

FOSFATASA ACIDA DE LEVADURAS

Por
M. P. FERNANDEZ, M. P. SUAREZ

y
S. GASCON
Departamento Interfacultativo de Bioquímica.
Universidad de Oviedo.

INTRODUCCION

La mayoría de las levaduras contienen al menos dos fosfatasa no específicas, denominadas fosfatasa ácida (E.C. 3.1.3.2.) y fosfatasa alcalina (E.C. 3.1.3.1.) (1) que catalizan la hidrólisis de los enlaces fosfomonoéster de una extensa variedad de moléculas a pH ácido y alcalino respectivamente (2).

Ambas fosfatasas no específicas poseen una localización distinta en la célula, mientras que la fosfatasa alcalina es intracelular, la fosfatasa ácida está localizada en el exterior de la membrana plasmática (3, 4, 5).

La fosfatasa ácida, aun siendo un enzima exocelular, raramente es segregado al medio de cultivo durante el crecimiento activo (3). Sin embargo, cuando la pared celular se somete a lisis enzimática y se obtienen protoplastos, la actividad fosfatásica se libera al medio de preparación de los mismos (6, 7). Asimismo, bajo condiciones apropiadas, los protoplastos segregan al medio de cultivo la mayoría de los componentes presentes en la pared celular y entre ellos la fosfatasa ácida.

La síntesis del enzima se reprime cuando en el medio de cultivo está presente el fosfato inorgánico, el cual actúa además como inhibidor competitivo de la actividad fosfatásica (8).

La fosfatasa ácida de *Saccharomyces cerevisiae*, aislada y purificada por BOER y STEYN-PARVÉ (9) ha resultado ser una glicoproteína que contiene aproximadamente un 50 % de manano y un 50 % de proteína.

En este trabajo se resumen los resultados obtenidos en el estudio de la fosfatasa ácida de *Candida utilis* (C.E.C.T. 1061) en cuanto a la síntesis, localización, existencia de formas moleculares y aspectos cinéticos de la reacción catalizada por el enzima.

MATERIALES Y METODOS

Productos químicos

De Sigma Chemical Company han sido obtenidos los siguientes productos: p-nitrofenil-fosfato, glucosa oxidasa, peroxidasa y o-dianisidina. El Sephadex G-200, el DEAE-Sephadex A-50 y el azul dextrano proceden de Pharmacia (Uppsala). El jugo intestinal de caracol *Helix pomatia* es un producto de los Laboratorios Endo (New York).

Microorganismo y condiciones de cultivo

A lo largo del trabajo se ha utilizado la cepa de levadura *Cándida utilis* n.º 1.061 de la Colección Española de Cultivos Tipo.

Las células se crecen en un agitador rotacional a 28°C en matraces que contienen 1/5 de su volumen del medio descrito por KITAZUME YKAS y VINCENT (10) con cantidades variables de fosfato monopotásico y glucosa, en tampón citrato 0,05 M pH 5. El medio se esteriliza por filtración mediante filtros Seitz.

Obtención de protoplastos

Para eliminar la pared de las células se utilizó como agente lítico el jugo intestinal del caracol *Helix pomatia*, cuyo nombre comercial es glusulase y como estabilizador osmótico sorbitol 1 M.

Después de 60 minutos a 30°C se ha obtenido un 100 % de protoplastos de acuerdo con los criterios que para los mismos han sido definidos (11).

Ensayo de fosfatasa

La fosfatasa se ensaya midiendo la absorción debida al p-nitrofenol liberado por acción del enzima sobre el p-nitrofenilfosfato 40 mM, utilizándose como tampón, acetato 0,2 M cuando se determina la actividad a pH 4,5 y tris-clorhídrico 0,2 M cuando se determina a pH 7,5.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de fosfatasa que libera un μmol de p-nitrofenol por minuto a 30°C en tampón 0,2 M y con p-nitrofenil fosfato 40mM como sustrato.

Separación de isoenzimas de fosfatasa

Los isozimas de fosfatasa se separan mediante filtración de extractos libres de células por una columna de Sephadex G-200 (80 \times 2,5 cm) equilibrada con tampón acetato 0,05 M pH 5 a 4°C.

Para obtener los extractos libres de células se ha realizado la ruptura de las mismas, utilizando un método mecánico en el que el agente abrasivo es el

polvo de vidrio «Ballotini» con un diámetro de partícula entre 450 a 500 μ . Los aparatos utilizados han sido o bien el Braun Melsungen (Alemania) o el Vibrogen.

