



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIOS SOBRE LA ASIMILACION
HETEROTROFICA DEL ANHIDRIDO
CARBONICO POR SACCHAROMYCES**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
(BIOQUIMICO MICROBIOLOGO)

**PRESENTA: ROSA DEL CARMEN MATEOS
MARCOS**

MEXICO, D. F.

1979



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.

TESIS 1979
M.T.
CENA 221
COC
1



JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. CARLOS DEL RIO ESTRADA

Vocal: " ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN

Secretario: " LILIA VIERNA GARCIA

1er. Suplente: " JORGE SOTO SORIA

2º Suplente: " ROSA MARIA RAMIREZ GAMMA

Sitio donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA EXPERIMENTAL,
FACULTAD DE QUIMICA, U.N.A.M.

Sustentante: ROSA DEL CARMEN MATEOS MARCOS

Asesor del tema: DR. CARLOS DEL RIO ESTRADA

A TI QUE GUIAS MIS PASOS.

CON EL MAS SINCERO AGRADECIMIENTO
Y CARINO A MIS PADRES, MA. ROSA Y
ARISTIDES, POR SU GRAN EJEMPLO.

A MIS ABUELOS SATUR Y ARISTI,
CORRESPONDIENDO AL CARINO QUE
ME DAN.

ARISTIDES, BEGOÑA Y LUPITA,
GRACIAS POR DARME SIEMPRE APOYO.

A TODOS MIS TIOS Y PRIMOS.

MI ESTIMACION Y AGRADECIMIENTO
AL DR. CARLOS DEL RIO ESTRADA.

A MIS AMIGOS, PROFESORES Y
COMPAÑEROS.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION Y GENERALIDADES.....	1
MATERIALES Y METODOS.....	20
RESULTADOS.....	26
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	33
RESUMEN.....	39
TABLAS.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	42

INTRODUCCION Y GENERALIDADES

Todos los sistemas vivos representan una química de complejidad casi increíble. Sin embargo, el estudio de la química de los organismos vivos, sea de plantas o animales, es hoy día, materia de intensa búsqueda por los bioquímicos. Esta actividad ha sido compensada con creces por un conocimiento creciente acerca del proceso de la vida.

Toda la bioquímica puede ser recapitulada estudiando el metabolismo o sea el conjunto de transformaciones químicas que los organismos vivos deben realizar para mantenerse y reproducirse. Los procesos metabólicos se dividen en anabolismo, proceso mediante el cual los organismos sintetizan material celular y catabolismo, a través del cual las células descomponen los materiales nutritivos.

El metabolismo intermedio tiene que cumplir dos tareas fundamentales: por un lado debe elaborar los productos intermedios requeridos para la síntesis de sustancias específicas, propias del organismo; por otra parte debe suministrar energía química bajo la forma de ATP (o sus equivalentes: GTP, ITP, CTP, o creatinfosfato en seres superiores), necesaria para tales

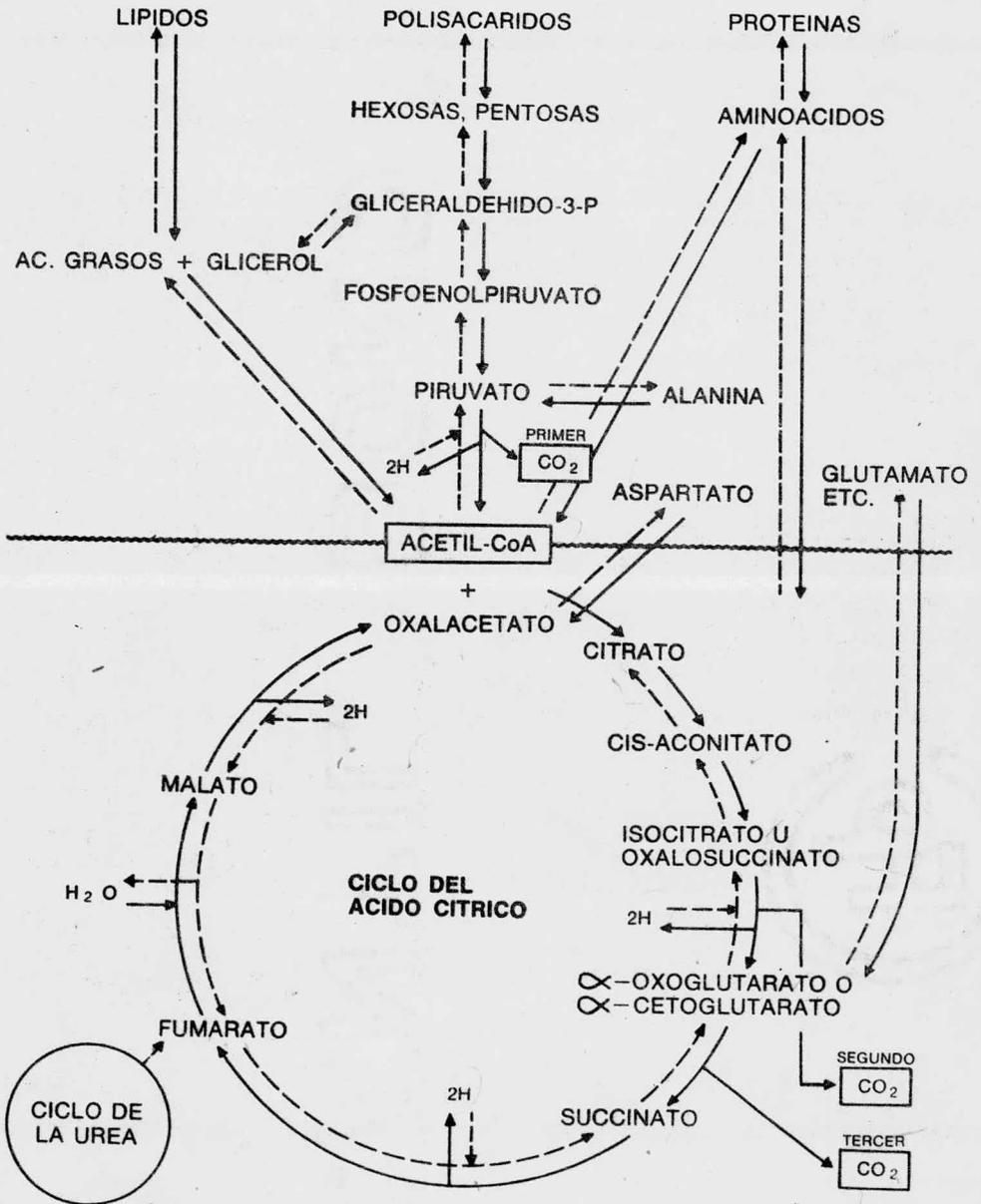
biosíntesis y funciones especiales, así como para el mantenimiento de estructuras complejas.

El ATP (adenosín trifosfato) es una sustancia notablemente simple, pero que con mucha frecuencia es la que suministra la energía necesaria para que las reacciones endergónicas ocurran; mediante la hidrólisis del grupo final fosfato del ATP se libera adenosín difosfato o ADP, ácido fosfórico y 8 Kcal/mol. La reversibilidad de esta reacción es muy importante, ya que la energía se almacena cuando el ADP se convierte en ATP en el sitio de la reacción bioquímica exergónica.

La finalidad del metabolismo intermedio, en lo que a degradación se refiere, puede concebirse en el sentido de llevar las sustancias nutritivas a un estado en que resulten posibles ciertas reacciones generales. En casi todos los organismos es muy simple, en la descomposición se sigue siempre el mismo camino. El producto final para la degradación total es el acetato activo, es decir, el radical acetilo unido a la coenzima A (CoA), cuya formación se puede llevar a cabo a partir de varias sustancias.

La degradación real tiene lugar en el ciclo del ácido cítrico, también denominado ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en el que confluyen los hilos del metabolismo de las proteínas, grasas e hidratos de car

(1) — CATABOLISMO --- ANABOLISMO



bono y que también suministra las sustancias estructurales necesarias para la síntesis de muchos compuestos propios del organismo. De esta forma, el ciclo del ácido cítrico constituye un gran depósito de productos intermedios que se utilizan en la síntesis de nuevos materiales celulares o se degradan produciendo energía.

En el metabolismo, los ácidos grasos se van degradando por el proceso de la β -oxidación a unidades de dos carbonos (acetato activado), las cuales son utilizadas, ya sea en la biosíntesis de otros productos o bien se oxidan a CO_2 y H_2O a través del ciclo del ácido cítrico y de la cadena respiratoria.

