



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“Efectos del  $Mg^{2+}$  en la homeostasis iónica  
y metabolismo de *Debaryomyces hansenii*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Christian Adrián Cárdenas Monroy

Director de tesis  
Dr. Antonio Peña Díaz

2007





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.

## Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Cárdenas Monroy Christian Adrián 56225633 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 095300676</p>
<p>2. Datos del tutor Dr. Antonio Calvin Peña Díaz</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Luis Felipe Jiménez García</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dra. Luisa Alba Lois</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dr. Salvador Uribe Carvajal</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dr. Heliodoro Celis Sandoval</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito. Efectos del <math>Mg^{2+}</math> en la homeostasis iónica y metabolismo de <i>Debaryomyces hansenii</i>. 50p 2007</p>

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 306 – ote. del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, bajo la asesoría del Dr. Antonio Peña Díaz.

Para la realización del trabajo se contó con el apoyo económico de un investigador

S.N.I. 3 como ayudante de investigador y del proyecto número 46521 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Antonio Peña Díaz por ser mi guía durante este viaje; gracias por todas y cada una de sus enseñanzas en este proceso de mi formación.
- Al Dr. Juan Carlos González Hernández por impulsarme en los inicios de esta mi formación, gracias.
- A todos y cada uno de los miembros de mi jurado por sus comentarios al trabajo escrito.
- A la Dra. Martha Calahorra, a la Q.F.B. Norma Sánchez, al M. en C. Andrés Rojas y a la Biol. Nidia Rodríguez por toda la ayuda técnica que me brindaron en el trabajo experimental, pero en especial por su amistad, gracias.
- A mis compañeros que están y algún día estuvieron compartiendo conmigo el laboratorio 306–ote del ifc; Bertha M, Carlos L., Daniela C., Emmanuel V., Fernando A., Gloria M, Jorge R., Mariana M. y Marissa C. por ayudarme en todo momento a la construcción de este objetivo.
- A mis amigas y amigos de la prepa 5: Adolfo, Anel, Horacio, Jazmín, Laura, Nancy, Oscar y Víctor; y de la facultad de ciencias: Alejandra, Hilda, Isaac, Karina, Leslie, Lizeth, Marcela, Mayren, Miguel, Naxdllely, Pati, Roberto y Viridiana que han compartido conmigo su tiempo y amistad en mi vida académica y en este gran vuelo que emprendimos juntos.
- A mis amigos Sandra y Cesar por estar conmigo en todo momento.
- A mis papás Reme y Andrés por el apoyo que me dieron en todos los aspectos. Muchas Gracias.
- A mi *Alma mater* la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.) a través de la Facultad de Ciencias por permitirme estar entre sus filas.
- A Dios y a la Virgen por permitirme cumplir un objetivo más de mi proyecto de vida.

## DEDICATORIAS

- A mis papás Reme y Andrés; por ustedes vale la pena, ya que le dan un gran sabor a esto y a muchas cosas más en mi vida.
- A mis hermanos Luis y Ricardo, porque al igual que yo, esperaban este momento con muchas ansias.
- A mis tías y tíos, en especial a Lula, Gela y Hector que vivieron todo mi desarrollo junto con mi primo Alejandro y mi abuelita Benita (††).
- A mis sobrinas Itzae e Ixchel y a todos los sobrinos que faltan por llegar.
- A mis padrinos Tere y Jaime (††).
- A todo el Ita-andehui, ya que con cada zapateado que dábamos juntos, logre marcar mi vida por éste camino alterno.
- A mis hijos, que aunque aún no los conozco, quiero que sepan, que éste gran objetivo cumplido es en gran parte por y para ustedes; los espero para caminar juntos sobre este sendero al que le llamamos vida.

A todos ustedes por estar conmigo en las buenas y en las malas.

## ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN.....	05
ABREVIATURAS.....	06
INTRODUCCIÓN.....	07
<i>Debaryomyces hansenii</i> .....	09
Magnesio.....	12
JUSTIFICACIÓN.....	14
OBJETIVOS.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivo particular.....	15
METODOLOGÍA.....	16
Crecimiento celular.....	18
Concentración interna de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Mg <sup>2+</sup> .....	18
Respiración.....	19
Preparación de extractos celulares.....	19
Actividades enzimáticas.....	19
Producción de etanol.....	22
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	37
PRINCIPALES HALLAZGOS.....	42
CONCLUSIONES.....	44
PERSPECTIVAS.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46

# EFFECTOS DEL $Mg^{2+}$ EN LA HOMEOSTASIS IÓNICA Y METABOLISMO DE *Debaryomyces hansenii*.

## RESUMEN

*Debaryomyces hansenii* es una levadura que resiste condiciones extremas de salinidad y alcalinidad; estas condiciones hacen interesante su estudio fisiológico. Aislada de un ambiente marino, mi interés consistió en observar sus capacidades con respecto a su crecimiento, consumo de oxígeno, producción de etanol, acumulación de iones y actividades enzimáticas bajo condiciones semejantes a las marinas, en particular del  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  en el cultivo.

En presencia del  $Mg^{2+}$  junto con el  $Na^+$  o  $K^+$  se observa un crecimiento más acelerado a diferencia de los cultivos que no presentan  $Mg^{2+}$ .

El  $Mg^{2+}$  se mantiene a una concentración relativamente constante en el interior de las células de los distintos cultivos, a diferencia de los otros iones, que mostraron un aumento del ión monovalente predominante ( $Na^+$  ó  $K^+$ ) en el medio.

Se observó una mayor respiración tanto a pH ácido como a pH alcalino (6 y 8) en las levaduras que se cultivaron con  $Na^+$  o  $K^+$ , a si mismo se encontró un aumento en el consumo de oxígeno pero en menor grado en las cultivadas con  $Mg^{2+}$  en conjunto con otro ion. No se observaron diferencias en las células cultivadas con  $Mg^{2+}$  a los dos valores de pH.

Al cultivar las levaduras en los distintos medios se observaron cambios en las actividades de algunas enzimas de la glucólisis, de las cuales las más importantes son la alcohol deshidrogenasa, última reacción de la vía, y la fosfofructocinasa, que desempeña un importante papel regulador en este camino metabólico.



## Abreviaturas

1. ADH= Alcohol deshidrogenasa.
2. ALD= Fructosa-1,6- bifosfato aldolasa.
3. ATP= Adenosin 5'-trifosfato.
4. BICINA= N,N-Bis (2-hidroxietil) glicina.
5. EDTA= Ácido etilendiamina tetraacético.
6. G3PDH= Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.
7. G6PDH= Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
8. HEPES= (ácido N-[2-hidroxietil] piperazina N'-[2-etanosulfónico]).
9. HK= Hexocinasa.
10. ITP= Inosin 5'-trifosfato.
11. MES= (Ácido 2-[N-morfolino] etanosulfónico).
12. MOPS= (ácido 3-[N- morfolina] propanosulfónico).
13. NADH=  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida.
14. NADP=  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
15. PDC= Piruvato descarboxilasa.
16. PFK= Fosfofructocinasa.
17. TEA= Trietanolamina hidroclicida.
18. Tris= Tris(hidroximetil) aminometano.

# INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha el planeta Tierra, es el único sitio en el que se conocen organismos vivos, los cuales al paso del tiempo han evolucionado. Según Margulis (1992), estos organismos están distribuidos en cinco grandes reinos. Todos los organismos vivos tienen características específicas en cuanto a su modo de vida, esto les da la capacidad de poderse encontrar en todos los tipos de hábitat de la Tierra, como las zonas boscosas, selváticas, desérticas y marinas por mencionar algunos. Todos estos seres vivos se han adecuado precisamente a las zonas en que se encuentran; en cuanto a los organismos marinos, deben tener la capacidad de realizar todo su desarrollo en este ecosistema donde existen características particulares, como los cambios de temperatura y la presencia de un sinnúmero de compuestos iónicos como el sodio a una concentración que va de 0.5 M hasta 0.6 M, el magnesio de 55 mM hasta 58 mM, el calcio en 40 mM y el potasio a 10 mM, estos iones en conjunto con otros más, se mantienen al 3.5% en el agua de mar.

*Los principales iones del agua del mar, expresados en porcentaje total. (ii).*

ANIONES		CATIONES	
Cloruro (Cl <sup>-</sup> )	55.29	Sodio (Na <sup>+</sup> )	30.75
Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	7.75	Magnesio (Mg <sup>2+</sup> )	3.70
Bicarbonato (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	0.41	Calcio (Ca <sup>2+</sup> )	1.18
Bromuro (Br <sup>-</sup> )	0.19	Potasio (K <sup>+</sup> )	1.14
Flúor (F <sup>-</sup> )	.0037	Estroncio (Sr <sup>2+</sup> )	0.022

**Molécula no disociada:** Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 0.076.

El océano cubre aproximadamente el 71% de la superficie terrestre y contiene la mayoría de los elementos químicos que ocupa la naturaleza tanto en altas

como en bajas concentraciones; el pH puede variar entre un rango de 7.8 hasta 8.3 y presentar una temperatura desde los 30°C hasta los 5°C y -2°C por abajo de los 100 m de profundidad (Atlas, 1988).

Una de las principales características de los organismos marinos consiste en mantener sus funciones metabólicas adecuadas a estas condiciones de vida. Dentro de estos organismos que habitan en el agua de mar, se pueden encontrar a los llamados halófilos, que presentan concentraciones internas elevadas del ión potasio ( $K^+$ ), y sus enzimas presentan mayor tolerancia a las sales que las de otros organismos no tolerantes. De hecho, en muchos casos requieren de altas concentraciones de sal para poder ejercer sus actividades enzimáticas adecuadamente (Atlas, 1988).

De los organismos que se encuentran en el agua de mar, podemos observar del reino animal a ciertos mamíferos, peces y distintos microorganismos, del reino Fungi existen géneros como *Pichia*, *Saccharomyces*, *Rhodospiridium*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Yarrowia* y *Candida*, entre otros (Norkrans, 1966; Sieburth, 1979; Gadanho *et al.*, 2003; Butinar *et al.*, 2005).

