa metanolizadas de 10 mg. de paredes celulares secas del mutante osmótico de *Neurospora crassa* cultivado en un medio con 4% de sorbosa y concentraciones ascendentes de sacarosa.

El estudio comparativo del contenido de glucosamina de las paredes celulares de las dos cepas cultivadas en sacarosa medio mínimo, con el contenido de este aminoazúcar cuando se cultiva en medio mínimo con otros carbohidratos como fuente de carbono se presenta en la tabla 4. Se puede ver que la Os. muestra un contenido mayor de glucosamina cuando la fuente de carbono es una hexosa en lugar de sacarosa, excepto para la mezcla de glucosa mas fructuosa, que recuerda al contenido observado cuando se cultiva en sacarosa medio mínimo. El contenido

de glucosamina en las paredes celulares de la C.N. no cambia significativamente usando hexosas como fuente de carbono. Cuando la fuente es glicerol hay aumento del contenido de glucosamina en las dos cepas.

Los resultados del contenido de glucosamina al cultivar el hongo en sacarosa medio mínimo, con concentraciones crecientes de sorbosa, muestran que el aminoazúcar aumenta en la C.N. solo a una concentración alta de sorbosa (8%), mientras que en la Os. aumenta en todas las concentraciones. Tabla 5.

TABLA 4. Contenido de glucosamina de las paredes celulares de la cepa *Neurospora crassa* cultivados en medios con distintos compuestos como fuente de carbono. **

Adición al med-min	%	Enzim	C.N.		Enzim	Os.	
			HCl	Total		HCl	Total
Manosa	2	0.68***	0.30	0.98	0.85	0.47	1.32
Galactosa	2	0.67	0.45	1.12	0.70	0.48	1.18
Glucosa	2		1.25	1.25		1.18	1.18
Fructosa	2	0.70	0.31	1.01		1.30	1.30
Gluc+fruc ¹	2		1.11	1.11		1.00	1.00
Glicerol ¹	2	1.00	0.41	1.41	0.90	0.31	1.21
Glicerol	2					1.30	1.30
Sacarosa	2		1.18	1.18		0.96	0.96

* El total de hexosamina encontrado es el resultado de hidrólisis con HCl 6.0 N., o hidrólisis enzimática seguida de hidrólisis con HCl 6.9 N. del residuo.

** Los resultados son el promedio de por lo menos 3 experimentos independientes.

*** Los resultados se expresan como mg. de hexosamina por 10 mg. de paredes celulares secas.

TABLA 5. Contenido de glucosamina de las paredes celulares de la cepa natural (C.N.) y el mutante osmótico (Os.) * de la *Neurospora crassa* cultivadas en sacarosa-medio mínimo con concentraciones ascendentes de sorbosa. **

Adición al med-min	Enzim	C. N.		Enzim	Os.	
		HCl	Total		HCl	Total
2% sacarosa	0.75***	0.30	1.05	0.60	0.30	0.90
2% sacarosa		1.18	1.18		0.96	0.96
2% sacarosa+2% sorbosa	0.58	0.35	0.93	0.70	0.35	1.05
2% sacarosa+2% sorbosa		0.96	0.96		1.02	1.02
2% sacarosa+4% sorbosa	0.70	0.28	0.96			
2% sacarosa+4% sorbosa		1.02	1.02		1.38	1.38
2% sacarosa+8% sorbosa	0.90	0.52	1.42			
2% sacarosa+8% sorbosa		1.31	1.31		1.30	1.30
2% sacarosa+10% sorbosa					1.37	1.37

* El total de hexosamina encontrado es el resultado de hidrólisis con HCl 6.0 N., o hidrólisis enzimática seguida de hidrólisis con HCl 6.9 N. del residuo.

