



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Caracterización cinética de la parte alta de la
glucólisis en *Euglena gracilis*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

Leo Benkis García González

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Ricardo Jasso Chávez



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo. de México, 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Dr. Álvaro Marín Hernández

Dr. Hugo Virgilio Perales Vela

Dra. Ana María García Bores

Dr. Francisco José Torner Morales

La presente tesis se realizó en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" bajo la dirección del Dr. Ricardo Jasso Chávez

Este trabajo fue apoyado por el donativo de ciencia básica #156969 (Dr Ricardo Jasso Chávez) y por el apoyo de infraestructura CONACYT #281428 (Dr. Rafael Moreno-Sánchez)

Asesor del tema:

Dr. Ricardo Jasso Chávez

Sustentante:

Leo Benkis García González

Agradecimientos

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a aquellas personas que me acompañaron y formaron parte de esta etapa de mi vida, tanto personal como académicamente.

A mi madre, Porfiria, quien siempre me ha brindado de manera incondicional su apoyo, consejos y sobre todo amor, lo cual me ha permitido cumplir esta meta. Le debo todo, por lo que le dedico este trabajo. Te amo Má.

A mi tutor, Ricardo, por aceptarme en su equipo de trabajo, por aconsejarme, regañarme y guiarme para concluir esta meta. Agradezco sus consejos y pláticas tanto académicas como personales. Lo aprecio mucho Doc.

A mi primo, Sergio, por siempre estar presente, agradezco sus atenciones y consejos. ¡Eres grande chaparro! De igual modo quiero extender estas palabras a Enrique quien de un modo u otro también se ha preocupado por mi bienestar. Gracias Kikín.

A Diana, gracias por las charlas, los consejos, el escucharme y brindarme apoyo, me da gusto el cómo hemos crecido. A mi amiga Jessica, gracias por lo mejor de tu amistad, por la confianza entre nosotros, por todas las pláticas y momentos divertidos, sigue siendo esa buena persona.

A las chicas del laboratorio, gracias por su ayuda en todo momento, esas pláticas de relajación, llegarán lejos.

A todo el equipo del departamento de Bioquímica de Cardio, gracias por su labor y apoyo durante todo este tiempo.

A los “Monos” por esa amistad tan duradera y todo su apoyo. Saquen.

Muchas personas vienen a mi mente, pero no terminaría por cada cosa brindada, simplemente me queda agradecer a todos los que formaron parte de esta etapa.

Finalmente, dedicatoria para aquellos que ya no están cuya memoria me acompaña.

Abreviaturas

2-OG: 2-oxoglutarato

Acetil CoA: Acetil Coenzima A

ADH: NAD⁺-Alcohol deshidrogenasa

mADH: Alcohol deshidrogenasa mitocondrial

mmADH: Alcohol deshidrogenasa de la matriz mitocondrial

ALDH: NAD⁺-Aldehído deshidrogenasa

mALDH: Aldehído deshidrogenasa mitocondrial

mmALDH: Aldehído deshidrogenasa de la matriz mitocondrial

ATP: Adenosin trifosfato

ATP-PFK: Fosfofructocinasa fosfato dependiente de ATP

Fru: Fructosa

GDH: NADP⁺-Glutamato deshidrogenasa

Glc: Glucosa

Glu6P: Glucosa 6 fosfato

Fru6P: Fructosa 6 fosfato

Glu6PDH: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

HEPES: del inglés: hydroxyethylpiperazineethanesulfonic acid

HK: Hexocinasa

HPI: Hexosa fosfato isomerasa

L-iLDH: del inglés: NAD⁺-independent L-Lactate dehydrogenase

L-LDH: Lactato deshidrogenasa

MDH: NAD⁺-Malato deshidrogenasa

ME: NADP⁺- Enzima Málica

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

PMSF: del inglés: phenylmethylsulfonylfluoride

PPi: Pirofosfato

PPi-PFK: Fosfofructocinasa fosfato dependiente de PPI

SDS: del inglés: sodiumdodecyl sulfate

Resumen

Euglena gracilis es un protista flagelado unicelular que habita en numerosos ecosistemas. Es de gran importancia en investigación ya que ha mostrado distintas particularidades como su resistencia y remoción de metales pesados, la síntesis de metabolitos de interés biotecnológico como los ésteres de cera, alfa-tocoferol (vitamina E) y el paramilo, además de su capacidad de consumir distintas fuentes de carbono; pese a esto la glucosa no es una buena fuente de carbono para el cultivo de *Euglena*; sin embargo, no se sabe con certeza si es debido a su transportador, a las enzimas de la vía glucolítica o algún otro factor. Por estas razones este trabajo busca esclarecer por qué la glucosa no es una fuente de carbono óptima comparada con otros sustratos. Debido a que la glucólisis clásica en otros organismos se regula principalmente en la parte alta, se determinaron estas actividades en condiciones fisiológicas y se determinó si existe un cambio en ellas durante su cultivo en bajas concentraciones de fuente de carbono.

Se realizaron cultivos de *Euglena gracilis* Z heterotrófica con 100 mM de glucosa y fructosa como fuente de carbono y en otra condición las células se adaptaron durante 10 semanas a 10 mM hasta que se logró su duplicación celular a estas concentraciones; se evaluó el consumo de glucosa y fructosa, la producción de proteína y paramilo en los cultivos, además de caracterizar cinéticamente las enzimas de los primeros 3 pasos de la glucólisis (Hexocinasa, Hexosa fosfato isomerasa y Fosfofructosa cinasa dependiente de Pirofosfato y dependiente de ATP).

Las cinéticas de crecimiento entre cultivos fueron similares con fases de crecimiento con la misma duración temporal. Se obtuvo mayor densidad celular en cultivos con 100 mM de fuente de carbono. Para los que contenían 10 mM de fuente de carbono fue necesario un acondicionamiento de 20 semanas para detectar la duplicación celular. La fuente de carbono fue consumida hasta en un 70% en los cultivos con 100 mM de hexosa y hasta en un 90% en los de 10 mM de hexosa. La producción

de paramilo y metabolitos intermediarios de la vía no cambió en las condiciones de una u otra fuente de carbono.

En cuanto a las actividades enzimáticas, éstas se determinaron en fracciones citosólicas enriquecidas de los cultivos celulares cosechados al día 7 (fase estacionaria temprana de crecimiento). La HPI y la PPI-PFK conservaron su actividad entre todos los cultivos sin cambios significativos en su afinidad por sus sustratos. Por otro lado, la HK y la ATP-PFK-1 conservaron sus actividades y afinidades en los cultivos de 100 mM glucosa o fructosa, mientras que en los cultivos en 10 mM parece que se indujeron isoformas de ambas enzimas con mayor afinidad por sus sustratos (*K_m* menores en ambos casos); estas isoformas podrían estar involucradas en una mejor eficiencia catalítica que mejore el consumo de hexosas en concentraciones menores a 30 mM. Aunado a esto, ambas PFK's pudiesen ser un paso limitante por las bajas concentraciones intracelulares de sus cofactores el ATP y PPI.

Índice

1. Índice de Figuras.....	9
2.1 Introducción.....	11
2.1 Biología de <i>Euglena gracilis</i>	11
2.2 Importancia de <i>Euglena</i>	14
2.3 Metabolismo de la glucosa.....	15
2.4 Metabolismo de la glucosa en <i>Euglena</i>	18
3. Antecedentes.....	18
4. Justificación.....	20
5. Hipótesis.....	20
6. Objetivos.....	20
6.1 Objetivo General.....	20
6.2 Objetivos particulares.....	21
7. Materiales y Métodos.....	21
7.1 Cultivo de organismos.....	21
7.2 Curva de crecimiento.....	22
7.3 Cosecha de células.....	22
7.4 Extracción y cuantificación de paramilo.....	23
7.5 Cuantificación de metabolitos.....	23
7.6 Consumo de fuente de carbono.....	23
7.7 Actividades enzimáticas	24
8. Resultados.....	26
8.1 Crecimiento celular.....	26
8.2 Consumo de fuente de carbono.....	28
8.3 Concentración de metabolitos y paramilo.....	29

8.4 Actividades enzimáticas.....	31
8.4.1. Hexocinasa.....	31
8.4.2. Hexosa Fosfato Isomerasa.....	33
8.4.3. Fosfofructosacinasasa dependiente de ATP.....	34
8.4.4. Fosfofructosacinasasa dependiente de PPI.....	36
8.4.5. Resumen de Actividades.....	38
9. Discusión.....	40
10. Conclusión.....	45
11. Bibliografía.....	47
12. Apéndices.....	53
12.1 Apéndice I. Composición del medio de cultivo Hutner.....	53

1. Índice de Figuras

Figura 1. *Euglena gracilis* Heterotrófica.

Figura 2. Esquema de las vías propuestas para el consumo de distintas fuentes de carbono en *E. gracilis*.

Figura 3. Estructura molecular del paramilo.

Figura 4. Esquema de la vía de la glucólisis en mamíferos y *E. gracilis*.

