



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Efecto del pH y los iones monovalentes en el
transporte y metabolismo energético de
Debaryomyces hansenii

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

CHRISTIAN ADRIÁN CÁRDENAS MONROY

Tutor: DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ



MÉXICO, D. F.

MAYO 2010



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.

Efecto del pH y los iones monovalentes en el transporte y metabolismo energético de *Debaryomyces hansenii*

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Antonio Peña Díaz en el laboratorio 306-Oriente, del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Antonio Peña Díaz. Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Salvador Uribe Carvajal Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica en la parte experimental de la Dra. Martha Calahorra F. y la Q.F.B. Norma Sánchez S.; técnicos académicos del laboratorio 306-Ote. del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACyT (46521) y PAPIIT-UNAM (IN200307/18). Durante los estudios de maestría gocé de una beca nacional otorgada por CONACyT para la realización del presente proyecto de tesis.

El Jurado de Examen a Grado de Maestría, estuvo constituido por:

Presidente Dra. Marieta Tuena Instituto de Fisiología celular, UNAM

Vocal Dra. Marina Gavilanes Facultad de Química, UNAM

Secretario Dr. Juan Pablo Pardo Facultad de Medicina, UNAM

Suplente Dra. Bertha González Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Suplente Dr. Diego González Instituto de Fisiología Celular, UNAM

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Antonio Peña Díaz por ser guía constante de mi formación profesional y por todas sus enseñanzas tanto académicas como no académicas.
- A los miembros de mi Comité Tutorial, Dr. Salvador Uribe y Dr. Juan Pablo Pardo por cada uno de sus comentarios en el desarrollo de este proyecto y por la confianza que me hicieron sentir durante los exámenes tutorales.
- A todos y cada uno de los miembros de mi jurado por sus comentarios y críticas al trabajo escrito.
- A la secretaria del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del I.F.C., Rocío Romualdo; a la secretaria del programa de MDCB, UNAM, Leticia García; al laboratorista del laboratorio 306-Ote., I.F.C., René Flores, a todos ellos por su ayuda administrativa y a la bibliotecaria del I.F.C., Brisa Robles, por el material bibliográfico facilitado.
- A mis papás por su gran apoyo; por ser mis pilares y por depositar toda su confianza en mí.
- A mis compañeros de laboratorio y del IFC: Carlos G., Daniela C., Emmanuel V., Helber A., Luis L., Manuel S., Marissa C., Maritrini C., Martha C., Norma S., Paloma M., René F., y Sergio G., por permitirme aprender de ustedes tantas cosas, por hacer más amena la estancia en el laboratorio en las horas de trabajo y principalmente por su amistad invaluable.
- A mis amigos Alan, Daniela, Jonathan, Laura, Natllely y Victor por permitirme compartir con ustedes este tiempo.

- A Sandra y Cesar por ser como mis hermanos adoptivos y estar conmigo.
- A Alejandra A., Faviola T. y Zahuiti H. por ser mis grandes amigas y ser parte indispensable de mi vida.
- A Daniela A., Gisela R. y Rocio R. por las incontables platicas que me regalaron.
- A mis amigos de antaño: Gabriela P., Marcela R., Mayren A., Michelle M., Roberto S., y Viridiana M.
- A mi *Alma mater* la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de ella, a través de la Facultad de Química y el Instituto de Fisiología Celular.
- A Dios por otorgarme la paciencia, el entendimiento y la fe, para cumplir este proyecto.

DEDICATORIAS

- A mis papás; este trabajo es dedicado principalmente a ustedes, porque sin su confianza y apoyo hubiera sido imposible obtener el resultado final.
- A mis hermanos Ricardo y Luis, por mantener su confianza en mí; trabájenle duro, sigan adelante y no se desesperen.
- A mis tías Lula y Gela con mucho cariño a ustedes.
- A mi primo Alejandro; échale ganas.
- A mis sobrinas Ixchel e Itzae; comiencen desde ahora a construir su sueño.
- A mi madrina Tere, con mucho cariño.

*Porque es lo que hace la gente; se lanza
con la esperanza de poder volar.*

Alex Hítch.

ÍNDICE

	Página
1. Resumen	01
2. Abreviaturas	02
3. Palabras Clave	02
4. Introducción	03
• Levaduras como modelos celulares	03
• Importancia del pH	05
• Sistemas de transporte celular	07
• Metabolismo energético	08
• <i>Debaryomyces hansenii</i>	08
5. Justificación	11
6. Hipótesis	11
7. Objetivos	12
• Objetivo general	12
• Objetivos particulares	12

8. Materiales y Métodos	13
• Diagrama de flujo	13
• Crecimiento celular	14
• Incubación celular a pH constante	14
• Concentración interna celular de Na ⁺ y K ⁺	15
• Cinéticas de transporte	15
• Consumo de glucosa en <i>Debaryomyces hansenii</i>	16
• Producción de etanol	17
• Consumo de oxígeno	17
9. Resultados	18
• Volumen de NaOH ó KOH para mantener el pH	18
• Crecimiento celular	19
• Transporte de iones	21
➤ Concentración interna de Na ⁺ y K ⁺	21
➤ Cinética de transporte control	26
➤ Cinética de transporte ⁸⁶ Rb ⁺	28
➤ Cinética de transporte ²² Na ⁺	30
• Metabolismo energético	32
➤ Consumo de glucosa	32
➤ Producción de etanol	34
➤ Consumo de oxígeno	35

	Página
10. Discusión	38
11. Conclusiones	43
12. Perspectivas	44
13. Bibliografía	45
14. Anexo	50
• Homologías de la cepa utilizada	50
• Medios de cultivo	50
• Líquido de centelleo	51

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura, No.	Página
Figura 1.0 Modelo propuesto por González-Hernández y cols. en el 2004	04
Figura 2.0 Estructura del Glicerol y la Trehalosa	05
Figura 3.0 Comportamiento del crecimiento celular	19
Figura 4.0 Comportamiento del crecimiento de <i>Debaryomyces hansenii</i>	20
Figura 5.0 Tiempo de duplicación celular de <i>Debaryomyces hansenii</i>	21
Figura 6.0 Na ⁺ y K ⁺ interno (control)	22
Figura 7.0 Na ⁺ y K ⁺ interno, incubando sin NaCl (ajustando pH con NaOH)	23
Figura 8.0 Na ⁺ y K ⁺ interno, incubando con NaCl (ajustando pH con NaOH)	24
Figura 9.0 Na ⁺ y K ⁺ interno, incubando sin NaCl (ajustando pH con KOH)	25

Figura, No.	Página
Figura 10.0 Na ⁺ y K ⁺ interno, incubando con NaCl (ajustando pH con KOH)	25
Figura 11.0 Ajuste Michaeliano para ²² Na ⁺ (control)	26
Figura 12.0 Ajuste Michaeliano para ⁸⁶ Rb ⁺ (control)	27
Figura 13.0 Consumo de glucosa (control)	33
Figura 14.0 Consumo de glucosa, incubando sin NaCl (ajustando pH con NaOH)	33
Figura 15.0 Consumo de glucosa, incubando con NaCl (ajustando pH con NaOH)	34
Figura 16.0 Producción de etanol	35
Figura 17.0 Respiración (control)	36
Figura 18.0 Respiración, incubando sin NaCl (ajustando pH con NaOH)	37

Figura, No.	Página
Figura 19.0 Respiración, incubando con NaCl (ajustando pH con NaOH)	37
Tabla 1.0 Concentración iónica final del medio de incubación	18
Tabla 1.1 mEq utilizados de KOH ó NaOH en el medio de incubación	18
Tabla 2.0 Parámetros cinéticos para $^{86}\text{Rb}^+$ incubando sin NaCl	28
Tabla 3.0 Parámetros cinéticos para $^{86}\text{Rb}^+$ incubando con NaCl	29
Tabla 4.0 Parámetros cinéticos para $^{22}\text{Na}^+$ incubando sin NaCl	30
Tabla 5.0 Valores de concentración interna de Na^+ y K^+	40
Microfotografía de <i>Debaryomyces hansenii</i>	09

RESUMEN

El transporte en levaduras fue caracterizado durante el siglo pasado en *Saccharomyces cerevisiae* y a partir de éstos estudios es posible abordar el transporte iónico en otras especies de levadura a las que se les ha llamado no convencionales. *Debaryomyces hansenii* es una levadura que pertenece a este grupo (no convencional); se aisló del agua de mar y presenta las características de ser osmotolerante y alcalófila, lo que le permite crecer hasta en 4.0 M de NaCl y un pH de 10.0.

En este trabajo se estudió el transporte de los cationes monovalentes Na⁺ y K⁺ en *D. hansenii* luego de ser incubada tanto a pH ácido (6.0) como alcalino (8.0) y sus efectos en el metabolismo energético.

Adicionar 1.0 M de NaCl al medio de cultivo favorece el crecimiento y permite una alta acumulación de Na⁺. Por otro lado, durante una incubación a pH constante por 3 horas, *D. hansenii* acumuló altas concentraciones de Na⁺ o K⁺; el transporte iónico mostró una mayor afinidad por el Rb⁺ (utilizado como análogo al K⁺ en ensayos con isótopos marcados radioactivamente) que por el Na⁺, manteniendo como principal diferencia la velocidad de entrada entre el pH ácido (pH 6.0) y alcalino (pH 8.0).

En ensayos a pH ácido sobre el consumo de glucosa, se obtuvo un mayor consumo. En presencia de 1.0 M de NaCl el consumo de glucosa disminuyó y fue igual a ambos valores del pH. En general, el metabolismo energético no mostró grandes cambios al modificar el pH del medio; sólo el consumo de glucosa disminuyó al adicionar NaCl a la incubación.

Sin embargo, a pesar de la mayor afinidad por el Rb⁺ (K⁺) observado en los experimentos de cinética, cuando se incubaron con altas concentraciones de Na⁺, *D. hansenii* parece perder la selectividad y muestra una acumulación similar de cualquiera de los iones, Na⁺ y K⁺ a pH alcalino, sin mostrar variaciones significativas en su metabolismo energético.

ABREVIATURAS

$^{22}\text{Na}^+$ ----- Ion sodio radioactivo

$^{86}\text{Rb}^+$ ----- Ion rubidio radioactivo

ADH ----- Alcohol deshidrogenasa

CCCP ----- Carbonilcianuro *m*-clorofenilhidrazona

K_m ----- Constante de Michaelis

mEq ----- miliequivalentes

MES ----- Ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfónico

TEA ----- Trietanolamina

V_{max} ----- Velocidad máxima

YPD ----- Medio de cultivo (2% glucosa, 1% extracto de levadura y 2% peptona de gelatina)

PALABRAS CLAVE

Debaryomyces hansenii; cinéticas de transporte; crecimiento celular; levaduras; metabolismo energético; pH y transporte iónico.

INTRODUCCIÓN

Levaduras como modelos celulares

Tanto en ciencia básica o como en la ciencia aplicada, el uso de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio es prácticamente insustituible. En esta levadura se han descrito muchos de los procesos fisiológicos que nos ayudan a comprender la bioquímica moderna; sin embargo, no podemos dejar de lado a otras levaduras, que por sus características fisiológicas nos permiten entender lo que se sale de lo convencional.

La levadura convencional y principal modelo de estudio es *Saccharomyces cerevisiae*, misma a la que se le han determinado una multitud de parámetros que sirven para comparar los distintos modelos de levadura e incluso modelos en otros reinos de la naturaleza. Por otro lado, *Debaryomyces hansenii* es considerada una levadura no convencional, en parte por el complejo comportamiento fisiológico que presenta en su forma de adaptación a distintos hábitats, modificando su capacidad metabólica.

Norkrans (1966) y Hobot y Jennings (1981), descubrieron que *D. hansenii* puede crecer eficientemente en presencia de altas concentraciones de Na^+ a diferencia de *S. cerevisiae*, ya que se creía que *S. cerevisiae* carecía de una bomba de salida de Na^+ que sí pudiera estar presente en *D. hansenii*. En el 2001 se pudo describir que *D. hansenii* tiene dos sistemas de salida de Na^+ , las ATPasas ENA 1 y ENA 2 (1). Otra característica de *D. hansenii* es que a concentraciones altas de Na^+ en el medio, su potencial osmótico disminuye mediante la síntesis de glicerol como soluto compatible ya que el glicerol le otorga un efecto osmoprotector a la levadura para evitar la pérdida de agua (35). Igualmente se ha visto que entre los cationes del interior celular, en el caso de Na^+ o K^+ , se da un intercambio rápido entre ellos para mantener un balance entre la salida y la entrada de cationes (16, 35, 49).

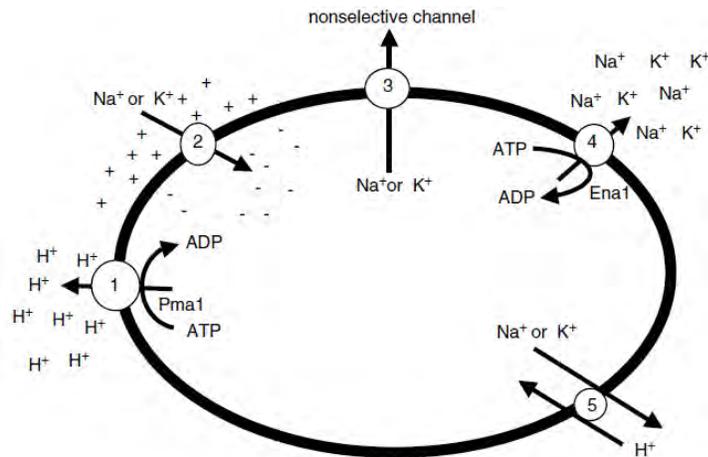


Fig. 1.0 Modelo propuesto en el 2004 por González-Hernández y cols. para ejemplificar un canal no selectivo de Na^+ o K^+ para *Debaryomyces hansenii* (marcado con el número 3).

González-Hernández y cols. en el 2004, reportaron que el transporte de cationes monovalentes presentó una inhibición del tipo no competitiva; es decir, que tanto para el ion Na^+ como para el ion K^+ el transporte al interior de la célula se da de una manera inespecífica o por distintos tipos de transportadores, y a su vez la expulsión de Na^+ o K^+ se da por un canal no selectivo (Fig. 1.0); sugiriendo con esto que el transportador catión/catión propuesto por Norkrans y Kylin (1969) y Thomé-Ortiz y cols. en 1998 no es el único medio por el que se intercambian los cationes en *D. hansenii*, además de que el mismo catión acumulado durante el cultivo por *D. hansenii* se expulsa en un medio libre de iones.

