

ACILGLICOSAS DE *H. stellata*

Por A. López y
J. Burgos

INTRODUCCION

Las acilglicosas (los glicolípidos más sencillos) constituyen un nuevo tipo de lípidos, recientemente descubiertos, presente en diversos microorganismos, crecidos en medios de cultivo de los que forma parte la glucosa.

Son frecuentes en las bacterias (KATES y WASSEF, 1970) pero no en los hongos. Los hasta ahora descubiertos en las especies fúngicas pertenecen a dos grandes grupos:

1.—Polioles acilados, como el 4-O-(2, 3, 4, 6-tetra-O-acil-β-D-manopiranosil)-D-eritritol aislado del *Ustilago maydis* (FLUHARTY y O'BRIEN, 1969); los manitoles y arabitoles acilados detectados en especies del género *Rhodotorula* (TULLOCH y SPENCER, 1964); la glucosa acilada del *Agaricus bisporus* y *Saccharomyces cerevisiae* (BRENNAN y col., 1970) y las trealosas aciladas, que parecen constituir la reserva endógena de lípidos, del *Pullularia pullulans* (MERDINGER y col., 1968) y *Claviceps purpurea* (COOKE y MITCHELL, 1969).

2.—Ácidos grasos hidroxilados unidos por enlaces glicosídicos a un azúcar; un ejemplo de este tipo es la 2-O-β-D-glucopiranosil-D-glucopiranososa unida por enlace β-glicosídico a hidroxiaácidos grasos, como el 17-L-hidroxi C-18, en *Torulopsis apicola* (GORIN y col., 1961) o al 13-L-hidroxidocosanoico en *Candida bogoriensis* (TULLOCH y col., 1968); otro ejemplo lo constituye el ácido monoglucosil-oxioctadecenoico hallado en *Aspergillus niger* (LAINE y col., 1972).

En un estudio previo de la composición lipídica de esporas y micelio joven de *Hemispora stellata* (LÓPEZ, 1972), se observó la presencia de ciertos glicolípidos provisionalmente considerados, sobre la base de su comportamiento cromatográfico,

como glicosilglicéridos. En esta publicación se estudian más profundamente estas sustancias y se caracterizan definitivamente como acilglicósidos.

MATERIAL Y METODOS

I. Microorganismo

La cepa de *Hemispora stellata* utilizada procede del «Centraal-Bureau voor Schimmel-cultures (Baarn-Holanda)».

Las esporas se obtuvieron sobre salvado humedecido siguiendo para su obtención y purificación la técnica descrita por SALA y BURGOS (1972).

El micelio se obtuvo por incubación en medio de Vaisey (VAISEY, 1954), preparado con ingredientes Oxoid, durante 24 horas a 25°C, en un agitador recíproco a 230 agit/min. y se recogió por centrifugación y lavó repetidas veces con agua destilada.

Tanto el micelio como las esporas se almacenaron, cuando fue necesario, hasta su uso, a -20°C.

II. Reactivos, soportes cromatográficos, disolventes y gases

Tanto los productos químicos como los soportes cromatográficos fueron suministrados por Merck o B. D. H., así como los disolventes; el glucostat lo fue por Worthington Biochemical Corp. (N.J., U.S.A.). Los disolventes empleados en las extracciones y cromatografías fueron redistilados antes de su uso.

Para la cromatografía en fase gaseosa se emplearon nitrógeno, hidrógeno y aire de alto grado de pureza suministrados por la S.E.O.

III. Extracción y fraccionamiento lipídico

Las esporas y el micelio se liofilizaron primero y se extrajeron después, 3 veces, con 10 volúmenes, de cloroformo-metanol (2/1) según ha sido previamente descrito (LÓPEZ, 1972). Los extractos se liberaron del material no lipídico lavándolos de acuerdo con el método de FOLCH (1957) y se fraccionaron en columnas de ácido silícico siguiendo esencialmente el método de VORBECK y MARINETTI (1965), recogándose tres fracciones: 1), eluida con cloroformo (lípidos apolares); 2) eluida con acetona (glicolípidos); 3) eluida con metanol (resto de los lípidos polares).