Figura 5. Curva de crecimiento de cultivos aerobios con glucosa o fructosa como fuentes de carbono a 10 y 100 mM.

Figura 6. Densidades celulares al día 7 de cultivo, con glucosa o fructosa como Fuente de carbono a distintas concentraciones.

Figura 7. Consumo de la Fuente de carbono a través de los días de cultivo.

Figura 8. Proteína total producida al día 7 de cultivo.

Figura 9. Producción de paramilo de *E. gracilis* durante la curva de crecimiento.

Figura 10. Actividad de la HK en cultivos de 100 mM,

Figura 11. Actividad de la HK en cultivos de 10 mM.

Figura 12. Actividad de la HK, afinidad por ATP, cultivos 100 mM.

Figura 13. Actividad de la HK, afinidad por ATP, cultivos 10 mM.

Figura 14. Actividad de la HPI en cultivos 100 mM.

Figura 15. Actividad de la HPI en cultivos 10 mM.

Figura 16. Actividad de la ATP-PFK-1 en cultivos 100 mM.

Figura 17. Actividad de la ATP-PFK-1 en cultivos 10 mM.

Figura 18. Actividad de la ATP-PFK-1, afinidad por ATP, cultivos 100 mM.

Figura 19. Actividad de la ATP-PFK-1, afinidad por ATP, cultivos 10 mM.

Figura 20. Actividad de la PPI-PFK en cultivos 100 mM.

Figura 21. Actividad de la PPI-PFK en cultivos 10 mM.

Figura 22. Actividad de la PPI-PFK, afinidad por PPI, cultivos 100 mM.

Figura 23. Actividad de la PPI-PFK, afinidad por PPI, cultivos 10 mM.

2. Introducción

2.1. Biología de *Euglena gracilis* Klebs

Euglena gracilis es un protista unicelular flagelado, pertenece al grupo monofilético de los Euglenoideos. Se caracteriza principalmente por la presencia de una película que consiste en una estructura de microtúbulos dispuestos helicoidalmente y conjunto de glicoproteínas que recubren la célula, posicionándose por debajo de la membrana, la cual le permite realizar movimientos cambiando la forma celular. Morfológicamente se distingue por la presencia de dos flagelos anteriores situados en el reservorio, uno de ellos emergente utilizado para la locomoción, el otro sin emerger. Junto a la base flagelar se encuentra el estigma, que es un cumulo de pigmentos con función en la fototaxis (Bouck, 1982; Leedale, 1982; Zakryś *et al.*, 2017).

Phylum: Euglenozoa

Clase: Euglenoidea

Orden: Euglenida

Familia: Euglenidae

Género: *Euglena*

Especie: *Euglena gracilis*

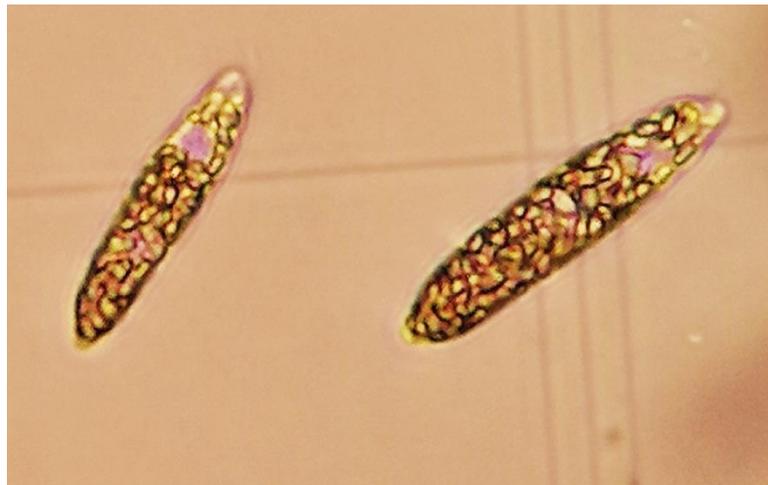


Figura. 1 *Euglena gracilis* heterotrófica. Microscopio óptico 400x.
(Departamento de bioquímica, INCar).

En *E. gracilis* la reproducción es asexual mediante bipartición y puede formar quistes de protección cuando las condiciones ambientales no son favorables.

Estos protistas son organismos cosmopolitas que habitan cuerpos dulceacuícolas, inclusive se ha reportado su presencia en ambientes salinos y cuerpos eutrofizados

y contaminados con metales pesados como lo son las aguas residuales. Es capaz de crecer en una amplia escala de pH, que va de 3 a 8; además *E. gracilis* puede tener distintos modos de nutrición teniendo la facilidad de ser autótrofo, dependiendo únicamente de la fotosíntesis, heterótrofo utilizando fuentes de carbono orgánicas, o bien mixotrófico utilizando ambos recursos. También tiene la capacidad de crecer en condiciones aerobias y anaerobias (Kempner, 1982).

Cuando los cultivos son expuestos en oscuridad se suelen perder los cloroplastos, una vez que regresan a condiciones de luz estos se recuperan; sin embargo, si el cultivo es durante largos periodos de tiempo o se cultivan con un tratamiento con antibiótico como la estreptomina, la pérdida de cloroplastos es irreversible, quedando estas cepas con un metabolismo completamente heterotrófico (Kirk, 1962; Grenson, 1964).

Euglena gracilis tiene una gran plasticidad metabólica que le permite utilizar fuentes de carbono como ácidos carboxílicos (málico, glutámico, DL-Láctico), así como etanol y algunos carbohidratos como glucosa y probablemente fructosa, para producir ATP y formar biomasa (Ragan & Chapman, 1978; Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez, 2003; Tucci *et al.*, 2010; Yoval-Sánchez *et al.*, 2011; Lira-Silva, *et al.*, 2011) (Fig.2).

El etanol es uno de los mejores sustratos para *E. gracilis*, este entra a la membrana plasmática mediante difusión y una vez en el citosol es oxidado a acetaldehído mediante la NAD⁺-ADH, el acetaldehído puede oxidarse a acetato mediante la NAD⁺-ALDH o transportarse a la mitocondria. El etanol también puede permear la membrana mitocondrial, ahí es oxidado a acetaldehído mediante la mADH o la mmADH y metabolizado a acetato mediante la mALDH o la mmALDH. Finalmente, el acetato es metabolizado por la tiocinasa para producir Acetil CoA y entrar al ciclo de Krebs (Yoval-Sánchez *et al.*, 2011). El malato es introducido a la mitocondria junto con el glutamato por la lanzadera malato-aspartato, donde es oxidado a oxalacetato mediante la NAD⁺-MDH y así ingresar al ciclo de Krebs. En el citosol puede ser oxidado a piruvato por la NADP⁺-ME. Por su parte, el glutamato también puede ser oxidado en el citosol por la NADP⁺-GDH (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

Otro sustrato utilizado por *E. gracilis* es el lactato, que puede ser utilizado para transferir equivalentes redox a la mitocondria a través de la lanzadera de lactato mediante las NAD⁺-iLDH (Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez, 2003). Finalmente, la glucosa es aprovechada mediante la vía de la glucólisis hasta la producción de piruvato, el cual en condiciones aerobias será transformado a lactato para aportar equivalentes redox a la mitocondria o bien a acetaldehído para continuar hacia el ciclo de Krebs.

