

SINTESIS DE LA INVERTASA Y LA α -GALACTOSIDASA POR LEVADURAS

Por
F. MORENO, P. HERRERO

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

INTRODUCCION

La invertasa y la α -galactosidasa presentan en la célula de levadura un mecanismo de regulación de su síntesis diferente. La invertasa es un enzima reprimible el cual solamente se sintetiza cuando los niveles de hexosas en el medio de cultivo son bajos (1), mientras que la α -galactosidasa es un enzima inducible (2) el cual solamente se sintetiza activamente cuando un inductor está presente en el medio de cultivo.

La adición de glucosa a un cultivo de células de levadura, produce la detención de la síntesis de un grupo de enzimas, fenómeno conocido como «represión catabólica» (3) pero también otro grupo de enzimas muestra un descenso en su actividad, fenómeno conocido como «inactivación catabólica» (4). Cuando nosotros estudiamos estos fenómenos en la invertasa y α -galactosidasa de levaduras, pudimos observar, que ambos enzimas sufren el fenómeno de represión catabólica pero no el de inactivación catabólica.

Hasta el momento, no se conocen con exactitud las bases moleculares que rigen la represión catabólica. Se podría suponer, que los niveles intracelulares de algún metabolito de la glucosa podrían regular la expresión de algunos genes del genoma de la levadura. En este sentido, un nivel intracelular bajo de algún metabolito de la glucosa ocasionaría un incremento en la síntesis, mientras que un nivel intracelular alto de algún metabolito de glucosa supondría un descenso en la síntesis de los enzimas sometidos a este tipo de regulación.

En el presente trabajo presentamos datos que apoyan dicha hipótesis.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Glucosa oxidasa tipo V, peroxidasa tipo III, o-dianisidina, p-nitrofenil α -D-galactopiranosido, p-nitrofenol y 2-desoxi-D-glucosa se obtuvieron de Sigma Chemical Co.; el extracto de levadura de Difco y la sacarosa, glucosa y galactosa de Merck.

Microorganismos utilizados

Se han utilizado dos cepas de levadura. *Saccharomyces* 303-67 (5), diploide y homocigótico para el gen Su2. Sintetiza invertasa en grandes cantidades cuando los niveles de glucosa en el medio de cultivo son muy bajos y no hidroliza la maltosa.

Saccharomyces carlsbergensis G-517 (6), es capaz de hidrolizar los 3/3 de la rafinosa, es decir sintetiza tanto invertasa como α -galactosidasa.

Condiciones de cultivo

Las levaduras se inocularon en matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 100 ml de medio, el cual estaba compuesto por 1 % de extracto de levadura y 1 % de glucosa o galactosa según el experimento. Después de 14 h. de incubación en un agitador orbital, las células se recogieron y lavaron dos veces con extracto de levadura al 1 % por centrifugación a 4000xg durante 10 min. Dichas células se utilizaron de inóculo para un medio fresco constituido por 1 % de extracto de levadura y 10 mM de glucosa o galactosa según el experimento. Alicuotas de este cultivo, se fueron recogiendo a tiempos diferentes y lavándose con agua destilada dos veces por centrifugación a 4000xg durante 10 min.

Ruptura de las células

Alicuotas de una suspensión de células en 0.05 M Tris HCl buffer, pH 7.5, con un volumen de 100 μ l se rompieron, cuando interesó determinar la actividad enzimática total, por congelación en CO₂ sólido y descongelación a 30°C. Ensayos realizados en este sentido demostraron que la repetición durante cinco veces del ciclo de congelación descongelación, produce la ruptura del 100 % de las células.

Ensayo de la invertasa y de la α -galactosidasa

Invertasa.—La invertasa se ensayó en dos etapas (7). En una primera etapa se hidrolizó la sacarosa y en una segunda se valoró la glucosa liberada. En la segunda etapa se utilizaron 1,4 U/ml de glucosa oxidasa.

Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza

1 μmol de sustrato en 1 min. a 30°C en 0,05 M acetato buffer pH 5,0 que contiene sacarosa 0,125 M.

