

92



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO FISIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO DE LA LEVADURA MARINA *Debaryomyces hansenii* EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO PRESENTA: ROMEL HERNANDEZ BELLO



DIRECTOR DE TESIS: DRA. LUISA ALVARINA ALBA LOIS

MEXICO, D.F.



2001

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

295218



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Estudio fisiológico y bioquímico de la levadura marina Debaryomyces
hansenii en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.

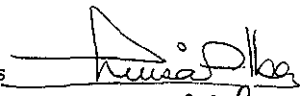
realizado por Rómel Hernández Bello

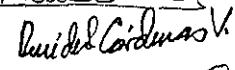
con número de cuenta 9135276-9, pasante de la carrera de Biología


Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.


Atentamente

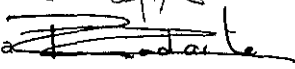
Director de Tesis

Propietario Dra. Luisa Alvarina Alba Lois 

Propietario Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez 

Propietario M. en IBB. Claudia Andrea Segal Kischinevzky 

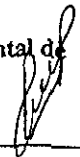
Suplente Biol. Alfonso José Vilchis Peluyera 

Suplente Biol. Beatriz Rodarte Murguía 

FACULTAD DE CIENCIAS
U N. A. M.

Consejo Departamental de Biología




Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Biología
Molecular del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, bajo la
tutoría de la Dra. Luisa A. Alba Lois.**

DEDICATORIAS

La presente tesis, está dedicada especialmente a mis padres María de los Ángeles Bello Marín y Juan Hernández Cortés, quienes con mucho sacrificio y amor me han dado todos los elementos necesarios para triunfar en la vida. Sé que tienen muchas expectativas para mí y que por lo mismo me exigen, pero les aseguro que no tienen nada de que preocuparse, que no me desviaré del camino. Un beso.

A mis hermanos Anayansi, Dení y Pável, de quienes he aprendido mucho.

A mi linda mujercita **NURY**, porque me has abierto las puertas de tu corazón y me has brindado tu cariño, comprensión y apoyo. Gracias por ayudarme a ver mis errores y hacerme rectificar el camino a través de tu amor.

Vida, éste es apenas el comienzo...

...Te Amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Luisa Alba Lois, la cual es como mi madre en la ciencia, por haberme permitido trabajar a su lado, por su paciencia para enseñarme la manera de analizar los resultados, por su espíritu emprendedor del cual me alimenté por mucho tiempo y sobre todo por aguantarme todos estos años en su laboratorio.

Lichi...

...Mil gracias.

Al Dr. René Cárdenas, por las acertadas correcciones que realizó durante la escritura de este trabajo y por haberme brindado la oportunidad de ser mi sinodal.

A Claudia, por los conocimientos transmitidos durante mi permanencia en el laboratorio, así como los ratos en que hablábamos de temas interesantes. Asimismo te agradezco por haber participado en la corrección de mi tesis.

A Alfonso, por ser un gran amigo y maestro en las cosas del laboratorio y de la vida. Por el apoyo brindado en el laboratorio y por las agradables, divertidas y sinceras veladas en que hablábamos de filosofía de la ciencia al calor de tu hogar.

A Beatriz, por ser una excelente compañera de laboratorio, por las críticas constructivas y el interés mostrado en el presente trabajo.

A las personas especiales del laboratorio: Dr. Víctor Valdés y al Biol. Epifanio, quienes considero interesantes.

A mis amigos de la carrera, con los que compartí muchos momentos felices y quienes me brindaron su apoyo y amistad.

A Josecillo "pecho amarillo", quien se ha convertido como un hermano para mí. Gracias por tu apoyo en momentos cruciales de mi vida y por seguir permaneciendo en ella.

A todos aquellos que sin saberlo, han participado de manera directa o indirecta para el término de esta tesis.

A todos...

...GRACIAS

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
Aspectos termodinámicos	8
Presión osmótica	8
Potencial osmótico	9
Presión de turgencia	9
Características del sistema experimental	11
Asimilación de amonio	12
Papel del glutamato y de la glutamina en la osmotolerancia	13
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
Cepas	16
Medios de cultivo	16
Condiciones de crecimiento	17
Determinación de la actividad enzimática	17
Obtención de extractos crudos	18
GDH método de Doherty	18
GOGAT método de Roon y Even	19
GOGAT método de Boland y Benny	20
GS método de Ferguson y Sims	21
GS método de Shapiro y Stadmand	22
RESULTADOS	23
GDH	27
GOGAT y GS	28
DISCUSIÓN	36
GDH	37
GOGAT y GS	37
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	43

ABREVIATURAS

Enzimas:

GDH.- Glutamato deshidrogenasa.

GS.- Glutamino sintetasa.

GOGAT.- Glutamato sintasa.

Cofactores:

NADPH.- Nicotinamín Adenín Dinucleótido Fosfato (forma reducida).

NADH.- Nicotinamín Adenín Dinucleótido (forma reducida).

ATP.- Adenosín trifosfato.

ADP.- Adenosín difosfato.

Medios de Cultivo:

MMS.- Medio de cultivo en base a la fórmula de DIFCO. *Yeast Base*.

MMDh.- Medio de cultivo suplementado con sales de potasio y sodio.

SNAsnDh.- MMDh sin amonio y con asparagina como fuente de nitrógeno suplementado con sales.

Reactivos:

ASB.- Albúmina de suero bovino.

DTT.- Ditionitrotol.

EDTA.- Ácido etilendiamina tetra-acético

TCA.- Ácido tricloro-acético

TLCK.- $N\alpha$ -p-Tosil-L-lisin clorometil cetona

PMSF.- Fenil-metil-sulfonil fluoruro.

Términos:

Cbp.- cuanto baste para

RESUMEN

La levadura marina *Debaryomyces hansenii* es un microorganismo eucariótico que tolera amplios rangos de concentración de sales, es decir, es osmotolerante y crece en medios de cultivo a concentraciones de hasta 4M de NaCl. El mecanismo general por el cual los microorganismos pueden contender con el bajo potencial hídrico provocado por la alta concentración de NaCl es por la exclusión de los solutos estresantes y por la compensación del potencial hídrico a través de la acumulación de uno o más especies de solutos denominados solutos compatibles (Brown & Simpson, 1972) u osmolitos (Yancey *et al.* 1982). Estos compuestos pueden dividirse en dos grupos principales: a) polihidroxicarbohidratos, y b) aminoácidos y derivados de éstos. Dentro de los aminoácidos, el glutamato ha sido identificado como un metabolito osmoprotector en algunas bacterias además de estar implicado en el mecanismo de asimilación de amonio (Yancey *et al.* 1982).

En bacterias, hongos, levaduras y plantas superiores se han encontrado dos vías para la asimilación de amonio. En la primera vía participa la NADP⁺-glutamato deshidrogenasa (NADP-GDH; EC 1.4.1.4), la cual cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato para formar glutamato. En la segunda vía se encuentra la acción combinada de la glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2), donde el glutamato es aminado a la forma de glutamina y de la glutamato sintasa (GOGAT; EC 1.4.1.13) la cual transfiere reductivamente el grupo amida a 2-oxoglutarato resultando en la conversión neta de amonio y 2-oxoglutarato a glutamato. La enzima GDH presenta menor afinidad al amonio que la enzima GS. Consecuentemente, la actividad de la enzima GDH puede ser insuficiente para la asimilación de amonio cuando la concentración interna de amonio es baja. Cuando se presenta esta condición, la ruta de las enzimas GS/GOGAT constituye la principal ruta de asimilación de amonio. Entre los organismos que presentan el fenómeno anteriormente descrito encontramos a bacterias como *Escherichia coli* y *Rhizobium*, hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans* (Kusnan *et al.*, 1987) y *Neurospora crassa* así como en plantas (Lomnitz *et al.*, 1987); no obstante esta vía (GS/GOGAT) puede no ser relevante en dicha asimilación. Por ejemplo, en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* y *Candida boidinii*, la enzima GDH-NADP⁺

constituye la ruta principal de asimilación de amonio en condiciones limitantes y de exceso de nitrógeno (Kusnan *et al.*, 1987).

En este trabajo se presenta la relación de la actividad de las enzimas implicadas en la asimilación de amonio y su posible participación en el estrés osmótico en *Debaryomyces hansenii*. Esta levadura fue crecida en un medio con asparagina como fuente alternativa de amonio, en condiciones limitantes y no limitantes de nitrógeno. Se encontró que la enzima GDH presentó las mismas actividades enzimáticas en condiciones limitantes y no limitantes de nitrógeno, mientras que las actividades de GS/GOGAT fueron muy bajas. Asimismo encontramos que la actividad de la enzima GDH de *D. hansenii* en presencia de 1M de NaCl aumentó 3 veces su actividad en comparación a la actividad presentada en ausencia de NaCl.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas naturales que son clasificados como ambientes extremos, donde imperan las temperaturas extremas, ambientes ácidos, alcalinos o hiper-salinos se caracterizan por su carencia de formas de vida superiores, sin embargo son habitados por abundantes comunidades microbianas adaptadas a estos nichos ecológicos. La salinidad es uno de los parámetro ambientales que más interesa a los biotecnólogos, ya que los mecanismos protectores que subyacen en la tolerancia a sal pueden tener importantes aplicaciones comerciales (Galinsky *et. al.*, 1982).

Entre los parámetros fisiológicos que determinan la capacidad de los organismos a proliferar en un hábitat determinado se encuentra la fuerza osmótica del ambiente. Esta capacidad de adaptación a las fluctuaciones de la osmolaridad externa es fundamental para la sobrevivencia de los organismos. Recientemente, los mecanismos responsables para la adaptación osmótica han sido dilucidados de manera relativa. Por otro lado, se ha observado que existe una similitud muy marcada entre bacterias y plantas en sus respuestas intracelulares al estrés osmótico y es probable que exista cierto paralelismo en los mecanismos de dichos organismos ya que ambos reinos acumulan los mismos tipos de solutos citoplásmicos al ser expuestos a condiciones de hiperosmolaridad (Csonka, 1989).

Un mecanismo común de adaptación a estrés osmótico es el denominado osmorregulación. El estrés osmótico se puede definir como el decremento o incremento en la fuerza osmótica del ambiente de un organismo (Csonka, 1989), mientras que la osmorregulación se entiende como la capacidad de respuesta de las células para ajustar su contenido de solutos intracelulares durante el estrés osmótico. En términos más específicos, el término osmorregulación se puede definir como la capacidad de las células para ajustar el número total de solutos intracelulares orgánicos y, inorgánicos (solutos compatibles u osmolitos) en el citosol para reestablecer la turgencia en las células. Este mecanismo permite que los procesos celulares operen a potenciales osmóticos intracelulares sin el requerimiento de modificaciones estructurales de las enzimas. (Blomberg & Adler, 1992).

Los organismos pueden ser clasificados de dos maneras dependiendo de su respuesta ante un cambio en la concentración de solutos en el medio. Si los organismos cambian la concentración osmótica de sus fluidos internos hasta conformar la del medio, permaneciendo de manera isosmótica, se les denomina *osmoconformadores*; si por el contrario si mantienen o regulan su concentración osmótica interna a pesar de los cambios de la concentración externas, entonces se les denomina *osmoreguladores* (Schmidt-Nielsen, 1979; Wilson, 1979).