** Los resultados son el promedio de por lo menos tres experimentos independientes.

*** Los resultados se expresan como mg. de hexosamina por 10 mg. de paredes celulares secas.

Los cultivos de la Os. en medio mínimo con 4% de sorbosa y concentraciones de sacarosa de 0.25 a 2.0% muestran valores mas altos de glucosa mina si se comparan con los valores obtenidos en sacarosa medio mínimo. Tabla 6.

TABLA 6. Contenido de glucosamina de las paredes celulares del mutante osmótico (Os.)* de la *Neurospora crassa* cultivado en sacarosa-medio mínimo y en medio mínimo con 4% de sorbosa con concentraciones ascendentes de sacarosa como fuente de carbono.**

Adición al med-min	
2.00% sacarosa	0.96***
0.25% sacarosa+4% sorbosa	1.18
0.50% sacarosa+4% sorbosa	1.26
1.00% sacarosa+4% sorbosa	1.07
1.50% sacarosa+4% sorbosa	1.26
2.00% sacarosa+4% sorbosa	1.38

* El total de hexosas encontrado es el resultado de hidrólisis con HCl 6.0 N.

** Los resultados son el promedio de por lo menos tres experimentos independientes.

*** Los resultados se expresan como mg. de hexosaminas por 10 mg. de paredes celulares secas.

DISCUSION

Unas de las propiedades mas importantes de las paredes de los hongos son su rigidez y aparente complejidad. Nabel (15) pudo demostrar la presencia de quitina y celulosa en *Rhizidiomyces bivellatus*. Fuller (16) confirmó estos hallazgos, y Horikoschi (17) también demostró por métodos físicos y químicos la presencia de quitina en *Aspergillus orizae*. Blumenthal y Roseman (18) demostraron la presencia de quitina en *Neurospora crassa* al determinar el contenido de glucosamina de los micelios. En

1962 de Terra y Tatum (2) estudiaron las variaciones del contenido de glucosa y glucosamina en *Neurospora* según el tipo de crecimiento, micelio extendido o colonia. Ellos observaron que al inducir crecimiento colonial por sorbosa, la cantidad de glucosa de las paredes celulares disminuía, mientras que la cantidad de quitina aumentaba. Al repetir estos experimentos se observa que las paredes de la C.N. muestran una ligera disminución del contenido de glucosa y un aumento del de quitina en condiciones de alta presión osmótica (concentración de sorbosa del 8%). Al comparar estos resultados con la Os. que es aun mas sensible al crecimiento colonial en sorbosa, el contenido de glucosa no varía a pesar del aumento en presión osmótica. En concentraciones tan altas como el 15% de sorbosa donde el crecimiento es muy difícil y la pared celular defectuosa, la cantidad de glucosa de estas es la misma que si el hongo se cultivara en medio mínimo, por lo tanto se puede concluir que hay poca relacion entre la morfología colonial y el contenido de glucosa de las paredes celulares.

Mahadevan y Tatum (5) encontraron manosa en las paredes celulares de *Neurospora crassa*. En nuestro estudio se encontró además galactosa en cantidad suficiente para ser medida con exactitud cuantitativamente. Contrario al hallazgo de la poca variación del contenido de glucosa en las paredes celulares, el de manosa

y galactosa varía diferentemente en las dos cepas del hongo cuando la presión osmótica se altera. Al aumentarla con sorbosa la cantidad de manosa de la pared celular disminuye mas en la Os. que en la C.N. La galactosa disminuye algo en C.N. pero es constante en Os. Estos estudios sugieren la presencia de varios polisacáridos en las paredes celulares, los cuales se efectan en diferente manera por cambios en la presión osmótica.

Los estudios de ambas cepas en concentraciones crecientes de sorbosa indican que la Os. tiene un claro defecto en relación a la síntesis de su pared celular, debido a la drástica caída de la concentración de manosa, si se compara con la C.N. El anterior hecho sumado a las alteraciones morfológicas de la pared celular muestra un defecto probablemente a nivel de membrana celular. El hecho de que el contenido de glucosa no varíe a pesar de los cambios de presión osmótica, indica que no todos los sistemas enzimáticos relacionados con la síntesis de la pared celular se afectan en forma similar.

