

FOTOACTIVACION IN VITRO DE LA QUITINA SINTETASA DE LOS
ESPORANGIOFOROS DE Phycomyces blakesleeanus*

por Georgina Reyna
y Jose Ruiz Herrera**

IN VITRO PHOTOACTIVATION OF CHITIN SYNTHETASE FROM Phycomyces
blakesleeanus SPORANGIOPHORES

SUMMARY

We analyzed the mechanism of photoactivation of chitin synthetase present in the Phycomyces sporangiophores in stage IV. The enzyme was partially stabilized by addition of sucrose to the homogenization media, its activity was optimal at pH 7.8, and it was stimulated by addition of exogenous proteases. Illumination of cell-free extracts during the chitin synthetase assays stimulated significantly enzymatic activity: an average of 75% and 21% in the absence or in the presence of trypsin, respectively. In darkness, low concentrations of Ca²⁺ brought about a slight activation, but higher concentrations were inhibitory. Nevertheless, its addition gave rise to high levels of stimulation by light. Iodo-acetamide inhibited chitin synthetase activation by both, light or trypsin. We propose a working model for the photoactivation of chitin synthetase to account for these observations.

RESUMEN

Se estudió el mecanismo de la foto-activación de la quitina sintetasa presente en los esporangióforos de Phycomyces en estado IV. La enzima se estabilizó parcialmente cuando los extractos se obtuvieron en presencia de sacarosa; se obtuvo la máxima actividad a pH 7.8 y se estimuló por la adición de

* Este trabajo fué realizado con apoyo parcial de DIGICySA de la Subsecretaría de Educación Superior e Investigación Científica de la SEP y del CONACYT.

** Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto. y Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., México, D.F.

proteasas exógenas. La iluminación de los extractos con luz blanca produjo una La iluminación de los extractos con luz blanca produjo una estimulación promedio en la actividad del 75% en ausencia de tripsina y del 21% en presencia de la proteasa. En la oscuridad, la adición de Ca^{2+} produjo una débil estimulación a bajas concentraciones y una inhibición a concentraciones mas altas; su adición dio lugar a una alta activación por la luz. La iodo-acetamida inhibió la activación de la quitina sintetasa por la luz y por la tripsina. Con estos resultados se propone un modelo para explicar el mecanismo de activación de la quitina sintetasa por la luz.

INTRODUCCION

Los esporangióforos de *Phycomyces blakesleeanus* Burg. se desarrollan en 4 estados sucesivos (Castle, 1942): I, en el que el esporangióforo crece como un cilindro; II, en el cual se detiene el alargamiento, pero su extremo distal se hincha para producir el esporangio, que adquiere una forma esférica; III, durante el cual cesa el crecimiento de ambas estructuras y IV, durante el cual se reanuda el crecimiento del esporangióforo. Este último estado se ha subdividido en IVa y IVb, dependiendo del sentido del giro del esporangio.

El esporangióforo es capaz de responder a una serie de estímulos entre los que se incluyen la luz, la gravedad, el viento, diversos productos volátiles, la presión y la presencia de objetos cercanos (Bergman *et al.*, 1969). La zona de sensibilidad del esporangióforo coincide con la zona de crecimiento que es la apical en estado I, y que ocupa unos 3 mm por debajo del esporangio en el estado IV. Cuando los estímulos se distribuyen simétricamente alrededor del esporangióforo, las respuestas se traducen en cambios transitorios en la velocidad de crecimiento del mismo (mecismos). Cuando los estímulos se distribuyen asimétricamente, las respuestas se traducen en cambios en la dirección del crecimiento (tropismos) (Bergman *et al.*, 1969; Cerda-Olmedo, 1977).

La respuesta inicialmente analizada en *Phycomyces* fué el incremento en la velocidad de crecimiento por la luz (Blaauw, 1909). Esta respuesta que consiste en un aumento transitorio en la velocidad de crecimiento seguido de una adaptación posterior, ocurre en una gama sumamente grande de intensidades luminosas. Su cinética ha sido extensamente estudiada (Bergman *et al.*, 1969).