En concentraciones moderadas de sodio, *D. hansenii* sintetiza además del glicerol, otro osmoprotector, la trehalosa (Fig. 2.0). La trehalosa actúa a nivel de la estructura terciaria de las proteínas, intercalándose con los puentes de hidrógeno que se forman con el agua, para así mantener estabilizada la forma nativa de las proteínas (17); las estrategias “salt-in” y “compatible solute” son las principales que manejan los organismos halófilos, para contrarrestar el efecto del estrés osmótico que prevalece en su ambiente (38).

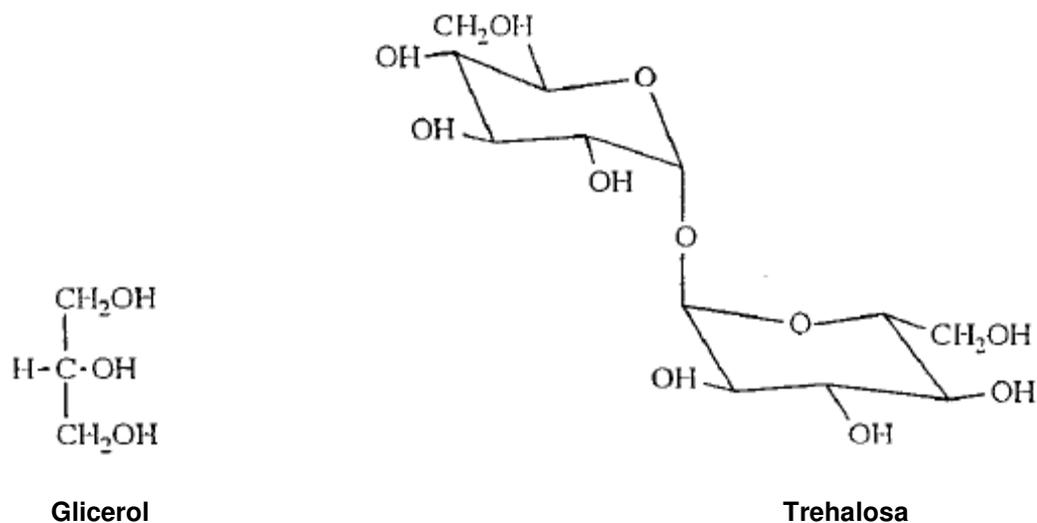


Fig. 2.0. Estructuras del glicerol y la trehalosa, solutos compatibles que sintetiza *D. hansenii* para contrarrestar el estrés osmótico ejercido en su ambiente, tomadas de Oren 1999.

Importancia del pH

Organismos multicelulares y unicelulares como las levaduras, tienen su interior mayormente compuesto de agua (representando entre el 80 y el 90% del peso celular); por lo tanto, casi todas las reacciones químicas al interior de la célula se realizan en un ambiente acuoso (45). El agua es la principal molécula que permite mantener una homeostasis ácida y alcalina, ya que al disociarse genera como producto un ion hidronio (H_3O^+) y un ion hidroxilo (HO^-), que pueden comportarse como ácido o base respectivamente.



Debido a esta característica particular del agua, la mayoría de los procesos celulares se llevan a cabo a un pH cercano al neutro (pH 7); el pH en la sangre de los humanos oscila entre 7.35 y 7.45.

Debido a que la tendencia del agua a ionizarse es muy baja (la concentración de iones de hidrógeno en agua pura es de 10^{-7}) pero de gran importancia ya que el pH puede afectar la estructura de una proteína y por consiguiente la actividad catalítica de las enzimas (29, 48), por ejemplo, en el caso de las proteínas que bombean protones, las moléculas de agua al interior de su estructura interna, participan en la formación de puentes de hidrógeno (24).

Las enzimas mantienen un pH óptimo limitado y el salirse de estos límites, repercute en la velocidad, afinidad y estructura de la proteína. El principal efecto del pH sobre las enzimas, se debe a cambios en sus grupos ionizables; las enzimas, como cualquier otra proteína, presentan diversos grupos ionizables, mismos que dependen del pH y sus constantes de ionización, contribuyendo en parte a la actividad catalítica (11).

Como se mencionó anteriormente, *S. cerevisiae* ha sido el principal modelo de estudio en los hongos; en ella se han caracterizado muchos de los fenómenos de transporte. Se ha visto que muchos de ellos dependen de la actividad de la ATPasa tipo P que bombea protones al exterior. La ATPasa tipo P es una enzima de membrana que produce cambios en el pH externo y su actividad varía con: a) la concentración de K^+ en el medio para poder intercambiarlo por H^+ y así mantener un equilibrio eléctrico; b) con la alcalinidad del pH del medio. En 1972 Peña y cols, reportaron precisamente que el pH externo influye directamente sobre el interno, en presencia de un sustrato fermentativo (glucosa) donde la ATPasa plasmática expulsa protones, permitiendo con ello el aumento del pH interno (39). En *D. hansenii* el bombeo de protones también está estrechamente relacionado con el pH del medio, ya que ese bombeo se presenta si el pH del medio es más alcalino.

Por otro lado, el crecimiento celular indica de manera indirecta, en qué grado afecta el pH del medio a los procesos fisiológicos de la levadura, por lo que es de gran importancia prestarle atención al pH en ensayos bioquímicos. En las levaduras el pH óptimo de crecimiento está cercano a la neutralidad o ligeramente hacia el intervalo ácido; sin embargo, hay especies de levaduras que salen de estos límites y pueden crecer en un intervalo de pH de 2.0 a 9.0; tal es el caso de las levaduras marinas, que en el océano, deben adaptarse a un pH cercano a 8.0 o mayor. *D. hansenii* es un modelo representativo de un organismo marino; tiene la capacidad de crecer en la mayoría de los casos en un pH de entre 8.5 a 9.3, aunque se da el caso de la cepa IFO 10939 de *D. hansenii*, capaz de crecer a pHs desde 3.6 hasta 10.3 (26). *S. cerevisiae* es una levadura poco tolerante a ambientes alcalinos y no crece en pH alto (19).

Sistemas de transporte celular.

Las proteínas intrínsecas de las membranas están embebidas en la bicapa lipídica de la membrana celular; éstas proteínas en su conjunto llevan a cabo distintas funciones; sobresale el transporte al interior o al exterior de la célula, tanto de sustratos, metabolitos, o iones que le permiten mantener su funcionamiento (18). El transporte de iones o de sustancias polares ocurre en las membranas mediante la acción de proteínas específicas de transporte siguiendo distintas estrategias (transporte pasivo o transporte activo), mediante canales o transportadores (algunos llamados bombas). Los transportadores pueden pertenecer a distintos tipos: uniporte, simporte y antiporte (18, 31, 53) y se encargan de mantener la homeostasis iónica y del pH en la célula. Se pueden activar o reprimir según las condiciones predominantes tanto en el ambiente celular como el circundante a la célula. Los transportadores generan gradientes, por ejemplo, de concentración iónica, a través de la membrana que después son usados como fuente de energía para los canales iónicos y otras proteínas de transporte para bombear nutrientes a la célula.

Los transportadores y los canales iónicos realizan funciones muy diferentes:

- Las bombas, o translocadores primarios transportan iones contra un gradiente electroquímico mediante un proceso de transporte energético cuesta arriba acoplado a una fuente de energía como la hidrólisis del ATP.
- Los transportadores secundarios aprovechan el movimiento con una energía cuesta abajo de otro ion (18) o sustrato como en el simporte glucosa-protón⁺ (51). Estos sistemas de transporte, por su propiedad de saturación, pueden estudiarse mediante modelos cinéticos (31).
- El canal iónico por el contrario regula un transporte pasivo, simplemente catalizado por el movimiento energéticamente cuesta abajo de los iones, en muchos casos a tasas de conducción iónica muy alta (18).

Tanto las bombas iónicas como los canales iónicos y cotransportadores, comparten una propiedad fundamental, la capacidad para transportar iones en una manera selectiva, crucial para la operación de proteínas transportadoras de iones (18).

Metabolismo energético

En una levadura facultativa, los productos finales de la glucólisis y la respiración son etanol + CO₂, ó CO₂ + H₂O, respectivamente; dada su capacidad de llevar a cabo tanto la fermentación alcohólica como la respiración. Otros de los productos obtenidos en estos procesos son las moléculas de alta energía como las coenzimas reductoras (pares redox) y el ATP, siendo estas moléculas importantes fuentes de energía en las células.

La fuerza protón-motriz de las mitocondrias es la principal fuente de energía de la célula y está compuesta por dos componentes, el gradiente de pH y el potencial eléctrico de la membrana (10, 31). Cada uno de ellos es generado por diversos sistemas y sirven en gran parte para llevar a cabo la síntesis de ATP partiendo de ADP y Pi mediante la ATP sintasa a partir del gradiente electroquímico formado por la respiración (23). Otra vía por la cual se genera ATP, aunque en menor cantidad, es la vía glucolítica, ya que sólo genera 2 moléculas de ATP (neto) por cada molécula de glucosa a diferencia de la fosforilación oxidativa que genera 38 moléculas de ATP, siendo ésta última reacción la vía principal para generar ATP mediante el gradiente formado en la membrana interna mitocondrial por la cadena de transporte de electrones.

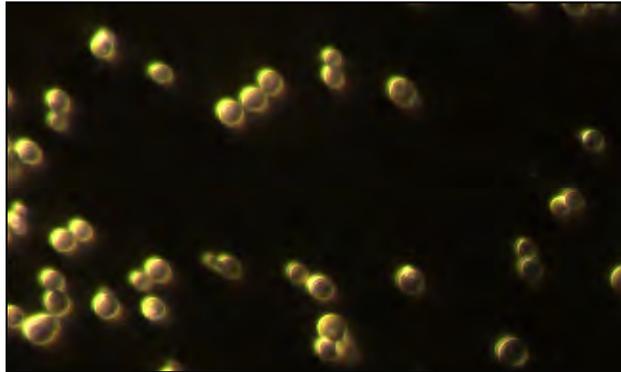
Debaryomyces hansenii

La clasificación taxonómica de esta especie se divide en:

Clase: Hemiascomycetos

Orden: Saccharomicetales

Familia: Saccharomicetaceae (en la actualidad no está bien definida la familia)



Microfotografía óptica de *Debaryomyces hansenii* (40x)

Esta levadura unicelular presenta ciertas características: puede permanecer en ambientes tales como en la superficie de ciertos alimentos con alto contenido de sal (algunos embutidos y quesos), (6, 14, 15, 25, 33, 37) hasta el ambiente marino; son los principales hongos en estos ecosistemas (3, 13). Se presentan en mayor abundancia individual o densidad poblacional en las zonas costeras y a una baja profundidad del océano (15). Esta especie ha desarrollado la capacidad de adaptarse a las condiciones del agua del mar, en la que varían según la zona, la temperatura y las cantidades de compuestos iónicos, principalmente el sodio, que presenta una concentración promedio de 0.5 M a 0.6 M, o del potasio, con una concentración promedio de 10 mM entre muchos otros.

D. hansenii es considerada un organismo marino, dado que se encuentra presente constitutivamente en aguas marinas como parte de la población microbiana (36); tiene la capacidad de crecer en condiciones características del océano: alta concentración de sales, bajas temperaturas, y pH alcalino. Con base en esta última característica se ha visto que la cepa de *D. hansenii* IFO 10939 puede crecer a un pH del medio de 3.6 a 10.3, con un crecimiento óptimo a pH 6.2 (26). La cepa Y-7426 a pH ácido (5.2) reprime su crecimiento y a pH neutro o alcalino (7.2 – 8.3) lo favorece (21).

Entre los hongos encontrados en aguas marinas, *Debaryomyces* es de los géneros que se presentan en mayor proporción. Sus especies pueden crecer *in vitro* en medios con altas concentraciones de azúcares, tanto de pentosas como hexosas, presentando un mejor desarrollo con glucosa (32). En esta fuente de carbono desarrolla su capacidad de respirar y fermentar (47) aunque algunos autores sostienen que *D. hansenii* es incapaz de fermentar; es decir, que se trata de una levadura aerobia estricta (52). Por otro lado se ha visto que estas capacidades aumentan aun más en presencia del ion potasio, el cual activa a algunas enzimas glucolíticas (30). Distingue a *D. hansenii* su capacidad para tolerar el NaCl, principal catión del agua del mar (33, 49).

Dada su capacidad para crecer en un medio alcalino y salino como el agua del mar, se decidió estudiar sus características de transporte y metabolismo ante concentraciones elevadas de sales y del pH del medio.

JUSTIFICACIÓN

Los estudios fisiológicos y bioquímicos en *D. hansenii*, tomando en cuenta su tolerancia al pH y resistencia a sales monovalentes, son escasos.

Estudios anteriores muestran que *D. hansenii* aumenta su capacidad fermentativa y respiratoria al ser cultivada en medio salino; por lo tanto, se espera que acercarse a condiciones de su hábitat natural, mediante la alcalinización del medio y presencia de Na⁺, se pueda tener una aproximación cercana a las condiciones de vida de esta levadura.

HIPÓTESIS

El aumento de pH en el medio de incubación, favorece tanto el transporte de iones monovalentes (Na⁺ y K⁺) como el metabolismo energético de la levadura alcalófila *Debaryomyces hansenii*.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar el transporte iónico y el flujo glucolítico de *D. hansenii*, a pH 6.0 y 8.0 en ausencia y presencia de 1.0 M de NaCl.