Los microorganismos y plantas superiores a partir de NO_3^- sintetizan aminoácidos y proteínas, sin embargo hay aldehídos que por la vitamina B_6 y diversas transaminasas se transforman en aminoácidos; cuando es necesario obtener energía a partir de aminoácidos, primamente se desaminan por diferentes mecanismos, para dar generalmente cetoácidos que pueden entrar fácilmente al ciclo de los ácidos tricarbónicos.

El metabolismo de los hidratos de carbono es muy complejo y variado, no forma un conjunto único, si no que se relaciona a través de productos intermedios comunes con otras series y ciclos de reacciones. Un

carbohidrato es un compuesto de carbón, hidrógeno y oxígeno, en el que el H y el O están presentes en la misma proporción que en el agua, ejemplos de ellos son los azúcares simples como la ribosa ($C_5H_{10}O_5$), la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y la fructosa ($C_6H_{12}O_6$).

El ciclo del ácido cítrico fue descubierto en 1937 casi simultáneamente por Krebs y Martius y Knoop. Los trabajos de Thunberg y Szent-György sirvieron de base para la postulación de este ciclo.

Los estudios de Thunberg sobre el aumento del consumo de O_2 en la oxidación de algunos ácidos como succínico, málico y fumárico, para dar CO_2 y agua lo condujeron a la exposición del ciclo de los ácidos dicarboxílicos, cuyo principio era la unión de dos moléculas de ácido acético para formar succínico y que por una serie de transformaciones se volvía al ácido acético. Posteriormente se comprobó que esta primera reacción no se lleva a cabo.

En 1935 Szent-György concluyó que el incremento en el consumo de O_2 observado por Thunberg, se debía a la presencia de algún sustrato hidrocarbonado endógeno de las células, posiblemente derivado del glucógeno y que la presencia de algunos ácidos orgánicos inducían su oxidación.

Partiendo de estas observaciones, Krebs (2) estudió las interrelaciones del metabolismo oxidativo de algunos ácidos orgánicos; utilizando músculo pectoral de paloma en sus experimentos. Enseguida se presentaban algunos puntos importantes de su trabajo:

= algunos ácidos dicarboxílicos como el succínico, fumarico, málico, oxalacético y α -cetoglutárico y únicamente algunos ácidos tricarboxílicos: el cítrico, isocítrico y cis-aconítico tenían una velocidad de oxidación comparativamente mucho mayor que la de otros ácidos orgánicos empleados.

= los ácidos antes mencionados estimulaban catalíticamente la oxidación de los carbohidratos endógenos y el piruvato añadido.

= el malonato inhibía completamente la estimulación de la oxidación del piruvato por cualquiera de los ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos antes citados, por lo que se supuso que la oxidación del succinato a fumarato por la acción de la succín deshidrogenasa se hallaba inhibida específicamente, constituyendo esta reacción un paso esencial en la secuencia de reacciones que implican los ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos específicos. También observó que esta inhibición provocaba la acumulación cuantitativa de succinato como consecuen

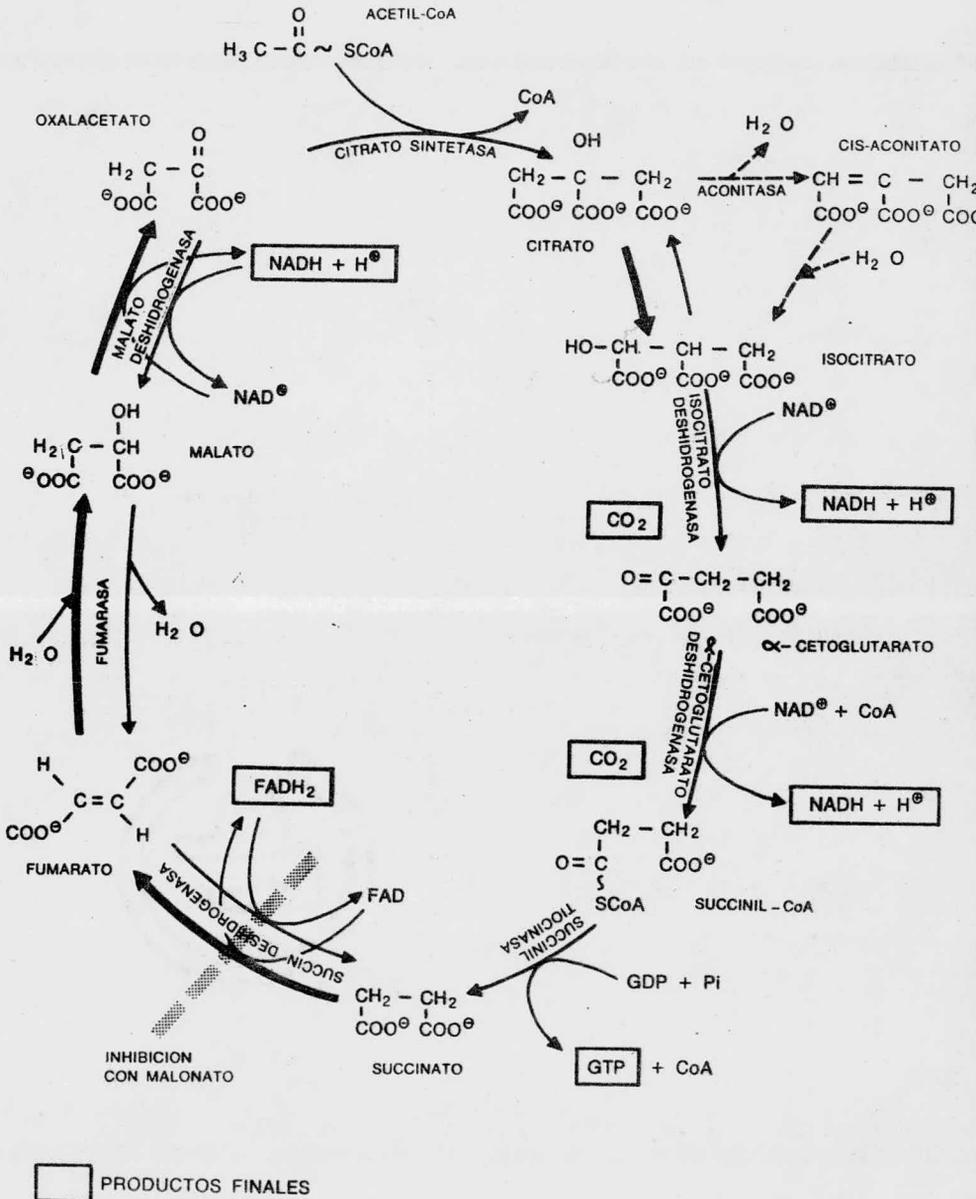
cia de la oxidación del citrato, isocitrato, cis-aconitato, α -oxoglutarato, fumarato, oxalacetato y malato que habían sido añadidos.

== cuando se incubaron oxalacetato y piruvato con suspensión de músculo en condiciones anaerobias, se forma ron pequeñas cantidades de ácido cítrico y fue esta observación la que hizo suponer que era la reacción clave para completar un ciclo con las otras reacciones de oxidación.

/ == por último se encontró que la inhibición del consumo de piruvato por el malonato podía superarse por la adición de oxalacetato; suponiendo que el ácido oxalacético es el que estimula la oxidación, pero cuando se inhibe el ciclo con el malonato se impide su regeneración, bloqueando indirectamente la utilización del piruvato.

Después de que fue postulado el ciclo de - los ácidos tricarboxílicos, la reacción de condensación del ácido pirúvico con el ácido oxalacético para formar ácido cítrico levantó muchas polémicas y este problema no fue resuelto hasta 1949. En primer lugar, el piruvato se oxida a ácido acético en forma de acetyl derivado de la coenzima A, que reacciona directamente con el oxalacetato para formar citrato (FIG. 1).

FIG. 1.- CICLO DEL ACIDO CITRICO O DE KREBS (I)



Recp

Clase I
Clase II
LTA 3

- 9 -

El ciclo de Krebs no constituye únicamente un mecanismo de degradación final sino que, al igual - que otras vías metabólicas, constituye un depósito de productos intermedios. Estos productos aportan materia prima para la síntesis de aminoácidos como ácido aspártico y glutámico, glucosa, así como las porfirinas derivan de la succinil-CoA, producto intermedio del ciclo.