El reino Fungi comprende todas las formas biológicas de los hongos, tanto macroscópicos como microscópicos; entre estos últimos se encuentran las levaduras; éstas son el tipo de hongos que predomina en el océano (Fell, 1968, y Bahnweg y Sparrow, 1971 en Sieburth, 1979); se presentan en mayor densidad poblacional en zonas cercanas a la costa y a una baja profundidad (Gadanho, 2003).

***Debaryomyces hansenii*.**

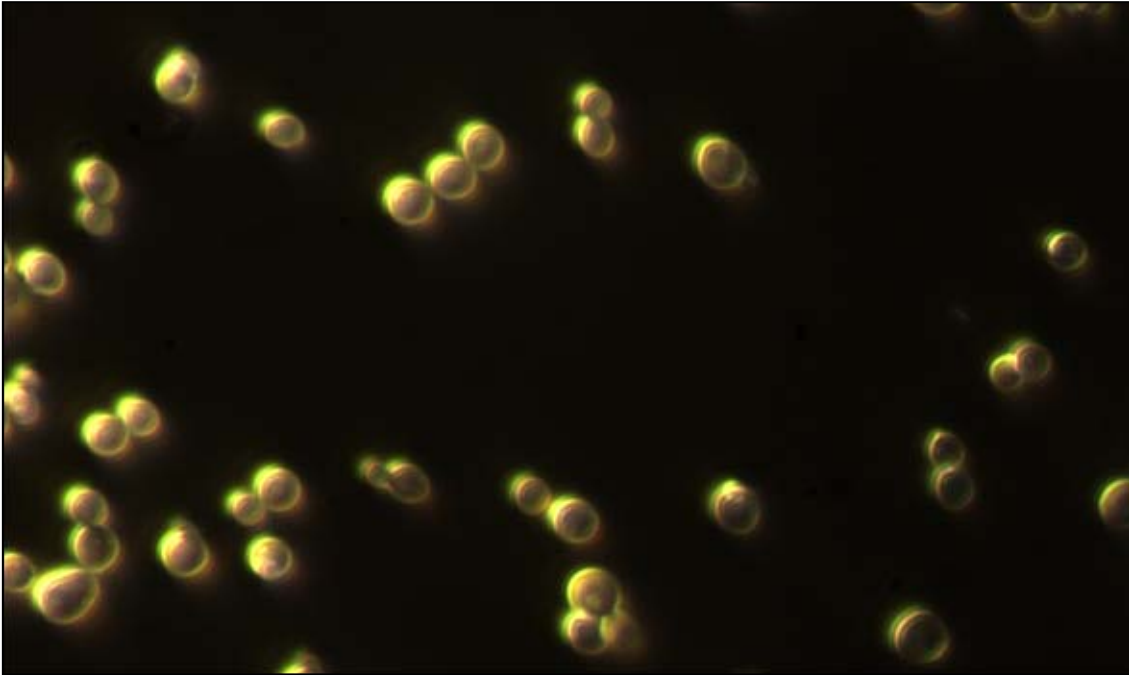


Figura 1. Microfotografía óptica de *Debaryomyces hansenii* (40x)

Las levaduras son organismos unicelulares; pueden presentar tanto reproducción sexual como asexual; su utilización para la fabricación del pan data de hace 5,000 años; posteriormente se les utilizó para la producción de bebidas alcohólicas, sin conocer el proceso por el cual se llevaba a cabo, hasta que Robert Schwann a principios del s. XIX describió el proceso que tiempo más tarde Pasteur reafirmó con los extractos de levadura.

Entre los hongos encontrados en las aguas marinas, *Debaryomyces* es de los géneros que se presentan en mayor proporción, con la especie *Debaryomyces hansenii*, del grupo de los ascomicetos. Las especies de *Debaryomyces* pueden crecer en medios con altas concentraciones de azúcares, como pentosas y hexosas, teniendo un mejor desarrollo con la glucosa (hexosa)

(Nobre *et al.*, 1999), ya que en presencia de esta fuente de carbono en el medio de cultivo, es mayor su capacidad de respirar y fermentar. Estas capacidades aumentan aún más en presencia del ión potasio, el cual activa a algunas enzimas glucolíticas (Neves *et al.*, 1997). Distingue a *D. hansenii* su capacidad para tolerar el NaCl, principal catión del agua del mar. (Thomé–Ortiz *et al.*, 1998). Otros autores sostienen que *D. hansenii* es incapaz de fermentar; es decir, que se trata de una levadura aeróbica estricta (Veiga *et al.*, 2003).

*D. hansenii* se ha aislado de ambientes con altas concentraciones salinas como el agua de mar, pero se sabe que además de ese hábitat, también puede crecer en algunos alimentos salados como la superficie de diversos quesos o embutidos, donde puede satisfacer su consumo de oxígeno (Norkrans, 1966; Kreger-van Rij, 1987; Leclercq-Perlat *et al.*, 1999; Ferreira y Viljoen, 2003; Gadanho *et al.*, 2003; Butinar *et al.*, 2005; Ochoa y Barragán, 2006).

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Clase: Hemiascomycetes

Orden: Saccharomycetales

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

*D. hansenii*, como ya se mencionó, es una levadura que se encuentra presente constitutivamente en aguas marinas como parte de la población microbiana, por lo que ahora se le considera como organismo marino (Ochoa y Barragán, 2006). Además de tener la capacidad de crecer en condiciones características

del océano, como el pH alto, alta concentración de sales y bajas temperaturas. *D. hansenii* se le considera dentro del grupo de los mesofílicos en la clasificación térmica, ya que los límites de temperatura para su supervivencia varían entre los 0°C y los 48°C, a diferencia de los psicofílicos que van de los 0°C a 20°C exclusivamente, y los termofílicos que van de los 20°C a los 50°C (Watson, 1987). Esta levadura presenta la mitad del tamaño en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*, el principal modelo de estudio de las levaduras (González-Hernández *et al.*, 2006).

En la actualidad se mantiene la disyuntiva en la clasificación de *D. hansenii* con respecto a su capacidad de tolerancia salina; algunos autores en vez de considerarla halotolerante, la consideran como halófila en ambientes naturales, donde por la concentración de K<sup>+</sup> suele ser menor que la de Na<sup>+</sup> (Prista *et al.*, 1997; González-Hernández *et al.*, 2004), pero además tiene la capacidad de acumular iones de sodio en su interior. En algunas condiciones, el sodio favorece el crecimiento de *D. hansenii*, y en presencia de otros factores de estrés como temperaturas elevadas y/o pH bajo o alto, le otorga un efecto protector, además, a diferencia de *S. cerevisiae*, el sodio no produce efectos tóxicos en *D. hansenii* (Prista, *et al.*, 1997; Almagro *et al.*, 2000).

De los organismos tolerantes al sodio, se encuentran los sodio-excluyentes que mantienen una concentración interna baja de sodio, y los sodio-incluyentes como las halobacterias que requieren altas concentraciones de sodio para efectuar de forma normal sus actividades enzimáticas (Rengpipat *et al.*, 1988). A su vez, sobre la base de su tolerancia a la sal, los organismos halófilos se pueden clasificar en:

- Halófilos ligeros: 0.2 – 0.85 M (2% – 5%)
- Halófilos moderados: 0.85 – 3.4 M (5% – 20%)
- Halófilos extremos: 3.4 – 5.1 M (20% – 30%)

Los organismos no halófilos y los halotolerantes crecen sólo en condiciones ambientales que no sobrepasen 0.2 M de sal, teniendo como principal diferencia que los halotolerantes pueden o no estar presentes en un medio con presencia de sales (Rengpipat *et al.*, 1988, González-Hernández y Peña, 2002).

## **El magnesio**

El agua del mar contiene una gran variedad de sales a distintas concentraciones, siendo importante el  $Mg^{2+}$ , con una concentración alrededor de 55 mM (Maguire y Cowan, 2002,).

El inglés Joseph Black, reconoció al magnesio (Mg) como un elemento químico en 1755, su número atómico es 12; es el octavo elemento en abundancia; constituye el 2% de la corteza terrestre y es el tercer ión más abundante en el agua del mar. El nombre surge de Magnesia, un distrito de Volos, en el área de Tesalia en el noreste de Grecia (Maguire y Cowan, 2002). Dentro de sus usos antropocéntricos se emplea primordialmente como elemento de aleación para la fabricación de armas y accesorios automovilísticos.

El  $Mg^{2+}$  es el catión divalente más abundante en la célula (Liu *et al.*, 2002), puede llegar hasta 30 mM en bacterias como *Escherichia coli*. Dentro de sus funciones están ayudar a mantener la estructura de los ácidos nucleicos (Romani y Scarpa, 1992), mantener una regulación en la operación de canales y receptores; se necesita en el crecimiento celular y para el control del ciclo celular entre otras cosas; en las plantas está asociado principalmente a la clorofila (Nelson y Cox, 2000; Stryer *et al.*, 2003). Un consumo bajo de magnesio en ratas jóvenes puede producir distintos síntomas, como retardo en el crecimiento e irritabilidad (Grubbs R. D., 2002). El magnesio libre en bacterias es de 0.3 mM, y en las células de mamífero o en eucariontes en general se presenta en un margen de 0.25 – 1 mM (Beeler *et al.*, 1997; Maguire y Cowan, 2002; Grubbs R. D., 2002).

El objetivo de este trabajo consistió en investigar la influencia del  $Mg^{2+}$  en las funciones celulares como el crecimiento, la acumulación de iones, el consumo de oxígeno y metabolismo en *D. hansenii*.



## JUSTIFICACIÓN

Desde la década de los años sesenta se iniciaron diversos estudios sobre el metabolismo de la levadura *D. hansenii*, su respiración y su capacidad fermentativa en concentraciones de sales cercanas a las marinas. Los resultados indicaron que es capaz de mantener una misma actividad fermentativa y respiratoria hasta concentraciones relativamente elevadas de NaCl en el medio, así como que acumula y no excluye al ión sodio de su interior (Norkrans 1968; Neves *et al.*, 1997; Thomé–Ortiz *et al.*, 1998; González-Hernández *et al.*, 2004).

