

INHIBICION DE LA α -GALACTOSIDASA DE *Saccharomyces* POR REACTIVOS -SH

Por
M. P. SUAREZ RENDUELES, I. COSSENT
y
S. GASCON
Departamento Interfacultativo de Bioquímica.
Universidad de Oviedo.

INTRODUCCION

La α -galactosidasa ha sido descrita por FRIIS y OTTOLENGHI (1) como uno de los enzimas que se pueden localizar extracelularmente en levaduras.

Anteriormente, ADAMS (2) había encontrado α -galactosidasa en preparaciones purificadas de invertasa de levaduras. Así mismo, DE LA FUENTE y SOLS (3) postulan que la melibiosa, sustrato natural del enzima, es un disacárido que necesita de una hidrólisis previa en sus dos componentes, glucosa y galactosa antes de ser incorporado a la célula. Esto exige la presencia de un enzima capaz de catalizar su hidrólisis en la superficie celular, es decir, situado fuera de la membrana plasmática.

La α -galactosidasa de *Saccharomyces carlsbergensis* 1317, purificada y caracterizada por LAZO (4) es un enzima exocelular de naturaleza glicoprotéica, que contiene aproximadamente un 60 % de carbohidrato y un 40 % de proteína.

Por otra parte, la α -galactosidasa de *Saccharomyces carlsbergensis* es un enzima inducible (5), cuya síntesis sólo tiene lugar de manera activa cuando en el medio de cultivo está presente un inductor apropiado.

Este trabajo resume los resultados obtenidos al estudiar la influencia que ejercen determinados reactivos de grupos -SH sobre la cinética de la reacción catalizada por la α -galactosidasa purificada de *Saccharomyces carlsbergensis* 303-49.

MATERIALES Y METODOS

Productos químicos

Los siguientes productos químicos han sido obtenidos de Sigma Chemical Company: p-nitrofenil- α -D-galactósido, melibiosa, glucosa oxidasa, peroxidasa, o-dianisidina, o-iodosobenzoato, p-hidroximercuribenzoato, acetato de fenil mercurio, ditiotreitól y cloruro mercuríco. La D-galactosa es un producto Merck y el medio base de Nitrógeno procede de Difco.

Microorganismo utilizado

Como microorganismo productor de la α -galactosidasa se utilizó la cepa 303-49 de *Saccharomyces carlsbergensis* (C.E.C.T. n.º 1.323), aislada y caracterizada por WINGE y ROBERTS (6). Esta cepa es portadora de los genes *Me* y *gs*, siendo por tanto capaz de hidrolizar la melibiosa y de fermentar lentamente la galactosa.

Preparación enzimática

La α -galactosidasa se purificó a partir de un sobrenadante de cultivo de *S. carlsbergensis* en un medio base de nitrógeno que contenía D-galactosa como fuente de carbono y energía, así como de inductor de la síntesis del enzima.

El método utilizado en la purificación del enzima es el descrito por LAZO (4).

La preparación enzimática utilizada en los ensayos de inhibición tenía una actividad específica de 355 U/mg proteína.

Ensayo de actividad

La actividad enzimática se midió de las siguientes formas:

a) Acción sobre el p-nitrofenil- α -D-galactósido: La reacción se lleva a cabo a 30°C en tampón acetato 0,2 M pH 4,5 produciéndose la hidrólisis del p-nitrofenil- α -D-galactósido 0,1 M. La reacción se detiene por adición de carbonato sódico 0,1 M y el color desarrollado por el p-nitrofenol liberado se mide a 410 nm.

b) Acción sobre la melibiosa: En este caso el ensayo se hace en dos etapas. La primera se lleva a cabo en tampón acetato 0,2 M pH 4,5 produciéndose la hidrólisis de la melibiosa 0,1 M. En la segunda, se valora la glucosa liberada mediante un sistema enzimático constituido por glucosa oxidasa, peroxidasa y o-dianisidina (7).

La unidad de actividad enzimática se define en ambos casos como la cantidad de enzima capaz de catalizar la hidrólisis de un micromol de sustrato por minuto a 30°C, en tampón acetato 0,2 M pH 4,5 y con sustrato 25 mM.