Con el objeto de desentrañar la compleja red de las diferentes reacciones sensoriales que muestra el esporangióforo de *Phycomyces*, se ha aplicado el análisis genético, habiéndose obtenido así mutantes con el fototropismo alterado. Los análisis por complementación y recombinación permiten asignar estas mutantes a 7 genes diferentes denominados de *madA* a *madG*, (Ootaki *et al.*, 1974; Eslava *et al.*, 1976). Las mutantes

madA a *madC* ("ciegas"), muestran respuestas normales a la gravedad y a los obstáculos, pero son defectuosas en todas las respuestas a la luz, que incluyen además del fotomecismo y el fototropismo, la carotenogénesis y la diferenciación. Por ello se piensa que los genes correspondientes participan en las etapas iniciales de la transducción sensorial. Por otro lado, las mutantes *madD* a *madG* ("paralíticas") muestran alteraciones en la respuesta a todos los estímulos sugiriendo que dichos genes determinan los mecanismos de respuesta.

Dado que la velocidad y direccionalidad del crecimiento del esporangióforo dependen de la síntesis de la pared celular, no es de sorprender que la relación entre esta estructura celular y las respuestas sensoriales del hongo hayan recibido gran atención. Ortega *et al.* (1975) demostraron que las propiedades mecánicas de la pared celular en la zona de crecimiento de los esporangióforos variaban notablemente al ser iluminada, pasando de ser netamente elástica a un estado con cierto grado de plasticidad, lo que le permite sufrir una deformación producida por la presión de turgor. Ello daría como resultado un alargamiento del esporangióforo.

Tomando en cuenta que la rigidez de la pared celular de los esporangióforos de *Phycomyces*, es debida a la presencia de microfibrillas de quitina (Mundo Cansino y Ruiz-Herrera, 1979), los conceptos de Ortega *et al.* (1975), fueron ampliados por estudios de Herrera-Estrella y Ruiz-Herrera (1983), quienes demostraron que la luz estimulaba *in vivo* el rompimiento de las moléculas de quitina y la síntesis y deposición de quitina en la pared. Estos resultados sugieren que en la respuesta del hongo a la luz, el incremento transitorio en la velocidad de alargamiento del esporangióforo es debida a la presión de turgor sobre la pared celular plastificada, la cual sería posteriormente reforzada por la síntesis acelerada de quitina (Herrera-Estrella y Ruiz-Herrera, 1983).

Con el objeto de estudiar con detalle el mecanismo de activación de la quitina sintetasa por la luz, se procedió a determinar si este proceso podría llevarse a cabo en un sistema libre de células. Los resultados obtenidos se describen en el presente trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Cepas y condiciones de cultivo. Se empleo la cepa silvestre NRRL1555 (-) de *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff, la cual fue donada por el Dr. Enrique Cerda-Olmedo de la Universidad de Sevilla, España. Las esporas del hongo se mantuvieron deshidratadas sobre gel de sílice. Cristales de este se colocaron sobre medio PDA (Difco) contenido en botellas de Roux y se incubaron por 6 días a 24°C bajo luz blanca difusa. Las esporas se cosecharon con agua destilada estéril por centrifugación, se resuspendieron en agua destilada estéril y se

contaron con un hemocitómetro. Se activaron a 48°C por 10 min, se inocularon de 100 a 500 en placas de medio PDA y se incubaron a 24°C por 4 días bajo luz blanca difusa hasta obtener esporangióforos en estado IVb.

Obtención de extractos libres de células. Los esporangióforos se desprendieron por medio de pinzas de disección y se resuspendieron en el regulador correspondiente, generalmente fosfatos 50 mM de pH 6.5, conteniendo MgCl₂ 10 mM, o TRIS-HCl 50 mM de pH 7.8 conteniendo EGTA 1 mM y sacarosa al 20%, a 4°C. Se cortaron en fragmentos pequeños, se colocaron en botellas de Duran con 20 ml de perlas de vidrio y se rompieron en un homogenizador Braun por 1 min, enfriando con una corriente de CO₂ líquido. El extracto se centrifugó a 500 g para eliminar las paredes celulares y el sobrenadante se centrifugó a 150,000/g (Rav) por 1 h. El sedimento (fracción mixta de membranas, FMM), se resuspendió en el regulador correspondiente y se homogenizó con un homogenizador de tejidos.