La fermentación o glucólisis es un proceso anaerobio, mediante el cual se obtienen ácido pirúvico, CO_2 y 2 ATP. No es una vía que proporcione mucha energía (2 deshidrogenaciones), en sí es una vía preparatoria para formar sustratos más simples. Se lleva a cabo en todos los seres vivos y a pesar de que este proceso comprende la degradación anaerobia de los hidratos de carbono, se ha podido comprobar que el metabolismo aerobio tiene muchos pasos comunes a la glucólisis, diferenciándose únicamente por la colaboración de las enzimas reducidas y del ácido pirúvico.

La transformación del ácido pirúvico puede llevarse a cabo por vía aerobia, ciclo del ácido cítrico y cadena respiratoria o por vía anaerobia, formándose por deshidrogenación ácido láctico en el músculo y alcohol etílico en la levadura (fermentación alcohólica).

La fermentación alcohólica fue propuesta por

Liebig, posteriormente Pasteur demostró que se efectua ba por acción microbiana y los hermanos Buchner traba jaron con molido de células de levaduras en sus experi mentos de fermentación, sentando las bases para la en zimología.

Harden y Young trataron de inhibir la fermen tación por medio de anticuerpos frente a levaduras, re sultado que no obtuvieron por la presencia de sustancias con fosfatos que aceleran e incrementan dicho proceso, ejemplo glucosa-6-P, glu-1-P, fructosa-1,6-DP (compues to ahora denominado éster de Harden y Young), fru-1-P, fósforo inorgánico.

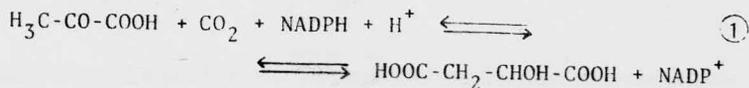
Meyerhof, Embden y Parnas reunieron todos - los datos de los investigadores anteriores para explicar mejor el proceso de fermentación. Expusieron un esquema cuya importancia radica principalmente en que esta vía de degradación puede llevarse a cabo no sólo en condi ciones anaerobias, sino que por vía aerobia se puede - llegar hasta ácido pirúvico, siempre y cuando la glucosa no se degrade directamente a pentosa, de esta forma el ácido pirúvico puede sufrir distintas transformacio nes posteriores.

La vía colateral de las hexosas o ciclo de las pentosas, descrito por Warburg y Dickens, no es -

servarse simultáneamente que se restringe en grado elevado la intervención de la glucosa y con ello se produce una modulación en las necesidades energéticas. Esta restricción se atribuye actualmente a la regulación alostérica de la fosfofructocinasa que requiere ATP para su actividad. Este proceso de regulación metabólica fue descubierto por Pasteur hace más de cien años y recibe el nombre de "Efecto Pasteur".

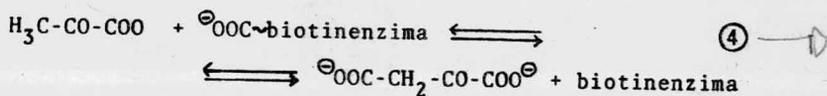
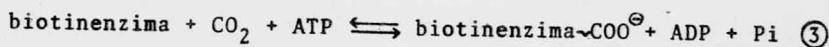
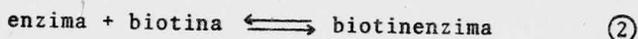
Otra reacción del ácido pirúvico, íntimamente ligada al ciclo del ácido cítrico, es la carboxilación a oxalacético. El ciclo de los ácidos tricarbóxicos requiere para su funcionamiento una reserva suficiente de oxalacetato. Si este se transforma en ácido aspártico o se deriva de algún otro producto intermedio, entonces existe el peligro de que el ciclo se paralice, pues sin la molécula aceptora, el ácido oxalacético, la acetil-CoA no puede introducirse al ciclo. Sin embargo, hay reacciones que suministran importantes metabolitos para determinadas rutas metabólicas, Kornberg las denomina reacciones anapleróticas.

Para pasar del piruvato al oxalacetato existen dos posibilidades. Una consiste en la carboxilación reductora (Ochoa), la deshidrogenasa málica descarboxilante, también llamada enzima málica, cataliza la siguiente reacción:



esta enzima existe en muy baja concentración y bajo condiciones metabólicas normales no desempeña un papel importante.

La ruta principal consiste en la unión directa con el ácido carbónico activado mediante una enzima que contiene biotina, la piruvato carboxilasa:



La formación de $\text{OOC}^\ominus\text{-biotinenzima}$ es una reacción que requiere ATP, por tanto la formación del oxalacetato por esta vía consume energía. Se ha comprobado que se requiere la integridad celular para que se efectúe la fijación de CO_2 , ya que la reacción está regulada por las necesidades metabólicas.

El concepto de "asimilación heterotrófica del CO_2 " fue propuesto primeramente por Wood y Werkman en 1935 (3); tras observar durante la fermentación de glicerol por el género Propionibacterium, una disminu-

ción en la cantidad de CO_2 contenido inicialmente en el medio en forma de carbonato y al mismo tiempo que los productos de fermentación contenían más carbón que los que se obtienen normalmente en la fermentación del glicerol. Esta exposición no fue bien aceptada a pesar de tener bases experimentales firmes y evidentes.

Anteriormente se conocía la asimilación del CO_2 por plantas, cuya capacidad fotosintética permite sintetizar sustancias complejas a partir del CO_2 , tomando como fuente de energía la luz solar. En 1800 Winogradsky observó que algunas bacterias carentes de pigmentos fotosintéticos tenían la capacidad de crecer en un medio exclusivamente inorgánico y en la obscuridad, por lo - cual se pensó que la energía necesaria para su metabolismo la obtenían a partir de reacciones de óxido-reducción de los compuestos inorgánicos sencillos como nitritos y amonio; algunos géneros de microorganismos con estas características son: Nitrosomonas, Nitrobacter y Beggiatoa, surgiendo así el término quimioautótrofo.

De esta forma se llegó a diferenciar a los organismos heterótrofos, que, en contraste con los autótrofos, requieren compuestos de carbón más complejos que el CO_2 , vitaminas y minerales, debido a su baja capaacidad de síntesis.

Posteriormente Krebs y Eggleston proponen - que la fijación del CO_2 se hace sobre ácido pirúvico - para formar oxalacético, pero en sus experimentos nunca se probó la síntesis de oxalacetato. Los experimentos se realizaron con suspensión de hígado de pichón. Lo único evidente fue la obtención de un estímulo en la - síntesis de succinato a partir de piruvato, pero el me- canismo era desconocido; lo mismo se podía obtener si el CO_2 se fijaba en el fumarato o el malato, además de que la fijación no se había realizado bajo condiciones normales.

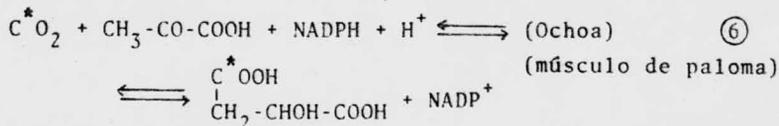
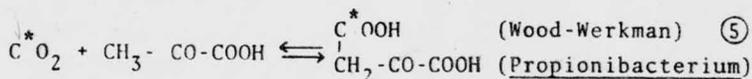
Después de muchas polémicas sobre el tema, - Krampitz y Werkman descubren una enzima que cataliza - la descarboxilación de oxalacetato a piruvato. En una suspensión de Micrococcus lysodeikticus lavado con ace- tato y fosfato alcalino, se trata de demostrar la pre- sencia de dicha enzima. Cuando la suspensión carece de cocarboxilasa y Mg^{++} , no se efectúa ninguna reacción - de descarboxilación u oxidación del oxalacetato o piru- vato. Cuando se añade Mg^{++} el oxalacetato es descarbo- xilado pero no hay reacción posterior con el piruvato resultante. Al añadir cocarboxilasa el piruvato resul- tante es oxidado a ácido acético y CO_2 ; esto hace evi- dente que la descarboxilación es dependiente de Mg^{++} e independiente de cocarboxilasa.

En base a esta reacción enzimática es reversible y que el equilibrio está desplazado hacia el ácido pirúvico, la síntesis de oxalacetato a partir de piruvato y CO_2 sería posible con esta enzima.

