



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO SISTEMATICO Y DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS ENZIMAS GLUTAMATO DESHIDROGENASA Y GLICEROL-3-FOSFATO DESHIDROGENASA EN LA LEVADURA MARINA Debaryomyces hansenii.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE ROMO YAÑEZ



DIRECTOR DE TESIS: DRA. LUISA ALVARINA ALBA LOIS



292317



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

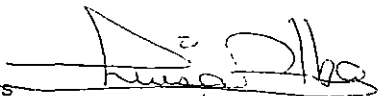
MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

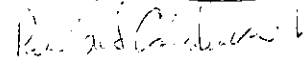
Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
 Estudio Sistemático y Determinación de la Actividad Específica, de
 las Enzimas Glutamato Deshidrogenasa y Glicerol-3-Fosfato Deshidro-
 genasa en la Levadura Marina *Debaryomyces hansenii*.
 realizado por


José Romo Yáñez
 con número de cuenta 9014926-3 , pasante de la carrera de Biología


Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

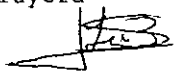
Atentamente

Director de Tesis
 Propietario Dra. Luisa Alvarina Alba Lois 

Propietario Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez 

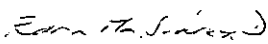
Propietario M. en I.B.B. Claudia Andrea Segal Kischinevzky 

Suplente Biól. Alfonso José Vilchis Peluyera 

Suplente Biol. Jose Luis Busto Sánchez 

FACULTAD DE CIENCIAS
 U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología


 Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
 DE BIOLOGÍA

El presente trabajo lo dedico a:

Mi madre

Aurelia Yáñez

Gracias por tu apoyo incondicional en todo momento y por el gran esfuerzo que has hecho para que finalizara mis estudios.

Mi padre

José Luis Romo

Por tu apoyo y cariño.

Mis Hermanos

Rosita, Clau, Luis, Ale, Susi, Eli

Por soportarme.

Mi Tía

Sonia Yáñez

Por tu apoyo y por las atinadas sugerencias que me has hecho en momentos clave.

Mis Sobrinos

Iris, Lalo, mi sobrino-ahijado Adán y mi sobrino-nieto-ahijado Ulises.

A todos ustedes, y los que me faltan, Gracias!

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luisa Alba Lois mis más sinceros agradecimientos por haberme invitado a trabajar en el laboratorio a su cargo, por haberme iniciado en este campo del conocimiento, pero principalmente por ser mi guía durante la realización del presente trabajo y por su preocupación para que presentara mi examen profesional.

A mis revisores de tesis:

A la M. en IBB. Claudia Segal por contar con su atinada asesoría durante mi trabajo de tesis y en la revisión de ésta.

Al Dr. Rene Cárdenas por sus valiosas aportaciones para la escritura de este trabajo.

Al Biól. Alfonso Vilchis que tuvo la atención de leer mi escrito y realizar críticas constructivas.

Al Biól. José Luis Busto por sus críticas y observaciones para la redacción final de este escrito.

A mis compañeros de laboratorio: Bety , Víctor, Epifanio y a mi gran amigo Rómel.

A mis compañeros de clase: Vero, Paula, Manuel, Juan, Luis, Raúl por su amistad y compañía durante los años que estuvimos juntos.

El Presente trabajo fue realizado en el

**Laboratorio de Biología Molecular
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias UNAM**

Bajo la Tutoría de la

Dra. Luisa Alba Lois

INDICE

	Pág.
Abreviaturas	3
Resumen	5
Introducción	7
Osmotolerancia.....	8
Osmoregulación.....	8
<i>Debaryomyces hansenii</i>	14
Objetivos	19
Materiales y Métodos	20
Cepas.....	20
Medios de Cultivo.....	20
Condiciones de crecimiento.....	20
Obtención de extractos crudos de proteína.....	21
Cuantificación de Proteína.....	22
Determinación de actividad específica de GDH-NADPH.....	23
Determinación de actividad específica de GPD-NADH.....	25
Resultados	27
Determinación del medio de cultivo para el crecimiento óptimo de <i>D. hansenii</i>	27
Actividad específica de GDH-NADPH.....	35
Actividad específica de GPD-NADH.....	37
Discusión	41
Conclusiones	46
Referencias	48

ABREVIATURAS

Enzimas:

GDH.- Glutamato deshidrogenasa.

GPD.- Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.

DHA cinasa.- Dihidroxiacetona cinasa

Cofactores:

NADPH.- Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato, forma reducida.

NADH.- Nicotinamín adenín dinucleótido, forma reducida.

Medios de cultivo:

YPD.- Medio de cultivo rico o completo elaborado con extracto de levadura, peptona y glucosa.

MM.- Medio mínimo de cultivo en base a la fórmula de Difco. Yeast Base.

MMDh.- Medio mínimo de cultivo suplementado con sales de potasio.

SNAsn.- Medio mínimo de cultivo con asparagina como fuente de nitrógeno.

SNAsnDh.- Medio mínimo de cultivo con asparagina como fuente de nitrógeno suplementado con sales de potasio.

S/C,NGlicAsnDh.- Medio mínimo de cultivo con glicerol como fuente de carbono y asparagina como fuente de nitrógeno suplementado con sales de potasio.

S/C,NSorbAsnDh.- Medio mínimo de cultivo con sorbitol como fuente de carbono y asparagina como fuente de nitrógeno suplementado con sales de potasio.

Reactivos

DHAP.- Dihidroxiacetona fosfato.

ASB.- Albúmina de suero bovina.

DTT.- Ditioneitol.

EDTA.- Etilendiamina ácido tetra-acético.

PMSF.- Fenil-Metil-Sulfonil Fluoruro.

RESUMEN

La levadura marina *Debaryomyces hansenii* ha sido aislada de diversos ambientes salinos tales como agua marina, fábricas de sal, quesos y carnes frías. Es uno de los pocos microorganismos eucarióticos que puede crecer tanto en ausencia de sal como en amplios rangos de concentración de sales, lo que la hace una levadura osmotolerante y crece en medios de cultivo a concentraciones desde 0 hasta 4M de NaCl.

D. hansenii puede contender con el bajo potencial hídrico provocado por la alta concentración de NaCl mediante dos mecanismos principales: 1) por el incremento en el transporte de K^+ que es favorecido por la presencia de Na^+ ; y 2) por la producción y acumulación de glicerol como principal soluto compatible.

En este trabajo se realizó un estudio sistemático para encontrar un medio de cultivo adecuado para el crecimiento óptimo de la levadura *D. hansenii*. Desarrollamos un medio de cultivo que tiene como características principales el contener al aminoácido asparagina como única fuente de nitrógeno y la presencia de sales que contienen potasio. Ambas condiciones, según nuestra experiencia, necesarias para el crecimiento óptimo de esta levadura. También se observó que *D. hansenii* posee una versatilidad metabólica amplia ya que presentó un crecimiento favorable en las distintas condiciones a las que fue sometida.

Una vez establecido el medio de cultivo, se determinó la actividad específica de las enzimas glutamato deshidrogenasa (GDH-NADPH dependiente), implicada en la síntesis de ácido glutámico y en la asimilación de amonio, y de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD-NADH

dependiente), enzima limitante en la síntesis de glicerol y mostrar su posible relación con la respuesta a un cambio en la osmolaridad del medio de cultivo en la levadura *D. hansenii*.

Encontramos un aumento de 4.7 veces en la actividad específica de la enzima GDH-NADPH cuando se cultiva a *D. hansenii* en presencia de NaCl 1M un resultado que sugiere una posible participación del glutamato como osmolito protector, sin embargo, hacen falta estudios para comprobar esta supuesta participación. Por otro lado encontramos un aumento de 1.7 veces en la actividad específica de la enzima GPD-NADH cuando se cultiva en presencia de NaCl 1M, confirmando los estudios existentes que indican la participación de la enzima GPD-NADH en el fenómeno de osmotolerancia.

Este trabajo pone de manifiesto que este microorganismo es sumamente adaptable a la presencia de sal y que se vislumbra como un modelo experimental idóneo para abordar estudios acerca de la osmotolerancia.

INTRODUCCIÓN

Las células, en toda su abundancia de formas, se encuentran encapsuladas por una membrana la cual tiene propiedades de semipermeabilidad, lo que le confiere a las células presentar el fenómeno de ósmosis. La ósmosis es el movimiento de agua de un compartimento con una solución menos concentrada a otro con una solución mas concentrada, cuando una membrana semipermeable separa las soluciones y cuando la membrana es impermeable al soluto. La fuerza que mueve el agua en un sistema osmótico es la presión osmótica, π , definida por la expresión de van't Hoff

$$\pi = RT(c_e - c_i)$$

donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta, c_e y c_i son las concentraciones externa e interna del soluto. La ecuación de van't Hoff muestra que la presión osmótica depende de la diferencia de concentración de las dos soluciones. Cuando una de las concentraciones es cero, la presión osmótica es definida por RTc . La presión osmótica es un parámetro usual para caracterizar las soluciones (Wilson, 1979).

La ósmosis del agua es un mecanismo para igualar el potencial químico del solvente y el soluto en cada compartimento. El potencial químico del agua, o potencial hídrico, está dado en función de la concentración de las partículas disueltas en una solución, así, el potencial hídrico es de 0 en el agua pura y se asignan valores negativos conforme aumenta la concentración de las partículas en solución. Por ejemplo, el agua de mar posee una concentración molar aproximada de 0.5 y su potencial hídrico es aproximadamente de -2.5 mpa. El potencial hídrico es una de las propiedades coligativas de las soluciones, junto con el

descenso del punto de congelamiento, el descenso de la presión de vapor y la elevación del punto de ebullición.

La molécula de agua permea la membrana celular mucho más libremente que otros constituyentes celulares, manteniendo, en la mayoría de los casos, el equilibrio hídrico de la célula con su ambiente. En solución la molécula de agua está asociada con el soluto (solvatación) esto provoca cambios en el estado del agua, lo cual lleva a un decremento dramático en la cantidad de agua disponible para los organismos vivos. Como los procesos celulares activos están en soluciones acuosas, la fisiología de la célula inevitablemente tiene que hacer frente a los fenómenos osmóticos y ajustarse adecuadamente para sobrevivir y crecer (Blomberg & Adler 1992).

OSMOTOLERANCIA

Se define como la capacidad de los organismos para desarrollarse en condiciones de alta o baja disponibilidad de agua. Otros términos describen el mismo fenómeno, como xerotolerancia, halofilismo, osmofilismo y tolerancia a la desecación (Onishi, 1963; Pitt, 1975; Brown 1976; Tilbury, 1980; Hockstra & Van Roedel, 1988).