IV. Análisis de los glicolípidos

a) *Cromatografías en láminas finas*: Las analíticas se efectuaron rutinariamente sobre láminas de sílice gel G de 250 μ s, activadas a 110°C durante 30 minutos; las preparativas sobre placas de sílice gel PF₂₅₄ de 0,5 mms. de espesor, activadas durante 12 horas a 25°C. La fase móvil usada fue siempre cloroformo-metanol-agua (65/25/4) (v/v).

Como una prueba confirmatoria más del carácter de glicolípidos, se usaron ocasionalmente cromatografías en láminas de sílice gel G con acetona-ácido acético-agua (100/20/1) (v/v) como fase móvil.

b) *Hidrólisis ácida y análisis de la fracción no lipídica*: Se realizó con una solución de ClH 2N a 110°C durante dos horas en tubo cerrado, al término de las cuales se eliminó el ClH por evaporación al vacío.

El estudio de los productos de hidrólisis se realizó por cromatografía descendente en papel de Whatman n.º 1 empleando como fase móvil una mezcla de n-butanol-piridina-agua en las proporciones 6/4/3 (v/v/v).

c) *Hidrólisis alcalina y metilación de los ácidos grasos*: La hidrólisis alcalina de los glicolípidos se llevó a cabo manteniendo las muestras en una disolución 0,2N de metóxido sódico en metanol, a la temperatura ambiente, durante una hora, al cabo de la cual se añadió agua y se neutralizó cuidadosamente el medio con Dowex 50 (forma H⁺) y se evaporó a sequedad. El material resultante se redisolvió en partes iguales de agua y cloroformo (unos 5 mls de cada uno). Las dos fases se separaron por filtración a través de papel de filtro Whatman siliconado 1 ps. El cloroformo que contiene los ésteres metílicos de los ácidos grasos se evaporó y el residuo se disolvió en éter etílico para su inyección en el cromatógrafo de gases.

d) *Examen por cromatografía en fase gaseosa de los ácidos grasos*: Se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer modelo F-11, con detector de ionización de llama y columnas de vidrio rellenas con dietilenglicol succinato al 10 % sobre soporte Cromosorb W 80-100 mallas lavado al ácido y tratado con hexametildisilazano. Las condiciones empleadas en el desarrollo de las cromatografías fueron las siguientes: flujo de nitrógeno 35 mls/min; flujo de aire: 300 mls/min; flujo de hidrógeno: 32 mls/min; velocidad de la carta: 2 mm/min; programa de temperatura: 50-180°C, con un incremento de 8°C/min; longitud de la columna: 1,83 metros.

La identificación de los ácidos grasos se basó en los tiempos de retención de sus ésteres metílicos, que fueron comparados con los patrones oportunos.

V. Determinación de hidratos de carbono totales, β -D-glucosa y ácidos grasos totales.

El contenido total en hidratos de carbono se determinó por la técnica de DUBOIS y col. (1956); el total de ácidos grasos esterificados por la de STERN y col. (1953); el total de ácidos grasos esterificados por la de Stern y col. (1953) y la β -D-glucosa por el método de KESTON (1956) con glucosa oxidasa y peroxidasa.

RESULTADOS

La tabla núm. 1 recoge los resultados obtenidos en un fraccionamiento típico de los extractos lipídicos de esporas y micelio; en ella puede verse que el porcentaje

total de glicolípidos es considerablemente más elevado (13 % del total de la fracción lipídica) en las esporas, que en el micelio (8 % de los lípidos totales).

La fracción eluida con acetona de las columnas de ácido silícico se reveló, al examen por cromatografía analítica en lámina fina, heterogénea. Alicuotas de la misma fueron colocadas en sendas láminas, que se revelaron individualmente con reactivos generales (A. sulfúrico al 50 %) y reactivos específicos para grupos amina (reactivo de ninhidrina, WAGNER y col. 1961), grupos colina (reactivo de I + IK), grupos fosfóricos (reactivo azul de molibdeno, DITTMER y LESTER, 1964), α -glicoles (reactivo periodato-SCHIFF, SHAW, 1968) e hidratos de carbono (reactivo de difenilamina, DISCHE, 1929; reactivo de antrona).

La fig. núm. 1 representa la copia de un cromatograma, revelado con ácido sulfúrico, de los presuntos glicolípidos de esporas en la que puede observarse cuatro manchas con los siguientes Rf: mancha núm. 1, 0,80; mancha núm. 2, 0,71; mancha núm. 3, 0,66; mancha núm. 4, 0,56. Las cuatro fueron negativas frente a los reactivos específicos para los grupos colina, amina y ésteres fosfóricos y se mostraron positivas ante los reactivos específicos para los hidratos de carbono.