α -Galactosidasa.—La α -galactosidasa libera p-nitrofenol cuando se incuba con p-nitrofenil α -D-galactopiranosido, que actúa como sustrato. El p-nitrofenol liberado da una coloración amarilla en medio alcalino con un máximo de absorción a 410 nm.

Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de sustrato en 1 min. a 30°C en 0,25 M acetato buffer pH 4,5 y con p-nitrofenil α -D-galactopiranosido 25 mM.

Determinación de glucosa y galactosa

La glucosa se determinó utilizando la segunda etapa del ensayo de la invertasa, según se describió anteriormente (7).

La galactosa se determinó de acuerdo con el método descrito, para azúcares reductores, por SOMOGYI (8) y NELSON (9).

RESULTADOS

Efecto de la 2-desoxi-D-glucosa sobre la síntesis de la invertasa y la α -galactosidasa

La Fig. 1, muestra el efecto de diferentes cantidades de 2-desoxi-D-glucosa sobre las síntesis de la α -galactosidasa y la invertasa por células de *Saccharomyces*

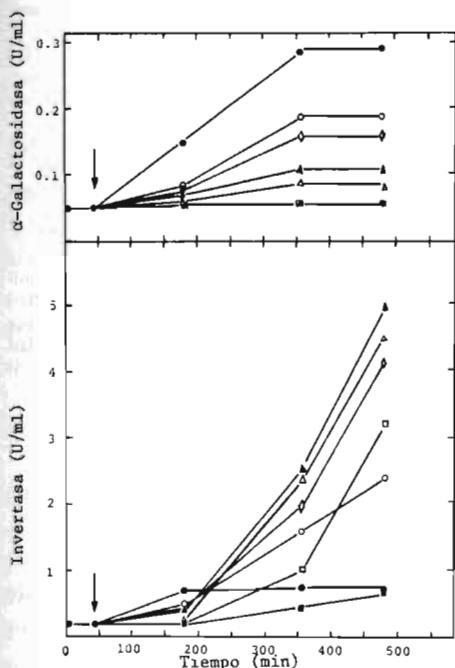


Fig. 1.—Síntesis de la α -galactosidasa y de la invertasa por *Saccharomyces carlsbergensis* G-517 con diferentes concentraciones de 2-desoxi-D-glucosa.

Las levaduras se crecieron en extracto de levadura al 1% y galactosa 10 mM, en el momento mostrado por las flechas el cultivo se dividió en varias alícuotas y se añadieron diferentes concentraciones de 2-desoxi-D-glucosa. (●—●) Control sin 2-desoxi-D-glucosa; (◊—◊) 2-desoxi-D-glucosa 0,15 mM; (▲—▲) 2-desoxi-D-glucosa 0,3 mM; (△—△) 2-desoxi-D-glucosa 0,45 mM; (□—□) 2-desoxi-D-glucosa 0,6 mM; (◻—◻) 2-desoxi-D-glucosa 1,2 mM; (■—■) 2-desoxi-D-glucosa 3,0 mM. Densidad celular inicial $0,6 \times 10^7$ células/ml.

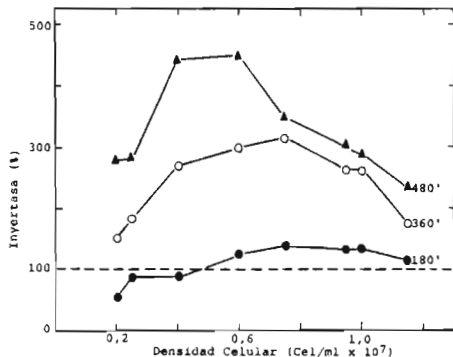
ces carlsbergensis G-517, las cuales fueron crecidas en un medio que contenía galactosa como fuente de carbono.