En las bacterias, los solutos compatibles pueden ser acumulados por síntesis *de novo* o por transporte desde el medio de cultivo. Existen diferencias en los efectos de varios solutos compatibles sobre la tolerancia a estrés osmótico de la célula, ya que algunos permiten una estimulación de la velocidad de crecimiento en un medio de alta osmolaridad, mientras que otros no tienen efectos detectables sobre el crecimiento de las mismas. Aún no son bien entendidas las diferencias entre los dos tipos de solutos compatibles, pero se puede proponer que aquellos solutos que contienen mejor con el estrés osmótico puedan ser acumulados en altos niveles al interior de la célula por ser menos tóxicos. Dichos solutos son llamados *osmoprotectores* y se dividen en dos grupos: a) polihidroxialcoholes o polioles y b) aminoácidos o derivados de aminoácidos.

a) Polioles

Los polioles están ampliamente distribuidos en los hongos, se han detectado en más de 450 especies; los principales son: glicerol, treitol, eritritol, ribitol, arabinitol, xilitol, sorbitol, manitol y galactitol.

b) Aminoácidos

Muchos organismos usan aminoácidos como solutos compatibles. Algunos de los aminoácidos acumulados en bacterias son por ejemplo: la prolina, el glutamato, la glicina y la betaina entre otros, y entre los derivados de aminoácidos tenemos al ácido γ -aminobutírico.

En la siguiente tabla se enlistan algunos organismos y la distribución que existe de estos osmolitos en los diferentes reinos (Yancey *et. al.*, 1982).

I. Polioles o Polihidroxi-alcoholes	
Grupo de organismos	Principales osmolitos
Cianobacterias <i>Synechococcus</i> sp.	Glucosil-glicerol
Fungi <i>Saccharomyces rouxii</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>	Arabinitol Glicerol, Arabinitol
Algas unicelulares <i>Dunaliella</i> spp	Glicerol
Plantas vasculares <i>Cossypium hirsutum</i>	Glucosa, fructosa, sacarosa
Insectos <i>Eurosta solidaginis</i>	Glicerol, sorbitol
Crustáceos <i>Artemia salina</i> (larva)	Glicerol, trehalosa
Vertebrados <i>Hyla versicolor</i>	Glicerol
II. Aminoácidos y derivados de aminoácidos	
Grupo de Organismos	Principales osmolitos
Eubacteria <i>Klebsiela aerogenes</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Ácido glutámico, prolina
Protozoa <i>Miemiensis avidus</i>	Glicina, alanina, prolina
Plantas vasculares <i>Spartina townsendii</i> <i>Aster tripolium</i>	Betaina y prolina
Anfibios <i>Bufo Marinus</i>	Varios aminoácidos

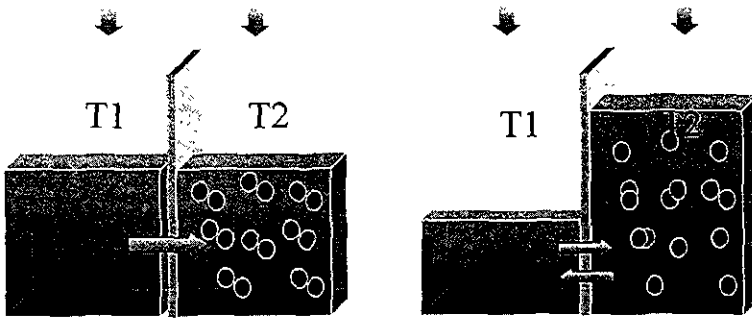
Tabla 1. Osmolitos acumulados en diferentes organismos durante un estrés osmótico (Yancey, *et al.* 1982)

Para comprender más ampliamente como afecta un medio hipersalino a las células, es necesario revisar algunos aspectos termodinámicos que en ella se generan y entender los conceptos básicos como presión osmótica, potencial osmótico y turgencia.

ASPECTOS TERMODINÁMICOS

Las membranas de los organismos exhiben permeabilidad selectiva a diferentes sustancias, es decir, son semipermeables; y las propiedades osmóticas de las células derivan de esta propiedad de las membranas.

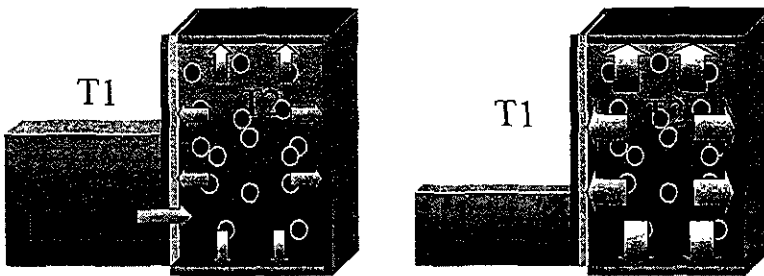
PRESIÓN OSMÓTICA: Para explicar lo que es la presión osmótica consideremos un recipiente que está dividido en dos compartimentos idénticos, los cuales están abiertos a la atmósfera y que están separados uno del otro de manera vertical por una membrana semipermeable. Supóngase que uno de los compartimentos (designado compartimento 1, T1) está parcialmente lleno con agua pura y el otro compartimento (compartimento 2, T2) está lleno con un volumen igual de solución acuosa de alguna molécula que no puede difundir a través de la membrana.



Debido a la presencia de las moléculas del soluto, la concentración (*actividad*) del agua de T2 es menor que la del agua pura y consecuentemente las moléculas de agua difundirán de T1 a T2, aumentando el gradiente de actividad. Este movimiento del agua provocará que el nivel de agua del T1 decrezca, mientras que el nivel de T2 se incremente, creando una presión hidrostática en T2; la magnitud de la presión hidrostática depende de la diferencia en los niveles de los líquidos en los dos compartimentos. La difusión del agua al compartimento T2 continuará hasta que el exceso de presión en ese compartimento sea suficiente para contender con la tendencia del agua a difundir en él. La presión ejercida hacia T2 cuando el sistema alcanza el equilibrio se le denomina *presión osmótica*.

POTENCIAL OSMÓTICO: Por definición la actividad de un solvente puro es 0. Generalmente, la adición de solutos decrece la actividad de los solventes a un valor de <0 y por lo tanto el potencial osmótico de las soluciones es generalmente negativo. El potencial osmótico se genera cuando una solución es separada de un solvente puro por una membrana que es más permeable al solvente que al soluto; las moléculas del solvente se moverán de la región de mayor a la región de menor *potencial osmótico*.

PRESIÓN DE TURGENCIA: En el ejemplo anterior, el volumen de la solución en la cámara o compartimento 2 (T2) está libre de expandirse con el influjo de agua. Pero asumamos que una cubierta rígida es colocada alrededor del líquido en T2 y que la membrana semipermeable no es completamente elástica.



En este caso, el volumen de la solución de T2 no será capaz de expandirse, y la presión en T2 se incrementará como consecuencia de la tendencia de las moléculas de agua a difundir hacia él. Esta situación ocurre en bacterias y plantas, ya que tienen paredes rígidas alrededor de sus membranas citoplasmáticas. Así como el agua difunde hacia el interior de estas células, las membranas pueden expandirse tanto como lo permita el lado interior de la pared celular, y el influjo adicional de agua resulta en el incremento en la presión que es ejercida por la membrana citoplasmática sobre las paredes celulares. Esta presión es la *presión de turgencia*.

Ya que las membranas citoplasmáticas de las bacterias son permeables al agua pero no a la mayoría de los metabolitos, los choques hiper o hiposmóticos provocan una entrada o salida instantánea de agua, la cual es acompañada por un concomitante decremento o incremento del volumen citoplasmático. El choque hiposmótico generalmente resulta sólo en un ligero incremento del volumen celular. Por otro lado, el choque hiperosmótico, causa encogimiento considerable o decremento del volumen citoplasmático; dicho proceso es conocido como *crenación*. La cinética de dicho proceso es dependiente de la magnitud del incremento en la osmolaridad del medio, pero no de la naturaleza del soluto utilizado; por ejemplo, aquellas moléculas que pueden difundir libremente a través de la membrana, tales como el glicerol o el etanol, no ocasionan crenación.

Si el choque hiperosmótico no es tan severo, la crenación es transitoria, y después de algún tiempo el volumen citoplasmático se incrementará como resultado del reajuste osmótico en las células. No obstante, después de que la adaptación osmótica se ha llevado a cabo, el volumen citoplasmático en el equilibrio de las bacterias en crecimiento es dependiente de la osmolaridad del medio, de tal manera que el volumen citoplasmático decrece con el incremento externo de la osmolaridad.

En general, la exposición de organismos a condiciones de hiperosmolaridad resulta en el decremento de sus actividades citoplásmicas. Las proteínas y otras macromoléculas biológicas parecen funcionar sólo dentro de ciertos rangos normales de potenciales hídricos, fuera de los cuales algunas funciones celulares esenciales se dañan. Además, la crenación da por resultado la inhibición de una variedad de procesos fisiológicos, los cuales van desde la asimilación o entrada de nutrientes hasta la replicación del DNA; asimismo, se ha descrito que este proceso va acompañado de un incremento en los niveles de ATP celular, posiblemente como resultado de la inhibición de la biosíntesis de macromoléculas (Csonka, 1989).

Características del Sistema Experimental

Clasificación.

Saccharomyces cerevisiae y *Debaryomyces hansenii* se clasifican de la siguiente manera (Alexopoulos *et al.*, 1996):

Phylum: Ascomycota

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetaceae.

En el aspecto morfológico, esta familia incluye a aquellas levaduras que (1) tienen predominantemente talos unicelulares (pseudomicelio), (2) se reproducen principalmente de manera asexual por gemación y (3) producen ascosporas. Desde el punto de vista fisiológico, son organismos que viven y proliferan en medios que contienen una gran variedad de compuestos iónicos y con grados de salinidad que van desde el agua dulce hasta hábitats hipersalinos. Para que estos organismos puedan crecer en un ambiente que represente un desafío osmótico, es necesario que la célula establezca y mantenga su presión interna por encima o por debajo del medio que la rodea.

En la literatura se han utilizado diferentes términos para describir la totalidad de respuestas de los organismos a una baja disponibilidad de agua, tales como osmotolerancia, xerotolerancia, halofilismo, osmofilismo y tolerancia a la desecación, aunque los dos primeros términos son generalmente los más usados (Csonka, 1989).

Así pues, se ha descrito a *D. hansenii* como una levadura halotolerante con la capacidad de crecer en un amplio rango de concentraciones de sal, que van de 0M hasta 4M de NaCl (Norkrans, 1969). Ha sido aislada de diversos ambientes salinos tales como agua marina, fábricas de sal, quesos y carnes frías. Cuando se crece a *D. hansenii* bajo estrés salino, la concentración de sal intracelular no es suficiente para balancear la osmolaridad del medio, lo cual se compensa por un incremento y la posterior acumulación intracelular de osmolitos protectores como polihidroxi-alcoholes, como glicerol y arabinitol (Adler *et al.*, 1985). Se ha reportado que la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD), que

biosintetiza glicerol, es sensible a altas concentraciones de sal. En ensayos con soluciones salinas, la enzima presenta menos del 10% de su actividad como resultado de un fuerte excedente iónico de 0.6 M. No obstante, cuando se prueba en presencia de glutamato, la enzima duplica su actividad aún a 0.9 M de fuerza iónica. (Adler and Gustafsson, 1980; Jovall *et al.*, 1990).

En algunas bacterias diazótrofes como *Azotobacter chroococcum*, los osmolitos que se acumulan durante un estrés osmótico son trehalosa y glutamato; en *Azospirillum brasilense* los osmolitos son prolina y glutamato, mientras que en *Klebsiella pneumoniae* son trehalosa y prolina. Los autores sugieren que el mecanismo de adaptación osmótica de éstos organismos reside en la acumulación de osmolitos como glicina, betaína, prolina y glutamato en células hiperosmóticamente estresadas, resultando en un aumento en la entrada a la célula de dichos osmolitos o incrementando la biosíntesis neta de trehalosa, prolina y glutamato o ambos. (Madkour *et al.* 1990).