Determinación de glucosa y fosfato

La glucosa presente en el medio de cultivo se determinó utilizando el método de Keston (12) que consiste en un sistema enzimático acoplado de glucosa oxidasa y peroxidasa y como agente cromógeno la o-dianisidina.

El fosfato inorgánico se determinó de acuerdo con el método de FISKE y SUBBAROW (13) utilizando fosfato monopotásico 1 mM como standard.

RESULTADOS Y DISCUSION

1.-Síntesis y localización de la fosfatasa ácida de *Candida utilis*

Para estudiar la síntesis de fosfatasa ácida es necesario utilizar un medio de cultivo deficiente en fosfato, que favorece la síntesis de fosfatasa ácida.

En la Fig. 1 se ha representado el crecimiento y la actividad fosfatásica de un cultivo del citado microorganismo en un medio sintético (10) con glucosa al 2 % como fuente de carbono y deficiente en fosfato. En estas condiciones la síntesis del enzima es inmediata, si bien la división celular no va más allá de dos generaciones y media, debido precisamente a la ausencia de fosfato.

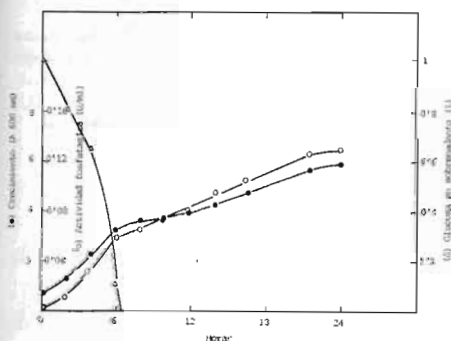


Fig. 1.-Síntesis de fosfatasa ácida a lo largo del crecimiento en un medio deficiente en fosfato.

Se inoculan células de *Candida utilis* que han crecido durante 12 h. en un medio rico en fosfato. Se sacan muestras de los tiempos indicados y con ellas se determina: (●) crecimiento, (○) actividad fosfatásica, (Δ) glucosa en sobrenadantes.

Cuando la levadura crece en el citado medio pero adicionado de diversas concentraciones de fosfato, la síntesis del enzima se encuentra totalmente reprimida mientras exista fosfato en el medio de cultivo y sólo cuando éste desaparece la síntesis enzimática comienza, siempre y cuando no haya agotado también la fuente de carbono suministrada. Esto ocurre cuando la disponibilidad de fosfato es mayor, en este caso aunque ya no exista fosfato en el medio, como tampoco dispone de glucosa, la síntesis enzimática o está notablemente disminuida o es nula. En la Fig. 2 se puede comprobar que el crecimiento de la levadura en el medio con una concentración de glucosa del 2 % y cantidades variables de

ortofosfato es óptimo para una concentración de fosfato 0,6 mM o superior, sin embargo, en la Fig. 3 se puede ver que precisamente a concentraciones superiores a 0,6 mM en fosfato la síntesis enzimática se va reprimiendo de forma ostensible.

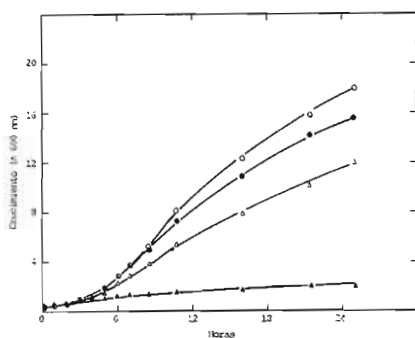


Fig. 2.-Crecimiento de la levadura *Candida utilis* en el medio sintético en distintas concentraciones de fosfato.

Se inoculan células de *C. utilis* en el medio sintético (10) conteniendo las concentraciones de fosfato siguientes: (▲) control, (△) 0,2 mM, (●) 0,4 mM, (○) 0,6 mM, 0,8 mM, 1 mM, 2 mM y 4 mM.