Los organismos osmotolerantes poseen fluidos con la misma presión osmótica que el medio en el que viven. Cuando se presenta un cambio en la concentración del medio, los organismos pueden responder de dos maneras distintas. En la primera mantienen o regulan la concentración de los fluidos internos a pesar de que se presenten cambios en la concentración del medio, dichos organismos se denominan osmorreguladores. La segunda forma es que modifican la concentración de los fluidos internos hasta conformar la del medio, permaneciendo, de

esta manera, isosmótica con la concentración del medio, los organismos que responden de esta forma se denominan osmoconformadores y no son capaces de osmorregular. (ver Figura 1) (Wilson, 1979; Schmidt-Nielsen, 1979).

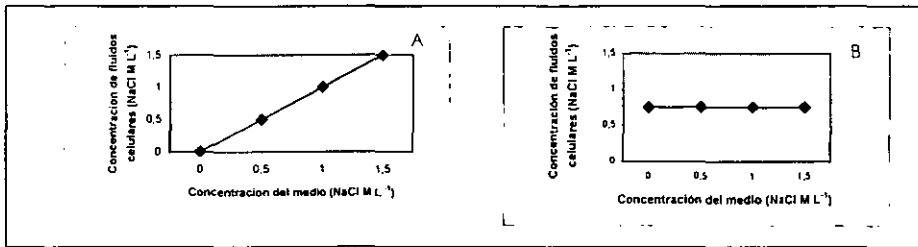


Figura 1.- Comportamiento de organismos osmotolerantes. A) Osmoconformador ideal. B) Osmorregulador ideal.

OSMORREGULACIÓN

La osmorregulación se entiende como la capacidad de las células para ajustar el contenido total de sus solutos intracelulares con respecto al medio (Blomberg & Adler, 1992).

La osmorregulación es el mecanismo general por el cual los microorganismos contrarrestan los efectos de la deshidratación, provocada por la composición de los diversos solutos externos. Se lleva a cabo mediante la exclusión de los solutos estresantes y/o por la compensación del potencial hídrico a través de la acumulación de una o mas especies de solutos denominados solutos compatibles (Brown & Simpson, 1972) u osmolitos (Yancey, *et al.* 1982). Estos compuestos pueden ser acumulados mediante producción endógena o por la toma de estos desde el medio extracelular, y además no provocan una inhibición o inactivación enzimática (Brown, 1976, 1978). Lo anterior da lugar a procesos celulares que operan a bajos potenciales hídricos sin el requerimiento de

modificaciones estructurales de enzimas celulares o estructuras particulares.

Algunos solutos compatibles, también llamados osmoprotectores, no solo son altamente inocuos a la estructura y función de las proteínas, sino que además disminuyen muchos de los efectos inhibitorios de una fuerza iónica alta (Yancey *et al.* 1982). Solo un limitado número de compuestos son usados como solutos compatibles. Estos compuestos pueden dividirse en 4 grupos principales: a) polihidroxi-alcoholes, b) aminoácidos y derivados de estos, c) urea y metilaminas y d) iones inorgánicos (Yancey *et al.* 1982).

Tabla 1.- Distribución de Osmolitos en distintos organismos (Yancey, *et al.* 1982).

Organismo	Principales osmolitos
A) polioles	
Cianobacterias <i>Synechococcus</i> sp.	Glucosil-glicerol
Hongos <i>Saccharomyces rouxii</i> <i>Asteromyces cruciatus</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>	Arabinitol Arabinitol, glicerol, manitol Arabinitol, Glicerol
Líquenes <i>Lichina pigmeae</i>	Manosido-manitol
Algas unicelulares <i>Dunaliella</i> spp. <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glicerol Sacarosa
Algas multicelulares <i>Fucus</i> spp.	Manitol
Plantas vasculares <i>Gossypium hirsutum</i>	Glucosa, fructosa, sacarosa
Insectos (tolerantes o resistentes a congelamiento) <i>Eurosta solidaginis</i> (Diptera) <i>Bracon cephi</i> (Hymenoptera)	Glicerol, sorbitol Glicerol

Crustáceos <i>Artemia salina</i>	Glicerol, trealosa
B) aminoácidos y derivados de aminoácidos	
Eubacteria <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Streptococcus faecalis</i>	Ácido glutámico Ácido glutámico Ácido γ -aminobutírico
Protozoa <i>Miemiensis avidus</i>	Glicina, alanina, prolina
Plantas vasculares <i>Spartina townsendii</i> <i>Atriplex spongiosa</i> <i>Aster tripolium</i>	Betaina Betaina Prolina
Ciclostomos <i>Myxine glutinosa</i>	Ácido glutámico y otros aminoácidos
Anfibios <i>Bufo marinus</i>	Ácido glutámico y otros aminoácidos
C) Urea y metilaminas	
Celacantos <i>Latimeria chalumnae</i>	Urea y metilaminas
Moluscos <i>Bulimulus dealbatus</i>	Urea y metilaminas
Anfibios <i>Scaphiopus couchi</i>	Urea y metilaminas
D) iones inorgánicos	
Arqueobacterias <i>Halobacterium spp</i>	K ⁺

Como se muestra en la Tabla 1 dentro de los aminoácidos el ácido glutámico ha sido identificado como un metabolito osmoprotector en varios organismos.

En bacterias que crecen a un bajo potencial hídrico la concentración citoplásmica de ácido glutámico se eleva. Se propone que este metabolito estaría actuando como un ión compatible con el K^+ , el cual también se acumula bajo estas condiciones (Measures, 1975; Csonka, 1989). La biosíntesis de L-glutamato se debe a la presencia de dos vías metabólicas demostradas en bacterias, levaduras, hongos y algunas plantas superiores. La biosíntesis de L-glutamato está íntimamente asociada con la asimilación de nitrógeno en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Measures, 1975; Csonka, 1989). Las reacciones están catalizadas por las enzimas GDH-NADPH dependiente (E.C. 1.4.1.4) y GOGAT (E.C. 1.4.1.14), denominadas glutamato deshidrogenasa y glutamato sintasa, respectivamente (ver Figura 2).

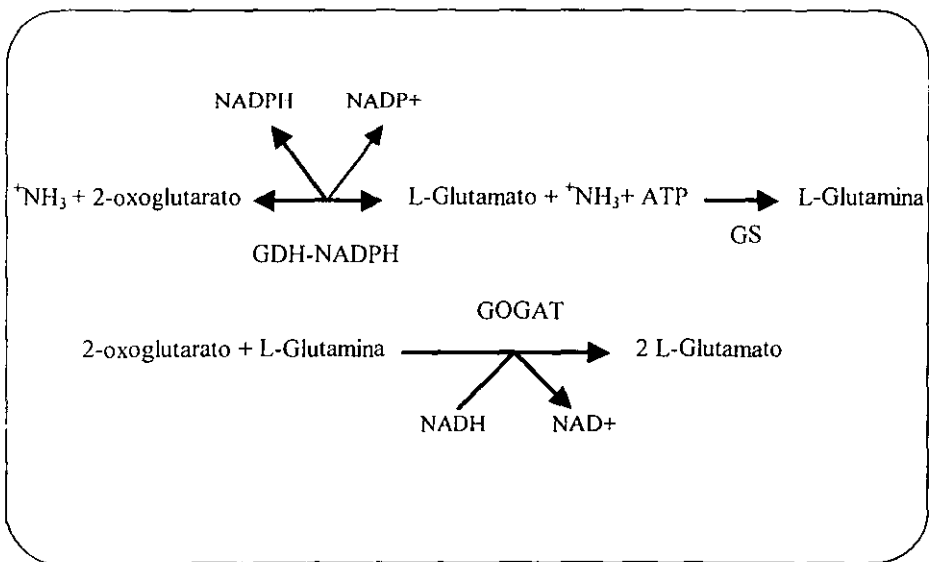


Figura 2.- Metabolismo del glutamato. La enzima GDH cataliza la reacción reversible de síntesis de glutamato a partir de amonio y 2-oxoglutarato. La enzima GS lleva a cabo la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio con el gasto de una molécula de ATP. Por último la enzima GOGAT a partir de una mol de glutamina y una mol de 2-oxoglutarato sintetiza dos moles de glutamato

En células que crecen a bajos potenciales hídricos se lleva a cabo una acumulación de L-glutamato mediante el incremento de su síntesis. Csonka (1989), ha demostrado que en mutantes de *S. typhimurium* deficientes en GOGAT que crecen bajo condiciones limitantes de amonio, existe una relación inversa entre la tasa de crecimiento y la osmolaridad del medio de cultivo. Este resultado es una evidencia indirecta de que el incremento en la síntesis de L-glutamato es necesaria para el crecimiento óptimo en condiciones de estrés osmótico (Csonka & Hansen, 1991). La actividad de GDH *in vitro* es estimulada por K⁺ (Measures, 1975) lo cual ha sido interpretado como una de las posibles causas del incremento de los niveles de glutamato en cultivos creciendo en condiciones de alta osmolaridad.

Debaryomyces hansenii

D. hansenii pertenece al *Phylum* Ascomycota, Orden *Saccharomycetales*, Familia *Saccharomycetaceae*. Los *Saccharomycetales* se caracterizan por la ausencia de una hifa ascógena y de ascocarpo. Las ascas de estos hongos son de pared delgada y liberan sus ascosporas mediante una ruptura eventual de la pared, muy pocas especies poseen una región especializada para la liberación de las ascosporas. La plasmogamia ocurre mediante la fusión de las células, no hay una fase dicariótica, ya que la cariogamia ocurre inmediatamente después de la plasmogamia. Sin embargo un estado diploide puede persistir en algunas especies con células que se multiplican por gemación. El cigoto, derivado de la unión de dos células o por partenogénesis, puede transformarse directamente en una asca (Figura 3).

La Familia *Saccharomycetaceae* incluye levaduras que 1) predominantemente son unicelulares y pueden producir un pseudomicelio, 2) su reproducción es principalmente asexual mediante gemación, y 3) producen ascosporas en ascas libres que se pueden originar por un cigoto o mediante partenogénesis por una célula somática única (Figura 3).

La familia incluye varios géneros, algunos de importancia económica como *Saccharomyces*, utilizada en la fermentación de azúcares para producción de vinos y cervezas, entre otras aplicaciones; algunas cepas del género *Kluyveromyces* producen enzimas que son utilizadas para remover lactosa de productos lácteos, varias especies del género *Pichia* son utilizadas en la industria alimenticia para la producción de proteína unicelular como alimento para ganado, especies del género *Dekkera* son utilizadas para la fermentación de azúcares para producción de vinos y

cervezas, otros géneros de esta familia tal como *Candida* pueden provocar enfermedades en el hombre (Alexopoulos *et al.* 1996).