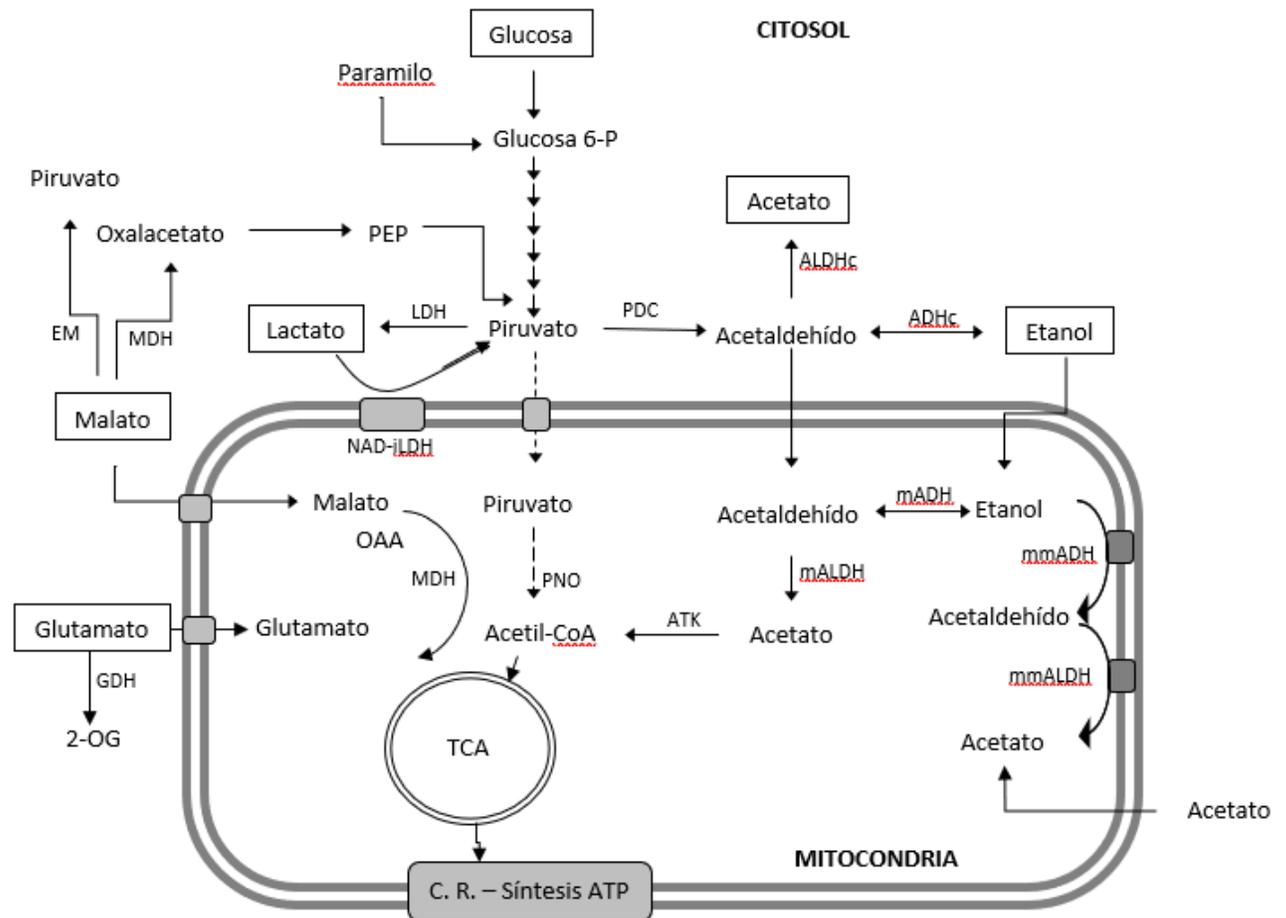


Figura 2. Esquema de las vías propuestas para el consumo de distintas fuentes de carbono en *Euglena gracilis*. PDC: piruvato descarboxilasa. LDH: Lactato deshidrogenasa. NAD⁺-iLDH: Lactato deshidrogenasa independiente de NAD⁺. PNO: Piruvato NAD⁺ oxidorreductasa. ADHc: alcohol deshidrogenasa citosólica. mADH: Alcohol deshidrogenasa mitocondrial. mmADH: Alcohol deshidrogenasa de la membrana interna mitocondrial. ALDHc: Aldehído deshidrogenasa citosólica. mALDH: Aldehído deshidrogenasa mitocondrial. mmALDH: Aldehído deshidrogenasa de la membrana interna mitocondrial. NAD⁺-EM: enzima málica. AT: acetato tiocinasa. NAD⁺-MDH: Malato deshidrogenasa. ATK: Acetato tiocinasa. GDH: Glutamato deshidrogenasa. PEP: Fosfoenol Piruvato. OAA: Oxalacetato. 2-OG: 2 Oxoglutarato. TCA: Ciclo de los ácidos tricarbónicos; C.R.: Cadena respiratoria. Esquema elaborado con datos reportados por Tucci *et al.* (2010), Yoval-Sánchez *et al.* (2011), Santiago-Martínez *et al.* (2015), Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez (2003) y Müller *et al.* (2012).

2.2. Importancia de *Euglena*

Euglena gracilis es de gran importancia en la investigación, ya que ha sido utilizado como modelo indicador de la calidad del agua (Sahoo & Seckbach, 2015) y por su alta capacidad para remover metales pesados, como Cd^{2+} y Cr^{2+} (Lira-Silva *et al.*, 2011; Santiago-Martínez *et al.*, 2015). En la industria también ha tomado gran importancia el cultivo de *Euglena* debido a su gran valor nutricional reportándose una gran cantidad de proteína con un rendimiento de hasta 0.7 g por gramo de peso seco, esta tiene gran valor nutricional equiparándose a la de origen animal; la cual puede ser utilizada como suplemento en la dieta (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010), por esto se ha sugerido su introducción en la dieta de rumiantes ya que mejora su digestión (Aemiro *et al.*, 2016). Además, se ha propuesto su cultivo para la producción de vitaminas como la provitamina A, sintetizada por *E. gracilis* como pigmento protector, así como vitamina C y el α -tocoferol, metabolitos sintetizados con importancia en la industria farmacéutica por sus propiedades antioxidantes; estos metabolitos pueden ser producidos simultáneamente y obtener concentraciones similares y superiores a las producidas por vegetales (Takeyama *et al.*, 1997; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010, Gissibl *et al.*, 2019).

Otra importancia de *E. gracilis* es su capacidad de producir metabolitos de acuerdo con sus condiciones de cultivo, en condiciones aerobias puede producir paramilo, un polisacárido formado por moléculas de glucosa unidas mediante enlaces β -1,3 glucano (Fig. 3). Este es utilizado como sustancia de reserva de energía y usualmente se encuentra agrupado en gránulos en el citoplasma; su importancia radica en su utilización en la industria farmacéutica, ya que tiene propiedades inmunoestimulantes además de ser un precursor para producir biomateriales como alternativas a plásticos derivados de petróleo. Si bien el paramilo puede sintetizarse aun cuando se cultiva a *Euglena* en distintas fuentes de carbono, se ha reportado que la mayor producción de paramilo ocurre en condiciones aerobias y utilizando glucosa como fuente de carbono (Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez, 2003; Matsuda *et al.*, 2010; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010), radicando aquí la importancia de su consumo. También se ha reportado que mediante la oxidación del paramilo

se producen las mayores concentraciones de ésteres de cera como resultado final de la fermentación anaerobia mitocondrial. Los ésteres de cera en *E. gracilis* están formados por ácidos grasos de cadena mediana unidos a alcoholes grasos de cadena mediana por un enlace éster, son de interés biotecnológico por su capacidad de ser utilizados para la producción de biocombustibles. Si las condiciones de cultivo cambian a aerobias, estos pueden regresar a Acetil-CoA o bien ser utilizadas para formar paramilo (Garibay *et al.*, 2009; Gissibl *et al.*, 2019).

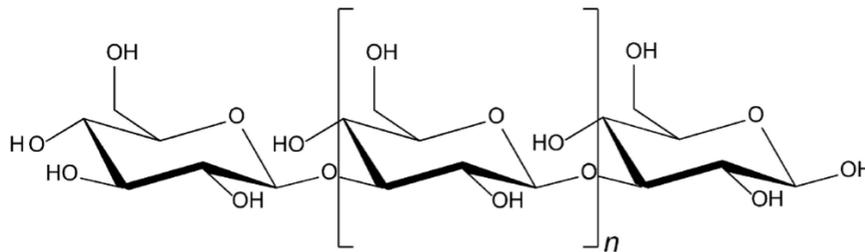


Figura. 3. Estructura molecular del paramilo. Esquema obtenido de Gissibl *et al.*, 2019.

2.3. Metabolismo de la glucosa

El metabolismo de la glucosa se lleva a cabo por medio de la vía de la glucólisis o la vía Embden-Meyerhof-Parnas. La glucólisis es la principal y en algunas células la única vía de obtención de energía. En esta vía metabólica, clásica de mamíferos, la degradación de una molécula de glucosa produce dos moléculas de piruvato, conservando parte de la energía desprendida en ATP y NADH. Esta consta de 11 pasos que puede dividirse en dos fases: los primeros 6 forman la fase de gasto de energía y los últimos 5 forman la fase de ganancia de energía (Nelson *et al.*, 2001).

La primera reacción inicia con la entrada de la glucosa al interior de la célula por medio de un transportador que puede ser de alta o baja afinidad, esto en mamíferos; en el caso de microorganismos unicelulares existen sistemas de transporte como el sistema fosfotransferasa de azúcares (PTS) que se encuentra presente en bacterias, de igual modo en algunos protistas como *Leishmania mexicana* se han reportado distintos transportadores de glucosa uno de baja afinidad similar a GLUT 1 y dos de alta afinidad (Jahreis *et al.*, 2008; Dean *et al.*, 2014). Una vez adentro, la glucosa sufre una fosforilación en el grupo hidroxil del carbono 6 catalizada por la