Determinación de actividad de quitina sintetasa. Las muestras dispuestas en tubos de ensayo contenían en un volumen total de 50 µl, cantidades variables del extracto enzimático; 5 µl de tripsina (100 µg/ml); 10 µl de una mezcla de reacción que contenía UDP-¹⁴C-GlcNAc 0.5 mM (0.163 Ci/mol), adenosin trifosfato (ATP) 0.2 mM y GlcNAc 20 mM; 5 µl de MgCl₂ 200 mM y regulador de TRIS.HCl 50 mM de pH 7.8 conteniendo EGTA 1 mM para completar el volumen total. Los tubos se agitaron en un baño de agua a 24°C; los testigos oscuros se cubrieron con hojas de aluminio y se encendieron 2 lámparas de luz blanca difusa de 20 W cada una, dispuestas a 27 cm sobre los tubos. La reacción se detuvo después de 10 a 30 min por adición de unas gotas de ácido acético glacial y la quitina sintetizada se midió por el método de filtración descrito por Ruiz-Herrera y Bartnicki-García (1976). Para ello las muestras se filtraron a través de discos de fibra de vidrio de 27 mm de diámetro (Schleicher and Schull) que se lavaron con una mezcla de ácido acético 1N-etanol al 95% (7:3 v/v). Los filtros se secaron a 80°C por un mínimo de 10 min y se midió la radiactividad con un espectrómetro de centelleo líquido. La actividad se expresó como nanomoles de GlcNAc incorporados en quitina (material insoluble retenido por los filtros) por mg de proteína en 30 minutos.

Otros métodos. Actividad proteolítica. Se usó el método descrito por Schwencke (1981), usando Azocoll como sustrato.

Determinación de proteínas. Se usó el método de Lowry *et al.* (1951) para proteínas insolubles.

Líquido de centelleo. Para medir la radiactividad se preparó el líquido disolviendo 2 g de DPO y 0.1 g de dimetil POPOP en 1 l de tolueno (McMurrrough y Bartnicki-García, 1971).

ABREVIATURAS USADAS

GLNAC: N-acetil glucosamina; UDP-GlcNAc: Uridin-difosfato-N-acetil glucosamina; ATP: adenosin-trifosfato;

EGTA: Etilen-glicol-bis (B-aminoetileter)
N,N,N'-acidotetracético; DPO: 2,5-difenil-oxazol; Dimetil POPOP,
1,4-bis (2-(4-metil-5-fenil-oxazolil) benceno; FMM: Fracción
mixta de membranas; FMSF: Fenil-metil-sulfonil-fluoruro; IAA:
Iodo-acetamida.

RESULTADOS

Características generales de la quitina sintetasa de los esporangióforos de Phycomyces en estado IV. La quitina sintetasa recuperada en el sedimento de 150,000/g (Rav) mostró una mayor actividad a 29°C y a un pH de 7.8. Como se ha descrito para otros hongos (Ruiz-Herrera, 1982) y para los esporangióforos en estado I (Herrera-Estrella y Ruiz-Herrera, 1983), la quitina sintetasa presente en los esporangióforos en estado IV se halla mayoritariamente inactiva y requiere activación por proteasas (Tabla 1), siendo la tripsina la más eficiente. La actividad de quitina sintetasa fue directamente dependiente de la concentración de proteína (Fig. 1) hasta 100 µg de proteína (la más alta ensayada) y del tiempo de incubación hasta 30 min. La enzima fue más estable al añadir sacarosa al 20% y EGTA 1 mM al medio de rompimiento. Estas sustancias estabilizan los quitosomas de la forma micelial de varios Mucorales (Martínez-Cadena *et al.*, 1987).

Activación de la quitina sintetasa por la luz. La iluminación de la FMM de los esporangióforos en estado IV estimuló a la quitina sintetasa. En los datos mostrados en la Fig. 2 se observa una estimulación, después de 30 min de incubación del 64% de la enzima pre-activa (medida en proteasas exógenas) y del 83% de la enzima inactiva (medida en presencia de tripsina). Un estudio estadístico realizado con diferentes extractos mostró que pese a que los valores de activación eran sumamente variables de experimento a experimento, fueron altamente reproducibles para el mismo extracto (Tabla 2). Es importante señalar, que en todos los experimentos se observó un efecto positivo por la iluminación y que este fue siempre mayor en ausencia de tripsina.