RESULTADOS Y DISCUSION

1.-Inhibición de la α -galactosidasa por *o*-iodosobenzoato

La acción primaria del *o*-iodosobenzoato consiste en oxidar a los grupos -SH al estado de disulfuro sin introducir nuevos grupos o cadenas laterales en la superficie del enzima.

La mayoría de los enzimas que poseen grupos -SH en, o cerca de su centro activo son inhibidos por el *o*-iodosobenzoato.

Se ha estudiado el efecto del citado oxidante sobre la actividad hidrolítica de la α -galactosidasa purificada, utilizando como sustrato el *p*-nitrofenil- α -D-galactósido.

a) *Influencia de la concentración de inhibidor y del tiempo de contacto previo.* El *o*-iodosobenzoato inhibe la actividad hidrolítica del enzima. El grado de inhibición depende de la concentración del reactivo y del tiempo de contacto previo entre el enzima y el oxidante.

Cuando el tiempo de preincubación es de 60 minutos se observa una ligera disminución de actividad para concentraciones de *o*-iodosobenzoato comprendidas entre 10^{-4} M y 10^{-3} M, y se produce un brusco descenso de la misma cuando la concentración del oxidante es superior a 10^{-3} M.

Los resultados obtenidos al estudiar el efecto del tiempo de preincubación sobre la inhibición causada por una concentración 4 mM de *o*-iodosobenzoato se encuentran esquematizados en la Fig. 1.

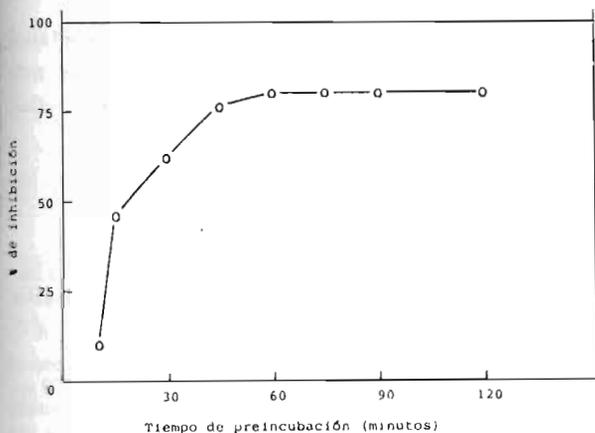


Fig. 1
*Influencia del tiempo de preincubación en la inhibición de la α -galactosidasa por el *o*-iodosobenzoato.*

Se mantiene al enzima en contacto con *o*-iodosobenzoato 4 mM durante los períodos de tiempo indicados en la figura. Se añade a continuación el sustrato y se determina la actividad.

La curva obtenida muestra tres fases perfectamente determinadas. En la primera la velocidad de inhibición es muy rápida (45 % de inhibición a los 15 minutos), encontrándose a continuación una segunda fase en la que el grado de inhibición aumenta mucho más lentamente con el tiempo de contacto. Final-

mente, a partir de 60 min. de preincubación la velocidad de inhibición se hace constante.

b) *Efecto de la cisteína y del β -mercaptoetanol.* La cisteína y el β -mercaptoetanol protegen a la α -galactosidasa de la inhibición producida por el o-iodosobenzoato cuando se añaden a la mezcla de reacción previamente a la adición de inhibidor, como se observa en la Fig. 2, debido a que poseen grupos -SH en su molécula susceptibles de ser oxidados por el o-iodosobenzoato, reduciendo así su concentración efectiva. Se comprobó que ni la cisteína ni el β -mercaptoetanol afectaban por sí mismos a la actividad del enzima.

