

HIDROLISIS DE LA RAFINOSA POR LA MELIBIASA DE LEVADURA Y FERMENTACION DE DICHO AZUCAR POR ACCION COMPLEMENTARIA DE GENES

por

MANUEL LOSADA (*)

Muchas de las complicaciones que surgen en el estudio de la especificidad de las carbohidrasas se deben a la dificultad de aislar estas enzimas en estado puro, no siendo a menudo posible asegurar si se trabaja con un solo fermento o con una mezcla de varios. En relación con las carbohidrasas de levaduras, adquieren, pues, indudable interés los métodos genéticos, desarrollados, principalmente, por los profesores Winge, del Carlsberg Laboratorium, y Lindegren. Dichos métodos permiten obtener, a partir de esporas aisladas conseguidas tras oportunas hibridaciones y segregaciones, cultivos conteniendo un solo gen productor de carbohidrasa o la combinación de genes deseada. El valor de tales genotipos es evidente, para investigar una carbohidrasa particular, sintetizada por un gen aislado, sin que interfieran otras, y para seguir la hidrólisis y fermentación de azúcares que, como la rafinosa, constan de diversos monosacáridos, unidos por enlaces glicosídicos de diferentes tipos.

Weidenhagen afirma que existen cinco tipos de glicosidasas (α - y β -glucosidasas, α - y β -galactosidasas, y β -L-fructosidasa). Estas glicosidasas poseen, según él, afinidad sólo por la porción

(*) Resumen del trabajo realizado durante mi estancia en el Laboratorio Carlsberg, con beca concedida por el Patronato «Alonso de Herrera», del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y que ha sido publicado en «Comptes Rendus» del citado Laboratorio, Serie Fisiológica, 25, 460 (1957).

glicosídica de la molécula que actúa de sustrato, por lo que el mismo tipo de enzima, α -glucosidasa, rompe las uniones α -glucosídicas de los oligosacáridos naturales (maltosa, sacarosa, turanosa, melezitosa y trehalosa), y de los α -glucósidos sintéticos, e igualmente el mismo tipo de enzima, α -galactosidasa, hidroliza los enlaces α -galactosídicos de la melibiosa y rafinosa. La teoría de Weidenhagen adolece, sin embargo, de la validez universal que *a priori* permita asegurar si cierta carbohidrasa particular hidroliza o no a cierta unión glicosídica, como lo demuestran las siguientes conocidas objeciones:

1) Hay carbohidrasas que hidrolizan la maltosa y no el α -metil-glucósido, a pesar de poseer ambos sustratos un anillo terminal de α -glucopiranosas.

2) La trehalosa, aunque es α -glucósido, no es hidrolizada por la maltosa de levadura, y necesita para su hidrólisis de un enzima específico, la trehalasa.

3) Se conocen α -glucosidasas que hidrolizan la maltosa y sacarosa, y otras que hidrolizan la maltosa, pero no la sacarosa.

Por tanto, aunque Neuberg demostró que la rafinosa es desdoblada por la melibiasa (α -galactosidasa) de la emulsina en galactosa y sacarosa, no puede afirmarse, hasta que no se realice experimentalmente, si dicha hidrólisis se produce igualmente con la melibiasa de levadura. El hecho de que hasta ahora no se haya demostrado se debe quizá a la presencia simultánea de melibiasa y fructosacarosa en los cultivos empleados, ya que esta última separa la fructosa terminal al actuar sobre la rafinosa y deja melibiosa libre.

Lindegren sostiene que la melibiasa de levadura no es capaz de hidrolizar la melibiosa en la molécula de rafinosa, y que la hidrólisis completa de ésta depende de la presencia simultánea de melibiasa y sacarosa (carbohidrasas sintetizadas, respectivamente, por los genes *ME* y *SU* de Lindegren, y *Me* y *R* de Winge).

Nosotros, utilizando cultivos de esporas aisladas *Me r*, hemos podido demostrar que la melibiasa es capaz de romper la unión α -galactosídica de la rafinosa. Los cultivos que poseen en vez del gen *Me* su recesivo *me* no producen hidrólisis. Es cierto, como afirma Lindegren, que los cultivos *Me r* no fermentan la

rafinosa, pero es en cambio erróneo atribuir este fenómeno a una incapacidad de la melibiasa para hidrolizar el trisacárido. Si se tiene presente que los dos azúcares originados en la hidrólisis, galactosa y sacarosa, no pueden ser directamente fermentados por el complejo zimásico existente en las levaduras de genotipo *Me r*, se comprende que la fermentación no se produzca aunque haya tenido lugar la hidrólisis previa. Nosotros hemos comprobado que la rafinosa hidrolizada por cultivos *Me* fermenta si se trata posteriormente con cultivos *G* o *M*. En el primer caso, la galactosidasa, sintetizada por el gen *G*, transforma la galactosa en un derivado fermentescible; en el segundo caso, la α -glucosidasa, producida por el gen *M* hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa. Sólo los genes *M* que, como los M_1 y M_2 , sintetizan α -glucosidasas activas frente a maltosa y sacarosa dan lugar a fermentación. Por esto el gen M_2 , que sólo hidroliza la maltosa, se muestra inactivo.