Estos estudios fueron los primeros indicadores de que *D. hansenii* puede servir como modelo para estudiar los mecanismos de la adaptación halofílica, que involucran diversas variables, y nos pueden permitir conocer las relaciones de *D. hansenii* con su ambiente natural.

# OBJETIVOS

## Objetivo general.

- Definir los cambios iónicos en *Debaryomyces hansenii* y sus posibles cambios metabólicos en presencia de las concentraciones de  $MgCl_2$  presentes en el agua del mar.

## Objetivos particulares.

- Definir las características del crecimiento de *D. hansenii* en presencia de los iones monovalentes sodio y potasio y del ión divalente magnesio.
- Cuantificar las concentraciones internas de cada uno de los iones mencionados en el anterior objetivo.
- Medir la capacidad respiratoria de las levaduras cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de  $MgCl_2$ .
- Medir las actividades enzimáticas de la vía glucolítica.
- Cuantificar la capacidad de fermentación en cada una de las distintas condiciones de crecimiento utilizadas.

# METODOLOGÍA

Se utilizó para todos los ensayos la cepa Y7426 de *D. hansenii*, donada por el departamento de agricultura, Peoria, IL. E.U.A.

Las levaduras se mantuvieron en cajas de Petri en un medio sólido YPGal – NaCl 1 M como stock.

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

Del stock anterior se resiembra una asada de levaduras en placas de medio similar al anterior, pero con glucosa como fuente de carbono (YPD).

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

Posteriormente se hicieron precultivos de 24 horas (para obtener cultivos uniformes), colocando una pequeña asada de levadura en 100 ml de distintos medios de cultivo líquido a los que se les agregaron distintas combinaciones de cloruro de magnesio, cloruro de sodio y cloruro de potasio.

El crecimiento de los preinóculos se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer, dentro de un cuarto a temperatura constante de 30°C con una agitación de 250 rpm en un agitador giratorio G10 New Brunswick Scientific.

Las distintas condiciones fueron las siguientes:

<p><u>YPD</u> 1</p> <p>(control)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2% de Glucosa</li> <li>• 1% de Bacto-Peptona</li> <li>• 1% de Extracto de levadura</li> </ul>	<p><u>Mg</u> 2</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• YPD</li> <li>• 54 mM de MgCl<sub>2</sub></li> </ul>
<p><u>NaMg</u> 3</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• YPD</li> <li>• 54 mM de MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 0.6 M de NaCl</li> </ul>	<p><u>KMg</u> 4</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• YPD</li> <li>• 54 mM de MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 0.6 M de KCl</li> </ul>
<p><u>Na</u> 5</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• YPD</li> <li>• 0.6 M NaCl</li> </ul>	<p><u>K</u> 6</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• YPD</li> <li>• 0.6 M KCl</li> </ul>

\* Ésta concentración de potasio se utilizó haciendo referencia a la concentración del otro ión monovalente empleado.

Nota: Todos los medios de cultivo, tanto sólidos como líquidos fueron esterilizados en una autoclave Hirayama por 15 min a 121°C (1.5 kg/cm<sup>2</sup>) de presión.

Posteriormente, el preinóculo de 24 hrs se resembró en 500 ml y se continuó incubando durante 36 horas para cada una de las distintas condiciones.

Las levaduras se cosecharon por centrifugación con dos lavados de agua desionizada, resuspendiéndolas finalmente a 500 mg/ml (50%).

### ***Crecimiento celular.***

Se prepararon precultivos de 100 ml en matraces para cada una de las condiciones; de estos últimos se colocó en otro matraz un inóculo en la cantidad necesaria de células para obtener de una alícuota diluida 1:10 una absorbencia inicial de 0.02 unidades de densidad óptica (D.O) a 600 nm, medida en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Se tomaron luego lecturas cada dos horas, de alícuotas obtenidas frente al mechero para evitar la contaminación. A las 12 horas, del precultivo se colocó nuevamente en otro matraz un inóculo que permaneció toda la noche junto al primer cultivo, al iniciar el día se continuó con las lecturas cada 2 horas hasta completar 36 horas en conjunto.

### ***Concentración interna de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup>.***

En un fotómetro de flama Carl Zeiss PF5 calibrado en su escala de lectura a 0 con agua desionizada y a 100 con 1 mM de NaCl, KCl o 10 mM de MgCl<sub>2</sub> según el ión a cuantificar, se determinó la concentración interna con los sobrenadantes obtenidos al extraer en 5 ml de agua 250 mg de células en un baño maría hirviendo durante 15 min. Las células fueron cosechadas como anteriormente se indicó de cada una de las condiciones utilizadas. La concentración interna de los distintos iones se calculó tomando en cuenta que *D. hansenii* contiene en su interior 40% de agua.

### ***Respiración.***

El consumo de oxígeno se midió en una cámara a temperatura constante (30°C) con un electrodo tipo Clark, utilizando 50 mg de células de cada una de las condiciones utilizadas. Los ensayos se realizaron a pH 6.0 utilizando como amortiguador MES – TEA 10 mM ó bicina – TEA como amortiguador a pH 8.0, agregando glucosa 50 mM o etanol 78 mM por separado como sustrato dando un volumen final de 5 ml.

### ***Preparación de los extractos celulares.***

Las levaduras se cosecharon por el método descrito anteriormente, sólo que se resuspendieron en buffer MOPS 10 mM al 50% a pH 7.0. Se colocaron en la cámara pequeña de un “bead beater” con perlas de vidrio con 0.5 mm de diámetro, utilizando 5 períodos de ruptura de 25 segundos cada uno, dejando 1 minuto entre uno y otro. Se centrifugó el homogenizado en una centrífuga Sorvall a 6000 rpm durante 10 minutos, se cuantificó la proteína por el método de biuret, y cada muestra se dividió en alícuotas de 1 ml para guardarlas a -70°C en un ultracongelador Revco.

### ***Actividades Enzimáticas.***

La actividad de las distintas enzimas, se determinó bajo las condiciones de reacción mencionadas en cada una de ellas.

*Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa:* (modificado de Martínez-Muñoz y Peña, 2005)

- 20 mM Hepes-TEA pH 7.4
- 3 mM Glucosa-6-fosfato.

- 0.13 mM NADP.

*Hexocinasa: (Bergmeyer et al., 1985)*

- 40 mM TEA pH 7.6
- 222 mM Glucosa diluida en el buffer.
- 8 mM MgCl<sub>2</sub>.
- 0.91 mM NADP<sup>+</sup> (sal de Na).
- 0.55 U/ml Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- 0.64 mM ATP (sal de Na).

*Fosfofructocinasa (Sánchez et al., 2006)*

- 56 mM Tris-HCl pH 7.6
- 5 mM MgSO<sub>4</sub>.
- 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>.
- 5.6 mM β-mercaptoetanol.
- 2.47 mM Fructosa-6-fosfato.
- 1.67 mM ITP.
- 0.44 mM NADH.
- Mezcla de enzimas (100 μl) en 1 ml 50 mM Tris-HCl pH 7.6 con 5 mg/ml

BSA:

- 50 U de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (glicerofosfato deshidrogenasa).
- 300 U triosafosfato isomerasa.
- 29.4 U Aldolasa.

*Aldolasa*: (modificado de Sánchez *et al.*, 2006)

- 80 mM Tris pH 8
- 2.35 mM Fructosa-1,6-bifosfato.
- 0.536 mM NADH.
- 11.2 U/ml de glicerofosfato deshidrogenasa.
- 119.4 U/ml de triosa fosfato isomerasa.

*Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa*: (modificado de Bergmeyer *et al.*, 1983 a)

- 82.5 mM TEA pH 7.6
- 1.1 mM ATP.
- 0.9 mM EDTA.
- 1.7 mM MgSO<sub>4</sub>.
- 5 mM Cisteína.
- 0.4 mM NADH.
- 14.8 U/ml de fosfoglicerato cinasa.
- 3.25 mg/ml de ácido 3-fosfoglicérico (sal de Na).

*Piruvato descarboxilasa*: (breve modificación de Bergmeyer H. U., *et al.*, 1983

b)

- 20 mM HEPES-TEA pH 7.5
- 5 mM piruvato.
- 0.33 mM NADH.
- 22.5 U/ml Alcohol deshidrogenasa.



*Alcohol deshidrogenasa: (Sánchez N. S., et al. 2006)*

- 20 mM Hepes-TEA pH 7.5
- 1.67 mM NADH.
- 1.13 mM Acetaldehído.

Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo con 0.5 mg de proteína de cada extracto celular, a 30°C, en celdas de vidrio con 1 cm de separación entre las paredes, en un espectrofotómetro Aminco DW-2a UV/Vis (doble rayo) actualizado por Olis. La actividad enzimática se determinó con base en el coeficiente de extinción del NADH o NADPH a 340nm en luz visible.

### ***Producción de etanol.***

Se incubaron las células durante 15 minutos en un baño a 30°C: 333 mg de células con 20 mM de glucosa, 200 µM de cianuro para inhibir la cadena transportadora de electrones, y 25 µM de octilgalato para inhibir la oxidasa alterna.

La determinación de alcohol se realizó mediante la reacción de la enzima alcohol deshidrogenasa en el espectrofotómetro de doble rayo mencionado anteriormente.

# RESULTADOS

## Crecimiento celular.

En todos los casos, como se puede observar en la figura 2, las levaduras alcanzaron la fase estacionaria, aproximadamente después de 24 horas de cultivo. Se muestran diferencias en la densidad óptica dependiendo de las condiciones de cultivo utilizadas.