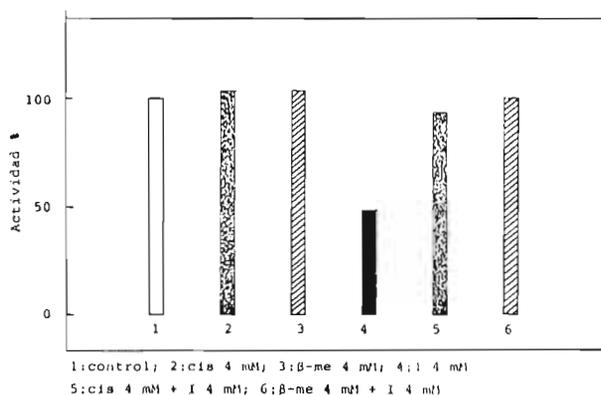


Fig. 2
Protección de la α -galactosidasa por cisteína y β -mercaptoetanol. Se preincuba el enzima con la cisteína y el β -mercaptoetanol durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo se adiciona o-iodosobenzoato y se prosigue la preincubación 15 minutos más. A continuación se añade el sustrato y se determina la actividad, comparándola con la de un control que no ha sufrido adiciones.

Se estudió la reactivación producida por la cisteína y el β -mercaptoetanol sobre la α -galactosidasa inhibida por el o-iodosobenzoato, consiguiéndose una reactivación de un 40 % al adicionar los mencionados tioles al enzima que había estado en contacto con el inhibidor durante 60 min. (Fig. 3).

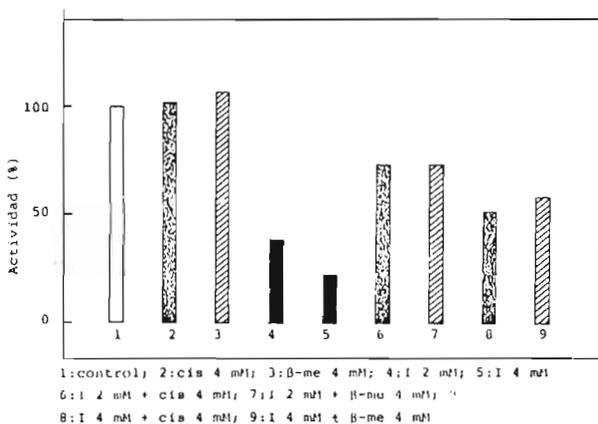


Fig. 3
Reversión por cisteína y β -mercaptoetanol de la inhibición de la α -galactosidasa por o-iodosobenzoato. Se preincuba el enzima con el o-iodosobenzoato durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo, y sin eliminar el inhibidor del medio se adiciona cisteína o β -mercaptoetanol y se prosigue la preincubación durante 15 minutos adicionales. Se añade entonces el sustrato y se ensaya actividad.

2.-Inhibición de la α -galactosidasa por mercuriales

El p-hidroximercuribenzoato y el acetato de fenil mercurio son mercuriales orgánicos monofuncionales capaces de formar mercáptidos al reaccionar con una sustancia que posea grupos $-SH$.

Se ha estudiado el efecto de los citados mercuriales sobre la actividad de la α -galactosidasa utilizando melibiosa como sustrato.

La hidrólisis de la melibiosa catalizada por la α -galactosidasa es inhibida por concentraciones de p-hidroximercuribenzoato superiores a 10^{-6} M (Fig. 4) consiguiéndose un 50 % de inhibición con una concentración de mercurial de $2,5 \times 10^{-5}$ M aproximadamente.

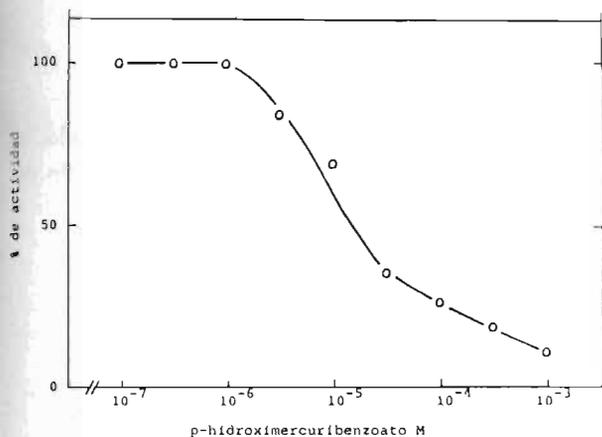


Fig. 4
Influencia de la concentración del p-hidroximercuribenzoato sobre la actividad de la α -galactosidasa.

