



Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

Facultad de Química

CAMBIOS METABÓLICOS Y FISIOLÓGICOS DE LA  
LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae* EN RESPUESTA A  
DIFERENTES pHs EXTERNOS

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO-FARMACÉUTICO-BIÓLOGO

PRESENTA:

HELBER ALVAREZ PARADA



México, D.F.,

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE	Rosario Adelaida Muñoz Clares
VOCAL	Norma Silvia Sánchez Sánchez
SECRETARIO	Antonio Peña Díaz
1 <sup>er</sup> SUPLENTE	José de Jesús García Trejo
2 <sup>o</sup> SUPLENTE	Vanessa Rebeca Maya Ampudia

Este trabajo de tesis se realizó en el laboratorio del Dr. Antonio Peña Díaz, en el departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

AESOR DEL TEMA:

Dr. Antonio Peña Díaz

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Martha Calahorra Fuertes

SUSTENTANTE:

Helber Alvarez Parada

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer plano agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser como mi segunda casa, especialmente a la Facultad de Química por brindarme los medios necesarios para poder realizarme como profesional.

A mis padres ROSA PARADA PÉREZ y NAZAREO OLIVAREZ PÉREZ, por el esfuerzo tan enorme realizado para poder sacarme avante durante toda mi vida como estudiante. Agradecerle por los buenos momentos que compartimos como la familia que somos. Agradecerles porque siempre supieron apoyarme ante los obstáculos que se me presentaron en mi carrera, porque ese amor incondicional que siempre me brindaron, es un amor que nunca podrá borrarse. Porque además de sufrir en la vida, sufrieron por hacerme una persona de bien, por crear en mi una mentalidad siempre ganadora, ganadora en el sentido de que todo lo me proponga lo podré lograr y creo que no me queda más que compensar ese sufrimiento con logros en mi vida, que sé de antemano que este triunfo también es de ellos. Porque siempre supieron comprenderme en todo momento, por eso y más quiero reiterarles las gracias. ¡¡LOS AMO!!

A mis hermanos ÁNGEL, MARITZA Y LUCERO ALVAREZ PARADA, por estar siempre conmigo y apoyarme en todo momento de mi carrera, y sin olvidar a mis pequeñas sobrinitas DANIELA, MARÍA JOSÉ y DIANA LARISSA por ser mi pequeña inspiración.

A mis abuelos MARÍA JOSEFA PÉREZ RODRÍGUEZ Y BENJAMÍN PARADA HERNÁNDEZ, por el cariño y las buenas enseñanzas brindadas.

A la familia VENEGAS REYNOSO por brindarme su hogar, cariño y confianza y por hacerme sentir parte de la familia. Sobre todo por los buenos consejos brindados y ese impulso que siempre me inspiraron a terminar este proceso.

Agradecer a la personita que fue un apoyo incondicional en mi vida, PALOMA ABIGAIL MONTERO PEÑALOZA, el amor de mi vida. Porque sin su apoyo incondicional en los momentos cruciales de mi vida, no habría podido salir adelante.

Porque siempre me dio ánimos para seguir adelante, siempre me entregó ese amor incondicional que todo hombre espera de una mujer, siempre me hizo sentir una persona importante y que lograría todo lo que me propusiera y porque siempre estuvo conmigo en los buenos y malos momentos.

A mis amigos ADRIAN, LEONARDO, ISRAEL, KAREN, NAYIBI, EDITH, AIMÉ, por brindarme su cariño y comprensión incondicionalmente y muy en especial a mi amiga JENNY BALAM VILLAREAL por motivarme en todo momento a continuar y mantenerme firme en este proceso tan importante.

A mis compañeros y ex compañeros del laboratorio 306 OTE del Instituto de Fisiología Celular, de la UNAM, MANUEL, CRHISTIAN, KARLA, OMAR, LUIS, RAÚL

Al Sr. RENÉ FLORES por su apoyo como laboratorista, por la amabilidad que siempre lo caracterizó y por ser una buena persona. Así mismo agradecerle al Ingeniero JUAN BARBOSA (departamento de cómputo del IFC), por brindarme el apoyo en el mantenimiento de mis herramientas tecnológicas.

En memoria de mi bisabuela ÁNGELA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ por ser como una madre durante mi infancia, y de mi prima ROSA ALEJANDRA PARADA CONDE un angelito que vigila mi camino.

Por último y no menos importante, agradecer a Dios por concederme la dicha de vivir día a día cada una de mis experiencias tanto como ser humano como de estudiante, y agradecerle por ponerme en mi camino personas que supieron ser incondicionales en todo momento.

Al Dr. ANTONIO PEÑA DÍAZ, primeramente por ser una humilde, espléndida, cariñosa, comprensiva, alegre persona y siempre con la determinación de ayudar al prójimo. En segundo término agradecerle por permitirme la estancia en su laboratorio (una de la mejores experiencias académicas en mi vida como estudiante), por la confianza brindada durante este tiempo, como tercer punto agradecerle por proporcionarme la figura 4 presentada en este trabajo, por su ayuda técnica en la realización de este proyecto de tesis y por la revisión de la misma y, finalmente no me queda más que agradecerle por ser un excelente tutor. ¡¡GRACIAS Dr. PEÑA!!

A la Q.F.B. NORMA SILVIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ y la Dra. MARTHA CALAHORRA FUERTES, por su ayuda técnica en la realización de este proyecto de tesis y en la revisión de la misma. También por brindarme un apoyo incondicional, por el cariño y sobre todo por el excelente humor que siempre mantuvimos. También agradecerle a MARTHA por proporcionarme la figura 2 de este trabajo. A NORMA por ser una excelente persona, que siempre me incitó a ser cada vez mejor en todo lo que hago y no quedarme estancado en algo, sino siempre sobresalir en todos los aspectos de mi vida. ¡¡EN VERDAD MUCHAS GRACIAS A LAS DOS!!

Al Dr. JORGE RAMÍREZ SALCEDO por proporcionarme la Fig. 18 de este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización de este proyecto.

## ÍNDICE

Tema	Página
Abreviaturas	7
<b>1 Introducción</b>	<b>8</b>
1.1 Metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.2 El K <sup>+</sup> y su importancia en las funciones celulares	13
1.3 La H <sup>+</sup> -ATPasa	15
1.4 La levadura en valores elevados del pH del medio	19
1.5 Objetivos	20
1.6 Objetivo general	20
1.7 Objetivos particulares	20
<b>2 Materiales y métodos</b>	<b>21</b>
2.1 Condiciones y cultivo de la levadura	21
2.2 Acidificación del medio	21
2.3 Transporte de K <sup>+</sup> , bombeo de H <sup>+</sup> y respiración	22
2.4 Fermentación	23
2.5 Consumo de glucosa	24
2.6 Determinación de G6P y ATP	24
2.7 Determinación de NADH	25
<b>3 Resultados y discusión</b>	<b>27</b>
3.1 Crecimiento y acidificación del medio	27
3.2 Fermentación	32
3.3 Efecto sobre la respiración	36
3.4 Transporte de K <sup>+</sup> y bombeo de H <sup>+</sup>	37
3.5 G6P, ATP y NADH	40
<b>4 Conclusiones</b>	<b>48</b>
<b>5 Perspectivas</b>	<b>49</b>
<b>6 Referencias bibliográficas</b>	<b>51</b>

## ABREVIATURAS

ADH	Alcohol Deshidrogenasa
AIDH	Aldehído Deshidrogenasa
ATP	Adenosín Trifosfato
ADP	Adenosín Difosfato
BFG	1,3-Bisfosfoglicerato
DAPI	Dicloruro 4',6- Diaminidino-2-fenilindol
DO	Densidad Óptica
EtOH	Etanol
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
G6P	Glucosa 6-Fosfato
G6PDH	Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa
GO	Glucosa Oxidasa
Homopipes	Ácido Homopiperazina-N-N'-bis-2-etanosulfónico
HK	Hexocinasa
MES	Ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfónico
mEq	miliequivalentes
NAD <sup>+</sup>	Nicotín Adenín Dinucleótido (Oxidado)
NADH	Nicotín Adenín Dinucleótido (Reducido)
NADP <sup>+</sup>	Nicotín Adenín Dinucleótido Fosfato (Oxidado)
NADPH	Nicotín Adenín Dinucleótido Fosfato (Reducido)
SD	Desviación Estándar. De sus siglas en inglés: "Standard Deviation"
TEA	Trietanolamina
YPD	Extracto de levadura, peptona y dextrosa. De sus siglas en inglés: "Yeast Peptone Dextrose"
$\epsilon$ NADPH	Coefficiente de Extinción Molar del NADPH

## INTRODUCCIÓN

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura. Las levaduras pertenecen al Reino Fungi (al reino de los hongos), al grupo de los Ascomicetos. Ha sido ampliamente estudiada, principalmente por su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol.

Los hongos son organismos eucariotas que se encuentran en un reino separado de las plantas y animales. Todos presentan una complejidad organizacional y de estructuras celulares; siendo los hongos similares a las plantas en cuanto a que poseen paredes celulares y son inmóviles. Se diferencian de éstas porque carecen de clorofilas y son incapaces de fotosintetizar. Referente a las células animales, los hongos se diferencian principalmente por poseer pared celular y por no tener centrosomas con centriolos, entre otras cosas.

Los hongos pueden ser macroscópicos o microscópicos. Entre los microscópicos existen dos morfologías:

- Hongos filamentosos (crecimiento en hifas)
- Unicelulares (levaduras)

Las levaduras son organismos unicelulares ovalados, de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Se suelen desarrollar en ambientes con altas concentraciones de azúcar. Además de sus usos tradicionales, son ahora de gran utilidad en la industria y la biología molecular porque pueden ser modificados genéticamente.

Este microorganismo muestra 5 fases de crecimiento cuando se cultiva en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: 1) la fase de retraso (lag), 2) la fase logarítmica o exponencial, 3) la fase diáuxica, 4) la fase postdiáuxica y 5) la fase estacionaria. La fase lag es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Al crecer en presencia de glucosa, durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo en el que producen etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio

(crecimiento en presencia de dos sustratos); en este caso al consumir la glucosa producen etanol y posteriormente consumen el etanol.

En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica y aumenta gradualmente su resistencia al estrés, en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. Para esta fase, las células han acumulado carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticasa (Strathern *et al.*, 1992).

Es frecuente que las levaduras se vean sometidas a varios tipos de estrés a medida que las condiciones del medio cambian, tanto en situaciones naturales como durante los procesos industriales. El daño provocado por el estrés y la respuesta de la levadura al mismo, depende de su tipo y del estado de desarrollo de la levadura al momento en que ocurre el estímulo. Sin embargo, en general, las condiciones adversas a las que se enfrenta este organismo afectan principalmente a las estructuras celulares (ej. las membranas) y a las diferentes moléculas, especialmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las cuales sufren modificaciones estructurales que dañan su función.

### **METABOLISMO DE *Saccharomyces cerevisiae***

Durante años *S. cerevisiae* ha sido utilizada en la elaboración de vinos, pan, cerveza, así como en las industrias de destilación. Ha sido utilizada por el hombre desde tiempos remotos para la fermentación, brebajes y comida (Sherman, 2002; Dequin y Casaregola, 2011) y es por ello que se puede considerar a *S. cerevisiae* como la reina de la fermentación.

La fermentación es sin duda el proceso anaeróbico más característico de *S. cerevisiae*, en el cual la levadura degrada la glucosa para obtener energía en forma de ATP. Durante el metabolismo de carbohidratos (principalmente glucólisis), la glucosa es degradada a piruvato y éste a su vez, en condiciones anaeróbicas (ausencia de oxígeno) es descarboxilado por la piruvato descarboxilasa a acetaldehído, el cual es posteriormente reducido por la alcohol deshidrogenasa a etanol que es el producto principal del metabolismo de la levadura, u oxidado hasta acetato por la aldehído deshidrogenasa (Eaton y Klein, 1954; Pronk *et al.*, 1996;

Postmus *et al.*, 2011). Como se mencionó anteriormente *S. cerevisiae* es un organismo principalmente fermentador, y por ello el organismo preferido en la industria vitivinícola, y ahora en la producción de bioetanol como combustible para automotores.

Durante el proceso de la fermentación también se genera dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), el cual en presencia de agua se hidrata a ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) y éste a su vez se disocia en bicarbonato ( $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ). Siendo éste una base conjugada que sirve como amortiguador a la célula en diferentes procesos de su metabolismo y es en parte responsable de la acidificación del medio en el que se encuentre la levadura (Jones y Greenfield, 1982; López *et al.*, 1999).

La producción de  $\text{CO}_2$  es el fenómeno que se aprovecha para la elaboración del pan.

En la Fig. 1 se muestran las principales rutas metabólicas de la levadura, así como las enzimas involucradas, en donde se observa la vía por la cual se lleva a cabo la producción de etanol y los intermediarios (Strathern *et al.*, 1982).

Como podemos observar en la Fig. 1, al mismo tiempo que el etanol puede ser un producto final de la degradación de la glucosa, también puede funcionar como sustrato para la levadura; es decir, puede llegar a ser consumido si en el medio en el que se encuentra no existe glucosa.

Por otra parte, el etanol también puede ser utilizado por la levadura como un sustrato respiratorio ya que al ser oxidado por la alcohol deshidrogenasa a acetaldehído, éste sufre una nueva oxidación por la aldehído deshidrogenasa para formar acetato, posteriormente la acetil CoA sintetasa une al acetato con una molécula de coenzima A (CoA) para formar acetil coenzima A (acetil CoA). Finalmente éste acetil CoA entra al ciclo de Krebs ó de los ácido tricarbóxicos condensándose con el oxalacetato para formar citrato, por la citrato sintasa y mediante reacciones subsecuentes en este ciclo se genera el poder reductor en forma de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  y éste entra a la cadena respiratoria.

En *S. cerevisiae*, el  $\text{K}^+$  acelera la fermentación, porque como resultado de su transporte se genera ADP, debido a la hidrólisis del ATP. La  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática, cuya función es la expulsión de  $\text{H}^+$  al exterior de la célula, se inhibe cuando la concentración de protones fuera de la célula aumenta, y por el contrario, el aumento el pH del medio acelera su actividad, aumentando también la

producción de ADP, uno de los sustratos importantes y elemento de control de la glucólisis.

Al consumir glucosa y producir etanol, *S. cerevisiae* puede llegar a acidificar mucho el medio en el que se encuentre y detener la producción de etanol, ya que además del bombeo de protones y de etanol, produce dióxido de carbono, que se hidrata y forma ácido carbónico, que se suma a la acidificación del medio. Este es uno de los problemas que la industria productora de alcohol enfrenta, y que podría solucionarse aumentando el pH del medio de cultivo en el que se coloque la levadura y asegurándose de que exista  $K^+$ , ya que como se mencionó anteriormente estos dos factores aumentan los niveles de ADP, que es uno de los principales reguladores en la producción de etanol.

Sin embargo, *S. cerevisiae* tiene también una importante capacidad respiratoria, que en presencia de oxígeno también participa de manera significativa en el aporte de la energía que la célula necesita. Durante el metabolismo respiratorio el piruvato generado es convertido en acetil coenzima A, el cual es utilizado para generar NADH en la mitocondria por la vía de los ácidos tricarbónicos (TCA). Posteriormente este NADH sintetizado es oxidado por la cadena respiratoria en la membrana interna mitocondrial, con la subsecuente translocación de protones. Esta translocación de protones resulta en la generación de una fuerza protón motriz la cual es utilizada para la síntesis de ATP (Postmus *et al.*, 2011).