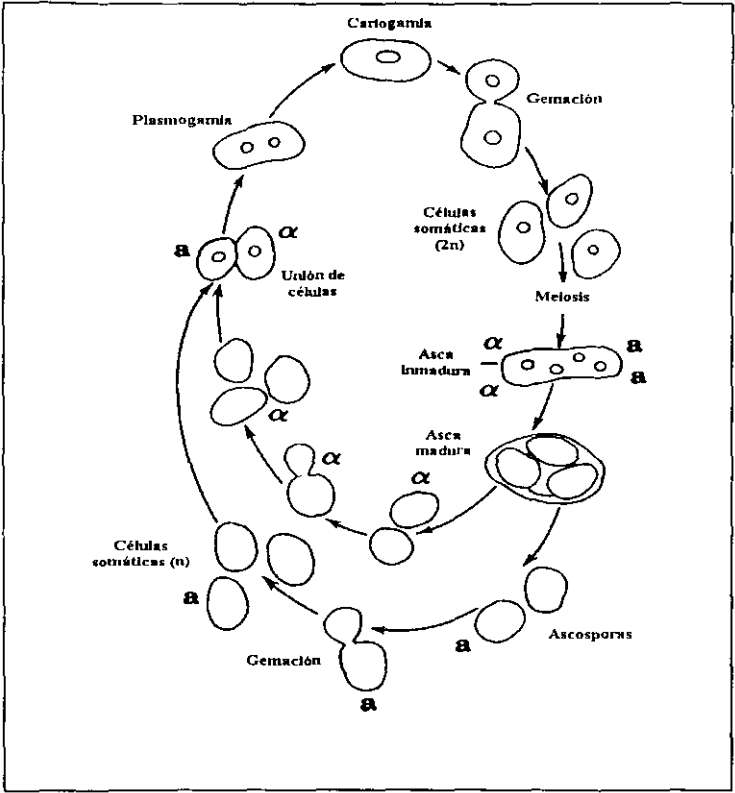


Figura 3.- Ciclo de vida típico de los miembros de la familia Saccharomycetaceae (Alexopoulos *et al.* 1996).

D. hansenii es una levadura que ha sido aislada de diversos ambientes salinos tales como agua marina, fábricas de sal, quesos y carnes frías. Es uno de los pocos microorganismos eucarióticos que toleran amplios rangos de concentración de sales (Norkrans, & Kylin 1969). Es una levadura osmotolerante que crece en medios de cultivo a concentraciones de 0 hasta 4M de NaCl (Onishi, 1963; Norkrans, 1969).

Cuando *D. hansenii* es sometida a estrés salino por el aumento en la concentración de NaCl en el medio, se presenta un decremento en la concentración intracelular de K⁺ y un incremento de Na⁺ (Norkrans & Kylin 1969). Prista, *et al.* (1997) proponen que *D. hansenii* es poco sensible al incremento de las concentraciones intracelulares de Na⁺, es decir que el Na⁺ no es tóxico para *D. hansenii*. Proponen también que el Na⁺ sustituye parcialmente al K⁺ cuando éste es escaso, dentro de un intervalo de concentraciones de NaCl en el medio, restaurando de esta manera la tasa de crecimiento; y que el transporte de K⁺ es favorecido por la presencia de Na⁺ (Prista *et al.* 1997); sin embargo los niveles intracelulares de sales son insuficientes para balancear el potencial hídrico del medio (Norkrans & Kylin, 1969), además se sabe que *D. hansenii* produce y acumula, como principales solutos compatibles, glicerol durante la fase de crecimiento exponencial y arabinitol durante la fase de crecimiento estacionaria (Adler & Gustafsson 1980).

En *Saccharomyces cerevisiae*, la evidencia bioquímica indica que el glicerol es formado a partir de dihidroxiacetona fosfato, la cual, como primer paso, es reducida por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (GPD, EC 1.1.1.8) (Gancedo, *et al.* 1968). Esta reacción produce glicerol-3-fosfato, el cual es subsecuentemente defosforilado por una fosfatasa específica para formar glicerol (Tsuboi & Hudson, 1956). La misma vía es responsable de la formación de glicerol en *Zygosaccharomyces rouxii* y *Debaryomyces hansenii* como lo indican los estudios enzimáticos llevados a cabo en estas levaduras (Edgley & brown, 1983; Adler, *et al.* 1985; Nilsson & Adler, 1990).

El glicerol es el producto final obligatorio cuando las levaduras fermentan glucosa a etanol. La producción de etanol a partir de glucosa

es señaladamente un proceso redox, donde la biosíntesis del material celular es consecuencia de un proceso oxidativo. Para mantener el balance redox la dihidroxiacetona fosfato es reducida a glicerol (Lagunas & Gancedo, 1973). El crecimiento en glicerol como única fuente de carbono fue demostrado en el 89% de las 469 cepas de levaduras descritas por Barnett, *et al.* (1983).

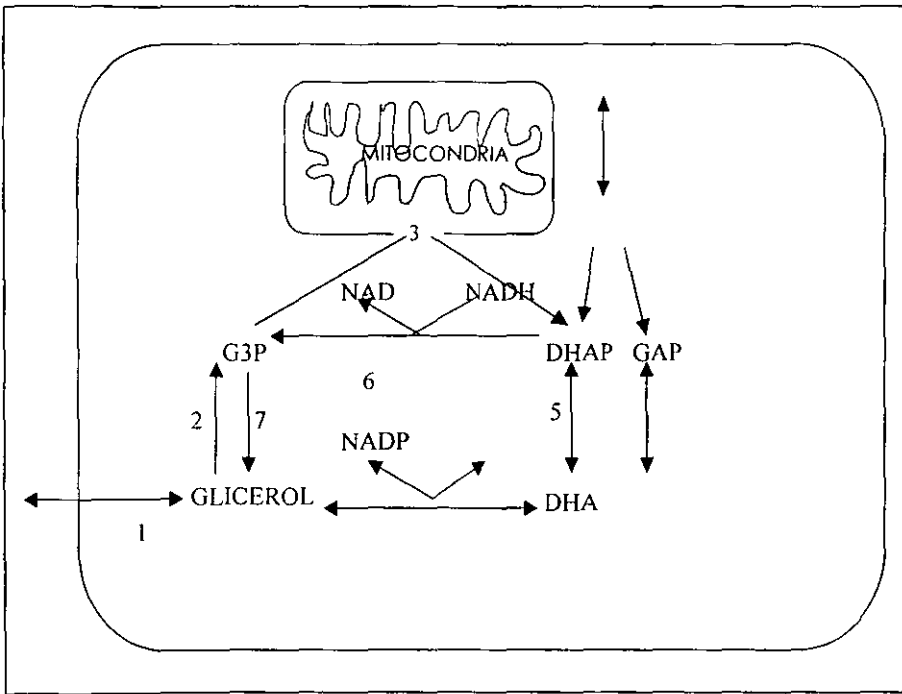


FIGURA 4.- Esquema del metabolismo de glicerol en *Debaryomyces hansenii*. (1) proteína (s) de transporte de glicerol; (2) glicerol cinasa; (3) glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial; (4) glicerol deshidrogenasa; (5) DHA cinasa; (6) glicerol 3 fosfato deshidrogenasa dependiente de NADH; Y (7) fosfatasa. DHAP, dihidroxiacetona fosfato; GAP, gliceraldehido 3 fosfato (Adler, *et al.* 1985).

Mediante el aislamiento de mutantes defectivas en la utilización del glicerol, Adler, *et al.* (1985) mostraron evidencia bioquímica acerca de la utilización de glicerol por *D. hansenii*, esta involucra la fosforilación por una

glicerolcínasa (EC2.7.1.30) seguida por una oxidación por la GPD mitocondrial (EC1.1.99.5) a dihidroxiacetona fosfato. Una segunda vía involucra la oxidación del glicerol a dihidroxiacetona por la glicerol deshidrogenasa, seguida de una fosforilación por la dihidroxiacetona cinasa a dihidroxiacetona fosfato (Figura 4).

OBJETIVOS

Determinar el medio mínimo (MM) para el crecimiento óptimo de la levadura marina osmotolerante *D. hansenii*, tanto en ausencia como en presencia de NaCl 1M y determinar su tiempo de duplicación.

Determinar la actividad específica de las enzimas Glutamato deshidrogenasa y Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y mostrar su posible relación con la respuesta a un cambio en la osmolaridad del medio de cultivo en la levadura *D. hansenii*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas

Se utilizó la cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* S288C como referencia para el estudio sistemático, y la cepa silvestre Y7426 (U.S. Department of Agriculture, Peoria, Ill.) de *Debaryomyces hansenii* donada por la Dra. Alicia González y el Dr. Antonio Peña del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Medios de cultivo

En la Tabla 2 se muestran los medios de cultivo utilizados en el estudio sistemático y en las determinaciones de actividad específica.

Condiciones de crecimiento

Se siembran en cajas Petri con YPD y YPD + NaCl 1 M a las cepas de *S. cerevisiae* S288C y *D. hansenii* respectivamente. Se cultivan en incubadora durante 2 ó 3 días a 30 °C y se toman colonias aisladas para inocularlas en el precultivo consistente en YPD NaCl 0 y 1 M líquido para *S. cerevisiae* y *D. hansenii* respectivamente. Una vez crecidas se centrifugan a 3,000 rpm durante 10 minutos; se lavan las células 2 veces con agua desionizada y se inoculan los medios de cultivo experimentales a una densidad óptica D.O. _{600nm} de 0.05. Las células se crecen a 30 °C a 250 rpm de agitación. El crecimiento se monitorea midiendo la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Zeiss PM QII cada tres horas hasta las primeras horas de la fase estacionaria.

Los tiempos de duplicación se obtienen durante la fase de crecimiento exponencial tomando el tiempo medio que tarda la levadura en pasar de una D.O. _{600nm} determinada al doble de su valor; de esta

manera si la D.O. $_{600nm}$ es de 0.5 a las 9 hrs. de crecimiento y de 1.0 a las 12 hrs el tiempo de duplicación es de 3 hrs. aproximadamente.

Tabla 2.- Medios de Cultivo

Medio	**Fuente de Carbono	***Fuente de nitrógeno	****Sales adicionales
*Medio rico (YPD)	Glucosa	Peptona	Ausentes
Medio Mínimo (MM)	Glucosa	Sulfato de Amonio	Ausentes
Medio Mínimo Dh (MMDh)	Glucosa	Sulfato de Amonio	Presentes
Medio SNAsn	Glucosa	Asparagina	Ausentes
Medio SNAsnDh	Glucosa	Asparagina	Presentes
Medio S/C,NGlicAsnDh	Glicerol	Asparagina	Presentes
Medio S/C,NsorbAsnDh	Sorbitol	Asparagina	Presentes

Para todos los medios de cultivo las concentraciones de vitaminas, elementos traza y sales según la fórmula de Difco Yeast Base.

*El medio rico (YPD) se preparó con extracto de Levadura 1%, peptona de caseína 2% y dextrosa 2%. este medio se utilizó para el crecimiento de precultivos.

**La concentración de glucosa es 55.5mM, la de glicerol y sorbitol es 111mM, esto para igualar el número de moléculas de carbono en el medio.

***La concentración de asparagina es 7.5mM, la de sulfato de amonio 40 mM.

****Las sales adicionales y sus concentraciones son las reportadas por Norkrans (1969) para el crecimiento de *D. hansenii* (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , K_2SO_4 y Na_2SO_4)

Obtención de extractos crudos de proteína total:

Los precultivos se obtienen de la misma manera que se describe en condiciones de crecimiento.