Efecto del calcio sobre la activación de la quitina sintetasa por la luz. Recientemente se ha demostrado que el calcio activa a la quitina sintetasa del micelio de *Phycomyces* (Martínez-Cadena y Ruiz-Herrera, 1987). Por ello se probó el efecto de la adición de calcio sobre la quitina sintetasa de esporangióforos en estado IV, empleando extractos obtenidos en presencia de EGTA 1 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. En ausencia de luz, la adición de Ca²⁺ 5 mM causó una ligera estimulación de la quitina sintetasa. A concentraciones mayores, el Ca²⁺ mostró un efecto inhibitorio. En presencia de luz, la mayor actividad se obtuvo al emplear Ca²⁺ 5 mM. Comparando los valores obtenidos en presencia de luz y los obtenidos en la obscuridad, se observa que al incrementar la

Tabla 1. Efecto de la tripsina sobre la quitina sintetasa a dos temperaturas

TRIPSINA (ug/ml)	ACTIVIDAD ESPECIFICA	
	28°C	22°C
0	8.24	4.57
5	25.26	12.57
10	25.87	15.77
20	27.71	14.78
40	26.39	14.81

Tabla 2. Activación de la quitina sintetasa de *Phycomyces blakesleeanus* por la luz

No. DE EXPERIMENTOS	TRIPSINA	ESTIMULACION PROMEDIO POR LA LUZ (%)	DESVIACION ESTANDARD
13	no	75	67
9	si (10 ug/ml)	21	20

Tabla 3. Efecto del calcio sobre la foto-estimulación de la quitina sintetasa

CaCl (mM)	ACTIVIDAD ESPECIFICA		ESTIMULACION POR LA LUZ (VECES)
	OBSCURIDAD	ILUMINADO	
0	5.62	7.56	1.35
2	7.30	8.36	1.14
5	4.50	9.06	2.01
10	2.52	8.82	3.51

Tabla 4. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la foto-estimulación de la quitina sintetasa

ADICION	CONCENTRACION	ACTIVIDAD ESPECIFICA	
		OBSCURIDAD	ILUMINADO
Ninguna	----	9.64	12.70
Tripsina	10 ug/ml	48.60	56.00
Metanol	5%	12.94	17.04
FMSF	0.1 mM	9.91	10.71
Leupeptina	5 ug/ml	12.44	14.34
Pepstatina	5 ug/ml	13.73	14.34
Antipsina	5 ug/ml	12.27	14.64
Iodoacetamida	5 mM	7.47	6.91

Tabla 5. Efecto de la iodo-acetamida sobre la actividad y la activación proteolítica de la quitina sintetasa

IODO-ACETAMIDA (mM)	ACTIVIDAD ESPECIFICA		INHIBICION (%)	
	SIN TRIPSINA	CON TRIPSINA	SIN TRIPSINA	CON TRIPSINA
0	2.91	24.26	-----	-----
2	3.14	19.56	-----	20
5	2.60	20.76	8	15
10	2.07	11.95	29	51
20	2.37	5.60	19	77