La presencia de la 2-desoxi-D-glucosa en el medio de cultivo produce una inhibición en la síntesis de la α -galactosidasa a todas las concentraciones del desoxi-azúcar ensayadas. Se consigue una inhibición del 50 % cuando la concentración de 2-desoxi-D-glucosa es del orden de 0,3 mM y este efecto se mantiene al menos durante 8 h.

Los resultados encontrados para la síntesis de invertasa, en la misma cepa de levadura fueron diferentes a los descritos para α -galactosidasa.

La síntesis de invertasa se inhibe durante las primeras 3 horas de cultivo a todas las concentraciones de 2-desoxi-D-glucosa usadas, posteriormente la actividad enzimática sube rápidamente alcanzando a la del cultivo control para al cabo de 4 h. de cultivo, superproducirse el enzima por el hecho de existir 2-desoxi-D-glucosa en el medio de cultivo. Una concentración de 1,2 mM de 2-desoxi-D-glucosa en el medio de cultivo, produce una inhibición de la biosíntesis de invertasa durante 5 h. para después de este tiempo superproducirse el enzima. Concentraciones superiores de 2-desoxi-D-glucosa (3,0 mM) producen a todos los tiempos ensayados (hasta 8 horas) una inhibición de la síntesis de invertasa.

Fig. 2.-Síntesis de la invertasa a diferentes densidades celulares.



En ordenadas está representada, la relación entre la actividad de un cultivo después de diferentes tiempos de tratamiento con 0,45 mM de 2-desoxi-D-glucosa, frente a la actividad invertásica en el cultivo control al mismo tiempo expresada como el porcentaje de incremento de la síntesis de invertasa. La densidad celular está tomada del momento de la adición de la 2-desoxi-D-glucosa. (●—●) 3 h. de cultivo; (○—○) 6 horas de cultivo; (▲—▲) 8 h. de cultivo. La línea discontinua del 100 % corresponde a la actividad del cultivo control a las diferentes densidades celulares iniciales.

El grado de incremento de la síntesis de invertasa, con 0,45 mM de 2-desoxi-D-glucosa, a diferentes densidades celulares se muestra en la Fig. 2. Como se puede observar, la densidad celular óptima para conseguir un mayor incremento en la síntesis de invertasa a cualquier tiempo de cultivo es de $0,6 \times 10^7$ células/ml. Después de 8 horas de cultivo es posible obtener 4,5 veces la actividad del cultivo control.

La Fig. 3, muestra el efecto de la 2-desoxi-D-glucosa en el crecimiento y consumo de galactosa por *Saccharomyces carlsbergensis* G-517. En este experimento podemos observar que la adición a un cultivo de 2-desoxi-D-glucosa produce, después de 30 min. una menor velocidad de crecimiento en el cultivo que la contiene que en el cultivo control que no posee 2-desoxi-D-glucosa. La velocidad de consumo de la galactosa también se ve disminuida por la presencia de este desoxiazúcar en el medio de cultivo.

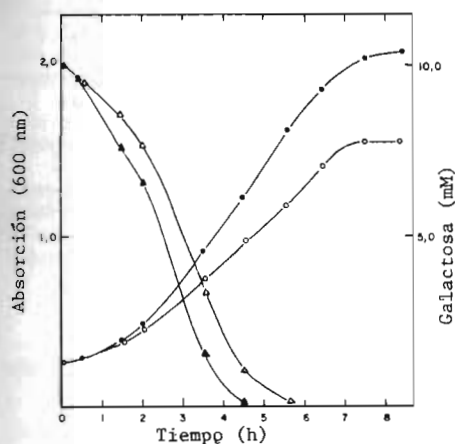


Fig. 3.—Efecto de la 2-desoxi-D-glucosa en el crecimiento y consumo de galactosa por *Saccharomyces carlsbergensis* G-517.

