

SINTESIS DE β -GALACTOSIDASA EN *Streptomyces violaceus*

Por
J. SANCHEZ, M.^a E. ARIAS
y
C. HARDISSON
Departamento Interfacultativo de Microbiología.
Universidad de Oviedo

RESUMEN

Se ha estudiado la síntesis inducida de β -galactosidasa en *Streptomyces violaceus*. Los resultados obtenidos —niveles de inducción, eficacia de diferentes inductores, etc.— son más parecidos a los encontrados en el estudio del sistema de la β -galactosidasa en hongos, que a los encontrados en otras especies bacterianas como *E. coli*.

INTRODUCCION

La síntesis de β -galactosidasa ha sido un modelo muy útil para la investigación de los procesos de control bacterianos. Los mecanismos que regulan su producción han sido ampliamente caracterizados en *Escherichia coli*, desde los interesantes trabajos iniciales de JACOB y MONOD que condujeron a la elaboración en 1961, de su teoría de regulación por inducción y represión (operón *lac*). En otros géneros bacterianos existen diferencias en cuanto a especificidad de inducción de β -galactosidasa, efectividad del inductor, tiempo de aparición del enzima inducido en el cultivo y otras. La actividad β -galactosidasa ha sido estudiada dentro del Género *Streptomyces*, únicamente en *S. griseus* (1, 2). En el presente trabajo se amplía el conocimiento de los mecanismos básicos de regulación (inducción y represión), que intervienen en la síntesis de β -galactosidasa en *Streptomyces*. Para ello hemos seleccionado, entre otras estudiadas previamente, la especie *S. violaceus* MR 3196 (Colección Española de Cultivos Tipo), que presentaba una actividad β -galactosidasa notable en los extractos celulares obtenidos en presencia de galactosa o lactosa como inductores.

MATERIAL Y METODOS

Medio y condiciones de crecimiento

Para los experimentos de inducción se utilizó el siguiente medio líquido sintético (medio AS): $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,68 g; $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1,8 g; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g; $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g; $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g; $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g; $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,005 g; L-asparragina, 1 g; fuente de carbono, en la proporción indicada en cada caso; agua destilada, 1 litro. La incubación en medio líquido se realizó a 28°C en un agitador orbital Gallenkamp, a 200 rpm. La medida del crecimiento se realizó por peso seco.

Obtención y preincubación de las esporas

Las esporas se obtuvieron a partir de cultivos en medio GAE sólido, utilizando perlas de vidrio (3). Como inóculo en los experimentos de inducción enzimática se utilizó micelio desarrollado a partir de las esporas preincubadas en el medio AS con glicerol 1 %, hasta el final de la fase exponencial. Los experimentos de inducción se realizaron en matraces de 100 ml con 20 ml de medio, utilizándose el contenido total para la medida de actividad en el extracto celular.

Obtención de los extractos celulares

El contenido del matraz se centrifugó a 12.000 xg y a 4°C, congelándose el sedimento a -20°C, hasta su uso. Para su ruptura, se resuspendió el micelio en tampón fosfato sódico 0,1M, pH 7,2; tratándose posteriormente en un MSE Ultrasonic Disintegrator. El homogenado celular así obtenido se centrifugó a 31.000 xg y a 4°C, utilizándose el sobrenadante para la medida inmediata de la actividad enzimática.

Medida de actividades enzimáticas

La actividad β -galactosidasa se midió a 37°C por el método de LEDERBERG (4), con o-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) como sustrato, en el tampón descrito anteriormente. La hidrólisis de lactosa se determinó midiendo la glucosa liberada en la reacción enzima-sustrato. Para ello se utilizó un sistema acoplado glucosa oxidasa-peroxidasa (5). La actividad α -galactósidasa se midió sobre p-nitrofenil- α -D-galactósido o melibiosa. Las actividades β -glucosidasa y β -fucosidasa se midieron sobre p-nitrofenil- β -D-glucósido y p-nitrofenil- β -D-fucósido. La hidrólisis de los sustratos sintéticos y melibiosa se midió en la forma indicada arriba para el ONPG y lactosa, respectivamente. Una unidad de actividad enzimática es equivalente a 1 μg de o-nitrofenol liberado por minuto. La actividad específica se expresa como unidades por mg de peso seco celular.

Medida de galactosa en el sobrenadante del cultivo

Se determinó por el método de SOMOGY (6) de valoración de grupos reductores.