*FRD* (fumarato reductasa), *FUM* (fumarasa), *GLD* (gliceraldehído-3-P deshidrogenasa), *GLK* (glucocinasa), *GND* (6-fosfogluconato deshidrogenasa), *GMP* (fosfoglicerato mutasa), *GPP* (glicerol-1-fosfatasa), *GUT1* (glicerol cinasa), *GUT2* (glicerol-3-P deshidrogenasa), *HXK1* y *HXK2* (hexocinasa), *ICD1* (isocitrato deshidrogenasa, NAD<sup>+</sup>), *ICD2* (isocitrato deshidrogenasa, NADP<sup>+</sup>), *ICL* (isocitrato liasa), *KGD* ( $\alpha$ -ketoglutarato deshidrogenasa), *LDH* (lactato deshidrogenasa), *MDD* (malato deshidrogenasa, descarboxilación), *MDH* (malato deshidrogenasa, mitocondrial), *MLS* (malato sintasa), *PCK* (fosfoenolpiruvato carboxilasa), *PDC* (piruvato descarboxilasa), *PDH* (piruvato deshidrogenasa), *PFK* (fosfofructocinasa), *PGI* (fosfoglucosa isomerasa), *PGK* (fosfoglicerato cinasa), *PGL* (6-fosfogluconolactonasa), *PGM1* y *PGM2* (fosfoglucomutasa), *PMI* (fosfomanosa isomerasa), *PYC* (piruvato carboxilasa), *PYK* (piruvato cinasa), *RPE* (ribulosa-5-P 3-epimerasa), *RPI* (ribulosa-5-P isomerasa), *SDH* (succinato deshidrogenasa), *SCS* (succinil-CoA sintetasa), *TAL* (transaldolasa), *TKT* (transcetolasa), *TPI* (triosa fosfato isomerasa), *ZWF* (glucosa-6-P deshidrogenasa).

De hecho, y volviendo al mismo ejemplo, también la respiración se acelera, tanto por la presencia de K<sup>+</sup> a pH bajo, como por el aumento del pH del medio (Peña *et al.*, 1972). En este último trabajo se demostró que el aumento de la fermentación y de la respiración en las condiciones mencionadas se debe al requerimiento de ATP para el transporte activo del ión.

### **EL K<sup>+</sup> Y SU IMPORTANCIA EN LAS FUNCIONES CELULARES**

El potasio es el principal catión intracelular en las levaduras ya que, junto con el H<sup>+</sup>, se encarga de mantener el gradiente electroquímico en las células. Sus niveles sin embargo, pueden variar desde más de 300 mM en las células recién colectadas, hasta 100 mM en las que se ayunan agitando en agua durante 24 horas. Es un catión fundamental en varios procesos celulares, incluso se requiere para el transporte de otros cationes (Peña y Ramírez, 1991; Enríquez-Freire *et al.*, 1999) y para la activación de algunas enzimas, como la piruvato Cinasa. Es responsable del aumento de la presión osmótica durante la gemación, así como un almacén de energía que permite a las células aun en ausencia de un sustrato, mantener el potencial electroquímico transmembranal, así como también se ve involucrado en el transporte de aminoácidos aumentando la síntesis de proteínas, además del transporte de sulfatos y fosfatos (Peña, 1975; Rosas *et al.*, 1994; Rodríguez-Navarro, 2000; Barreto *et al.*, 2011; Petrezsélyová *et al.*, 2011). Por otro lado se ha demostrado que el potasio puede proteger de la muerte celular programada inducida por glucosa (Lauff y Santa-María, 2010; Hoeberichts *et al.*, 2010). Cuando se agrega al medio, acelera tanto la respiración como la fermentación (Gómez-Puyou *et al.*, 1969; Peña *et al.*, 1969), debido a que su transporte al interior abate la diferencia de potencial eléctrico, lo cual estimula la actividad de la ATPasa de protones de la

membrana plasmática y por ende la respiración y la fermentación, debido a que con el aumento en la actividad de esta enzima, los niveles de ATP disminuyen y los de ADP aumentan, y es éste el responsable directo del aumento en la respiración y la fermentación.

*S. cerevisiae* presenta dos transportadores importantes encargados del movimiento del potasio hacia dentro de la célula, conocidos como Trk1p y Trk2p, codificados por los genes *TRK1* y *TRK2* (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; Navarrete *et al.*, 2010), El primero presenta una mayor afinidad por el potasio y se expresa en condiciones normales, mientras que el segundo presenta una menor afinidad por el potasio y sólo se expresa en ciertas condiciones (Michel *et al.*, 2006).

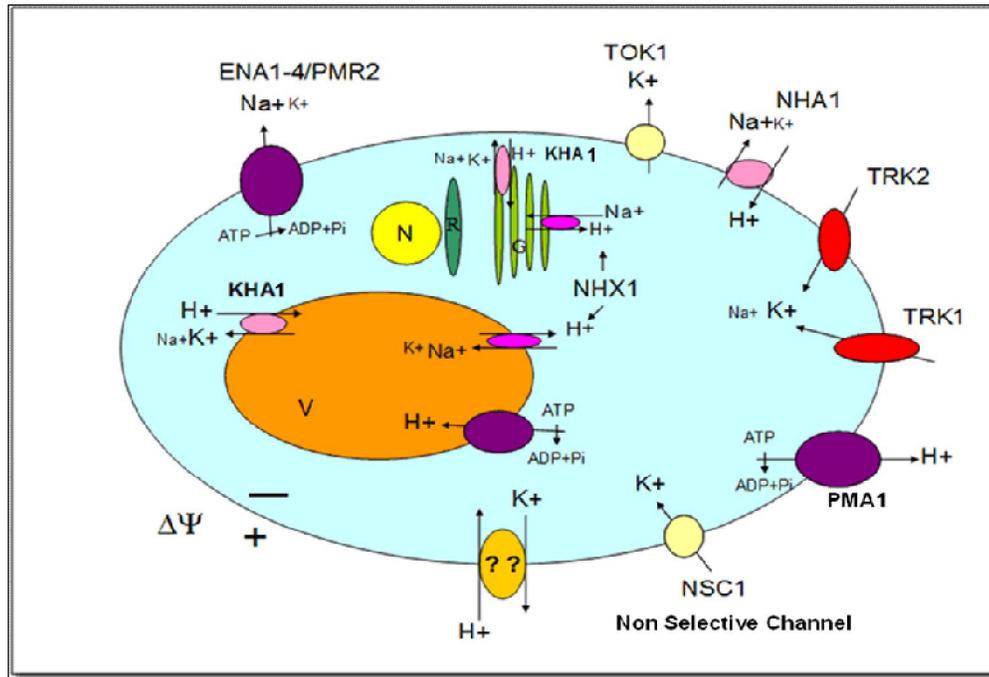
Además de lo antes mencionado, el movimiento de iones inorgánicos y diferentes nutrientes requiere de un potencial electroquímico para moverse a través de la membrana, el cual es generado por una H<sup>+</sup>-ATPasa (P) y por el K<sup>+</sup>. Aun en la ausencia de un sustrato, la levadura, que ha acumulado durante su crecimiento una gran concentración de este ion, puede, gracias a un sistema de salida, irlo liberando lentamente, con el fin de mantener la diferencia del potencial eléctrico a ambos lados de la membrana plasmática.

Se sabe también que el K<sup>+</sup> se acumula parcialmente en la célula junto con el bicarbonato (Klionsky *et al.*, 1990), principalmente en la vacuola, que es el principal organelo donde se acumulan iones y moléculas; la concentración total de este ion varía entre 100 y 300 mM de la cual gran parte se acumula en la vacuola (López *et al.*, 1999, Martínez-Muñoz y Peña, 2005).

Dada la importancia del K<sup>+</sup> en las funciones celulares, la reducción en la concentración de este catión podría implicar serias complicaciones para la célula; por ejemplo, una disminución en la velocidad de transporte de algunas moléculas al interior de la célula e incluso de algunos cationes. También la disminución de K<sup>+</sup> afecta la osmolaridad celular, la síntesis de las proteínas, la división celular y otros procesos.

En la Fig. 2 se muestran los principales transportadores en *S. cerevisiae*, donde podemos observar a los ya mencionados Trk1p, y Trk2p entre otros, implicados en el mantenimiento de la osmolaridad y el potencial electroquímico de la célula. Además de estos transportadores tenemos a otros como Kha1p, Nha1p, Ena1p y Tok1p, implicados en el movimiento del K<sup>+</sup> y el Na<sup>+</sup> hacia dentro y fuera de la célula respectivamente (Orij *et al.*, 2011). Es necesario señalar que el mantenimiento de la

concentración del  $\text{Na}^+$  es muy importante, ya que si no se mantiene una adecuada relación tanto dentro como fuera de la célula le puede resultar tóxico y alterar algunas de sus funciones.



**Fig. 2.** Esquema representativo de los principales transportadores encargados de mantener la homeostasis iónica en *S. cerevisiae*. (Realizado por M. Calahorra). N: Núcleo, R: Retículo endoplásmico, G: Aparato de Golgi, V: Vacuola.

### LA $\text{H}^+$ -ATPasa

En particular *S. cerevisiae* tiene una gran capacidad para acidificar el medio que la rodea; esta propiedad le ofrece una enorme ventaja para sobrevivir en él, dado que son muy pocos los organismos capaces de vivir a valores bajos del pH. Si a ello agregamos que es capaz de vivir en anaerobiosis, le asegura su prevalencia frente a otros organismos.

La manera por la cual la levadura acidifica el medio en que se encuentra, se debe principalmente a la actividad de la  $\text{H}^+$ -ATPasa plasmática (tipo P, Fig. 3) y junto con V-ATPasa, localizada en la vacuola mantienen la homeostasis del pH celular (Martínez.Muñoz y Kane, 2008). Por otra parte la V-ATPasa se encarga de acidificar este compartimento (Stevens, 1992), y dicha acidificación es indispensable para catalizar las reacciones que se llevan a cabo dentro de este organelo tan importante

(Tabla 1). Ambas ATPasa funcionan como transportadores primarios, siendo responsables de la acidificación del medio externo y vacuolar, respectivamente.

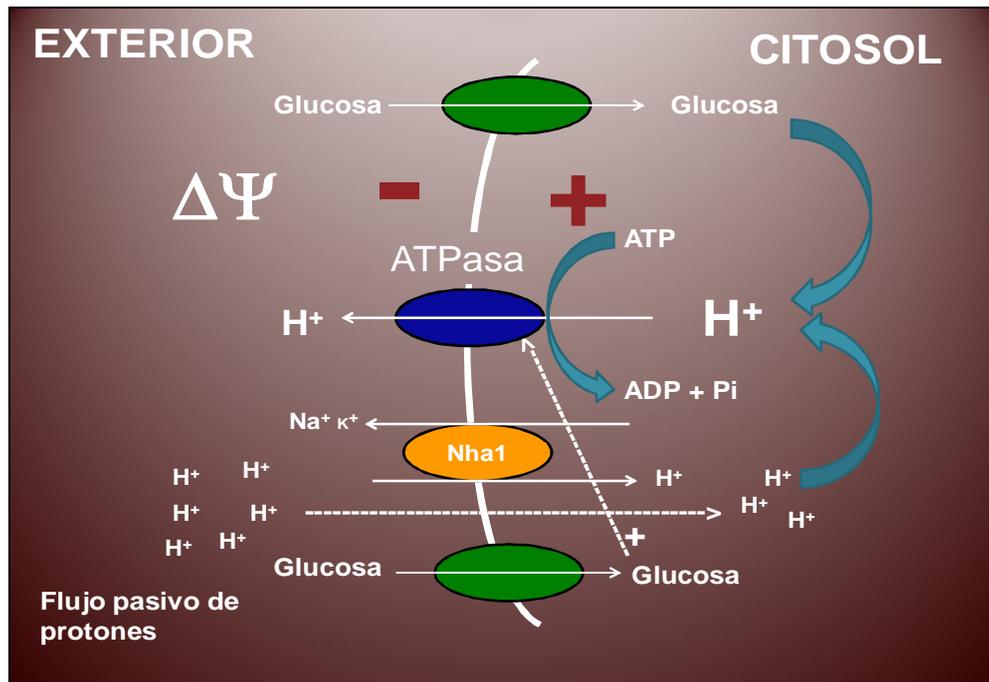


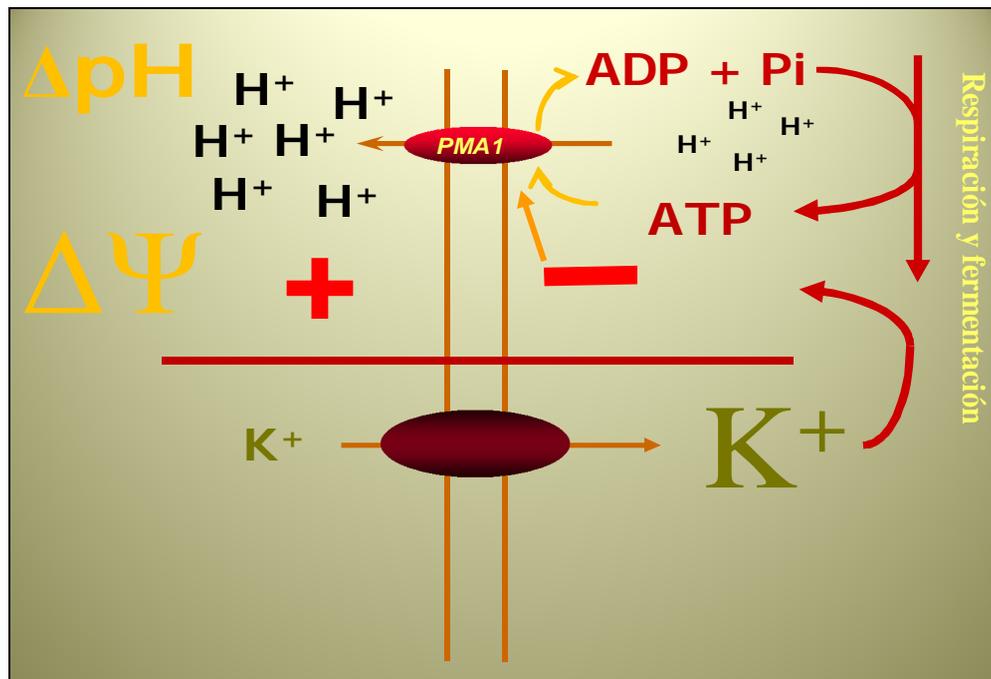
Fig. 3 Actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa en la membrana de levaduras

La H<sup>+</sup>-ATPasa es un hexámero, codificado por el gen *PMA1*, localizada en la membrana plasmática de hongos, plantas y protozoarios (Scarborough, 1999; Pagadala *et al.*, 2011). La manera por la cual lleva a cabo la acidificación del medio es mediante la hidrólisis de ATP. Esta hidrólisis provee la energía necesaria para el bombeo de protones (H<sup>+</sup>) al exterior de la membrana plasmática y a su vez este transporte es el responsable del movimiento de otras moléculas por medio de un transporte secundario.