Antiguamente se consideraba que la asimilación del CO_2 por los organismos era exclusiva de los seres autótrofos. Con la aparición de la técnica de los isótopos y el empleo del carbono radiactivo (C^{14}) en bioquímica, se ha comprobado que la mayoría de los organismos asimilan en gran cantidad el CO_2 . De tal manera ocurre en las levaduras, según los reportes de Sánchez-Marroquín, del Río y Celis (4 y 4').

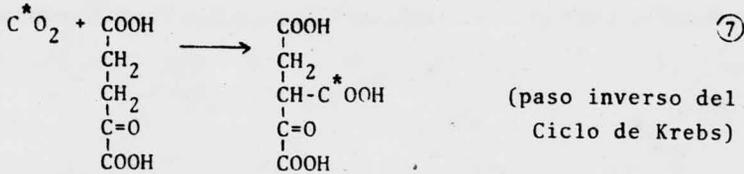
La fijación de CO_2 , tanto en gérmenes autótrofos como heterótrofos procede de acuerdo con una serie de reacciones químicas que hasta el momento podríamos resumir como sigue:

- 1.- La formación de ácidos dicarboxílicos por β -carboxilación:

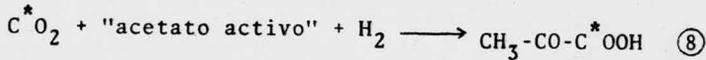


- 2.- La formación de ácidos tricarboxílicos por β -carboxilación:

xilación:



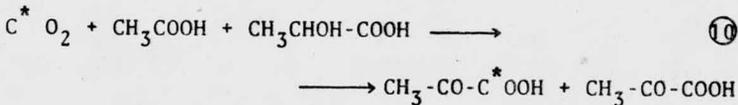
3.- La formación de piruvato por α -carboxilación:



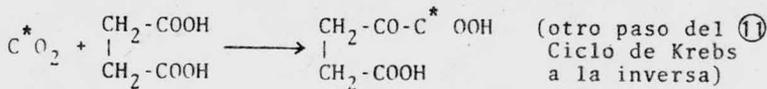
o efectuando la reacción reversible a la llamada fosfo
roclástica o hidroclástica que llevan a cabo Escherichia coli o Aerobacter aerogenes :



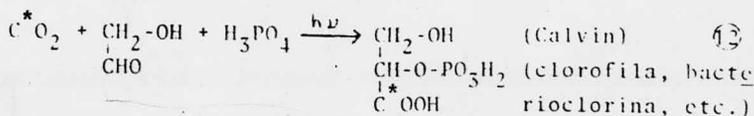
o empleando láctico como reductor:



4.- La formación de α -cetoglutarato por α -carboxilación:



5.- La formación del ácido 2-fosfoglicérico por fotosíntesis:



Existen otros caminos de fijación de CO_2 , pero implican mecanismos para síntesis muy específicos y no son cuantitativamente muy importantes aunque sí lo sean cualitativamente, como el uso de CO_2 o bicarbonato en la fabricación de purinas o la biosíntesis de urea conforme al ciclo de Krebs-Hanseleit.

También se ha especulado en el funcionamiento a la inversa del clásico ciclo de Krebs o del ácido cítrico.

El estudio de la fijación de CO_2 juega un papel importante desde el punto de vista de la microbiología médica, ya que dentro de este campo existen géneros, como Clostridium, Brucella y Neisseria, que requieren CO_2 para su crecimiento y no como se consideraba que la atmósfera de CO_2 era necesaria para disminuir la tensión de O_2 en el medio (8). De igual forma ocurre con la adsorción de CO_2 por proteínas de diversas clases, que a pesar de no ser funcionales en sistemas biológicos, son capaces de fijar el CO_2 del medio por procesos fisicoquímicos, esto ha sido reportado por Mitsuda y colaboradores (9).

En base a lo expuesto anteriormente la finalidad de este trabajo es ayudar a visualizar un fenómeno complejo como es el ciclo de Krebs, de manera sencilla y objetiva, con posibilidad de reproducir los experimentos en el laboratorio, sin necesidad de equipos y métodos sofisticados, facilitando así el aprendizaje y comprensión de uno de los procesos más interesantes del metabolismo intermedio.

Con motivo de la visita a México del Dr. Sir H. Krebs que asistía al Simposium Internacional Sobre la Actividad Enzimática y Regulación Metabólica (1960), el propio Dr. Krebs sugirió la utilización del método de fijación del gas carbónico por levaduras como un experimento demostrativo sencillo para ayudar a entender el inicio del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (17).

MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS QUIMICOS:

- Glucosa - "Técnica Química, S.A.", México
 KH_2PO_4 - "Técnica Química, S.A.", México
 MgSO_4 - Mallinckrodt Chemical Works, E.U.A.
Extracto de levadura - "Difco", México
Peptona - Central de Drogas, S.A., México
Ext. hidrol. de caseína libre de vit. - E.Merck,
Darmstadt, Alemania
 NH_4NO_3 - Productos Químicos Berkman, México
Alanina - Sigma de México, S. A.
Biotina - La Roche and Co. Ltd., Suiza
Ac. Succínico - Mallinckrodt Chemical Works, E.U.A.
Ac. malónico - E.Merck, Darmstadt, Alemania
Ac. cítrico - Baker Analyzed Reagent, E.U.A.
Ac. málico - Fisher Scientific Company, E.U.A.
Destiobiotina - Sigma Chemical Company, E.U.A.

BIOLOGICO:

Levadura de cerveza, proporcionada por la -
Cervecería Cuauhtémoc, S.A. (planta en México, D.F.)

Preparación de Suspensión de Levaduras. Inóculo.

Se utiliza el medio de cultivo con la siguiente composición:

KH_2PO_4	0.3%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1%
peptona	1%
extracto de levadura	0.1%
glucosa	0.33 M (esterilizada por separado)
agua	100 ml.

Ajustar el pH a 5 con solución de NaOH o solución de HCl, según sea necesario. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Inocular con cultivo de levadura de cerveza hasta obtener una concentración de 3 ml %. Incubar con agitación en matraces de 300 ml conteniendo 100 ml de medio a 30°C y durante 24 hrs.

Una vez transcurrido este período, la suspensión contenida en los matraces se centrifuga a 2000 rpm durante 15 minutos, el sedimento se resuspende en agua destilada estéril, hasta obtener una suspensión aproximada al 50 %. Se refrigera a 4°C.

Esta suspensión se empleará en la inoculación de los medios para pruebas de fermentación y fijación de CO_2 .

Con el fin de emplear un medio de cultivo mínimo, en el cual se obtuviera la máxima asimilación de CO_2 producido durante la fermentación, se probó el efecto de varias sustancias como fuente de N y a diferente pH (4,5,6,7).

glucosa	0.33 M
KH_2PO_4	0.3 %
MgSO	0.1 %
Agua	100 ml.

variante 1)	extracto hidrolizado de caseína libre - de vitaminas	1 %
2)	peptona	1 %
3)	NH_4NO_3	1 %
4)	alanina	1 %
	suspensión de levaduras	3 ml. %

En base a los resultados obtenidos en las pruebas anteriores y por la economía que ello representa, se eligió como medio base el siguiente:

glucosa	0.33 M
KH_2PO_4	0.3 %
MgSO_4	0.1 %
peptona	1 %
agua	100 ml.
Ajustar el pH a 5	

Esterilizar a 120°C - 20 minutos

Los estudios realizados durante este trabajo son comparativos, siempre frente al medio base y - las variantes utilizadas fueron las siguientes:

ácido málico	0.08 M
ácido succínico	0.08 M
ácido cítrico	0.08 M
biotina	trazas
ácido malónico	1 %
NaF	0.1 %
destiobiotina	6.5 mg/100 ml.

El recipiente empleado para cuantificar el volúmen de gas producido en la fermentación y posteriormente asimilado es una modificación del tubo de Smith. Consiste en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. al cual se le ha unido lateralmente y desde el fondo un tubo de ensayo, en el cual se acumula el gas. Por medición de la longitud de la columna se puede hacer la cuantificación comparativa, de la cantidad de gas (CO₂) producido y fijado. Dado que los tubos en los matraces no son iguales, se ha tomado una longitud determinada para cada uno de ellos como el 100 % de gas y en relación a estas cifras se calculan los porcentajes durante el proceso. (ver esquema)

Para observar el fenómeno de fijación de CO_2 es necesario tener inicialmente el tubo lleno de medio, el cual será desplazado por el gas producido durante la fermentación, pudiéndose observar la asimilación del CO_2 por las variaciones que se efectúan en el volúmen de gas contenido en la rama aneróbia.