RESULTADOS Y DISCUSION

Inducción de actividad β -galactosidasa en *S. violaceus*

Se ensayó en primer lugar la eficacia de diversos análogos de la galactosa y galactósidos para inducir actividad β -galactosidasa en *S. violaceus*. Para ello, se añadieron en concentración 4.10^{-3} M al medio AS con glicerol 1 % como fuente de carbono, siguiéndose la aparición de la actividad en los extractos celulares. Los compuestos más efectivos como inductores fueron D-galactosa y L-arabinosa, con una pendiente de síntesis similar. La D-galactosa es, asimismo, el inductor más eficaz en otras especies microbianas, como *Bacillus megaterium* (7), *Lactobacillus plantarum* (8), *Aspergillus nidulans* (9) o *Neurospora crassa* (10). La L-arabinosa es también inductor de β -galactosidasa en *N. crassa*, que la utiliza para su crecimiento, *A. nidulans* y *B. megaterium*, aunque con menor eficacia que la galactosa en los tres casos. Indujeron actividad con menor pendiente la D-arabinosa y metil- β -D-galactosa, que no se utilizan para el crecimiento (la L-arabinosa y D-galactosa se utilizan fácilmente). No se obtuvo inducción con isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG), metil- β -D-tiogalactósido (TMG), ambos muy eficaces en *E. coli* (11). Estos compuestos tampoco inducen actividad β -galactosidasa en hongos. No fueron efectivos asimismo la melibiosa, lactosa, ácido D- α -galacturónico, fucosa, D-talosa, lactulosa, rafinosa, D-galactosa-6-fosfato y β -D-galactosamina. De los resultados anteriores se deduce que en *S. violaceus*, al igual que en hongos microscópicos, solamente compuestos fácilmente metabolizables son buenos inductores, y en consecuencia no hemos encontrado inductores gratuitos entre todos los compuestos ensayados, tanto naturales como sintéticos.

La lactosa es el inductor natural de β -galactosidasa en *E. coli* y en otras especies de *Streptomyces*, como *S. griseus*, por lo que se investigó con más detalle la síntesis enzimática en *S. violaceus* en presencia de ese disacárido, utilizando inóculos con alta y baja actividad específica. Los resultados en ambos casos fueron negativos. La preincubación de las células en galactosa o lactosa no aumentó la posterior síntesis de β -galactosidasa en lactosa. La adición de glicerol 1 % al medio con lactosa 1 %, para permitir una mayor velocidad de crecimiento, no modificó los resultados negativos anteriores.

Síntesis de β -galactosidasa en presencia de galactosa como inductor

Se estudió la cinética de inducción de la síntesis, siguiéndose la aparición de la actividad β -galactosidasa en el medio AS con galactosa 1 % como fuente de carbono. Según se observa en la Fig. 1, la síntesis enzimática tiene lugar durante

la fase exponencial de crecimiento, comenzando a las 2 ó 3 horas y alcanzando el valor máximo a las 5 ó 6 horas, cuando se ha consumido aproximadamente el 20 % de galactosa.

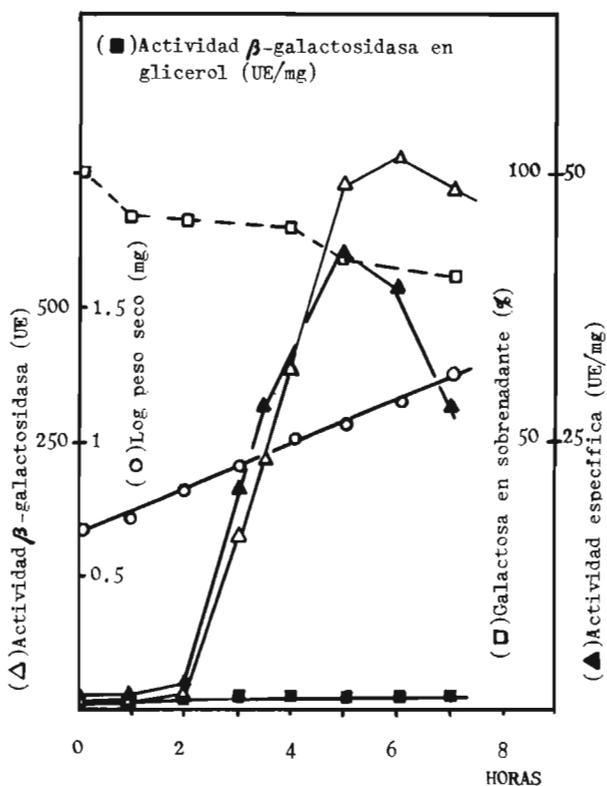


Fig. 1
Síntesis de β-galactosidasa por *S. violaceus* en medio sintético AS, con galactosa 1 %