Se sabe que esta H<sup>+</sup>-ATPasa puede consumir más del 60% del ATP celular generando un gradiente de protones para el transporte secundario de nutrientes y, además se ha observado que está involucrada en la resistencia al calor y diferentes estreses. (Bracey *et al.*, 1998).

Esta ATPasa fue primeramente postulada por Peña *et al.* (1972) y Van der Rest *et al.* (1995), en una revisión, la describen como un importante translocador de protones indispensable, entre otras cosas, para el transporte de iones y nutrientes al interior de la célula.

La actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa se incrementa al aumentar el pH del medio (Eraso y Portillo, 1994) ó al agregar K<sup>+</sup>; como resultado de la diferencia de potencial de membrana o el intercambio de iones, respectivamente, lo que trae como consecuencia la disminución de ATP y el aumento en los niveles de ADP y P<sub>i</sub>, como se mencionó anteriormente acelerando la fermentación y respiración de la levadura, como se ilustra en la Fig 4.



**Fig. 4.** Estimulación de la H<sup>+</sup>-ATPasa e implicaciones sobre la respiración y fermentación de la levadura al agregar K<sup>+</sup>.

Esta P-ATPasa tiene una gran afinidad por el sustrato (Mg-ATP); aislada presenta un pH óptimo entre 5 y 6.7, pero en la célula intacta, puede mostrar una actividad muy alta hasta niveles del pH del medio de 8 ó 9. Uno de sus inhibidores más utilizados es el vanadato, pero también se inhibe con dietilestilbestrol u omeprazol.

**Tabla 1.** Tipos de ATPasas de diferentes organismos y el papel desempeñado por cada una de ellas (Tomado de Nelson y Cox, 2000).

Ion(es) transportados	Organismo	Tipo de membrana	Papel de la ATPasa
<b>P-ATPasas</b>			
Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup>	Eucariotas superiores	Plasmática	Mantiene baja [Na <sup>+</sup> ] y alta [K <sup>+</sup> ] en el interior de la célula. Crea potencial transmembranal
H <sup>+</sup> K <sup>+</sup>	Células secretoras de ácido en mamíferos	Plasmática	Acidifica el contenido del estómago
H <sup>+</sup>	<b>Hongos (<i>Neurospora, Saccharomyces</i>)</b>	<b>Plasmática</b>	<b>Eliminan protones hacia la matriz extracelular, aumentando el pH del interior de la célula</b>
H <sup>+</sup>	<b>Plantas superiores</b>	<b>Plasmática</b>	
Ca <sup>2+</sup>	Eucariotas superiores	Plasmática	Mantiene baja la [Ca <sup>2+</sup> ] en el citosol
Ca <sup>2+</sup>	Células musculares en animales	Retículo sarcoplasmático	Secuestra el Ca <sup>2+</sup> intracelular manteniendo baja la [Ca <sup>2+</sup> ]
<b>V-ATPasas</b>			
H <sup>+</sup>	Animales	Vesículas secretoras lisosómicas y endosómicas	Crea un bajo pH en el compartiment o activando proteasas y otras enzimas hidrolíticas.
H <sup>+</sup>	Plantas superiores	Vacuolar	
H <sup>+</sup>	Hongos	Vacuolar	
<b>F-ATPasas</b>			
H <sup>+</sup>	Eucariotas	Mitocondrial interna	Cataliza la formación de ATP a partir de ADP + P <sub>i</sub>
H <sup>+</sup>	Plantas superiores	Tilacoides	
H <sup>+</sup>	Procariotas	Plasmática	

## LA LEVADURA EN VALORES ELEVADOS DEL pH DEL MEDIO

Es bien sabido que tanto la fermentación como la respiración de *S. cerevisiae* disminuyen notablemente a valores bajos del pH (Rothstein y Demis, 1953; Peña *et al.*, 1972) y que ambos procesos se aceleran a valores elevados del pH, o por la presencia de K<sup>+</sup>; sin embargo, se sabe también que su crecimiento se abate a niveles altos del pH, entre 8 y 9. Se han realizado diversos estudios sobre este fenómeno, fundamentalmente sobre los cambios en la expresión de algunos genes. Se sabe por ejemplo, que algunos genes, como los involucrados en el metabolismo de carbohidratos (*ALD4*, *DLD3*, *SDH4*, etc), en el transporte de fosfatos (*PHO12*, *PHO84*, *PHO89*, etc), en el transporte de iones y homeostasis (*ENA1*, *CST13*, *FIT2*, *ARN2*, *ARN2*, *ARN3*, etc) e involucrados en la respuesta a estrés (*HSP30*, *PAI1*, *CCP1*, etc), y principalmente los genes involucrados en el ciclo celular, como *RIM101*, un regulador positivo de la meiosis (Deninson, 2000; Peñalva y Arst, 2002, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)); entre otros, aumentan su expresión al elevar el pH del medio (Serrano, *et al.*, 2002; Viladevall, *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha investigado lo suficiente alrededor de los cambios del metabolismo y la energética o el transporte de iones y sustratos como posible causa de la suspensión del crecimiento. Este estudio muestra los resultados de un análisis del posible papel de cambios en el metabolismo, el transporte y la energética de la levadura a valores elevados del pH, como un intento de contribuir a la solución de esta incógnita.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del pH en el metabolismo, producción de energía y crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y su posible papel en la detención del crecimiento a niveles elevados del pH.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Definir los efectos en el metabolismo y la energética del pH elevado del medio en la levadura.
- Determinar los efectos del pH externo sobre el crecimiento de la levadura.
- Observar el comportamiento en cuanto al transporte de  $K^+$ , bombeo de  $H^+$  y respiración de la levadura al someterla a cambios de pH.
- Determinar la capacidad de la levadura para llevar a cabo la producción de etanol ante cambios de pH externos.
- Determinar y cuantificar los cambios en la producción de algunos metabolitos glucolíticos clave de la levadura al exponerla a cambios de pH del medio.
- Proponer una posible solución a los problemas en las fermentaciones de la industria vitivinícola.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. CONDICIONES Y CULTIVO DE LA LEVADURA

La cepa de *S. cerevisiae* utilizada para este trabajo se obtuvo de una colonia aislada de la levadura comercial (La Azteca S.A.), y se cultivó en un medio rico, como el YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2% y Glucosa 2%). Para su conservación, se utilizó medio sólido al cual se le adicionó agar al 2%. Se cultivó tomando una asada de levadura crecida en el medio sólido e inoculándola a 500 mL de medio líquido durante 24 h, a 30 °C y en agitación constante a 250 rpm (New Brunswick) y finalmente cosechadas para los experimentos a realizarse.

Las células se colectaron por centrifugación a 1020 g en tubos de centrifuga de 250 mL, se lavaron dos veces con agua destilada centrifugando finalmente a 1625 g (centrifuga clínica), en un tubo de 15 mL previamente pesado.

El paquete celular se resuspendió en agua desionizada a una relación del 50% (peso húmedo/volumen) y se mantuvo en hielo.

Para ayunar las células, después del segundo lavado se resuspendió el paquete celular en 250 mL de agua destilada y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 1 L.

La suspensión se incubó durante 24 h, a 30 °C y en agitación constante a 250 rpm.

### II. ACIDIFICACIÓN DEL MEDIO

Para medir la acidificación del medio por las levaduras, en la cámara de incubación del equipo pHstat (TIM86, Radiometer analytical); se adicionó medio YPD nuevo y estéril, amortiguador (Homopipes-TEA pH 4, MES-TEA pH 6 ó Bicina-TEA pH 8 ó 9) 10 mM, 500 µL de la suspensión celular al 50% (250 mg); finalmente se le agregaron 3g de glucosa a las incubaciones de células a pH 6 (esta adición fue de gramo en gramo, una vez que se acababan la glucosa contenida en el medio). Para los pH altos (8 y 9) se agregaron 100 mg de ampicilina para evitar posibles contaminaciones bacterianas, en un volumen final de 20 mL. La acidificación se siguió durante 6 h, a 30 °C, en agitación constante. Se determinó la  $DO_{600nm}$  al principio y al final de la incubación.

Al final de la incubación las levaduras se centrifugaron en tubos previamente pesados.

Se lavaron las células con agua destilada y se centrifugaron a 1625 g aproximadamente durante 5 min y se determinó el peso del paquete celular, Se resuspendió el paquete celular al 50% peso húmedo/volumen en agua desionizada y se procedió a realizar las determinaciones de transporte de  $K^+$ , bombeo de  $H^+$  y respiración (ver más adelante).

Para mantener el pH en la cámara del pHstat se adicionaba NaOH ó KOH ~ 0.5 M titulados previamente.

Los datos se calcularon como mEq tomando en cuenta los volúmenes de NaOH ó KOH gastados para mantener el pH. También se reportan la  $DO_{600nm}$  y la cantidad de biomasa.

Los resultados con KOH no se muestran, ya que no existió ninguna diferencia significativa entre los datos obtenidos con NaOH.

Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado a cada uno de los pHs a los que se realizaron las determinaciones y se presentan los trazos más representativos.

### **III. TRANSPORTE DE $K^+$ , BOMBEO DE $H^+$ Y RESPIRACIÓN.**

El transporte de  $K^+$  y bombeo de  $H^+$  se determinó en la misma cámara de incubación con electrodos selectivos correspondientes a cada catión, conectados a un sistema computarizado. En la cámara se adicionó cada uno de los amortiguadores ya mencionados anteriormente, dependiendo del pH (pH 4, 6, 8 ó 9) a una concentración final de 2 mM, glucosa 20 mM, KCl 10  $\mu$ M y 200  $\mu$ L (100 mg) de la suspensión de levaduras a un volumen final de 10 mL, a 30 °C y en agitación constante.

La respiración se midió mediante el consumo de oxígeno en otra cámara de incubación cerrada con un electrodo de Clark conectado a un sistema computarizado, que determina el grado de saturación de oxígeno contenido en el medio (400 natg de oxígeno por mL a la altitud de la ciudad de México). En la cámara se agregó el amortiguador correspondiente, como ya se mencionó, dependiendo del pH (pH 4, 6, 8 ó 9) a una concentración final de 10 mM, glucosa 20 mM y 100  $\mu$ L (50

mg) de la suspensión de levaduras a un volumen final de 5 mL, a 30 °C y en agitación constante.

Estas fueron las condiciones para las levaduras crecidas durante 24 h y sin ningún otro tratamiento posterior, es decir, inmediatamente después de cosechadas por centrifugación, para obtener los datos correspondientes a los controles.

En otra serie de experimentos, se utilizaron levaduras que fueron ayunadas durante 24 horas. Se incubaron a los diferentes pHs, y luego se determinó el transporte de  $K^+$ , bombeo de  $H^+$  y respiración a pH 6 (antes y después de la incubación). En la respiración el volumen de la suspensión celular utilizado fue de 50  $\mu$ L (25 mg).

#### **IV. FERMENTACIÓN**

La fermentación se realizó tanto en condiciones “semianaeróbicas” como aeróbicas. En la condición semianaeróbica se incubaron las levaduras en una cámara que contenía el amortiguador correspondiente (pH 4, 6, 8 ó 9) 10 mM, glucosa 20 mM, 1 mL de suspensión celular al 50 % (500 mg); con y sin KCl 10 mM, en un volumen final de 10 mL; durante 12 minutos, a 30 °C y en agitación constante. En aerobiosis, se añadía constantemente  $H_2O_2$  al 3% para mantener la saturación de oxígeno en la cámara entre 75-80% durante todo el tiempo de incubación. Al final de las respectivas incubaciones se tomó una alícuota de 5 mL y se centrifugó a 1625 *g* durante 5 minutos, se descartó el paquete celular y se mantuvo el sobrenadante en hielo para determinar el etanol.

Para la medición de etanol (EtOH), se procedió de la siguiente forma: en un tubo de ensayo de 13 x 60 mm, se añadió amortiguador de pirofosfato de potasio ( $P_2O_7K_4$ ) 10 mM pH 9,  $NAD^+$  1 mg/mL. Se agregaron alícuotas de las muestras y del estándar (20 mM de EtOH), AIDH (Sigma Aldrich, Co., Número de catálogo A9770; 1.9 U/mg sólido; a una concentración final de 19 U/mL), se dejaron incubar durante 30 min y se determinó la absorbencia a 340 nm; posteriormente se agregó ADH (Sigma Aldrich, Co., Número de catálogo A-7011; 314 U/mg sólido, a una concentración final de 9420 U/mL), se dejó incubando la reacción durante 1 h y finalmente se determinó la absorbencia a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

## **V. CONSUMO DE GLUCOSA**

En el mismo sobrenadante obtenido de la fermentación se determinó el consumo de glucosa, en alícuotas de las muestras y de un estándar (20 mM de Glucosa), a una temperatura de 37 °C en baño maría. Una vez equilibrada la temperatura se le adicionó el reactivo para la determinación de glucosa (glucosa oxidasa, peroxidasa y o-dianisidina, Kit de Sigma Aldrich, Co., Número de catálogo GAGO-20); se incubó durante 30 min y finalmente se agregó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 N y se determinó la absorbencia a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

## **VI. DETERMINACIÓN DE G6P Y ATP**

Para las incubaciones se colocó en la cámara de incubación a 30 °C, amortiguador 10 mM (pH 4, 6, 8 ó 9), glucosa 20 mM, y células (2 g) en un volumen final de 20 mL. Se tomaron alícuotas de 2 mL a los 0, 2, 4, 5, 6 y 8 min; los tiempos 0, 2 y 4 min corresponden a controles sin glucosa. Después al min 4, se agregó glucosa (20 mM) y se tomaron muestras a los 5, 6 y 8 minutos totales.

Se realizó una extracción ácida para lo cual se vertieron las alícuotas de 2 mL tomadas de la incubación celular en tubos de ensaye con 1 mL de ácido perclórico al 70% (HClO<sub>4</sub>), enfriado previamente en hielo, dejando las muestras por 20 min en hielo, agitando cada 5 min los tubos.

Se centrifugaron las muestras por 5 min a 1625 g, se decantó el sobrenadante y se virtió en tubos de ensayo de 13 x 60 mm, seguido de la adición de 20 µL de indicador de pH (azul de metileno 0.05% - rojo neutro 0.05% en etanol al 96%) agitando para homogeneizar las muestras.

Se neutralizó el ácido perclórico con KOH 10 M, manteniendo los tubos en hielo todo el tiempo, ya que la reacción es exotérmica, lo que podría causar la hidrólisis del ATP.

Finalmente se dejaron enfriar las muestras durante 5 minutos más y se centrifugan a 1625 g por 5 minutos, para determinar el ATP presente en los extractos celulares en un espectrofotómetro de doble rayo, mediante una reacción acoplada a enzimas.