Objetivos particulares

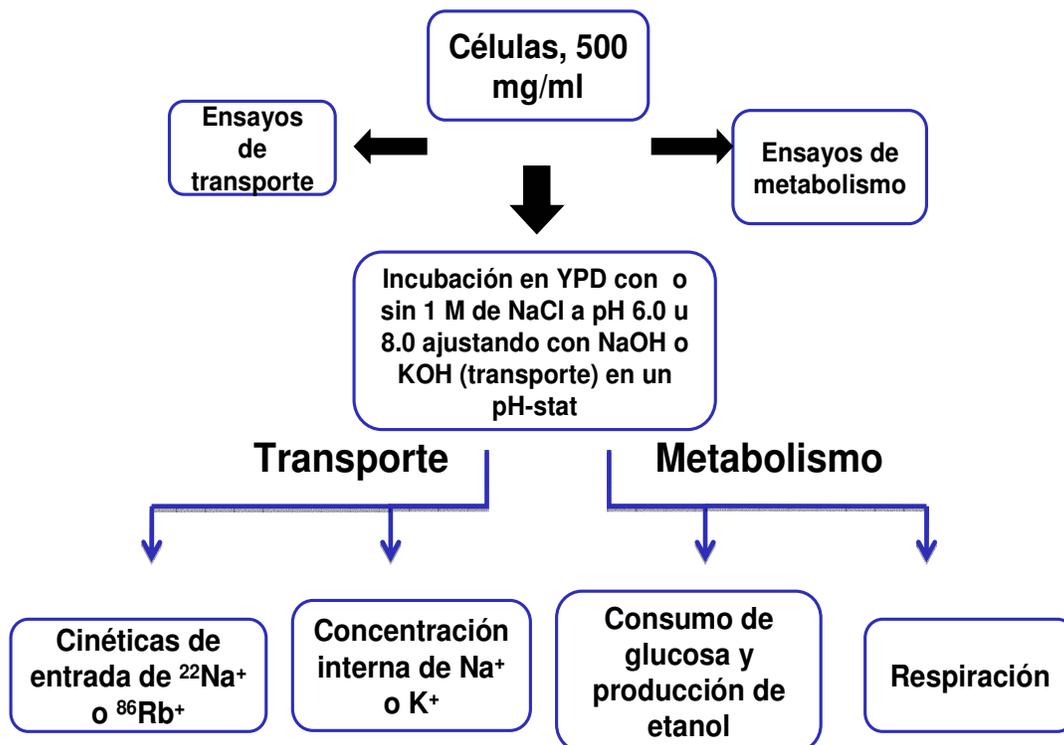
- Cuantificar la concentración intracelular de Na^+ y K^+ en levaduras crecidas en distintas concentraciones de estos cationes monovalentes.
- Determinar los parámetros cinéticos del transporte de rubidio (^{86}Rb) y sodio (^{22}Na) en *D. hansenii*.
- Cuantificar el flujo glucolítico mediante el consumo de glucosa y la producción de etanol para las distintas condiciones de incubación.
- Medir el efecto de estos parámetros sobre el consumo de oxígeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

La levadura utilizada fue la cepa Y-7426 de *Debaryomyces hanseni* del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), Peoria IL, (ver anexo) (22).

Las levaduras se mantuvieron en cajas de Petri en medio sólido YPGal – NaCl 1.0 M como cultivo madre; de éste, se inoculó una asada de levaduras en cajas de medio YPD sólido suplementado con 1.0 M de NaCl.

Los cultivos se realizaron en matraces de 1 l con 400 ml de medio YPD a 30.0 °C y agitación constante a 250 rpm. Todos los medios, se esterilizaron en un autoclave Hirayama durante 15 min a 121 °C y 1.5 kg/cm² de presión. Terminado el cultivo, 24 horas después de colocado el inóculo, se cosecharon las células por centrifugación a 2500 rpm, lavando 2 veces con agua destilada y resuspendiendo finalmente a 500 mg/ml en suspensión. Los distintos ensayos realizados a estas células se utilizaron como control.



Crecimiento celular.

El ensayo se inició en 20 ml de medio YPD en presencia o ausencia de 1.0 M de NaCl; se agregó una pequeña asada de *D. hansenii* almacenada en cajas Petri de YPD con 1.0 M de NaCl (se mantienen en presencia de sal para una mejor preservación de la levadura). De este precultivo obtenido en 3 horas en un cuarto de cultivo a temperatura constante de 30 °C, se midió la absorbencia y se inoculó la cantidad necesaria en 20 ml de YPD con o sin 1.0 M de NaCl para obtener una absorbencia inicial de 0.02 a 600 nm de D.O. Una vez hecho el inóculo se tomaron 300 µl del cultivo y se colocaron en uno de los pozos de las placas que se utilizan en el sistema automático para análisis de crecimiento microbiano de Bioscreen C (en total se utilizaron 25 pozos de los 100 que tiene la caja, dejando uno libre entre pozo y pozo). Se midió el crecimiento celular durante 60 h y se determinó el tiempo de duplicación para ambas condiciones de cultivo (presencia y ausencia de 1.0 M de NaCl). Los ensayos se realizaron en un sistema automatizado para el análisis de crecimiento microbiano de Bioscreen durante 60 hrs.

El crecimiento celular manteniendo constante el pH del medio, no se determinó.

Incubación celular a pH constante.

Se realizaron incubaciones a pH 6.0 y pH 8.0 ajustando con KOH 0.267 M (sólo para ensayos de transporte) y con NaOH 0.26 M, agregando o no 1.0 M de NaCl a 20 ml de YPD utilizado como medio de incubación. Las células (1750 mg) se incubaron en estas condiciones durante 3.0 horas (aproximadamente el tiempo de duplicación celular) dentro de una cámara descubierta de vidrio, capaz de mantener la temperatura constante a 30 °C y que se acopla a un TIM 856 Tritation Manager de Radiometer Analytical (pH stat) mediante un dispensador de amortiguador y un electrodo de pH de la misma marca. La cantidad de base añadida para mantener el pH puede registrarse a lo largo del tiempo, así como para determinar la cantidad final de iones (potasio o sodio) adicionados al medio y los miliequivalentes de base utilizada.

Al término de las distintas condiciones de incubación mencionadas, se midieron las concentraciones internas de los respectivos cationes monovalentes y se realizaron los experimentos de transporte y de metabolismo.

Concentración interna celular de Na⁺ y K⁺.

En el fotómetro de flama Carl Zeiss PF5, calibrado en su escala de lectura a 0 con agua desionizada y a 100 con 1.0 mM de NaCl o KCl según el ion a cuantificar, se determinó la concentración interna celular de Na⁺ y K⁺, mediante la luz emitida por cada uno de los cationes en la combustión de la “solución problema” vaporizada y mezclada con gas butano. La línea de emisión generada y característica para cada ion, es proporcional a la concentración iónica. La emisión es captada por un filtro óptico específico para la coloración de la flama producida (20).

La “solución problema” corresponde a los extractos obtenidos al romper 250 mg de células en baño maría hirviente durante 15 min y resuspendidas en 5 ml de agua desionizada. La concentración interna celular de los distintos iones, se calculó tomando en cuenta que *D. hansenii* contiene en su interior aproximadamente 40% de agua.

Cinéticas del transporte.

El uso de iones marcados radioactivamente para determinar el transporte a través de la membrana plasmática en levaduras ha sido utilizado desde mediados del siglo pasado por Conway, 1958, quien lo estudió en células de *S. cerevisiae*.

En este trabajo se determinó la cinética de transporte de rubidio (⁸⁶Rb⁺ utilizado como análogo al potasio) y de sodio (²²Na⁺). La dirección del transporte fue hacia el interior de las células de *D. hansenii*.

Las cinéticas de transporte se llevaron a cabo en células cultivadas (control) o incubadas a pH constante bajo distintas condiciones; los ensayos cinéticos se realizaron en un medio de incubación a pH 6.0 con 10 mM de MES-TEA o pH 8.0 10 mM de Bicina-TEA, 50 mM de glucosa, ⁸⁶Rb⁺ a concentraciones

variables (1.0, 2.0, 4.0, 8.0 y 10 mM) y 50 mg de células. Se realizó un curso temporal de 90 minutos tomando alícuotas de 200 μl a los 5, 15, 30, 60 y 90 minutos, o en el caso de $^{22}\text{Na}^+$ a concentraciones variables (10, 20, 50, 80 y 100 mM) y 100 mg de células realizando un curso temporal de 270 segundos, tomando alícuotas a los 90, 180 y 270 segundos. Las alícuotas se colocaron en filtros de nitrocelulosa de 0.45 μm en un multifiltro Millipore lavando 5 veces con 0.5 ml CaCl_2 10 mM frío (4°C) y Triton-X100 diluido 1:1000 (v:v); los filtros se dejaron secar y se colocaron en viales de cristal con 5 ml de líquido de centelleo (ver anexo) para contar la marca del interior de la célula en un contador de centelleo Beckman LS6500 y determinar los parámetros cinéticos mediante las velocidades iniciales.

Consumo de glucosa en D. hansenii.

Se incubaron 125 mg de células con agitación constante a 30 °C tanto a pH 6.0 como pH 8.0 con 10 mM de MES – TEA o Bicina – TEA respectivamente y 20 mM de glucosa (se inició la incubación al momento de adicionar la glucosa). De esta incubación, se obtuvieron alícuotas de 1.0 ml al tiempo cero y al minuto 15; se centrifugó la alícuota durante 60 segundos en tubos Eppendorf, se decantó el sobrenadante y se mantuvo en hielo, el botón celular se desecha.

Modificando a la mitad los volúmenes recomendados en la metodología del Glucose (GO) Assay Kit (GAGO-20) de Sigma y con los sobrenadantes de cada una de las condiciones, se determinó la concentración de glucosa obteniendo la diferencia al tiempo cero y al minuto 15, diluyendo 10 μl de cada una de las muestras en 490 μl de agua desionizada. Se utilizó solamente 1.0 ml del reactivo de ensayo y de igual manera 1.0 ml de ácido sulfúrico 12 N para detener la reacción.

Mediante los parámetros (pendiente y ordenada al origen) obtenidos al graficar linealmente la curva estándar recomendada por el fabricante del Kit GAGO-20, se determinaron los μmoles de glucosa por gramo de células en las muestras. Se tomaron en cuenta los miligramos de células utilizados (125 mg), la masa molecular de la glucosa (180 g/mol) y el volumen utilizado de muestra en la reacción (10 μl).

Producción de etanol

Se incubaron durante 15 minutos en un baño a 30 °C y con agitación constante, las células recién cosechadas del cultivo o incubadas 3.0 horas manteniendo el pH; 100 mg de células y 66 mM de glucosa a pH 6.0 con MES – TEA 10 mM (la incubación se inició con la adición de las células). Transcurrido el tiempo se tomó una alícuota de 1.0 ml y se centrifugó en tubos Eppendorf; se decantó el sobrenadante y se mantuvo en hielo.

La determinación de alcohol se realizó mediante la reacción con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) utilizando como cofactor NAD⁺. La diferencia en la absorbencia producida con la reducción del NAD⁺ a 340 nm se midió en un espectrofotómetro de doble rayo DW2a actualizado por On-Line Instrument Systems (Olis) y se utilizó para cuantificar la concentración de alcohol en las muestras, tomando en cuenta el coeficiente de extinción del NADH el volumen de la muestra, el volumen final de la reacción y los miligramos de células empleadas. La reacción en el espectrofotómetro de doble rayo se llevó a cabo a pH 9.0 con 60 mM de Bicina–KOH e inició al adicionar 200 µl de sobrenadante.

Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió en una cámara a temperatura constante (30°C) mediante un electrodo tipo Clark de un monitor de oxígeno biológico YSI 5300 conectado a una interfase que convierte los datos analógicos en digitales. Los ensayos se realizaron a pH 6.0 utilizando como amortiguador MES – TEA 10 mM ó Bicina – TEA como amortiguador a pH 8.0, 25 mg de células de cada una de las variables y glucosa 50 mM o etanol 78 mM como sustrato.

El registro para cada ensayo se almacenó y tomando en cuenta los 400 natm de oxígeno por mililitro de agua en la Ciudad de México, el tiempo que duró cada ensayo, la pendiente en la fase lineal del experimento y los miligramos de células, se determinó la respiración en células integrales.

RESULTADOS

Cantidad de NaOH ó KOH para mantener el pH

Como ya se mencionó, la cantidad de base añadida para mantener el pH a lo largo del tiempo permite determinar la cantidad de iones (potasio o sodio) adicionados al medio; las Tablas 1 y 1.1 muestran esos resultados.

Medio de incubación utilizado	Ajustando el pH del medio con KOH	Ajustando el pH del medio con NaOH
YPD a pH 6.0	16 mM; 0.4 mEq	30 mM; 0.8 mEq
YPD a pH 8.0	50 mM; 1.4 mEq	61 mM ; 1.8 mEq
YPD 1 M NaCl a pH 6.0	21 mM; 0.5 mEq	33 mM; 0.9 mEq
YPD 1 M NaCl a pH 8.0	63 mM; 1.9 mEq	62 mM; 1.9 mEq

Tabla. 1.0. Concentraciones iónicas del medio al término de la incubación y los mEq totales de base utilizados para ajustar el pH del medio.

Medio de incubación utilizado	Ajustando el pH del medio con KOH	Ajustando el pH del medio con NaOH
YPD a pH 6.0	0.25 mEq	0.8 mEq
YPD a pH 8.0	0.93 mEq	1.42 mEq
YPD 1 M NaCl a pH 6.0	0.45 mEq	0.64 mEq
YPD 1 M NaCl a pH 8.0	1.9 mEq	1.6 mEq

Tabla. 1.1 mEq de base (KOH o NaOH), utilizados para neutralizar el ácido producido por las células.

Los datos de las tablas muestran que a) la cantidad de base necesaria para mantener el pH deseado fue con ambas bases mucho mayor a pH 8.0 que a

pH 6.0; b) las cantidades de NaOH fueron siempre superiores a las de KOH, y c) al añadir NaCl 1.0 M, la cantidad necesaria para mantener el pH aumentó cuando la base era KOH, pero no cuando era NaOH.

Crecimiento celular

El crecimiento microbiano no representa en sí una rama de investigación; sin embargo, se utiliza en los estudios de fisiología microbiana, ya que los constituyentes celulares aumentan durante este proceso a partir de las células inoculadas (exceptuando los organismos cenocíticos), y se mide como la biomasa producida (27, 40). A mediados del siglo XX, Jacques Monod definió seis fases distintas en el crecimiento de las células de un cultivo microbiano: 1) Fase lag o de retardo – la tasa de crecimiento es nula. 2) Aceleración – aumenta la tasa de crecimiento. 3) Exponencial – es constante la tasa de crecimiento. 4) Retardo – disminuye la tasa de crecimiento. 5) Estacionaria – la tasa de crecimiento es nula. 6) Declive – tasa de crecimiento negativa (Fig. 3.0) (28).

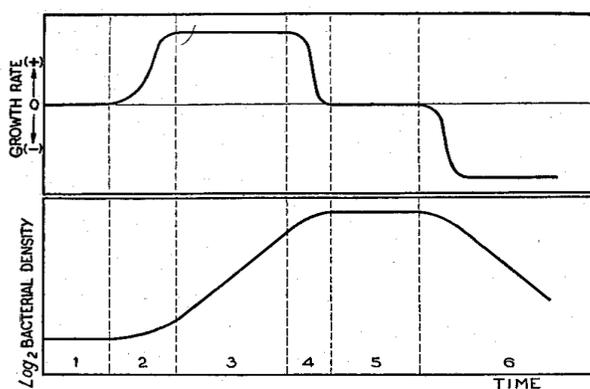


Fig 3.0. Comportamiento de un cultivo donde se muestran las fases de crecimiento. Parte baja de la figura: logaritmo base 2 de la densidad bacteriana. Parte alta de la figura: variaciones de la tasa de crecimiento. Líneas verticales punteadas señalan los límites de las fases.

Las distintas fases del crecimiento microbiano se pueden determinar mediante diversas técnicas, como el conteo en el número de células, la turbidez y medición de la masa microbiana mediante espectrofotometría (27, 28, 40).