hexocinasa (HK), formando glucosa 6-fosfato (Glc6P), esta reacción es irreversible en condiciones fisiológicas; el siguiente paso es la modificación de Glc6-P a fructosa 6-fosfato (Fru6P), catalizada por la hexosa fosfato isomerasa (HPI), esta molécula es a su vez fosforilada de nuevo, en el grupo hidroxilo del carbono 1, por la fosfofructosa cinasa-1 (PFK-1), formando fructosa 1, 6-bifosfato (Fru1,6BP); en cada fosforilación una molécula de ATP es la donadora del grupo fosfato, liberando ADP, esta reacción también es irreversible en condiciones fisiológicas. En la siguiente reacción la Fru1,6-BP se divide en dos moléculas de 3 carbonos: la dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y el gliceraldehído 3-fosfato (Gly3P), esta reacción es catalizada por la fructosa 1, 6-bifosfato aldolasa; que es la última reacción de la fase de gasto de energía en que la molécula de DHAP es isomerizada a Gly3P por la triosa fosfato isomerasa (TPI). La siguiente reacción inicia la fase de obtención de energía, se trata de la fosforilación y oxidación de ambas moléculas de Gly3-P, por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) resultando en dos moléculas de 1,3-bifosfoglicerato (1,3BPG), en esta reacción una molécula NAD^+ es reducida a $\text{NADH} + \text{H}^+$. Las moléculas de 1,3-BPG son des-fosforiladas por la fosfoglicerato cinasa (PGK) formando dos moléculas de 3-fosfoglicerato; esta es la primera reacción donde se forman dos moléculas de ATP. La siguiente reacción es la isomerización de las moléculas de 3-PG formando 2-fosfoglicerato (2PG), esta reacción es catalizada por la fosfoglicerato mutasa (PGAM); la siguiente reacción es la formación de un doble enlace y el desprendimiento de una molécula de agua por la enolasa (ENO), formando dos moléculas de fosfoenolpiruvato (PEP). El último paso de la glucólisis clásica es una reacción irreversible que consiste en la desfosforilación del carbono 2 del PEP por la piruvato cinasa (PYK), dando como resultado dos moléculas de piruvato, y otras dos moléculas de ATP. El resultado de la glucólisis con la degradación de una molécula de glucosa es la formación de dos moléculas de piruvato y una ganancia neta de 2 moléculas de ATP y 2 moléculas de NADH (Nelson *et al.*, 2001) (Fig. 3).

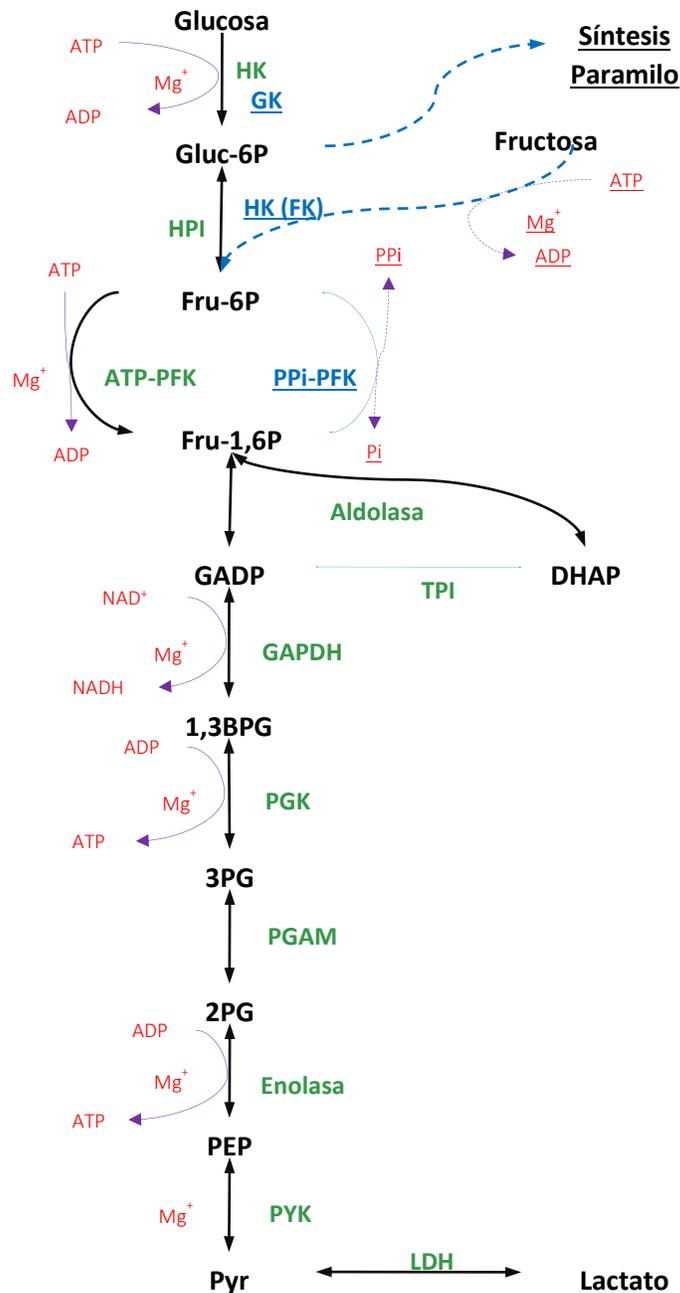


Figura 4. Esquema de la vía de la glucólisis en mamíferos; las diferencias de la vía en *Euglena gracilis* se marcan con texto subrayado y flechas punteadas. Enzimas: HK: Hexocinasa, GK: Glucocinasa, FK: Fructocinasa, HPI: Hexosa fosfato isomerasa, ATP-PFK: ATP fosfofructocinasa, PPI-PFK: Pirofosfato fructocinasa, TPI: Triosa fosfato isomerasa, GAPDH: Glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa, PGK: Fosfoglicerato cinasa, PGAM: Fosfoglicerato mutasa, PYK: Piruvato cinasa, LDH: Lactato deshidrogenasa. Metabolitos: Gluc-6P: Glucosa 6-fosfato, Fru-6P: Fructosa 6-fosfato, Fru-1,6P: Fructosa 1,6-bisfosfato, GAD: Glicerinaldehído 3-fosfato, DHAP: Dihidroxiacetona 3-fosfato, 1,3BPG: 1,3 bisfosfoglicerato, 3PG: 3-fosfoglicerato, 2PG: 2-fosfoglicerato, PEP: Fosfoenolpiruvato, PYR: Piruvato. Esquema tomado y modificado de Nelson y Cox (2012).

2.4. Metabolismo de la glucosa en *Euglena*

Se sabe que existen algunas modificaciones de la glucólisis en *E. gracilis*, se ha reportado una hexocinasa particulada para la fosforilación específica de glucosa (glucocinasa) y una HK soluble para la fosforilación de fructosa (fructocinasa), además de la presencia de una hexocinasa que fosforila ambas hexosas y que es activada alostéricamente por fosfato (Graves, 1977; Luccini, 1971). Otra peculiaridad es en la fosforilación de Fru6P a Fru1,6BP para esta reacción cuenta con dos PFK-1, una dependiente de ATP cuya reacción es irreversible y otra dependiente de PPI, que puede catalizar la reacción en ambas direcciones (Fig. 3) (Miyatake *et al.*, 1984).

El consumo de glucosa como fuente de carbono no es el óptimo para el crecimiento de *E. gracilis*; sin embargo, tras un periodo prolongado de cultivo en glucosa, como única fuente de carbono, su consumo mejora (Kempner, 1982; Wang *et al.*, 2018), lo cual podría sugerir algún cambio en las actividades enzimáticas de la glucólisis, como las de la parte alta de la vía, la HK y la ATP-PFK-1 que han sido reportadas en otros organismos como los principales puntos mediadores de la vía (Aomine, 1980).

3. Antecedentes

Distintos autores han medido algunas actividades enzimáticas de la glucólisis en *E. gracilis*. Santiago-Martínez *et al* (2015) determinaron la actividad del transporte de glucosa, identificando por western blot la presencia de una isoforma similar al GLUT 1 en condiciones de aerobiosis. De igual modo Graves (1978) reportó que la HK tenía mayor actividad en cultivos de glucosa en comparación de cultivos con acetato o etanol. Otros autores, Miyatake *et al* (1984) reportaron la presencia en el citosol de la ATP-PFK y una PFK dependiente de PPI con una actividad 30 veces mayor respecto a la dependiente de ATP. (tabla 1).

Tabla 1. Antecedentes de datos reportados de las actividades enzimáticas de enzimas de la parte alta de la glucólisis en *E. gracilis* por autores previos. mU/mg prot= nmol x (min x mg proteína)⁻¹. Los valores de *Km* son utilizando glucosa (glucocinasa) y Fru 6-P (PPi-PFK) como sustrato.

Enzima	pH	<i>Km</i>	<i>Vmax</i>	T°	Autor
Transportador de Glucosa	7.2	-	14.4 mU/mg	26°C	Santiago-Martínez 2015
Hexocinasa	-	-	31.9 mU/mg	-	Graves 1978
Glucocinasa	8.2	8 mM	86.6 mU/mg	-	Luccini 1971
Fructocinasa	7.5	-	57 mU/mg	-	Luccini 1971
HPI	-	-	-	-	-
PPi-PFK	6.5	0.25 mM	300-700 mU/mg	30°C	Miyatake, et al. 1984
ATP-PFK	8	-	20-30 mU/mg	-	Miyatake, et al. 1984

Pese a que la glucólisis es la vía más estudiada en los seres vivos, en *E. gracilis* no es el caso, los antecedentes muestran que, a pesar de tener registro de la presencia de todas las enzimas participantes en la vía, no se tienen datos completos de las

actividades en condiciones fisiológicas, ni de las concentraciones de los intermediarios de la vía (Buetow, 1989).