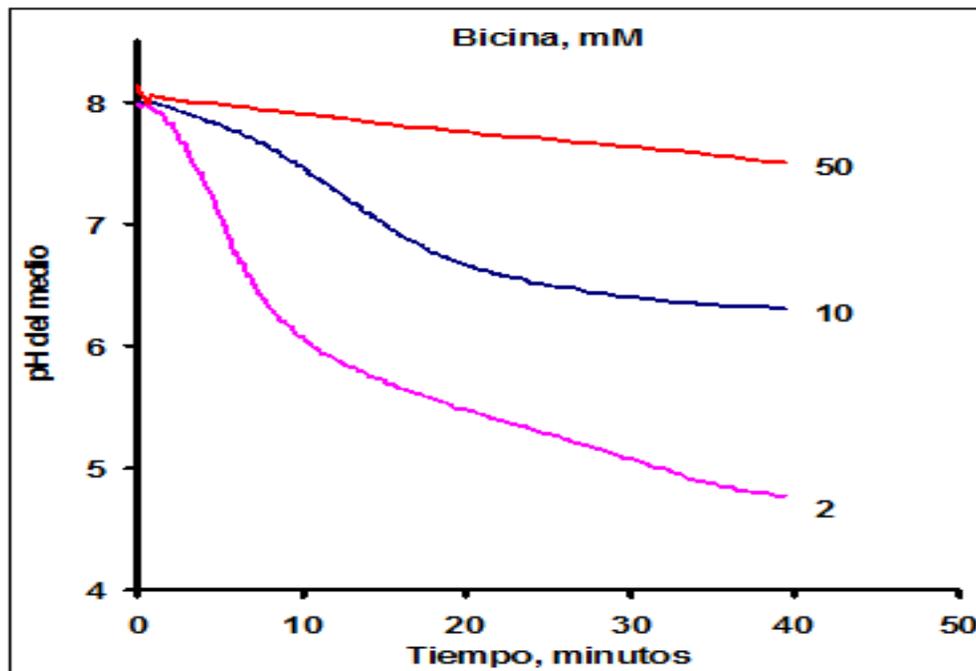
Aprovechando la fluorescencia intrínseca del NADH, se realizó esta determinación en un fluorómetro SLM-AMINCO excitando a 340 nm y recibiendo la emisión a 460 nm en una celda con agitación y temperatura constantes a 30 °C.

En algunos experimentos se hicieron adiciones de 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% y NaCN 0.3 mM.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### CRECIMIENTO Y ACIDIFICACIÓN DEL MEDIO

En experimentos preliminares se vio la dificultad para mantener el pH del medio sólo con la utilización de amortiguadores, en especial a valores elevados. Por ejemplo, para mantener el pH a 8.0, se requiere utilizar concentraciones mayores de 50 mM de Bicina-TEA, y aún así, en incubaciones largas, se observa una disminución del pH (Fig. 5).



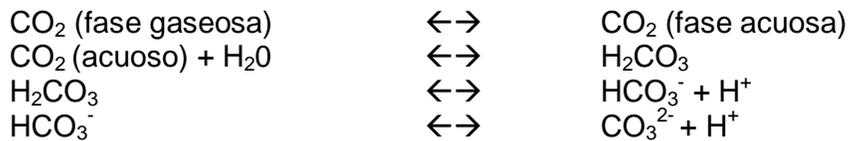
**Fig. 5.** Cambios de pH observados al incubar la levadura en diferentes concentraciones del amortiguador Bicina-TEA.

Fue así que con el fin de mantener constante el valor deseado el pH del medio, decidimos utilizar el equipo pHstat, el cual adiciona constantemente volúmenes conocidos de una solución titulada de NaOH (también se utilizó KOH con resultados semejantes) y con ello, mantiene el valor deseado de pH en el tiempo.

Dada la duración de los experimentos, a todos los pHs evaluados fue necesario agregar glucosa adicional, ya que las levaduras agotan la glucosa presente en el medio de incubación; en particular a pH 6 fue necesario agregar 3 gramos, debido a que en estas condiciones las levaduras consumían mucho más glucosa. No se

añadieron los 3 g de glucosa de una vez, para no aumentar la osmolaridad del medio y evitar a las levaduras un estrés que pudiera alterar los resultados. En estos experimentos se midió: a) la cantidad de NaOH utilizada, que nos proporciona el valor de la acidificación; b) el crecimiento de las células, tanto como peso húmedo, como en unidades de densidad óptica (DO), y c) una vez incubadas las células durante períodos largos (6 horas) se les utilizó también para verificar sus propiedades de acidificación y de transporte de  $K^+$ , como índices de su capacidad para generar su energía y para realizar el transporte.

El volumen de base gastado para neutralizar el ácido producido por la levadura fue diferente para cada pH, y aquí debemos señalar que a pH 6.0 y mayores, la acidificación del medio no se debe sólo a la actividad de la  $H^+$ -ATPasa, sino también a que durante el metabolismo la levadura produce  $CO_2$ , que se hidrata a ácido carbónico y finalmente se ioniza a bicarbonato (como se muestra abajo); siendo *S. cerevisiae* principalmente fermentativa, la producción de  $CO_2$  es grande.



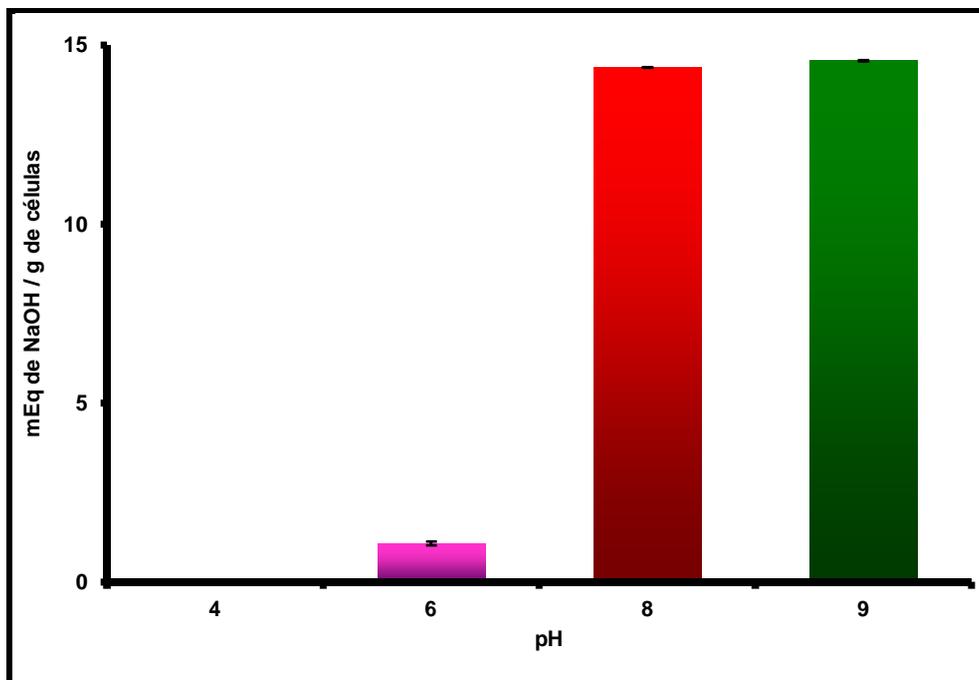
La concentración de ácido carbónico, por otra parte, depende también del pH; aunque la reacción de hidratación del  $CO_2$  es la misma a cualquier pH, a partir de 6.0, cercano al valor del pKa del ácido carbónico (6.1), su disociación aumenta, de manera que si a 6.0 la concentración del ácido y de bicarbonato son prácticamente iguales, por encima de este valor (pH 8 ó 9), prácticamente todo el  $CO_2$  pasa a bicarbonato. Por otra parte, el ácido carbónico como tal puede entrar libremente a las células, y por el valor del pH dentro de ellas (alrededor de 6.7), se disocia, liberando protones y acidificando el citoplasma. A los valores elevados del pH, dado que la forma predominante es el bicarbonato, que no puede entrar a las células, prácticamente todo se encuentra en el exterior.

Aunque no se midió expresamente a pH 4, la necesidad de agregar glucosa adicional fue menor que a pH 6, debido a que la  $H^+$ -ATPasa no baja el pH del medio por debajo de 4; más aún, sólo se mantiene a pH 4.5.

En la Fig. 6 se muestra la cantidad de NaOH utilizada para mantener el pH deseado, expresada en mEq totales gastados para neutralizar el ácido presente el medio para mantener el valor del pH deseado durante 6 horas. La estequiometría de la reacción es de 1:1, por cada protón liberado al medio se utiliza un mEq de NaOH

para neutralizarlo. A pH 4, el volumen de NaOH es nulo, ya que como se mencionó, las levaduras no alcanzan a acidificar tanto el medio, sino que sólo alcanzaron a mantenerlo a un valor de pH de 4.5.

A pH 6 se necesita una cantidad mayor de NaOH; este pH se utiliza con gran frecuencia para estudiar diversos parámetros en la levadura, y consume una gran cantidad de glucosa, necesaria para realizar sus funciones celulares, pero también para su crecimiento. No obstante, es necesario señalar que el crecimiento es semejante también a pH 4.0.



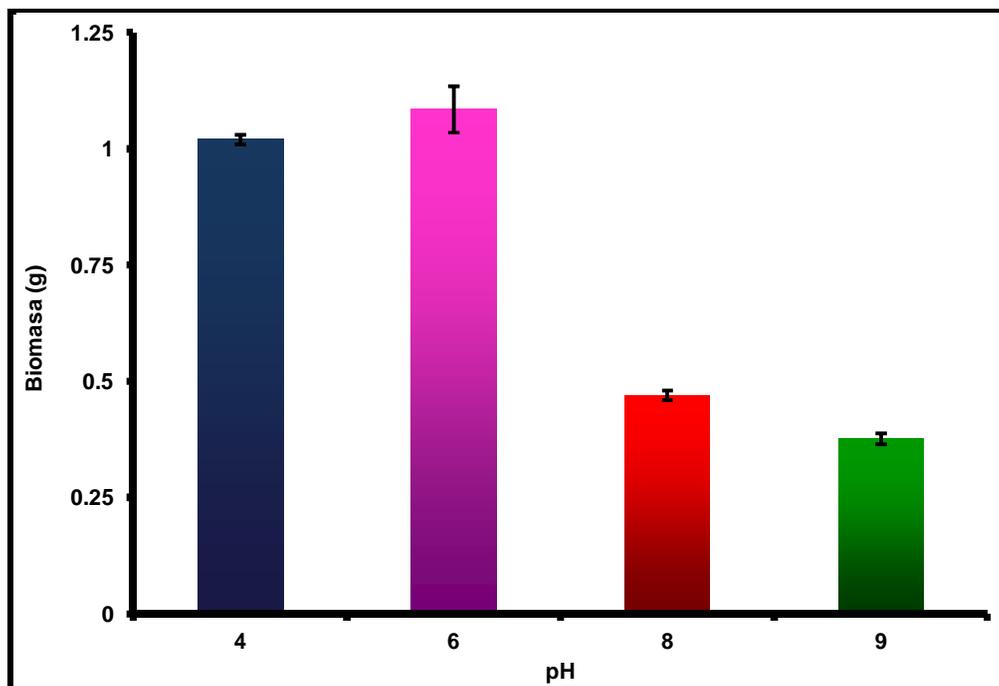
**Fig. 6.** Acidificación del medio por *S. cerevisiae* expresado en mEq de NaOH/g de levadura. Las incubaciones se realizaron en YPD, amortiguador 10 mM (Homopipes-TEA pH 4, MES-TEA pH 6, Bicina-TEA pH 8 ó 9), 1 g de glucosa (excepto para pH 6, donde se agregaron después 2 g más de glucosa); a 30 °C, durante 6 h y en agitación constante. A los pHs 8 y 9 se les adicionaron 100 mg de ampicilina. Los datos presentados son el promedio de tres repeticiones  $\pm$ SD.

Tanto a pH 8 como a pH 9 la cantidad de NaOH fue mayor, debido en primer lugar a que la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa aumenta a valores elevados del pH, y por lo tanto se acelera la fermentación y por ende la producción de CO<sub>2</sub>, que se hidrata a ácido carbónico; éste posteriormente se ioniza a bicarbonato y un protón, como la causa que lleva a la mayor acidificación del medio a los valores más altos del pH.

Durante el tiempo de incubación a los pHs altos, donde la cantidad necesaria de NaOH fue mayor, las levaduras estuvieron expuestas a una concentración final de

0.14 M de NaOH, pero esta concentración no les provoca un estrés salino, de acuerdo a lo reportado por Yale y Bohnert en el 2001, quienes encontraron que *Saccharomyces cerevisiae* no se encuentra en estrés salino sino hasta una concentración superior a 1 M de NaCl.

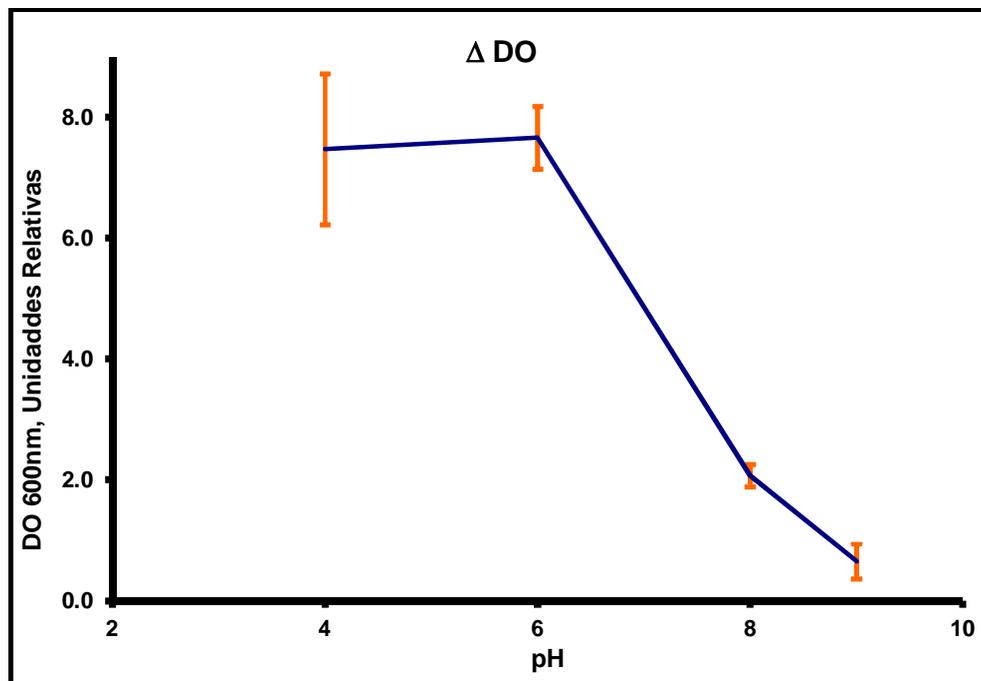
Respecto al crecimiento, expresado en términos de biomasa; es decir, los gramos totales al final de la incubación a cada pH evaluado, fue semejante a pH 4 y 6, como se puede apreciar en la Fig. 7. Es necesario señalar que la levadura en la cámara del pHstat no fue capaz de bajar el pH del medio hasta 4, sino que lo mantuvo entre 4.5-5.0, lo que nos sugiere que la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa es mínima a estos valores de pH. Por otra parte y como se mencionó anteriormente, se esperaría que el crecimiento a pH 9 fuera casi nulo, pero no sucede esto, como se puede apreciar en la Fig. 7, el crecimiento es muy parecido al de pH 8, lo que nos permite concluir que el pH del medio no inhibe totalmente el crecimiento celular.