Debido a que el crecimiento celular tiene como base principal el aumento en el número de células individuales, es posible aplicarlo en otros organismos, como las levaduras, aplicando el mismo método (27, 40). Se parte de una absorbencia inicial del cultivo y a través del tiempo se continúa midiendo la absorbencia a una longitud de onda determinada. Partiendo de estas bases, el crecimiento celular se determinó en un medio completo (YPD) y en YPD suplementado con 1.0 M de NaCl. Con los datos obtenidos para los dos cultivos en escala lineal de absorbencia vs tiempo, se construye un gráfico semilogarítmico, manteniendo la escala de tiempo lineal (Fig. 4.0).

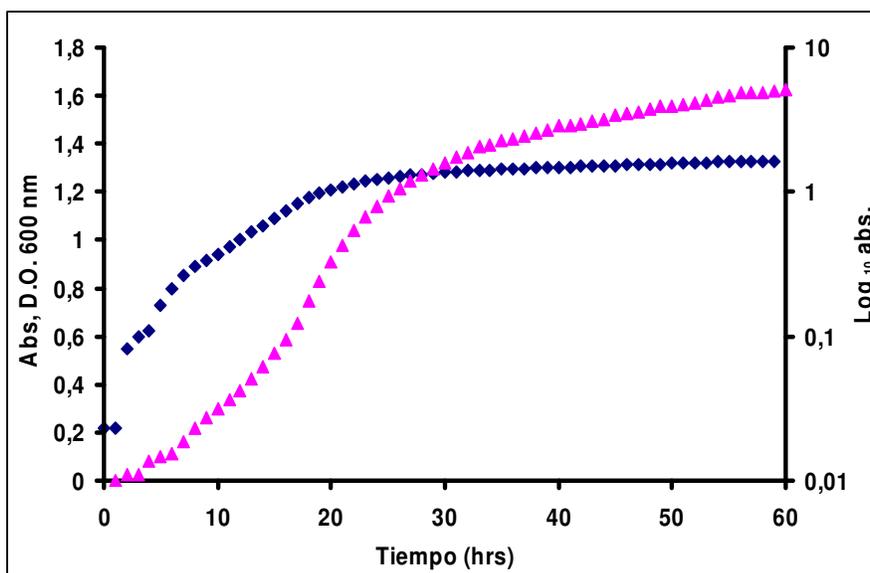


Fig 4.0. Gráfica lineal y semilog del crecimiento celular durante el tiempo. Los puntos en triángulo y rombos pertenecen a la escala lineal y logarítmica base 10 de la absorbencia, respectivamente.

Los datos obtenidos en la fase exponencial y graficados semilogarítmicamente se utilizaron para determinar el tiempo de duplicación mediante la ecuación:

$$x = \ln 2 / m$$

Donde "x" es el tiempo de duplicación celular; "ln2" es el logaritmo natural de 2 y "m" es la pendiente en la fase exponencial ajustada a una línea de tendencia exponencial.

El tiempo de duplicación para los cultivos fue de prácticamente tres horas para los realizados en YPD y de 2 para las células cultivadas en presencia de 1.0 M de NaCl, como se muestra en la Figura 5.0.

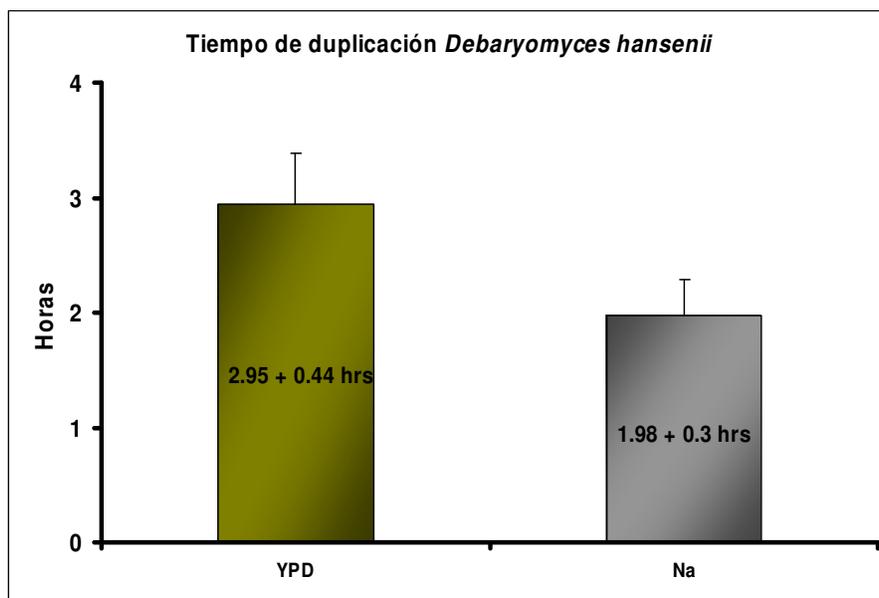


Fig 5.0. Tiempo de duplicación celular obtenido para *D. hansenii* en cultivos de YPD con ausencia (columna izquierda) o presencia de 1M de NaCl (columna derecha); el tiempo que tarda una célula en duplicarse está expresado en horas. Los ensayos fueron realizados en un sistema automatizado para el análisis de crecimiento microbiano de Bioscreen durante 60 hrs. Se inició con una absorbencia de 0.02 y se mantuvo a temperatura (30 °C) y agitación constante.

Transporte de iones

Concentración interna de Na^+ y K^+

La concentración de un ion dentro de las células se relaciona, entre otras cosas, con su capacidad para mantener una cierta selectividad de transporte y con los efectos que puede ejercer el ion acumulado sobre los diversos procesos fisiológicos de la célula (e.g. metabolismo). El K^+ es el ion más abundante en el interior de la célula (42) y entre otras cosas, ayuda a mantener un potencial eléctrico y osmótico adecuado con respecto del exterior celular (5). Sin embargo, la acumulación de sodio o potasio en *D. hansenii* recién cosechada depende del medio donde se realizó el cultivo, que puede ser el

estándar, YPD, o suplementado con una sal YPD-1.0 M NaCl (49). *D. hansenii* tiene la capacidad de acumular en su interior el catión más abundante en el medio (16, 49); sin embargo, el K^+ se acumula en mayor concentración, como lo muestra la Fig 6.0. Las células crecidas en YPD (concentración de K^+ en el YPD es cercana a 20 mM), acumularon una alta concentración de este catión. Sin embargo, las células crecidas en el mismo medio YPD, pero agregando 1.0 M de NaCl todavía acumularon una concentración alta de K^+ , aproximadamente un 50 por ciento de la acumulada en el medio sin sal. Por otra parte, la concentración acumulada de sodio aumentó por un factor de poco más de 13.

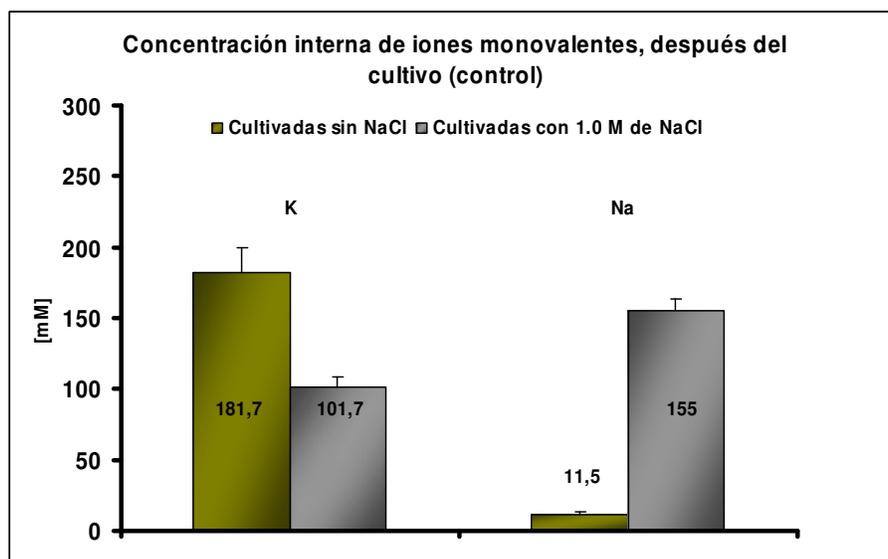


Fig. 6.0. Concentración interna de Na^+ y K^+ en células cultivadas 24 hrs en medio YPD (columnas en verde) y medio YPD suplementado con 1.0 M de NaCl (columnas en gris). Las barras del lado izquierdo corresponden a la concentración interna celular de K^+ ; las del lado derecho corresponden a la concentración interna celular de Na^+ ; los valores dentro de las columnas corresponden a la concentración milimolar.

En las células cultivadas durante 24 horas en YPD, el pH del medio no se regula, y disminuye a lo largo del tiempo. Era entonces necesario determinar estas concentraciones acumuladas en experimentos en los que se mantuvo el pH del medio a pH 6.0 ó 8.0. Además, dado que los cationes Na^+ y K^+ pueden transportarse al interior, los experimentos se realizaron manteniendo el pH del medio a los valores mencionados de pH, pero utilizando NaOH ó KOH.

Manteniendo constante el pH del medio durante 3 horas a pH 6.0 ó pH 8.0 con NaOH, como se puede observar en la Figura 7.0, a) a pH 6.0, no obstante que no se requirió una cantidad grande de NaOH para mantener el pH, la concentración acumulada de K^+ disminuyó moderadamente en comparación con la mostrada en la Fig. 6.0, y la de Na^+ aumentó, y b) a pH 8.0, las concentraciones acumuladas de ambos iones fueron semejantes; es decir, se favoreció la acumulación ligeramente mayor de sodio, a expensas de una disminución importante de la concentración interna de potasio (véase la Fig. 6.0).

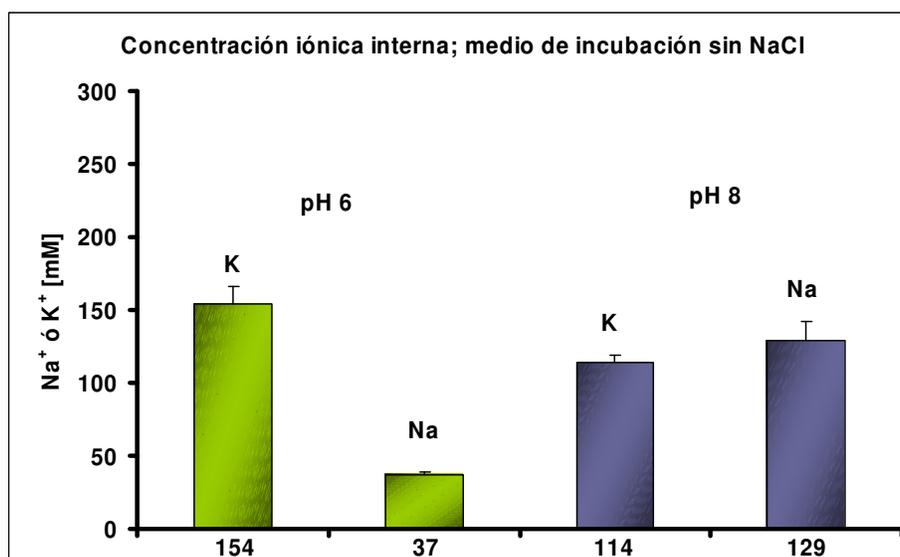


Fig. 7.0. Acumulación de Na^+ ó K^+ en las células incubadas al pH señalado mediante la adición de NaOH. Las dos primeras columnas (en verde), muestran la acumulación iónica de K^+ y Na^+ con el pH ajustado a 6.0; las columnas en azul señalan la concentración iónica interna a pH 8.0. El pH se mantuvo constante mediante la adición continua de NaOH 0.26 M. Valores al pie de la columna corresponden a las concentraciones en mM.

En otro experimento, manteniendo las mismas condiciones de incubación, se agregó 1.0 M de NaCl al medio. La concentración interna del Na^+ aumentó y la concentración para el ion K^+ disminuyó. En la Figura 8.0 se muestra el comportamiento observado; se encontró una acumulación mayor del Na^+ , catión predominante. El cambio del pH del medio no hizo cambiar la selectividad al ion más abundante del medio.

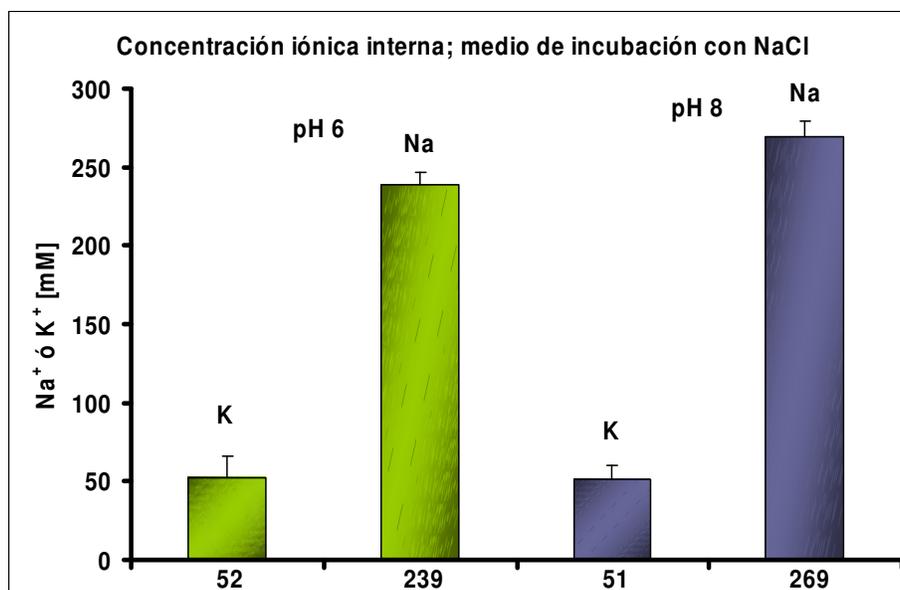


Fig. 8.0. Concentración iónica de K^+ y Na^+ en células cultivadas 24 horas y luego incubadas en YPD suplementado con 1.0 M de NaCl durante 3 horas a pH 6.0 (columnas en verde) y a pH 8.0 (columnas en azul) continuamente ajustado con sosa. Valores al pie de la columna corresponden a las concentraciones en mM.

Tomando en cuenta que la base utilizada (NaOH) para ajustar el pH del medio influiría en la acumulación iónica generando una concentración mayor de sodio en la levadura, se realizó el mismo experimento utilizando una solución 0.267 M de KOH para ajustar el medio de incubación y mantenerlo a pH 6.0 ú 8.0 durante 3 horas. La figura 9.0 muestra que la concentración para el K^+ interno aumentó con respecto a las células que se incubaron en el medio ajustado con NaOH y son semejantes a las alcanzadas en las células crecidas en YPD; sin embargo, los valores de la concentración interna obtenida no mostraron grandes cambios en comparación con los obtenidos en el control que se presenta en la Fig. 8.0; el Na^+ interno se mantuvo constante a las condiciones fisiológicas de la célula. Este comportamiento fue similar a pH 6.0 y 8.0.