Los experimentos en los cuales el hongo se cultivó en medios con azúcares distintos a la sacarosa como fuente de carbono, muestran que el azúcar usado tiene un mayor efecto en la composición de la pared celular de Os. que en C.N. Estas observaciones también pueden rela-

cionarse a diferencias enzimáticas probablemente a nivel de membrana celular.

Los experimentos con Os. en medios con concentraciones ascendentes de sacarosa muestran también el efecto osmótico sobre el polisacárido donde el azúcar manosa se halla envuelto.

Desde los trabajos de Potgieter (4) se sabe que existe mas de un polisacárido en las paredes de los hongos, siendo el principal un glucán con enlaces beta-1,3 y tal vez beta-1,6 tipo gentibiosa. Una de nuestras observaciones fue la liberación precoz en la hidrólisis de manosa y galactosa. A las 12 horas se habían liberado completamente mientras que solamente un 70% de la glucosa lo había sido. Esto sugiere que la galactosa y manosa estan envueltas, tal vez con glucosa en un polisacárido diferente del principal glucán beta-1,3 que constituye la mayor parte de la pared celular. La localización del polisacárido en el cual se encuentra galactosa es probablemente diferente del cual en donde se halla manosa, pues no varía grandemente al aumentar la presión osmótica, lo cual señala también que se sintetizan independientemente.

Intentos de hidrólisis directa de la pared celular purificada con quitinasa fallaron, lo cual sugiere que la quitina ocupa un lugar en la pared

donde las enzimas hidrolíticas no pueden llegar, posiblemente el centro de la pared. El valor del contenido de quitina es aproximadamente un 10% del total del peso de la pared celular seca y aumenta especialmente en Os. al aumentar la presión osmótica. Al hidrolizar este polisacárido no solamente se libera N-acetilglucosamina, sino una pequeña cantidad de glucosa, lo que sugiere la presencia de otros polisacáridos con glucosa íntimamente asociados a la quitina y no metanolizables. La hidrólisis enzimática de la quitina de la pared solo libera un 70% de N-acetilglucosamina, al contrario de la hidrólisis con HCl 6.0 N. que libera un 100%, sugiriendo este hecho la presencia de enlaces celulares diferentes al del tipo de la quitina (beta-1,4), en parte de este polisacárido residuo de la metanólisis.

En conclusión se puede inferir de los anteriores estudios que la pared celular de *Neurospora crasa* está formada por lo menos por cuatro polisacáridos. Primero uno superficial en el que el azúcar manosa es el principal constituyente, sensible en Os. a los cambios de presión osmótica. Segundo uno con galactosa como componente principal, que no se afecta por la presión osmótica. Tercero, el más abundante, polímero de glucosa que puede ser el glucán

descrito por Potgieter (4). Finalmente un cuarto compuesto por quitina, central rodeado por los anteriores y posiblemente asociado a pequeñas cantidades de otros polisacáridos compuestos por glucosa y N-acetilglucosamina diferentes de la quitina. Mahadevan (19) sugiere también la presencia de mas de un polisacárido en las paredes de *Neurospora crasa*.

Otros estudios en nuestro laboratorio muestran la presencia de pequeñas cantidades de proteína en las paredes celulares así como de lípidos, lo cual podría sugerir la existencia de lipidopolisacáridos y peptidoglicanes análogos a los descritos en bacterias por Wang (20).

RESUMEN

Estudios comparativos sobre la composición química de las paredes celulares del hongo *Neurospora crasa* en su cepa natural y en su mutante-osmótico son efectuados. Mediante métodos hidrolíticos especiales, así como métodos analíticos sensibles es posible deducir la presencia de por lo menos cuatro polisacáridos diferentes en las paredes, y su diferente susceptibilidad a los cambios de la presión osmótica y a los diferentes compuestos usados como fuente de carbono.