**Fig. 7.** Crecimiento de *S. cerevisiae* ayunada 24 hr a los diferentes pHs, expresado en biomasa total al final de las incubaciones correspondientes. Incubaciones en medio YPD, amortiguador 10 mM (Homopipes-TEA pH 4, MES-TEA pH 6, Bicina-TEA pH 8 ó 9), 1 g de glucosa (excepto para pH 6, donde se utilizaron 3 g de glucosa); a 30 °C, durante 6 h y en agitación constante. A los pHs pH 8 y 9 se les adicionaron 100 mg de ampicilina. Los datos presentados son el promedio de tres repeticiones con sus respectivas SD.

Otra manera de expresar el crecimiento de la levadura fue a través de la D.O. determinada a 600 nm. Se midió ésta DO antes de la incubación y al final de ella. En

la Fig. 8, podemos observar el crecimiento de *S. cerevisiae* a los distintos pHs. La pequeña diferencia observada entre pH 4 y 6 se debe a que, aunque a pH 4 crecen, no se necesitó añadir NaOH para mantener el medio en un pH estable, como se muestra en la Fig. 6. Además, de acuerdo a lo mencionado anteriormente, *S. cerevisiae* no fue capaz de bajar el pH hasta 4, sino que lo mantuvo en 4.5-5.0, y es por ello que al momento de determinar la DO nos arroja una pequeña diferencia con la DO a pH 6, en el cual sí se necesitó añadir NaOH para poder mantener el medio a este valor de pH, es decir que la diferencia entre las DO, se debe precisamente al volumen de NaOH añadido al medio en estos valores de pH.



**Fig. 8.** Crecimiento de *S. cerevisiae* ayunada 24 h, expresada como la diferencia de DO a 600 nm. Incubaciones en medio YPD, amortiguador 10 mM (pH 4, 6, 8 ó 9), 1 g de glucosa (excepto para pH 6, donde se utilizaron 3 g de glucosa); a 30 °C, durante 6 h y en agitación constante. A los pHs 8 y 9 se les adicionaron 100 mg de ampicilina. Los datos presentados son el promedio de tres repeticiones con sus respectivas SD.

Por otro lado a pH 8 y 9, el incremento en densidades ópticas fue mucho menor, al obtenido para los pHs bajos, la explicación a este caso es que aunque la levadura logra crecer, pero muy poco, fue necesario añadir un volumen mayor de NaOH (aproximadamente 8 mL) para poder contrarrestar la acidificación por parte de la levadura, y este volumen fue lo que provocó que la DO nos arrojara un valor pequeño aunque ya fue corregido por la dilución comprobándose por la biomasa, que el crecimiento de la levadura a pH alto no se detiene completamente.

## FERMENTACIÓN

Al igual que muchas otras levaduras, *S. cerevisiae* fermenta la glucosa para producir etanol y CO<sub>2</sub> a través de la glucólisis. Sin embargo, el piruvato generado es convertido a etanol a través de dos enzimas: la piruvato descarboxilasa, que mediante una descarboxilación, convierte al piruvato a acetaldehído, y éste a su vez es reducido a etanol por la alcohol deshidrogenasa, utilizando NADH como cofactor (Nelson D. L. y Cox, M., 2000).

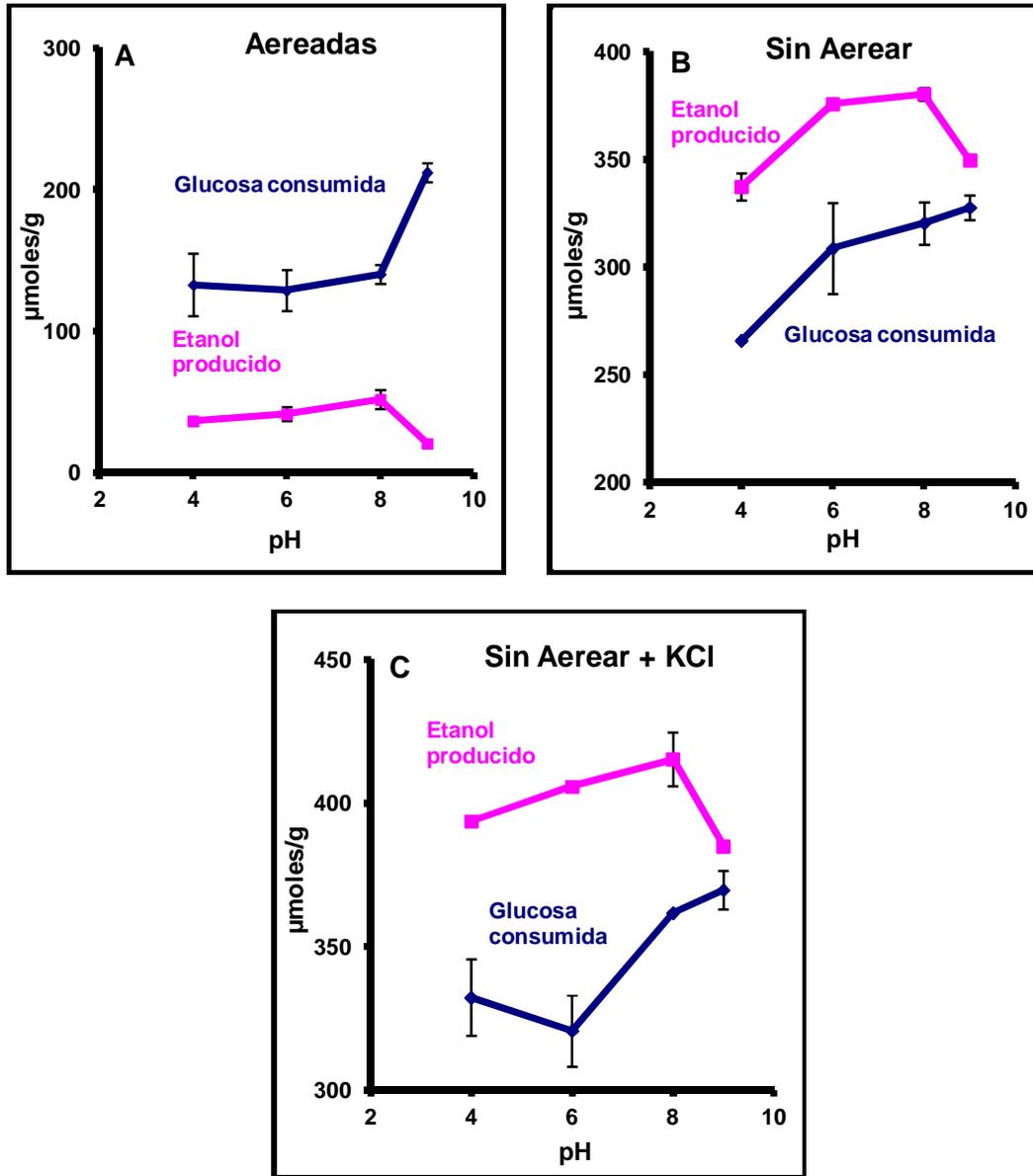
La estequiometría final de este proceso está dada por la siguiente reacción:



En anaerobiosis, esta vía es la principal fuente de ATP de *S. cerevisiae* para la realización de todas sus funciones. La primera posibilidad que se exploró fue analizar si la razón para la inhibición del crecimiento era por la inhibición de esta vía al aumentar el pH a valores extremos (8 ó 9).

La fermentación se realizó en células ayunadas y sin ayunar, incubando en ausencia de oxígeno (anaerobiosis) y mediante la adición de cantidades controladas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (aerobiosis). En las levaduras sin ayunar (Fig. 9), el consumo de glucosa en condiciones aeróbicas (adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se mantiene constante con el pH, exceptuando pH 9, donde el consumo de glucosa aumenta. La producción de etanol aumenta ligeramente de pH 4 a 6 y 8, exceptuando a pH 9, donde disminuye (Fig. 9A). En ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (anaerobiosis, Fig. 9B) aumenta el consumo de glucosa y la producción de etanol (efecto Pasteur) (ver escala). A pH 9 existe un consumo mayor de glucosa, pero una menor producción de etanol. La explicación posible sería que a pH 9, el etanol producido puede estar siendo utilizado inmediatamente como sustrato respiratorio ó por otra parte que el metabolismo de la glucosa, mediante las diferentes vías que existen para su consumo, nos estaría llevando hacia la producción de glucógeno o trehalosa. En ausencia de oxígeno y presencia de KCl 10 mM en el medio se observa un ligero aumento en el consumo de glucosa y producción de etanol bajo estas condiciones (Fig. 9C), que coincide con lo reportado por Conway en 1950 y Peña y colaboradores en 1969. Las distintas respuestas, al aumento del pH, a la presencia de oxígeno y a la adición de K<sup>+</sup> indican que a los

valores altos del pH no afectan la fermentación, lo cual nos permite eliminar este factor como causa de la disminución del crecimiento.



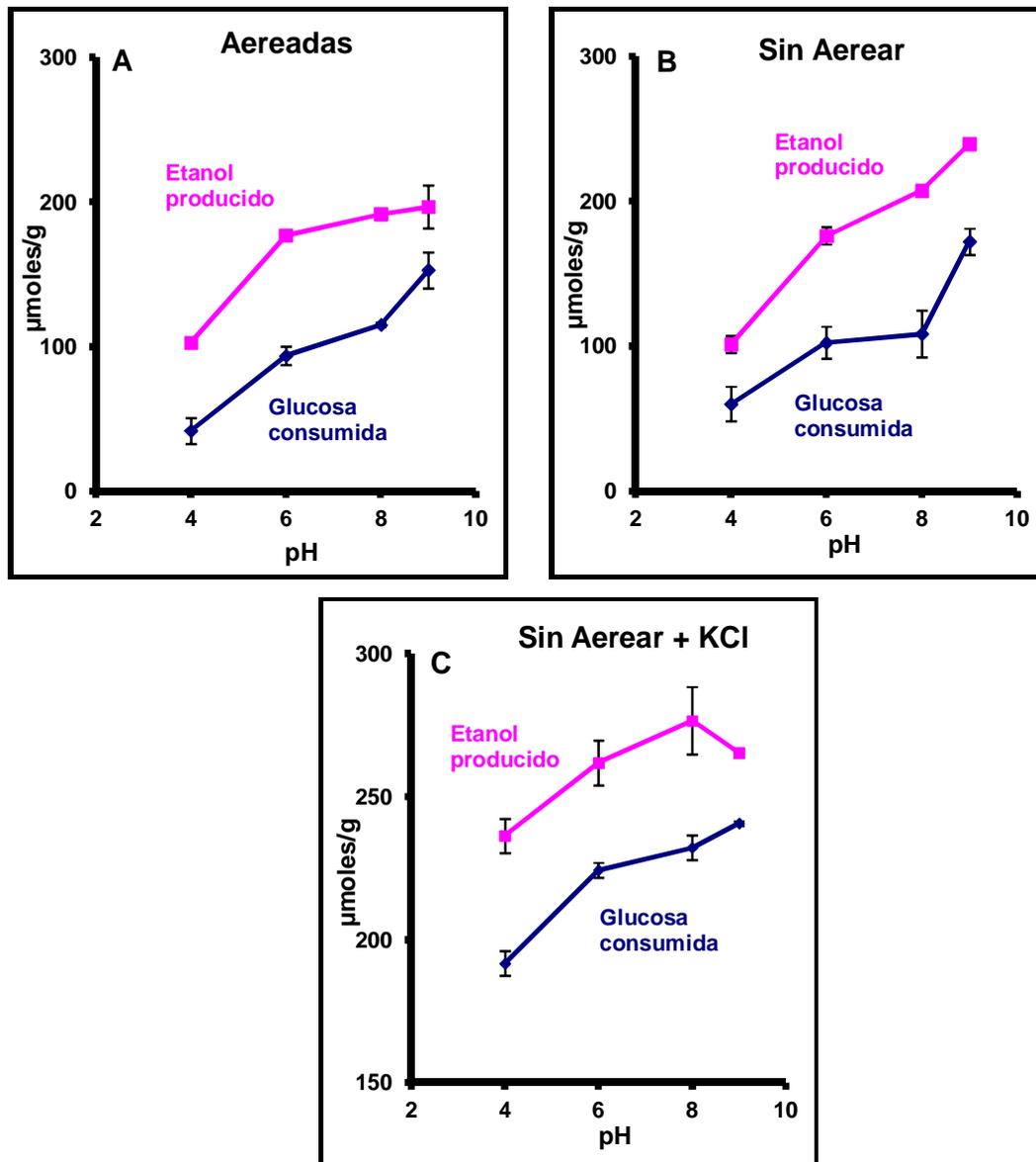
**Fig. 9.** Consumo de glucosa y producción de etanol en levaduras sin ayunar. A) levaduras “aereadas” a las que se fueron agregando cantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% a la cámara para mantener la saturación de oxígeno entre 75 y 80%; B) levaduras sin aerear, sólo incubadas a 30 °C en tubos de ensayo de 13 x 60 mm y C) mismas condiciones que B, pero con 10 mM de KCl. Se presenta el promedio de 3 repeticiones para cada condición de pH evaluado, con sus SD.

En la Fig. 10 se muestran los resultados con células ayunadas. Los experimentos se realizaron para definir la respuesta de las células en las que se han agotado, al menos en gran parte, sus reservas durante el ayuno. En la Fig. 10A (aerobiosis) se observa que en la levadura ayunada, el consumo de glucosa aumenta conforme

aumenta el pH del medio, pero este consumo es menor que en levaduras sin ayunar.

La producción de etanol aumenta al incubar las levaduras a valores altos de pH y se observa un incremento en la producción de etanol en comparación con las levaduras sin ayunar. Éste incremento en la producción de etanol de las levaduras sin ayunar puede ser resultado de que, en esta condición la levadura tiene sustratos endógenos que hacen que su metabolismo siempre esté activo; en tanto que las levaduras ayunadas no tienen sustratos endógenos y por ende la producción de etanol es menor. En condiciones anaeróbicas (Fig. 10B), tanto el consumo de glucosa como la producción de etanol son similares a la condición de aerobiosis, lo que nos dice que la levadura necesita poner en marcha su maquinaria metabólica para satisfacer sus necesidades en ambas condiciones ya que durante el ayuno gastó en gran parte sus sustratos endógenos y cuando se le coloca en un medio con sustratos rápidamente recupera estos sustratos. Al igual que en las levaduras sin ayunar, en las levaduras en ayuno se presenta el efecto del potasio, como podemos ver en la Fig. 10C, el potasio tiene un efecto aun más notorio, ya que tanto el aumento en el consumo de glucosa como en la producción de etanol aumentan, sobre todo a los valores de pH bajo (pH 4 y 6). Esto puede deberse a que en las células ayunadas la capacidad respiratoria es menor, y por esa razón la adición del oxígeno tiene menos efecto para favorecer a la fosforilación oxidativa frente a la fermentación, de modo que el efecto Pasteur es menor. Por otra parte, también en estas levaduras ayunadas, el aumento del pH del medio produjo un ligero aumento de la fermentación.

En concordancia con lo descrito por Rothstein y Demis (1953), la adición de  $K^+$  al medio de incubación produjo un aumento en la fermentación. Esto ocurre en virtud del mecanismo propuesto en la figura 4 (Peña *et al.*, 1972); es decir la actividad de la ATPasa aumenta con el  $K^+$  y el pH, lo que implica la degradación de ATP y el incremento de los niveles de ADP y  $P_i$  que son sustratos cruciales para el metabolismo, la fermentación y la respiración de la levadura.