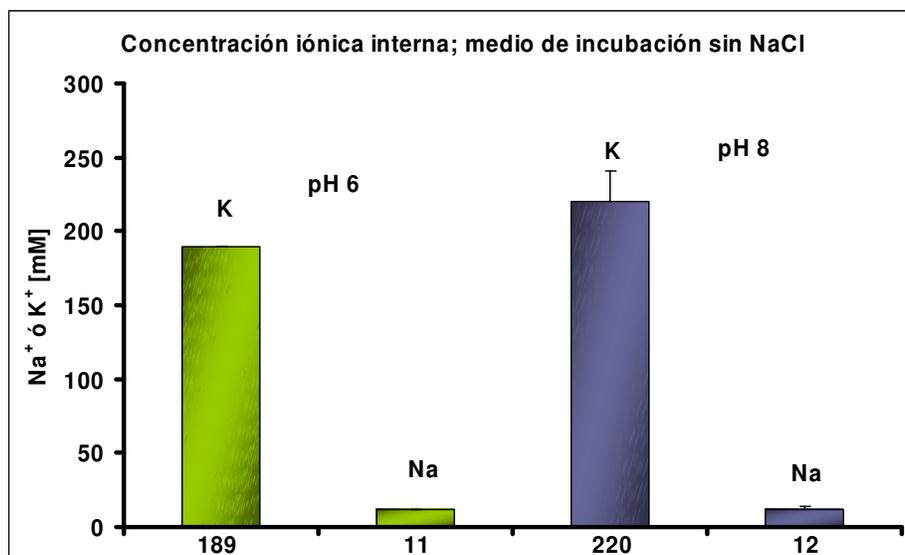


Fig. 9.0. Efectos de la incubación de *D. hansenii* manteniendo el pH del medio a 6.0 ú 8.0 con KOH. El medio de incubación se mantuvo continuamente a pH 6.0 (columnas verdes) o pH 8.0 (columnas en azul) con KOH 0.267 M para cuantificar la concentración iónica interna de K⁺ y Na⁺ de *D. hansenii*. Valores al pie de la columna corresponden a las concentraciones en mM.

En otro experimento, agregando 1.0 M NaCl al medio de incubación, se mantuvo el pH a 8.0 durante 3 horas con hidróxido de potasio 0.267 M. La Figura 10.0 señala una acumulación mayor del sodio pero en comparación con los datos mostrados en la figura 6, la entrada de potasio aumentó y la de sodio disminuyó.

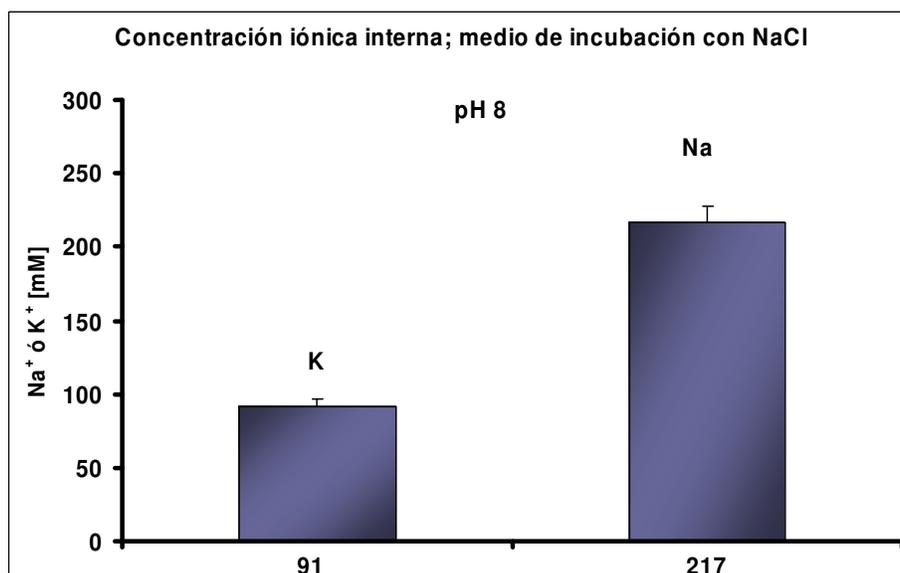


Fig. 10.0. Concentración interna de Na⁺ y K⁺ en las células incubadas en presencia de 1.0 M de NaCl. Los ensayos se realizaron incubando con 1.0 M de NaCl a pH 8.0 ajustado constantemente con una solución 0.267 M de KOH. Valores al pie de la columna corresponden a las concentraciones en mM.

Cinética del transporte

Desde mediados del siglo pasado se estudió el transporte de los cationes monovalentes en *S. cerevisiae* mediante ensayos cinéticos con iones marcados radioactivamente; el K^+ es el catión con mayor afinidad, y se transporta al interior de la célula aún en presencia de otros iones (9). En la segunda mitad del siglo XX, se comenzó a utilizar este tipo de ensayos para determinar el transporte iónico en *D. hansenii*, con Norkrans y Kylin en 1969, Prista y cols. en 1997, Thomé-Ortíz y cols. en 1998, y recientemente González-Hernández y cols. en el 2004, todos utilizando los isótopos $^{86}Rb^+$ como análogo al K^+ y por ser el K^+ un inhibidor competitivo del Rb^+ tanto en *S. cerevisiae* como en *D. hansenii* (41) y $^{22}Na^+$ además del $^{42}K^+$ y $^{24}Na^+$ como isótopos directos por Norkrans y Kylin en 1969.

El primer ensayo de cinética de transporte realizado como control consistió en determinar los parámetros cinéticos para el $^{22}Na^+$ en *D. hansenii* recién cosechada, ensayando las células a pH 6.0 con 10 mM de MES-TEA y pH 8.0 con 10 mM de Bicina-TEA. La figura 11.0 muestra los resultados; a pH 6.0 se obtuvo una $K_m = 14$ mM y una $V_{max} = 0.95$ nmoles min^{-1} mg de células $^{-1}$ y a pH 8.0 una $K_m = 24.6$ mM y una $V_{max} = 1.3$ nmoles min^{-1} mg de células $^{-1}$.

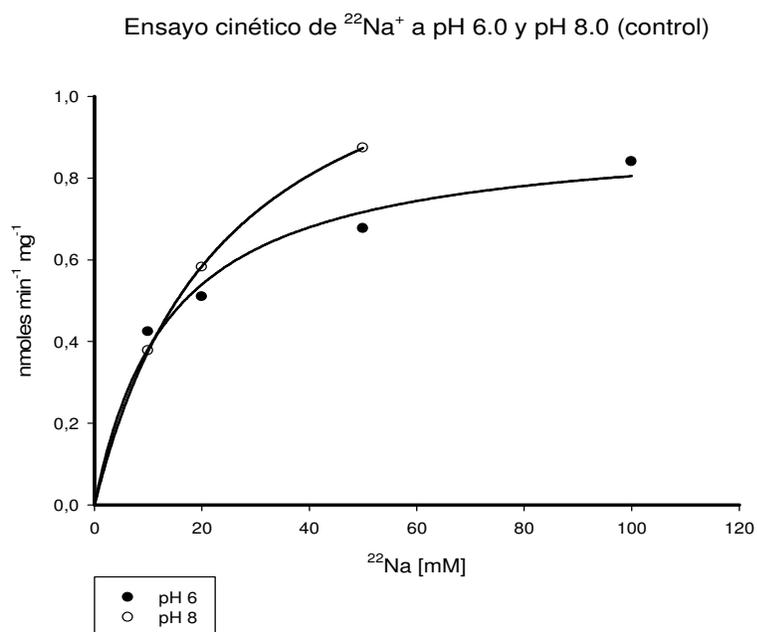


Fig. 11.0. Ajuste michaeliano de la cinética de transporte para $^{22}Na^+$ tanto a pH 6.0 (círculos rellenos) como pH 8.0 (círculos en blanco).

De igual manera se realizó una cinética de transporte para el $^{86}\text{Rb}^+$ en células recién cosechadas; el ensayo se llevó a cabo tanto a pH 6.0 como pH 8.0 utilizando los parámetros cinéticos obtenidos como control del transporte para el Rb^+ . Las incubaciones para los distintos ensayos cinéticos se realizaron en ausencia y presencia de 20 mM de NaCl. En la Figura 12.0 se puede observar el ajuste michaeliano para los diversos ensayos realizados; los parámetros cinéticos obtenidos fueron a pH 6.0 sin sodio una $K_m = 2.5 \text{ mM}$ y una $V_{\text{max}} = 0.05 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg de cel.}^{-1}$ a pH 6.0 con 20 mM de NaCl una $K_m = 18 \text{ mM}$ y una $V_{\text{max}} = 0.2 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg de cel.}^{-1}$. Al hacer los ensayos cinéticos a pH 8.0 sin sodio se obtuvo una $K_m = 3.2 \text{ mM}$ y una $V_{\text{max}} = 0.1 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg de cel.}^{-1}$ y a pH 8.0 con 20 mM de NaCl una $K_m = 15 \text{ mM}$ y una $V_{\text{max}} = 0.2 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg de cel.}^{-1}$.

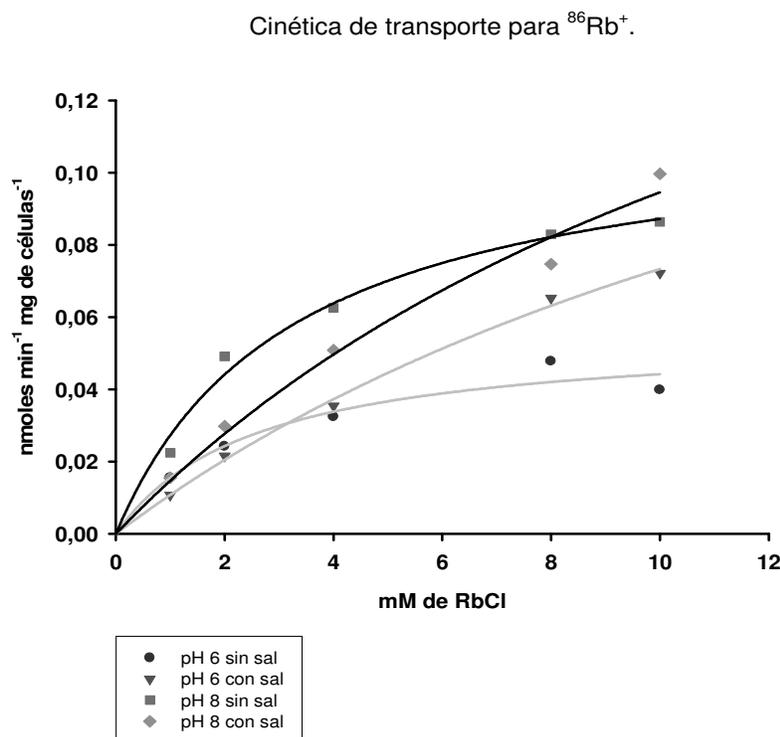


Fig. 12.0. Ajuste michaeliano para la cinética de transporte del $^{86}\text{Rb}^+$ en *D. hansenii* ensayando a pH 6.0 en ausencia (círculos) y presencia de 20 mM de NaCl (triángulo invertido) y pH 8.0 en ausencia (cuadros) y presencia de 20 mM de NaCl (rombos).

Cinéticas de transporte para $^{86}\text{Rb}^+$.

Una vez obtenidos los parámetros control, se realizaron las cinéticas de transporte para $^{22}\text{Na}^+$ y $^{86}\text{Rb}^+$ en células incubadas durante 3 horas a 30 °C, tanto en medio YPD o YPD suplementado con 1.0 M de NaCl, ajustando constantemente con NaOH o KOH a pH 6.0 y pH 8.0.

Las Tablas 2.0 y 3.0 muestran los datos obtenidos para las cinéticas de $^{86}\text{Rb}^+$ en las distintas condiciones de incubación realizadas. En estos experimentos no se añadió sodio al momento de los ensayos como en las gráficas control, porque solamente se quería determinar el transporte para el Rb^+ presente en *D. hansenii*.

Ajustando el pH con NaOH, los datos encontrados (Tabla 2.0), no mostraron cambios importantes en las constantes cinéticas; se observaron velocidades semejantes y constantes de Michaelis–Menten (K_m) prácticamente en los mismos órdenes de magnitud.

pH 6.0 (NaOH)				pH 8.0 (NaOH)			
Ensayando a pH 6.0		Ensayando a pH 8.0		Ensayando a pH 6.0		Ensayando a pH 8.0	
Km	4.7	Km	7.4	Km	3.8	Km	6.0
V max	0.15	V max	0.54	V max	0.16	V max	0.6
pH 6.0 + 1.0 M NaCl (NaOH)				pH 8.0 + 1.0 M NaCl (NaOH)			
Ensayando a pH 6.0		Ensayando a pH 8.0		Ensayando a pH 6.0		Ensayando a pH 8.0	
Km	2.0	Km	3.0	Km	5.0	Km	4.3
V max	0.1	V max	0.4	V max	0.2	V max	0.4

Tabla 2.0 Constantes cinéticas para $^{86}\text{Rb}^+$ en células incubadas durante 3 horas en medio YPD y YPD suplementado con 1.0 M de NaCl, ajustando continuamente a pH 6.0 y pH 8.0 con hidróxido de sodio (NaOH) y ensayando los cursos temporales nuevamente a pH ácido y alcalino para cada una de las 4 variables obtenidas. Vmax, nmoles $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$; Km, mM

Utilizando KOH como la base para mantener el pH del medio de incubación, las constantes cinéticas mostraron los cambios que muestra la Tabla 3.0. La afinidad (definida a partir de la K_m) tanto a pH 6.0 como a pH 8.0 en medio estándar (ausencia de 1.0 M de NaCl) disminuyó; se obtuvo una K_m entre 2 y 4 veces mayor con respecto al control y entre 2 y 8 veces mayor la K_m con respecto al medio suplementado con 1.0 M de NaCl.

pH 6.0 (KOH)				pH 8.0 (KOH)			
Ensayando a pH 6.0		Ensayando a pH 8.0		Ensayando a pH 6.0		Ensayando a pH 8.0	
K_m	14	K_m	9.0	K_m	11.5	K_m	5.0
V max	0.2	V max	0.3	V max	0.25	V max	0.16
pH 6.0 + 1.0 M NaCl (KOH)				pH 8.0 + 1.0 M NaCl (KOH)			
Ensayando a pH 6.0		Ensayando a pH 8.0		Ensayando a pH 6.0		Ensayando a pH 8.0	
K_m	1.5	K_m	3.0	K_m	3.0	K_m	4.0
V max	0.1	V max	0.3	V max	0.1	V max	0.2

Tabla 3.0. Constantes cinéticas para $^{86}\text{Rb}^+$ en células incubadas durante 3 horas en medio YPD y YPD suplementado con 1.0 M de NaCl ajustando continuamente a pH 6.0 y pH 8.0 con hidróxido de potasio (KOH) y ensayando los cursos temporales nuevamente a pH ácido y alcalino para cada una de las 4 variables obtenidas. V_{max} , $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$; K_m , mM.