Se inocula la levadura *D. hansenii* en 500 ml de medio de cultivo a una D.O. $_{600nm}$ de 0.05. Las células se cosechan en fase de crecimiento exponencial entre 0.8 y 1.0 de D.O. $_{600nm}$ y se centrifugan a 3,000 rpm durante 10 min. Se lavan con H₂O desionizada y la pastilla celular se recupera y se resuspende en el amortiguador de extracción adecuado para cada ensayo enzimático. El extracto celular se obtiene con seis pulsos de agitación de un minuto cada uno en un vórtex utilizando perlas de vidrio Sigma para lisis de levaduras de 0.7-1.18 mm de diámetro. La suspensión se transfiere a un tubo Eppendorf y se centrifuga a 15,000 rpm durante 10 min y se recupera el sobrenadante. Los extractos se mantienen a 4°C todo el tiempo.

Cuantificación de proteína:

Se realiza con una variación del método descrito por Lowry (1951). Las soluciones utilizadas son:

- A.- Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1 N
- B.- Tartrato de Sodio y Potasio al 2% en H₂O
- C.- Sulfato cúprico al 1% en H₂O
- D.- Reactivo de Folin 1 N
- E.- Albúmina de suero bovino 1 µg/µl (ASB)

Se prepara una solución ABC a las siguientes concentraciones: A=98%, B=1%, C=1%

Los extractos crudos de proteína se diluyen entre 1:5 y 1:100 con agua desionizada a un volumen final de 1 ml, posteriormente se tratan con la solución ABC por 10 min y al terminar, se adicionan 0.5 ml del reactivo de Folin para colorear la reacción. Al mismo tiempo se realiza una curva patrón utilizando albúmina de suero bovino con concentraciones de proteína de 50, 100 y 200 µg/µl.

Las muestras experimentales y de la curva patrón se leen en un espectrofotómetro Zeiss PM QII a 625 nm. En la figura 5 se muestra la gráfica de la curva patrón obtenida.

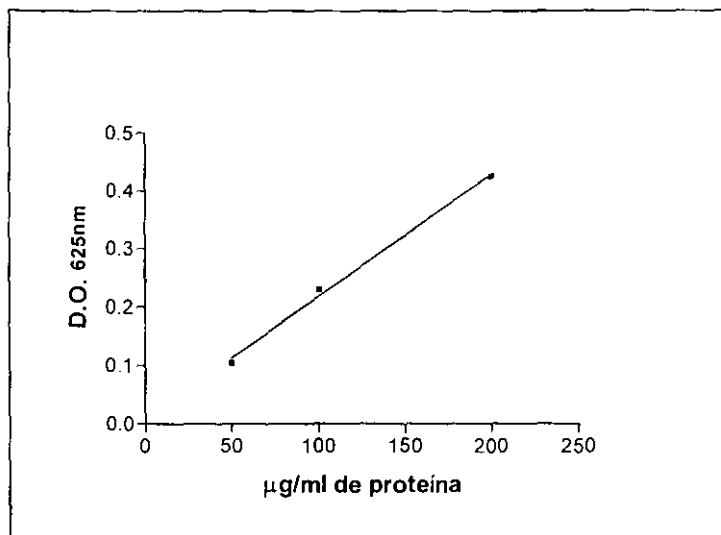


Fig. 5.- Curva patrón de concentración de proteína determinada con concentraciones crecientes de Albúmina de suero bovino. Esta curva es una referencia para la cuantificación de la proteína total en los extractos experimentales.

Determinación de la actividad específica de la enzima Glutamato Deshidrogenasa biosintética dependiente de NADPH (GDH-NADPH) (Doherty, 1970).

Se preparan extractos crudos de proteína total cuyo amortiguador contiene:

Amortiguador de fosfatos de potasio 0.1M pH 7.4
EDTA 1.0mM
DTT 1.0mM
PMSF 1.0mM

El coctel para ensayo de actividad contiene:

Amortiguador de fosfato de potasio 1M pH 7.4
 2-oxoglutarato 0.1M
 NH₄Cl 1M
 NADPH 0.15mM

De cada una de estas soluciones se toma el volúmen señalado para elaborar 3 diferentes cocteles: completo, sin 2-oxoglutarato y sin +NH₄Cl.

Cocteles	Completo	- 2-oxoglutarato	- +NH ₄ Cl
Amortiguador de Fosfatos	3 ml	3 ml	3 ml
2-oxoglutarato	900 µl	-	900 µl
NH ₄ Cl	1.5 ml	1.5 ml	-
Agua bidestilada	24 ml	24.9 ml	25.5 ml

Se añaden 3.2 mg de NADPH a cada coctel al momento de iniciar la reacción. La actividad de GDH-NADPH dependiente se mide en el coctel completo y en los dos controles (- 2 oxoglutarato y - +NH₄Cl). Se coloca 1 ml de coctel en una celda y se inicia la reacción añadiendo diferentes concentraciones del extracto crudo de proteínas, se mide la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-64 cada 20 segundos durante 3 minutos, los datos se grafican y se calcula la pendiente y la actividad específica por minuto con la siguiente formula:

$$A.E.=m/6.22/alícuota \text{ ml del extracto crudo}/mg \text{ proteína total}$$

donde **m** es la pendiente, **6.22** es el coeficiente de extinción molar del NADPH 1% a 1 cm de paso, la **alícuota** son los ml de extracto crudo de proteína utilizado para cada ensayo y **mg** de proteína es la concentración de proteína total del extracto crudo en cuestión.

La actividad específica se expresa en micromolas de sustrato utilizado por minuto por miligramo de proteína (µmol/min/mg proteína)

Determinación de la Actividad Específica de la enzima Glicerol-3-fosfato Deshidrogenasa dependiente de NADH (GPD-NADH) (Adler, et. al. 1985)

Se preparan extractos crudos de proteína total cuyo amortiguador contiene:

Tris-HCl 50mM pH 7.5

El coctel para ensayo de actividad contiene:

Amortiguador de Imidazol-HCl 20mM pH 7.5

DTT 1mM

MgCl₂ 1mM

NaCl 200 mM

Dihidroxiacetona fosfato (DHAP) 1mM

NADH 0.09mM

Para obtener las concentraciones descritas anteriormente se realiza lo siguiente: a 30 ml del amortiguador imidazol-HCl se le agregan 4.6 mg de DTT, 6.1 mg de MgCl₂ y 350.6 mg de NaCl. Al coctel completo se le añaden 5.1 mg de DHAP. Se agregan 2.0 mg de NADH al momento de determinar la reacción.

Cocteles	Completo	- DHAP
Amortiguador imidazol-HCl	30 ml	30 ml
DHAP	5.1 mg	-
DTT	4.6 mg	4.6 mg
MgCl ₂	6.1 mg	6.1 mg
NaCl	350.6 mg	350.6 mg

Se mide la actividad de GPD-NADH dependiente en el coctel completo y en el control (- DHAP). Se coloca 1 ml de coctel en una celda y se inicia la reacción añadiendo diferentes concentraciones del extracto crudo de proteínas, se mide la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-64 cada 20 segundos durante 3 minutos,

los datos se grafican y se calcula la pendiente y la actividad específica por minuto de la misma manera que la A. E. de GDH

La actividad específica es expresada en micromolas de sustrato utilizado por minuto por miligramo de proteína ($\mu\text{molas}/\text{min}/\text{mg}$ proteína). La adición de DTT, MgCl_2 y NaCl incrementan la actividad enzimática y mejoran la reproducibilidad del ensayo (Adler, et. al. 1985).

Para las curvas de actividad específica de la enzima GPD-NADH contra tiempo se parte de 1.2 litros de medio de cultivo y se realizan extractos de proteína total de 300 ml de medio para cada uno de los tiempos indicados. La A.E. se determina de la misma forma como se detalló arriba.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO ÓPTIMO DE *Debaryomyces hansenii*.

Con el fin de establecer un medio mínimo de cultivo para el crecimiento óptimo de nuestra levadura en ausencia y presencia de NaCl, se realizó un estudio sistemático tomando como referencia a la cepa S288C de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En la Figura 6 se muestra la comparación entre el crecimiento de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* en medio mínimo comercial (Difco yeast base, reportado para el crecimiento de levaduras).

Los tiempos de duplicación para *D. hansenii* muestran valores de 8 y 7 hrs con NaCl 0 y 1M respectivamente (ver Figura 6 y Tabla 3), lo cual sugiere que el medio de cultivo probado parece no ser el óptimo para el crecimiento de *D. hansenii* ya que los tiempos de duplicación son muy largos. Sin embargo vemos que no hay diferencias entre su crecimiento con o sin NaCl lo cual sugiere que la sal no es tóxica para esta levadura a la concentración ensayada, confirmando el reporte de Prista, *et al.* (1997). Para *S. cerevisiae* los tiempos de duplicación son de 2 y 5.2 hrs con NaCl 0 y 1M respectivamente, con lo cual podemos inferir que para esta levadura, a la concentración ensayada, la sal es tóxica ya que en presencia de NaCl 1M su crecimiento se ve disminuido considerablemente con respecto a la ausencia de sal (ver Tabla 3).

Revisando la literatura encontramos que Norkrans (1969) tiene reportadas modificaciones en algunos de los componentes y concentraciones del medio de cultivo (ver materiales y métodos, Tabla 2)

con lo cual nos dimos a la tarea de modificar estos componentes en el MM. A este nuevo medio de cultivo lo denominamos MMDh.

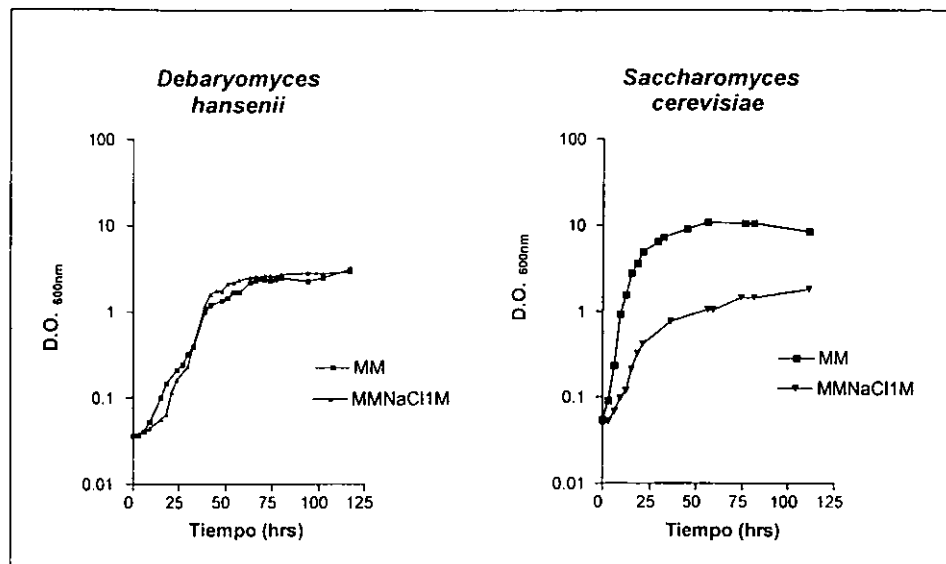


Figura 6.- Curvas de crecimiento de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* en medio mínimo para crecimiento de levaduras. *D. hansenii* crece lentamente (tiempo de duplicación de 8 y 7 hrs con y sin NaCl 1M respectivamente) y no alcanza valores altos de crecimiento (comparar escalas de D.O. en ambas gráficas); cabe mencionar que el crecimiento de *D. hansenii* es similar en presencia y ausencia de sal, mientras que *S. cerevisiae* ve afectado su crecimiento en presencia de 1M de NaCl.