**Fig. 10.** Consumo de glucosa y producción de etanol en **levaduras ayunadas 24 h**. A) Levaduras “aereadas”, se añadió  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% a la cámara para mantener la saturación de oxígeno entre 75-80%; B) levaduras sin aerear, sólo incubadas a 30 °C en tubos de ensayo de 13 x 60 mm y C) mismas condiciones que B, pero con 10 mM de KCl. Se presenta el promedio de 3 repeticiones para cada caso con sus SD.

La producción de  $\text{CO}_2$  y su transformación en ácido carbónico durante la fermentación contribuye a acidificar el medio, y como consecuencia a disminuir la producción de etanol. Este es un problema de las fermentaciones industriales, y como resultado de este trabajo proponemos aumentar el pH del medio o simplemente añadir una pequeña cantidad de  $\text{K}^+$  al medio en el que se encuentre la levadura. Esto puede ser de importancia en las fermentaciones de hidrolizados de

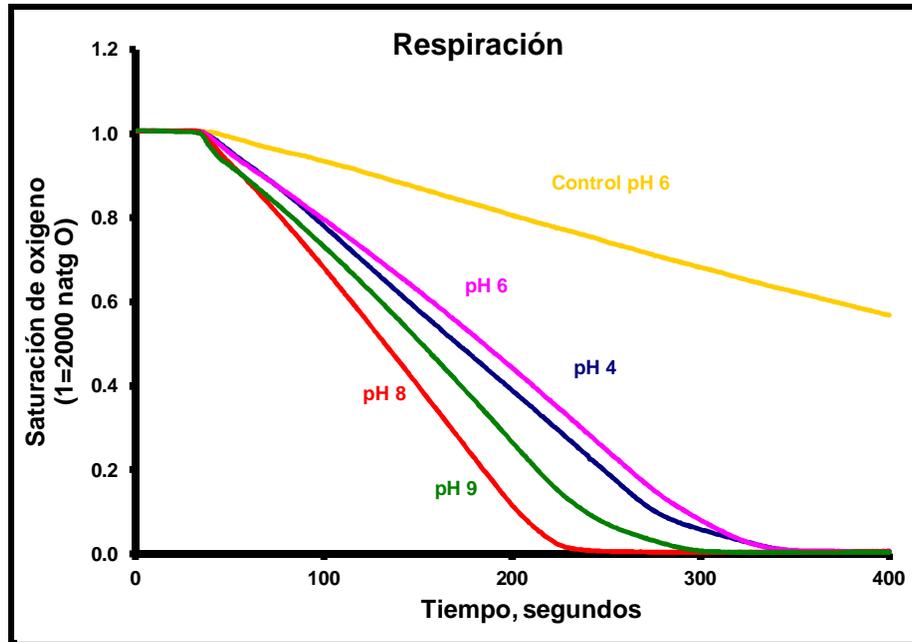
almidón, mas no en las de otros productos vegetales, como los jugos de caña o frutas, que sí contienen una cantidad importante de  $K^+$ .

### **EFFECTOS SOBRE LA RESPIRACIÓN**

Otra de las funciones que podría estar alterada por los valores extremos del pH (pH 8 y 9) es la respiración, ya que en estudios anteriores (Peña, *et al.*, 1972) se demostró que con el aumento del pH aumenta la respiración en la levadura, debido a un aumento del ADP y Pi a pH alto. Sin embargo, estos estudios se realizaron después de incubar las células durante 6 horas, llegando a valores extremos (8 y 9) del pH, tomando como control las células antes de la incubación.

Sánchez y colaboradores (2006) demostraron que en levaduras ayunadas el consumo de oxígeno es menor comparada con las no ayunadas en presencia de etanol y glucosa como sustratos. Nosotros decidimos realizar las determinaciones utilizando como sustrato la glucosa y corroborar el efecto del pH sobre la respiración estudiados por Peña, *et al*, en 1972.

La Fig. 11 muestra que, en comparación con las células no incubadas (Control pH 6), se produjo un aumento en la respiración después de incubarlas a distintos valores del pH. La velocidad respiratoria después de incubar las células a los valores más altos del pH (8 y 9) fue mayor que a los valores más bajos (4 y 6). Aunque la respiración después de incubar a pH 9 fue ligeramente menor que la observada después de incubar a pH 8, la pequeña diferencia indica que este factor tampoco puede considerarse como el responsable del menor crecimiento de las células a los valores elevados del pH.

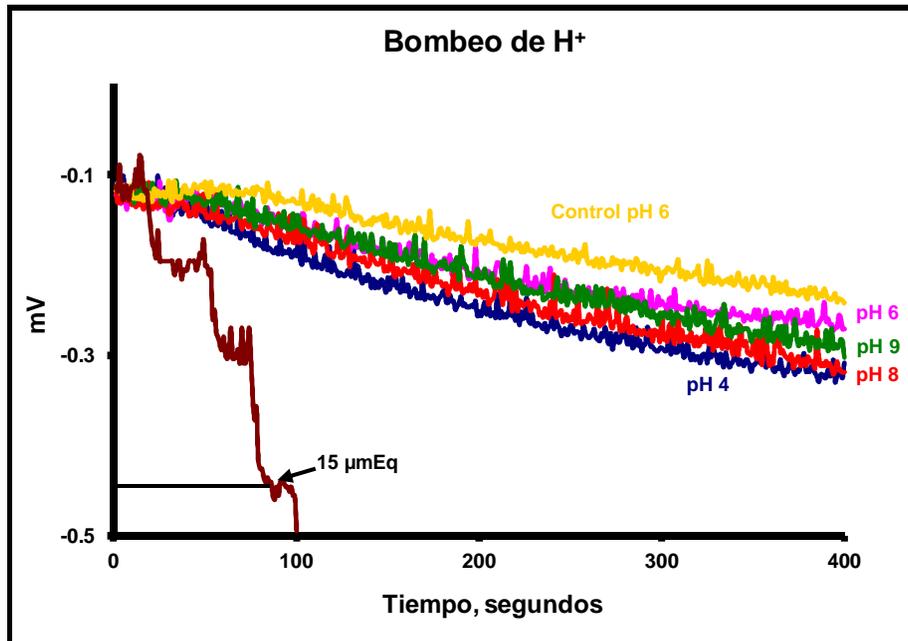


**Fig. 11.** Respiración de *S. cerevisiae* ayunada antes y después de la incubación a cada pH evaluado. Incubaciones en amortiguador MES-TEA 10 mM pH 6, glucosa 20 mM, 50  $\mu$ L (25 mg) de la suspensión celular al 50%, a 30 °C y agitación constante. Se presenta el trazo representativo de tres repeticiones.

### TRANSPORTE DE $K^+$ Y BOMBEO DE $H^+$

El bombeo de protones es el fenómeno primario que, debido a la actividad de la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática, genera un gradiente de pH entre el interior y el exterior de la célula, además de una diferencia del potencial eléctrico a ambos lados de la célula (negativo en el interior) que impulsa el  $K^+$  al interior, entre otros muchos metabolitos. Por tal razón, medimos la capacidad de acidificación del medio luego de incubar las células a los distintos valores de pH durante 6 horas; las medidas se hicieron todas a pH 6.0 (Fig. 12).

No observamos cambios importantes, comprobando que el bombeo de protones no se ve afectado en gran medida al someter por un tiempo largo a la levadura a diferentes pHs, en particular a los valores más elevados de 8 y 9. Sólo es necesario mencionar que con este experimento se corrobora que la acidificación observada, en especial a pH 6, no provienen toda de la  $H^+$ -ATPasa de membrana plasmática, ya que los trazos son muy parecidos entre las muestras de las diferentes incubaciones; sino de la ionización del  $CO_2$  a bicarbonato resultado de la fermentación, como se ha mencionado repetidamente.



**Fig. 12.** Bombeo de  $H^+$  en *S. cerevisiae* ayunada antes y después de la incubación a cada pH evaluado. Incubaciones en amortiguador MES-TEA 2 mM pH 6, glucosa 20 mM, KCl 10  $\mu$ M, 200  $\mu$ L (100 mg) de la suspensión celular al 50%, a 30 °C y agitación constante. Se presenta el trazo representativo de tres repeticiones. Control pH 6: células sin incubación provenientes del cultivo.

Si, además, el bombeo de protones es también un indicador de la eficiencia de los sistemas de producción de ATP, se consideró conveniente estudiar tanto el bombeo de  $H^+$  al exterior de la célula como la producción de ATP, antes de incubar las células y después de haberlas mantenido a un cierto pH durante 6 horas. Los datos de ATP se reportan en la sección de determinación de G6P y ATP.

Siendo el  $K^+$  el principal catión intracelular implicado en muchas funciones celulares, su transporte es también uno de los principales indicadores tanto del estado energético de las células como de la integridad de sus principales sistemas de transporte, creímos pues necesario saber si después de la incubación a los distintos valores del pH, en especial los más altos, las células mantenían su capacidad de transportar potasio. En la Fig. 13 se presenta un curso temporal en el que se aprecia el transporte de  $K^+$  en células ayunadas. El experimento se realizó tomando como referencia la adición de KCl 10  $\mu$ M y mediante un electrodo selectivo de  $K^+$ .

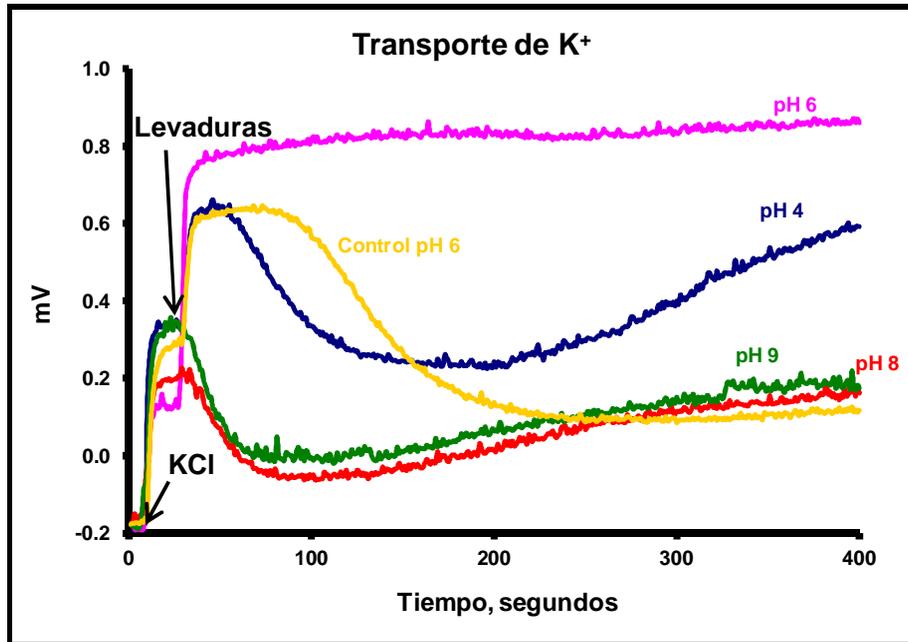
En la Fig. 13 se presentan los trazos del transporte de  $K^+$ . Las determinaciones se hicieron antes y después de las incubaciones (todas a pH 6, para comparar el estado de las células después de la incubación). Obviamente antes de la incubación sí existe un transporte de  $K^+$ , que puede tomarse como referencia para las otras

condiciones. En cada trazo, el primer ascenso del trazo se debe a la adición de KCl (10  $\mu$ M) que se puede tomar como estándar. A continuación se añadió la levadura y se observa un segundo aumento, que resulta de una pequeña salida del  $K^+$  interno. Posteriormente se aprecia una disminución progresiva que nos indica que el  $K^+$  está siendo transportado al interior de la célula, hasta llegar a un valor constante.

Después de incubar a *S. cerevisiae* durante 6 h a los diferentes valores de pH, observamos algunos cambios en el transporte de este catión. Tal vez el más importante es que luego de añadir las células, el transporte (trazo hacia abajo) se inicia con mayor rapidez, lo cual es explicable, pues estas células se colectan de un medio nutritivo (YPD); se observó una salida de  $K^+$ , que probablemente pudieron acumular durante su incubación, pero luego transportan el catión (trazo hacia abajo).

Tal vez el dato más interesante consiste en que, luego de agregar las células que fueron incubadas a pH 6, se produjo una salida del catión, el cual no es transportado después al interior (el trazo no desciende).

Es posible que la levadura saque en gran medida este catión por difusión debido a que la concentración de  $K^+$  en el interior es mucho mayor y necesita equilibrar el potencial de membrana. Por otro lado, la concentración de  $K^+$  en el medio YPD es aproximadamente 15 mM, y parece que el pH de 6 es óptimo para que *S. cerevisiae* acumule el catión.



**Fig. 13.** Transporte de  $K^+$  en *S. cerevisiae* ayunada antes y después de la incubación a cada pH. Incubaciones en amortiguador MES-TEA 2 mM pH 6 (para las células provenientes de las incubaciones a pH 4, 8 y 9, se hizo la determinación del transporte de  $K^+$  posterior a pH 6), glucosa 20 mM, KCl 10  $\mu$ M, 200  $\mu$ L (100 mg) de la suspensión celular al 50%, a 30°C y agitación constante. Se presenta el trazo representativo de tres repeticiones. Control pH 6: células sin incubación provenientes del cultivo.

De cualquier forma, a los valores altos del pH (8 y 9), el transporte es rápido y eficiente; no obstante haber sometido a la levadura a condiciones que podrían considerarse adversas.

### G6P, ATP Y NADH

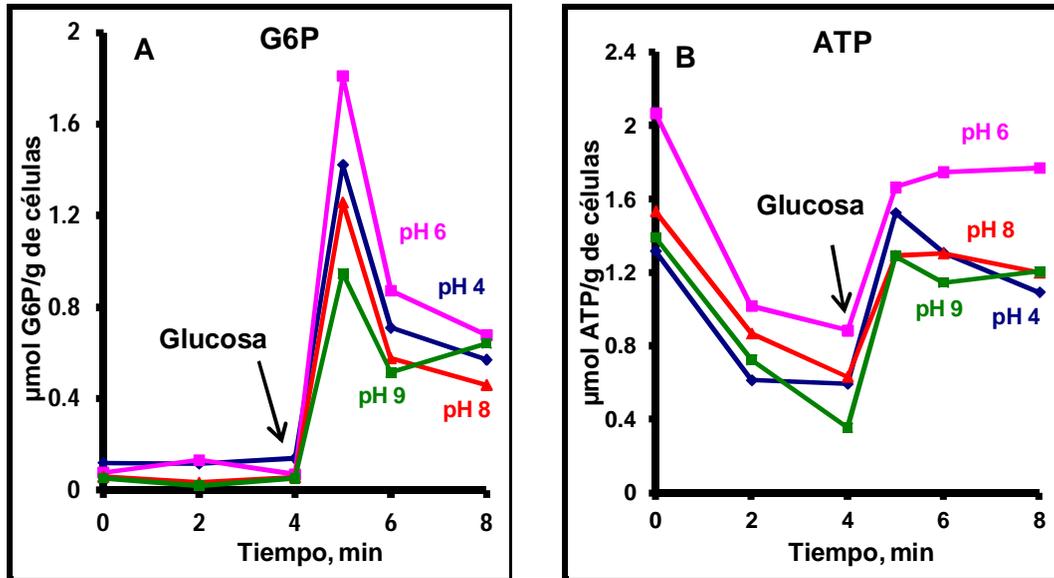
Para que la célula realice todas sus funciones, así como durante situaciones adversas como pueden ser un estrés salino, térmico, oxidativo, etc., y para contender con las distintas condiciones que puede enfrentar, requiere un gasto energético para poner en acción muy diversos mecanismos. Esta energía necesaria es provista por la síntesis de ATP, comúnmente conocido como “la moneda energética de la célula”.