Es evidente un cambio en la afinidad al Rb^+ por *D. hansenii* entre las incubaciones hechas con NaOH o con KOH; el sodio acumulado durante la incubación con NaOH pudiera estar ejerciendo una menor resistencia al transporte del Rb^+ sin modificar considerablemente la velocidad a la que se transporta en todas las variables.

Cinéticas del transporte para $^{22}\text{Na}^+$

Utilizando $^{22}\text{Na}^+$ se determinaron los parámetros cinéticos para el transporte de sodio en *D. hansenii* después de incubar durante 3 horas al pH correspondiente ajustando con KOH.

La Tabla 4.0 muestra las constantes cinéticas obtenidas para el transporte de Na^+ . Se puede observar en general una menor afinidad, aunque una alta velocidad en comparación con el transporte de Rb^+ . Sin embargo, en las células incubadas en ausencia de NaCl 1.0 M se encontró una mayor afinidad por este catión, al incubar y al ensayar a pH 8.0 que a pH 6.0. En el medio suplementado con 1.0 M de NaCl e incubando a pH 8.0 o en su ausencia, se mantuvo prácticamente la misma velocidad.

pH 6.0 (KOH)				pH 8.0 (KOH)			
Ensayando a pH 6.0		Ensayando a pH 8.0		Ensayando a pH 6.0		Ensayando a pH 8.0	
Km	32.0	Km	72.0	Km	13.5	Km	12.0
V max	0.7	V max	2.3	V max	0.5	V max	1.0
pH 6.0 + 1.0 M NaCl (KOH)				pH 8.0 + 1.0 M NaCl (KOH)			
Ensayando a pH 6.0		Ensayando a pH 8.0		Ensayando a pH 6.0		Ensayando a pH 8.0	
Km	13.6	Km	19.4	Km	28.3	Km	21.2
V max	1.3	V max	1.4	V max	2.0	V max	1.8

Tabla 4.0. Cinética de transporte para $^{22}\text{Na}^+$ en células incubadas a pH 6.0 y pH 8.0 ajustando el medio constantemente con potasa 0.267 M en ausencia o presencia de 1.0 M de NaCl , los ensayos cinéticos se realizaron a pH 6.0 y 8.0. V_{max} , nmoles min^{-1} ; Km, mM.

Este comportamiento se presentó desde la obtención de los cultivos y ensayando bajo las mismas condiciones; es decir, que al incubar a pH

constante a *D. hansenii* no se generan mayores cambios en la afinidad por el Na^+ , ya que desde un principio se encontró una K_m alta para este ion.

Los parámetros para las células incubadas utilizando NaOH para ajustar el pH del medio, no se pudieron determinar, ya que al momento de realizar los distintos ensayos para el transporte de sodio, los resultados fueron muy heterogéneos y no se pudo obtener un patrón que nos permitiera determinar las constantes cinéticas para $^{22}\text{Na}^+$ en ninguna condición utilizada.

Metabolismo energético

Consumo de glucosa.

El transporte iónico y el metabolismo energético están relacionados por la existencia de transportadores iónicos que dependen de una fuente de energía para su funcionamiento; esta fuente de energía radica principalmente en la hidrólisis de ATP, producido en el metabolismo energético.

D. hansenii tiene la capacidad de crecer en medios de cultivo suplementados con azúcares de 6 carbonos (hexosas: glucosa, manosa, galactosa) o 5 carbonos (pentosas: xilosa, arabinosa) (32), utilizando de estas últimas a la xilosa como sustrato para la producción entre otras cosas de xilitol, metabolito utilizado en la industria de los alimentos y farmacéutica (44). Según Nobre y cols en 1999, el transporte de glucosa en la cepa INETI CL18 de *D. hansenii* cultivada en glucosa, se da mediante difusión facilitada; ésto lo sustentan entre otros parámetros, con el cambio de pH externo, ya que en el intervalo de pH 3.0 a 7.0, no se ve afectado el crecimiento y de igual manera, dicho transporte de glucosa es insensible a CCCP. Los experimentos realizados por Nobre y cols. en 1999 con respecto al consumo de glucosa se hicieron en la cepa CL18 del Instituto Nacional de Ingeniería y Tecnología Industrial de Portugal, cepa distinta a la que se utilizó en este trabajo (Y-7426), además que el cultivo se realizó en medio mínimo y aquí fue en medio YPD sin ajustar el pH como control.

La Figura 13 muestra el consumo de glucosa de las células recién cosechadas e incubadas durante 15 minutos a pH 6.0 ú 8.0. Se observó un mayor consumo de glucosa al hacer los ensayos de consumo de glucosa a pH ácido que a pH alcalino.

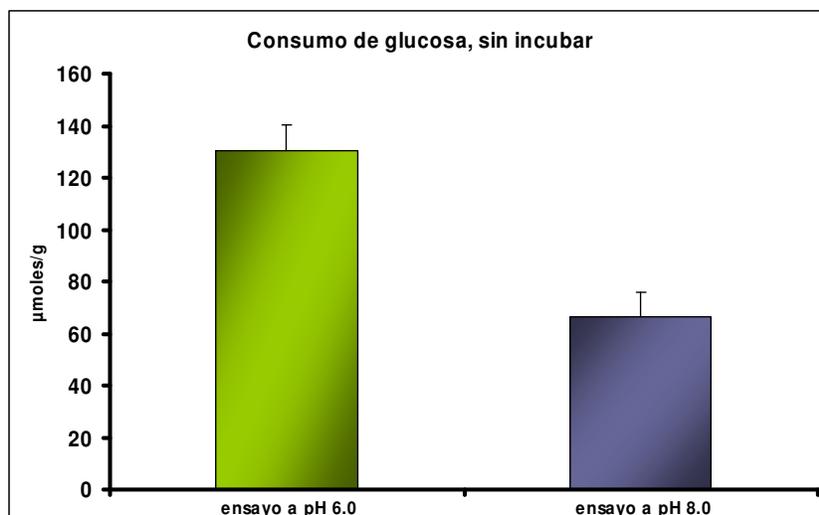


Fig. 13.0. Consumo de glucosa en células recién cosechadas y ensayadas a pH 6.0 10 mM MES-TEA y pH 8.0 10 mM Bicina-Tea. Datos expresados en μ moles de glucosa consumida por gramo de célula.

El consumo de glucosa disminuyó en las células incubadas durante 3 horas, manteniendo el pH a 6.0 con NaOH, mientras que en las incubadas a pH 8.0, la utilización de glucosa se mantuvo sin mayor cambio con respecto al control; las células de *D. hansenii* en los ensayos a pH 6.0 10 mM MES-TEA y pH 8.0 10 mM Bicina-TEA posteriores a la incubación a pH alcalino ajustado continuamente con NaOH, tienen un consumo de glucosa ligeramente mayor con respecto al control, Figura 14.0.

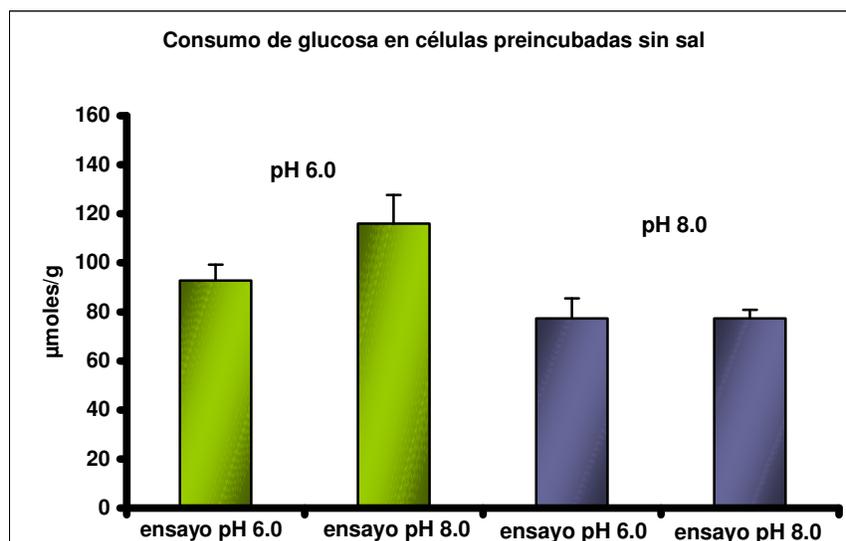


Fig. 14.0. Consumo de glucosa en células preincubadas 3 horas en YPD a pH continuamente ajustado a 6.0 y 8.0 con NaOH e incubadas luego a pH 6.0, 10 mM MES-TEA o pH 8.0, 10 mM Bicina-TEA. Datos expresados en μ moles de glucosa consumida por gramo de célula. Barras verdes, incubadas tres horas a pH 6.0; barras azules, incubadas tres horas a pH 8.0.

En la Figura 15.0 se observa que al suplementar el medio de preincubación con 1.0 M de NaCl, se produjo un menor consumo de glucosa para *D. hansenii* en todas las condiciones de ensayo y de incubación; sin embargo, cuando se ensayaron a pH 8.0 las células incubadas a pH 6.0, la disminución en el consumo de azúcar aumentó; lo mismo ocurrió en las células preincubadas a pH 6.0 que se ensayaron luego en medio alcalino.

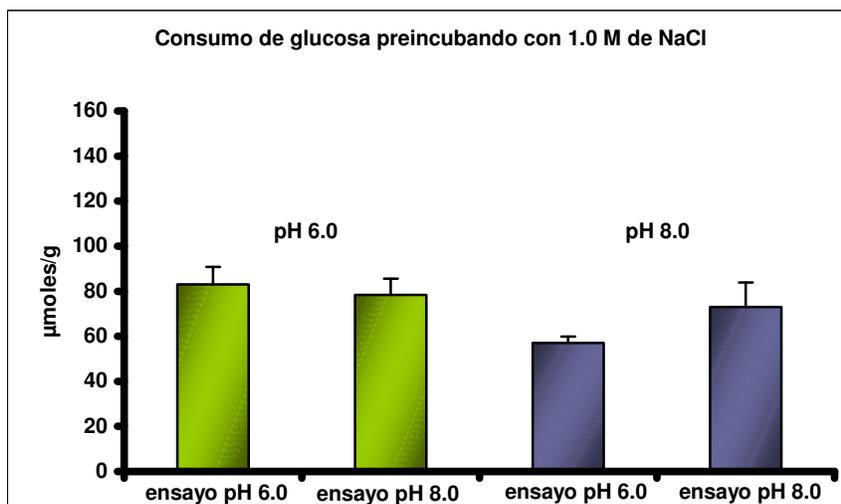


Fig. 15.0. Consumo de glucosa en células incubadas durante 3 horas en medio YPD suplementado con 1.0 M de NaCl a pH continuamente ajustado a 6.0 y 8.0 con NaOH y ensayando cada variable a pH 6.0 con 10 mM MES-TEA y pH 8.0 con 10 mM Bicina-TEA. Datos expresados en μmoles de glucosa consumida por gramo de célula.

La glucosa es el principal sustrato catabólico en estas condiciones utilizadas en *D. hansenii* y por consiguiente es de esperarse un metabolismo energético relacionado estrechamente con los resultados obtenidos hasta ahora.

Producción de etanol.

D. hansenii, es una levadura facultativa, capaz de llevar a cabo un metabolismo fermentativo y respiratorio; por eso, bajo las condiciones de pH utilizadas, se determinó también la producción de etanol, además de que en presencia de sal se ha visto que esta levadura aumenta la producción de etanol (7). La Figura 16.0, muestra la producción de etanol en *D. hansenii* en células recién cosechadas (control) y en células incubadas tanto en ausencia de sal en el

medio estándar (YPD), como en presencia de Na^+ en el medio de incubación a pH (ácido y básico) ajustando continuamente con NaOH durante 3 horas. La fermentación aumenta al incubar a *D. hansenii* a un pH determinado; sin embargo, ésta se mantiene sin mayor cambio entre las distintas variables.

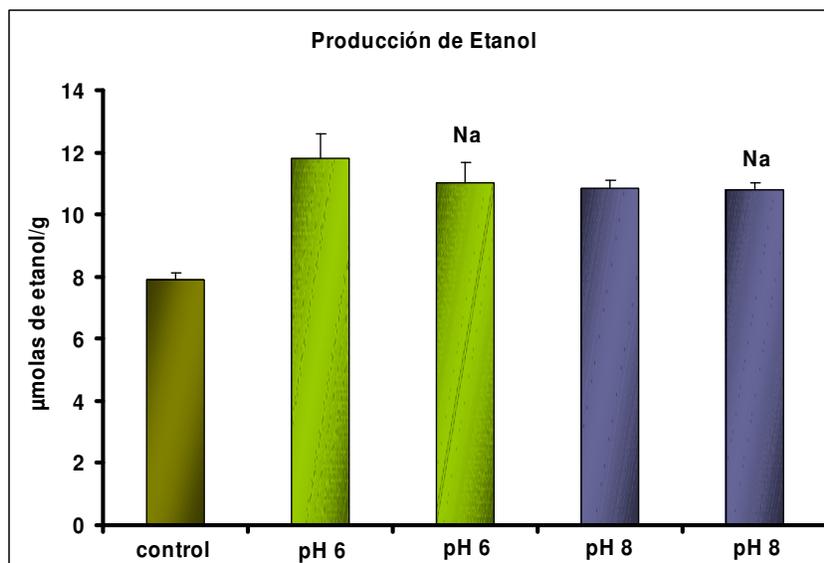


Fig. 16.0. Producción de alcohol a pH 6.0 y 8.0 por *D. hansenii* incubada en ausencia o presencia de NaCl 1.0 M. La producción de etanol se estudió ensayando a pH 6.0 u 8.0 en presencia de glucosa. Datos expresados en μmoles de etanol producido por gramo de células.

Consumo de oxígeno.

Otro parámetro involucrado en el metabolismo energético de una levadura es la respiración, que nos puede indicar la capacidad metabólica de una célula para la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa en mitocondrias. Por otro lado, se sabe que el consumo de oxígeno en *D. hansenii* aumenta en presencia de sales en el medio de cultivo (49), pero éste no es el caso si se ensaya la respiración en presencia de Na^+ o K^+ , ya que disminuye la tasa de respiración para ambos iones (30, 46).