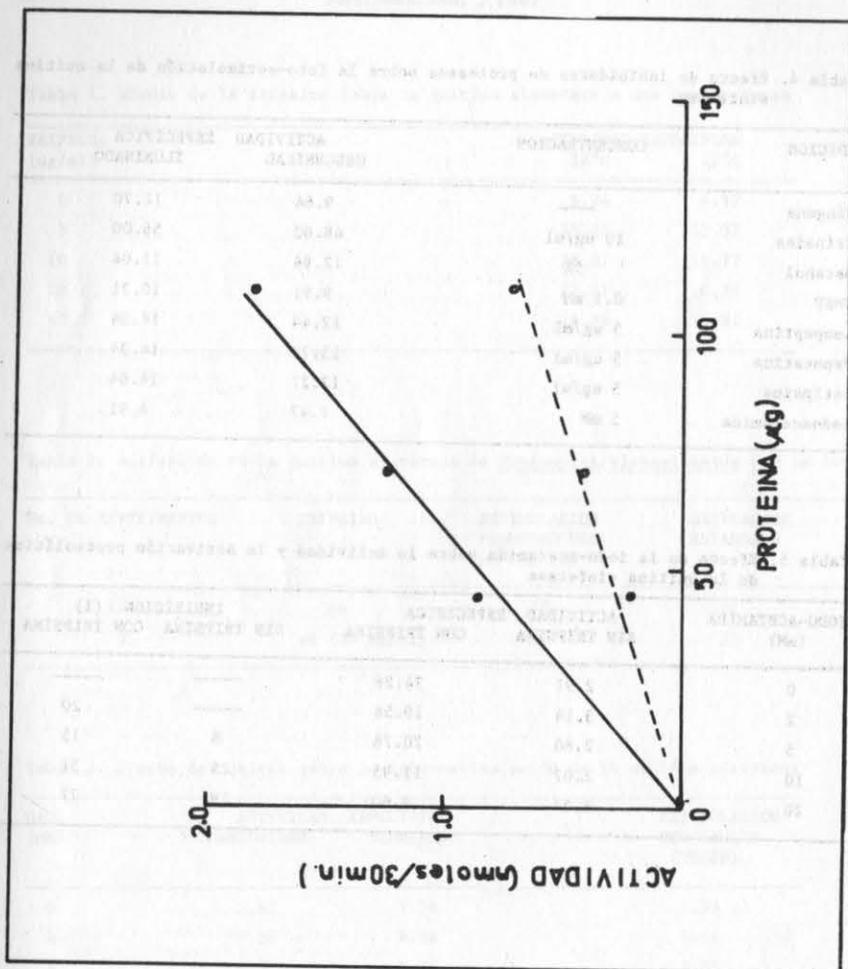


Fig. 1. Efecto de la concentración de proteína y la tripsina sobre la actividad de la quitina sintetasa.
●, con 10 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina.

concentración de Ca^{2+} hasta 10 mM, aumenta la activación de la quitina sintetasa hasta 3.5 veces en relación con la obtenida en la oscuridad.

Efecto de inhibidores de proteasas sobre la estimulación de la quitina sintetasa por la luz. Con el objeto de determinar si una proteasa estaba involucrada en la activación de la quitina sintetasa por la luz, se probó el efecto de diversos inhibidores de proteasas sobre la fotoestimulación. Los resultados (Tabla 4) mostraron que aunque ciertos inhibidores afectaron la fotoactivación de la quitina sintetasa, solamente la iodo-acetamida la bloqueó completamente.

En un experimento posterior se midió el efecto de concentraciones variables de iodo-acetamida sobre la actividad de la quitina sintetasa, medida en ausencia o en presencia de tripsina. Se observó (Tabla 5) que la iodo-acetamida inhibió tanto la actividad basal como la actividad medida en presencia de tripsina, aunque esta fue notablemente más sensible a la presencia del inhibidor. Cabe hacer notar que la tripsina no es sensible a la iodo-acetamida, y que concentraciones del inhibidor hasta de 50 mM no afectaron la actividad proteolítica de la tripsina medida con Azocoll (Tabla 6).

Para saber si el paso inhibido por la iodo-acetamida era la actividad catalítica *per se* o la activación de la quitina sintetasa, se procedió a separar ambos procesos de acuerdo con el siguiente protocolo: se preincubo FMM con tripsina en presencia o ausencia de iodo-acetamida (activación). Se detuvo la actividad proteolítica por adición del inhibidor de tripsina obtenido de frijol de soya, se añadió posteriormente el sustrato de la quitina sintetasa, y la iodoacetamida solo a aquellas muestras que se habían incubado en ausencia del inhibidor. A los controles correspondientes, no se añadió iodo-acetamida. Después de incubar, con el sustrato (actividad), se detuvo la reacción, y se midió la quitina sintetizada. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7. Se observa que la iodo-acetamida inhibió la activación proteolítica en un 85%; en tanto que la actividad fue inhibida en un 20% solamente. Estos resultados sugieren que la tripsina probablemente no actúa directamente sobre la quitina sintetasa, sino sobre un activador endógeno que debe poseer uno o más grupos $-\text{SH}$ en el sitio activo, mismos que son alquilados por la iodo-acetamida, proceso que lo inactiva.

DISCUSION

Los resultados obtenidos mostraron que la cinética de síntesis de quitina es directamente proporcional a la concentración de enzima empleada, por un periodo de cerca de 30 min. Las razones de la detención de la actividad catalítica, a pesar de la existencia de sustrato residual pueden ser la inestabilidad de la enzima, o la necesidad de un aceptor para la