En la Figura 7 se observa que cuando se crece en MMDh un cultivo de *D. hansenii*, su velocidad de crecimiento se incrementa, el tiempo de duplicación sin NaCl disminuye a 4.8 hrs y lo mismo ocurre con NaCl 1M que disminuye a 4 hrs (ver Tabla 3); estos resultados señalan que *D. hansenii* necesita de condiciones adicionales para su crecimiento óptimo que no son las mismas requeridas por *S. cerevisiae*.

S. cerevisiae no muestra diferencias significativas en los tiempos de duplicación entre el MMDh y el MM con y sin sal (ver Figura 7 y Tabla 3).

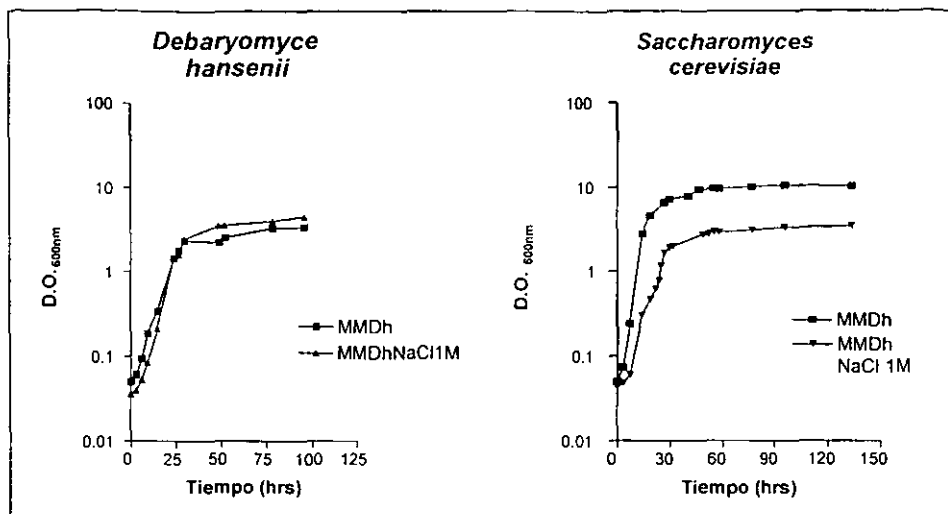


Figura 7.- Curva de crecimiento en medio mínimo modificado (MMDh) para el crecimiento de *D. hansenii*. Los tiempos de duplicación se redujeron en esta cepa osmotolerante a 4.8 y 4 hrs con 0 y 1 M de NaCl respectivamente. El crecimiento aumentó notoriamente con respecto al MM lo cual demuestra que las sales adicionales que posee este medio (ver Materiales y Métodos) contribuyen a un mejor crecimiento. Para *S. cerevisiae* no se encontraron cambios con respecto al MM.

Se probaron diferentes fuentes de nitrógeno alternativas al sulfato de amonio para el crecimiento de esta levadura (datos no mostrados), entre las cuales la asparagina y el ácido glutámico mostraron los mejores resultados. De estos dos aminoácidos elegimos para posteriores estudios a la asparagina debido a que el ácido glutámico, utilizado en altas concentraciones, se comporta como un inhibidor de la actividad específica de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH-NADPH dependiente) en una inhibición por producto (Folkes & Sims, 1974). Este medio de cultivo se denominó SNAsn.

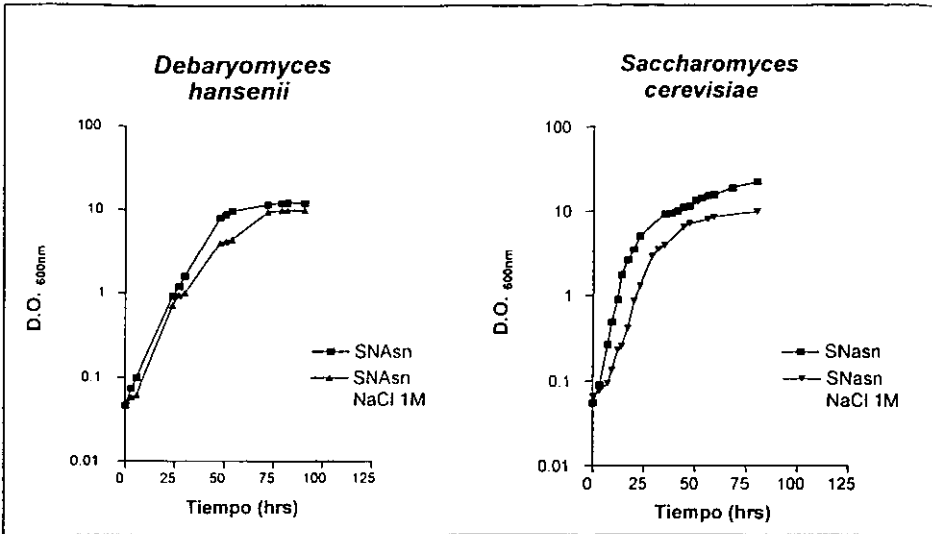


Figura 8.- Curva de crecimiento en el medio SNAsn el cual contiene como fuente de nitrógeno la asparagina. Los tiempos de duplicación para *D. hansenii* son de 5 y 4.5 hrs con 0 y 1 M de NaCl respectivamente, para *S. cerevisiae* son de 2.9 y 4.3 hrs con 0 y 1 M de NaCl respectivamente, no se observan diferencias significativas con respecto a los medios anteriormente probados.

En la Figura 8 se muestra la curva de crecimiento de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* en el medio de cultivo SNAsn. Los tiempos de duplicación de *D. hansenii* son de 5 hrs en ausencia de NaCl y de 4.5 hrs en presencia de NaCl 1M. Los tiempos de duplicación son menores en comparación al MM (ver Figura 6 y Tabla 3), sin embargo no hay diferencias significativas con los tiempos de duplicación obtenidos en el MMDh (ver Figura 7 y Tabla 3). Además se puede observar que el crecimiento medido como la biomasa (o concentración celular en el medio de cultivo) es mayor en este medio de cultivo que en los anteriores (MM y MMDh) (ver escalas de D.O. en las figuras 6, 7 y 8) lo cual señala que esta levadura puede asimilar bien la asparagina y utilizarla como fuente de nitrógeno. Los tiempos de duplicación de *S. cerevisiae* en SNAsn no muestran variaciones significativas con respecto al MM y al MMDh con y sin sal (ver Tabla 3 y

Figuras 6 y 7) mostrando valores de 2.9 y 4.3 hrs con 0 y 1M de NaCl respectivamente.

Tabla 3.- Tiempos de duplicación y duración de fase lag de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* en los medios indicados.

Medio de cultivo	[NaCl]	<i>D. hansenii</i>		<i>S. cerevisiae</i> S288C	
		Tiempo de duplicación (hrs)	Fase Lag (hr)	Tiempo de duplicación (hrs)	Fase Lag (hr)
MM	0M	8	12	2	3
	1M	7	18	5.2	6
MMDh	0M	4.8	3	2	3
	1M	4	5	4.5	6
SNAsn	0M	5	6	2.9	3
	1M	4.5	4.5	4.3	6
SNAsnDh	0M	4	6	2.8	3
	1M	4	4.5	3.6	6
S/C,NGlicAsnDh	0M	6.5	12	8	24
	1M	6	9	8.8	27
S/C,NSorbAsnDh	0M	5	7.5	6	21
	1M	5	9	7	24

Una vez que se estableció que en *D. hansenii* el aporte de nitrógeno puede ser dado por la asparagina, decidimos evaluar si las sales de potasio reportadas por Norkrans (1969) podrían tener una participación directa en el crecimiento de esta levadura por lo cual se adicionaron éstas en el medio de cultivo, este medio de cultivo se denominó SNAsnDh. Para *D. hansenii* no encontramos diferencias en los tiempos de duplicación siendo de 4 hrs con 0 y 1M de NaCl (ver Figura 9 y Tabla 3), además se vuelve a observar un incremento en la biomasa en este medio de cultivo comparado con el MM y el MMDh (ver escalas de D.O. en las figuras 6, 7 y 9). En este medio de cultivo encontramos la mayor velocidad de

crecimiento de las condiciones probadas y por lo tanto es el que se ocupó en la determinación de actividad específica de las enzimas GDH-NADPH dependiente y GPD-NADH dependiente.

Para *S. cerevisiae* los tiempos de duplicación son de 2.8 hrs y 3.6 hrs con NaCl 0 y 1M respectivamente. Se observa tanto un mejor crecimiento como una disminución en el tiempo de duplicación en presencia de NaCl 1M en este medio de cultivo, con respecto a los anteriores medios de cultivo probados (ver Tabla 3). Estos resultados sugieren que la asparagina y las sales de potasio contribuyen para un mejor crecimiento tanto de *D. hansenii* como de *S. cerevisiae*.

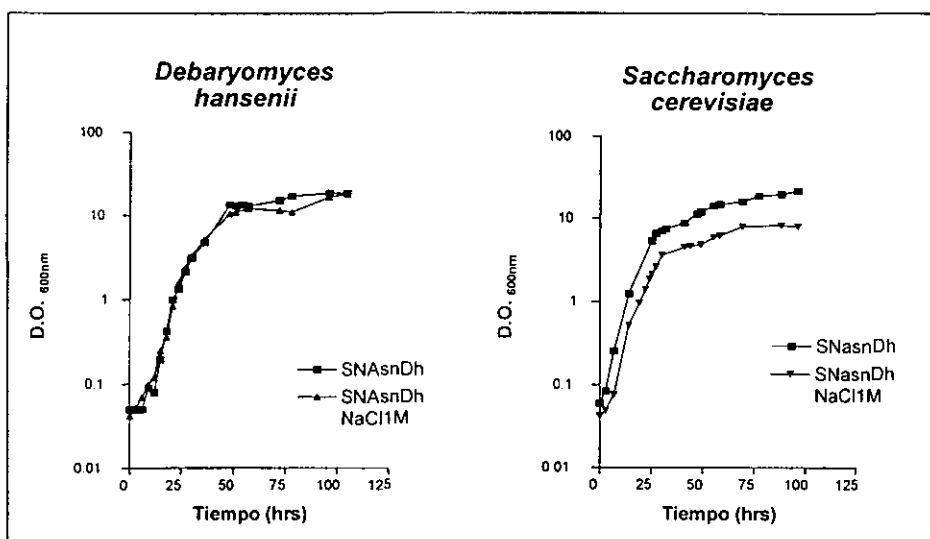


Figura 9.- Curva de crecimiento en el medio mínimo modificado para el crecimiento de *D. hansenii* con asparagina como fuente de nitrógeno (SNAsnDh). Las curvas de crecimiento son idénticas para *D. hansenii*, los tiempos de duplicación disminuyen a 4 hrs en ambas condiciones, siendo este el mejor medio probado. Para *S. cerevisiae* los tiempos de duplicación son de 2.8 hrs sin NaCl y de 3.6 hrs con 1 M de NaCl.