4. Justificación

Dado la importancia de *E. gracilis* por ser un organismo modelo en distintas investigaciones, por su potencial nutricional y capacidad de sintetizar metabolitos de interés biotecnológico, es necesario dilucidar su consumo de distintas fuentes de carbono para potenciar este aprovechamiento, en este caso el estudio se enfoca en el consumo de glucosa, ya que es ampliamente utilizado en medios definidos. Al dilucidar el consumo de esta fuente de carbono se puede explorar el cultivo de este organismo en medios experimentales; además de explotar la potenciación de producción de paramilo y otros metabolitos intermediarios de la glucólisis. Por estos motivos, este trabajo tiene como objetivo evaluar el consumo de glucosa, en la parte alta de la vía glucolítica, bajo las mismas condiciones de cultivo, así como evaluar si existe un cambio en estas enzimas, participantes de la parte alta de la vía, al utilizar distintas concentraciones de glucosa.

5. Hipótesis

El acondicionamiento a concentraciones bajas de glucosa provocará un cambio en las actividades enzimáticas de la glucólisis de *Euglena gracilis* heterotrófica.

6. Objetivos

6.1. General

Evaluar las actividades enzimáticas de la parte alta de la glucólisis en *Euglena gracilis* Z heterotrófica.

6.2. Particulares

- Evaluar el crecimiento de *E. gracilis* cultivada a distintas concentraciones de glucosa y fructosa.
- Evaluar el consumo de las fuentes de carbono.
- Cuantificar la concentración de intermediarios relevantes de la glucólisis.
- Cuantificar la concentración de paramilo producido en los cultivos.
- Determinar la actividad enzimática de la HK, HPI, ATP-PFK y PPI-PFK.

7. Materiales y Métodos

7.1. Cultivo de organismos

Se trabajó con la cepa de *E. gracilis* Klebs heterotrófica, cultivada en el Instituto Nacional de Cardiología, la cual es una cepa con ausencia de cloroplastos. La cepa se cultivó en condiciones aerobias en 100 mL de medio de cultivo Hutner (Apéndice I) utilizando concentraciones iniciales de 100 mM glucosa como única fuente de carbono, después se realizaron varios pases a concentraciones decrecientes de 50, 25, 10 y 5 mM. Se utilizaron cultivos en las mismas condiciones con fructosa como única fuente de carbono para comparar el consumo de una u otra hexosa, para determinar si las actividades enzimáticas, principalmente la hexocinasa es específica por el sustrato o no.

Una vez adaptados los cultivos a distintas concentraciones de fuente de carbono, se realizaron cultivos con glucosa y fructosa a concentraciones de 100 y 10 mM. Los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 3.5 y los cultivos se iniciaron a una densidad celular de 0.2×10^6 céls/mL y se mantuvieron a 120 rpm de agitación orbital constante, en ausencia de luz y a una temperatura de 25 ± 1 °C (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

7.2. Curva de crecimiento

Se hicieron conteos a diferentes días de cultivo, tomando alícuotas de 50 μL y preparando diluciones 1:10, los organismos fueron inmovilizados agregando 5 μL de HCl al 1% (v/v). Se determinó la densidad celular con ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio óptico.

7.3. Cosecha de células

Para la cuantificación de metabolitos se cosecharon aproximadamente 20 millones de células (10 ml aprox.) a 3500 rpm/10min y se lavaron con el medio SHE (120 mM sacarosa, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA y pH 7.2. Se recuperó la pastilla y se resuspendió en 1mL de medio SHE. Para lisarlas, las células fueron sonicadas con ayuda de un equipo BRANSON sonifier 450, durante 10 segundos, por 3 periodos con 60 segundos entre periodo y en presencia de 0.3 mM ditioneitol (DTT) y 0.3 mM de PMSF. Posteriormente se centrifugaron a 14,500 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue recuperado y guardado con 100 μL de glicerol a -20°C para cuantificar proteínas y medir actividades enzimáticas. La pastilla fue resuspendida en 500 μL de medio SHE y guardada a -20°C para cuantificar paramilo, tal como previamente se ha descrito (Rodríguez-Zavala et al., 2010).

7.4. Consumo de fuente de carbono

Para medir el consumo de fuente de carbono en los cultivos se recolectaron muestras de $\sim 500 \mu\text{L}$ los días 0, 3, 5 y 7 de cultivo; fueron centrifugadas a 3,500 rpm en una microcentrífuga de mesa por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se midió el azúcar presente mediante la reacción fenol-sulfúrico como se ha reportado previamente (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

7.5. Extracción y cuantificación de paramilo

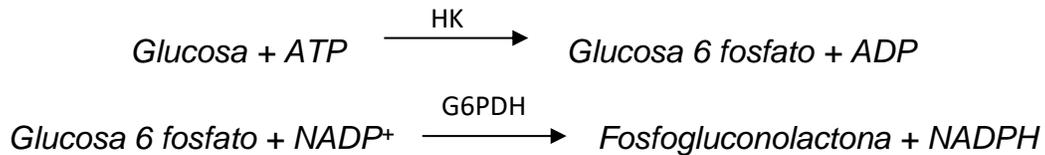
Para la extracción del paramilo, las muestras de 500 μL fueron tratadas con 50 μL de ácido perclórico al 30% (PCA; V/V), dejándolas reposar 2 minutos a 4°C, después fueron centrifugadas a 2400 rpm por 2 minutos en una microcentrifuga, se recuperó la pastilla y se resuspendió en 1 mL de detergente 1% dodecilsulfato sódico (SDS; p/V), se incubaron en baño maría durante 15 minutos y se centrifugaron a 2400 rpm por 2 minutos. Las pastillas fueron recuperadas y se lavaron en 1 mL de 0.1% SDS (p/V) y nuevamente se centrifugaron a 2400 rpm por 2 minutos, finalmente la pastilla se recuperó y resuspendió en 1 mL de 1N hidróxido de sodio (NaOH), la muestra fue guardada 24 horas a -20°C. Pasadas las 24 horas el paramilo fue cuantificado mediante la reacción fenol-sulfúrico tal como se ha reportado previamente (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

7.6. Cuantificación de proteína y metabolitos

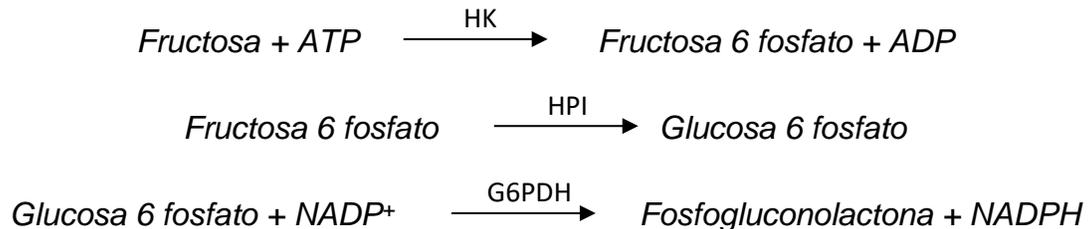
La proteína total fue cuantificada por la técnica colorimétrica de Biuret (Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez, 2003). Para cuantificar los metabolitos se cosecharon alrededor de 1×10^7 células al día 3 de cultivo, estas células fueron lisadas mediante sonicación y concentradas en 500 μL de buffer SHE pH 7.2. Se prepararon extractos ácidos con cada muestra, agregando 50 μL de PCA al 30% y se dejaron reposar 10 minutos a 4°C, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se le adicionaron 30 μL de indicador de pH universal y se titularon las muestras con KOH. Una vez que las muestras fueron tituladas a un pH aproximado de 7 fueron centrifugadas a 3500 rpm por 4 minutos y se recuperaron los sobrenadantes los cuales fueron utilizados para la cuantificación de metabolitos.

Estos fueron cuantificados en un espectrofotómetro de diodos marca Agilent modelo 8453, midiendo la formación de NADH y NADPH a una absorbancia de 340 nm a 30°C (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

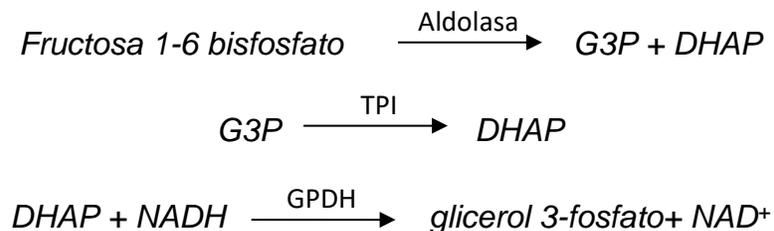
La glucosa 6 fosfato junto con el ATP se cuantificaron adicionando 100 µL del extracto ácido neutralizado con 1800 µL de buffer de 500 mM hidrazina 400 mM glicina a pH 9, adicionando 10 mM glucosa, 5 mM MgCl₂ y 0.4 mM NADP⁺ se adicionaron 10 G6PDH y 1 UI HK de acuerdo con la siguiente reacción:



La fructosa 6 fosfato fue cuantificado con 100 µL de extracto ácido junto con 1800 µL de buffer hidrazina-glicina pH 9, 5 mM MgCl₂, 0.4 mM NADP⁺, 1U HK, 10 UI Glc6PDH y 8 UI HPI, de acuerdo con la siguiente reacción:



Las triosas fosfato junto con la fructosa 1,6 bisfosfato fueron cuantificados con 100 µL de extracto ácido en 1800 µL de buffer hidrazina-glicina pH 9, adicionando 0.15 mM NADH, 7 UI aldolasa y 28.5 UI TPI/αGDH, de acuerdo con la reacción:



7.7. Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas fueron evaluadas utilizando un espectrofotómetro de diodos marca Agilent modelo 8453 midiendo la absorbancia a una longitud de 340 nm. Los ensayos fueron realizados con proteína citosólica, utilizando 50 a 100 µg, a 26°C; y empleando el buffer KME (120 mM KCl, 20 mM Mops, 1 mM EGTA a pH 7.2).