Las células se crecieron en un 1 % de extracto de levadura y un 1 % de galactosa durante 14 horas a 28°C. En el momento en que se recogieron, existía un 0.2 % de galactosa en el sobrenadante de cultivo. Estas células en fase exponencial de crecimiento, se usaron como inóculo de 100 ml de un medio fresco compuesto por extracto de levadura al 1 % y galactosa 10 mM, el cual después de 30 min. de incubación se dividió en dos alícuotas, a una de las cuales se les adicionó 2-desoxi-D-glucosa 0,3 mM. (●—●) crecimiento sin 2-desoxi-D-glucosa; (○—○) crecimiento con 2-desoxi-D-glucosa; (▲—▲) consumo de galactosa sin 2-desoxi-D-glucosa; (△—△) consumo de galactosa con 2-desoxi-D-glucosa.

Los resultados obtenidos para la síntesis de la invertasa externa y de la invertasa total en presencia de 2-desoxi-D-glucosa (Fig. 4) son muy similares, pero hay una diferencia importante entre ambas. Antes de las 3 horas de la adición de la 2-desoxi-D-glucosa el grado de inhibición producido es diferente, a las 2 horas de la adición, la invertasa externa tiene un 50 % de inhibición con respecto al control pero la invertasa total solo tiene un 25 % de inhibición, este resultado está de acuerdo con los datos publicados en trabajos anteriores (10) con respecto al efecto de la 2-desoxi-D-glucosa en la inhibición de la biosíntesis de la mitad de carbohidrato de la invertasa y la acumulación de formas moleculares del enzima en el interior del protoplasto.

De acuerdo con estos resultados, la presencia de 2-desoxi-D-glucosa en el medio de cultivo ocasiona una superproducción del enzima invertasa por *Saccharomyces carlsbergensis* G-517, dicho incremento en la síntesis del enzima, en un principio, se puede pensar que es debida, a que el enzima preexistente en una forma inactiva se transforma en la forma biológicamente activa o que se incrementa la síntesis de invertasa. Con el fin de establecer cuál de estas posibilidades es la que se da «in vivo», se procedió a inhibir la biosíntesis de proteínas

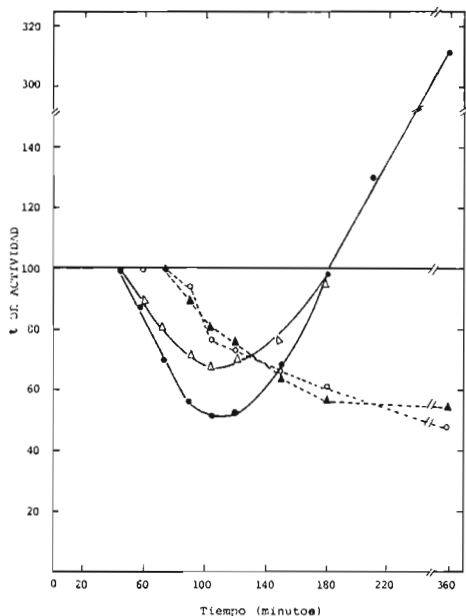


Fig. 4.-Representación comparativa del efecto de la 2-desoxi-D-glucosa sobre la síntesis de la invertasa externa y total.

En ordenadas está representada la relación entre la actividad total, o la actividad exocelular de un cultivo después de diferentes tiempos de tratamiento con 0,45 mM de 2-desoxi-D-glucosa frente a la actividad expresada como el porcentaje de incremento de la síntesis. (Δ - Δ) invertasa total; (\bullet - \bullet) invertasa exocelular; (\blacktriangle - \blacktriangle) α -galactosidasa total; (\circ - \circ) α -galactosidasa exocelular. Densidad celular inicial $0,6 \times 10^7$ células/ml.

mediante la adición del antibiótico cicloheximida cuando el enzima se estaba superproduciendo y observar si éste dejaba de sintetizarse. En la Fig. 5, se pueden observar los resultados obtenidos, la adición de 1 μ g/ml de cicloheximida supone la detención del incremento de actividad invertásica casi instantáneamente, esto supone el concluir que la superproducción de invertasa ocasionada