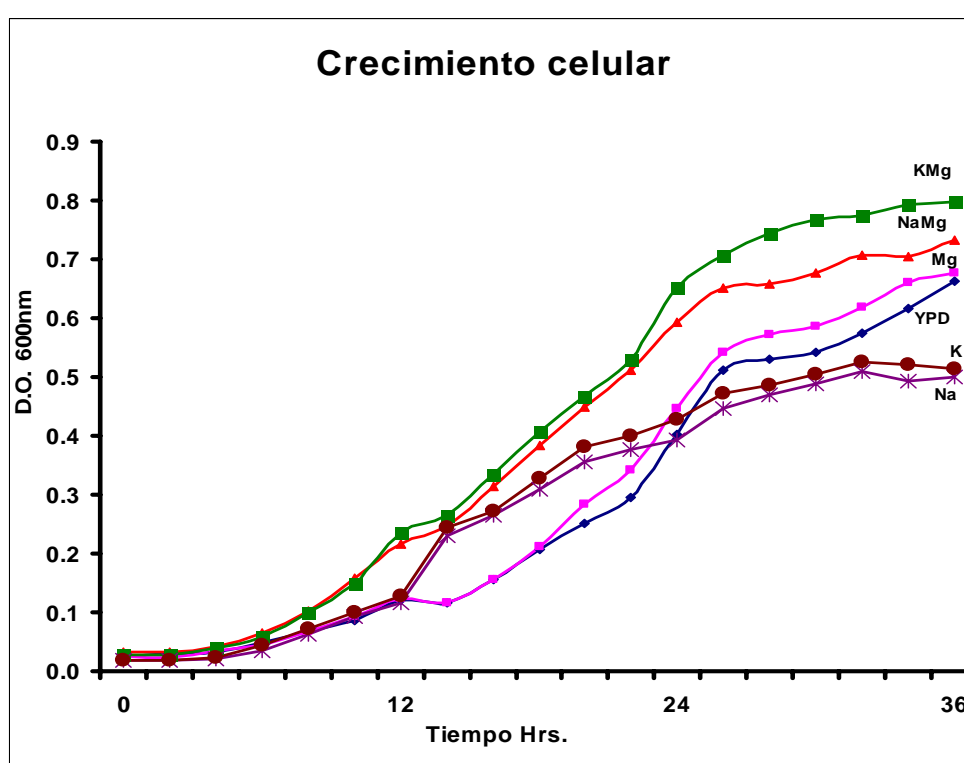


Figura 2. Crecimiento de las células en presencia o ausencia de  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  ó  $K^+$ . La curva se siguió hasta las 36 h, en que alcanzó la fase estacionaria.

De las distintas condiciones de cultivo utilizadas en el trabajo, el mayor crecimiento fue en KMg. Las levaduras en NaMg presentaron un crecimiento acelerado pero menor que las levaduras crecidas en KMg. La densidad óptica disminuyó en ausencia del ión monovalente (potasio o sodio), produciendo un efecto menos acelerado en su crecimiento como se puede observar tanto en

Mg como en YPD. Por último las células cultivadas con potasio y sodio en ausencia del magnesio, fueron las que presentaron un crecimiento más lento, figura 2.

### Acumulación de los distintos iones.

Como se muestra en la Figura 3, la concentración interna del  $Mg^{2+}$  mostró cambios leves en las distintas condiciones de cultivo, en todas ellas, se mantiene una concentración promedio de 24 mM.

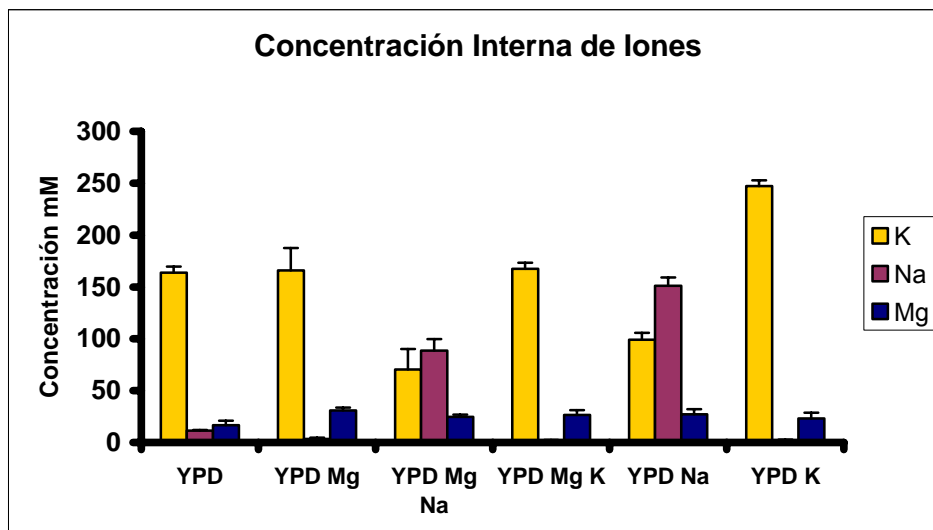


Figura 3. Concentración de los iones acumulados por las células en las distintas condiciones de cultivo. Los valores se obtuvieron de acuerdo con los procedimientos ya descritos en la Metodología.

Las concentraciones de  $Mg^{2+}$  aumentaron ligeramente en las células cultivadas sólo en presencia de este ión. En cuanto a los cationes monovalentes, la diferencia más grande se encontró con respecto a nuestros controles ya que en los cultivos Na y K, se incrementó de manera considerable su concentración al interior de la célula. Éstas concentraciones internas de los iones monovalentes son semejantes a las encontradas anteriormente por González-Hernández *et al.*, (2004). Por lo que se refiere a los efectos del  $Mg^{2+}$ , sin duda lo más notable

fue que en las células crecidas en presencia de este catión y uno u otro de los monovalentes,  $\text{Na}^+$  ó  $\text{K}^+$ , la acumulación de cada uno, para cada caso, fue menor; es decir, las células cultivadas en NaMg contenían menos  $\text{Na}^+$  (88 mM) que las cultivadas en presencia de sólo NaCl (151 mM), y las cultivadas en KMg contenían menos  $\text{K}^+$  (167 mM) que las cultivadas en presencia de sólo KCl (247 mM).

### **Consumo de oxígeno.**

Como ya se mencionó en la metodología, el consumo de oxígeno se midió a dos distintos valores de pH del medio, y para cada una de las distintas condiciones de cultivo, utilizando glucosa y etanol como fuente de carbono (Figuras 4 y 5). La célula no realiza de la misma forma su metabolismo en ausencia de sustratos o en presencia de ellos; por ello se midió la respiración sin sustrato para establecer la comparación en ausencia y presencia de sustratos. Con etanol como fuente de carbono, no ocurre la fermentación alcohólica, y el metabolismo es esencialmente aeróbico. Ambos sustratos aumentaron el consumo de oxígeno, pero en todas las condiciones de crecimiento se observó un consumo de oxígeno ligeramente mayor con etanol como sustrato que con glucosa. En la Fig. 4 se presentan los datos al medir la respiración a pH 6.0 en el medio. Como para la acumulación de iones, nuevamente, y en particular para las células crecidas en NaCl, la velocidad respiratoria fue mayor en las que no tenían Mg (Na), que en las que sí (NaMg). En menor grado, y poco significativo, lo mismo se observó para las crecidas en presencia de KCl, con o sin Mg.

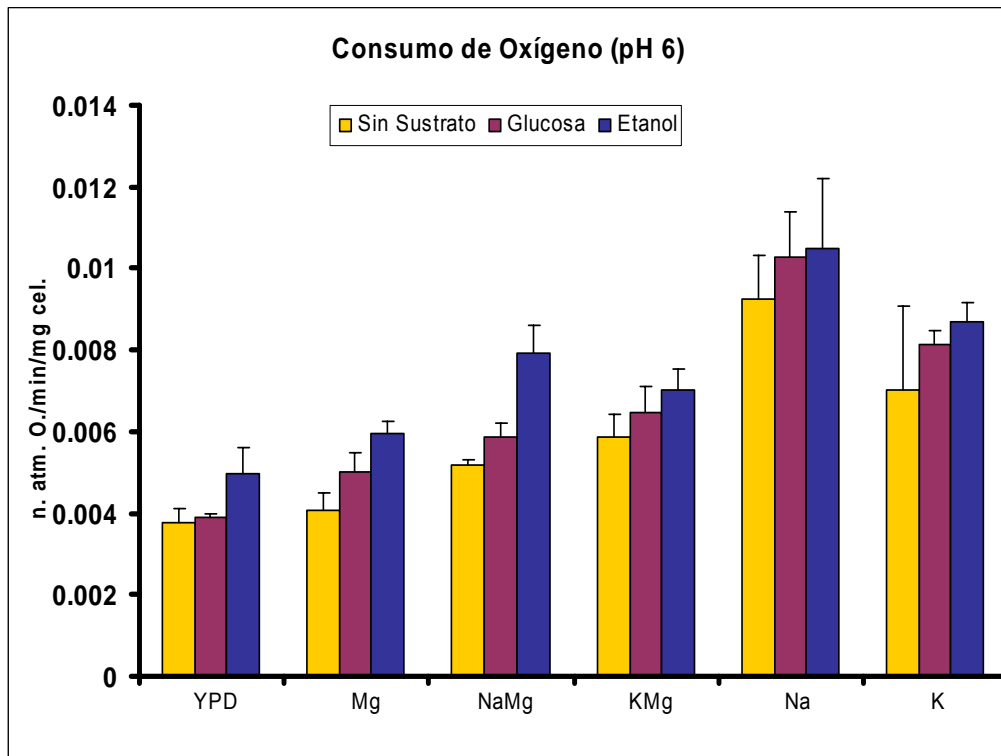


Figura 4. Respiración de las células a pH 6.0. Las células se cultivaron en las distintas condiciones señaladas en la metodología, tomando en cuenta que *Debaryomyces hansenii* mantiene un 40% de agua al interior de la célula.

Al medir la respiración en un medio a pH 8.0 (Figura 5), los resultados generales fueron semejantes, excepto que, al comparar las células cultivadas en NaCl (Na) con las cultivadas en conjunto con  $MgCl_2$  (NaMg), la diferencia observada a pH de 6.0 disminuyó, pero persistió la misma tendencia en las crecidas en KCl (K), en comparación con las crecidas en KCl más  $MgCl_2$  (KMg), en el sentido de una ligeramente y no significativamente menor respiración en las células crecidas en presencia del ión magnesio.