Asimismo, se ha demostrado que estos osmolitos también son empleados por células endoteliales cuando éstas son expuestas a un estrés osmótico, observándose un incremento de L-glutamina a nivel intracelular (Dall'asta *et al.*, 1999).

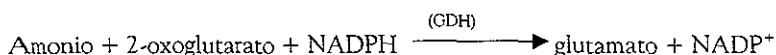
Los aminoácidos que tienen propiedades de ser osmolitos como la prolina y glutamina, derivan o son sintetizados a partir del glutamato; veamos pues, como se lleva a cabo la síntesis de glutamato:

ASIMILACIÓN DE AMONIO:

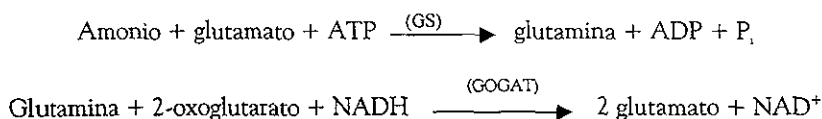
El nitrógeno reducido en la forma de ión NH_4^+ es utilizado en la biosíntesis de aminoácidos y en la de otras biomoléculas que contienen nitrógeno. Los dos aminoácidos que proveen el punto crítico de entrada son el glutamato y la glutamina. Estos dos aminoácidos juegan un papel central al ser precursores de otros aminoácidos. Los grupos amino de la mayoría de los aminoácidos son derivados del glutamato y glutamina a través de las reacciones de transaminación.

Las vías biosintéticas de glutamato y glutamina parecen ser similares en todas las formas de vida. (Lehninger *et al.*, 1993).

En una vía, la enzima GDH-NADP⁺ dependiente (E.C. 1.4.1.4) cataliza la reacción:



En la siguiente vía se ve implicada la acción combinada de la enzima glutamina sintetasa (GS) (E.C. 6.3.1.2) y de la enzima glutamato sintasa (GOGAT-NAD⁺ dependiente) (E.C. 1.4.1.14):



Se ha observado que la enzima GDH de plantas verdes y de bacterias como *Escherichia coli* y *Rhizobium sp* tiene menor afinidad por amonio que la GS, por lo que la actividad de GDH puede ser insuficiente cuando la concentración interna de amonio es baja, en consecuencia reduciendo su actividad (Brown & Jonson, 1970; Burn *et al.*, 1974); bajo estas condiciones, la vía GS/GOGAT constituye la principal ruta de asimilación de amonio. Por otro lado, en hongos, la relación de ambas rutas es menos clara; por ejemplo, en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* y *Candida boidinii*, la ruta GS/GOGAT no juega un papel esencial para la asimilación de amonio, siendo la GDH-NADP⁺ la vía principal tanto en condiciones de limitación como en exceso de nitrógeno. No obstante, la vía GS/GOGAT es utilizada a bajas concentraciones de amonio en los hongos filamentosos *Aspergillus nidulans* (Kusnan *et al.*, 1987) y *Neurospora crassa* (Lomnitz *et al.*, 1987; Holmes 1989).

PAPEL DEL GLUTAMATO Y DE LA GLUTAMINA EN LA OSMOTOLERANCIA

GLUTAMATO Y GLUTAMINA: Los niveles citoplasmáticos de glutamato se incrementan en la mayoría de los organismos procariontes después de la exposición a un medio con una elevada osmolaridad. En bacterias gram negativas, el estrés osmótico genera un gran incremento en los niveles de glutamato, llegando a alcanzar hasta el 90% de los aminoácidos. Richey y cols. (1987) reportaron que en estado estacionario, la concentración

intracelular de glutamato en *E. coli* es directamente proporcional a la osmolaridad del medio de cultivo. Los niveles de glutamina también se incrementan en respuesta al estrés osmótico en bacterias gram negativas; aunque la glutamina está presente en niveles mucho menores que el glutamato, es probable que no sea importante en el mantenimiento de la osmolaridad citoplasmática.

La acumulación de glutamato y glutamina ha sido observada en varias especies de bacterias cultivadas en medios deprivados de aminoácidos exógenos, indicando que, en estos casos, el incremento de los niveles de estos dos aminoácidos es debido a un incremento en su velocidad de síntesis. La caracterización de las vías implicadas en la síntesis del glutamato para la osmoregulación ha sido estudiada en *Vibrio harvery*; Gurevich y cols. (1986) encontraron que el estrés hiperosmótico resulta en un decremento de la actividad de GDH y un incremento en la actividad de GOGAT. Tempest y cols. (1970) encontraron que la actividad de GDH de *Klebsiella aerogenes* es sensible a cambios en el pH, con un rango óptimo de actividad cercano a pH 8.0 y que la exposición de las células a un estrés osmótico provoca una rápida salida de protones del citoplasma.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Conocer cómo se lleva a cabo la asimilación de amonio en la levadura marina *D. hansenii* a través del análisis de las actividades específicas de las enzimas implicadas (GDH, GS y GOGAT), en diferentes concentraciones de NaCl y su posible relación con el fenómeno de osmotolerancia.

Objetivos Particulares:

1. Determinar el medio mínimo (MM) óptimo de crecimiento para la levadura marina *D. hansenii* tanto en ausencia como en presencia de NaCl.
2. Determinar cuál es la concentración de sal óptima para crecer y determinar su tiempo de duplicación.
3. Determinar las actividades específicas de las enzimas: GDH-NADPH, GS y GOGAT-NADH de *D. hansenii* cultivada en el medio seleccionado en ausencia como en presencia de NaCl.

MATERIAL Y METODOS

Cepas: Las cepas utilizadas fueron *Saccharomyces cerevisiae* cepa S288C y *Debaryomyces hansenii* cepa Y7426 (US Department of Agriculture, Peona, Ill.), las cuales fueron donadas generosamente por la Dra. Alicia González y el Dr. Antonio Peña del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Estas cepas se mantuvieron en medio rico sólido (YPD-Agar 2%) con 0M y 0.5M de NaCl para *S. cerevisiae* y *D. hansenii* respectivamente.

Medios

Tabla 2.- Medios de Cultivo

Medio	Fuente de Nitrógeno	Sales Adicionales
Medio Rico YPD ¹	Peptona	Ninguna
Medio Mínimo (MM)	Sulfato de amonio ²	Ninguna
Medio mínimo Dh (MMDh)	Sulfato de amonio ²	Presentes
SN-Asn 7.5 mM-Dh	Asparagina ^{3,5}	Presentes
SN-Asn 1.5 mM-Dh	Asparagina ^{4,5}	Presentes

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

¹El 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.

²La concentración de sulfato de amonio fue 40 mM.

³La concentración de asparagina (Asn) fue de 7.5 mM para medios en condición no limitante de nitrógeno.

⁴La concentración de asparagina fue de 1.5 mM para medios en condición limitante de nitrógeno.

⁵Las sales adicionales fueron las reportadas por Norkrans (1969) para el crecimiento de *Debaryomyces hansenii* (KH₂PO₄, K₂HPO₄, K₂SO₄ y Na₂SO₄).

MMS: Sales 50X, vitaminas 1000X, trazas 100X, glucosa 1%, sulfato de amonio 0.5% y NaCl a la molaridad requerida.

MMDh: Modificado a partir del reportado por Norkrans *et. al.* 1969.

SN-Asn-Dh: Sales 50X, vitaminas 1000X, trazas 100X, glucosa 1%, Asn como fuente alternativa de nitrógeno a una concentración final de 7.5 mM ó 1.5 mM, KH₂PO₄ 0.7mM, K₂HPO₄ 2.6 mM, K₂SO₄ 2mM, Na₂SO₄ 2mM y NaCl a la molaridad requerida.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Mantenimiento de cepas: Las cepas se sembraron en cajas de Petri con medio YPD con 0 y 1M de NaCl para *S. cerevisiae* y *D. hansenii* respectivamente y incubaron a 30 °C durante 2 ó 3 días.

Crecimiento de cepas: Se inocularon a partir de una colonia aislada, precultivos en medio YPD líquido con 0 y 1M NaCl según sea el caso, los cuales se cultivaron por un periodo de 12 horas a 30 °C a 180 rpm de agitación. Ya crecidas las células, se colectaron por centrifugación a 3,000 rpm durante 10 min y se lavaron dos veces con agua desionizada. Posteriormente los medios experimentales se inocularon a una densidad óptica ($D.O._{600nm}$) de 0.05. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación constante de 180 rpm. El crecimiento se monitoreó midiendo la densidad óptica a 600nm en un espectrofotómetro Carl Zeiss PM QII cada tres horas. Para calcular los tiempos de duplicación, los cultivos se dejaron crecer hasta la fase estacionaria, siendo en la fase exponencial en donde se calculan los respectivos tiempos de duplicación de la siguiente manera: se grafica el tiempo (t) vs $D.O._{600nm}$ en papel semilogarítmico; se selecciona de manera aleatoria un punto dentro de la fase exponencial, posteriormente se busca sobre la recta el valor duplicado del punto anteriormente seleccionado y se cuenta el tiempo que tardó en duplicarse el valor de la $D.O.$ en el eje de las ordenadas. Para los ensayos enzimáticos, las células fueron cultivadas en las mismas condiciones que se utilizaron para realizar las curvas de crecimiento. Cuando las células alcanzaron una $D.O._{600nm}$ de 1.0, se cosecharon por centrifugación y se lavaron con H_2O desionizada. La pastilla resultante se guardó a -70 °C.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Obtención de las muestras:

El crecimiento en cada medio fue probado sin sal y en concentraciones de 0.5, 1, 1.5 y 2M de NaCl. Se autoclavearon matraces Erlen-Meyer de 250 ml conteniendo 100 ml de cultivo y posteriormente se les agregó asparagina a la concentración final que se requería. Los medios se inocularon a una $D.O._{600nm}$ de 0.05 y fueron mantenidos a 30 °C en agitación a 180 rpm en una incubadora Giromax 703. El crecimiento fue monitoreado en un

espectrofotómetro *Carl Zeiss PM QII*, cada 3 horas hasta alcanzar la fase estacionaria. Las células fueron colectadas por centrifugación a 2000rpm durante 10 min. Las pastillas se lavaron y guardaron a -70°C .

Obtención de Extractos

Amortiguador de extracción general: amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.4 + EDTA 1 mM.

Preparación de extractos crudos: Todo el procedimiento se realizó en frío. A 10 ml de *amortiguador de extracción general* se le agregó DTT (reductor de puentes disulfuro), TCLK y PMSF (inhibidores de proteasas) a una concentración final de 1 mM. La pastilla de células se resuspendió en 1ml de este amortiguador y se transfirió a un tubo de ensaye para romperse mecánicamente con perlas de vidrio de 0.7-1.18 mm de diámetro, con seis pulsos en vórtex de 1 min alternados con 1 min en hielo. Se recuperó la mayor parte del extracto en un tubo *eppendorf* y se centrifugó a 14,000 rpm en microfuga (*Eppendorf centrifuge 5415 C*). El sobrenadante se transfirió a otro tubo *Eppendorf*.

Cuantificación de proteínas: La concentración de proteína del extracto crudo se determinó por el método de Lowry y cols. (1951).