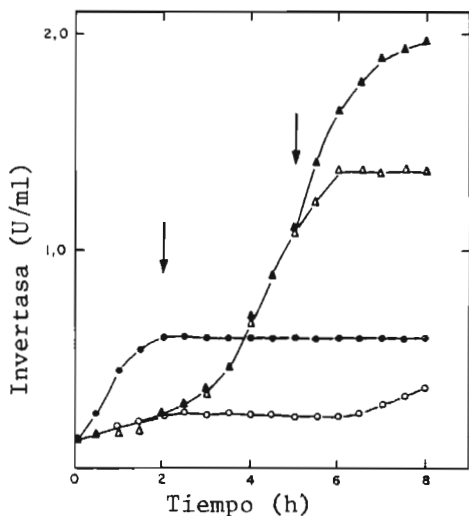


Fig. 5.-Efecto de la cicloheximida en el incremento de la síntesis de la invertasa producida por la 2-desoxi-D-glucosa.

Saccharomyces carlsbergensis G-517 se creció en un 1% de extracto de levadura y galactosa 10 mM. Densidad celular inicial $0,6 \times 10^7$ células/ml. (\bullet - \bullet) control sin adiciones; (\blacktriangle - \blacktriangle) con 0,45 mM de 2-desoxi-D-glucosa; (\circ - \circ) con 0,45 mM de 2-desoxi-D-glucosa y 1 μ g/ml de cicloheximida añadido a las 2 h. de cultivo; (Δ - Δ) con 0,45 mM de 2-desoxi-D-glucosa y 1 μ g/ml de cicloheximida añadido a las 5 h. de cultivo.

por la presencia de 2-desoxi-D-glucosa en el medio de cultivo es debida a una biosíntesis «de novo» del enzima.

Cuando *Saccharomyces carlsbergensis* o *Saccharomyces* 303-67 se crecieron en un 1 % de extracto de levadura y 10 mM de glucosa como fuente de carbono y se añadieron 50 µg/ml u otra concentración de 2-desoxi-D-glucosa los resultados obtenidos, con respecto a la síntesis de invertasa fueron muy diferentes. En la Fig. 6, se puede observar como en ningún caso se superproduce el enzima. *Saccharomyces* 303-67 presenta una inhibición de la biosíntesis de invertasa a lo largo de las 8 horas del experimento y *Saccharomyces carlsbergensis* G-517 solamente después de 7 horas de cultivo se alcanzan unos niveles similares entre la actividad invertásica en el control y en el cultivo problema.

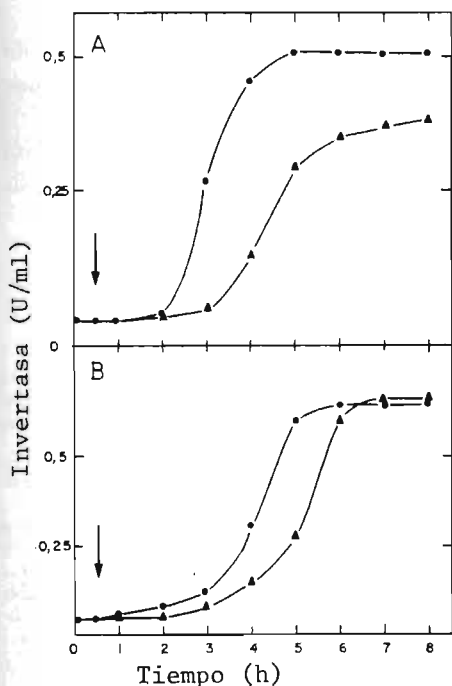


Fig. 6.—Efecto de la 2-desoxi-D-glucosa sobre la síntesis de la invertasa por *Saccharomyces* 303-67 (A) y *Saccharomyces carlsbergensis* G-517 (B) creciendo con glucosa como fuente de carbono.