La mancha núm. 3 de Rf 0,66 dio en las placas rociadas con ácido sulfúrico y calentadas a 110°C durante unos minutos, una coloración roja característica de los 3-hidroxi-esteroides con doble enlace en posición 5-6.

En el micelio (véase fig. 1) y por el mismo procedimiento se identificaron tres glicolípidos con los siguientes Rf: 0,83; 0,67; y 0,58. A diferencia de las esporas no se detectaron esterol glicósidos.

Por cromatografía en lámina fina preparativa se aislaron y purificaron los cuatro componentes detectados en las esporas y los tres identificados en el micelio.

En la tabla núm. 2 se muestra el porcentaje (determinado por pesada) que representa cada uno de ellos respecto del total de glicolípidos. Las cifras que se dan son el valor medio de los obtenidos en cinco cromatografías preparativas. Los hallados en cada caso no se desviaron en ningún caso más de un 1-2 % de la media.

Una alícuota de cada uno de los componentes fraccionados por cromatografía en lámina fina preparativa se sometió a hidrólisis ácida. Los productos de hidrólisis se cromatografiaron en papel (cromatografía descendente) junto con patrones de glicerol, glucosa, galactosa y manosa. Los cromatogramas obtenidos se revelaron con los reactivos de nitrato de plata (TREVELYAN y col. 1950) y SCHIFF (SHAW, 1968) demostrando (fig. núm. 2) que todos los glicolípidos carecen de glicerol y contienen glucosa y que el componente de Rf 0,71 (núm. 2) de las esporas contiene además galactosa.

Otra alícuota de cada uno de los glicolípidos purificados se sometió a hidrólisis alcalina y al examen de sus ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa. La tabla núm. 3 recoge la composición en ácidos grasos de cada glicolípido y el porcentaje que representan del total.

La fracción soluble en cloroformo resultante de la hidrólisis alcalina de la

mancha núm. 3 de Rf 0,66 de las esporas, no contiene ácidos grasos, pero sí un esterol no identificado, cuyo espectro ultravioleta aparece en la fig. núm. 3. Sometido a análisis por cromatografía en lámina fina de sílica gel G, empleando como fase móvil una mezcla de éter de petróleo-éter etílico-ácido acético en las proporciones 80-20-1 (v/v/v), mostró un Rf (0,16) muy similar al de una muestra patrón de ergosterol (Rf, 0,18) cromatografiada en las mismas condiciones.

En la tabla núm. 4 se muestra la relación molar de ácidos grasos-hidratos de carbono de cada glicolípido. El componente número 2 de las esporas dio además una relación glucosa-galactosa de 2/1.

Queda así demostrado:

a) Que los glicolípidos números 1, 2 y 4 de las esporas y los tres glicolípidos del micelio son acilglicosas y que el componente número 3 de los glicolípidos de las esporas es un esterol-glicósido.

b) Que el componente número 1 de las esporas es un mono-acil-glucosil-glicósido; el número 2 puede ser un mono-acil-glucosil-glicósido-galactósido, o un mono-acil-glucosil-galactosil-glicósido o un mono-acil-galactosil-glicósido-glicósido; el número 4 es un mono-acil-glucosil-glicósido.

c) Que el glicolípido número 1 del micelio es una diacil-glucosa; el número 2 es una mono-acil-glucosa; y el número 3 es idéntico al número 4 de las esporas, es decir, una mono-acil-glucosil-glicósido.

d) Que su composición en ácidos grasos es heterogénea.

DISCUSION

Los glicolípidos de *Hemispora stellata* con excepción del esterol glicósido de las esporas, caen dentro del amplio grupo de los polioles acilados que son los más frecuentemente hallados en los hongos. Su tasa global supera a la de los fosfolípidos netamente en las esporas y lo hace ligeramente en el micelio. Aunque no sea un hecho excesivamente frecuente tampoco es totalmente nuevo. Algo similar ha sido observado por WILKINSON (1968) en *Pseudomona diminuta* y *Pseudomona rubescens* y por LAINE y col. (1972) en *Aspergillus niger*. Llama la atención que la mayor abundancia en glicolípidos se da en aquella fase de crecimiento (las esporas) en las que es menor la proporción que respecto a los lípidos totales, representan los fosfolípidos. Este hecho parece apoyar el segundo de los dos papeles que para ellos se han propuesto (DISTLER y ROSEMAN, 1964): 1) mediar en el transporte de azúcares para la síntesis de polisacáridos y 2) sustituir a los fosfolípidos como componentes estructurales de las membranas.