Ensayos enzimáticos

Las siguientes fueron las técnicas empleadas para la realización de los ensayos enzimáticos:

GDH (glutamato deshidrogenasa-NADPH dependiente) (Doherty, 1970)

El *amortiguador de ensayo* consiste de amortiguador de fosfatos de potasio 1 M (pH 7.4), 2-oxoglutarato 10mM y NH_4Cl 1M. Los cocteles se prepararon de la siguiente forma:

Cocteles	Completo	Sin 2-oxoglutarato	Sin $\text{N}^+\text{H}_4\text{Cl}$
Amortiguador de fosfatos 1M pH 7	3 ml	3 ml	3 ml
2-oxoglutarato 10 mM	900 μl	-	900 μl
NH_4Cl 1M	1.5 ml	1.5 ml	-
H_2O	24 ml	24.9 ml	25.5 ml
Volumen Final	29.4 ml	29.4 ml	29.4 ml

Antes de cada medición, a cada uno de los tres cocteles se les añade NADPH a una concentración final de 0.16 mM. El extracto se diluye 1:10 para realizar las mediciones. En cada celda se coloca 1 ml de cada coctel y un determinado volumen en μl del extracto diluido. Se sigue la disminución de la absorbancia (A) debida a la oxidación del cofactor a una longitud de onda de 340 nm durante 3 min con intervalos de 20 seg. A partir de los datos obtenidos para cada celda se calcula la pendiente por minuto. Dichas pendientes son restadas de sus controles y el resultado final se calcula con la fórmula:

$$\text{Actividad Especifica (AE)} = m/6.22 / \text{ml de alícuota} / \text{mg de proteína.}$$

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

La actividad específica se reporta en :

$$\mu\text{mol NAD(P)H oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína total}^{-1}$$

GOGAT (glutamato sintasa) (Roon & Even, 1974)

El coctel de ensayo se realiza de la siguiente manera: se prepara una solución con 2-oxoglutarato 6mM, L-glutamina 5.6mM y 12.5 ml de amortiguador de fosfatos de potasio 1M (pH 7.0) en un volumen final de 112.5 ml; dividir en 4 frascos con 28.13 ml cada uno. Se prepara Azaserina a una concentración de 50 mM, que se usa como control negativo.

Para llevar a cabo las mediciones, en cada celda se adiciona lo siguiente:

	Sin Azaserina	Azaserina (control negativo)
Coctel	900 μl	900 μl
Azaserina	----	100 μl
H ₂ O	100 μl	----

Antes de cada medición, a cada coctel se le añade NADH a una concentración final de 0.18mM. En cada celda se coloca 1 ml de cada coctel y un determinado volumen en μl del extracto crudo. Se sigue la disminución de la absorbancia (A) debida a la oxidación del

cofactor a una longitud de onda de 340 nm durante 3 min con intervalos de 15 seg. A partir de los datos obtenidos para cada celda, con y sin azaserina, se calcula la pendiente por minuto. Las pendientes son restadas y el resultado se sustituye en la fórmula para calcular la A. E. de la enzima:

$$A.E. = m/6.22 \text{ /ml de alícuota /mg de proteína.}$$

La actividad específica se reporta en:

$$\mu\text{mol NADH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg total proteína}^{-1}$$

GOGAT (Boland y Benny, 1977 citado en Farnden & Robertson, 1980)

Materiales y reactivos

- Amortiguador de fosfatos, 0.2 M, pH 8.6, conteniendo 2% de β -mercaptoetanol.
- 2-oxoglutarato, 10 mM neutralizado con KOH.
- NADH, 1 mM.
- L-Glutamina, 100 mM

Procedimiento: Estos reactivos son añadidos a una cubeta de 1 ml en las siguientes cantidades: 0.5 ml de amortiguador de fosfatos, 100 μ l de 2-oxoglutarato, 100 μ l de NADH, 50 μ l de extracto crudo y 200 μ l de H₂O. La velocidad del decremento en la absorbancia a 340 nm es monitoreada a 25 °C antes y después de la adición de 50 μ l de solución de glutamina. La primera medición sirve como una estimación de fondo de la oxidación del NADH, el cual es restado de la velocidad de la actividad dependiente de glutamina. Esta actividad es expresada en:

$$\mu\text{mol NADH} \cdot \text{oxidado min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$$

Para asegurar que la oxidación del NADH sea resultado de la actividad de la enzima GOGAT y no de la actividad de alguna glutaminasa y/o glutamato deshidrogenasa, se añade NH₄Cl a la cubeta antes de añadir la solución de glutamina. La velocidad de oxidación es restada a la actividad de la GOGAT dependiente de glutamina. Se recomienda que el amortiguador de extracción contenga altos niveles de agentes reductores. El

amortiguador usado para este ensayo contiene 10 mM de DDT , 2% v/v 2-mercaptoetanol, PMSF (10 µl/10 ml) y TLCK (50 µl/10 ml).

GS (Actividad de sintetasa) (Ferguson & Sims, 1974)

El amortiguador de ensayo consiste en Tris acetatos 50 mM y EDTA 0.5 mM pH a 6.4 ajustado con HCl. Los reactivos que se utilizan para el coctel de ensayo se enlistan en la siguiente tabla; se preparan por separado en 50 ml de este amortiguador y se congelan por separado:

Reactivo	Concentración en amortiguador de ensayo para GS (50 ml)
ADP	0.75 Mm
L-glutamina	35 mM
Hidroxilamina	8.75 mM
Arsenato de Sodio	17.5 mM
Cloruro de Manganeso	2.25 mM

El coctel de ensayo se prepara de la siguiente manera: en 50ml de H₂O en agitación, se agregan 10 ml de cada una de las soluciones anteriormente mencionadas en el orden en que se reportan. El cloruro de magnesio se añade gota a gota.

Reactivo para detener la reacción: TCA 10 g, HCl 10.35 ml, llevados a 250 ml. Filtrar 3 veces con papel Whatman y guardar protegido de la luz a temperatura ambiente.

Protocolo:

1. Poner baño a 30 °C.
2. Vertir 2 ml del coctel de ensayo preparado en cada tubo (marcar cada tubo con el tiempo que se vaya a dejar correr la reacción). Hacer por lo menos 6 tiempos diferentes entre 0 y 16 minutos (ej. 0', 1', 2', 4', 8', y 16').
3. Al tubo marcado como tiempo " 0 ", se le agrega 1 ml del *Reactivo de Parar* y posteriormente se le añaden 0.5 mg de proteína del extracto crudo. Agitar en vortex.
4. Iniciar las reacciones con 0.5 mg de proteína a cada tubo.
5. Transcurrido el tiempo de incubación de cada tubo, se detiene la reacción agregando 1 ml del *Reactivo de Parar*.

6. Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm

7. Leer la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 500 nm.

La actividad específica se reporta en:

$$\mu\text{mol } \gamma\text{-glutamil hidroxamato producido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg total proteína}^{-1}$$

GS (Ensayo de hidroxamato transferasa) Shapiro y Stadtman, 1970 citado en (Farnden & Robertson, 1980).

Procedimiento. La mezcla de reacción es preparada con los siguientes volúmenes de los reactivos: 2 ml de amortiguador de Imidazol, 4 ml de glutamina, 0.6 ml de MnSO_4 , 0.8 ml de ADP, 0.4 ml de arsenato y 2.2 ml de H_2O .

Materiales y reactivos

-Amortiguador de Imidazol-HCl, 0.5 M, pH 7.0

-Glutamina, 0.15 M.

-Sulfato de manganeso, 0.1 M.

-ADP, 0.01 M, pH 7.0.

-Arsenato de Sodio, 1.0 M, pH 7.0.

-Solución de hidroxilamina: mezclar volúmenes iguales de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 1 M y NaOH 1 M justo antes de usar.

-Reactivo de FeCl_3 : Mezclar 10% w/v $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 24% w/v ácido tricloroacético, HCl 6M y agua en proporciones 8:2:1:13.

- γ -glutamil hidroxamato, 10 mM (estándar).

El ensayo de transferasa contiene 0.5 ml de la mezcla de reacción, extracto y agua hasta llegar a un volumen final de 0.9 ml. Incubar a 25 °C por 5 min. La reacción es iniciada por la adición de 0.1 ml de solución de hidroxilamina y se incuba a 25 °C por 15 min. La reacción de detiene añadiendo 2 ml del reactivo de FeCl_3 . Incluir un control negativo el cual no tendrá hidroxilamina. Los ensayos se centrifugan a 5000 rpm por 10 min y la absorbancia del sobrenadante es medida a 540 nm. El valor de la absorbancia se sustituye en la siguiente fórmula:

La actividad de transferasa es expresada como:

$$\mu\text{moles de } \gamma\text{-glutamil hidroxamato} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$$

RESULTADOS

En este trabajo se analizaron de manera sistemática tres medios para el crecimiento de *D. hansenii* MMS, MMDh, y SN-Asn-Dh (ver Material y Métodos). Se utilizó inicialmente el medio MMS, el cual se emplea generalmente para crecer a *S. cerevisiae*. Lo que se observó fue que *D. hansenii* presentó un tiempo de duplicación cuatro veces mayor que *S. cerevisiae* en condiciones sin NaCl en el medio. Cuando se le adicionó NaCl, el tiempo de duplicación de *D. hansenii* se redujo de 8 a 6 hrs, mientras que *S. cerevisiae* aumentó su tiempo de duplicación conforme se incrementaba la concentración de NaCl (Fig. 1 y Tabla 3).

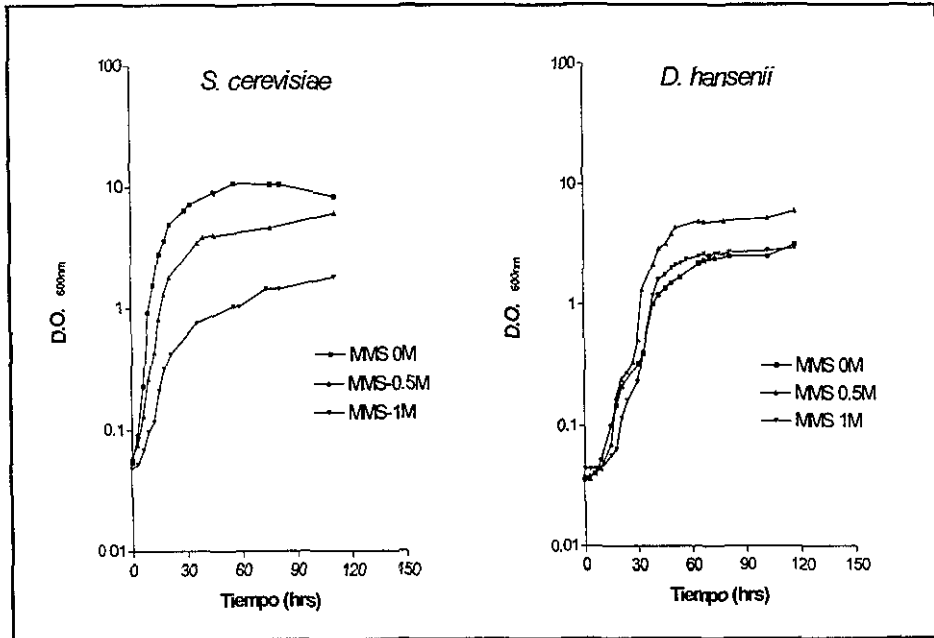


Fig. 1. *S. cerevisiae* y *D. hansenii* fueron cultivadas en el medio MMS. La velocidad de crecimiento se ve modificada en *S. cerevisiae* cuando se le adiciona NaCl al medio, mientras que *D. hansenii* no modifica sustancialmente sus tiempos de duplicación en presencia de NaCl a pesar de que la velocidad con la que crece *D. hansenii* en comparación con *S. cerevisiae* es muy lenta.