El ensayo se realiza en tampón acetato 0,2 M de pH 4,5 a 30°C y sin preincubación del enzima con el mercurial. Los tantos por ciento de actividad se calculan frente a un control al que no se adicionó el p-hidroximercuribenzoato.

Al utilizar acetato de fenil mercurio como inhibidor el 50 % de inhibición se consigue con una concentración de mercurial de 3×10^{-6} M.

Para la α -galactosidasa de *Diplococcus pneumoniae*, se ha descrito una fuerte inhibición de la actividad (80 %) por p-hidroximercuribenzoato 10^{-4} M (8). Con una α -galactosidasa de procedencia vegetal (9, 10) las inhibiciones citadas son más débiles y se interpretan como reacciones del mercurial con grupos histidina más que con grupos $-SH$, basándose en el hecho de que el citado enzima no es afectado por otros reactivos específicos de grupos $-SH$.

La inhibición de la actividad enzimática provocada por los citados mercuriales es perfectamente reversible por diálisis y por acción de tólos tales como el ditiotreitól (DTT). En la Fig. 5 se puede observar la reversión obtenida al añadir DTT al enzima previamente inhibido por el acetato de fenil mercurio.

Con ambos reactivos la inhibición es de naturaleza competitiva. El valor de K_i calculado por los métodos de Lineweaver-Burk y Dixon a pH 4,5 y 30°C es de

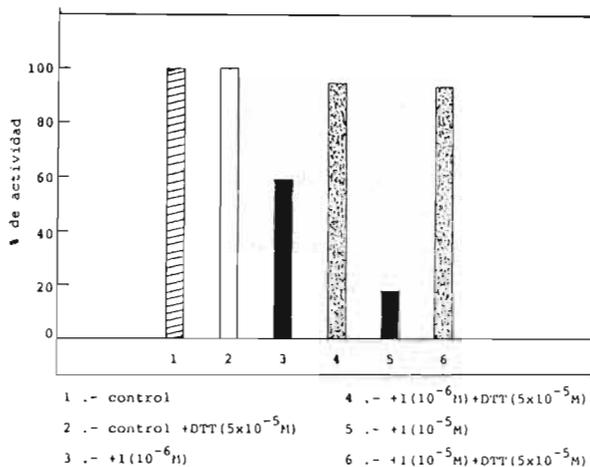


Fig. 5
Reversión por ditioneitol (DTT) de la inhibición de la α -galactosidasa por el acetato de fenil mercurio.

Se mantuvo el enzima en contacto con el acetato de fenil mercurio hasta conseguir un grado de inhibición constante (15 min.). A continuación y sin eliminar el mercurial del medio se añade ditioneitol. Se preincuba otros 15 min. y se determina la actividad.

$3,3 \times 10^{-6}$ M para el primer mercurial (Fig. 6) y de 2×10^{-7} M para el segundo, lo que indica que la α -galactosidasa muestra una mayor afinidad por el acetato de fenil mercurio que por el p-hidroximercuribenzoato.

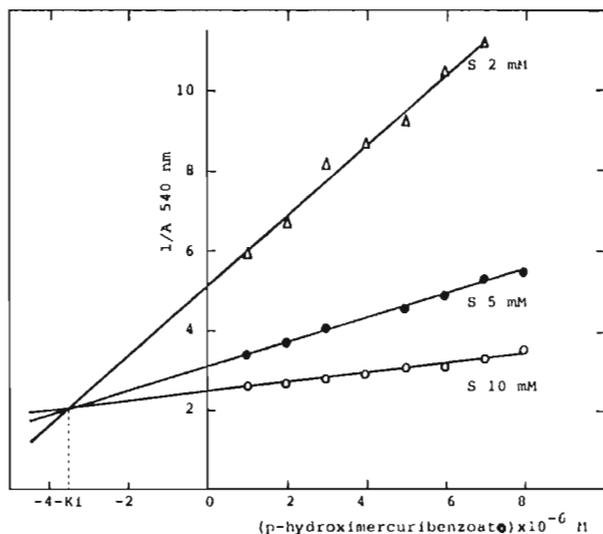


Fig. 6
Determinación del tipo de inhibición y cálculo de K_i para el sistema melibiosa/p-hidroximercuribenzoato.