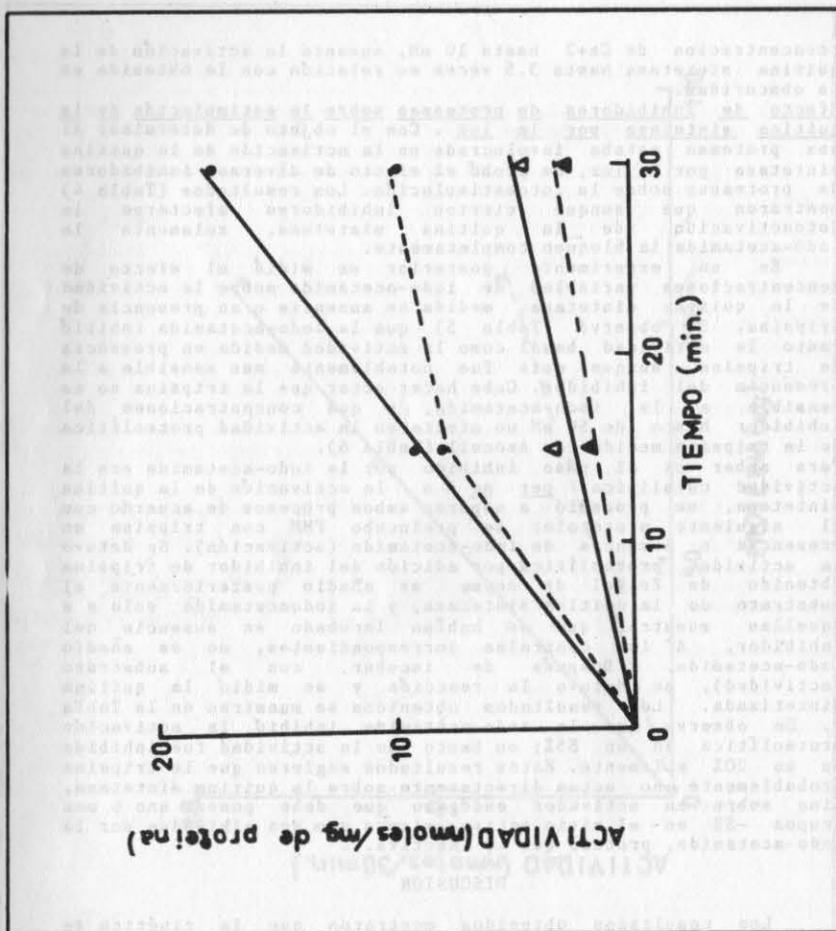


Fig. 2. Efecto de la luz y la tripsina sobre la actividad de la quitina sintetasa.

Δ▲, sin tripsina; ○●, con tripsina; ▲●, obscuridad; ●▲, luz.

síntesis de las cadenas de GlcNAc según lo han descrito Mills y Cantino (1978), cuya concentración sea limitante. De los reguladores probados, el TRIS-HCl de pH 7.8 fue el que dió el mejor resultado. La estabilidad de la enzima se incremento por adición de sacarosa, la cual posiblemente protege osmoticamente a la enzima y previene la liberación de enzimas destructivas presentes en estructuras subcelulares osmoticamente sensibles, de acuerdo con los resultados descritos por Larriba *et al.* (1981).

En la mayoría de los sistemas en los que se ha estudiado la quitina sintetasa, se ha señalado que la enzima es activada por proteasas exógenas (Ruiz-Herrera, 1982). En forma similar se ha señalado por Van Laere y Carlier, (1974) y Herrera-Estrella y Ruiz-Herrera (1983) que la quitina sintetasa presente en el micelio vegetativo y en los esporangióforos en estado I de *Phycomyces* es activada por tripsina. Asimismo se ha descrito por Fischer y Thomson (1979) que el hongo posee un sistema de proteasas neutras, una de las cuales es capaz de activar y destruir a la quitina sintetasa. Nosotros encontramos que la quitina sintetasa presente en los esporangióforos en estado IV de *Phycomyces* es activada por proteasas exógenas.

Más importante fue la demostración de que la quitina sintetasa presente en extractos libres de células es activada por la luz. En un estudio estadístico realizado con un alto número de extractos celulares obtenidos separadamente, encontramos que la fotoestimulación era significativamente mas alta en ausencia de proteasas exógenas. Ello significa que posiblemente la luz actúe sobre la quitina sintetasa como un activador, mas que como un estimulante. Es decir, la luz posiblemente active el "zimógeno" de la quitina sintetasa (aunque con mucho menor eficiencia que las proteasas exógenas).

La adición de concentraciones crecientes de calcio a los extractos celulares mantenidos en la obscuridad, causó cierta inhibición, posiblemente porque actúa como un antagonista del magnesio, el cual se requiere para la actividad de la enzima (Ruiz-Herrera *et al.*, 1977). Sin embargo, en presencia de luz la enzima se estimula por el calcio a niveles comparables a los que se logran por adición de tripsina (3 a 4 veces) que enmascaran la inhibición de la enzima *per se*. Ello sugiere que el calcio puede estar involucrado en el mecanismo natural de activación por la luz.