Al utilizar etanol como sustrato las células recién cosechadas consumieron 15 n.atm.O/min/mg, ensayando el experimento a pH 6.0 y 8.0; en presencia de glucosa el consumo de oxígeno disminuye (12 n.atm.O/min/mg). Sin embargo, al adicionar un protonóforo (CCCP) la respiración aumenta en los ensayos a pH 6.0, mostrando un estado desacoplado (Fig. 17.0).

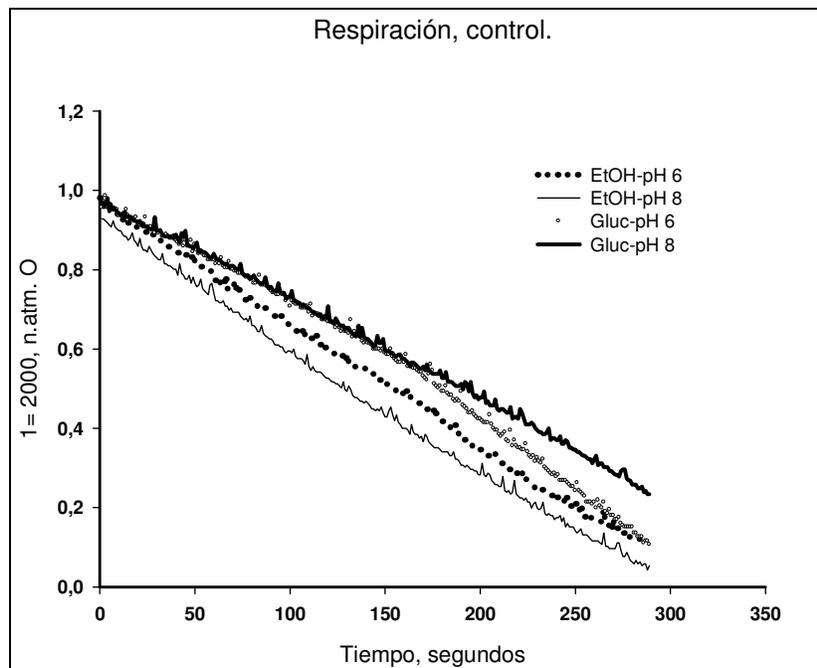


Fig. 17.0 Consumo de oxígeno en células recién cosechadas, tanto a pH 6.0, como a pH 8.0 en presencia de etanol o glucosa como sustrato. La figura es representativa de tres experimentos independientes.

En la Figura 18.0 se muestra que utilizando glucosa como sustrato en los ensayos para determinar el consumo de oxígeno en las células incubadas 3 horas a pH de 6.0 constante mediante el uso de NaOH, y en medio YPD, la respiración fue similar con respecto a lo observado en células recién cosechadas. De igual manera, el cambio de pH ácido a pH alcalino en el ensayo no produjo cambio en la respiración, aunque sí aumentó al subir el pH en la preincubación anterior al experimento. Modificando el sustrato de glucosa a etanol en el experimento, sí se presentó mayor consumo de oxígeno en las células, aunque con respecto al control, la tasa respiratoria se mantiene sin cambio a los dos valores del pH del ensayo.

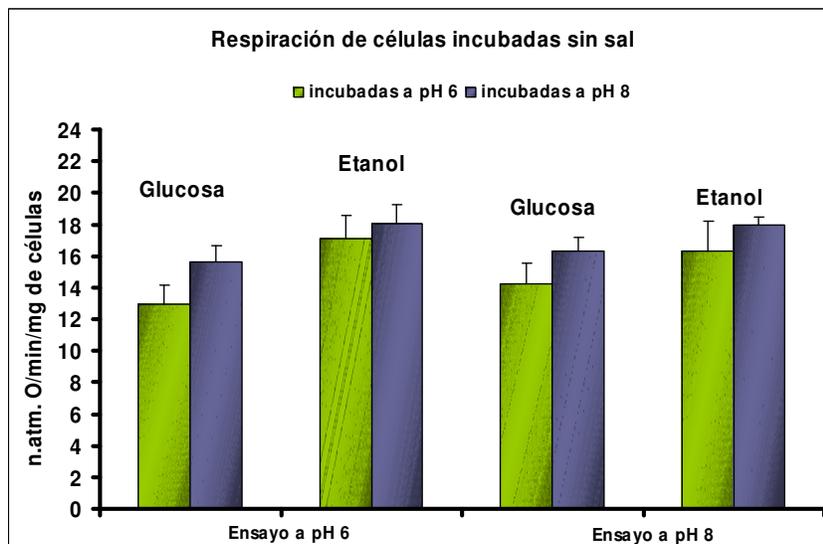


Fig. 18.0 Consumo de oxígeno en células preincubadas en medio YPD, tanto a pH 6.0, como pH 8.0 en presencia de etanol o glucosa como fuente de carbono. La figura representa 3 experimentos independientes.

Incubando las células en YPD suplementado con 1.0 M de NaCl, los cambios encontrados en la figura 18.0 desaparecen y se homogeneiza el consumo de oxígeno en todas las condiciones de incubación y de ensayo utilizadas, aunque la tasa de respiración es mayor con respecto al control y a las células incubadas en medio estándar YPD no suplementado con sal, (Fig. 19)

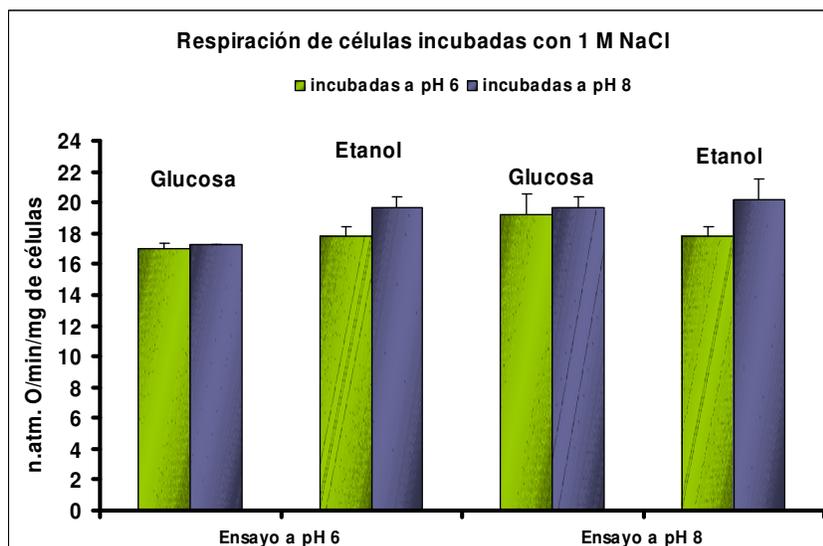


Fig. 19. Consumo de oxígeno en las células incubadas en medio YPD con 1.0 M de NaCl, la medida se realizó tanto a pH 6.0, como pH 8.0, en presencia de etanol o glucosa como fuente de carbono. La figura representa 3 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

La fisiología de una célula está asociada al medio en que se encuentra, ya que de éste se obtienen los sustratos que pueden metabolizarse para mantener el funcionamiento adecuado del organismo. El modelo de levadura utilizado en este trabajo, *D. hansenii* Y-7426, USDA, se ha empleado para estudios de tolerancia a las sales que involucran al metabolismo y al transporte iónico de manera independiente; sin embargo, son escasos los estudios que toman en cuenta el pH del medio en los procesos metabólicos y de transporte iónico en esta levadura. Esta levadura puede estar presente en la superficie de ciertos quesos (14, 54), aunque se encuentra con frecuencia en el ambiente marino (7, 34, 37), lo cual le ha permitido desarrollar ciertas adaptaciones fisiológicas que la hacen un organismo interesante de estudio, en particular por su tolerancia al ambiente alcalino (21, 50) y por su halotolerancia (12); considerándola de igual manera por ciertos como un organismo halofilo (16, 41, 43).

El crecimiento en presencia de NaCl en el medio de cultivo se favoreció, como ya se había reportado en otros trabajos (16, 41, 49), mostrando una reducción de una hora en el tiempo de duplicación para las células cultivadas con sal (Fig 5.0).

Al término del cultivo (control) se encontró una gran acumulación de K^+ cuando no fue suplementado el medio (YPD) con sodio, dato esperado debido a que el K^+ es el ion preferido por las células (4). En esta condición prácticamente no hay acumulación de sodio (Fig 6.0). La concentración interna de sodio aumenta si se agrega 1.0 M de NaCl; sin embargo, se encontró una gran acumulación del potasio al término de esta incubación (Fig 6.0). Esto permite descartar la actividad de un antiporte catión⁺/catión⁺ como estrategia para la acumulación iónica de sodio; es decir, la acumulación iónica preferente al Na^+ parece deberse a su mayor abundancia en el medio (20 mM de K^+ vs 1.02 M de Na^+ en el YPD). Debe señalarse que el medio de cultivo no está ajustado a un pH determinado, y durante el cultivo, el pH del medio se va acidificando (datos no mostrados). Esta acumulación de iones podría estarse dando por un tipo de transporte iónico mediado por una fuerza motriz que se produce principalmente por un potencial eléctrico, derivado de la energía metabólica (18, 31) a través de transportadores (18), y que se diferencian principalmente por su capacidad

de saturación. Esto permite estudiarlos como enzimas (53). Los procesos involucrados tanto en la homeostasis iónica para un estado estacionario de K^+ y Na^+ como los sistemas de transporte de estos cationes, son importantes para la viabilidad de la célula (4) y están relacionados con el pH del medio.

Partiendo de este punto, se decidió incubar durante 3 horas (tiempo de duplicación control) a las células a un pH constante. Consideramos que es el tiempo adecuado para obtener una aproximación a los procesos fisiológicos presentes en el hábitat natural, debido a que en los cultivos el pH del medio disminuye rápidamente y se sale de los parámetros que deseamos determinar en el transporte y metabolismo energético.

Para determinar el efecto del pH se escogieron dos extremos. El pH durante la incubación fue de 6.0 y 8.0, utilizando NaOH 0.26 M para mantener constante el pH. Lo que se observó fue: a) una mayor cantidad de base para mantener el pH del medio, cuando éste es más alcalino, lo cual indica una mayor capacidad para acidificar el medio; b) en todos los casos, la cantidad de sosa requerida fue mayor que la de potasa, y c) la cantidad de base requerida fue mayor al incubar las células en presencia de NaCl 1.0 M.

La acidificación del medio se debe a dos factores, el bombeo de protones por una $H^+ATPasa$ y la producción de CO_2 , que luego se hidrata para formar H_2CO_3 , uno u otro, o ambos factores pueden estar aumentados al pH más alcalino. En particular, el segundo sí debe estar claramente aumentado, dando lugar a la acumulación de Na^- ó $KHCO_3$, resultantes de la reacción del ácido carbónico con la base utilizada (ver más adelante).

En relación con la acumulación de los dos cationes, es claro que el aumento del Na^+ , al preincubar las células y mantener el pH a 6.0, proviene de la cantidad no despreciable del NaOH agregado al medio. Esta acumulación es luego mucho mayor, con una disminución del K^+ , al incubar al pH 8.0, ya que las cantidades de Na^+ agregadas con la sosa, son también mucho mayor al pH 8.0. De hecho, si se comparan las concentraciones de Na^+ ó K^+ en el medio que resultan de mantener el pH a un cierto valor, puede notarse que igualan o superan en todas las condiciones de preincubación a los valores de la K_m para el transportador del Na^+ .

Finalmente, y en este mismo sentido, es claro que la acumulación del Na^+ al preincubar las células en presencia de NaCl 1.0 M, puede explicarse tan sólo porque a esa concentración del catión, no obstante la mayor K_m (o menor afinidad del transportador), su concentración es mucho mayor que la K_m .

Es posible concluir que en experimentos de este tipo sea más conveniente mantener el pH del medio con KOH que con NaOH , para evitar los efectos, sobre la homeostasis iónica de las células.

Ajustando el pH con NaOH (sosa)		
Incubación sin NaCl		
	pH 6.0	pH 8.0
K^+ [mM]	154.4 ± 11.5	114 ± 4.6
Na^+ [mM]	37.5 ± 2	129.2 ± 13
Incubación con 1.0 M NaCl		
	pH 6.0	pH 8.0
K^+ [mM]	52.5 ± 13	51.7 ± 8.5
Na^+ [mM]	239 ± 8	269 ± 10
Ajustando el pH con KOH (potasa)		
Incubación sin NaCl		
	pH 6.0	pH 8.0
K^+ [mM]	189	220.5 ± 20
Na^+ [mM]	11.4 ± 0.8	12 ± 1
Incubación con 1.0 M NaCl		
	pH 6.0	pH 8.0
K^+ [mM]	N.D.	91 ± 5
Na^+ [mM]	N.D.	217 ± 10

Tabla 5.0. Valores obtenidos de la concentración iónica interna de *D. hansenii* [mM], después de incubar por 3 horas a pH continuamente ajustado a 6.0 y 8.0 con hidróxido de sodio 0.26 M é hidróxido de potasio 0.267 M. Los datos presentados representan valores de 3 experimentos independientes para cada una de las condiciones.

La Tabla 5.0 se presenta como resumen de los datos en que se muestran los cambios de la composición iónica de las células.

Las cinéticas del transporte iónico de Na^+ y Rb^+ en el control, muestran que entre ambos cationes existe distinta afinidad, siendo el Rb^+ más afín a transportarse al interior que el Na^+ . A pH alcalino el Rb^+ aumenta su velocidad de transporte (Fig. 12.0) al igual que el Na^+ ; sin embargo, la mayor afinidad a pH 8.0 para el Na^+ se pierde (Fig. 11.0). En las células incubadas con medio ajustado con NaOH, la cinética de Rb^+ mantiene una afinidad semejante en las distintas condiciones, aunque la velocidad aumenta en pH alcalino (tabla 2.0). El mismo fenómeno se encontró cuando al medio de incubación suplementado con 1.0 M de NaCl se le ajustó el pH con KOH. La cinética de Rb^+ en las células incubadas en ambos valores de pH, es de alta afinidad y una misma velocidad, sin embargo esa afinidad, disminuye en el medio de incubación estándar, es decir, sin suplementar con 1.0 M de NaCl (Tabla 3.0).

Por otro lado, las cinéticas de Na^+ muestran una más baja afinidad en comparación con el Rb^+ , comportamiento observado en *S. cerevisiae* (2), aunque la velocidad fue de 2 a 10 veces mayor en las células incubadas con el medio ajustado con KOH (tabla 4.0). No se pudieron obtener las cinéticas de transporte a las células incubadas con NaOH, probablemente por las altas concentraciones de Na^+ al interior de la célula al final de la incubación en presencia de 1.0 M de NaCl.