En aerobiosis, la síntesis de ATP se lleva a cabo principalmente en la mitocondria, pero en anaerobiosis, la vía principal que genera ATP es por las fosforilaciones a nivel de sustrato. Aunque todos los datos mostrados hasta ahora indican que al incubar a *S. cerevisiae* a valores del pH en los que su crecimiento se ve fuertemente inhibido no hay una alteración importante en su metabolismo

energético, decidimos determinar los cambios de los niveles de ATP en *S. cerevisiae* al incubarla en diferentes pHs externos. Ya se sabe que al aumentar el pH del medio hay una disminución en los niveles de ATP y un aumento de ADP (Peña, *et al.*, 1972), debido a que se acelera la actividad de la ATPasa, proporcionando mayor cantidad de ADP para la glucólisis.

En la Fig. 14A podemos observar los niveles de glucosa-6-fosfato (G6P) y ATP (Fig. 14B) a cada pH evaluado, en células sin ayunar, a las que se incubó durante 4 minutos y en este minuto se les agregó glucosa. Se siguieron entonces los niveles de ambos metabolitos. Podemos apreciar que, los niveles de G6P, partiendo desde prácticamente cero, aumentan rápidamente al agregar la glucosa hasta alcanzar un máximo y luego disminuir hasta un nivel menor. Pareciera existir una tendencia a que los niveles máximos sean menores en las células incubadas a los valores más elevados del pH. Esto es congruente con lo encontrado, en el sentido de que la fermentación se acelera a los pHs más altos, trayendo consigo una utilización más rápida de este metabolito.

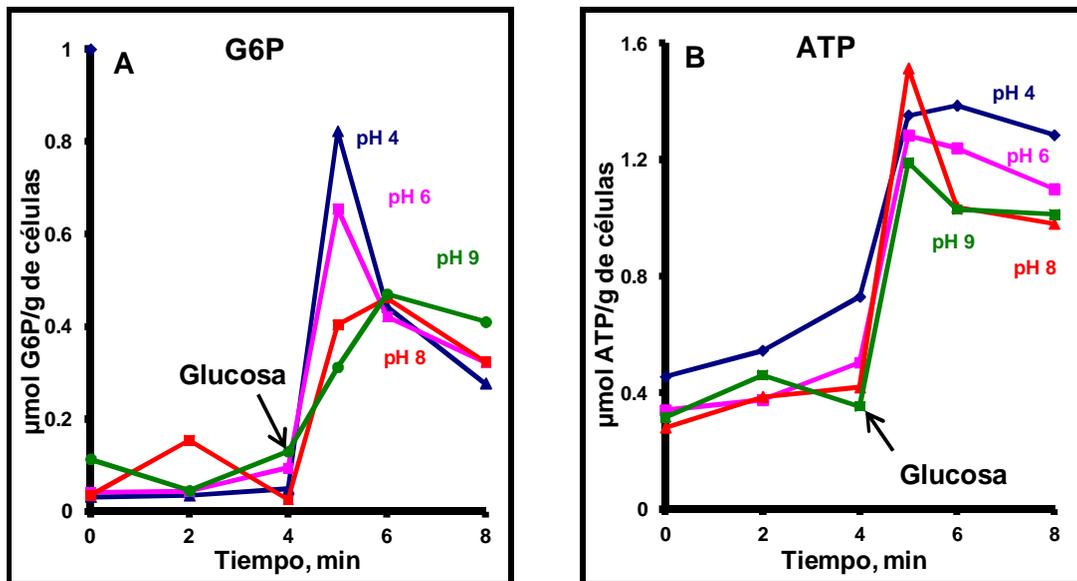
Se observa, por otra parte, que en particular si comparamos los niveles de ATP a pH 6 con los de los pHs más altos, los niveles alcanzados, más o menos estables, son menores a pH 8 y 9. También estos datos son congruentes con el hecho de que a estos valores del pH el gasto de ATP es mayor, en el intento de la levadura de acidificar el medio.



**Fig. 14.** Determinación de G6P (A) y ATP (B) en extractos de **células sin ayunar**, y el efecto de los distintos pHs evaluados. Para la determinación se utilizó amortiguador MES-TEA-KOH 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, glucosa 10 mM, NADP<sup>+</sup> 100 µg/mL, extracto celular, G6PDH 16.7 U/mL y Hexocinasa 13.2 U/mL. Se presenta el promedio de 3 repeticiones de cada pH evaluado.

Al utilizar levaduras ayunadas, los resultados son más claros; la Fig. 15A muestra que los niveles máximos de G6P alcanzados luego de la adición de la glucosa son menores a medida que el pH de incubación es más alto, también en congruencia con la mayor velocidad de la fermentación, y de su utilización a medida que aumenta el pH, en especial a pH 8 y 9. Luego de esta observación, los valores en que se estabilizan los niveles son semejantes, debido a la gran capacidad de ajuste de la vía glucolítica.

Los niveles de ATP (Fig. 15B) antes de añadir glucosa al medio son bajos, pero después de la adición de la glucosa aumentan rápidamente, y se ve una clara tendencia a que se estabilicen al final en un valor más bajo a medida que se aumenta el pH en que fueron incubadas.



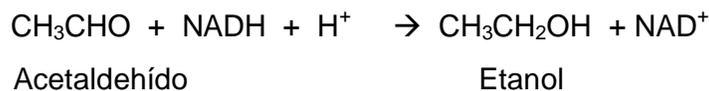
**Fig. 15.** Determinación de G6P (A) y ATP (B) en extractos de **células ayunadas 24 h**, como producto del metabolismo de las levaduras a los distintos pHs evaluados. Para la determinación se utilizó amortiguador MES-TEA-KOH 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, glucosa 10 mM, NADP<sup>+</sup> 100 µg/mL, extracto celular, G6PDH 16.7 U/mL y Hexocinasa 13.2 U/mL. Se presenta el resultado de 3 repeticiones de cada pH evaluado.

El poder reductor, ya sea en forma de NADH o FADH<sub>2</sub>, generado durante los procesos metabólicos celulares, como son la glucólisis, la oxidación de ácidos grasos y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos ó ciclo de Krebs, es una forma de alta energía como pares de electrones con elevado potencial de óxido-reducción. Un ejemplo de ello es que cuando estos electrones son utilizados para reducir el oxígeno molecular a agua durante la respiración celular pueden ser utilizados para la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa. El potencial energético de estos electrones es utilizado para transferir grupos fosforilos al ADP para formar ATP.

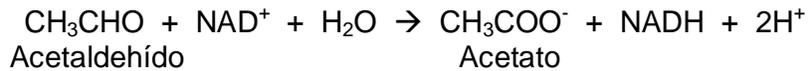
Durante la glicólisis se generan 2 moléculas de NADH como podemos ver en la siguiente reacción:



El piruvato es convertido luego en acetaldehído por acción de la piruvato descarboxilasa, y el acetaldehído generado es convertido en etanol por la alcohol deshidrogenasa y el resultado de está reacción esta dado por:



Esta reacción está fuertemente desplazada hacia la producción de etanol, y se favorece aún más en condiciones alcalinas, ya que el anión de la base sustrae los dos protones; es decir, el protón libre y el del NADH, dando como resultado la formación de agua y el NAD<sup>+</sup>. Además de esta reacción, el acetaldehído puede formar acetato por acción de la aldehído deshidrogenasa, como se muestra en la siguiente reacción:



Por otra parte, en aerobiosis *S. cerevisiae* puede utilizar el etanol como sustrato y generar NADH de acuerdo con la segunda reacción. En particular la última reacción se lleva a cabo principalmente en condiciones aeróbicas.

En condiciones aeróbicas el NADH generado durante la glucólisis, en el paso en donde el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) es convertido a 1,3-bisfosfoglicerato (BFG), es introducido a la mitocondria por una NADH-deshidrogenasa, dando lugar a una competencia entre la glucólisis y la respiración celular por el NADH. En condiciones anaeróbicas, no puede funcionar el complejo NADH-deshidrogenasa y sólo se genera, principalmente etanol, y algo de acetato como productos finales. Queriendo detectar posibles diferencias en las levaduras incubadas a los distintos valores del pH, decidimos observar en células intactas los cambios de esta coenzima, gracias a que es posible seguir su fluorescencia, como un índice más de posibles alteraciones metabólicas de las células.

En la Fig. 16A, mostramos los resultados de la fluorescencia del NADH en células sin ayunar y utilizando como sustrato la glucosa. Al añadirla se produce un pequeño aumento de la fluorescencia, por la deshidrogenación del gliceraldehído-3-fosfato, que produce 1,3-bisfosfoglicerato (BFG), que rápidamente disminuye, al iniciarse la producción de etanol, en la que se le utiliza. Pero al acabarse el oxígeno, se observa otro aumento, debido a que ya no existe esa competencia entre la glucólisis y la respiración, durante la cual, parte del NADH generado se va hacia la producción de agua en la cadena respiratoria. De hecho, al añadir peróxido de hidrógeno, una forma eficiente de generar oxígeno en el medio, los niveles de NADH disminuyen porque se activa la respiración; finalmente, agregando cianuro de sodio, un inhibidor de la cadena respiratoria (inhibe la citocromo c oxidasa, complejo IV), vuelven a aumentar los niveles de NADH, y se aprecia un pequeño incremento a pH alto, ya que en estas

condiciones la levadura necesita un gasto energético mayor para poder contrarrestar las adversidades del medio en el que se encuentra.

Con etanol como sustrato (Fig. 16B), el aumento de NADH es inmediato ya que se convierte rápidamente en acetaldehído, pero al igual que con la glucosa, (Fig. 16A), existe una competencia entre la respiración y la glucólisis, y al momento de que el oxígeno se agota, los niveles de NADH aumentan. Al añadir peróxido de hidrógeno los niveles de NADH disminuyen al reinstalarse la respiración celular, y nuevamente al adicionar cianuro de sodio se recuperan los niveles de NADH al inhibirse la citocromo *c* oxidasa. Esta última la señal es un poco mayor a pH 6.

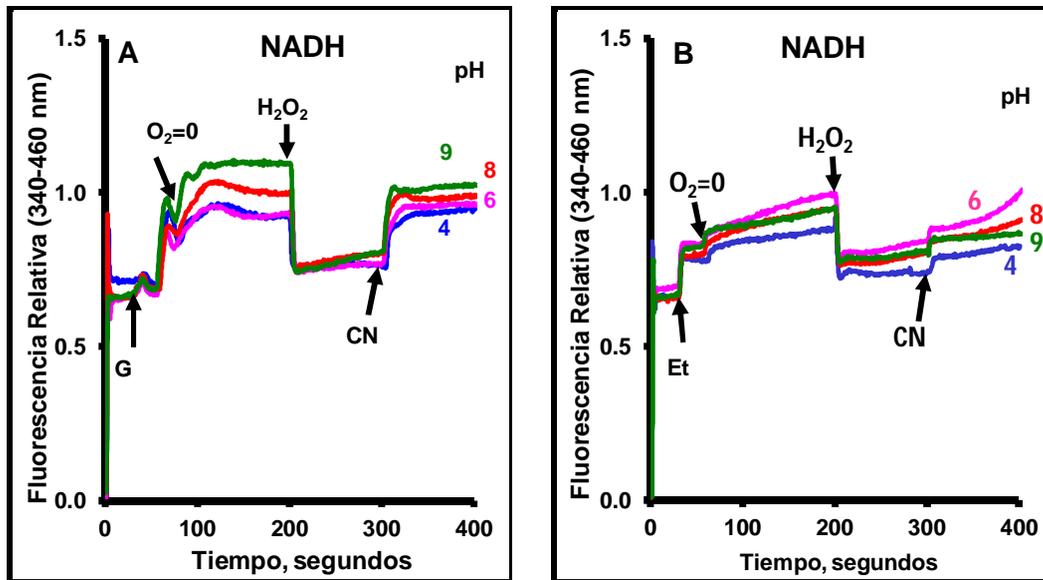
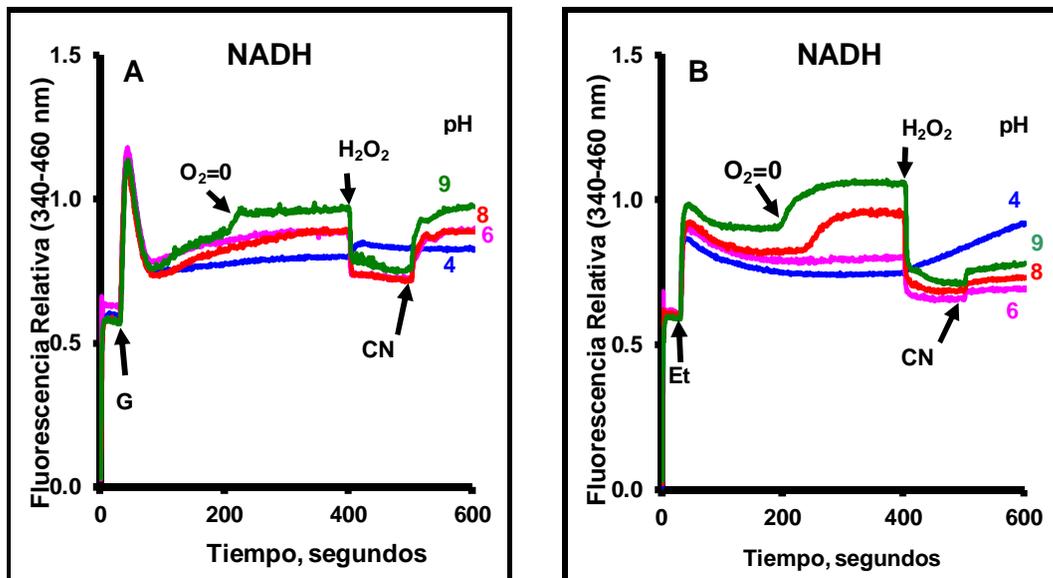


Fig. 16. Fluorescencia relativa de NADH (excitación a 340 nm y emisión a 460 nm) en células **sin ayunar** de *S. cerevisiae* en presencia de glucosa (A) y etanol (B) como sustrato. Incubaciones en amortiguador (Homopipes-TEA, pH 4, MES-TEA pH 6, bicina-TEA pH 8 ó 9, 10 mM), 50  $\mu$ L de la suspensión celular al 50% (25 mg), glucosa 20 mM o etanol 3 mM en un volumen final de 2 mL. Trazos representativos de 3 repeticiones.

En la Fig. 17A puede verse que en células ayunadas, los cambios son más evidentes, pues la célula no tiene materiales de reserva. En especial los cambios iniciales son más evidentes porque al ayunar las células disminuye su capacidad respiratoria, y la competencia entre la vía glucolítica y la respiración es menor, a favor de la primera. Al agregar la glucosa, rápidamente es metabolizada por la levadura y los niveles de NADH aumentan, pero inmediatamente disminuyen, en cuanto se inicia la formación de etanol.