Estos resultados son semejantes a los obtenidos en *S. griseus*. La máxima producción de β-galactosidasa se alcanza en *S. violaceus* para concentraciones de 2 % y 3 % de galactosa en el medio. Concentraciones superiores producen inhibición de la síntesis. En *S. griseus* el nivel saturante de inducción se obtiene con 0,072 % de lactosa. En este sentido, *S. violaceus* muestra mayor semejanza con organismos eucariotas, como los hongos. La máxima actividad específica representa un incremento de unas 45 veces sobre el nivel enzimático basal observado en glicerol. Este valor es unas siete veces superior al encontrado en *S. griseus*; pero nuevamente es del orden del obtenido en algunos hongos, como *Aspergillus nidulans* (9).

Efecto del IPTG, TMG y otros galactósidos sobre la inducción y actividad enzimáticas

Hemos investigado la posible acción represora del IPTG, TMG y otros galactósidos sobre la síntesis de β -galactosidasa inducida por galactosa, cuando se añaden al medio simultáneamente con el inductor (galactosa 0,5 %). Los resultados indicaron que el TMG es un inhibidor efectivo de la inducción enzimática (84 % de inhibición) en concentración 1 mM. El IPTG mostró, asimismo, un efecto inhibitorio notable (49 %), mientras que éste fue menos acusado en el caso de la D-fucosa. El efecto inhibitorio del IPTG sobre la inducción de β -galactosidasa por galactosa ha sido descrito asimismo en *Staphylococcus aureus* (12). Estudios realizados con el extracto enzimático mostraron, por otra parte, que el TMG no inhibía significativamente la actividad β -galactosidasa en concentración de hasta 20 mM. El IPTG inhibía algo más (14 % respecto al control), pero los valores son muy inferiores a los observados sobre la inducción.

Especificidad del extracto enzimático

Los valores de hidrólisis obtenidos sobre diferentes sustratos, referidos a la actividad encontrada sobre ONPG (100 %), indicaron la inexistencia de actividad α -galactosidasa o β -glucosidasa significativa en el extracto. La actividad β -fucosidasa es algo mayor (3 %). Esta actividad se presenta en la β -galactosidasa de *E. coli* (13). El extracto enzimático manifiesta poca actividad sobre lactosa (0,4 %), siendo esta velocidad de hidrólisis respecto al ONPG unas 10 veces menor que en *E. coli* (14). La función fisiológica de la β -galactosidasa estudiada en *S. violaceus*, se desconoce.

BIBLIOGRAFIA

- (1) DAN, A. y G. SZABO (1973).-Acta biol. Acad. Sci. hung., **24**, 1-10.
- (2) VITALIS, S. y G. SZABO (1978).-En «Nocardia and Streptomyces». Proc. of the Internat. Symp. on Nocardia and Streptomyces, Warsaw, October 4-8, 1976. M. Mordarski, W. Kurylowicz and J. Jeljaszewicz. Ed. p. 327-334. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- (3) HARDISSON, C., M. B. MANZANAL, J. A. SALAS y J. E. SUÁREZ (1978).-J. Gen. Microbiol., **105**, 203-214.
- (4) LEDERBERG, J. (1950).-J. Bacteriol., **60**, 381-392.
- (5) HUGGET, A. ST. G. and D. A. NIXON (1975).-Biochem. J., **66**, 12 p.
- (6) SOMOGYI, M. (1952).-J. Biol. Chem., **195**, 19.
- (7) LANDMAN, O. E. (1957).-Biochim. Biophys. Acta, **127**, 355-365.
- (8) HASAN, N. y I. F. DURR. (1974).-J. Bacteriol., **120**, 66-73.
- (9) FANTES, P. A. y C. F. ROBERTS (1973).-J. Gen. Microbiol., **77**, 471-486.
- (10) BATES, W. K., S. C. HEDMAN y D. O. WOODWARD (1977).-J. Bacteriol., **93**, 1631-1637.
- (11) JACOB, F. y J. MONOD. (1961).-J. Mol. Biol., **3**, 318-356.
- (12) MCCLATCHY, J. K. y E. D. ROSENBLUM (1963).-J. Bacteriol., **86**, 1211-1215.
- (13) WALLENFELS, K. y O. P. MALHOTRA (1960).-«Enzymes», second ed. vol 4, p. 409. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, Ed. Academic Press, Inc. New York.
- (14) WALLENFELS, K. (1962).-En «Methods in Enzymology», vol. V, p. 212. S. P. Colowick y N. O. Kaplan, Ed. Academic Press. New York.