Resulta particularmente interesante observar que las acilglicosas del micelio son más ricas en ácidos grasos que las de las esporas y que la riqueza en ácidos grasos no saturados es bastante inferior a la de los fosfolípidos de este microorganismo donde representan hasta un 75 % en peso del total de ácidos grasos (LÓPEZ, 1972). Se observa, sin embargo, al igual que en ellos una dominancia entre los

ácidos grasos no saturados de C-18 : 1 y C-18 : 2 y entre los saturados C-16 y C-14. El mono-acil-diglucozil-galactósido de las esporas resalta por su elevada tasa de C-14 : 1, que parece sustituir al C-18 : 1 de las demás acilglicosas y de C-10 que parece sustituir al C-14 del mono-acil-diexósido. El mono-acil-triglicósido de ambas fases de crecimiento resulta bastante más rico en dobles enlaces merced, sobre todo, a su elevado contenido en C-18 : 2 (que en peso llega a representar alrededor de 1/3 del total de ácidos grasos).

En general el contenido en ácidos grasos con dos dobles enlaces es intermedio entre el de los lípidos apolares y los fosfolípidos de esta especie a juzgar por los datos publicados (LÓPEZ, 1972) y parece un tanto alto para el desempeño de una función estructural dadas las perturbaciones que en la bicapa lipídica introducen los dobles enlaces (Fox, 1972).

La presencia de galactosa en una de las acilglicosas de las esporas puede reflejar diferencias en la composición lipídica debidas a la fase de crecimiento o ser consecuencia del distinto medio nutritivo en que se obtuvieron las esporas y el micelio, dada la clara dependencia que en algunos microorganismos se ha observado entre la presencia de hidratos de carbono en el medio y la síntesis de acilglicosas (BRENNAN y col., 1970).

RESUMEN

Se han estudiado los componentes de la fracción glicolípidos de esporas y micelio de 24 horas de *H. stellata*, que representan el 13 % de los lípidos fácilmente extractibles de las esporas y el 8,06 % del micelio, superior en ambos casos al contenido en fosfolípidos.

Por cromatografía en lámina fina se han detectado a partir de las esporas cuatro componentes, que han sido identificados como un esteroil glicósido y tres acilglicosas, basándose en su comportamiento frente a los reactivos específicos y el estudio de sus productos de hidrólisis ácida y alcalina.

En el micelio se han identificado tres componentes que son acilglicosas, pero falta el esteroil glicósido.

La fracción hidratos de carbono tanto de los glicolípidos de las esporas como los del micelio está formada exclusivamente por glucosa, excepto el componente número 2 de las esporas que contiene glucosa y galactosa.

Se han identificado también los ácidos grasos constitutivos de la fracción lipídica de las distintas acilglicosas, tanto de las esporas como del micelio.

Se ha calculado la relación molar de ácidos-grasos-hexosas de las diferentes acilglicosas de las esporas y micelio.

RESUME

On a étudié les composants de la fraction glycolipides de spores et de mycélium de 24 heures, de *H. stellata*, qui représentent le 13 % des liquides facilement extrac-

tibles des spores, et le 8,06 % du mycélium, supérieur dans les deux cas à la teneur en phospholipides.

Par Chromatographie à couche mince on a détecté, à partir des spores, quatre composants qui ont été identifiés comme un stéroil-glycoside et trois acilglycoses, en nous basant sur leur conduite en présence des réactifs spécifiques et l'étude de leurs produits d'hydrolyse acide et alcaline.

Dans le mycélium on a identifié trois composants comme acilglycoses, mais il reste encore le stéroil-glycoside.

La fraction hydrates de carbone des glycolipides des spores aussi bien que ceux du mycélium, est formée exclusivement de glucose, excepté le composant n.º 2 des spores qui contient de la glucose et de la galactose.

On a identifié aussi les acides gras qui constituent la fraction de lipides des différentes acilglycoses des spores et du mycélium.