Por último se utilizó glicerol (Figura 10) y sorbitol (Figura 11) en el medio SNA_sDh como fuentes de carbono alternativas a la glucosa en presencia y ausencia de NaCl 1M, a estos medios los denominamos S/C,NGlicAsnDh y S/C,NSorbAsnDh respectivamente.

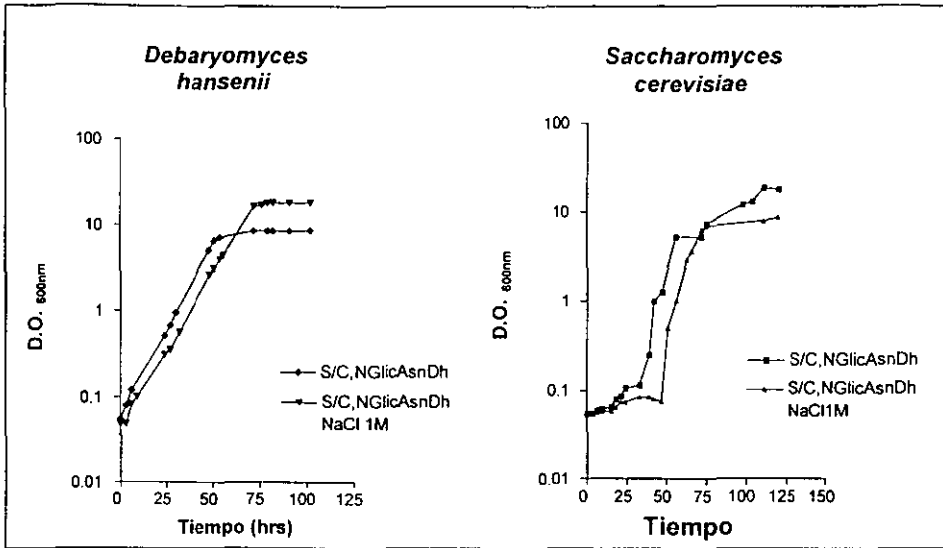


Figura 10.- Curva de crecimiento en el medio mínimo modificado para el crecimiento de *D. hansenii* con glicerol como fuente de carbono alternativa y asparagina como fuente de nitrógeno. Los tiempos de duplicación para *D. hansenii* son de 6.5 y 6 hrs con 0 y 1 M de NaCl respectivamente, mientras que para *S. cerevisiae* son de 8 y 8.8 hrs con una fase lag muy amplia de 24 y 27 hrs con 0 y 1 M de NaCl respectivamente.

Los tiempos de duplicación para *D. hansenii* en glicerol fueron de 6.5 y 6 hrs con 0 y 1 M de NaCl respectivamente; para *S. cerevisiae* en glicerol los tiempos de duplicación fueron de 8 y 8.8 hrs con 0 y 1M de NaCl respectivamente y muestra una fase de crecimiento lag muy amplia de 24 y 27 hrs con 0 y 1 M de NaCl respectivamente (ver Figura 10 y Tabla 3). Se puede notar la lenta adaptabilidad de *S. cerevisiae* para su crecimiento en distintas condiciones ambientales; en contraste a una alta adaptabilidad que presenta *D. hansenii* para su crecimiento en distintas

ambientales, medida como una función del tiempo de duplicación de ambas especies.

El tiempo de duplicación para *D. hansenii* en sorbitol es de 5 hrs para ambas condiciones, mientras que para *S. cerevisiae* es de 6 y 7 hrs con 0 y 1 M de NaCl respectivamente y se vuelve a observar una fase de crecimiento *lag* muy amplia de 21 y 24 hrs con 0 y 1 M de NaCl respectivamente (ver Figura 11 y Tabla 3) lo cual continúa sugiriendo una lenta adaptabilidad de esta levadura a las distintas condiciones ambientales (ver Figuras 8, 9 y 10).

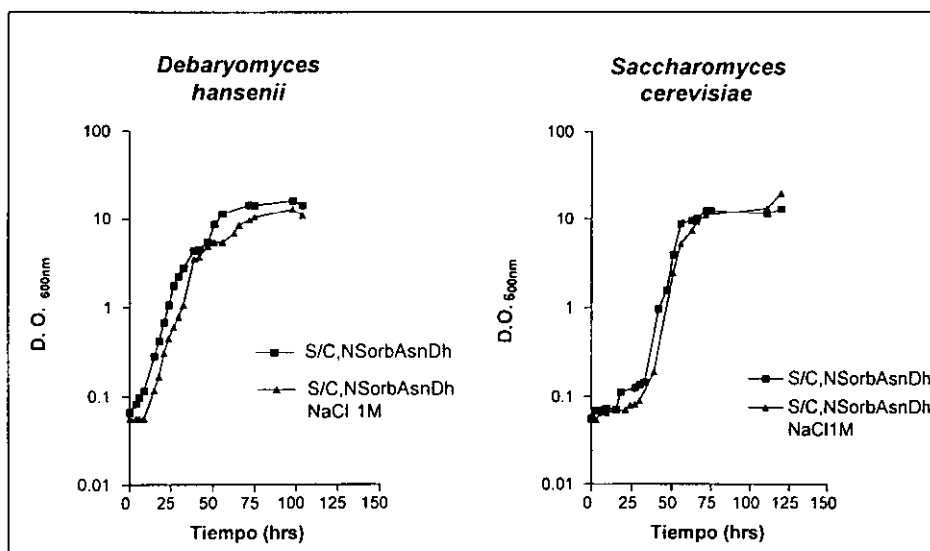


Figura 11.- Curva de crecimiento en el medio mínimo modificado para el crecimiento de *D. hansenii* con sorbitol como fuente de carbono alternativa y asparagina como fuente de nitrógeno. Los Tiempos de duplicación para *D. hansenii* son de 5 hrs en ambas condiciones, mientras que para *S. cerevisiae* son de 6 y 7 hrs con una fase de crecimiento *lag* muy amplia de 21 y 24 hrs con 0 y 1 M de NaCl respectivamente.

Los resultados obtenidos sugieren que *D. hansenii* posee una versatilidad metabólica más amplia que la de *S. cerevisiae*, con respecto a

su crecimiento en distintos medios de cultivo, ya que su crecimiento fué favorable en las distintas condiciones a las que fue sometida. Cabe aclarar que, para *D. hansenii*, las curvas de crecimiento son muy similares cuando se crece en presencia y en ausencia de NaCl 1M; y los tiempos de duplicación, en general, son ligeramente menores cuando se cultiva en presencia de NaCl 1M, señalando a esta cepa como una osmotolerante típica, lo cual sugiere que este microorganismo debe contar con mecanismos particulares que le permiten contender con las concentraciones de sal en el medio. En cambio, encontramos que en todas las condiciones probadas, *S. cerevisiae* ve afectado su crecimiento cuando se cultiva con NaCl 1M.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA GLUTAMATO DESHIDROGENASA DEPENDIENTE DE NADPH (GDH-NADPH).

La enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) está implicada en el metabolismo de compuestos nitrogenados. Esta enzima lleva a cabo la reacción reversible de 2-oxoglutarato a glutamato con la participación de un ión amonio y NADPH (ver Figura 2). Con el fin de estudiar la asimilación de amonio primario por esta levadura, nos dimos a la tarea de medir la actividad específica de la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH (GDH-NADPH) en presencia y ausencia de NaCl 1M en *D. hansenii*. Encontramos que en presencia de NaCl 1M la actividad específica se ve incrementada 4.7 veces, de 0.169 a 0.804 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína total con 0 y 1M de NaCl, respectivamente (ver Figura 12).

En la literatura encontramos que algunos organismos presentan una acumulación de glutamato como respuesta a un estrés osmótico (Yancey *et al.* 1982; Ogahara, *et al.* 1995; Botsford, *et al.* 1994); de esta manera nosotros relacionamos este aumento de 4.7 veces en la actividad

específica de GDH-NADPH en presencia de NaCl 1M como una posible respuesta de osmotolerancia de *D. Hansenii*, dada por la sobreproducción del supuesto osmolito protector, el glutamato.

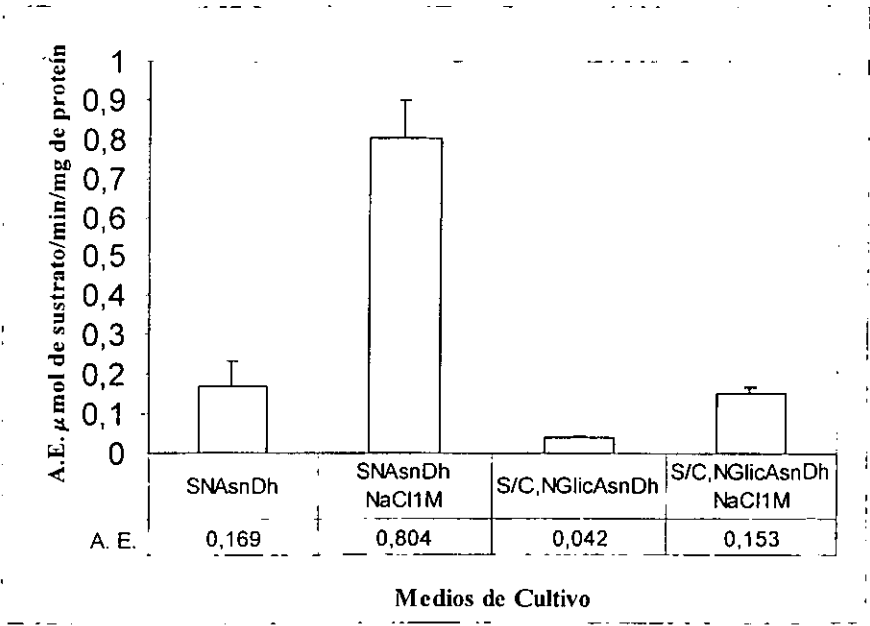


Figura 12.- Determinación de Actividad Específica de la enzima GDH-NADPH dependiente en distintos medios de cultivo.