Es importante recalcar que en este trabajo la cuantificación de la similación heterotrófica del CO_2 es comparativa y no se ha tomado el volúmen de gas en ml. ya que el diámetro de los tubos es el mismo, variando únicamente su longitud. Para los fines de la tesis basta con tener una escala comparativa como es el medir en cm la longitud de las columnas de gas y el porcentaje que estas representan.

Debido a posibles contaminaciones durante el estudio, se deben mantener al máximo las condiciones de esterilidad, tanto en el material y medios empleados, como en la zona de trabajo. Cualquier contaminación puede causar interferencias y los resultados obtenidos no son confiables ya que el metabolismo no es igual en todos los seres vivos.

RESULTADOS

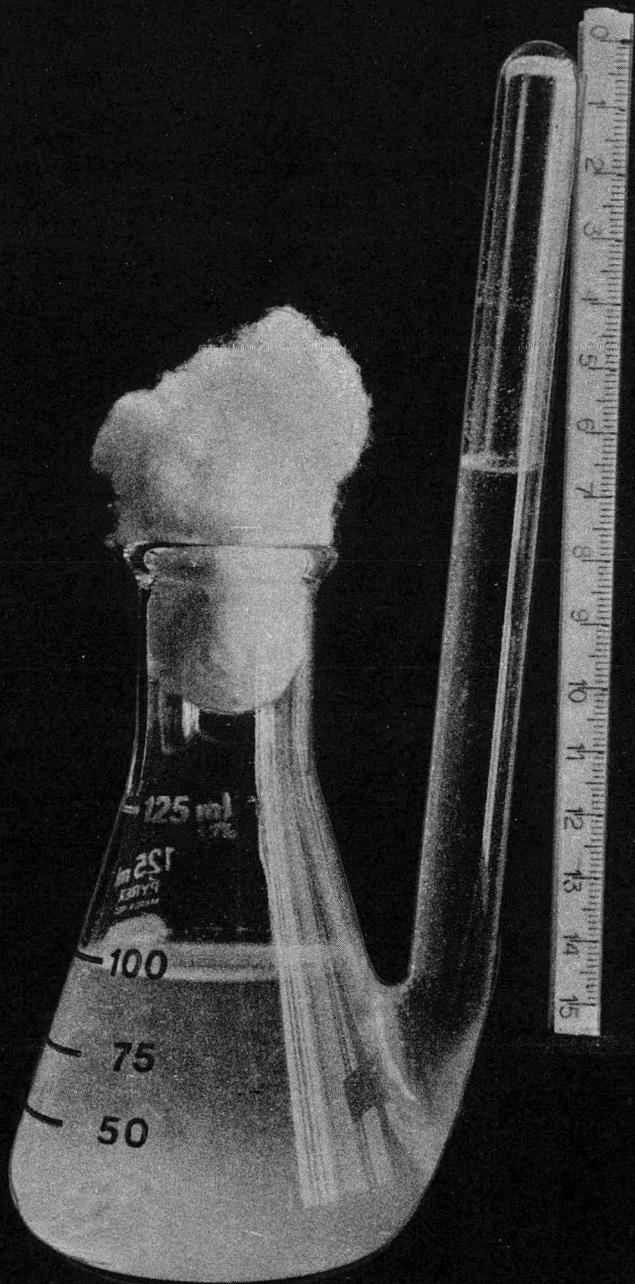
La fijación del CO_2 por Saccharomyces cerevisiae, levadura heterotrófica que generalmente se asocia a la producción de CO_2 , se comprobó plenamente, aún cuando el proceso fermentativo fue simultáneo. El efecto de dos temperaturas, 30 y 37°C, es únicamente sobre las velocidades de fermentación y fijación del CO_2 , no registrándose ninguna otra alteración. Hay una asimilación del CO_2 más rápida cuando la incubación es a 37°C que cuando se realiza a 30°C.

En las gráficas se muestran los resultados de la fijación del CO_2 , utilizando medio base (control) y el mismo medio conteniendo además otras sustancias.

Se puede observar en las gráficas I y II que la asimilación de CO_2 es más lenta si añadimos ácido málico, ácido cítrico o ácido succínico, en concentración 0.08 M.

La adición de ácido malónico al 1 % (gráficas IIA y IIB) también retarda la fijación del gas, aunque no tanto como las sustancias anteriores, pero sí más que la biotina (gráficas IA y IB).

En las gráficas IIA y IIB se observa un gran estímulo en la fijación del CO_2 con el NaF (0.1 %),



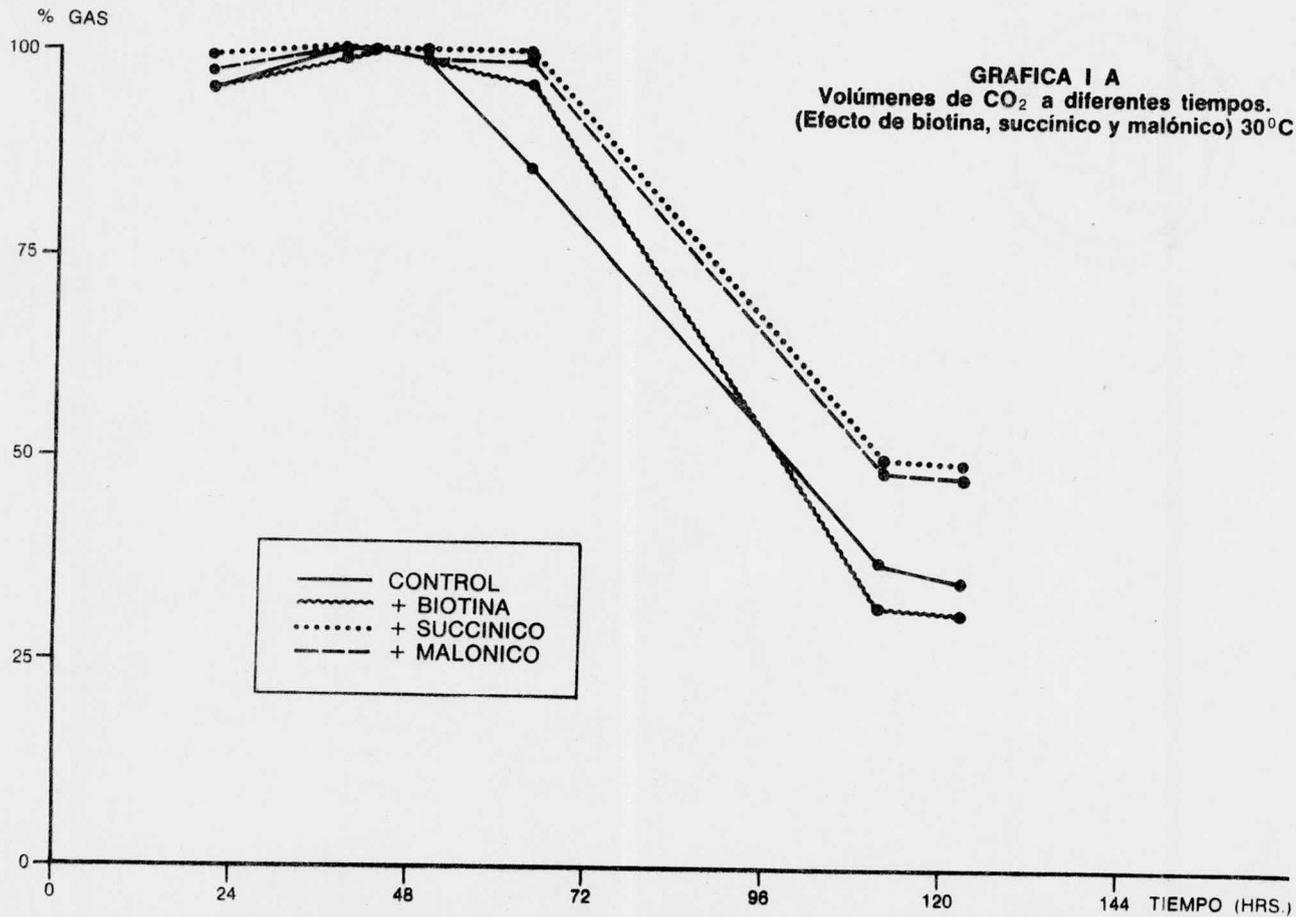
añadido a los matraces cuando la fermentación ha sido completa; en las curvas se aprecia una fijación muy rápida del CO_2 , al grado de que a las 48 hrs. sólo queda un 30 % del gas presente.