Hexocinasa

La actividad de la HK fue evaluada adicionando 50-100 µg de proteína de la muestra citosólica a 900 µL de buffer que contenía 10 mM MgCl₂, 1.5 mM ATP, 0.4 mM NADP⁺ y 10 UI G6PDH, 8 UI HPI (solo para fructosa) como enzimas acoplantes, así como distintas concentraciones de glucosa o fructosa (0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 mM) para determinar el *K_m* por glucosa o fructosa. La reacción se inició con la adición de NADP⁺ Al determinar la *K_m* por ATP, se utilizó una concentración fija de hexosa (5 mM) y el ATP se varió de 0.005 a 1 mM.

Hexosa Fosfato Isomerasa

La actividad de la hexosa fosfato isomerasa (HPI) se determinó en 900 µL de buffer que contenía entre 50-100 µg de proteína citosólica, 0.5 mM NADP⁺ 10 mM MgCl₂, distintas concentraciones de Fru6P (0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2mM) y 10 UI de G6PDH como enzima acoplante, esta enzima fue utilizada para iniciar la reacción. También se midió la actividad de la HPI en presencia de 10 mM de eritrosa-4-fosfato (Erythro4P), utilizando 0.5 mM Fru6P.

Fosfofructocinasa-1

La actividad de fosfofructocinasa-1 (PFK) se evaluó utilizando 900 µL de buffer, 50-100 µg de proteína citosólica, junto con 5 mM MgCl₂, 2.5 mM ATP para la PFK dependiente de ATP o 1.5 mM PPi para la PFK dependiente de PPi, 0.15 mM NADH y 1 UI Aldolasa, 28.5 UI TPI, y 2.85 UI αGDH como enzimas acoplantes. La reacción se inició con la adición de F6P a distintas concentraciones (0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 y 5 mM). La *K_m* de las enzimas por ATP y PPi fue determinada utilizando distintas concentraciones de estos (0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM) con una concentración fija de Fru6P (2 mM).

Los datos fueron procesados utilizando el programa Origin 5.0, los valores de *K_m* y

V_{max} fueron calculados con la ecuación de hipérbola $y = \frac{P_1x}{P_2+x}$

8. Resultados

8.1. Crecimiento celular

Los resultados obtenidos indican que no hubo diferencia en las curvas de crecimiento al utilizar 100 mM de glucosa o de fructosa como fuente de carbono, ya que se determinaron densidades similares (10×10^6 cels/mL) en 7 días (Fig. 4). En cambio, a concentraciones de 10 mM de glucosa o fructosa, las densidades celulares bajaron significativamente debido a una menor fuente de carbono; sin embargo, estas densidades siguen siendo similares entre ambos sustratos, alcanzando una densidad máxima de 3.5×10^6 cels/mL en 7 días (Fig. 4).

En todos los cultivos con alta y baja concentración de glucosa o fructosa como fuente de carbono, la cinética de crecimiento es similar, al día tres los cultivos se encuentran en fase exponencial, llegando a la máxima densidad al día siete, posterior a este los cultivos entran en fase estacionaria por lo que la densidad se mantiene e inclusive empieza a decaer. Si bien la densidad lograda en concentraciones altas de fuente de carbono es 2 a 3 veces mayor que la obtenida con los cultivos con baja fuente de carbono, se aprecia que aun utilizando una baja concentración de fuente de carbono existe la división celular en el cultivo (Fig. 4).

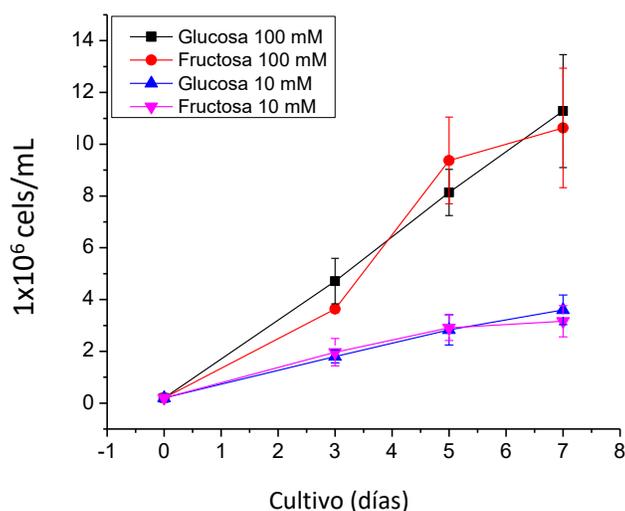


Fig.5. Curva de crecimiento de cultivos aerobios con glucosa o fructosa como fuentes de carbono a 10 y 100 mM. Valores son promedio \pm DS n=3.

Inicialmente los cultivos en 10 mM de fuente de carbono mostraron una baja densidad al día 7 de cultivo, con una máxima de alrededor de 1×10^6 cels/mL. Después de esto se realizó la adaptación de los cultivos a concentraciones bajas de sustrato, esto a través de numerosos pases partiendo de una concentración de 100 mM a 50, 25, 10 y 5 mM de sustrato, como resultado se obtuvieron densidades de alrededor de 4×10^6 cels/mL, por lo que se adaptaron células capaces de dividirse utilizando bajas concentraciones de sustrato.

Las densidades alcanzadas dependieron directamente de la concentración de fuente de carbono utilizada, en los cultivos con concentraciones de 100 y 50 mM las densidades celulares son parecidas, entre 6 y 10×10^6 cels/mL, pero al bajar la concentración del sustrato a 25, 10 y 5 mM, las densidades bajan y se mantienen entre 3 y 4×10^6 cels/mL. Un punto importante es que en este proceso de adaptación las densidades no variaron entre el uso de glucosa o fructosa como fuente de carbono, solo en cuanto a concentración (Fig. 5).

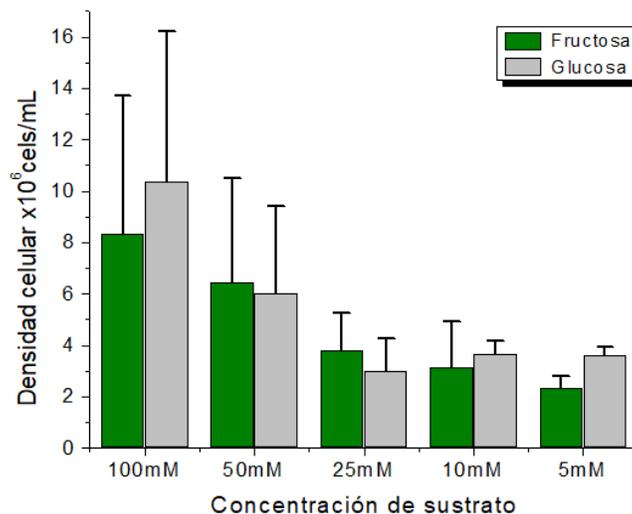


Fig. 6. Densidades celulares al día 7 de cultivo, con glucosa o fructosa como fuentes de carbono a distintas concentraciones. Densidades alcanzadas después de 10 pases a estas concentraciones de fuente de carbono. Datos mostrados son promedio \pm DS, n=3.

8.2. Consumo de fuente de carbono

En los cultivos con 100 mM glucosa o fructosa, el consumo de la fuente de carbono fue de 56 y 49 % respectivamente al día 7 de cultivo, que corresponde a cuando se alcanzó la mayor densidad celular y empezó la fase estacionaria del cultivo. Después de esto se detuvo cuando quedaba un remanente de 30-40 mM del sustrato en el medio, lo cual indica que por debajo de estas concentraciones la glucosa y fructosa no son consumidas.

En los cultivos con 10 mM de glucosa o fructosa, se determinó un consumo del 90 % de la fuente de carbono con un remanente de alrededor de 1 mM en el medio. Estos resultados indicaron que *E. gracilis* adaptada a baja concentración de hexosas puede consumir por igual estas fuentes de carbono, glucosa o fructosa, siendo casi por completo cuando existe en bajas concentraciones (Fig. 6).

Condición de cultivo

Fig. 7. Consumo de la fuente de carbono (glucosa o fructosa) a través de los días de cultivo a concentraciones de 10 y 100 mM. Datos mostrados son promedio \pm DS, n=3.