El metabolismo energético se relaciona con el pH del medio y la homeostasis iónica, principalmente mediante: a) la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (con el consecuente consumo de ATP); b) la entrada de cationes monovalentes mediante un uniportador; c) una ATPasa presente en *D. hansenii* que bombea Na^+ al exterior, y d) antiportadores catión/ H^+ (que intercambian protones por cationes). Por tal motivo se decidió estudiar el metabolismo energético como un indicador de la fisiología en *D. hansenii*. Reportes previos catalogan a *D. hansenii* como una levadura Crabtree positiva, es decir, que fermenta en presencia de oxígeno; sin embargo, esa capacidad es muy pobre por la baja actividad de la fosfofructocinasa, enzima reguladora de la vía glucolítica en *D. hansenii* (47). Otros estudios del metabolismo energético en esta levadura y que fueron realizados por nuestro grupo de trabajo (ensayando a pH 6.0),

señalan un aumento en la capacidad respiratoria y fermentativa en células crecidas en presencia de sal (7, 46). Los resultados que aquí se presentan, están de acuerdo con esos datos para la respiración; sin embargo, no lo confirman para los datos de la fermentación ya que aunque sí hay un aumento en la capacidad fermentativa en las células incubadas con respecto al control. Ese aumento en la producción de alcohol podría estarse dando por el efecto de la anaerobiosis presente durante la incubación en el pHstat, dato también encontrado en el 2006 por nuestro grupo de trabajo (47). El aumento del pH, tanto en los ensayos como en la incubación no generó mayor cambio en la capacidad metabólica aquí estudiada, aunque sí lo reflejó en el consumo de glucosa. El consumo de glucosa a pH 8.0 fue menor en comparación a pH 6.0 (Fig 13.0); sin embargo, la adición de 1.0 M de NaCl provocó una disminución en ese consumo de glucosa a pH 6.0 manteniéndose prácticamente igual que a pH 8.0 (Fig 15.0). Una posible explicación a este fenómeno podría darse tomando en cuenta los datos de acumulación de iones (Fig 8.0), ya que para el Na^+ se observa una captación muy alta, que podría favorecer la síntesis y acumulación de osmolitos (17, 35), evitando así el consumo de glucosa. Esa ligera tendencia a acumular más sodio a pH 8.0 podría influir en el bajo consumo de glucosa en ambiente alcalino.

Hay que tomar en cuenta también que uno de los productos de la respiración y la fermentación es el CO_2 y que al hidratarse en el medio forma ácido carbónico, que durante la incubación genera una disminución del pH que debe ser neutralizada por el pH-stat adicionando la solución alcalina para mantener el pH del medio, por lo que los mEq de base utilizados no neutralizaron solamente los protones bombeados al medio. Por otro lado, debido a que en los experimentos del metabolismo energético, los ensayos realizados a pH 8.0 no fueron más eficientes en comparación con los ensayos a pH 6.0, la mayor parte de los mEq de base utilizados a pH 8.0 (se necesitó más solución alcalina a pH 8.0 que a pH 6.0 para neutralizar el medio, Tabla 1); fueron probablemente para neutralizar los H^+ liberados al medio por la acción del antiporte Na^+/H^+ KHA1 (8) y no el ácido carbónico formado por la liberación de CO_2 , para eso se tendrá que hacer ensayo de bombeo de protones.

CONCLUSIONES

- El tiempo de duplicación en *D. hansenii* disminuye al suplementar el medio de cultivo con NaCl 1.0 M.
- A pH 8.0 disminuye la afinidad del transporte y permiten una alta acumulación tanto de Na⁺ como de K⁺.
- El Rb⁺ como análogo al K⁺, se transporta con mayor afinidad que el Na⁺ al interior de las células.
- El consumo de glucosa en *D. hansenii*, contrario a lo esperado, se favorece a pH 6.0.
- El metabolismo energético no varía ante los cambios de pH en esta levadura.
- El sodio aumenta la capacidad respiratoria; no así la fermentación, estos datos se relacionan con el consumo de glucosa.

PERSPECTIVAS

- Determinar el pH interno durante la incubación y posterior a la incubación, junto con ensayos de bombeo de protones.
- Determinar la concentración de ATP celular ante los cambios del pH del medio.
- Realizar ensayos de competitividad en transporte iónico con Na^+ y Rb^+ .
- Cuantificar la cantidad de transcrito y la actividad de la ATPasa-ENA en las células provenientes de las incubaciones a pH 6.0 y 8.0, para definir su papel en la acumulación de grandes cantidades de Na^+ .
- Medir la posible acumulación de polisacáridos que puedan explicar los cambios del consumo de glucosa.
- Determinar la concentración de CO_2 producido en las distintas incubaciones para diferenciar del ácido neutralizado por las soluciones alcalinas, cuál proviene de los H^+ liberados por la célula al medio y cual del ácido carbónico proveniente del CO_2 del metabolismo.
- Medir la síntesis de osmolitos a distintos pH del medio.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Almagro, A., C. Prista, B. Benito, M. C. Loureiro-Dias, and J. Ramos.** 2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol* **183**:3251-5.
2. **Armstrong, W. M., and A. Rothstein.** 1964. Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake. *J Gen Physiol* **48**:61-71.
3. **Bahnweg, G., and S. F. K.** 1979. Marine fungi: Occurrence in the southern Indian Ocean., p. 491. *In* J. M. Sieburth (ed.), *Sea Microbes*. Oxford University Press, New York, U.S.A.
4. **Benito, B., B. Garciadeblas, J. Perez-Martin, and A. Rodriguez-Navarro.** 2009. Growth at high pH and sodium and potassium tolerance in media above the cytoplasmic pH depend on ENA ATPases in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **8**:821-9.
5. **Benito, B., B. Garciadeblas, P. Schreier, and A. Rodriguez-Navarro.** 2004. Novel p-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryot Cell* **3**:359-68.
6. **Butinar, L., S. Santos, I. Spencer-Martins, A. Oren, and N. Gunde-Cimerman.** 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett* **244**:229-34.
7. **Calahorra, M., N. S. Sanchez, and A. Pena.** 2009. Activation of fermentation by salts in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res*.
8. **Carcia-Salcedo, R., V. Montiel, F. Calero, and J. Ramos.** 2007. Characterization of DhKHA1, a gene coding for a putative Na(+) transporter from *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* **7**:905-11.
9. **Conway, E. J., and F. Duggan.** 1958. A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochem J* **69**:265-74.
10. **Chevance, F. F., and K. T. Hughes.** 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* **6**:455-65.
11. **Dixon, M., and E. C. Webb.** 1979. *Enzymes*, Third ed. Longman Group Ltd., London. Great Britain.

12. **Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. De Montigny, C. Marck, C. Neuveglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anhouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J. M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisrame, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. De Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J. M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G. F. Richard, M. L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaiia, M. Wesolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, and J. L. Souciet.** 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**:35-44.
13. **Fell, J. W.** 1979. Distribution of Antarctic marine fungi., p. 491. *In* J. M. Sieburth (ed.), *Sea Microbes*. Oxford University Press, New York, U.S.A.
14. **Ferreira, A. D., and B. C. Viljoen.** 2003. Yeasts as adjunct starters in matured cheddar cheese. *Int J Food Microbiol* **86**:131-40.
15. **Gadanho, M., J. M. Almeida, and J. P. Sampaio.** 2003. Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. *Antonie Van Leeuwenhoek* **84**:217-27.
16. **González-Hernández, J. C., C. A. Cárdenas-Monroy, and A. Peña.** 2004. Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **21**:403-12.
17. **González-Hernández, J. C., M. Jiménez-Estrada, and A. Peña.** 2005. Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles* **9**:7-16.
18. **Gouaux, E., and R. Mackinnon.** 2005. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* **310**:1461-5.
19. **Hagler, A. N., and A. D. G.** 1987. Ecology of Aquatic Yeasts, p. 181-199. *In* A. H. Rose and H. J.S. (ed.), *The Yeasts*, vol. 2. Academic Press, London. U.K.

20. **Harris, D. C.** 1987. Quantitative Chemical Analysis, 2a ed. ed. W.H. Freeman & Company., New York, U.S.A.
21. **Hobot, J. A., and D. H. Jennings.** 1981. Growth of the *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to pH and salinity. *Experimental Mycology* **5**:217-228.
22. **Jong, S. C., and M. J. Edwards.** 1990. Catalogue of Yeasts. *In* A. T. C. Collection (ed.), 18th ed, Maryland, USA.
23. **Junge, W., H. Sialaff, and S. Engelbrecht.** 2009. Torque generation and elastic power transmission in the rotary F(O)F(1)-ATPase. *Nature* **459**:364-70.
24. **Kandori, H.** 2000. Role of internal water molecules in bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta* **1460**:177-91.
25. **Kreger-vanRij, W. J. N.** 1987. Clasification of yeasts., p. 5-61. *In* A. H. Rose and H. J.S. (ed.), *The Yeasts*, 2 ed, vol. 1. Academic Press, London. U.K.
26. **Kurita, O., and E. Yamazaki.** 2002. Growth under alkaline conditions of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* IFO10939. *Curr Microbiol* **45**:277-80.
27. **Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker.** 1997. *Brock biology of microorganisms*, Eighth ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, USA.
28. **Monod, J.** 1949. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol* **3**:371-394.
29. **Nelson, D. L., and M. M. Cox.** 2008. Lehninger, Principles of Biochemistry, Fifth ed. ed. W.H. Freeman and Company, New York. U.S.A.
30. **Neves, M. L., R. P. Oliveira, and C. M. Lucas.** 1997. Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* **143 (Pt 4)**:1133-9.
31. **Nicholls, D. G., and S. J. Ferguson.** 2002. *Bioenergetics 3*, 3rd ed. Academic Press, London, UK.
32. **Nobre, A., C. Lucas, and C. Leao.** 1999. Transport and utilization of hexoses and pentoses in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* **65**:3594-8.

33. **Norkrans, B.** 1966. Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Arch Microbiol* **54**:374-392.
34. **Norkrans, B.** 1968. Studies on marine occurring yeasts: respiration, fermentation and salt tolerance. *Archiv. Fur. Mikrobiologie* **62**:358-372.
35. **Norkrans, B., and A. Kylin.** 1969. Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *J Bacteriol* **100**:836-45.
36. **Ochoa, J., and V.-J. R.** 2004. Las levaduras marinas como herramientas científica y biotecnológica. *Universidad y Ciencia*:39-50.
37. **Ochoa, J. L., and B. H.L.** 2006. Usos potenciales de las levaduras marinas de México. *Revista Ciencia* **57**.
38. **Oren, A.** 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:334-48.
39. **Pena, A., G. Cinco, A. Gomez-Puyou, and M. Tuena.** 1972. Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **153**:413-25.
40. **Prescott, L. M., J. P. Harley, and D. A. Klein.** 2005. *Microbiology*, 6th ed. Mc Graw Hill, New York, USA.
41. **Prista, C., A. Almagro, M. C. Loureiro-Dias, and J. Ramos.** 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* **63**:4005-9.
42. **Prista, C., J. C. Gonzalez-Hernandez, J. Ramos, and M. C. Loureiro-Dias.** 2007. Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* **153**:3034-43.
43. **Ramos, J.** Introducing *Debaryomyces hansenii*, a salt loving yeast, p. 3-11. En preparación.
44. **Rivas, B., P. Torre, J. M. Dominguez, and A. Converti.** 2009. Maintenance and growth requirements in the metabolism of *Debaryomyces hansenii* performing xylose-to-xylitol bioconversion in corn cob hemicellulose hydrolyzate. *Biotechnol Bioeng* **102**:1062-73.
45. **Rose, A. H.** 1987. Responses to the chemical environment, second ed, vol. 2. Academic Press Inc., London. U.K.

46. **Sánchez, N. S., R. Arreguín, M. Calahorra, and A. Peña.** 2008. Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. FEMS Yeast Res **8**:1303-12.
47. **Sánchez, N. S., M. Calahorra, J. C. González-Hernández, and A. Peña.** 2006. Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **23**:361-74.
48. **Stryer, L., J. M. Berg, and J. C. Tymoczko.** 2003. Bioquímica, 5ta Ed. ed. Ed. Reverté, S. A., Barcelona. España.
49. **Thomé-Ortiz, P. E., A. Peña, and J. Ramírez.** 1998. Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. Yeast **14**:1355-71.
50. **Turk, M., V. Montiel, D. Zigon, A. Plemenitas, and J. Ramos.** 2007. Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. Microbiology **153**:3586-92.
51. **van Urk, H., E. Postma, W. A. Scheffers, and J. P. van Dijken.** 1989. Glucose transport in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts. J Gen Microbiol **135**:2399-406.
52. **Veiga, A., J. D. Arrabaca, F. Sansonetty, P. Ludovico, M. Corte-Real, and M. C. Loureiro-Dias.** 2003. Energy conversion coupled to cyanide-resistant respiration in the yeasts *Pichia membranifaciens* and *Debaryomyces hansenii*. FEMS Yeast Res **3**:141-8.
53. **Voet, D., and J. G. Voet.** 2003. Biochemistry, Third edition ed. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey. U.S.A.
54. **Welthagen, J. J., and B. C. Viljoen.** 1998. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. Int J Food Microbiol **41**:185-94.

ANEXO

Homologías de la cepa utilizada.

- Departamento de Agricultura de E. U. (USDA), Peoria IL: Y-7426
- American Type Culture Collection: ATCC 36239
- Centraalbureau voor Schimmelcultures: CBS-767
- Institute for Fermentation, Osaka: IFO-0083
- National Collection of Yeast Cultures, U.K.: NCYC (no se encontró registro)

Medios de cultivo

- YPGal – NaCl 1.0 M sólido
 - 2% de Agar.
 - 2% de Galactosa.
 - 2% de Bacto-Peptona.
 - 1% de Extracto de levadura.
 - Cloruro de Sodio (NaCl) 1.0 M.

- YPD – NaCl 1.0 M sólido
 - 2% de Agar.
 - 2% de Glucosa.
 - 2% de Bacto-Peptona.
 - 1% de Extracto de levadura.
 - Cloruro de Sodio (NaCl) 1.0 M.

- YPD Líquido

- 2% de Glucosa
- 2% de Bacto-Peptona.
- 1% de Extracto de levadura.

- YPD – NaCl 1.0 M Líquido

- 2% de Glucosa
- 2% de Bacto-Peptona.
- 1% de Extracto de levadura.
- Cloruro de sodio (NaCl) 1.0 M.

Líquido de centelleo

- Para 9.0 litros de líquido de centelleo.

- Triton X100 = 2,313 ml
- Etilenglicol = 313 ml
- Etanol = 954 ml
- Xileno = 5,400 ml
- 2,5-Difeniloxazol (PPO) = 24 gramos.