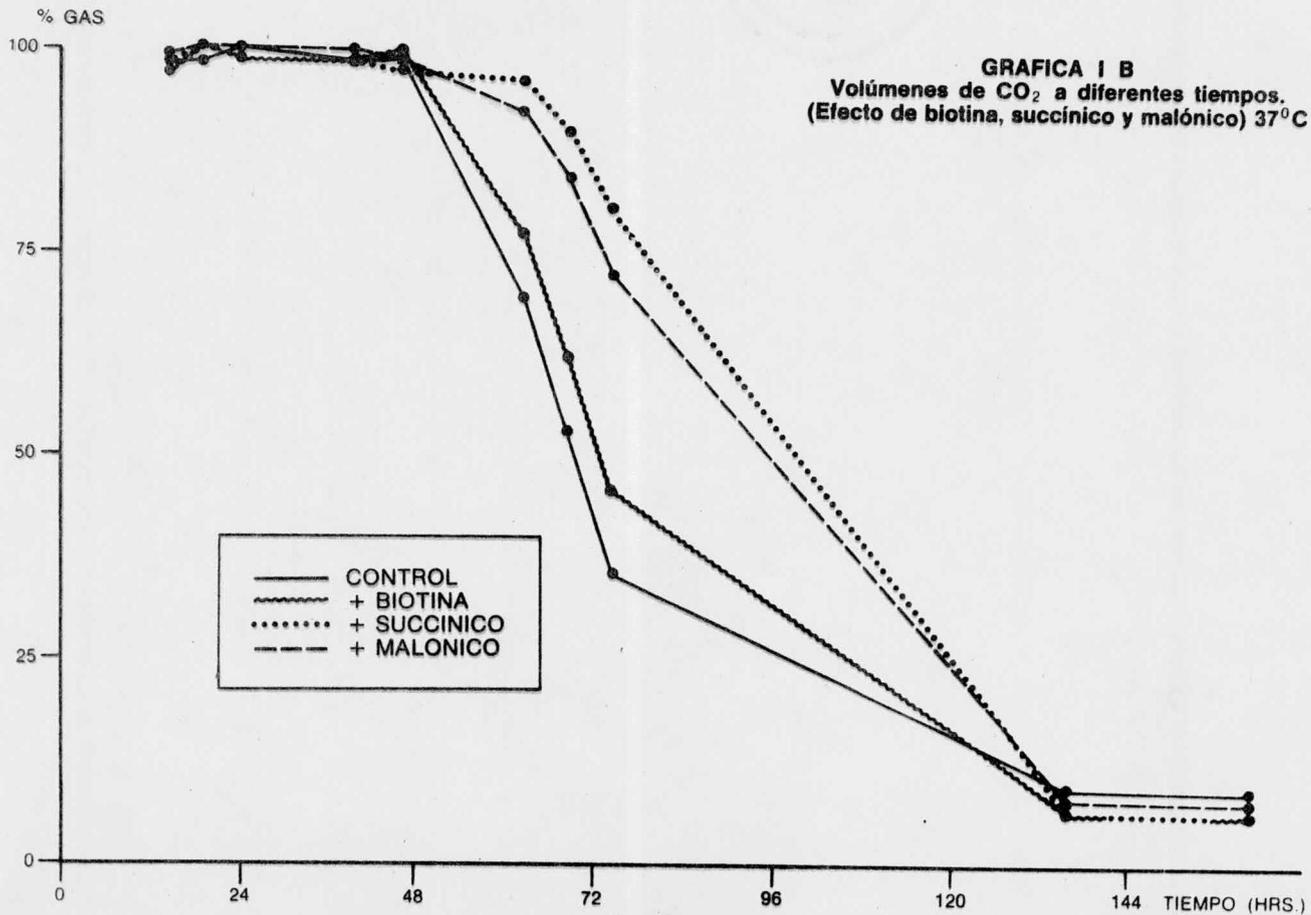
Cabe mencionar que se realizó un experimento utilizando inóculo de levaduras "tratadas" con albúmina fresca y cruda de huevo de gallina, aprovechando su contenido de avidina, protefina del huevo de aves - que fija la biotina y que debe eliminar a esta vitamina del medio, bloqueando la carboxilación del ácido pirúvico. Posteriormente se comprobó que las variaciones obtenidas en la fijación del CO_2 , se debían a que los numerosos lavados que se realizaban con agua destilada, eliminaban al mismo tiempo otras sustancias indispensables para la levadura, probablemente coenzimas, metabolitos y sales minerales, lo cual inhibe los procesos metabólicos, desde la fermentación.

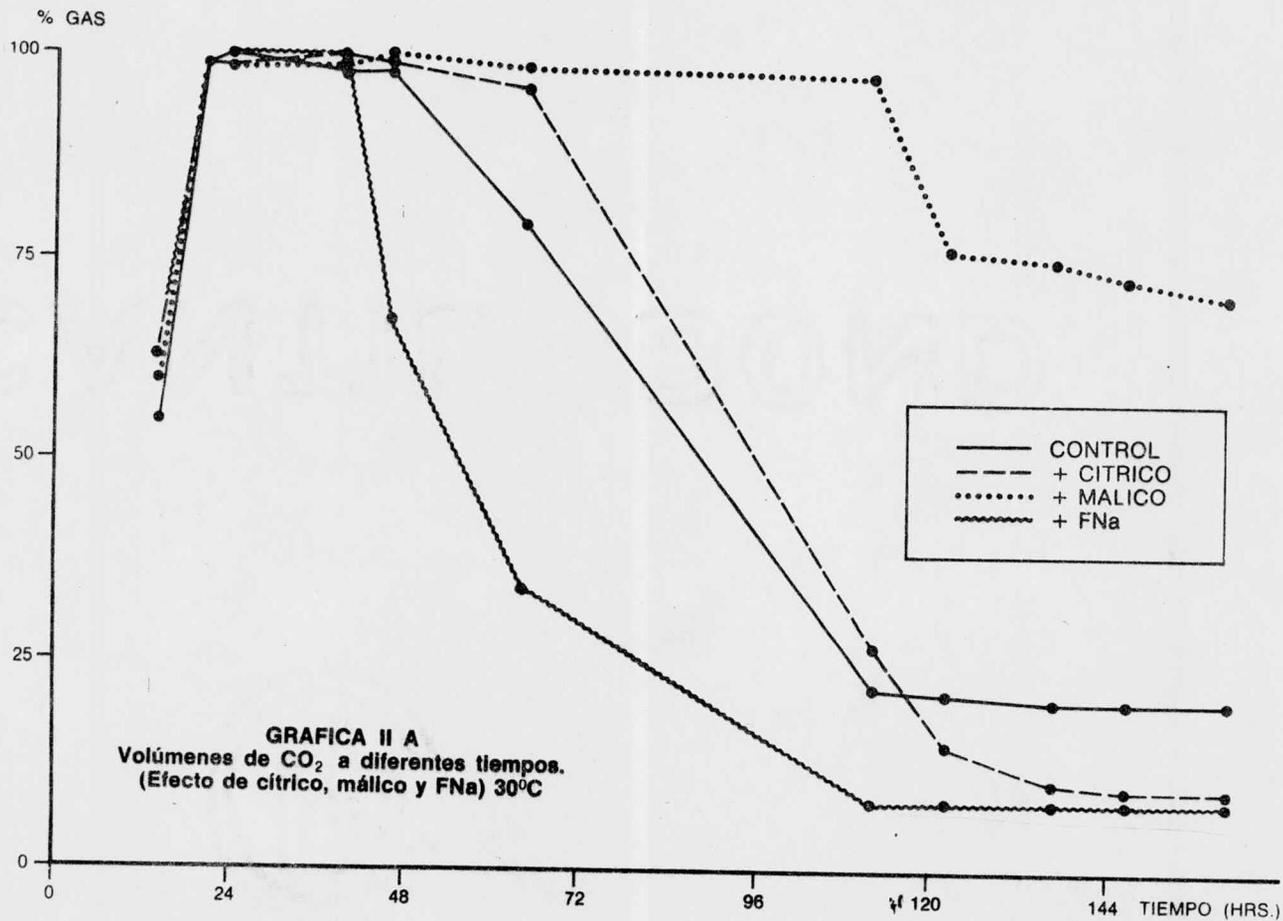
Con el fin de observar el efecto inhibitorio de la destiobiotina en la fijación del CO_2 se hicieron dos experimentos: en uno la destiobiotina fue añadida directamente al medio de cultivo y en el otro la adición fue a la suspensión de levaduras previamente a la inoculación del medio base. Estos dos experimentos se realizaron simultáneamente a los controles carentes de destiobiotina. La concentración de destiobiotina empleada