Medio de cultivo		<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. hansenii</i>
MMS	[NaCl]	T. D.	T. D.
	-----	2 h	8 h
	0.5 M	3.8 h	6 h
	1 M	5.2 h	6.5 h

Tabla 3.- Tiempos de duplicación de *S. cerevisiae* y *D. hansenii* cultivadas en el medio MMS a diferentes concentraciones de NaCl

Paralelamente se prepararon medios mínimos sólidos, suplementados con los 20 aminoácidos, para detectar posibles auxotrofas. No se encontró ninguna, pero se observó que los aminoácidos que permitían un mejor crecimiento fueron: asparagina (Asn), glutamina (Gln) y prolina (Pro); de estos tres, la Asn demostró ser la mejor fuente de nitrógeno (datos no mostrados).

En la literatura se reportó un medio de crecimiento para *D. hansenii* (Norkrans y Kylin, 1969), el cual fue probado y modificado; a este medio se le denominó MMDh (ver Material y Métodos). En dicho medio se observó que *S. cerevisiae* redujo ligeramente sus tiempos de duplicación en comparación con el medio MMS, además en condiciones de alta osmolaridad 0.5 M de NaCl, su tiempo de duplicación es muy similar al presentado en condiciones sin NaCl. Por otro lado, *D. hansenii* redujo su tiempo de duplicación a casi la mitad que el mostrado en MMS. Como se puede observar en la tabla 4, los tiempos de duplicación para *D. hansenii* en las tres primeras condiciones (0, 0.5 y 1M), no presenta una diferencia significativa, pero se puede evidenciar que en presencia de sal se reducen los tiempos de duplicación. Dicho fenómeno también se presentó en el medio MMS (Fig. 2 y Tabla 4).

El medio MMDh se modificó en el laboratorio; así, se sustituyó la fuente de nitrógeno, cambiando el sulfato de amonio por asparagina a una concentración de 7.5 mM, ya que como se reportó anteriormente permitía un mejor crecimiento. A este nuevo medio se le denominó SN-Asn -Dh (ver Material y Métodos).

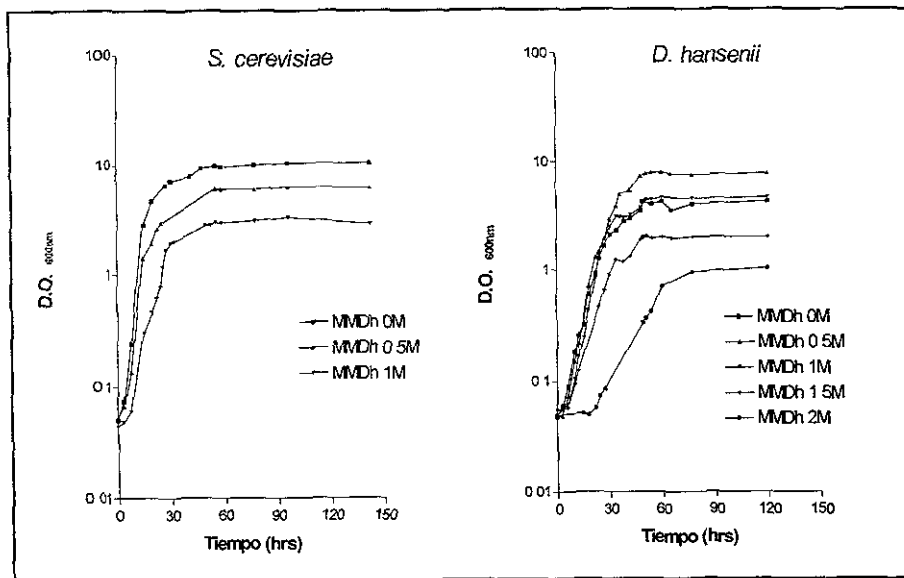


Fig. 2. El medio MMDh, permite un mejor crecimiento que se traduce en una reducción en el tiempo de duplicación para ambas cepas. *S. cerevisiae* no modifica de manera significativa sus tiempos de duplicación; *D. hanseni* lo reduce de manera drástica, casi a la mitad del tiempo presentado en MMS.

Medio de cultivo		<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. hanseni</i>
MMDh	[NaCl]	T. D.	T. D.
	-----	2 h	4.8 h
	0.5 M	2.2 h	4.2 h
	1 M	4.5 h	4.0 h
	1.5 M	-----	6 h
2 M	-----	11 h	

Tabla 4- Tiempo de duplicación de *S. cerevisiae* y *D. hanseni* en medio MMDh en diferentes condiciones de estrés salino. Los TD de *D. hanseni* en las primeras 3 condiciones de molaridad, casi no varían. *S. cerevisiae* reduce su tiempo de duplicación y entre 0 y 0.5 M presentan casi el mismo tiempo de duplicación.

Al crecer ambas cepas en dicho medio no se observó una reducción en los tiempos de duplicación, pero lo que fue evidente es que el tiempo de duplicación de 4 hr se mantuvo hasta una molaridad de 1.5 M; asimismo, se observó que este medio permitía un mayor crecimiento, ya que se registró, para ambas cepas, una densidad óptica (D.O. _{600nm}) mayor a

10, en comparación al medio MMS que sólo permitió un crecimiento por debajo de esta densidad (Fig 3 y tabla 5).

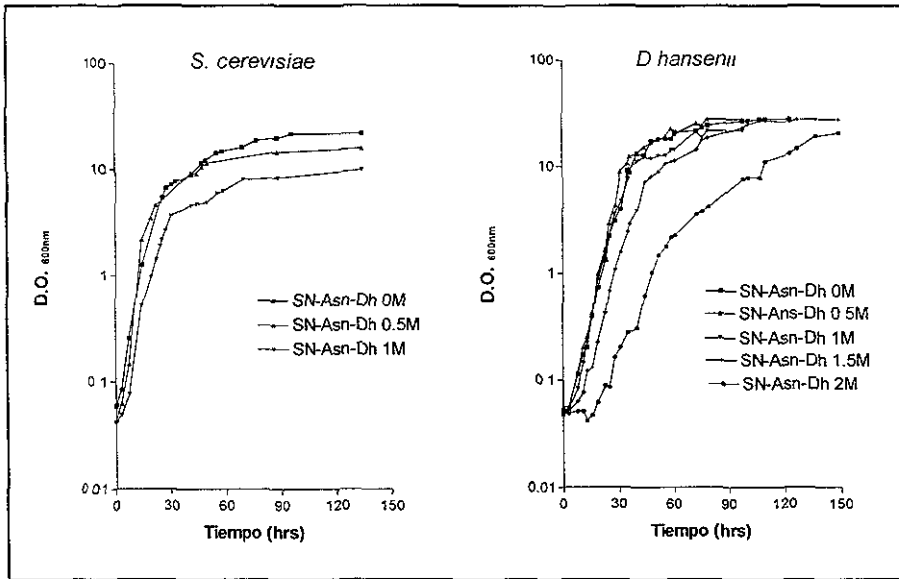


Fig. 3. Cuando se cambió la fuente de nitrógeno, las curvas de crecimiento no mostraron una diferencia contrastante cuando se adiciona sal al medio.

Medio de cultivo		<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. hanseni</i>
SN-Asn-Dh	[NaCl]	T. D.	T. D.
	-----	2.4 h	4 h
	0.5 M	2.4 h	3.8 h
	1 M	3.6 h	4 h
	1.5 M	-----	4 h
	2 M	-----	7.5 h

Tabla 5.- Tiempos de duplicación obtenidos para *S. cerevisiae* y *D. hanseni* cuando se cambió la fuente de nitrógeno por Asn a una concentración de 7.5 mM.

Debido a que el medio SN-Asn-Dh permitía una velocidad de crecimiento igual que el medio MMDh, así como también un mayor crecimiento celular en presencia de NaCl, *D. hanseni* parecía contender mejor con la alta osmolaridad producido por el NaCl, seleccionamos este medio para medir la actividad específica de GDH, GOGAT y GS, enzimas relacionadas con la asimilación de amonio. La determinación de las actividades

específicas se realizó por los métodos de Doherty (1970), Ferguson & Sims (1974) y Roon y cols. (1974) respectivamente.

GDH

Se determinó la actividad específica en el medio SN-Asn 7.5mM-Dh en 5 diferentes concentraciones sin sal y con 0.5, 1, 1.5 y 2M de sal, según el método de Doherty (1970).

Cuando se cultivó a *D. hansenii* en el medio SN-Asn 7.5 mM-Dh en ausencia de NaCl, esta enzima presentó una actividad específica de $0.15 \mu\text{mol}$ de NADPH oxidado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ total proteína $^{-1}$; en cambio, cuando fué cultivada en presencia de NaCl, la actividad específica registrada de la enzima fue 3 veces más alta en todas las condiciones con NaCl (0.5, 1, 1.5 y 2M), presentando un pico máximo de actividad a una concentración de 1M de NaCl (Fig. 4 y tabla 6). Con base en lo anterior, se decidió que las siguientes determinaciones enzimáticas se realizarían en condiciones de 0 y 1M de NaCl.

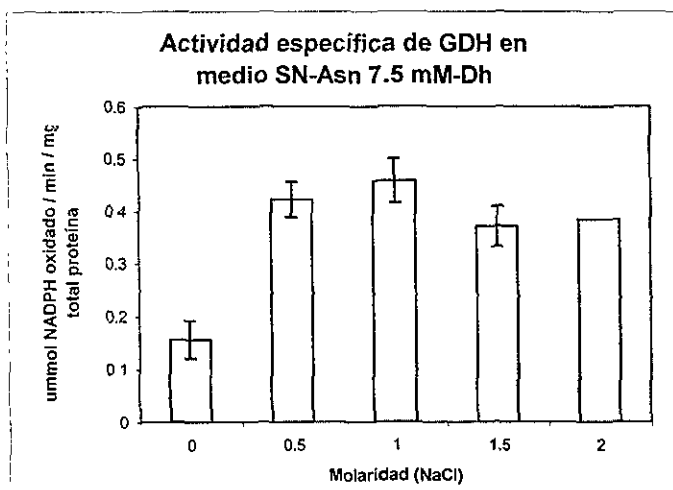


Fig 4.- La enzima GDH de *D. hansenii* cuando se cultivó en el medio SN-Asn 7.5 mM-Dh presenta una actividad específica de $0.15 \mu\text{mol}$ de NADPH oxidado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ total proteína $^{-1}$ en ausencia de sal. Cuando se crece en condiciones de sal, la enzima aumenta sus niveles de actividad en promedio tres veces más.

Tabla de Actividades específicas de las enzimas GDH, GS y GOGAT de <i>D. hanseni</i>				
Medio	Enzima	[NaCl]	$\mu\text{mol cofactor oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína total}^{-1}$	Desviación estandar.
SN-Ans 7.5 mM-Dh	GDH ^{1*}	0M	0.15547	± 0.0357
		0.5M	0.4226	± 0.0338
		1M	0.45816	± 0.0422
		1.5M	0.37125	± 0.0385
		2M	0.384	± 0.001
Sn-Asn 1.5 mM-Dh	GDH ^{1*}	0M	0.1812	± 0.0541
		1M	0.451	± 0.0665
	GDH ^{1**}	0M	0.0315	± 0.002121
MMDh (1.5 mM Asn)	GDH ^{1*}	0M	0.0725	± 0.00070
	GDH ^{1**}	0M	0.0468	± 0.00169
Sn-Asn 1.5 mM-Dh	GOGAT ²	0M	ND	\pm
		1M	ND	\pm
	GS ³	0M	ND	\pm
		1M	ND	\pm
	GOGAT ⁴	0M	0.0217	± 0.01903
		1M	0.0308	± 0.0277
	GS ⁵	0M	0.054	± 0.0056
		1M	0.105	± 0.0325

Tabla 6 - Actividades específicas de las tres enzimas que participan en la asimilación del amonio, obtenidas con diferentes metodologías en los medios señalados en presencia y ausencia de sal. *Cofactor NADPH, **Cofactor NADH, ¹método de Doherty (1970), ²método de Ferguson & Sims (1974), ³método de Roon et al (1974), ⁴método de Boland y Benny (1977), ⁵método de Shapiro y Stadtman (1970)

GS y GOGAT

Inicialmente se utilizaron los métodos de Ferguson & Sims (1974) y Roon y cols. (1974) para medir respectivamente las actividades específicas de estas dos enzimas.