De los inhibidores de proteasas probados, solo la iodo-acetamida bloqueo totalmente la activación por la luz. Este inhibidor también afectó la activación por la tripsina, pese a que no tiene efecto sobre la actividad proteolítica en si, y solo afecta débilmente la acción catalítica de la quitina sintetasa. Estos resultados sugieren que el efecto de la tripsina como activador no sea sobre la quitina sintetasa directamente, sino que posiblemente inicie un proceso en cascada, actuando sobre el activador fisiológico endógeno de la

Tabla 6. Efecto de la iodo-acetamida sobre la actividad proteolítica de la tripsina

iodo-acetamida (mM)	ACTIVIDAD PROTEOLITICA
0	0.950
5	0.945
10	0.948
20	0.970
50	0.930

Tabla 7. Efecto de la iodo-acetamida sobre la activación y la actividad de quitina sintetasa

CONCENTRACION DE IAA	IAA EN LA ACTIVACION		IAA EN LA ACTIVIDAD	
	ACT. ESPECIFICA	INHIBICION	ACT. ESPECIFICA	INHIBICION (%)
0	19.72	----	19.72	----
20	2.96	85	15.64	20

quitina sintetasa el cual debe poseer grupo(s)-SH indispensables para su actividad. Este activador sería el blanco de la inhibición causada por la iodo-acetamida. Ello nos lleva a proponer el mecanismo de activación que se muestra en la Fig. 3. Según este modelo la quitina sintetasa es activada por un componente endógeno del sistema que a su vez sería activable indirectamente por la luz mediante la excitación del complejo fotorreceptor descrito en *Phycomyces* (Galland y Lipson, 1984), con la posible participación del calcio. Dicho componente endógeno también sería activable por proteólisis.

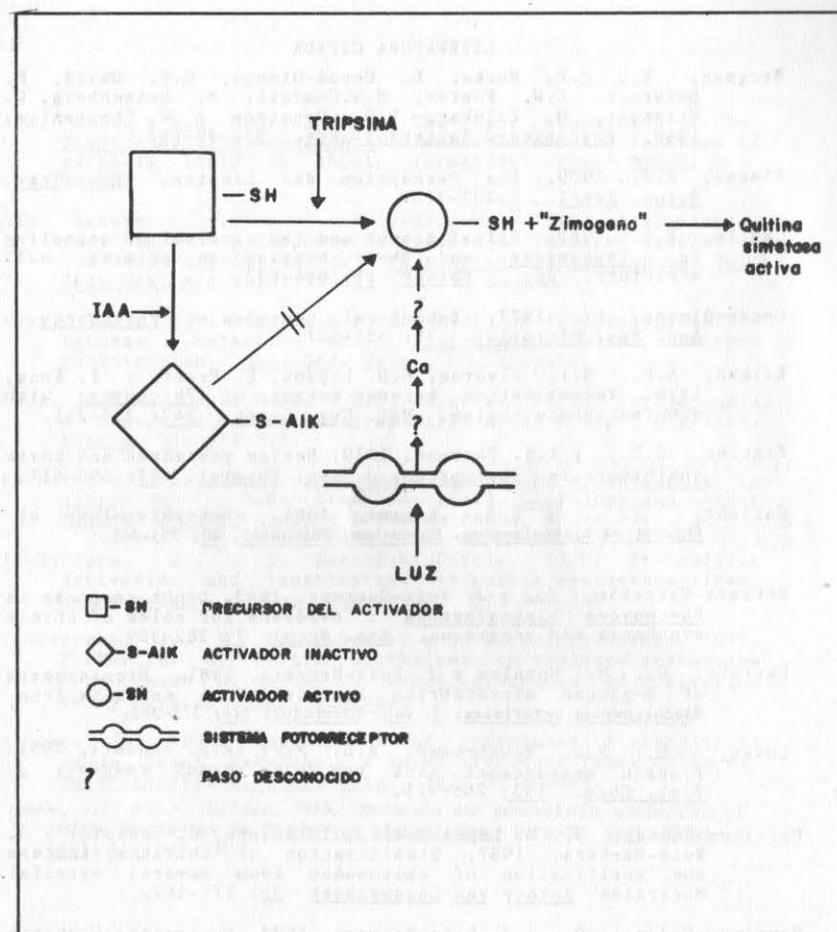


Fig. 3. Mecanismo hipotético para explicar la activación de la quitina sintetasa por la luz y las proteasas exógenas.