Winge y Roberts han estudiado la fermentación de la rafinosa por acción complementaria *Mc G*. Nosotros nos hemos ocupado de la acción *Me M*. Utilizando como padres los cultivos diploides (*McMe m₁, m₁, m₂, m₂*), (*meme M₁, M₁, m₃, m₃*) y (*meme m₁, m₁, M₂, M₂*), ninguno de los cuales fermenta la rafinosa, conseguimos, por cruzamientos espora \times espora, híbridos de los tipos (*Me \times M₁* y (*Me \times M₂*). Analizamos 26 ascas tetrasporuladas de un híbrido del primer tipo (*Meme M₁, m₁*), y 29 de uno del segundo (*Meme M₂, m₂*). La segregación obtenida siguió, en ambos casos excelentemente, la frecuencia teórica indicada a continuación:

TIPO DE ASCA	Frecuencia
2 Me m : 2 me M ₁	1
1 Me M : 1 Me m : 1 me M : 1 me m....	4
2 Me M : 2 me m.....	1

De los cuatro tipos de cultivos originados en la segregación, sólo los de genotipo *Me M* fermentaron la rafinosa (1 aproxima-

damente de cada 4). La explicación es clara. Las α -glucosidasas aisladas son inactivas frente a la sacarosa de la rafinosa, donde la glucosa se encuentra bloqueada por la unión con una molécula de galactosa. Ahora bien, si la α -galactosidasa, que separa galactosa de la rafinosa, está simultáneamente presente en las mismas levaduras, las α -glucosidasas se hacen activas y liberan los monosacáridos glucosa y fructosa, directamente fermentescibles. Como todos los cultivos de la colección del Carlsberg a los que falta el gen *G* contienen el gen *g_s* (sintetizador lento de galactozimasa), pensamos que los cultivos *Me m*, si bien muy lentamente, llegarían a fermentar la rafinosa por acción complementaria *Me g_s*.

Prolongados durante un mes los ensayos, pudimos comprobar que la mayoría de los cultivos *Me m* producían fermentación. (Es decir, a largo plazo la mitad de los cultivos originados en la segregación fermentan la rafinosa.)

Estudios cuantitativos realizados en el aparato de van Iterson Kluyver con cultivos de genotipo *Me M*, y *M. M. G.*, demostraron que los primeros fermentan 2/3 (la β -galactosa queda sin fermentar), y los segundos 3/3 de la molécula de rafinosa. La fermentación de la rafinosa por acción complementaria *Me M*, transcurre más lentamente que por acción simple *R*, debido seguramente a que la β -*h*-fructosidasa actúa sobre la rafinosa con más rapidez que la α -galactosidasa. La fermentación se acelera, sin embargo, cuando los cultivos *Me M* han crecido en mosto en vez de en glucosa, como consecuencia de un enriquecimiento de las células en α -glucosidasa.

CONCLUSIONES

1. La melibiasa (α -galactosidasa) de levadura hidroliza la rafinosa en galactosa y sacarosa.
2. Levaduras de genotipo *Me M* hidrolizan completamente la rafinosa por acción complementaria de los genes *Me* (α -galactosidasa) y *M* (α -glucosidasa). La α -glucosidasa actúa sobre la sacarosa liberada por la α -galactosidasa.

3. Levaduras de genotipo *Me M* fermentan 2/3 de la molécula de rafinosa (sacarosa). Si el gen *G* (galactozimasa) está también presente, la fermentación es completa.

4. Levaduras de genotipo *Me M* fermentan la rafinosa más lentamente que levaduras de genotipo *R*, probablemente debido a que la β -*h*-fructosidasa, sintetizada por el gen *R*, actúa sobre la rafinosa con más rapidez que la α -galactosidasa. La fermentación se retarda aún más cuando los cultivos *M Me* han crecido en glucosa en vez de en mosto (menor contenido en α -glucosidasa de las células).

5. Levaduras de genotipo *Me g_s* pueden fermentar, aunque muy lentamente, la rafinosa por acción complementaria de los genes *Me*, y *g_s* (sintetizador lento de galactozimasa).

6. Híbridos (*Me m* × *me M*) obtenidos por cruzamiento de dos padres no fermentadores, fermentaron la rafinosa, y segregaron frente a este azúcar, en excelente acuerdo con los resultados teóricos, en la proporción 0:4, 1:3 y 2:2.

RESUMEN

En el presente trabajo se establece que la melibiasa procedente de la levadura hidroliza la rafinosa en galactosa y sacarosa. Si las levaduras presentan un genotipo *Me M* hidrolizan completamente la rafinosa por la acción complementaria de los genes *Me* (α galactosidasa) y *M* (α glucosidasa), actuando esta segunda sobre la sacarosa, liberada por acción de la primera.

Los híbridos (*Me m* × *me M*) obtenidos por cruzamiento de dos padres no fermentadores, fermentaron la rafinosa y segregaron frente a este azúcar, en acuerdo con los resultados teóricos, en la proporción 0:4, 1:3 y 2:2.

SUMMARY

In this work we establish that melibiase from yeast hydrolyzes raffinose to galactose and saccharose. If yeast present a genotium *Me M* they hydrolyze raffinose completely through the complementary action of the genes *Me* (α galactosidase) and *M* (α glucosidase) the latter acting upon the saccharose freed by the action of the former.

The ybrids (*Me m* × *me M*) obtained through crossing of two non-fermenting parents, fermented raffinose and segregated in front of this sugar, according to theoretical results, in the proportion of 0:3, 1:3, 2:2.