On a déterminé le rapport molaire d'acides gras/hexoses des différentes acilglycoses des spores et du mycélium.

SUMMARY

A study has been made on the components of the fraction glycolipides of spores and mycellium of 24 hours old from *H. stellata* which represent a 13 % easily extractable from the spores and 8.06 % from the mycellium, higher in both cases than the phospholipides contents.

Four components have been detected from spores by thin-layer Chromatography. They have been identified as one glycoside-sterol and three acylglycoses, based on their behaviour against the specific reagents and the study of their products of acid and alkaline hydrolysis.

In mycellium we have found three components as acylglycoses but glycoside-sterol still remains unidentified.

Carbon hydrates fraction from glycolipides of spores as well as of mycellium is exclusively constituted by glucose, except number 2 component of spores which contains glucose and galactose.

Fat acids which constitute the lipidic fraction of the various acylglycoses, either of spores or of mycellium have also been identified.

The molar ratio between fat acids/hexoses of the various acylglycoses of spores and of mycellium have been calculated.

BIBLIOGRAFIA

1. BRENNAN, P. J., FLYNN, M. P. y GRIFFIN, P. F. S. (1970): FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett. 8. 322.
2. COOKE, R. C. y MITCHELL, D. T. (1969): Trans. Brit. Mycol. Soc. 52. 365.
3. DISCHE, Z. (1929): Mikrochemie. 7. 33.

4. DISTLER, J. y ROSEMAN, S. (1964): *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* **51**. 897.
5. DITTMER, J. C. y LESTER, R. L. (1964): *J. Lipids Res.* **5**. 126.
6. DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. y SMITH, F. (1956): *Anal. Chemistry*. **28**. 350.
7. FLUHHARTY, A. L. y O'BRIEN, J. S. (1969): *Biochemistry*. **8**. 2.627.
8. FOLCH, J., LESS, M. y SLOANE-STANLEY, G. H. (1957): *J. Biol. Chem.* **226**. 497.
9. FOX, C. F. (1972): *Scientific American*. **226**. 31.
10. GORIN, P. A. J., SPENCER, J. F. T. y TULLOCH, A. P. (1961): *Can. J. Che.* **39**. 846.
11. KATES, M. y WASSEF, M. K. (1970). *Annual Review of Biochemistry*. **39**. 323-358.
12. KESTON, A. S. (1956): *Abstract of 129th Meeting A. C. S.* P31C.
13. LAINE, R. A., GRIFFIN, P. F. S., SWELEY Ch. C. y BRENNAN, P. J. (1972): *Biochemistry*. **11**. 2.267.
14. LÓPEZ, A. (1972): *Anales Fac. Vet. de León*. Año XVIII. núm. 18(2). 613-741.
15. MERDINGER, E., KOHN, P. y MCCLAIN, R. C. (1968): *Can J. Microbiol.* **14**. 1.021.
16. SALA, F. J. y BURGOS, J. (1972): *Applied Microbiology*. **24**. 504.
17. SHAW, N. (1968): *Biochim. Biophys. Acta*. **164**. 435.
18. STERN, I. y SHAPIRO, B. (1953): *J. Clin. Path.* **6**. 158.
19. TREVELYAN, W. P., PROCTER, D. P. y HARRISON, J. S. (1950): *Nature*. **166**. 444.
20. TULLOCH, A. P. y SPENCER, J. F. T. (1964): *Can. J. Chem.* **42**. 830.
21. TULLOCH, A. P., SPENCER, J. F. T. y DEINEMA, M. H. (1968): *Can. J. Chem.* **46**. 345.
22. VAISEY, E. B. (1954): *Fish. Res. Bd. Of Canada Progs. Repts. Pacific Coasts Stas.* **11**. 901.
23. VORBECK, M. L. y MARINETTI, G. V. (1965): *J. Lipids Res.* **6**. 3.
24. WAGNER, H., HÖRHAMMER, L. y WOLFF, P. (1961): *Biochem. Z.* **334**. 175.
25. WILKINSON, S. G. (1968): *Biochim. Biophys. Acta*. **152**. 227.

TABLA N.º 1

Fraccionamiento de los lípidos de esporas y micelio de *H. stellata* en columna de ácido silíceo

Extracto lipídico cromatografiado de las esporas: 358,1 mgr.

Extracto lipídico cromatografiado del micelio: 521 mgr.