Las células se crecieron en ambos casos en extracto de levadura al 1 % y glucosa al 1 % durante 14 h. a 28°C. En el momento de recoger las células quedaba un 0,2 % de glucosa en el sobrenadante del cultivo. Estas células en fase exponencial de crecimiento, se usaron para inocular dos matraces que contenían 100 ml de un medio fresco compuesto por un 1 % de extracto de levadura y glucosa 10 mM, los cuales después de 30 min. (flechas) se dividieron en dos alícuotas, a una de ellas se añadió 2-desoxi-D-glucosa a una concentración de 0,45 mM. (●—●) actividad en el cultivo control sin 2-desoxi-D-glucosa; (▲—▲) actividad en el cultivo con 2-desoxi-D-glucosa 0,45 mM. Las densidades celulares iniciales fueron de $0,6 \times 10^7$ células/ml.

Efecto de la D-xilosa sobre la síntesis de invertasa

La D-xilosa es un azúcar no metabolizable por las levaduras (11) y asimismo actúa como inhibidor competitivo de la hexoquinasa (12).

La adición de 50 mM de D-Xilosa a un cultivo de *Saccharomyces carlsbergensis* que está creciendo en extracto de levadura al 1 % y galactosa 10 mM, provoca un incremento en la síntesis de invertasa que se pone de manifiesto a los 30 minutos de la adición de la D-Xilosa al medio de cultivo.

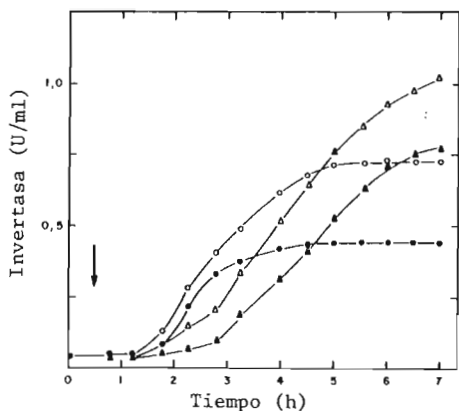


Fig. 7.-Efecto de la D-xilosa sobre la síntesis de la invertasa por *Saccharomyces carlsbergensis* G-517 usando galactosa como fuente de carbono.

Las células se inocularon a una densidad de $0,6 \times 10^7$ células/ml en un medio compuesto por extracto de levadura al 1 % y galactosa 10 mM. En el momento que señala la flecha el cultivo se dividió en varias alícuotas a las que se adicionaron D-xilosa, 2-desoxi-D-glucosa o ambos compuestos. (●-●) control sin adiciones; (▲-▲) 2-desoxi-D-glucosa 0,30 mM; (○-○) D-xilosa 50 mM; (△-△) 2-desoxi-D-glucosa 0,30 mM y D-xilosa 50 mM.

La Fig. 7 resume los resultados obtenidos, la presencia de 50 mM de D-xilosa provoca un incremento de la síntesis de invertasa similar al que produce una concentración de 2-desoxi-D-glucosa de 0,3 mM.

La presencia en un mismo cultivo de 2-desoxi-D-glucosa y de D-Xilosa produce una adición de los efectos causados por ambos azúcares sobre la síntesis de la invertasa.

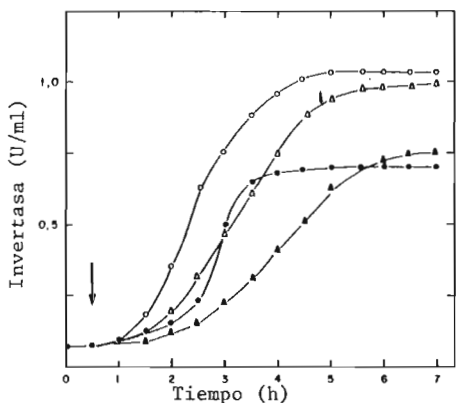


Fig. 8.-Efecto de la D-xilosa sobre la síntesis de la invertasa por *Saccharomyces carlsbergensis* G-517 usando glucosa como fuente de carbono.

El método seguido en el experimento es como el descrito en la Fig. 7, excepto que la galactosa se substituyó por glucosa a una concentración de 10 mM. (●-●) control sin adiciones; (▲-▲) 2-desoxi-D-glucosa 0,30 mM; (○-○) D-xilosa 500 mM; (△-△) 2-desoxi-D-glucosa 0,30 mM y D-xilosa.