Para determinar la actividad de GOGAT, se utilizó un inhibidor competitivo de glutamina; el más utilizado es azaserina (Igeño et al., 1993) (Fig 5).

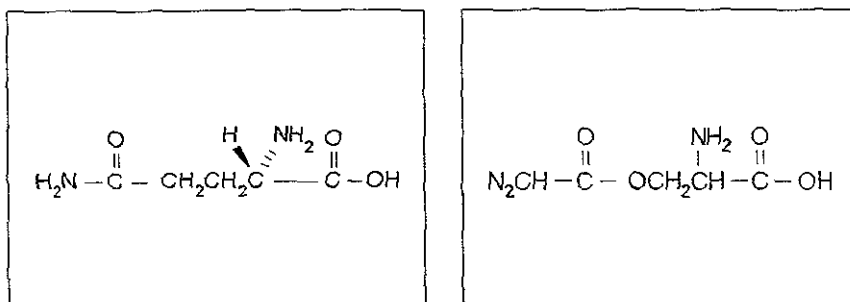


Fig. 5. Estructura de la glutamina (izquierda) y de la azaserina (derecha).

A las pendientes obtenidas del ensayo sin inhibidor se le restan las del ensayo con inhibidor. La diferencia es la pendiente por minuto con la cual se calcula la actividad específica. En los resultados obtenidos, las muestras con y sin inhibidor presentaron pendientes similares, por lo que al ser restadas y calcular la actividad específica dieron un resultado de $0.0015 \mu\text{mol de NADH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína total}^{-1}$, lo cual indica una baja actividad de GOGAT.

Por lo que respecta a GS, no se pudo registrar actividad por el método arriba mencionado en ninguna de las dos condiciones de sal, en comparación al control *S. cerevisiae*.

Se sabe que en *Salmonella typhimurium* el ciclo GS/GOGAT es utilizado en condiciones limitantes de nitrógeno ($\leq 2 \text{ mM}$). Esto se debe por que la GS tiene una alta afinidad por el amonio. No obstante cuando hay altas concentraciones externas de amonio este ciclo decrece, debido al decremento en la actividad de GS, que ocurre como consecuencia de una modificación covalente debido a una adenilación por medio de una adeniltransferasa. En contraste con la GDH, la cual funciona eficientemente sólo a altas concentraciones de NH_4^+ externo, pues su afinidad por este sustrato es baja (Yan *et al.*, 1996).

Por lo anterior, pensamos que el exceso de asparagina como fuente de nitrógeno, podría estar activando la vía de GDH e inhibiendo la vía GS/GOGAT. Debido a esto se decidió reducir la concentración de la fuente de nitrógeno en nuestro medio de 7.5mM a 1.5mM. Lo que se esperaba al disminuir la concentración de amonio en el medio era generar una condición limitante de nitrógeno, con lo cual se permitiría activar la vía GS/GOGAT y así poder medir la actividad de dichas enzimas. Se realizó la curva de crecimiento correspondiente y se comparó con los datos obtenidos de la curva de crecimiento en medio Sn-Asn 7.5 mM-Dh. Lo que se aprecia es que ambas curvas presentaron el mismo tiempo de duplicación (Fig. 6 y tabla 7).

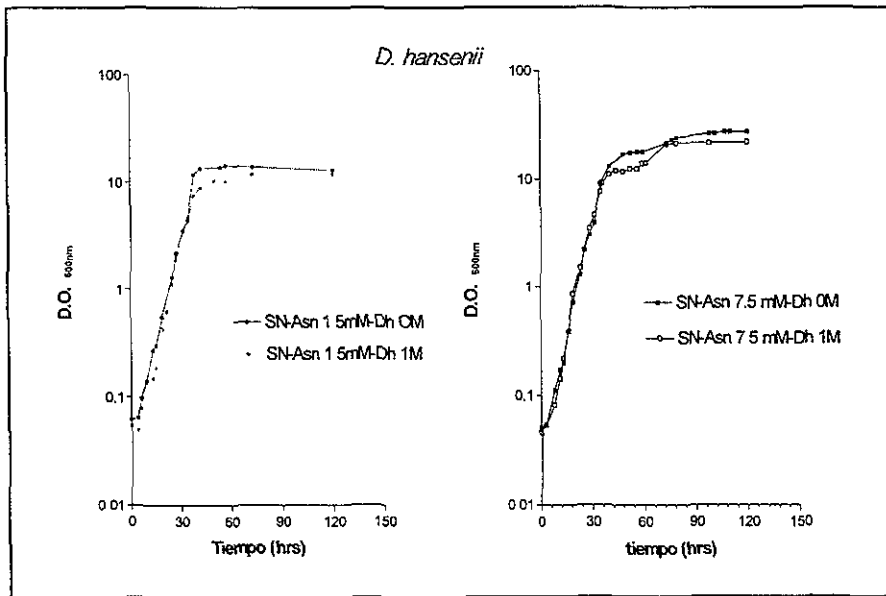


Fig 6. *D. hansenii*, en condiciones limitantes y no limitantes de nitrógeno, presenta los mismos tiempos de duplicación. El medio con Asn a una concentración de 7.5 mM permite un mayor crecimiento en la fase estacionaria.

Medio de cultivo	[NaCl]	Asn [1.5 mM]	Asn [7.5 mM]
Sn-Asn -Dh	----	4.7 h	4.0 h
	1M	4.1 h	3.8 h

Tabla 7.- Los tiempos de duplicación de *D. hanseni* son similares en ambas concentraciones de Asn. El td en la condición 1.5 mM de Asn en ausencia de NaCl fue el más alto. Este fenómeno se presentó en todos los nuestros casos registrados.

Por lo expuesto anteriormente, se procedió la medición enzimática con este medio utilizando los métodos anteriores, sin embargo se obtuvieron resultados similares. Se decidió entonces probar con otra una técnica reportada para las enzimas en cuestión (GS/GOGAT). Los métodos utilizados para GOGAT fueron los de Boland y Benny (1977) y los de Shapiro y Stadtman (1970) para GS (ver Material y Métodos).

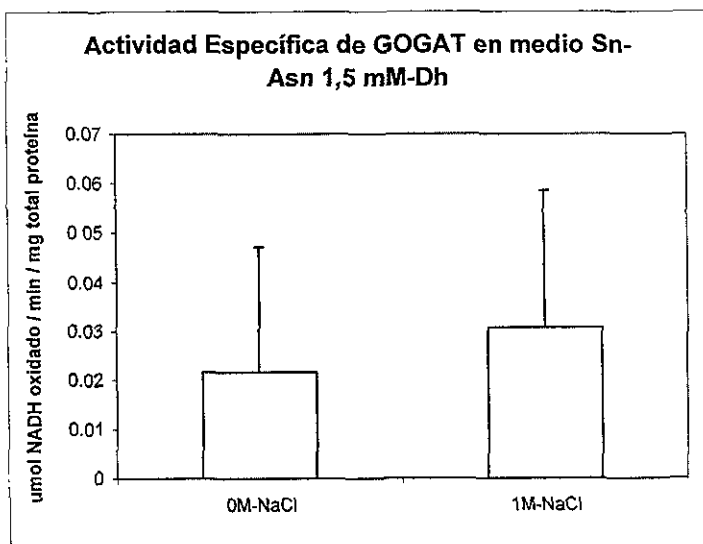


Fig.7. Actividad específica de GOGAT en *D. hanseni* cultivada en medio Sn-Asn 1.5 mM-Dh, en dos diferentes concentraciones de sal. La A.E. registrada en condiciones con sal, llega a ser de hasta cinco veces la actividad registrada en condiciones sin sal.

En el caso de la GOGAT, lo que encontramos fue una actividad de 0.02 μmol de NADH oxidado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ total proteína $^{-1}$ en condiciones sin NaCl, mientras que en

condiciones de 1M de NaCl, la actividad se incrementó hasta dos veces (Fig. 7 y Tabla 6). Hay que señalar que la desviación estándar es muy grande.

La actividad de la enzima GS presentó un fenómeno similar. Cuando se creció a *D. hansenii* en presencia de sal, se registró una mayor actividad enzimática en comparación con las actividades presentadas al cultivarse sin sal. La actividad registrada para las condiciones sin sal fueron de 0.05 μmol de NADH oxidado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ total proteína⁻¹, incrementándose hasta dos veces la actividad de la enzima en presencia de sal (Fig. 8).

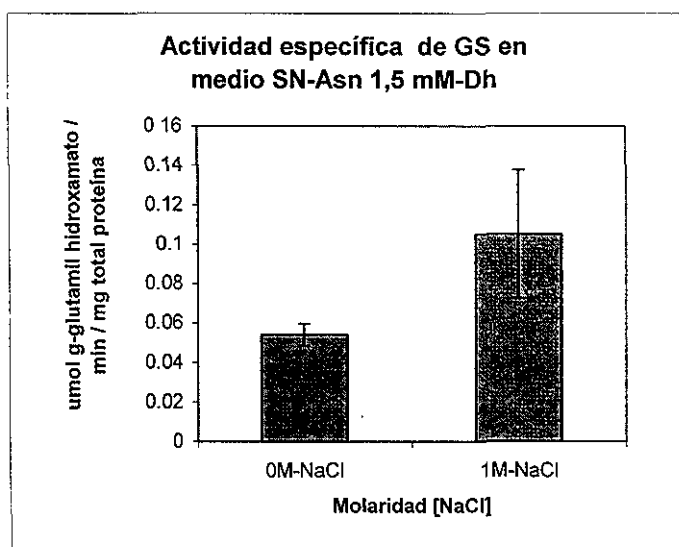


Fig. 8. Actividad específica de GS de *D. hansenii* cultivada en medio Sn-Asn 1.5 mM-Dh sin sal y con 1M de sal. Se puede observar que cuando se crece a *D. hansenii* en presencia de sal la actividad específica que presenta dicha enzima llega a ser del doble a la registrada en condiciones sin sal

Sin embargo, aunque se pudo cuantificar cierta de actividad específica, el resultado es una actividad diez veces menor que la que se determinó para *S. cerevisiae* (Fig. 9).

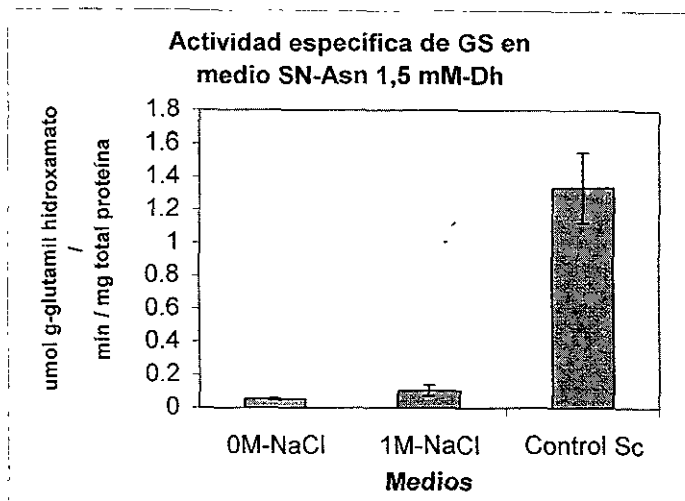


Fig 9 - Tanto *D. hansenii* como *S. cerevisiae* fueron cultivadas en condiciones limitantes de nitrógeno. La actividad de GS registrada en la levadura *S. cerevisiae* es diez veces mayor que la registrada en *D. hansenii* en presencia y ausencia de sal.