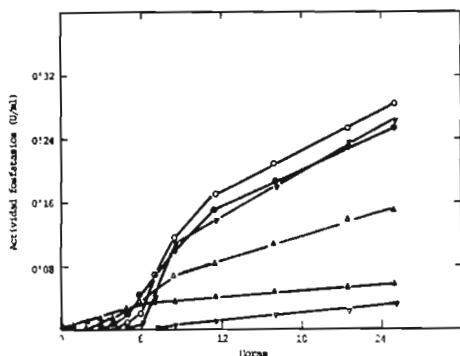


Fig. 3.-Efecto de la concentración de fosfato en el medio de cultivo sobre la síntesis de fosfatasa ácida.

Se determina la actividad fosfatásica en los distintos cultivos conteniendo las diferentes concentraciones de fosfato siguientes: (▲) control, (△) 0,2 mM, (●) 0,4 mM, (○) 0,6 mM, (▼) 1 mM, (◒) 2 mM.

La actividad fosfatásica no se segrega al medio de cultivo en ninguno de los casos estudiados.

La actividad fosfatásica detectada en células enteras, presenta un perfil de pH óptimo con un máximo bien definido a pH 4,5 y una apreciable actividad a pH alcalino.

Se ha observado el mismo grado de represión por fosfato al ensayar la actividad de las células tanto a pH 4,5 como a pH 7,5.

El hecho de que la actividad se detecte en células enteras es una prueba indirecta del carácter exocelular del enzima. Se ha comprobado que la mayoría de la actividad fosfatásica de *C. utilis* está localizada entre la membrana citoplásmica y la pared celular. En efecto, al obtener protoplastos a partir de células que se encontraban en fase de crecimiento activo la mayor parte de la actividad se detecta en el sobrenadante del medio de obtención de protoplastos.

En la tabla I se encuentra esquematizada la distribución celular de la actividad fosfatásica de *C. utilis*, mostrándose la naturaleza exocelular de la misma.

TABLA I
Distribución de actividad fosfatásica (U/ml)

pH de ensayo	4,5	7,5
Células intactas	0,71	0,21
Protoplastos	0,06	0,06
Enzima liberado durante la formación de protoplastos*	0,76	0,26
Protoplastos lisados	0,17	0,35

* Estos valores están corregidos para la actividad fosfatásica del enzima de caracol.

2.-Formas moleculares de fosfatasa ácida, en *Candida utilis*

Cuando se someten a filtración a través de Sephadex G-200 extractos libres de células de *Candida utilis* y se analiza la actividad fosfatásica en los eluidos, se puede apreciar la presencia de dos máximos bien definidos de actividad enzimática. Estos máximos corresponden a dos formas moleculares del enzima, con diferente peso molecular (Fig. 4).

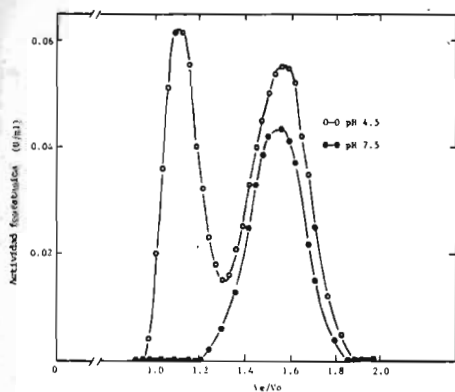


Fig. 4.-Filtración en Sephadex G-200 de un extracto libre de células. (Fase estacionaria).

5 ml de extracto libre de células (5 U) se cargaron en una columna (80 × 2,5 cm) equilibrada con tampón acetato 0,05 M pH 5. En las fracciones eluidas se determinó la actividad fosfatásica.

El isozima pesado tiene un volumen relativo de elución de 1,1 y sólo tiene actividad a pH 4,5. La forma ligera de fosfatasa tiene un V_e/V_o de 1,5 y presenta actividad a pH 4,5 y pH 7,5, si bien la actividad detectada a pH alcalino es siempre menor que la encontrada a pH ácido.

Ambas formas moleculares de fosfatasa tienen localización exocelular, como se demostró al someter a filtración por Sephadex G-200 un sobrenadante de

obtener protoplastos. En la Fig. 5 están representados los resultados obtenidos, observándose la presencia de las dos formas moleculares de fosfatasa con unos volúmenes relativos de elución que coinciden con los encontrados para extractos libres de células. En la misma gráfica está representado el perfil de elución de la actividad fosfatásica existente en la preparación enzimática de *Helix pomatia* utilizada en la obtención de los protoplastos.