SUMMARY

A comparative study of the chemical composition of the cell walls of the wild type and osmotic-mutant of *Neurospora crassa* was performed. By means of special hydrolytic methods and accurate quantitative determinations, it was possible to

suggest the presence of at least four different polysaccharides in the cell walls and their different susceptibility to increased osmotic pressure, and to the different compounds used as a carbon source.

REFERENCIAS

1. Aronson, J. and Machlis, L. The chemical composition of the hyphal walls of the fungus *Allomyces*. *Am. J. Botany*, 46:292-300, 1959.
2. de Terra, N. and Tatum, E.L. Colonial growth of *Neurospora*. *Science*, 134:1066-1068, 1961.
3. de Terra, N. and Tatum, E.L. A relationship between cell wall structure and colonial growth in *Neurospora crassa*. *Am. J. Botany*, 50:669-677, 1963.
4. Potgieter, H.J. and Alexander, M. Polysaccharide components of *Neurospora crassa* hyphal cell walls. *Can. J. Microbiol.*, 11:122-125, 1965.
5. Mahadevan, P.R. and Tatum, E.L. Relationship of the major constituents of the *Neurospora crassa* cell walls to wild type and colonial morphology. *J. Bacteriol.*, 90:1073-1081, 1965.
6. Hamilton, J.G. and Calvet, J. Production of protoplasts in an osmotic mutant of *Neurospora crassa* without added enzyme. *J. Bacteriol.*, 88:1076-1084, 1964.
7. Bianchi, E.D. Differential staining of yeast for purified cell walls, broken cells and whole cells. *Stain Technol.*, 40:79-82, 1965.
8. Sweeley, C.C. and Walker, B. Determination of carbohydrates in glycolipides and gangliosides by gas chromatography. *Anal. Chem.*, 36:1461-1466, 1964.
9. Crook, E.M. and Johnston, I.R. The qualitative analysis of the walls of selected species of fungi. *Biochem. J.*, 83:325-331, 1962.
10. Sweeley, C.C. Bentley, R., Makita, M. and Wells, W.W. Gas liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 84:1463-1468, 1962.

10. Sweeley, C.C. Bentley, R., Makita, M. and Wells, W.W. Gas liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2497-2507, 1963.
11. Boas, N.F. Method for the determination of hexosamines in tissues. *J. Biol. Chem.*, 204:553-563, 1953.
12. Ashwell, G. en S.P. Colowick and N.O. Kaplan (editores). *Methods in Enzymology*, vol. III, Academic Press, Inc., New York, pp. 98:99, 1957.
13. Reynolds, D.M. Exocellular chitinase from a *Streptomyces* sp. *J. Gen Microbiol.*, 11:150-159, 1954.
14. Berger, R.L. and Reynolds, D.M. The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 29:522-534, 1958.
15. Nabel, K. *Über die Membrane nieder Pilze, besonders von Rhizidiomyces bivellatus nov. spec.* *Arch. Mikrobiol.*, 10:515-541, 1939.
16. Fuller, M.S. Biochemical and microchemical study of the cell walls of *Rhizidiomyces* sp. *Am. J. Botany*, 47:838-842, 1960.
17. Horikoshi, K. and Arima, K. X-ray diffraction patterns of the cell wall of *Aspergillus oryzae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 57:392-394, 1962.
18. Blumenthal, H.J. and Roseman, S. Quantitative estimation of chitin in fungi. *J. Bacteriol.*, 74:22-224, 1957.
19. Mahadevan, P.R. Localization of structural polymers in the cell wall of *Neurospora crassa*. *J. Cell. Biol.*, 35:295-302, 1967.
20. Wang, W.S., Korczynski, M.S. and Lundgren, D.G. Cell envelope of an Iron-oxidizing bacterium. Studies of lipopolysaccharides and peptidoglycan. *J. Bacteriol.*, 104:556-565, 1970.