8.3. Concentración de metabolitos y paramilo

La proteína total cuantificada en los cultivos de *E. gracilis* tampoco mostró diferencia significativa en el rendimiento utilizando glucosa o fructosa como sustrato. En los que se utilizó 100 mM la concentración de proteína obtenida fue de 7.5 ± 1.8 g/L con glucosa y 6.8 ± 1.2 g/L con fructosa. Sin embargo, la proteína cuantificada en cultivos con 10 mM de sustrato si mostró una disminución significativa del 40% con respecto los primeros. Con esta concentración de fuente de carbono la proteína cuantificada fue de 4.6 ± 0.5 g/L en los cultivos de glucosa y 4.6 ± 0.6 g/L para fructosa (Fig. 7).

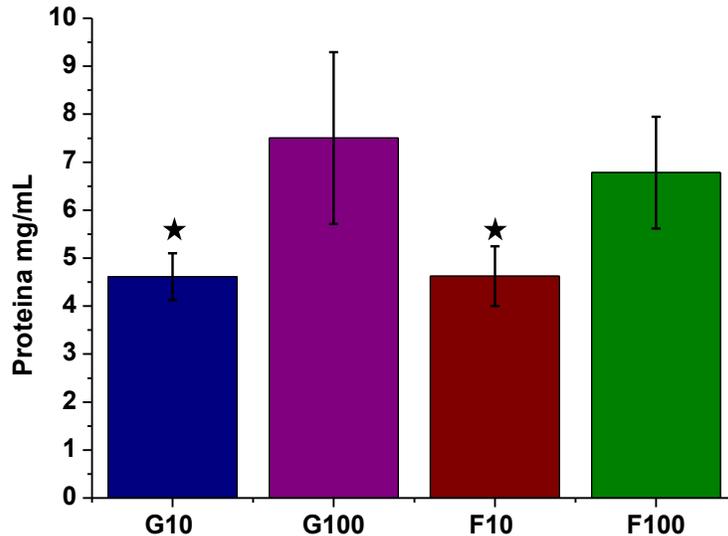


Fig. 8. Proteína total producida al día 7 de cultivo en distintos medios de cultivo (G: glucosa, F: fructosa, 10 y 100 mM). Datos mostrados son promedio \pm DS, n=3. ★= Prueba ANOVA de 1 vía P=0.05, con respecto a G100.

Los metabolitos cuantificados eran intermediarios de la vía glucolítica: Glc6P, Fru6P, ATP, triosas fosfato (DHAP + G3P) y Fru1, 6-BP.

La concentración de Glc6P osciló entre 8.76 y 9.6 mM en todos los cultivos sin importar la fuente de carbono o la concentración de esta. Los valores fueron hasta 3 veces mayores que de Fru6P que osciló entre 2.6 y 4 mM. La concentración de

ATP tampoco se vio afectada por el tipo o cantidad de fuente de carbono, obteniéndose valores semejantes en todos los cultivos de 4.1 y 4.7 mM.

Por otro lado, la concentración de triosas fosfato (DHAP + G3P) disminuyó en cultivos con fructosa como fuente de carbono con valores 2.3 y 3.11 mM, en comparación con los obtenidos en medios de glucosa que oscilaron entre 4.2 y 4.5 mM. Finalmente, los valores de Fru1,6BP oscilaron entre 5.5 y 7.2 mM, y no se observó un cambio en ellas independientemente del tipo y cantidad de fuente de carbono. La concentración de los metabolitos se calculó a partir de los valores determinados en las muestras y el volumen intracelular (3 μ L/10 millones de cels) de *E. gracilis* reportado por Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez (2003) (Tabla 2).

Tabla 2. Metabolitos evaluados en los distintos cultivos, expresados en: metabolitos intermediarios (nmol/ 1×10^7 células), paramilo (mg/ 1×10^7 células y g/L) y proteína (g/L de cultivo). Valores mostrados son promedios de n=3

Metabolitos	Medios de cultivo			
	G10	G100	F10	F100
Glucosa 6P	26.3	28.8	26.8	28.7
Fructosa 6P	7.8	8.1	12	9.2
ATP	14.2	12.3	13.6	12.8
Triosas Fosfato	13.9	12.6	7	9.35
Fructosa 1, 6-BP	16.6	21.25	19	21.75
Paramilo	2.3 (0.21)	5.3 (2.12)	1.7 (0.15)	5.9 (2.36)
Proteína total	4.5	7.5	4.1	6.5

La producción de paramilo no se modificó al utilizar glucosa o fructosa como fuente de carbono. En los cultivos con altas concentraciones de sustrato (100 mM) no se observó una diferencia en la producción de paramilo (Tabla 2) durante los 7 días de crecimiento, que fue cuando alcanzaron la concentración máxima. La producción fue constante desde inicios de la fase exponencial en los cultivos y su degradación inició en la fase estacionaria, que es cuando las concentraciones de fuente de carbono ya no fueron consumidas. Por otro lado, al utilizar bajas concentraciones

de sustrato (10 mM) las células presentaron su máxima concentración al día 3 de cultivo (Tabla 2) para glucosa y fructosa respectivamente. En estos cultivos la producción de paramilo inició en la fase exponencial, en el día 3 es cuando se determinó la mayor concentración, después permaneció constante e inclusive inició su degradación, esto sugirió la falta de fuente de carbono (Fig. 8). Dados estos resultados se sugirió que la producción de paramilo depende directamente de la cantidad de fuente de carbono disponible.

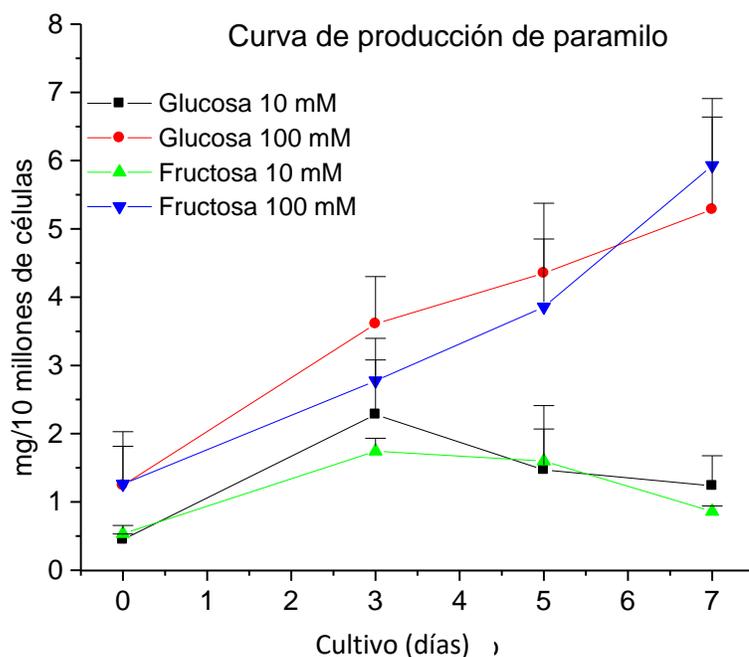


Fig. 9. Producción de paramilo de *E. gracilis* durante la curva de crecimiento, utilizando diferentes medios de cultivo. Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes.

8.4. Actividades enzimáticas

8.4.1. Hexocinasas

La actividad de la HK fue similar en los cultivos con 100 mM de fuente de carbono, sin importar si se utilizó glucosa o fructosa, en los cultivados con glucosa la actividad fue de 41 mU/mg de proteína con una $Km_{Glc} = 0.78$ mM. En los que se utilizó fructosa

la actividad de la HK fue de 38 mU/mg de proteína con una $Km_{Fru}= 0.81$ mM (Fig. 10). Por otro lado, en los cultivos con 10 mM de glucosa como sustrato, la actividad de la HK fue de 27 mU/mg de proteína y una $Km_{Glc}=0.13$ mM, la actividad de esta enzima fue menor a la obtenida en cultivos con alta concentración del mismo sustrato, mientras que en los cultivados con fructosa 10 mM, la actividad obtenida fue de 39 mU/mg de proteína y una $Km_{Fru}=0.22$ mM (Fig. 11). En todos los cultivos, con 10 y 100 mM de fuente de carbono, con glucosa o fructosa, la actividad de HK tuvo una cinética hiperbólica (que se ajustó a la ecuación de Michaelis-Menten); sin embargo, la actividad enzimática fue menor en los cultivos con baja concentración de fuente de carbono. Así mismo, los valores de Km también menores sugirieron la expresión de isoformas con alta afinidad por glucosa y fructosa en comparación con a las expresadas en las células cultivadas en altas concentraciones de fuentes de carbono.