La actividad enzimática se determinó en tampón citrato-fosfato 0,2 M, pH 4,5 con melibiosa como sustrato a 30°C.

(o-o) melibiosa 10 mM
(●-●) melibiosa 5 mM
(Δ-Δ) melibiosa 2 mM

Se ha estudiado el efecto del pH sobre la actividad de la α -galactosidasa que no ha sufrido ninguna adición y sobre la actividad del enzima inhibido por los mercuriales (Fig. 7-8).

Puede observarse que el enzima tiene un rango de pH óptimo que va desde

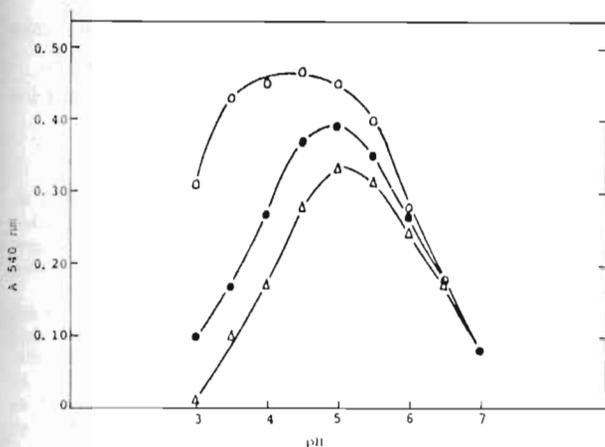


Fig. 7
Influencia del pH en la inhibición de la α -galactosidasa por *p*-hidroximercuribenzoato. Se ensaya la actividad de la α -galactosidasa (control) y del enzima adicionado de *p*-hidroximercuribenzoato a los diferentes pH proporcionados por un tampón citrato-fosfato 0,2 M. (o) control (●) *p*-MB $2,5 \times 10^{-5}$ M (Δ) *p*-MB 5×10^{-5} M.

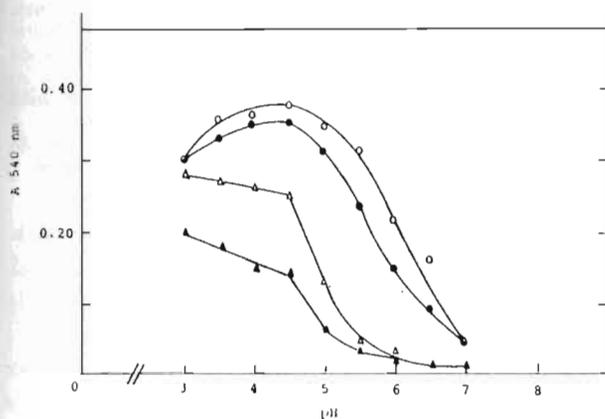


Fig. 8
Influencia del pH en la inhibición de la α -galactosidasa por acetato de fenilmercurio. Se determina la actividad de la α -galactosidasa (control) y del enzima adicionado de acetato de fenilmercurio a los diferentes pH. (o) control acetato de fenilmercurio (●) 10^{-6} M (Δ) 5×10^{-6} M (▲) 10^{-5} M.

pH 4,0 a pH 5,0, disminuyendo la actividad de manera gradual a valores de pH más ácidos o más alcalinos.

Se comprueba que el pH afecta al grado de inhibición producido por ambos mercuriales, si bien los efectos son contrarios. Con el *p*-hidroximercuribenzoato se observa una disminución de la inhibición con el pH en el intervalo comprendido entre 3,5 y 6,5, mientras que con el acetato de fenilmercurio se produce un fuerte aumento de la inhibición en el mismo intervalo de pH.

El comportamiento frente al pH sugiere que la presencia de grupos cargados en la molécula de inhibidor juega un papel importante en la inhibición, debido probablemente a la existencia de grupos ionizables en el centro activo del enzima o próximos a él.

Se ha estudiado la estabilidad a la temperatura del enzima purificado y el efecto que sobre esta estabilidad tiene la adición de mercuriales.