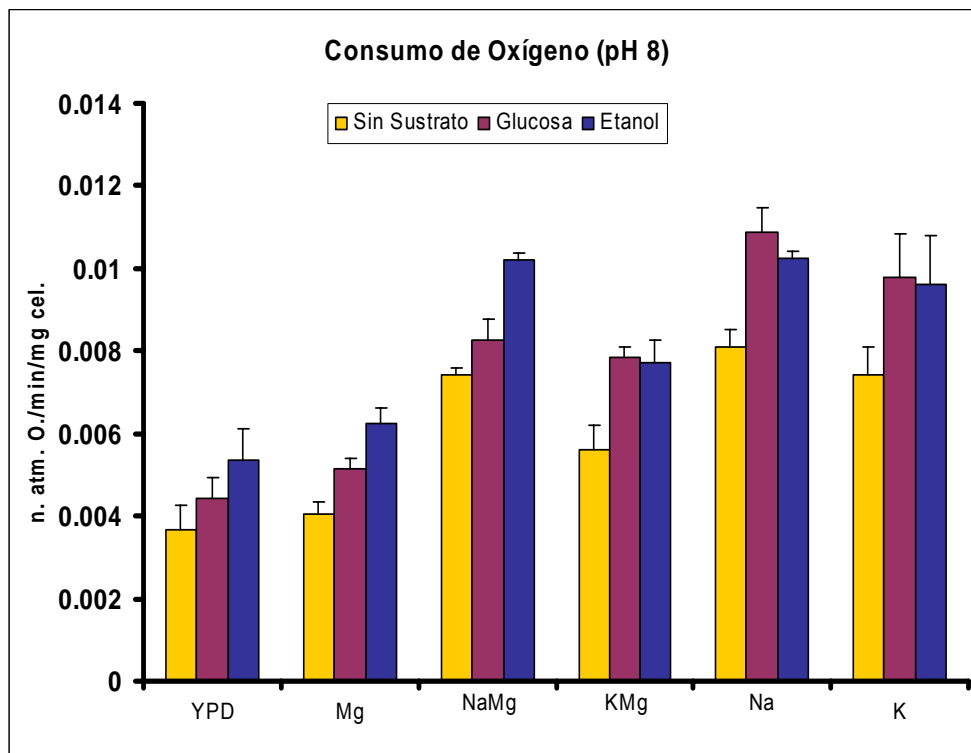


Figura 5. Respiración de las levaduras crecidas en las distintas condiciones, sin, o con glucosa o etanol como sustratos.

### **Actividades enzimáticas.**

Se midieron las actividades enzimáticas como una aproximación al conocimiento de las capacidades intrínsecas de las células cultivadas en las distintas condiciones para llevar a cabo sus funciones metabólicas. Habiendo encontrado cambios importantes en la actividad respiratoria, se decidió estudiar principalmente algunas de las enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa, principal sustrato de las células, y en particular la fermentación.

### **Análisis estadístico de las actividades enzimáticas y la producción de etanol.**

Se realizó un análisis de varianza con ayuda del programa Winks, el cual, nos mostró un comportamiento normal en todas las actividades enzimáticas ( $p < 0.001$ ) con excepción de la producción de etanol ( $p = 0.0527$ ). Posterior al análisis se llevó a cabo la prueba de Newman-Keuls para determinar la diferencia entre grupos con respecto a YPD, Mg, NaMg, KMg, Na y K vs YPD y Mg con una confianza al 95%.

En todos los casos, la simbología es la siguiente:

(\*) = Hay diferencia significativa

(-) = No hay diferencia significativa

## Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Figura 6) mostró un leve aumento en las células cultivadas en presencia de  $MgCl_2$ , pero también al crecerlas en presencia de  $NaCl$  ó  $KCl$ . Sin embargo, las diferencias no son significativas a excepción de las crecidas en  $KCl$ .

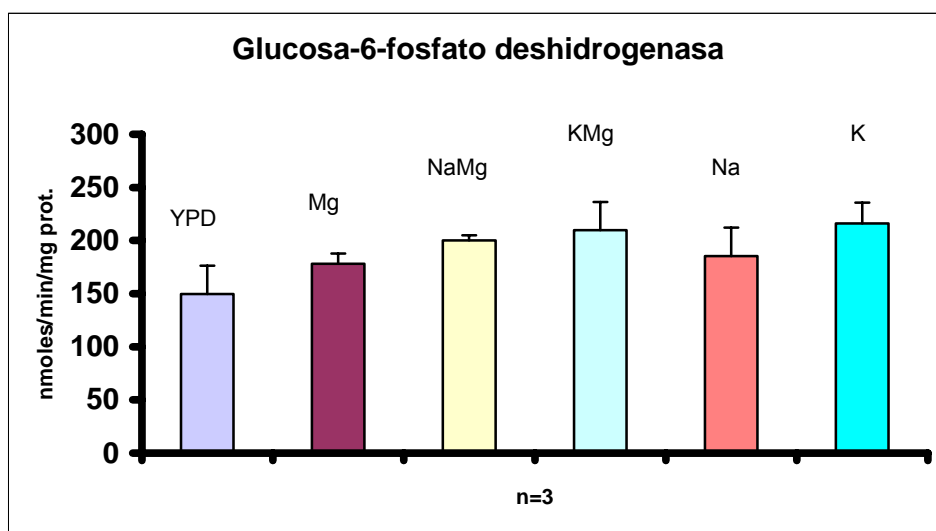


Figura 6. Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en extractos de las células crecidas en las distintas condiciones. La preparación de los extractos celulares y el procedimiento de medida se presentan en Metodologías.

Análisis estadístico, G6FDH.

	YPD	Mg	NaMg	KMg	Na	K
YPD		*	*	*	*	*
Mg	*		-	-	-	*



## Hexocinasa

También la actividad de la hexocinasa (Figura 7) se encontró aumentada ligeramente en todas las células crecidas en presencia de cualquiera de los iones o sus distintas combinaciones. Se observan diferencias significativas entre las distintas condiciones con respecto al control. El mayor aumento llegó hasta los 860 nmoles/min/mg de proteína en K contra 528 nmoles/min/mg de proteína en las células crecidas en YPD.

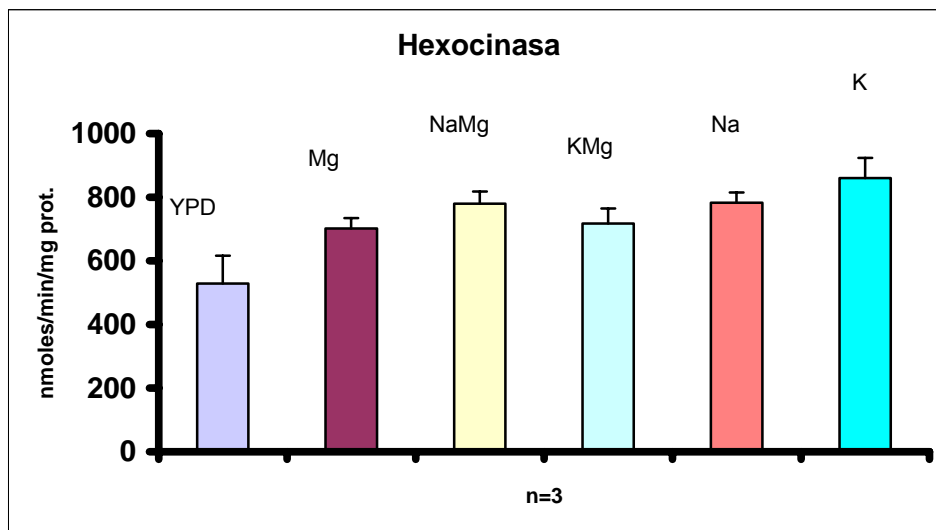


Figura 7. Actividad de la hexocinasa en extractos de las levaduras crecidas en medio YPD, con o sin la adición de  $MgCl_2$ , en ausencia o presencia de NaCl ó KCl.

Análisis estadístico, HK.

	YPD	Mg	NaMg	KMg	Na	K
YPD		*	*	*	*	*
Mg	*		-	-	-	*

## Fosfofructocinasa

La actividad de esta enzima (Figura 8) en las células crecidas en YPD se encontró baja, tal y como lo reportaron Sánchez *et al.* (2006), pero es interesante señalar que es todavía menor en las células crecidas en YPD sólo con la adición de  $MgCl_2$ . Es también interesante que sin embargo, esta disminución parece contrarrestada por la adición de KCl ó NaCl, ya sea en presencia o en ausencia de  $Mg^{2+}$  en el medio de cultivo.

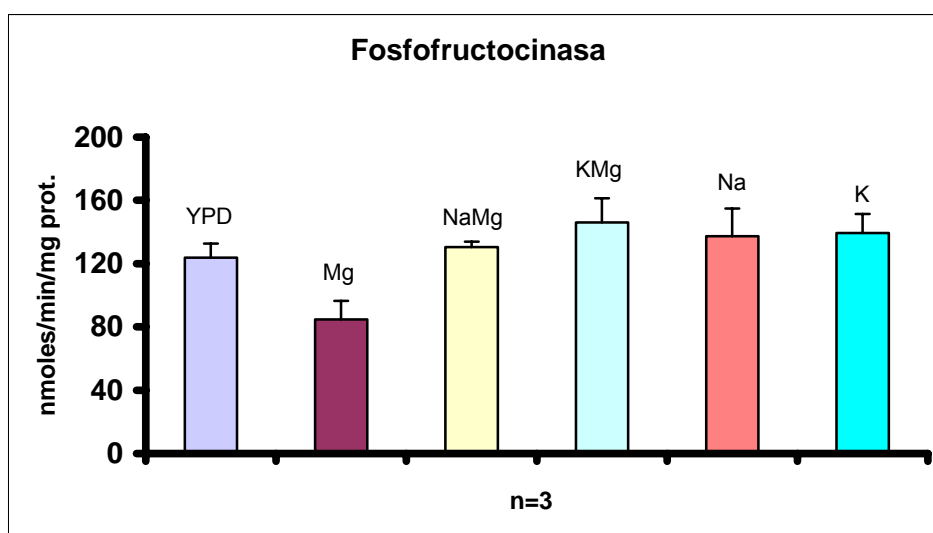


Figura 8. Actividad de la fosfofructocinasa en extractos de las levaduras crecidas en medio YPD, con o sin la adición de  $MgCl_2$ , en ausencia o presencia de NaCl ó KCl.