Fracción	Mls.	ESPORAS		MICELIO		Naturaleza de la fracción eluida.
		mgs.	%	mgs.	%	
Cloroformo	300	280,2	81,3	428,4	84,7	Lípidos apolares
Acetona	200	45,3	13	40,8	8,06	Glicolípidos
Metanol	200	18,3	5,2	36,6	7,2	Fosfolípidos

TABLA N.º 2

Porcentaje que representan cada una de las fracciones de glicolípidos del total de ellos

ESPORAS		MICELIO	
Manchas (Glicolípido)	Porcentaje	Manchas (Glicolípido)	Porcentaje
1	13,5 %	1	47 %
2	16 %	2	25 %
3	17,2 %	3	28 %
4	53 %		

TABLA N.º 3

Composición en ácidos grasos y porcentaje de los mismos en las acilglicosas de esporas y micelio de *H. stellata*

Ácidos grasos	ESPORAS (acilglicosa)			MICELIO (acilglicosa)		
	1	2	4	1	2	3
C-10	—	13,65	—	—	—	—
C-12	3,44	2,41	1,32	6,20	7,70	7,07
C-14	16,55	2,41	4,48	9,52	8,32	6,70
C-14 : 1	Trazas	19,27	0,99	1,20	4,43	6,42
C-14 : 2	Trazas	—	0,99	0,90	—	0,50
C-15	Trazas	—	3,32	—	—	—
C-16	37,93	29,71	29,90	25,7	29,9	22,3
C-16 : 1	1,38	Trazas	4,98	2,7	0,75	1,6
C-16 : 2	Trazas	0,80	Trazas	Trazas	Trazas	0,20
C-17	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas
C-18	2,75	6,42	5,31	8,7	3,9	4,4
C-18 : 1	24,13	3,61	19,43	26,6	18,3	17,03
C-18 : 2	13,79	21,68	29,23	18,3	26,5	33,05

TABLA N.º 4
Relación molar de hexosas y ácidos grasos en cada una de las acilglicosas
presentes en esporas y micelio

ESPORAS				MICELIO			
Mancha (glicolípido)	Hexosa	Acido graso	Grupos de Hexosa-A. graso	Mancha (glicolípido)	Hexosa	Acido graso	Grupos de Hexosa-A. graso
1	0,38	0,18	2 - 1	1	0,66	1,2	1 - 2
2	0,5	0,18	3 - 1	2	0,48	0,4	1 - 1
4	0,8	0,24	3 - 1	3	0,88	0,25	3 - 1