Posteriormente nos enfocamos a determinar la actividad de la enzima GDH, de la cual se determinó la actividad específica en esta condición limitante de nitrógeno. Lo que encontramos fue que la enzima se comportó de manera similar en las dos condiciones de nitrógeno (7.5 mM y 1.5 mM) (Fig. 10), esto es, en ausencia de sal y con 1.5 y 7.5 mM de asparagina como fuente de nitrógeno. La actividad observada fue de $0.155 \mu\text{mol de NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg total proteína}^{-1}$, mientras que en presencia de sal con 1.5 y 7.5 mM de Asn, la actividad presentada fue de $0.45 \mu\text{mol de NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg total proteína}^{-1}$.

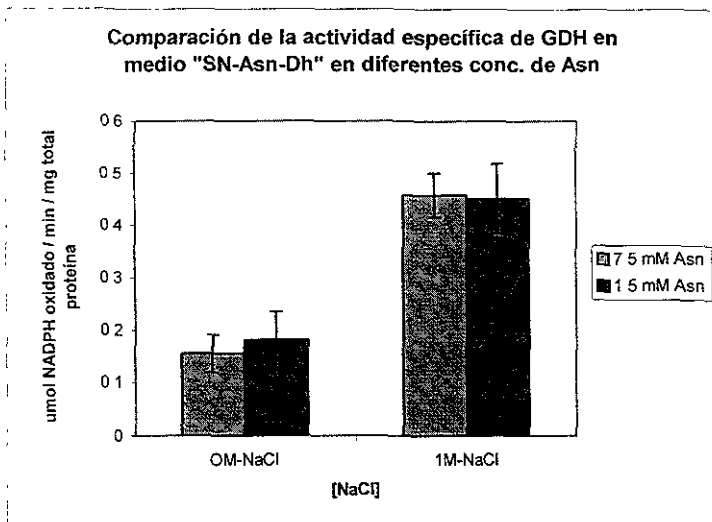


Fig 10.- Las actividades enzimáticas de GDH de *D. hansenii*, en 7.5 y 1.5 mM de Asn en las dos condiciones de NaCl (0 y 1 M), fueron muy similares. La actividad en 1.5 mM se incrementa aproximadamente tres veces en condiciones tanto con NaCl como con 7.5mM de Asn.

Por otro lado, se ha visto que la enzima GDH de algunos organismos además de presentar una actividad NADP⁺-GDH dependiente, presenta una actividad dependiente de NAD⁺. Por esta razón, se realizaron ensayos enzimáticos para determinar si la enzima GDH de *D. hansenii* presenta actividad con ambos cofactores en condición limitante de nitrógeno, pero con Asn y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en ausencia de sal.

Como podemos observar en la figura 11, la enzima GDH presentó un mejor funcionamiento y preferencia por el cofactor NADPH tanto con asparagina como con sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno; no obstante, las células obtenidas del medio con asparagina tienen una mayor actividad de la enzima que las que provienen del medio con sulfato de amonio. Asimismo, la actividad registrada con el cofactor NADH fue de 0.046 μ mol para la condición con sulfato de amonio y de 0.035 μ mol para la condición con asparagina.

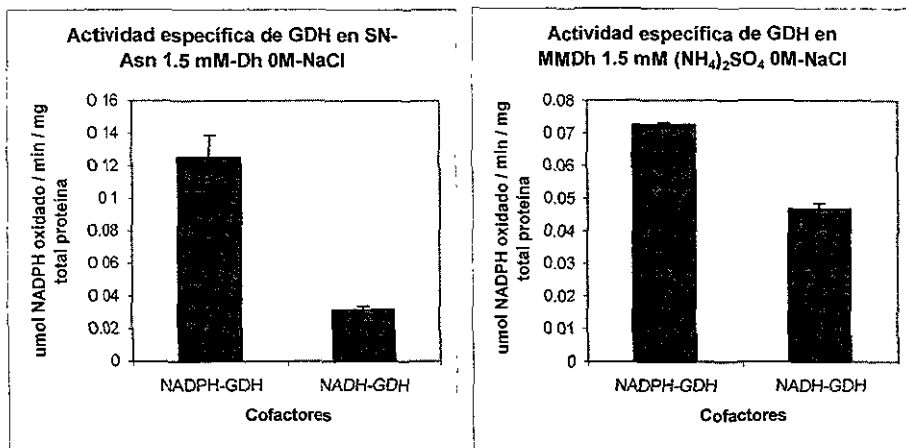


Fig 11.- Actividades de la enzima GDH en el medio Sn-Asn-Dh en condiciones limitantes de nitrógeno. El cofactor con el que se encontró mayor actividad fue NADPH en el medio con Asn, mientras que con el cofactor NADH fue de 0.04 en los dos medios.

DISCUSION

De los tres medios aquí probados, el que permitió una velocidad de crecimiento mayor y mostró una mayor masa celular reflejado en la *D. O.* que alcanza, fue el medio denominado **Sn-Asn-Dh**. Dicho medio fue reportado por Norkrans y cols. (1969) y modificado en nuestro laboratorio. El hecho de que *D. hansenii* pueda crecer más en este medio que en los otros dos se debe a que este medio está suplementado con sales de potasio y de sodio y que la asparagina es una mejor fuente de nitrógeno, ya que es más fácilmente metabolizada que el sulfato de amonio.

Por otro lado, cuando se aumentó la concentración de NaCl en los diferentes medios, la levadura *S. cerevisiae* aumentaba su fase *lag* así como su tiempo de duplicación, mientras que *D. hansenii* presentaba el fenómeno inverso. Esto era de esperarse, ya que *D. hansenii* es una levadura marina y por lo tanto posee un metabolismo diseñado y adaptado que le permite crecer bajo condiciones de alta salinidad. Por lo anterior se puede decir que *D. hansenii* más que ser una levadura halotolerante es una levadura halófila, mientras que *S. cerevisiae* parece ser halotolerante.

Asimismo, si comparamos los tiempos de duplicación de la curva de crecimiento de *D. hansenii* cultivada en medio SN-Asn-Dh en ausencia y presencia de NaCl, vemos que éstos se mantienen en un rango de 4.0-4.5 hrs. La duración de la fase *lag* se incrementa de manera directa con el aumento de NaCl. Probablemente este periodo de tiempo es el que le toma a *D. hansenii* ajustar su potencial osmótico interno para posteriormente comenzar a crecer.

De los ensayos enzimáticos de GDH, GS y GOGAT realizados en el medio Sn-Asn-Dh con sulfato de amonio y asparagina como fuentes de amonio en condiciones limitantes y no limitantes de nitrógeno en ausencia y presencia de 1M de NaCl, encontramos lo siguiente:

GDH

La enzima GDH-NAPDH dependiente, cuando *D. hansenii* se cultivó en el medio anteriormente mencionado a una concentración de 7.5 mM de Asn, *mostró un aumento de 3 veces en la actividad enzimática en condiciones de alta salinidad (1M de NaCl) en comparación a cuando se encuentra en ausencia de NaCl.* Este incremento en la actividad tal vez se debe a que en condiciones de estrés osmótico *D. hansenii* incrementa la tasa de producción de glutamato a través de la enzima encargada de sintetizarlo (GDH), pues este aminoácido se ha reportado como un osmolito protector en diferentes organismos y se sabe que en otros organismos se emplea para contender con el estrés osmótico extracelular (Yancey 1982; Blomberg 1992; Csonka, 1989; Dall'asta, 1999).

Desde el punto de vista metabólico, el glutamato es de gran importancia, ya que constituye una de las dos rutas de entrada de amonio a la célula en la asimilación de nitrógeno; asimismo, este aminoácido es esencial en la producción de otros aminoácidos, como glutamina, aminoácido que constituye la otra ruta de entrada del amonio; prolina y arginina, a través de transaminaciones; derivados de aminoácidos, etc. Finalmente, la producción eficiente de glutamato y los productos de éste, repercute en la capacidad de la célula para llevar a cabo la síntesis de proteínas.

GS/GOGAT

Cuando se intentó determinar la actividad específica de las enzimas de la ruta GS/GOGAT, no se obtuvieron resultados concluyentes. Se ha reportado que la vía GS/GOGAT se activa en condiciones limitantes de nitrógeno (≤ 2 mM) (Yan, 1996); debido a esto, decidimos disminuir la concentración de la fuente de nitrógeno del medio, de 7.5 y a 1.5 mM; esta última ya se considera condición limitante de nitrógeno. El inhibidor competitivo por excelencia de la GOGAT es la azaserina, que es un compuesto análogo a la glutamina. Este inhibidor se utilizó cuando se efectuaron los ensayos enzimáticos, sin embargo la actividad de la enzima no fue diferente en presencia de este compuesto, pareciendo no inhibir la enzima. Debido a lo anterior, se empleó la técnica de Boland y

Benny (1977), que no requiere de este inhibidor para medir la actividad enzimática de la GOGAT.

A pesar de implementar esta otra técnica las actividades específicas determinadas para la GOGAT en condiciones sin y con 1M de NaCl fueron muy bajas y no mostraron diferencias significativas, pues la desviación estándar de cada una de ellas es muy grande, lo que probablemente sugiere que la causa de esta baja o casi nula actividad enzimática se deba a que las condiciones de crecimiento utilizadas en este trabajo no sean las óptimas para medir esta enzima o que las técnicas no permitan una adecuada valorización de esta actividad enzimática.

Por otro lado, las actividades de GS en presencia de NaCl son dos veces mayores que las calculadas en la condición sin sal, 0.05 y 0.1 μmol de γ -glutamil-hidroxamato $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ total proteína⁻¹, respectivamente. No obstante, si comparamos estas actividades con las encontradas en nuestro control *S. cerevisiae*, vemos que ambas actividades son muy bajas.

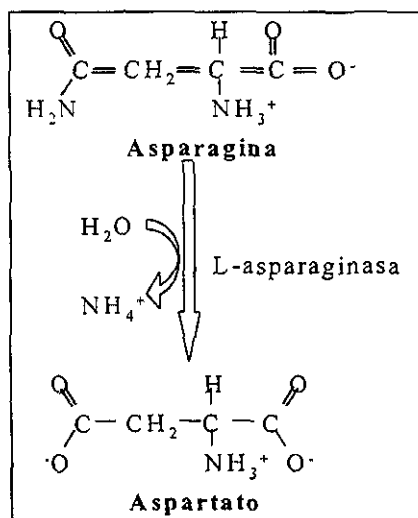
Así, en nuestro estudio, no se pudieron determinar las actividades específicas de estas dos enzimas de manera confiable. Lo anterior no quiere decir que los genes que codifican para dichas enzimas no estén presentes o que no puedan ser transcritos; no obstante se ha reportado que en algunos organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* y *Candida boidinii* la ruta metabólica en la cual están implicadas las enzimas GS y GOGAT no juega un papel significativo en la asimilación de amonio (Holmes, 1989).