Análisis estadístico, PFK.

	YPD	Mg	NaMg	KMg	Na	K
YPD		*	-	*	-	-
Mg	*		*	*	*	*

## Aldolasa

La actividad de la aldolasa (Figura 9) en las células crecidas en presencia de NaCl se encontró aumentada con respecto al resto de las condiciones de cultivo, que mostraron valores cercanos al control (304 nmoles/min/mg de proteína).

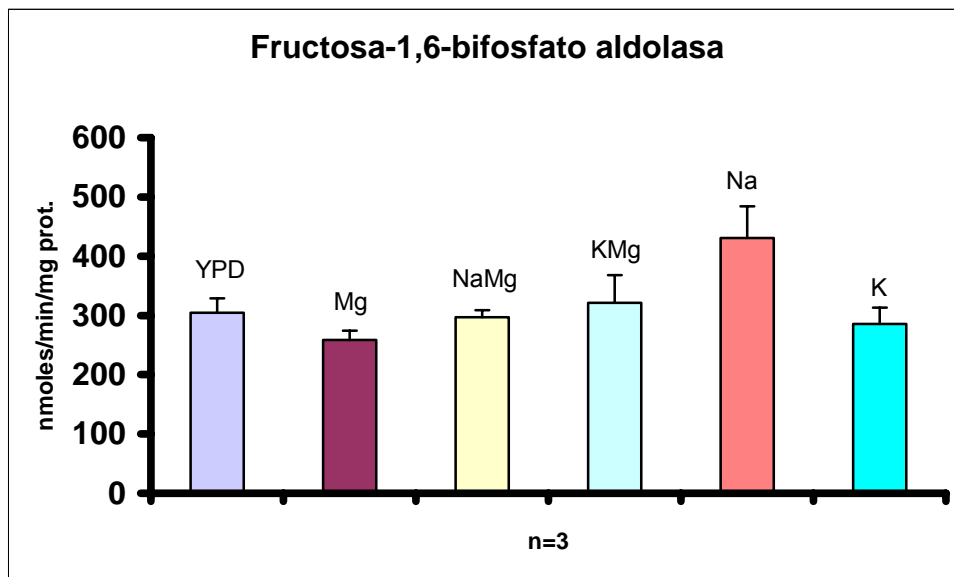


Figura 9. Actividad de la aldolasa en extractos de las levaduras crecidas en medio YPD, con o sin la adición de  $MgCl_2$ , en ausencia o presencia de NaCl ó KCl.

Análisis estadístico, ALD.

	YPD	Mg	NaMg	KMg	Na	K
YPD		-	-	-	*	-
Mg	-		-	*	*	-

### Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

Esta enzima (Figura 10) presentó la mayor actividad enzimática con respecto al resto de las enzimas. Se observa un muy ligero aumento en todas las condiciones de cultivo utilizadas, con respecto al control en YPD.

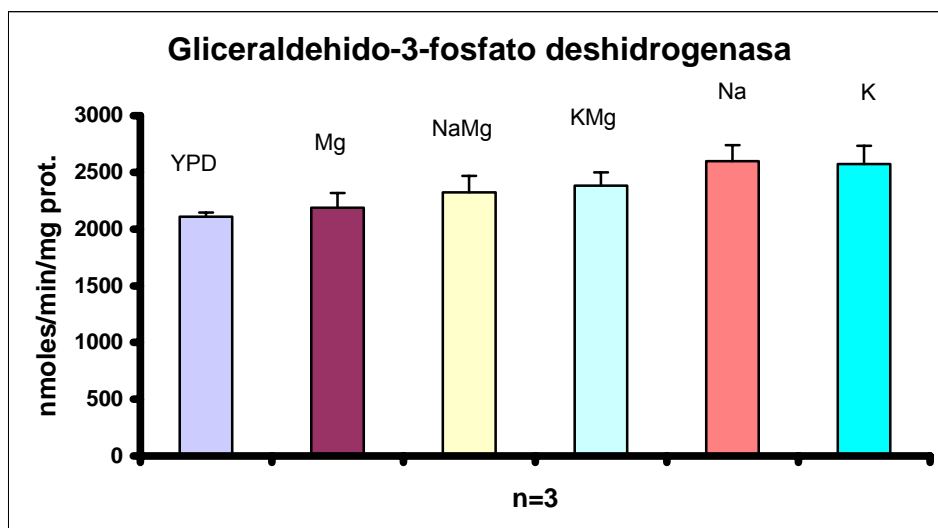


Figura 10. Actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en extractos de las levaduras crecidas en medio YPD, con o sin la adición de  $MgCl_2$ , en ausencia o presencia de NaCl ó KCl.

Análisis estadístico, G3PDH.

	YPD	Mg	NaMg	KMg	Na	K
YPD		-	*	*	*	*
Mg	-		-	*	*	*

### Piruvato descarboxilasa

Es interesante que esta enzima mostró un aumento significativo en su actividad, tanto en las células crecidas en presencia de ambos tipos de iones, como en la presencia de cationes monovalentes por separado. Sin embargo, la adición de  $MgCl_2$ , en las células crecidas en YPD y en presencia de KCl,

produjo una disminución de la actividad, a diferencia de las crecidas en presencia de NaCl.

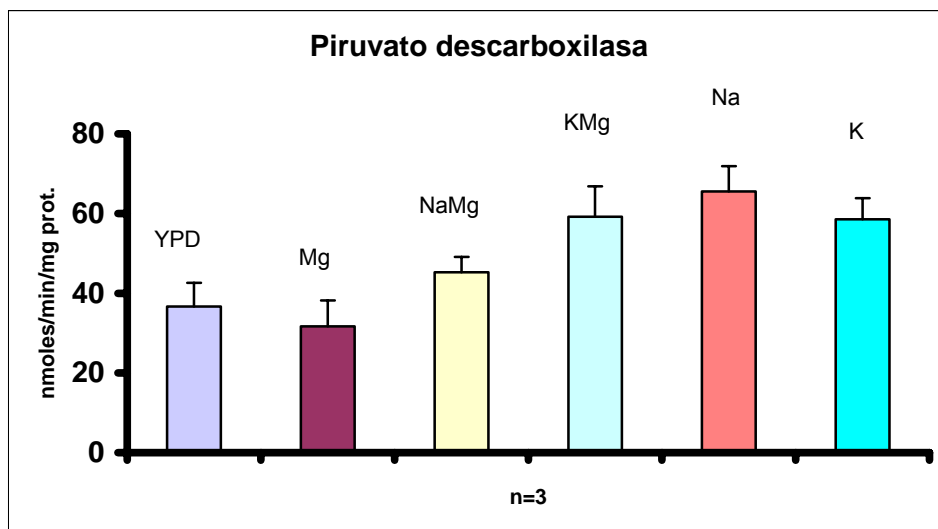


Figura 11. Actividad de la piruvato descarboxilasa en los extractos de las levaduras crecidas en medio YPD, con o sin la adición de  $MgCl_2$ , en ausencia o presencia de NaCl ó KCl.

Análisis estadístico, PDC.

	YPD	Mg	NaMg	KMg	Na	K
YPD		-	*	*	*	*
Mg	-		*	*	*	*

### Alcohol deshidrogenasa

En la figura 12 se muestra la actividad de esta enzima, que es probablemente la que mostró los cambios más importantes en su actividad al crecer las células en presencia de las distintas sales. De una manera semejante, pero más marcada que con la piruvato descarboxilasa, el crecimiento en presencia de  $MgCl_2$  produjo una disminución significativa de la actividad. Por otra parte, tanto los cultivos con NaCl, como KCl, produjeron un aumento de la actividad a más

del doble, pero que también se redujo de manera muy clara cuando en el medio de cultivo había también  $MgCl_2$ , a niveles inclusive inferiores a los observados en las células crecidas en YPD sin la adición de ninguna de las sales.

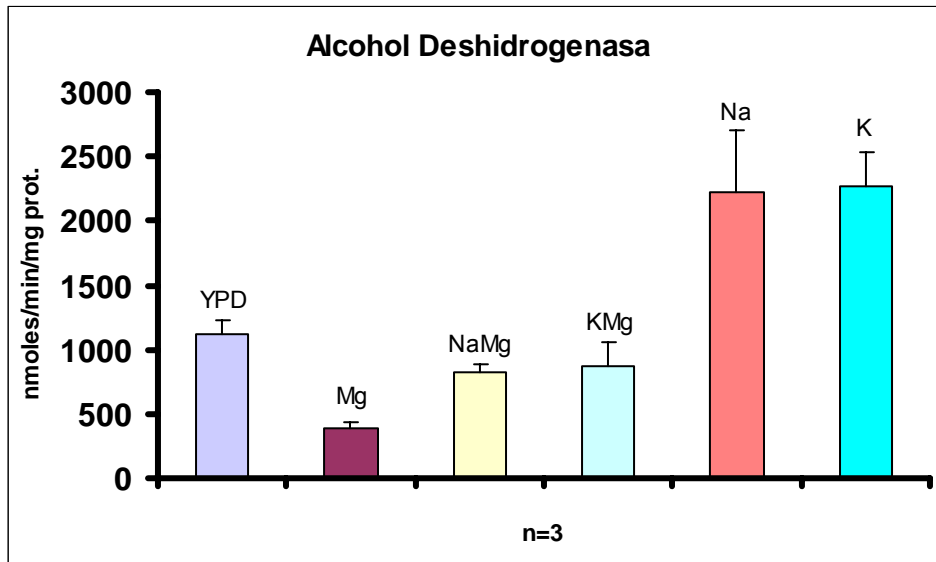


Figura 12. Actividad de alcohol deshidrogenasa en extractos de las levaduras crecidas en medio YPD, con o sin la adición de  $MgCl_2$ , en ausencia o presencia de  $NaCl$  ó  $KCl$ .