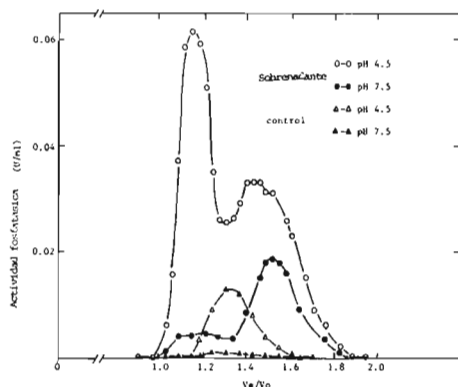


Fig. 5.-Filtración en Sephadex G-200 de un sobrenadante de obtención de protoplastos.

Células crecidas en medio sintético con 2 % de glucosa y 0,6 mM de fosfato se han convertido en protoplastos y el sobrenadante de preparación de los mismos se ha filtrado a través de una columna utilizando como eluyente tampón acetato 0,05 M pH 5.

La síntesis de las dos formas moleculares de fosfatasa de *C. utilis*, es reprimida en igual grado por la presencia de fosfato en el medio de cultivo, como se comprobó al someter a filtración por Sephadex G-200 diversos extractos libres de células, correspondientes a cultivos con concentraciones crecientes de fosfato.

Las formas pesada y ligera de fosfatasa ácida no se separan por filtración a través de DEAE-Sephadex- A-50. Cuando se filtran extractos libres de células de *candida utilis* a través de éste intercambiador catiónico la actividad fosfatásica queda ligada al gel y se eluye con un gradiente de cloruro sódico. Al ensayar actividad fosfatásica en el eluido de la columna después de conectado el gradiente, se observa un único máximo de actividad que eluye a una concentración de cloruro sódico de 0,2 M (Fig. 6).

En este único máximo se encuentran las dos formas moleculares de fosfatasa, como se comprobó al filtrar por Sephadex G-200 las fracciones correspondientes al máximo de actividad en DEAE Sephadex A-50 una vez concentradas y dializadas.

3.-Caracterización cinética de las formas moleculares de fosfatasa ácida de *Candida utilis*

Se han determinado diferentes parámetros de tipo cinético en las formas pesada y ligera de fosfatasa ácida de *C. utilis*.

Se han calculado las constantes de Michaelis y Menten frente al p-

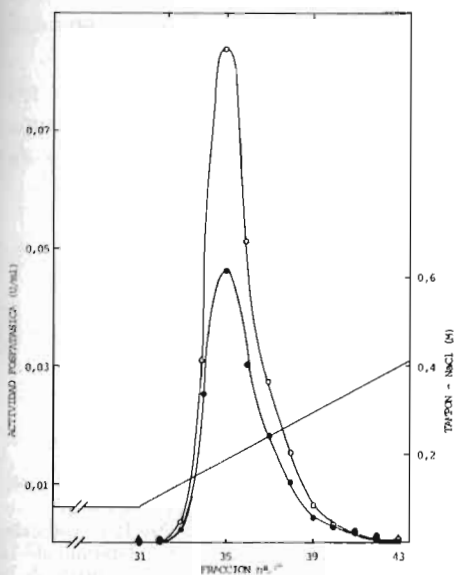


Fig. 6.-Cromatografía en DEAE-Sephadex A-50 de un extracto libre de células.

5 ml de extracto libre de células (5 U) se cargaron en una columna (40 × 2,5 cm) equilibrada con tampón acetato 0,05 M pH 5. Se aplicó un gradiente de ClNa hasta 1 M en el mismo tampón, con un volumen total de 600 ml. Se determinó la actividad de las fracciones eluidas (●) actividad fosfatásica a pH 7,5 (○) actividad fosfatásica a pH 4,5, (-) concentración de ClNa.

nitrofenil-fosfato a 30°C y pH 4,5, de ambas formas moleculares del enzima, obteniéndose valores de 2 mM para la fosfatasa pesada y 0,8 mM para la forma ligera del enzima.

Al estudiar el pH óptimo de las dos formas moleculares de fosfatasa se encontraron los resultados representados en la Fig. 7. Puede observarse que el enzima pesado tiene un perfil de pH óptimo con un máximo bien definido a pH 4,5, siendo completamente nula su actividad a valores de pH superiores a 7.