En la Fig. 9 están representados los resultados obtenidos al determinar la actividad del enzima a 30°C después de que ha permanecido 30 minutos de

preincubación a las distintas temperaturas. La α -galactosidasa muestra una gran estabilidad a la temperatura conservando toda su actividad hasta los 50°C. A partir de esta temperatura la actividad va disminuyendo gradualmente hasta los 70°C en la que la desnaturalización del enzima es total.

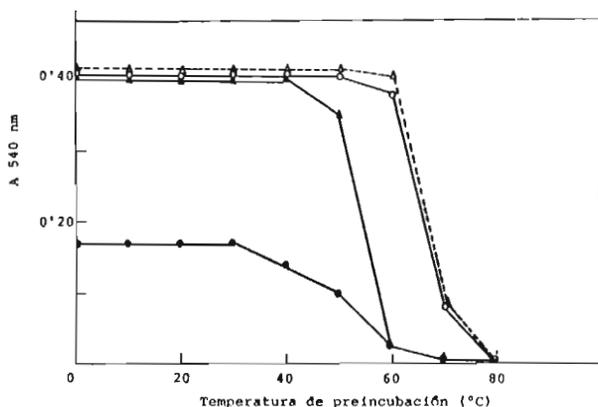


Fig. 9
Influencia de la temperatura de preincubación en la inhibición de la α -galactosidasa por acetato de fenil mercurio. Reversión con ditiotreitól.

Se preincuba al enzima (control) y al enzima adicionado de acetato de fenil mercurio a las distintas temperaturas durante 30 minutos. Transcurridos estos se colocan las muestras a 30° y se determina la actividad.

En un ensayo paralelo se determina la reversión con ditiotreitól de la inhibición alcanzada a cada temperatura.

(o) control (●) acetato de fenil mercurio.

(Δ) ditiotreitól (▲) acetato de fenil mercurio + ditiotreitól.

La adición del acetato de fenil mercurio no afecta a la estabilidad del enzima hasta los 30°C, produciéndose una gran disminución de la misma para temperaturas de preincubación superiores. Los resultados obtenidos con el p-hidroximercuribenzoato son similares.

El efecto del inhibidor sobre la estabilidad del enzima a la temperatura es revertido por acción de los tólos como el ditiotreitól.

La actividad hidrolítica de la α -galactosidasa es asimismo inhibida por concentraciones de Hg^{2+} superiores a 10^{-8} M, correspondiendo el 50 % de inhibición a una concentración de Hg^{2+} de 5×10^{-7} M.

Estos resultados parecen indicar la presencia de grupos activos, probablemente grupos -SH, en la molécula enzimática, implicados en la actividad y que causan una fuerte pérdida de la misma cuando se bloquean.

REFERENCIAS

- (1) FRIS, J. y OTTOLENGHI, P. (1959 b).—Compt. Rend. Trav. Lab. carlsberg., **31**, 272.
- (2) ADAMS, M., RICHTMER, N. K. y HUDSON, C. S. (1943).—J. Am. Chem. Soc., **65**, 1.369.
- (3) DE LA FUENTE, G. y SOLS, A. (1962).—Biochim. Biophys. Acta, **56**, 49.
- (4) LAZO, P. S., G. OCHOA, A. y GASCÓN, S. (1977).—Eur. J. Biochem. **77**, 375-382.
- (5) LINDEGREN, C. C., SPIEGELMAN, S. y LINDEGREN, G. (1944).—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **30**, 346.
- (6) WINGE, O. y ROBERTS, C. (1957).—Compt. Rend. Trav. Lab. carlsberg. Ser. Physiol., **25**, 419.
- (7) KESTON, A. S. (1956).—Abstr. A., Chem. Soc. 129th Meet. 31 c.
- (8) LI, Y., LI, S. C. y SHETLAR, M. R. (1963).—Arch. Biochem. Biophys., **103**, 436.
- (9) DEY, P. M. y PRIDHAM, J. B. (1969).—Biochem. J., **115**, 47.
- (10) DEY, P. M. (1969).—Biochim. Biophys. Acta, **191**, 644.