Análisis estadístico, ADH.

	YPD	Mg	NaMg	KMg	Na	K
YPD		*	-	-	*	*
Mg	*		*	*	*	*

### Producción de etanol.

La producción de alcohol (Figura 13) mostró un aumento pequeño, pero no significativo en las células crecidas en presencia de las distintas sales. Esto

representa una discrepancia con respecto a las actividades de las últimas dos enzimas estudiadas, en especial con la alcohol deshidrogenasa.

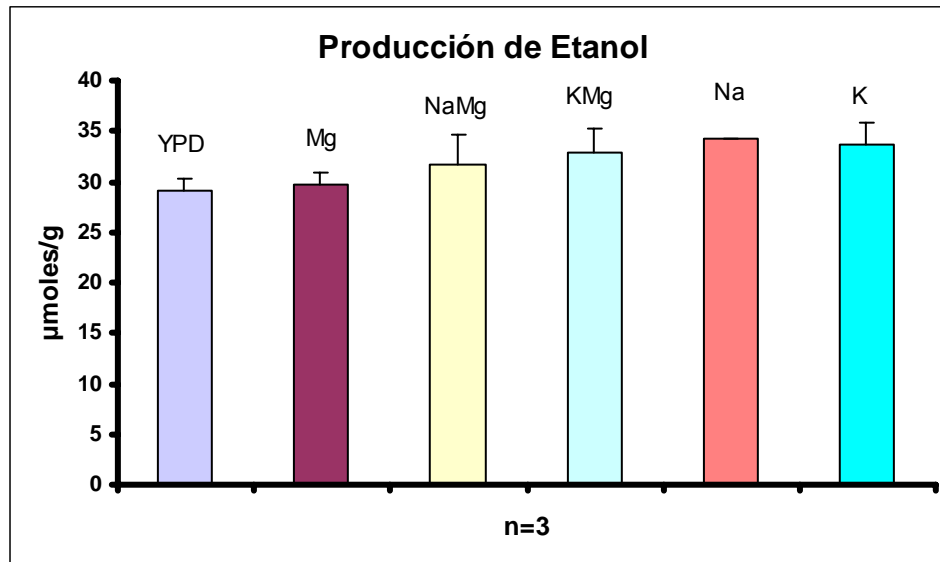


Figura 13. Producción de alcohol por las levaduras crecidas en medio YPD, con o sin la adición de  $MgCl_2$ , en ausencia o presencia de  $NaCl$  ó  $KCl$ .

Análisis estadístico, producción de etanol.

	YPD	Mg	NaMg	KMg	Na	K
YPD		-	-	-	-	-
Mg	-		-	-	-	-

# DISCUSIÓN

## **Efectos del magnesio sobre *Debaryomyces hansenii*.**

Como ya se mencionó previamente, *Debaryomyces hansenii* es una levadura que prevalece en ambientes salinos donde hay una gran cantidad de cationes entre los que sobresalen el sodio en primer lugar y el magnesio en segundo. El magnesio, uno de los iones más abundantes del agua de mar, es un catión necesario en los organismos vivos y en general para la vida. Es el catión divalente más abundante de los tejidos celulares y tipos de células, por ejemplo en bacterias como *E. coli* se llega a almacenar hasta 30 mM (Romani y Scarpa, 1992; Maguire y Cowan, 2002). Este ión participa en un sinnúmero de reacciones biológicas, entre las que destaca mantener la estructura de los ácidos nucleicos; en el citosol se encuentra unido a los nucleósidos fosforilados, como el ATP y el ADP entre otros. Los grupos fosfato, tanto del ATP como del ADP y los intermediarios glucolíticos, forman complejos con el  $Mg^{2+}$ , p. ej., el complejo ATP- $Mg^{2+}$  es la forma que funciona como sustrato, al servir como donador del grupo fosforilo en la mayoría de las reacciones que necesitan ATP, como es el caso de varias enzimas glucolíticas (Nelson y Cox, 2000; Stryer *et al.*, 2003).

Aunque los medios normales de crecimiento, como el YPD, contienen una cantidad significativa de  $Mg^{2+}$  ( $\approx 4$  mM), y dadas las concentraciones elevadas de este catión en el agua del mar, se decidió estudiar los efectos de la presencia adicional de  $MgCl_2$  en el medio a las concentraciones en que se le encuentra en el agua del mar (55 mM), combinado su presencia con la de los



dos principales cationes monovalentes en el agua de mar ( $\text{Na}^+$ ) y en la célula ( $\text{K}^+$ ).

Los resultados mostraron primero, que la adición de sólo  $\text{MgCl}_2$  al medio de cultivo (YPD) no modificó la capacidad de crecimiento de *D. hansenii*. En concordancia con los resultados de Thomé *et al.* (1998), se encontró que la presencia , tanto de  $\text{NaCl}$  como de  $\text{KCl}$  1 M en el medio, disminuyen el crecimiento de las células, sin embargo, al agregar al medio de cultivo  $\text{MgCl}_2$  a las concentraciones de éste en el agua de mar (tomando en cuenta que la concentración del  $\text{MgCl}_2$  es de 58 mM), pero en presencia de cualquiera de los dos cationes monovalentes a la misma concentración, observamos que este catión produjo un mayor crecimiento al observado en presencia de sólo los cationes monovalentes. Por otra parte, nuestros resultados difieren de los publicados por otros autores, en los cuales se menciona que en presencia de sales a 0.6 M de  $\text{NaCl}$  ó  $\text{KCl}$ , *D. hansenii* crece mejor que en su ausencia. Es importante, sin embargo, señalar que los efectos de estas sales dependen de la temperatura de incubación durante el cultivo (Prista *et al.*, 1997). Es también una posibilidad, no explorada en nuestro trabajo, pero que se apoya en los resultados de la acumulación de los cationes monovalentes, que el  $\text{Mg}^{2+}$  sea un inhibidor del transporte y de la acumulación de ambos cationes monovalentes,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

En efecto, los datos obtenidos para la acumulación de los iones de sodio y potasio, son similares con los reportados por González-Hernández *et al.*, (2004) para las condiciones en que se utilizó YPD, Na y K; pero en las otras

condiciones (sodio y potasio con magnesio), se observa una disminución en la concentración del  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , lo cual puede indicar, o bien una inhibición de su transporte hacia la célula, o bien un desplazamiento por el  $\text{Mg}^{2+}$  en su acumulación, aunque no necesariamente haya ocurrido un aumento en la concentración del catión divalente en el interior de la célula. Es posible que la concentración interna de  $\text{Mg}^{2+}$  en las células sea un parámetro finamente regulado (Beeler *et al.*, 1997) y que no sea posible aumentar su concentración cultivándolas en concentraciones elevadas del catión, pero que sí, su sola presencia inhiba el transporte y la acumulación, tanto del  $\text{Na}^+$ , como del  $\text{K}^+$ . Esta idea se refuerza también con los resultados de los diferentes estudios metabólicos, e inclusive en la mayor parte de las actividades enzimáticas, cuyas modificaciones en general fueron mayores ante la presencia en el cultivo de los cationes monovalentes, que cuando estaban presentes simultáneamente al  $\text{Mg}^{2+}$ .

De acuerdo con la idea anterior, el consumo de oxígeno aumentó en las células crecidas en presencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a diferencia de las crecidas en YPD solo, y también se observó una leve diferencia a favor de las cultivadas en presencia del ión sodio con respecto al potasio, como lo reportaron Thomé-Ortíz *et al.* (1998), indicando de nuevo que *D. hansenii*, no sólo tolera las concentraciones de sal presentes en el agua del mar, sino que parece necesitarlas para llevar a cabo algunas de sus funciones metabólicas. Este hecho refuerza la clasificación de *D. hansenii* como un organismo halófilo.

El estudio de las enzimas glucolíticas produjo resultados heterogéneos para las distintas condiciones de cultivo a las que se sometieron las células. Los resultados pueden resumirse como se muestra en la tabla 1.

	Mg	NaMg	KMg	Na	K
G6PDH	+	+	+	+	+
HK	+	+	+	+	+
PFK	-	+	+	+	+
ALD	-	o	o	++	o
G3PDH	o	o	o	o	o
PDC	-	o	++	++	++
ADH	-	o	o	+++	+++

Tabla 1. G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; HK, hexocinasa; PFK, fosfofructocinasa; Ald, aldolasa; G3PDH, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; PDC, piruvato descarboxilasa; ADH, Alcohol deshidrogenasa. Sin cambio, (o); disminución, (-); aumento ligero, moderado, alto, (+), (++), (+++), respectivamente, con respecto al cultivo de YPD.

Esto señala algo que por otra parte suena lógico; no es posible esperar que todas las enzimas, requieran o no  $Mg^{2+}$  para su funcionamiento y se modifiquen por la presencia o ausencia del ión en el medio de cultivo. En algunos casos las actividades de las enzimas aumentaron al cultivar las células en presencia de cualquiera de los iones (G6PDH, HK, PFK, PDC y ADH) como lo reportaron Neves *et al.* (1997), en otras se presentan de una forma semejante a la variable que no lo presenta como el caso de la PFK, ALD y G3PDH.

Curiosamente, para la principal enzima reguladora de la glucólisis en *D. hansenii*, la fosfofructocinasa (Sánchez *et al.*, 2006) se encontró disminuida su actividad en presencia del ión magnesio en el medio de cultivo, y con mayor actividad en las demás condiciones. También la ADH mostró una disminución marcada en las células crecidas en presencia de  $MgCl_2$ , un aumento muy importante en las crecidas en presencia de NaCl ó KCl, y un regreso a los

niveles observados en YPD. Sin duda éste fue el cambio más notable observado en las actividades enzimáticas; la base de datos Genolevures indica que en el genoma de *D. hansenii* hay cinco genes diferentes para esta enzima, y nuestros análisis no permiten distinguir entre ellas (i). No deja de llamar la atención este cambio, en especial siendo la ADH la enzima final de la fermentación.