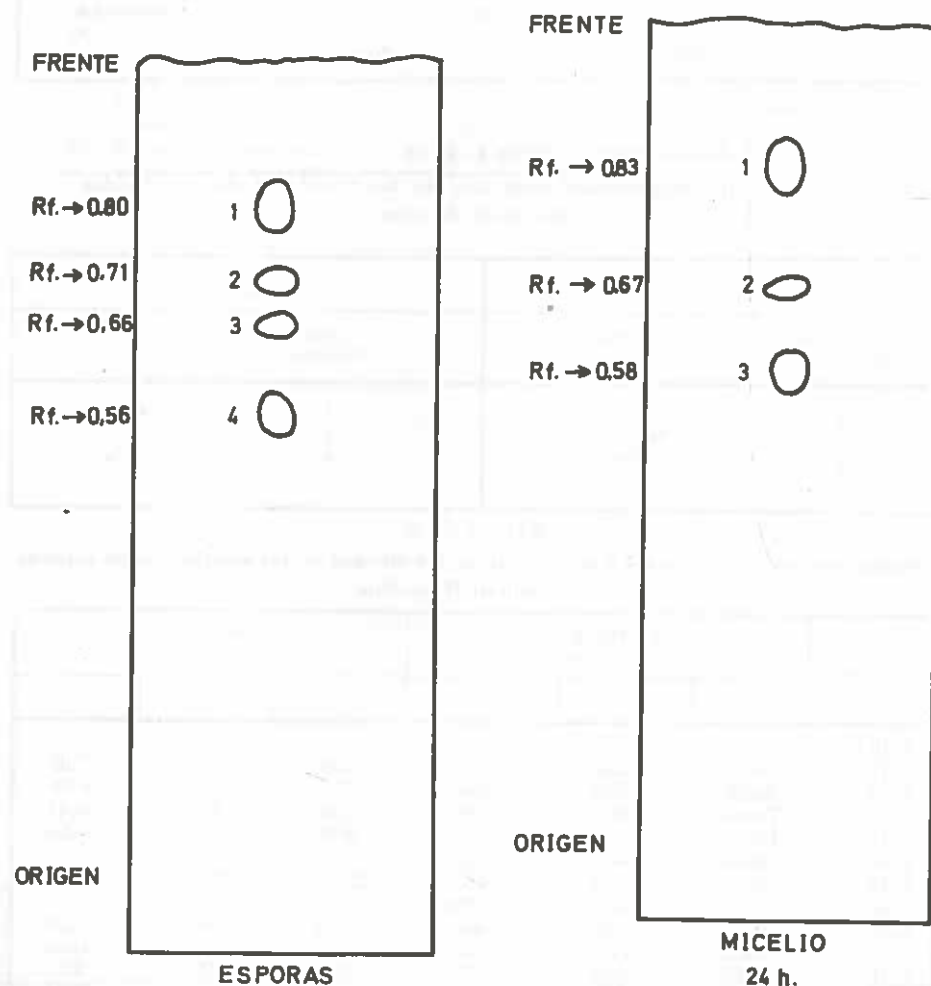


Figura 1.—Cromatografía en lámina fina de sílica gel G, reveladas con ácido sulfúrico al 50 %, de la fracción glicolípidos de esporas y micelio.

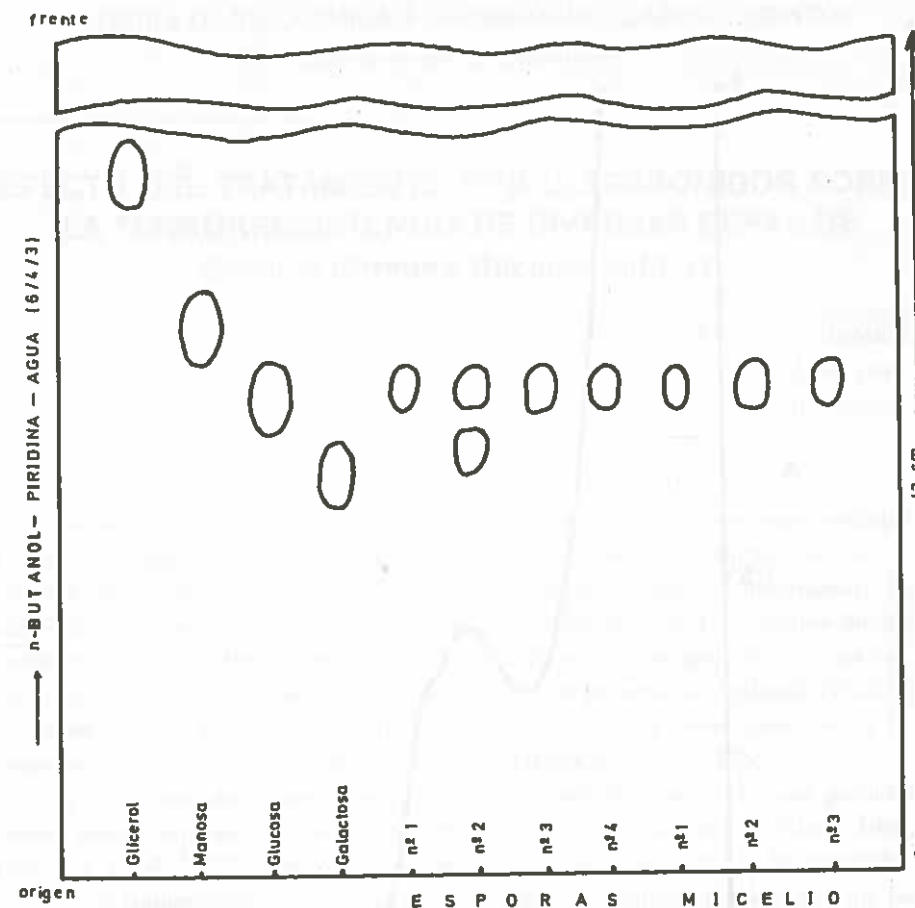


Figura 2.—Cromatografía descendente en papel de Whatman núm. 1 de los productos de hidrólisis ácida de los diferentes glicolípidos de esporas y micelio.