LITERATURA CITADA

- Bergman, K., P.V. Burke, E. Cerdá-Olmedo, C.N. David, M. Delbruck, K.W. Foster, E.W. Goodell, M. Heisenberg, G. Meissner, M. Zalokar, D.S. Dennison y W. Shropshire, 1969. Phycomyces. Bacteriol. Rev. 33: 99-157.
- Blaauw, A.H., 1909. Die Perzeption des Lichtes. Rec. Trav. Botan. Neerl. 5:209-372.
- Castle, E.S. 1942. Spiral growth and the reversal of spiraling in Phycomyces and their bearing on primary wall structure. Am. J. Botany 29: 664-672.
- Cerdá-Olmedo, E., 1977. Behavioral genetics of Phycomyces. Ann. Rev. Microbiol. 31: 535-547.
- Eslava, A.P., M.I. Alvarez, E.D. Lipson, D. Presti y K. Kong, 1976. Recombination between mutants of Phycomyces with abnormal phototropism. Mol. Gen. Genet. 147: 235-241.
- Fischer, E.P., y K.S. Thomson. 1979. Serine proteases and their inhibitors in Phycomyces. J. Gen. Physiol. 62: 590-617.
- Galland, P. y E.D. Lipson, 1984. Photophysiology of Phycomyces blakesleeana. Photochem. Photobiol. 40: 795-800.
- Herrera-Estrella, L., y J. Ruiz-Herrera, 1983. Light response in Phycomyces blakesleeana: evidence for roles of chitin synthesis and breakdown. Exp. Mycol 7: 362-369.
- Larriba, G., M. Morales y J. Ruiz-Herrera, 1981. Biosynthesis of B-glucan microfibrils by cell-free extracts from Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol. 124: 375-383.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Martínez-Cadena, G., E. López-Romero, I. Acosta, C. González y J. Ruiz-Herrera, 1987. Stabilization of chitin synthetase and purification of chitosomes from several mycelial Mucorales Antony van Leeuwenhoek 53: 171-182.
- Martínez-Cadena, G. y J. Ruiz-Herrera. 1987. Activation of chitin synthetase from Phycomyces blakesleeana by calcium and calmodulin. Arch. Microbiol. En prensa.
- McMurrough, I., y S. Bartnicki-García, 1971. Properties of particulate chitin synthetase from Mucor rouxii. J. Biol. Chem. 246: 4008-4016.

- Mills, F.I., y E.C. Cantino, 1978. The lipid composition of the Blastocladiella emersonii particle and the function of particle lipid in chitin formation. Exp. Mycol. 2: 99-109.
- Mundo Cansino, J. y J. Ruiz-Herrera, 1979. Aislamiento, purificación y composición química de la pared celular de los esporangióforos de Phycomyces blakesleeana. Bol. Soc. Mex. Mic. 13: 39-45.
- Ootaki, T.J., E.P. Fischer y P. Lockhart, 1974. Complementation between mutants of Phycomyces with abnormal phototropism. Mol. Gen. Genet. 131: 233-246.
- Ortega, J.K.E., R.I. Gamow y C.N. Ahlquist, 1975. Phycomyces: a change in mechanical properties after a light stimulus. Planta 55: 333-337.
- Ruiz-Herrera, J., 1982. Synthesis of chitin microfibrils in vitro. In: R.M. Brown Jr. (Ed.) Cellulose and other natural polymer systems. Plenum Press, Nueva York.
- Ruiz-Herrera, J., y S. Bartnicki-García, 1976. Proteolytic activation and inactivation of chitin synthetase from Mucor rouxii. J. Gen. Microbiol. 97: 241-249.
- Ruiz-Herrera, J., E. López-Romero y S. Bartnicki-García, 1977. Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast extracts. A novel procedure of activation using pepsin. Anal. Biochem.
- Schwencke, J., 1981. Measurement of proteinase B activity in crude yeast extracts. A novel procedure yeast cells of Mucor rouxii. J. Biol. Chem. 252: 3338-3343.
- Van Laere, A.J. y A.R. Carlier, 1978. Synthesis and proteolytic activation of chitin synthetase in Phycomyces blakesleeana Burgeff. Arch. Microbiol. 116: 181-184.