Por otro lado Gustafsson & Norkrans (1976); Adler & Gustafsson (1980); Adler, et al. (1985), han reportado al glicerol como el principal osmolito protector de *D. hansenii* durante la fase de crecimiento exponencial. En vista de lo anterior decidimos determinar la actividad específica de GDH en células cultivadas en un medio que contiene como fuente de carbono glicerol, esperando que se presente una inhibición de la actividad específica de la enzima GDH-NADPH debida a que el glicerol va a estar penetrando a la célula en grandes cantidades, inhibiendo la posible participación del glutamato como osmoprotector.

Como se esperaba encontramos que en los medios de cultivo que contienen glicerol como fuente de carbono, la actividad específica de GDH-NADPH se ve disminuida, ya que decae a un valor de 0.042 y 0.153 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína total, en ausencia y presencia de NaCl 1M, respectivamente, lo cual podría suponer que es el glicerol el que está actuando como osmoprotector y no el glutamato (ver Figura 12); sin embargo se sigue observando una mayor actividad en presencia de NaCl 1M.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA GLICEROL-3-FOSFATO DESHIDROGENASA NADH DEPENDIENTE (GPD-NADH).

Se ha reportado al glicerol como un osmolito protector en distintos microorganismos, entre ellos a *D. hansenii* (Yancey, *et al.* 1982; Blomberg & Adler, 1985). Con esto nos dimos a la tarea de determinar la actividad específica de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADH (GPD-NADH) en presencia y ausencia de NaCl 1M y como fuentes alternativas de carbono glucosa y glicerol, ya que, al crecer las células en un medio de cultivo que contiene glicerol como fuente de carbono, esperamos encontrar una inhibición en la síntesis de éste y por lo tanto una baja actividad de la enzima GPD-NADH; también esperamos encontrar una mayor actividad en los medios con NaCl. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13.

La actividad específica de GPD-NADH en los medios con glucosa es de 0.026 y 0.031 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína total, con 0 y 1M de NaCl respectivamente (ver Figura 13). Se observa un aumento de 1.19 veces en el medio con NaCl 1M, sin embargo consideramos que no es una diferencia significativa. Por este motivo realizamos un ensayo en el cual

medimos la actividad específica de GPD-NADH en distintos tiempos de la fase de crecimiento exponencial, para ver si durante ésta encontrábamos diferencias significativas (ver Figura 14).

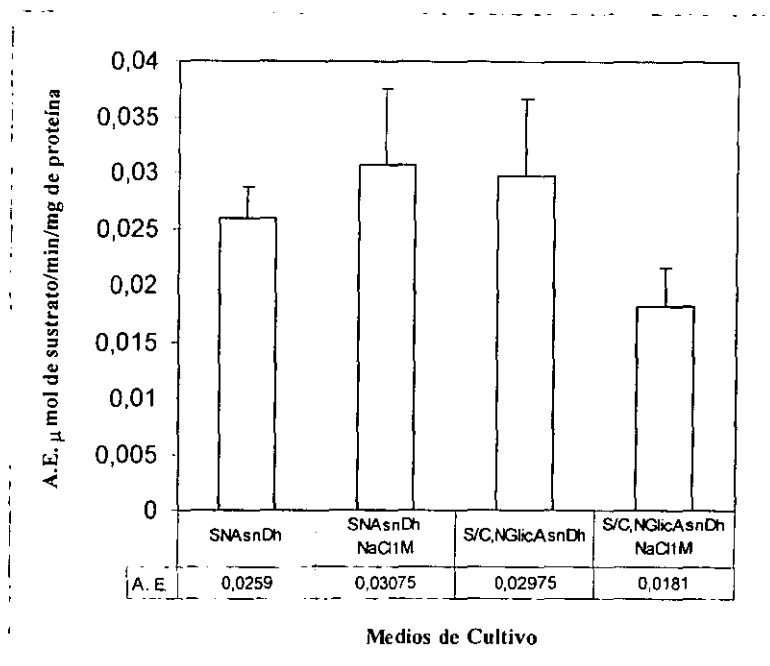


Figura 13.- Determinación de la actividad específica de la enzima GPD en distintos medios de cultivo.

Observamos a las 48 hrs, poco antes de finalizar la fase de crecimiento exponencial, (ver Figura 10) una diferencia de 1.7 veces en la actividad entre los medios con NaCl 1M y sin NaCl. Esta diferencia es significativa, aunque se esperaba una diferencia mayor que manifestara que la síntesis de glicerol, por la vía de GPD, es uno de los mecanismos para contender con el estrés osmótico al que se ven sometidas las células. Por otro lado probablemente la concentración de NaCl probada no es tan alta para que se manifieste como un incremento en la concentración interna de glicerol y por lo tanto en la actividad específica de la enzima en cuestión.

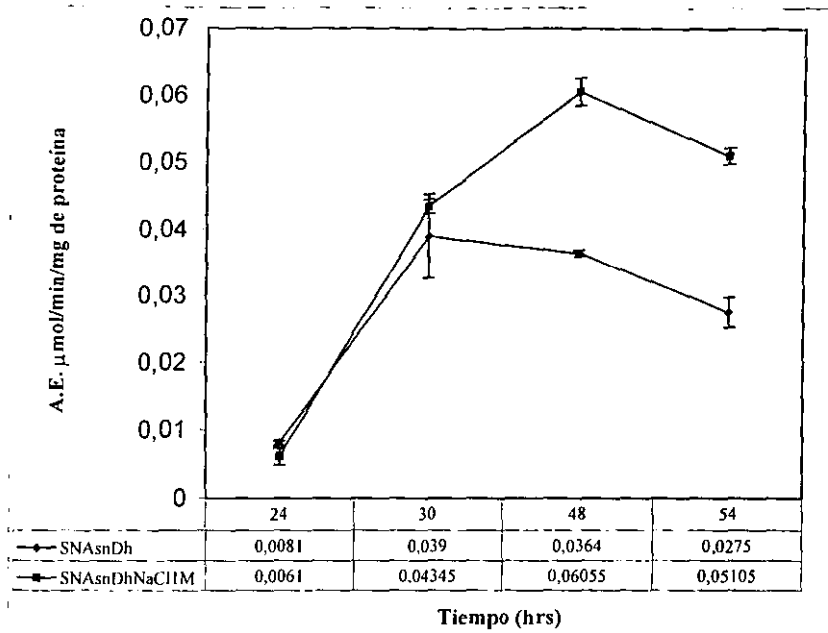


Figura 14.- Determinación de la actividad específica de la enzima GPD en el tiempo.

En los medios con glicerol la actividad específica de GPD-NADH dependiente es de 0.029 y 0.018 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína total, con NaCl 0 y 1 M respectivamente (ver Figura 13). Encontramos que la actividad específica en ausencia de NaCl es mayor en este medio que en el que contiene glucosa como fuente de carbono, sin embargo se esperaba lo contrario. Probablemente la actividad específica detectada es la basal para esta levadura (observar las desviaciones estándar en el medio sin NaCl con glucosa y glicerol en la figura 13), ya que el producto de GPD-NADH, el glicerol-3-fosfato, es un intermediario importante para la síntesis de ácidos fosfatídicos, sustratos esenciales de enzimas involucradas en la síntesis de triacilglicérols y glicerofosfolípidos (Athenstaedt & Daum, 1999).

En el medio con NaCl 1M, como se esperaba, la actividad es menor si la comparamos con la actividad en el medio con glucosa (figura 12), ya que el glicerol que entra a las células por las proteínas transportadoras, es suficiente para contender con la osmolaridad del medio y no se requiere síntesis de glicerol *de novo*.

DISCUSIÓN

La levadura marina *Debaryomyces hansenii* es uno de los pocos microorganismos eucarióticos que toleran amplios rangos de concentración de sales (Norkrans & Kylin, 1969). Es una levadura osmotolerante que crece en medios de cultivo a concentraciones de hasta 4M de NaCl (Onishi, H. 1963; Norkrans 1969).

Se encuentra descrito en la literatura que cuando *D. hansenii* es sometida a estrés salino por el aumento en la concentración de NaCl en el medio, se presenta un decremento en la concentración intracelular de K^+ y un incremento de Na^+ , (Norkrans & Kylin, 1969). Prista, *et al.* (1997) proponen que *D. hansenii* es poco sensible a las concentraciones intracelulares de Na^+ , el cual sustituye parcialmente al K^+ cuando éste es escaso -dentro de un rango de concentraciones de NaCl en el medio- restaurando de esta manera la tasa de crecimiento, y que el transporte de K^+ es favorecido por la presencia de Na^+ (Prista, *et al.* 1997); sin embargo Norkrans & Kylin, (1969) mencionan que los niveles intracelulares de sales no son suficientes para balancear el potencial hídrico del medio.

Las curvas de crecimiento de nuestro estudio sistemático son similares cuando se crece a *D. hansenii* en presencia y en ausencia de NaCl 1M (ver figuras 6 a 11), los tiempos de duplicación, en general, son menores cuando se cultiva con NaCl 1M (ver Tabla 3) lo cual nos indica que la sal no es tóxica para esta levadura a la concentración ensayada, confirmando los estudios de Prista, *et al.* (1997) que señalan a esta levadura como una osmotolerante típica. Por otro lado encontramos que, en todas las condiciones probadas, *S. cerevisiae* ve afectado su crecimiento cuando se cultiva con NaCl 1M (ver figuras 6 a 11).

Encontramos también que el medio de cultivo en el cual obtuvimos el mejor crecimiento de *D. hansenii* fue el denominado SNAsnDh, el cual contiene el aminoácido asparagina como fuente de nitrógeno junto con sales de potasio, ambas condiciones necesarias para el crecimiento óptimo de esta levadura (ver figura 9 y Tabla 3). Esto puede explicarse porque el ión potasio se considera un soluto compatible u osmolito y porque la catálisis de la asparagina, la cual implica una reacción de desaminación mediada por la asparaginasa, libera una molécula de amonio y una molécula de aspartato, el cual puede seguir 2 vías de degradación, la primera implica una desaminación mediada por la aspartasa la cual va a liberar fumarato y una molécula de amonio, mientras que la segunda vía implica una reacción de transaminación y la participación de 2-oxoglutarato para formar oxaloacetato y glutamato, el primero puede entrar en el ciclo de Krebs, mientras que la desaminación del glutamato va a liberar 2-oxoglutarato y una molécula de amonio, así una molécula de asparagina puede liberar 2 moléculas de amonio. Esta serie de reacciones hacen considerar a la asparagina una buena fuente de nitrógeno (Voet & Voet. 1995).

En nuestro estudio sistemático encontramos que *D. hansenii* puede crecer satisfactoriamente en las distintas condiciones a las que fue sometida, lo cual señala que esta levadura posee una amplia versatilidad metabólica, con respecto a su crecimiento en los medios de cultivo probados (ver figuras 6 a 11).