Cuando la fuente de carbono presente en el medio de cultivo es la glucosa, tanto *Saccharomyces carlsbergensis* como *Saccharomyces* 303-67 no tienen afectada la síntesis de invertasa por la presencia de 2-desoxi-D-glucosa en el medio de cultivo, resultado que ya habíamos descrito anteriormente, sin embargo la adición de D-xilosa provoca un incremento de la síntesis de invertasa por ambas levaduras similar al descrito anteriormente, asimismo los efectos causados por 2-desoxi-D-glucosa y D-xilosa son aditivos, estos resultados están resumidos en las Figs. 8 y 9.

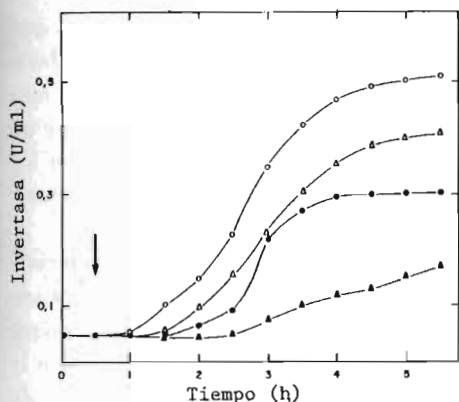


Fig. 9.—Efecto de la D-xilosa sobre la síntesis de la invertasa por *Saccharomyces* 303-67 usando glucosa como fuente de carbono.

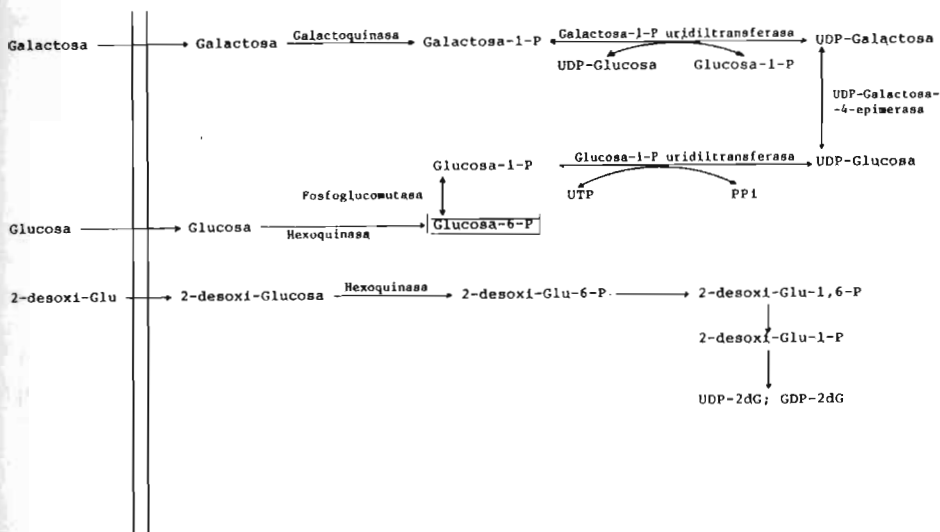
El método seguido en el experimento es como el ya descrito en la Fig. 7, excepto que la fuente de carbono utilizada fue la glucosa a una concentración 10 mM (●—●) control sin adiciones; (▲—▲) 2-desoxi-D-glucosa 0,30 mM; (○-○) D-xilosa 500 mM; (△-△) 2-desoxi-D-glucosa 0,30 mM y D-xilosa 500 mM.