La forma ligera de fosfatasa muestra, sin embargo, un perfil de pH óptimo más amplio con un máximo en la zona de pH 4,5 pero presenta una apreciable

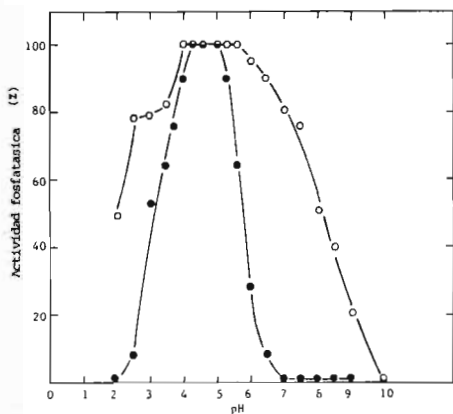


Fig. 7.-Efecto del pH en la actividad fosfatásica.

Se ha ensayado actividad fosfatásica a los distintos pH, que se han conseguido con la mezcla acetato-maleato-trihidroximetilaminometano. (●) actividad fosfatásica de la forma pesada, (○) actividad fosfatásica de la forma ligera.

actividad a pH alcalino, siendo a pH 7,5 aproximadamente el 80 % de la actividad que posee a pH 4,5.

Ambas formas moleculares de fosfatasa difieren en su estabilidad al pH (Fig. 8). Mientras que la forma ligera tiene un rango de estabilidad máxima comprendido entre pH 4 y 7, la forma ligera del enzima tiene un rango de estabilidad más amplio que va desde pH 5 a pH 9.

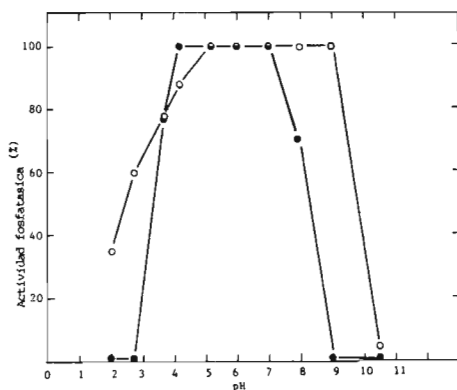


Fig. 8.—Estabilidad frente al pH de la actividad fosfatásica.

Muestras del isozima pesado y el ligero se han mantenido en contacto con los diversos pH durante 12 h. y al cabo de este tiempo se ha determinado la actividad fosfatásica de la forma pesada, (●) actividad fosfatásica de la forma ligera.

Las diferencias encontradas al estudiar la estabilidad frente a la temperatura de ambas formas moleculares, no son muy señaladas, si bien es de notar que mientras la forma pesada conserva un 50 % de actividad después de haber permanecido durante 60 minutos a 60°C, la forma ligera conserva tan solo el 10 % de su actividad después de idéntico tratamiento.

REFERENCIAS

- (1) SUOMALAINEN, H., LINKO, M. y OURA, E. (1960).—*Biochi. Biophys. Acta*, **37**, 482.
- (2) BERGMAYER, H. U. (1963).—*Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York and London.
- (3) SCHMIDT, G., BARTSCH, G., LAUMONT, M. C., HERMAN, T. y LISS, M. (1963).—*Biochemistry*, vol. 2, n.º 1, 127.
- (4) HEREDIA, C. F., YEN, F. y SOLS, A. (1963).—*Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 10, n.º 1, 14.
- (5) TONINO, G. J. M. y STEYN-PARVÉ, E. (1963).—*Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 453.
- (6) MC LELLAN, N. L. y LAMPEN, J. O. (1963).—*Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 324.
- (7) VAN RIJN, H. J. M., BOER, P. y STEYN-PARVÉ, E. (1972).—*Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 431.
- (8) MILDNER, P., RIES, B., GOLUBIC, Z. y POTO, E. (1972).—*Journal of General Microbiology*, **72**, 403.
- (9) BOER, P. y STEYN-PARVÉ, E. (1966).—*Biochim. Biophys. Acta*, **128**, 400.
- (10) KITAZUME, Y., YCAS, M. y VINCENT, W. S. (1962).—*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **48**, 265.
- (11) VILLANUEVA, J. R. y GARCÍA ACHA, I. (1971).—En «*Methods in Microbiology*», p. 665, vol. 4, Ed. por G. Booth, Academic Press. London y New York.
- (12) KESTON, A. S. (1956).—*Abstracts American Chemical Society, 129th Meeting* 31C.
- (13) FISKE, C. H. y SUBBAROW, Y. (1925).—*J. Biol. Chem.*, **66**, 375.