La producción de solutos compatibles (Brown & Simpson, 1972) u osmolitos (Yancey *et al.* 1982) es uno de los mecanismos generales mediante el cual los microorganismos contrarrestan los efectos de la deshidratación provocada por la concentración de los diversos solutos

externos. Entre los solutos compatibles se ha señalado al ácido glutámico y el glicerol como dos de los principales osmolitos en los microorganismos (Yancey *et al.* 1982). Medimos la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH-NADPH dependiente), una enzima involucrada en la síntesis de glutamato en bacterias, levaduras, hongos y plantas superiores y que está íntimamente asociada con la asimilación de nitrógeno en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Encontramos un aumento de 4.7 veces en la actividad específica de GDH-NADPH en presencia de NaCl 1M lo cual relacionamos con una posible respuesta de osmotolerancia de *D. hansenii* (ver Figura 12).

Por otro lado Gustafsson & Norkrans (1976); Adler & Gustafsson (1980) y Adler, *et al.* (1985), tienen reportado al glicerol como el principal osmolito protector de *D. hansenii* durante la fase de crecimiento exponencial; así, cuando medimos la actividad específica de la enzima GDH-NADPH dependiente en células que habían sido cultivadas en un medio que contiene glicerol como fuente de carbono, se esperaba observar una reducción en la actividad específica de la enzima GDH-NADPH, debido a la introducción del glicerol extracelular por parte de la célula, actuando éste como un osmoprotector. Como se esperaba, encontramos que en los medios con glicerol la actividad específica de GDH-NADPH se ve disminuida, lo cual haría suponer que es el glicerol el que está actuando como osmoprotector y no el glutamato (ver Figura 12). En nuestro laboratorio se ha medido la concentración intracelular de glutamato en ausencia y presencia de NaCl 1M, encontrándose que la concentración de glutamato no varía, aunque no sabemos si el glutamato sintetizado se utilice rápidamente para la síntesis de otro aminoácido que actúe como osmolito protector.

Nilsson & Adler (1990) reportan que la actividad más alta de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa *in vitro*, una de las enzimas más importantes implicadas en la síntesis de glicerol, se presenta cuando la enzima se encuentra en presencia de glutamato. Probablemente la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa necesita del glutamato para un mejor funcionamiento en esta levadura, sin embargo, esto no ha sido probado y no se tienen reportes que indiquen una asociación de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa con el glutamato.

Por otro lado con respecto a la actividad específica de la enzima GPD-NADH detectamos un aumento de 1.2 veces en el medio con NaCl 1M (ver Figura 13). Este aumento no es una diferencia significativa. Al realizar el ensayo en el cual medimos la actividad específica de GPD-NADH en distintos tiempos de la fase de crecimiento exponencial detectamos un aumento de 1.7 veces a las 48 hrs. de cultivo (ver Figura 14). Esta diferencia es significativa aunque se esperaba un mayor aumento en la actividad específica en los medios con NaCl 1M lo cual pusiera de manifiesto que la síntesis de glicerol es un mecanismo de respuesta a la osmotolerancia de las células. También, probablemente la concentración de NaCl ensayada no es tan elevada como para generar un incremento en la actividad específica de la enzima en cuestión.

En los medios de cultivo que contienen glicerol como fuente de carbono se esperaba encontrar una baja actividad específica de la enzima GPD-NADH; sin embargo, encontramos que, en ausencia de NaCl, la actividad específica es ligeramente mayor en este medio de cultivo que en el que contiene glucosa como fuente de carbono, probablemente, la actividad detectada es la basal para esta levadura (ver Figura 13), ya que el producto de GPD-NADH, el glicerol-3-fosfato, es un intermediario

importante para la síntesis de ácido fosfatídico, sustrato esencial de enzimas involucradas en la síntesis de triacilglicerol y glicerofosfolípidos (Athenstaedt & Daum, 1999).

En el medio de cultivo con glicerol y NaCl 1M, la actividad es menor comparada con la actividad en el medio con glucosa, ya que el glicerol que entra a las células mediante las proteínas transportadoras es suficiente para contender con la osmolaridad del medio sin requerirse síntesis de glicerol *de novo* (ver Figura 13).

CONCLUSIONES

- Se desarrolló el medio mínimo de cultivo para el crecimiento óptimo de esta levadura, el cual se denominó SNAsnDh. Éste medio contiene asparagina como fuente de nitrógeno y sales de potasio, ambos factores necesarios para el crecimiento de esta levadura.
- Se determinaron los tiempos de duplicación en todas las condiciones probadas, siendo de 4 hrs. en el medio SNAsnDh con 0 y 1M de NaCl.
- Nuestros resultados sugieren que *D. hansenii* posee una amplia versatilidad metabólica, en comparación a *S. cerevisiae*, ya que presentó un crecimiento más favorable en las distintas condiciones a las que fue sometida.
- Las curvas de crecimiento de nuestro estudio sistemático son similares cuando se crece a *D. hansenii* en presencia y en ausencia de NaCl 1M; los tiempos de duplicación, en general, son menores cuando se cultiva con NaCl 1M lo cual nos dice que la sal no es tóxica para esta levadura a la concentración ensayada, confirmando los estudios de Prista *et. al.* (1997) y que señalan a esta cepa como una osmotolerante típica.
- Se determinó un aumento de 4.7 veces en la actividad específica de la enzima GDH-NADPH cuando se crece a *D. hansenii* en presencia de NaCl 1M y con glucosa como fuente de carbono. Estos resultados muestran una posible relación entre la síntesis de glutamato y el fenómeno de

osmotolerancia en esta levadura. En presencia de glicerol, principal osmolito protector en la fase de crecimiento de esta levadura, la actividad específica se ve disminuida drásticamente tanto en presencia como en ausencia de NaCl, lo cual supone que es el glicerol, que esta penetrando en grandes cantidades en la célula, y no el glutamato, el que está actuando como osmoprotector. Sin embargo se sigue observando una mayor actividad en presencia de NaCl 1M. Hacen falta más estudios para comprobar si es cierta o no la participación del glutamato en el mecanismo de osmotolerancia en esta levadura.

- Se determinó un aumento de 1.7 veces en la actividad específica de la enzima GPD-NADH cuando se crece con NaCl 1M y con glucosa como medio de cultivo. Este aumento pone de manifiesto que la producción de glicerol por la vía de GPD es un mecanismo para contender con el bajo potencial hídrico del medio ambiente confirmando los trabajos de Adler & Gustafsson (1980).

REFERENCIAS

1. Adler, L. & Gustafsson, L. 1980. Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Archives on Microbiology*. 124: 123-130.
2. Adler, L., Blomberg, A. & Nilsson, A. 1985. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology*. 162: 300-306.
3. Alexopoulos, C., Mims, C. & Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. *John Wiley and Sons*. Inc. USA. 272-293.
4. Athenstaedt, K. & Daum, G. 1999. Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *European Journal of Biochemistry*. 266: 1-16.
5. Barnett, J., Payne, R. & Yarrow, D. 1983. Yeasts: Characteristics and identification. *Cambridge University Press*. Cambridge.
6. Blomberg, A. & Adler, L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Advanced Microbial physiology*. 33: 145-212.
7. Botsford, J., Alvarez, M., Hernández, R. & Nichols, R. 1994. Accumulation of glutamate by *Salmonella typhimurium* in response to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2568-2574.
8. Brown, A. 1976. Microbial water stress. *Bacteriological Reviews* 40: 803-846.
9. Brown, A. 1978. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms. *Advanced Microbial Physiology*. 17:181-242.
10. Brown, A. & Simpson, J. 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *Journal of General Microbiology*. 72: 589-591
11. Csonka, L. & Hansen, A. 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review Microbiology*. 45: 569-606.
12. Csonka, L. 1989. Physiological and genetic response of bacteria to osmotic stress. *Microbiology Review*. 53: 121-147.

13. Doherty, D. 1970. L-glutamate dehydrogenase (yeast). *Methods in Enzymology*. 17: 850-856.
14. Edgley, M. & Brown, A. 1983. Yeast water relations: Physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. *Journal of General Microbiology*. 129: 3453-3463.
15. Folkes, B. & Sims, A. 1974. The significance of amino acid inhibition of NADP-linked glutamate dehydrogenase in the physiological control of glutamate synthesis in *Candida utilis*. *Journal of General Microbiology*. 82: 77-95.
16. Gancedo, C. Gancedo, J. & Sols, A. 1968. Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production. *European Journal of Biochemistry*. 5: 165-172.
17. Gustafsson, L. & Norkrans, B. 1976. On the mechanism of salt tolerance. Production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology*. 110: 177-83.
18. Hockstra, F. & Van Roeckel, T. 1988. Desiccation tolerance of *Papaver dubium* L. pollen during its development in the anther. *Plant Physiology*. 88: 626-632.
19. Lagunas, R. & Gancedo, J. 1973. Reduced pyridine-nucleotides balance in glucose-growing *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*. 37: 90-94.
20. Lowry, O., Rosenbraugh, N., Al Farr, A. & Randall, R. 1951. Protein Measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biochemistry*. 193: 265-269
21. Measures, C. 1975. Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature (London)*. 257: 398-400
22. Nilsson, A. & Adler, L. 1990. Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in the salt tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1034: 180-185.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

23. Norkrans, B. & Kylin, A. 1969. Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *Journal of Bacteriology*. 100: 836-845.
24. Norkrans, B. 1969. The sodium and potassium contents of yeasts differing in halotolerance, at various NaCl concentrations in the media. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 35: 1-2.
25. Ogahara, T., Ohno, M., Takayama, M., Igarashi, K. & Kobayashi, H. 1995. Accumulation of glutamate by osmotically stressed *Escherichia coli* is dependent on pH. *Journal of Bacteriology*. 177: 5987-5990.
26. Onishi, H. 1963. *Advances in Food Research*. 12: 53
27. Pitt, J. 1975. In "Water relations of Foods" (R. Duckworth, eds) Academic Press, London 12: 273-307
28. Prista, C., Almagro, A., Loureiro-Dias, M. & Ramos, J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4005-4009.
29. Schmidt-Nielsen K. 1979. *Animal Physiology: Adaptation and environment* Second Ed. *Cambridge University Press*. USA. 285-332
30. Tilbury, R. 1980. In "Biology and activities of yeast". (F. Skinner, S. Passmore and R. Davenport, eds). Academic Press, London. 9: 153-157
31. Tsuboi, K. & Hudson, P. 1956. Acid Phosphatase VI. Kinetic properties of purified yeast and Erythrocyte phosphomonoesterase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 61: 197-210.
32. Voet, D. and Voet, J. 1995. *Biochemistry* Second Ed. *JohnWiley and Sons*. Inc. USA.
33. Wilson, J. 1979. *Principles of Animal Physiology* Second Ed. *Macmillan Publishing Co.* Inc. USA.
34. Yancey, P., Clark, M., Hand, S., Bowlus, D. & Somero, G. 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*. 217: 1214-1222.