A pH 4 la levadura ayunada no alcanza a consumir el oxígeno contenido en la celda, porque su respiración es menor, pero de todas formas, al agregar cianuro se observa el aumento del NADH. A pH 6 y pH 8 se observa un pequeño brinco en la señal, lo que nos indica que sí se acaba el oxígeno, aunque menos notorio que en las células sin ayunar. Al agregar peróxido de hidrógeno los niveles de NADH disminuyen drásticamente por la competencia entre la respiración y la glucólisis, y al añadir cianuro de sodio vuelven a aumentar los niveles, siendo mayores a pH 9 en donde el metabolismo exige un mayor gasto de energía. Es posible también que en estos trazos influya que a valores más altos del pH del medio, hay un aumento del pH interno lo que favorece la reducción del  $\text{NAD}^+$ , al eliminar el  $\text{H}^+$  de la forma reducida, que es el  $\text{NADH} + \text{H}^+$ .



**Fig. 17.** Fluorescencia relativa del NADH (Excitación a 340 nm y emisión a 460 nm) en **células ayunadas** de *S. cerevisiae* en presencia de glucosa (A) y etanol (B) como sustrato. Incubaciones en amortiguador (Homopipes-TEA, pH 4, MES-TEA pH 6, Bicina-TEA pH 8 ó 9, 10 mM), 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular al 50% (25 mg), glucosa 20 mM o etanol 3 mM en un volumen final de 2 mL. Trazos representativos de 3 repeticiones.

Utilizando etanol como sustrato (Fig. 17B) podemos ver que el primer aumento es un poco más pequeño que cuando utilizamos glucosa, debido a que cuando se utiliza glucosa, ésta pasa por la vía glucolítica, mientras que cuando utilizamos etanol, sólo nos lleva a la formación de acetaldehído posteriormente a acetato y finalmente a acetil-CoA y entrar a l ciclo de los ácidos tricarbóxicos para formar el poder reductor.

Nuevamente podemos observar en la Fig. 17B que a pH 4 y 6 la levadura no se termina el oxígeno, y sólo si añadimos cianuro para detener la respiración se observa el aumento en los niveles de NADH.

Los niveles a pH 6 y 8 son muy similares al igual que cuando se utiliza glucosa como sustrato, pero a pH 9 los niveles aumentan un poco más, debido al gasto energético.

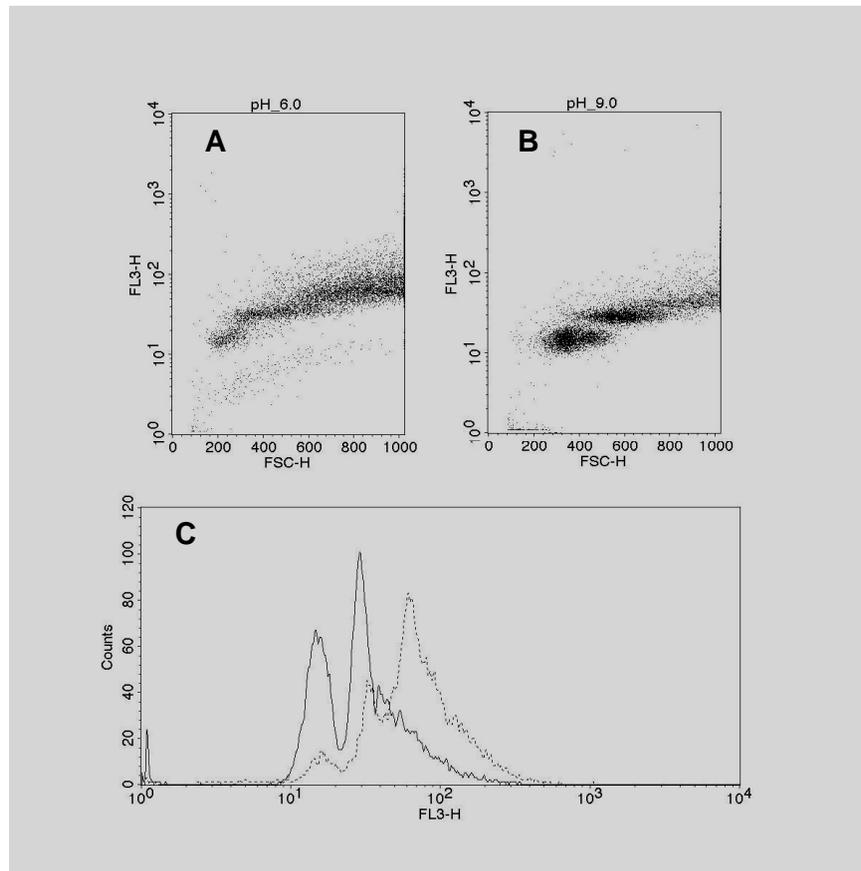
Estos resultados confirman lo que se concluyó antes, en el sentido de que la incubación de *S. cerevisiae* en ambientes con pH alto no produce alteraciones en el metabolismo, que puedan explicar la ausencia del crecimiento al pH elevado del medio.

## CONCLUSIONES

- Los datos de crecimiento nos permiten concluir que *S. cerevisiae* presenta una mayor dificultad de crecer a pH elevado, como son pH 8 y 9.
- El potasio juega un papel crucial en las funciones de la levadura, ya que conforme a los resultados pudimos observar que tanto la fermentación como la respiración se incrementan al adicionar este catión al medio de incubación. Esto podría ser utilizado a nivel industrial para la optimización de las fermentaciones etanólicas.
- Siendo *S. cerevisiae* una levadura fermentativa, gran parte de la acidificación observada a los valores elevados de pH se debe a la producción de CO<sub>2</sub>, que en solución acuosa se hidrata a H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ionizándose finalmente a bicarbonato y un protón. Por otro lado, a los valores altos del pH, el bicarbonato permanece fuera de la célula casi en su totalidad.
- Tanto el transporte de K<sup>+</sup> como el bombeo de H<sup>+</sup> no se vieron afectados significativamente después de las incubaciones a los distintos pHs externos, comprobando así que el pH externo no afecta este parámetro tan importante para las levaduras.
- Los niveles de metabolitos determinados (G6P y ATP) disminuyeron al aumentar los valores del pH en el medio esto debido a que a pH alto el gasto energético es mayor. Esto se pudo corroborar al determinar los niveles de NADH donde los datos nos muestran un incremento en los niveles de esta coenzima al incubar la levadura a los valores de pHs elevados.
- Los datos permiten concluir que los valores elevados del pH no parecen afectar las funciones metabólicas ni energéticas de las células, afectando sólo el crecimiento. Nuestra propuesta es que este daño se provoca, tal vez a nivel del ciclo celular. Éste último resultado abre una nueva perspectiva para estudiar este fenómeno.

## PERSPECTIVAS

1. En resumen, observamos que al incubar las levaduras a valores elevados del pH, se detiene en gran parte el crecimiento. El análisis de los parámetros estudiados de los posibles cambios en el metabolismo y las transformaciones de energía de las células, así como dos de los principales parámetros relativos al transporte, nos muestran que ninguno de estos sistemas parece afectarse por los valores elevados del pH. Sin embargo, el crecimiento se detiene. Otros autores han tratado de analizar este fenómeno mediante otro enfoque, observando que aumenta la expresión de algunos genes (Peñalva y Arst, 2002). Este enfoque es interesante, pero de los genes que parecen sobreexpresarse al aumentar el pH del medio ninguno parece ofrecer solución a nuestro problema. Ante esta situación, en nuestro laboratorio, el Dr. Jorge Ramírez estudió el efecto de la incubación a dos valores del pH sobre el ciclo celular. La figura 18 nos muestra el resultado de una citometría de flujo realizada a dos condiciones de pH, 6.0 y 9.0.



**Fig. 18.** Citometría de flujo. Cambios en las poblaciones celulares al incubar las células a pH 6.0 (A) y 9.0 (B), que muestran claramente que el ciclo celular se detiene al pH más alto. El ADN celular se tiñó con DAPI. En panel C, línea continua corresponde a pH 6 y línea punteada corresponde a pH 9.

Lo que observó el Dr. Ramírez es que, al hacer pasar la suspensión celular (incubada a pH 6 ó 9) teñida con DAPI (colorante que tiñe el ADN) por el tubo de flujo celular, que sólo permite el paso de una célula a la vez, a pH 6.0 se detectan claramente dos poblaciones de células con distintos contenidos de ADN (línea continua), derivados de su duplicación y división celular. Por otra parte, a pH 9.0, en el que se detiene el crecimiento, sólo observa que predomina una población de células (línea punteada), demostrando que en efecto, el ciclo celular se detiene. Lo que nos indica que a pH 9.0 las células se arrestan (generalmente en la fase G1 del ciclo celular), es decir, las células duplican su ADN, pero no se dividen (Fig. 18C).

Estos resultados abren una nueva perspectiva para el estudio del fenómeno que nos ocupa; el mecanismo por el cual se detiene el ciclo celular ante los valores elevados del pH de medio.

## 2. Determinación del pH interno a los diferentes pHs de incubación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barreto, L., Canadell, D., Petrezsélyová, S., Navarrete, C., Marešová, L., Pérez-Valle, J., Herrera, R., Olier, I., Giraldo, J., Sychrová, H., Yenush, L., Ramos, J. y Ariño, J. 2011. A genome-wide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 1-27.
- Bracey, D., Holyoak, C.D., Nebe-von Caron, G. y Coote, P.J. 1998. Determination of the intracellular pH (pH<sub>i</sub>) of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of reduced-expression of the membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Microbiological Methods*. 31: 113–125.
- Conway, E. J y Brady, T. G. 1950. Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. *Department of Biochemistry and Pharmacology*. 47: 360-369.
- Denison, S. H. 2000. Review: pH Regulation of Gene Expression in Fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 29, 61–71.
- Dequin, S. y Casaregola, S. 2011. The genomes of fermentative *Saccharomyces*. *C. R. Biologies*. 334:687–693.
- Eaton, N. R. y Klein, H. P. 1954. The oxidation of glucose and acetate by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 68:110-116.
- Enríquez-Freire, E., López, R., y Peña, A. 1999. Potassium ion efflux induced by cationic compounds in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*.1418: 147-157.
- Eraso, P. y Portillo, F. 1994. Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites. *The Journal of Biological Chemistry*. 14:10393-10399.
- Gómez-Puyou, A., Sandoval, F., Peña, A., Chávez, E., y Tuena, M. 1969. Effect of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> on mitochondrial respiratory control, oxygen uptake, and adenosine triphosphatase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 244: 5339-5345.
- Hoeberichts, F. A., Perez-Valle, J., Montesinos, C., Mulet, J. M., Planes, M, D., Hueso, G., Yenush, L., Sukesh C., Sharma, S. C. y Serrano, R. 2010. The role of K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> transport systems during glucose- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 27: 713–725.
- Jones, R. P. y Greenfield, P. F. 1982. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme Microbiology Technology*. 4:210-223.
- Klionsky, D., Herman, P. K, y Emr S. D. 1990. The Fungal Vacuole: Composition, Function, and Biogenesis. *Microbiological Reviews*. 3: 266-292.
- Lauff, D. B. y Santa-María, G. E. 2010. Potassium deprivation is sufficient to induce a cell death program in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 10:497–507.
- López, R., Enríquez, E. y Peña, A. 1999. Effects of weak acids on cation accumulation, ΔpH and ΔΨ in Yeast. *Yeast*. 15:553–562.

- Martínez-Muñoz, G. A. y Kane, P. 2008. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*. 29:20309-20319.
- Martínez-Muñoz, G. A y Peña, A. 2005. *In situ* study of K<sup>+</sup> transport into the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 22: 689–704.
- Michel, B., Lozano, C., Rodríguez, M., Coria, R., Ramírez, J., y Peña A. 2006. The yeast potassium transporter TRK2 is able to substitute for TRK1 in its biological under K<sup>+</sup> and low pH conditions. *Yeast*. 23: 581–589.
- Navarrete, C., Petrežsélyová, S., Barreto, L., Martínez, J. L., Zahrádka, J., Ariño, J., Sychrová, H. y Ramos, J. 2010. Lack of main K<sup>+</sup> uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Research*. 10:508–517.
- Nelson D. L. y Cox, M. 2000. *Lehninger principles of Biochemistry* 3<sup>a</sup> Edition. World Publishers. New York. Pág. 527-591, 675-690.
- Orij, R., Brul, S. y Smits, G. J. 2011. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1-12.
- Pagadala, V., Vistain, L., Symersky, J. y Mueller, D. M. 2011. Characterization of the mitochondrial ATP synthase from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 43:333–347.
- Peña, A. 1975. Studies on the Mechanism of K<sup>+</sup> Transport in Yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 167, 397-409.
- Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. 1969. Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K<sup>+</sup> in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 180:1-8.
- Peña, A., Cinco, G., Gómez Puyou, A., y Tuena, M. 1972. Effect of the pH of the Incubation Medium on Glycolysis and Respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 163: 413-425.
- Peña, A. y Ramírez J. 1991. An energy-dependent efflux system for potassium ions in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1068: 237- 244.
- Peñalva, M. A., y Arst, H. N. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66: 426-446.
- Petrežsélyová, S, Ramos, J. y Sychrová H. 2011. Trk2 transporter is a relevant player in K<sup>+</sup> supply and plasma-membrane potential control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiológica*. 56:23–28.
- Postmus, J., Tuzun, I., Bekker, M., Müller, W. H, Teixeira de Mattos, M. J., Brul, S. y Smit, G. J. 2011. Dynamic regulation of mitochondrial respiratory chain efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Papers*. 1-36.
- Pronk, J. T, Yde. S, H., y Van Dijken, J.P. 1996. Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 12: 1607-1633.

- Rodríguez-Navarro, A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1469: 1-30.
- Rodríguez-Navarro, A. y Ramos J. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Bacteriology*. 159: 940-945.
- Rosas, G., Gómez, F, y Peña, A. 1994. Effect of potassium on amino acid transport in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1195: 223-228.
- Rothstein A. y Demis C. 1953. The relationship of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1: 18-29.
- Sánchez, N. S., Calahorra, M., González-Hernández, J. C y Peña, A. 2006. Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 361-374.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers R., y Ariño, J. 2002. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium mediated signaling. *Molecular Microbiology*. 46: 1319–1333.
- Scarborough A., G. 1999. Crystallization, structure and dynamics of the proton translocating P-type ATPase. *The Journal of Experimental Biology*. 203: 147–154.
- Sherman, F. 2002. Getting Started with Yeast. *Methods in Enzymology*. 350, 3-41.
- Stevens, T. H. 1992. The structure and function of the fungal V-ATPase. *The Journal Experimental. Biology*. 172. 47-55.
- Strathern, J. N., Jones, E. W. y Broach, J. R. 1982. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. Vol I. Pág. 1-27.
- Strathern, J. N., Jones, E. W. y Broach, J. R. 1992. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. Vol. II. Pág. 194-198, 212-218, 220-235.
- Van der Rest, M. E, Kamminga, A. H, Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., y N. Konings, W. 1995. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, Function, and Biogenesis. *Microbiological Reviews*. Vol 59, No 2: 304-322.
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barceló, A., y Ariño, J. 2004. Characterization of the Calcium-mediated Response to Alkaline Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 42: 43614–43624.
- Yale, J. y Bohnert, H.J. 2001. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 15996–16007.
- <http://www.yeastgenome.org/>