En cuanto a la importancia metabólica de la glutamina, esta constituye una ruta similar a la del glutamato, involucrada en la entrada de amonio a la célula. La glutamina es precursor de aminoácidos como triptofano e histidina, de nucleótidos, aminoazúcares y glicoproteínas. Esto da una idea de la importancia de este aminoácido en el metabolismo integral de la célula, y es por lo anterior que la enzima (GS) que sintetiza a este aminoácido deba estar presente en *D. hansenii*. Debemos buscar condiciones adecuadas para medir eficientemente esta enzima en esta levadura marina.

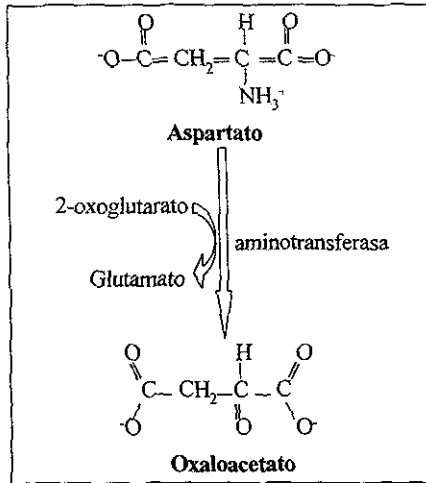
Finalmente, pensamos que la responsable de llevar a cabo la asimilación del amonio en condiciones limitantes y no limitantes de nitrógeno en *D. hansenii* es la enzima GDH-NADPH dependiente. Para demostrarlo, decidimos determinar la actividad enzimática de la GDH en condiciones limitantes de nitrógeno (1.5 mM Asn), encontrando que la enzima tiene actividades enzimáticas similares a las mostradas en condiciones no limitantes de nitrógeno (7.5 mM Asn) en presencia o ausencia de NaCl. Asimismo, se determinó la actividad de esta enzima en condiciones limitantes de nitrógeno pero con sulfato de amonio como fuente de amonio; la actividad registrada fue de $0.07 \mu\text{mol de NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg total proteína}^{-1}$ en comparación a la registrada en presencia de Asn como fuente de nitrógeno ($0.14 \mu\text{mol de NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg total proteína}^{-1}$). Esto correlaciona con lo encontrado en los cultivos sólidos (datos no mostrados), en donde se observa un mayor crecimiento de *D. hansenii* en los medios suplementados con Asn.

Esto también nos indica que la asimilación del amonio, con esta fuente de nitrógeno, no se lleva a cabo de manera tan eficiente como lo hace con asparagina.

Cuando la asparagina se encuentra en el medio intracelular, es hidrolizada por una L-asparaginasa, generando aspartato y amonio (NH_4^+), como se muestra en la siguiente reacción:

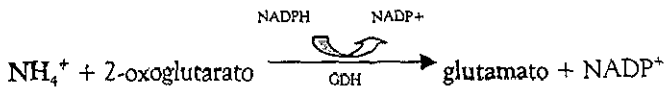


El aspartato es transaminado por una transaminasa generando una molécula de glutamato y otra de oxaloacetato como producto de la reacción (Voet & Voet, 1995).



Nosotros pensamos que la causa de que se observe un mejor crecimiento cuando se administra Asn al medio en lugar de sulfato de amonio, se debe a lo siguiente:

El amonio generado de la hidrólisis de la asparagina es tomado por la enzima GDH para formar glutamato.



Por otro lado, la reacción que da origen al oxaloacetato a partir de aspartato origina como subproducto de la reacción una molécula de glutamato. De esta manera se podrían obtener dos moléculas de ácido glutámico, mientras que cuando se cultiva con sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno se obtiene sólo una molécula de ácido glutámico, lo que explicaría el por qué se observa un mejor crecimiento con asparagina como fuente de nitrógeno.

CONCLUSIONES

- ❖ El medio mínimo SN-Asn -Dh diseñado y probado en el laboratorio permite el crecimiento óptimo de la levadura marina *D. hansenii*.
- ❖ La asparagina favorece el crecimiento de *Debaryomyces hansenii* y *S. cerevisiae* cuando se utiliza como única fuente de nitrógeno.
- ❖ De manera general, los tiempos de duplicación de *D. hansenii* en presencia y ausencia de sal en medio con asparagina son similares, es decir, su crecimiento es independiente de la presencia de NaCl en el medio de cultivo; en cambio *S. cerevisiae* aumenta su tiempo de duplicación en presencia de esta sal. Esto nos sugiere que *D. hansenii* se comporta como una levadura halofílica mientras que *S. cerevisiae* se comporta como una levadura halotolerante.
- ❖ La actividad de la enzima Glutamato Deshidrogenasa dependiente de NADPH (GDH biosintética) de *D. hansenii* se incrementa por lo menos tres veces en presencia de 1M de NaCl en relación a la actividad registrada en ausencia de sal. Por otro lado la poza intracelular de glutamato no se incrementa cuando se crece a *D. hansenii* en presencia de 1M de NaCl. Lo anterior nos hace pensar que existe una inhibición de esta enzima en altas concentraciones intracelulares de NaCl, por lo que la célula probablemente incrementaría la síntesis de dicha enzima para compensar o más bien igualar o mantener los niveles basales de glutamato intracelular.
- ❖ Las actividades mostradas por la enzima GOGAT en condiciones limitantes de nitrógeno son muy bajas, no se observa inhibición en presencia de azaserina, y además presenta una desviación estándar muy grande, lo que sugiere que la actividad determinada pueda ser artefacto de la técnica empleada. Esto conlleva a probar otras técnicas mediante las cuales la actividad de dicha enzima sea detectable. Por otro lado, la enzima glutamino sintetasa (GS) pudo ser medida por el método de Shapiro y Stadtman (1970). A pesar de que las actividades son bajas, se observa un aumento en la actividad de la enzima en condiciones de 1M de NaCl, dos veces más, que en condiciones sin sal; esto nos sugeriría al igual que la enzima GDH, que el aumento en la concentración intracelular de NaCl afecta de manera negativa a esta enzima

decreciendo su actividad enzimática , por lo que la célula tendría que incrementar la síntesis de esta enzima.

- ❖ Cuando se comparan las actividades específicas de GS de la levadura *D. hansenii* con las observadas en el control (*S. cerevisiae*), las actividades específicas son diez veces menores en las mismas condiciones de crecimiento.
- ❖ La enzima GDH de *D. hansenii* tiene una actividad específica muy similar cuando se cultiva en concentraciones de 1.5 y 7.5 mM de asparagina en ausencia y presencia de NaCl, lo que sugiere que por esta vía se lleva a cabo principalmente la asimilación del amonio en esta levadura halotolerante.

REFERENCIAS

1. Adler, L. and L. Gustafsson. 1980. Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* 124:123-130.
2. Adler, L., A. Blomberg and A. Nilsson. 1985. Glicerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.* 162 (1):300-306.
3. Alexopoulos, C., Mims C. and Blackwell M. 1996. *Introductory Mycology*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA. p.p. 272-293.
4. Blomberg, A. and Adler, L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 33, 145-212.
5. Brown, A.D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriological Reviews.* 40, 803-846.
6. Brown, A.D. 1978. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* 17, 181-242.
7. Brown, A.D. 1990. *Microbial Water Stress Physiology. Principles and Perspectives*. Wiley, Chichester.
8. Brown, A.D. and Simpson, J.R. 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* 72, 589-591.
9. Brown, C.M. and B. Johnson. 1970. Influence of the concentration of glucose and galactose on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 64, 279-287.
10. Burn, V. J., P. R. Turner and C. M. Brown. 1974. Aspects of inorganic nitrogen assimilation in yeast. *Antonie van Leeuwenhoek.* 40, 93-102.
11. Csonka, L. N, 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53 (1):121-147.
12. Dall'asta, V., O. Bussolati, R. Sala, A. Parolari, F. Alamanni, P. Biglioli and G. Gazzola. 1999. The amino acids are compatible osmolytes for volume recovery after hypertonic shrinkage in vascular endothelial cells. *Am J. Physiol.* 276. 45:C865-C872.

13. Doherty, D. 1970. L-Glutamate dehydrogenases (yeast). *Methods Enzymol.* 17, 850-856.
14. Farden, K.J.F. and J.G. Robertson. 1980. *Methods Evaluating Biological Nitrogen Fixation.* Cap. 7 p.p.265-314.
15. Ferguson, A.R. and A.P. Sims 1974. The regulation of glutamine metabolism in *Candida utilis*: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *J. Gen. Microbiol.* 80, 159-171.
16. Galinski, E. A. and H. G. Trüper. 1982. Betain, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*. *FEMS Lett.* 13:357-360.
17. Harris, R. F. 1981. In "Water Potential Relations in Soil Microbiology" (Soil Science of America Special Publication No. 9) (J.F. Parr, W. R. Gardner & L. F. Elliot, eds). Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. p.p. 23-96.
18. Holmes, A.R., A. Collings, K.J. Farden and M.G. Shepherd. 1989. Ammonium assimilation by *Candida albicans* and others yeasts: evidence for activity of glutamate synthase. *J. Gen. Microbiol.* 135:1423-1430.
19. Igeño, M.I., F.J. Caballero and F. Castillo. 1993. Molecular and kinetic characterization of glutamate synthase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *J. Gen. Microbiol.* 139:2921-2929.
20. Jovall, P. A., I. Tunblad-Johansson and L. Adler. 1990. *Arch Microbiol.* 75. 287.
21. Kusnan, M. B., M. G. Berger and H. P. Fock. 1987. The involvement of glutamine synthetase/glutamate synthase in ammonia assimilation by *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 133:1235-1242.
22. Lehninger, A.L., D.L. Nelson and M.M. Cox. 1993. *Principles of Biochemistry.* Worth Publishers, New York. 2^o ed. p.p. 693-695.
23. Lomnitz, A., J. Calderón, G. Hernández and J. Mora. 1987. Functional analysis of ammonium assimilation enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 133:2333-2340.
24. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

25. Madkour, M., L.T. Smith and G.M. Smith. 1990. Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl Environ. Microbiol.* Sept. p.2876-2881.
26. Norkrans, B. 1969. The sodium and potassium contents of yeast differing in halotolerance, at various NaCl concentrations in the media. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 35:1-2.
27. Norkrans, B and Kylin A. 1969. Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation of salt tolerance in yeasts. *J. Bacteriol.* 100:836-845.
28. Richey, B., D.S. Cayley, M.C. Mossing, C. Kolka, C.F. Anderson, T.C. Farrar and M.T. Record. 1987. Variability of the intracellular ionic environment of *Escherichia coli*. Differences between in vitro and in vivo effects of ion concentrations on protein-DNA interactions and gene expression. *J Biol Chem.* 25;262(15):7157-64.
29. Roon, R.J., H.L. Even and F. Larimore. 1974. Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 118:89-95.
30. Sambrook, J. , E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. Vol. 3. A.3.
31. Schmidt-Nielsen, K. 1979. *Animal physiology: adaptation and environment.* Second Ed. Cambridge University Press. p.p. 285-32.
32. Tempest, D.W., J.L. Meers and C.M. Brown. 1970. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown rout. *Biochem J.* 117:405-407.
33. Voet, D. and J.D. Voet. 1995. *Biochemistry.* John Wiley & Sons, Inc. USA. 2^o ed.
34. Wilson, J. 1979. *Principles of animal physiology.* Second Ed. Macmillan Publishing Co. Inc. USA.
35. Yan, D., T.P. Ikeda, A.E. Shauger and S. Kustu. 1996. Glutamate is required to maintain the steady-state potassium pool in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93. 13: 6527-6531.
36. Yancey, P.H., M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowlus and G.N. Somero. 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte system. *Science.* 217, 1214-1222.