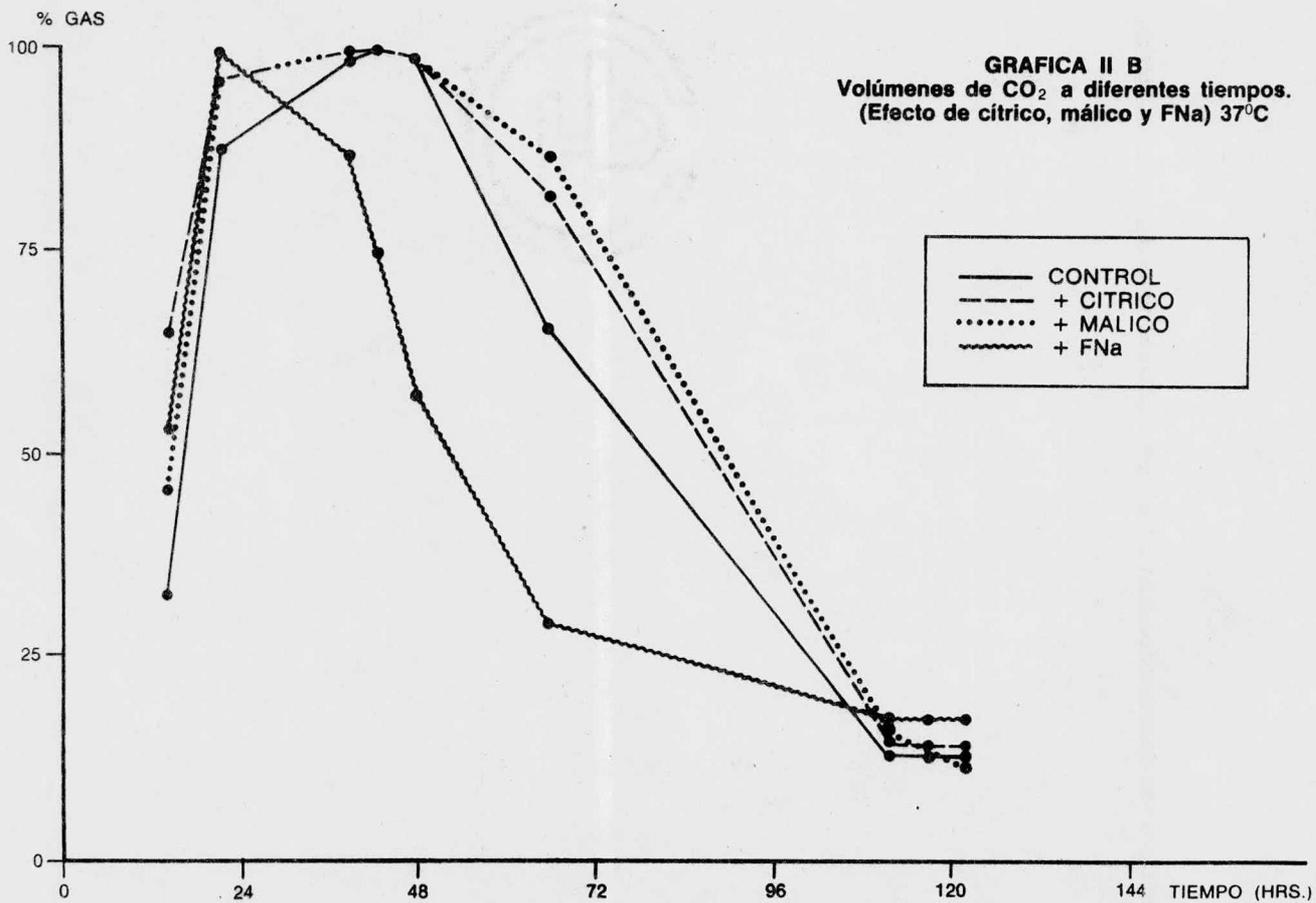
en ambos casos fue de 6.5 mg %, con respecto al volúmen del medio de cultivo.

El efecto inhibidor de la destiobiotina en la fijación del CO₂ no se observó; las curvas obtenidas en los dos experimentos son iguales a las obtenidas en los controles respectivos, por lo que no se reportan las gráficas.









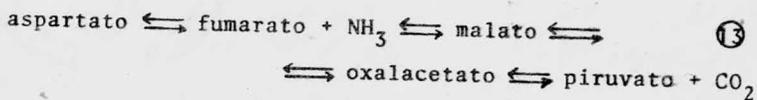
DISCUSION Y CONCLUSIONES

La levadura de cervecera, productora de CO_2 por fermentación alcohólica, fue capaz de fijar nuevamente este gas, en un medio con glucosa, peptona y sales minerales al encontrarse en contacto con el oxígeno atmosférico. Esta fijación es más lenta cuando en el medio existen ácido málico, ácido cítrico o ácido succínico y en general los ácidos que constituyen el ciclo de Krebs lo cual era de esperarse al existir los productos que se formarían en esta fijación. Es probable que esta levadura ni precise fermentar la glucosa al tener sustratos oxidables aeróbicamente con el ciclo de Krebs, cuyas enzimas los utilizan sin requerir la formación de oxalacético por carboxilación del pirúvico.

Al añadir ácido malónico se pensó en obtener el siguiente resultado: al ser inhibida por competencia la enzima succinato deshidrogenasa el ciclo no se puede completar y es necesaria la fijación del CO_2 para la producción de más oxalacetato. Esta reacción debería ser más acelerada que en los otros casos porque al bloquearse el ciclo se necesitan dos moléculas de piruvato y una de CO_2 para darle continuidad al ciclo.

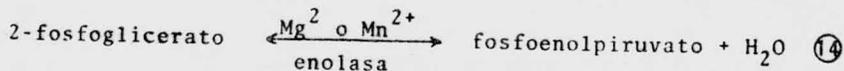
Sin embargo, en los experimentos realizados no se observa estimulada la fijación, sino al contrario,

desaminación de aminoácidos, ya que es capaz de desaminar al aspártico, la serina y treonina, causando la liberación de energía por estos mecanismos, con lo cual no será tan necesaria la fijación del CO_2 para implementar al ciclo de Krebs (5).



Se estudió el efecto del ión fluoruro, conocido inhibidor de enzimas que manejan fosfatos ya que remueve el Mg^{++} (Mn^{++}), ión necesario para estas reacciones. El mecanismo es la eliminación del Mg como fluorofosfato.

El resultado indica una fijación más acelerada del CO_2 . Como el fluoruro fue añadido al encontrarse llena la rama anaerobia de CO_2 , el papel de este ión fue sólo detener el proceso fermentativo ya que la enzima enolasa queda inactivada y el resultado neto que observamos es sólo el debido a la fijación del CO_2 , sin nueva acumulación de gas por fermentación. Las veces en que el fluoruro se agregó desde el inicio no hubo ni fermentación, ni fijación del CO_2 .



Las explicaciones anteriores son solamente algunas de las muchas que se pueden proponer, como es el caso en que la relación existente entre todos los ciclos metabólicos se vea afectada por la presencia del fluoruro, especialmente este ión inhibe la enzima pirofosfatasa inorgánica que cataliza la hidrólisis de pirofosfato inorgánico, reacción esencial en el proceso de activación global del metabolismo.

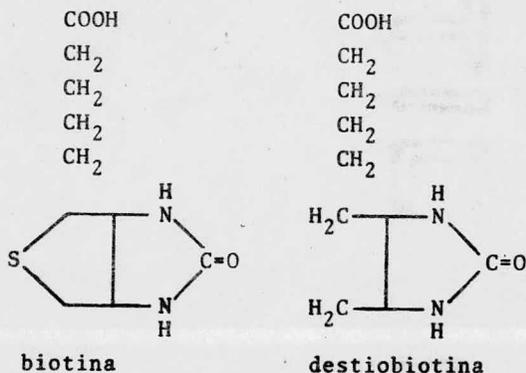


Con esto se impide la oxidación de los ácidos grasos libres hasta acetyl-CoA. Al no tener la levadura capacidad para obtener energía por esta vía, se acelera el proceso de asimilación del CO_2 , contrarrestando así las deficiencias que se presentan por las inhibiciones que causa el fluoruro.