DISCUSION

El esquema I resume las rutas de conversión de la galactosa y la glucosa del medio de cultivo en glucosa-6-P intracelular. Si suponemos, que la represión catabólica ejercida por estos azúcares y que afecta a la síntesis de diversas proteínas entre las que se encuentra la invertasa, viene condicionada por los niveles intracelulares de glucosa-6-fosfato u otro metabolito de la glucosa, el efecto producido por la 2-desoxi-D-glucosa sobre la síntesis de la invertasa lo

ESQUEMA I

RUTA DE CONVERSION DE LA GLUCOSA Y LA GALACTOSA DEL MEDIO EN GLUCOSA-6-FOSFATO INTRACELULAR



podríamos achacar a una inhibición de alguno o varios de los enzimas que transforman la galactosa exocelular en glucosa-6-fosfato intracelular es decir 2-desoxi-D-glucosa inhibiría algún enzima de la ruta de la galactozimasa. Por otra parte un inhibidor competitivo de la hexoquinasa tal como la D-xilosa produce un efecto similar cuando las levaduras crecen en glucosa lo cual indicaría que los niveles bajos de glucosa-6-fosfato u otro metabolito de glucosa afecta a la síntesis de la invertasa.

El hecho de que 2-desoxi-D-glucosa, no tiene el efecto descrito anteriormente sobre la síntesis de la invertasa, cuando las levaduras crecen utilizando glucosa como fuente de carbono restringe su papel a la ruta de la galactozimasa sin embargo D-xilosa ejerce un efecto similar tanto usando la galactosa como la glucosa como fuentes de carbono por lo que se podría suponer que además de inhibir hexoquinasa (12) también sería inhibidor de algún enzima de la ruta de la galactozimasa.

En otro sentido, cuando están presentes en el medio de cultivo tanto 2-desoxi-D-glucosa como D-xilosa los efectos de ambos compuestos se suman. La inhibición causada por la D-xilosa sobre la hexoquinasa no sólo se manifestaría produciendo un descenso en la velocidad de fosforilación de la glucosa o en la velocidad de síntesis de glucosa-6-fosfato a partir de galactosa sino que también produciría un descenso en la velocidad de fosforilación de la 2-desoxi-D-glucosa a 2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato. Estos datos apoyan la idea de que es la 2-desoxi-D-glucosa el compuesto responsable del incremento de la síntesis de la invertasa y no un metabolito suyo, resultado que estaría en contraposición con los publicados por otros autores (13) en el sentido de que es la 2-desoxi-glucosa-6-fosfato el metabolito responsable de la inhibición de la biosíntesis de carbohidratos en levaduras.

REFERENCIAS

- (1) GASCÓN, S. y OTTOLENGHI, P. (1972).-C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **39**, 15-24.
- (2) FRIIS, J. y OTTOLENGHI, P. (1959).-C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **31**, 272-280.
- (3) MACASANIK, B. (1961).-Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **26**, 249-256.
- (4) HOLZER, H. (1976).-Trends Biochem. Sci., **1**, 178-181.
- (5) WINGE, Ø. y ROBERTS, C. (1957).-C. R. Trav. Lab. Carlsberg., **25**, 419-459.
- (6) GILLILAND, R. R. (1969).-Antonie van Leewenhoek, J. Microbiol. Serol., **35**, 13-23.
- (7) GASCÓN, S. y LAMPEN, J. O. (1968).-J. Biol. Chem., **243**, 1.567-1.572.
- (8) SOMOGYI, M. (1952).-J. Biol. Chem., **195**, 19-23.
- (9) NELSON, N. (1944).-J. Biol. Chem., **153**, 375-380.
- (10) MORENO, F., OCHOA, A. G., GASCÓN, S. y VILLANUEVA, J. R., (1975).-Eur. J. Biochem., **50**, 571-579.
- (11) HEREDIA, C. F., SOLS, A. y DE LA FUENTE, G. (1968).-Eur. J. Biochem. **5**, 321-329.
- (12) SOLS, A., DE LA FUENTE, G., VILLAR-PALASI, C. y ASENSIO, C. (1958).-Biochim. Biophys. Acta, **30**, 92-101.
- (13) LAMPEN, J. O., KUO, S. C., CANO, F. R. y TKACZ, J. S. (1972).-En Fermentation Technology Today (Terni, G. ed.) pp. 819-824, Society of Fermentation Technology, Japón.