Finalmente, la producción de etanol, si acaso, presentó un aumento muy ligero y sin significación estadística en todos los casos en que había NaCl ó KCl en el medio de cultivo. Esta tendencia podría sin embargo implicar un ligero aumento en la velocidad de la fermentación, debida al requerimiento energético del transporte de los iones al interior de la célula. De hecho, lo mismo podría sugerirse para explicar también el aumento en el consumo de oxígeno en las células crecidas en presencia de Na<sup>+</sup> ó K<sup>+</sup>; que al menos una parte del aumento en el consumo de oxígeno se deba al requerimiento de las células para manejar sus concentraciones de cualquiera de los dos cationes. Desde luego que, siendo esta levadura más aeróbica, se antoja más probable que se observe un aumento en la respiración que en la fermentación.

## PRINCIPALES HALLAZGOS

- El crecimiento de *Debaryomyces hansenii* se favorece en las condiciones en que se agregó  $\text{MgCl}_2$  54 mM al medio de cultivo.
- La concentración interna del  $\text{Mg}^{2+}$  no aumenta al agregar el catión al medio; posiblemente porque su acumulación está regulada de manera muy fina.
- Sin embargo, la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  en el medio redujo la acumulación de  $\text{Na}^+$  ó  $\text{K}^+$  por parte de las células. Es posible que su presencia impida la entrada de los cationes monovalentes.
- El consumo de oxígeno aumentó al cultivar las células en presencia de ambos iones monovalentes por separado, pero también disminuyó ante la presencia simultánea de  $\text{Mg}^{2+}$  en el medio, probablemente por la misma capacidad para impedir la entrada de los cationes monovalentes.
- No se muestra ningún patrón de actividad entre las distintas enzimas ya que éstas son muy heterogéneas entre ellas.
- De todas las enzimas glucolíticas, la fosfofructocinasa fue la que presentó una menor actividad, aún en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  siendo éste uno de sus principales cofactores. Esto refuerza su papel como principal reguladora de la fermentación en *D. hansenii*.

- La adición de sales al medio de cultivo produjo una ligera tendencia a aumentar la fermentación alcohólica.
- *Debaryomyces hansenii* en presencia del  $Mg^{2+}$  puede llegar a ser un organismo facultativo ya que al adicionarle  $Na^+$  ó  $K^+$  respira de una manera más eficiente y de igual forma en presencia de éstas puede llegar a producir una fermentación alcohólica de la misma forma que en su ausencia, lo que la hace ser un organismo halófilo.

## CONCLUSIONES

- El  $Mg^{2+}$  inhibe la entrada de iones monovalentes.
- Se desconoce la causa por la cual, el consumo de  $O_2$  se favorece en presencia de iones monovalentes por separado, sin verse reflejada una disminución en la tasa de fermentación alcohólica.

## PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de transporte de iones monovalentes en presencia de  $Mg^{2+}$  para determinar las posibles causas de inhibición con respecto a su entrada a la célula.
- Cuantificar la producción de acetaldehído y determinar la cantidad producida de este intermediario con respecto a la producción de etanol.
- Investigar la causa por la que se mantiene activa la producción de etanol y la respiración en estas condiciones de cultivo.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Almagro A., Prista C., Castro S., Quintas C., Madeira–Lopes A., Ramos J. y Loureiro–Dias M. C. (2000). Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Intl. J. Food Microbiol.* 56. 191-197.
2. Atlas R. M. (1988). *Microbiology, fundamentals and applications*. Second ed. Macmillan Publishing Co. New York, U.S.A. 807 pp.
3. Bahnweg G. y Sparrow F. K. 1971. Marine fungi: Occurrence in the southern Indian Ocean. En: Sieburth J. M. (1979). *Sea Microbes*. Oxford University Press. New York, U.S.A. 491 pp.
4. Beeler T., Bruce K. y Dunn T. 1997. Regulation of cellular  $Mg^{2+}$  by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1323. 310-318.
5. Bergmeyer H. U., Grassl M. y Walter H. E. (1983)a. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. En *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn. Vol II. Bergmeyer H. U., Bergmeyer J., Grassl M., (eds). VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim; 211-13.
6. Bergmeyer H. U., Grassl M. y Walter H. E. (1983)b. Pyruvate decarboxylase. En *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn. Vol II. Bergmeyer H. U., Bergmeyer J., Grassl M., (eds). VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim; 302-3.

7. Bergmeyer H. U., Grassl M. y Walter H. E. (1985). Hexokinase. En *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn. Vol II. Bergmeyer H. U., Bergmeyer J., Grassl M., (eds). VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim; 222-23.
8. Butinar L., Santos S., Spencer-Martins I., Oren A. y Gunde-Cimerman N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol. Lett.* 244: 229-234.
9. Fell J. W. (1968). Distribution of Antarctic marine fungi. En: Sieburth J. M. 1979. *Sea Microbes*. Oxford University Press. New York, U.S.A. 491 pp.
10. Ferreira A. D. y Viljoen B. C. (2003). Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Intl. J. Food Microbiol.* 86. 131-140.
11. Gadanho M., Almeida JMGCF. y Sampaio J. P. (2003). Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. *Antonie van Leeuwenhoek.* 84: 217-227.
12. González-Hernández J. C. y Peña A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Rev. Latamer. Microbiol.* 44 (3-4). 137-156.
13. González-Hernández J. C., Peña A., Sánchez N. S. y Calahorra M. 2006. Fisiología y metabolismo celular de *Debaryomyces hansenii*. *Ciencia Nicolaíta.* 44. 63-74.
14. González-Hernández J.C. Cárdenas-Monroy C.A. Peña A. (2004) Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast.* 21: 403-412.
15. Grubbs R. D. 2002. Intracellular magnesium and magnesium buffering. *Biometals.* 15. 251 – 259.

16. Kreger-van Rij N. J. W. (1987). Clasification of yeasts. En: Rose A. H. y Harrison J. S. (1987). *The Yeasts*, Vol. 1 Biology of yeasts. Second edition. Academic Press. London. 5 – 61pp.
17. Leclercq-Perlat M.N. Oumer A. Bergere J.L. Spinnler H.E. Corrieu G. (1999) Growth of *Debaryomyces hansenii* on bacterial surface-ripened soft cheese. *J. Dairy Res.* 66: 271-281.
18. Liu J. G., D. K. Martin, R. C. Gardner, P. R. Ryan. (2002) Large  $Mg^{+2}$ -dependent currents are associated with the increased expresión of ALR1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 213: 231-237.
19. Maguire M. E. y Cowan J. A. (2002). Magnesium chemistry and biochemistry. *Biometals.* 15: 203-210.
20. Maguire M. E. y Cowan J. A. (2002). Preface-Introduction *Magnesium in the New Millenium*. *Biometals.* 15: 201.
21. Margulis L. (1992) Biodiversity: Molecular Biological Domains, Symbiosis and Kingdom Origins. *Bio Systems.* 27: 39-51.
22. Martínez-Muñoz G. A. y Peña A. (2005). *In situ* study of  $K^{+}$  transport into the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 22: 689-704.
23. Nelson D. L. y Cox M. M. (2000). Lehninger, Principles of Biochemistry. Third edition. Worth Publishers. New York, NY. U.S.A. 1152 pp.
24. Neves M. L., Olivera R. P. y Lucas C. M. (1997). Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiol.* 143. 1133-1139.

25. Nobre A., Lucas C., y Leão C. (1999). Transport and utilization of hexoses and pentoses in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environ. Microbiol.* 65, 3594-3598.
26. Norkrans B. (1966) Studies on Marine Occurring Yeast: Growth Related to pH, NaCl Concentration and Temperature. *Arch. Mikrobiol.* 54: 374-392.
27. Norkrans B. (1968) Studies on Marine Occurring Yeast: Respiration, Fermentation and Salt Tolerance. *Arch. Mikrobiol.* 62: 358-372.
28. Ochoa J. L. y Barragán H. L., (2006). Usos potenciales de las levaduras marinas de México. *Revista Ciencia.* 57 (3).
29. Prista C. Almagro A. Loureiro-Dias M.C. Ramos J. (1997) Physiological Basis for the High Salt Tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 6: 4005-4009.
30. Rengpipat S., Lowe S. E. y Zeikus J. G., (1988). Effect of extreme salt concentrations on the physiology and biochemistry of *Halobacteroides acetoehtylicus*. *J. Bacteriol.* 170 (7). 3065-3071.
31. Romani A., A. Scarpa. (1992) Regulation of Cell Magnesium. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 1-12.
32. 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.
33. Sieburth J. M. (1979). *Sea Microbes*. Oxford University Press. New York, U.S.A. 491 pp.
34. Stryer L., Berg J. M. y Tymoczko J. L. (2003). *Bioquímica*. Quinta edición. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España. 974 pp.

35. Thomé-Ortiz P.E. Peña A. Ramírez J. (1998) Monovalent Cation Fluxes and Physiological Changes of *Debaryomyces hansenii* Grown at High Concentrations of KCl and NaCl. *Yeast*. 14: 1355-1371.
36. Veiga A. Arrabaca J. D. y Loureiro-Dias M. C. (2003) Stress situations induce cyanide-resistant respiration in spoilage yeasts. *J. Applied Microbiol.* 95: 364-371.
37. Watson K. (1987). Temperature Relations. En: Rose A. H. y Harrison J. S. (1987). *The Yeasts*, Vol. 2 Yeasts and the environment. Second edition. Academic Press. London. 41 – 71pp.

**Sitios web consultados.**

- i. <http://cbi.labri.fr/Genolevures/>
- ii. [http://es.wikipedia.org/wiki/Agua\\_de\\_mar](http://es.wikipedia.org/wiki/Agua_de_mar)