Los resultados obtenidos en el experimento en donde se trató de eliminar, por adición de avidina, la biotina contenida en las levaduras, son similares a los reportados por McManus (mencionado por Utter y Wood, 7), quien encontró que extractos ultrasonificados libres de células del germen M. lysodeikticus, no fueron afectados por adición de albúmina de huevo. En los extractos celulares tratados con acetona, o en preparados lisados, aún existe biotina firmemente unida a una

sustancia no conocida.

La destiobiotina actúa como antimetabolito, la inhibición de la reacción catalizada por la enzima piruvato carboxilasa es por competencia con la biotina, debido a la semejanza estructural de ambas sustancias.



Este efecto ha sido ampliamente comprobado cuando la reacción enzimática se realiza en forma aislada. En este experimento no se observó dicho efecto, quizá debido al gran obstáculo que presenta la membrana celular y como ya se ha mencionado, la biotina o vitamina H se requiere en tan baja cantidad que si no logra ser desplazada en el interior de la célula por el antimetabolito, la inhibición de la enzima piruvato carboxilasa no se obtiene.

Este estudio permite demostrar con aparatos

muy simples el proceso de asimilación heterotrófica -
del CO_2 , entender sus implicaciones y permite que el -
investigador aún en grado de alumno, modifique, corrija
o añada experimentos para interpretar estos aspectos -
interesantes del metabolismo microbiano.

RESUMEN

Se comprobó plenamente que la reacción de fijación del CO_2 es efectuada por las levaduras.

Según los resultados obtenidos al tener en el medio ácidos componentes del ciclo, la velocidad de fijación del CO_2 es menor, debido a que son los sustratos que entran directamente en el ciclo de Krebs, sin necesidad de fabricarlos.

El efecto inhibitor del malonato sobre la succín deshidrogenasa, no se presentó, posiblemente por una marcada competencia en síntesis de ácidos grasos.

El fluoruro de sodio nos aclara la relación existente entre los procesos o rutas metabólicas para la obtención de energía, actuando como fuerte inhibidor de la enolasa y enzimas que requieren Mg^{++} como cofactor en su trabajo durante la glucólisis.

La biotina es requerida en cantidades mínimas por las levaduras para efectuar la fijación heterotrófica del CO_2 , además de que una porción probablemente se encuentra unida a una sustancia desconocida componente celular y resulta muy difícil eliminarla para observar la variación que se obtendría al permanecer las células sin ella, siendo un factor importante en la reacción de carboxilación del ácido pirúvico.

hasta
aquí.

TABLA I A.- Porcentajes de gas en la asimilación heterotrófica de CO₂ por Saccharomyces cerevisiae, temperatura 30°C.

TIEMPO (hrs.)	0	21.5	38.5	43	48.5	63.5	110.5	121
CONTROL	0	94.77	100	100	99.33	85.25	37.32	34.87
+ BIOTINA	0	94.83	99.44	100	99.68	95.82	31.91	30.96
+ SUCCINICO	0	99.39	99.68	100	100	99.69	49.77	49.09
+ MALONICO	0	97.79	100	100	98.72	99.41	48.51	47.14

TABLA I B.- Porcentajes de gas en la asimilación heterotrófica de CO₂ por Saccharomyces cerevisiae, temperatura 37°C.

TIEMPO (hrs.)	0	14	18.5	23	38	45	62	67	72.5	134	158
CONTROL	0	98.01	99	100	99	99	89.26	82.69	38.16	6.98	6.98
+ BIOTINA	0	97.24	100	98.93	99.58	99.64	76.88	61.99	45.45	6.60	6.60
+ SUCCINICO	0	98.18	100	99.89	99.78	99.86	96.02	90.53	80.14	6.41	5.80
+ MALONICO	0	98.41	100	100	99.38	99.04	92.27	84.60	71.82	6.69	6.69

TABLA IIA.- Porcentajes de gas en la asimilación heterotrófica de CO₂ por Saccharomyces cerevisiae, temperatura 30°C.

TIEMPO (hrs.)	0	14	21	24	38	48	63	110	120	134	144	158
CONTROL	0	62.76	98.35	100	98.34	98.34	80	22.48	21.51	20.89	20.88	20.88
+ CITRICO	0	62.27	99.10	99.10	100	98.78	96.42	27.77	15.23	10.75	10.29	10.29
+ MALICO	0	61.85	99.68	99.68	100	99.69	98.37	76.78	74.59	73.34	73.02	71.77
+ NaF	0	62.12	99.43	100	100	67.88	34.33	8.67	8.67	8.67	8.67	8.67

TABLA IIB.- Porcentajes de gas en la asimilación heterotrófica de CO₂ por Saccharomyces cerevisiae, temperatura 37°C.

TIEMPO (hrs.)	0	14	21	38	42	47	65	110	116	120
CONTROL	0	33.27	87.58	98.88	100	99.01	84.87	6.57	6.57	6.57
+ CITRICO	0	64.88	96.04	99.89	100	99.89	81.34	7.96	7.96	7.88
+ MALICO	0	45.91	85.26	99.38	100	99.05	86.52	6.91	6.60	5.98
+ NaF	0	53.53	100	87.33	75	57.02	28.16	17.42	17.42	17.42

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lehninger, A.L.- BIOQUIMICA.- Segunda edición.- - Ediciones Omega, S.A.- Barcelona, España.- 1972.
- 2.- Krebs, H.A. and Johnson, W.A.- THE ROLE OF CITRIC ACID IN INTERMEDIATE METABOLISM IN ANIMAL TISSUES.- Enzymología, 4, 148 (1937).
- 3.- Werkman, C.H. and Wood, H.G.- HETEROTROPHIC ASSIMILATION OF CARBON DIOXIDE.- Advances in Enzymology, 2, 135 (1942).
- 4.- del Río, C.- ESTUDIOS BIOQUIMICOS DE Saccharomyces carbajali.- Tesis profesional de Químico Bacteriólogo y Parasitólogo.- Escuela de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.- Abril 1948.
- 4'.- Sánchez-Marroquín, A., del Río, C., Celis, C.- ALGUNOS ASPECTOS METABOLICOS DE Saccharomyces carbajali.- Anales del Instituto de Biología, México, D.F., 20 (1949).
- 5.- Utter, M.F. and Wood, H.G.- MECHANISMS OF FIXATION OF CARBON DIOXIDE BY HETEROTROPHS AND AUTOTROPHS .- Adv. in Enzymology, 12, 41 (1951).

- 6.- Sánchez-Marroquín, A.- METABOLISMO AUTOTROFICO Y HETEROTROFICO EN LOS MICROORGANISMOS.- Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural.- Tomo X: 1-4 (1949).
- 7.- Wood, H.G. and Barden, R.E.- BIOTIN ENZYMES.- Ann. Rev. Biochem., 46, 385-413 (1977).
- 8.- Dubos, R.J.- BACTERIAL AND MYCOTIC INFECTIONS OF MAN.- Third edition.- J.B. Liprincott Co.- The Rockefeller Institute.- New York, U.S.A., (1958).
- 9.- Mitsuda, H., Kawai, F., Yamamoto, A. and Nakajima, K.- CARBON DIOXIDE PROTEIN INTERACTION IN A GAS-SOLID PHASE.- J. Nutr. Sci. Vitaminol.,21, 151-162 (1975).
- 10.- Wood, H.G. and Werkman, C.H., Biochem. J., 34, 7-14 (1940).
- 11.- Wood, H.G. and Werkman, C.H., Biochem. J., 34, 129 (1940).
- 12.- Wood, H.G., Werkman, C.H., Hemingway, A. and Nier, A.O.C., J. Biol. Chem. 139, 365-376 (1941).
- 13.- Wood, H.G., Werkman, C.H., Hemingway, A. and Nier, A.O.C., J. Biol. Chem., 139, 377-381 (1941).

- 14.- Evans, E.A., Jr. and Slotin, L., J. Biol. Chem.,
136, 301-312 (1940).
- 15.- Ruben, S. and Kamen, M.D., Proc. Natl. Acad. Sci.,
26, 418-422 (1940).
- 16.- Krampitz, L.O. and Werkman, C.H., Arch. of Biochem.,
4, 25-40 (1944).
- 17.- Krebs, H.A. 1960, Comunicación Personal a C. del
Rfo durante el Simposium Internacional Sobre la -
Actividad Enzimática y Regulación Metabólica, Mé-
xico, D. F. (1960).