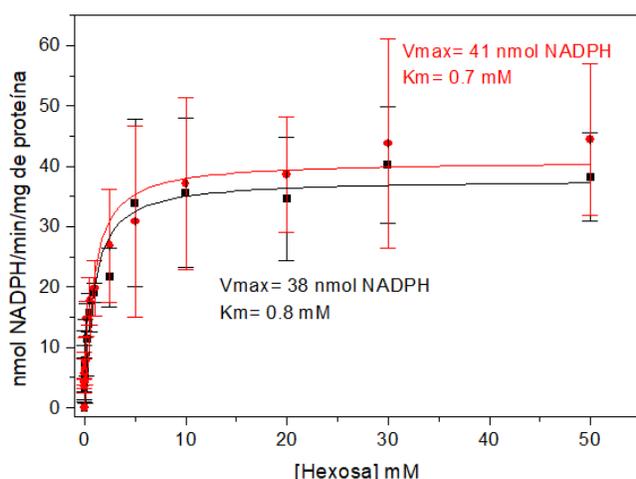


Fig.10. Actividad de hexocinasa determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 100 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de hexosa contra actividad, a una concentración fija de ATP (1.5 mM). Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

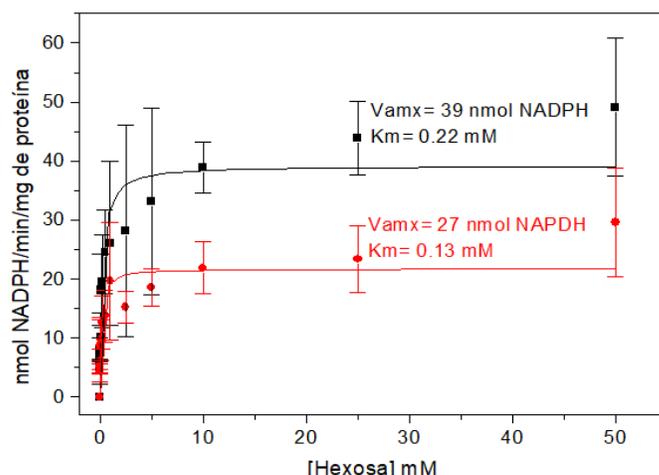


Fig 11. Actividad de hexocinasa determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 10 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de hexosa contra actividad, a una concentración fija de ATP (1.5mM). Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y o la ecuación de Michaelis-Menten.

La afinidad por ATP fue similar entre los cultivos con 100 mM de fuente de carbono, tuvieron una $Km_{ATP}= 0.047$ mM con glucosa y 0.0475 mM con fructosa. En el caso de los cultivos con 10 mM de fuente de carbono, las afinidades también fueron

semejantes con un valor de $K_{mATP}=0.06$ mM con glucosa y 0.07 mM con fructosa, estos resultados sugieren una afinidad similar de la hexocinasa para el ATP, en los 4 cultivos. Sin embargo, la actividad de la enzima disminuyó en todos los casos, excepto en glucosa 100 mM (Fig. 12 y 13).

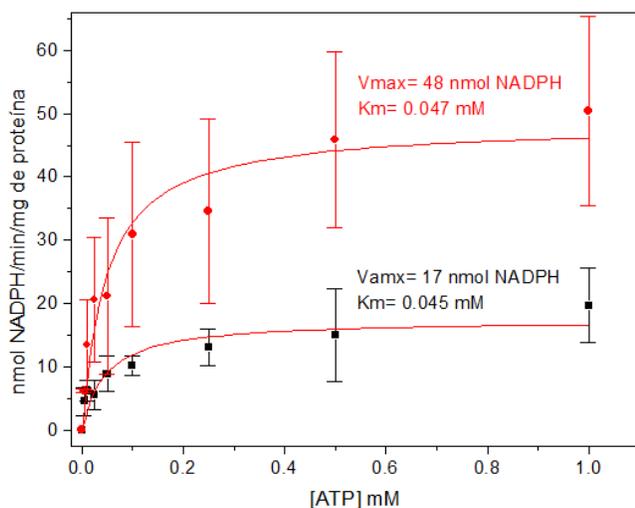


Fig.12. Actividad de hexocinasa determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 100 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de ATP contra actividad, a una concentración fija de glucosa o fructosa (5 mM). Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

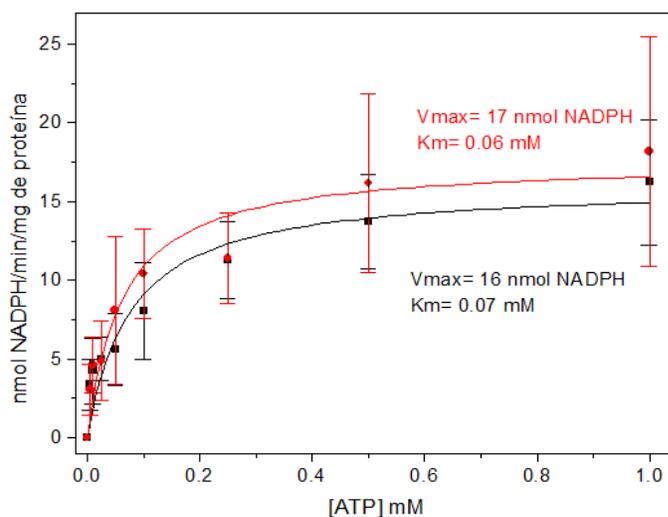


Fig.13. Actividad de hexocinasa determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 10 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de ATP contra actividad, a una concentración fija de glucosa o fructosa (5 mM). Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

8.4.2 Hexosa Fosfato Isomerasa

La actividad de la HPI fue similar sin importar la fuente de carbono o la concentración de esta. La actividad determinada estuvo en un intervalo de 2050-2205 mU/mg de proteína y el valor de K_{mFru6P} entre 0.14mM y 0.35 mM (Fig. 14 y 15).

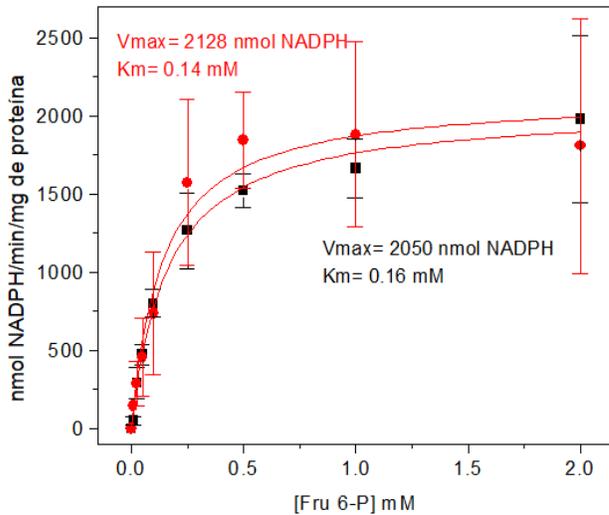


Fig. 14. Actividad de HPI determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 100 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de Fru6P contra actividad. Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

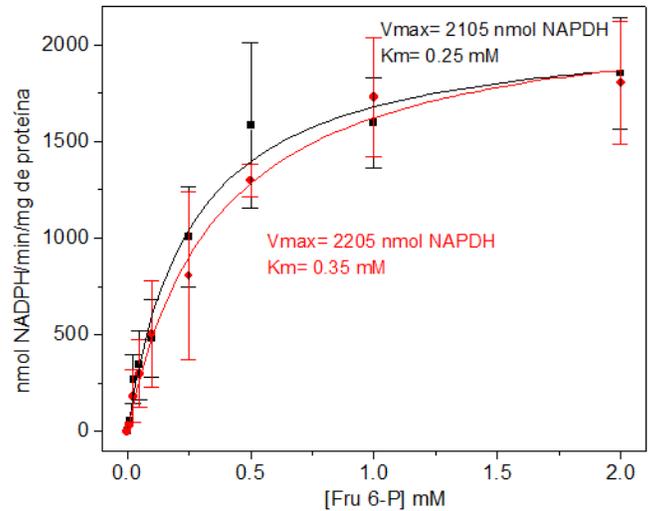


Fig. 15. Actividad de HPI determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 10 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de Fru6P contra actividad. Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

Se tiene reportado que la eritrosa 4P actúa como inhibidor de la HPI de mamífero (Chirgwin et al., 1975; Marín-Hernández et al., 2016), por lo que se realizaron ensayos con este metabolito intermediario de la vía de síntesis de ribosas fosfato para evaluar si en la enzima de *E. gracilis* también ocurre esta inhibición. Se determinó que la actividad de la HPI, en las células cultivadas con 100 mM de fuente de carbono, se redujo en un 12% al agregar 10 μ M Erythro4P, mientras que la actividad de la HPI de las células cultivadas con 10 mM de fuente de carbono solo disminuyó un 7% agregando 10 μ M eritrosa. Esto sugirió que la Erythro4P puede tener actividad inhibidora sobre la HPI como ocurre en la enzima presente en mamíferos.

8.4.3 Fosfofructocinasa dependiente de ATP

La actividad de la ATP-PFK fue de 100 mU/mg de proteína con un valor de $K_{m_{Fru6P}} = 2$ mM en los cultivos con glucosa 100 mM, en cuanto a la actividad de las cultivadas

con fructosa 100 mM, fue de 112mU/mg de proteína con un valor de $Km_{Fru6P}=3$ mM (Fig. 16), por lo que esta enzima no mostró diferencia en sus actividades ni su afinidad por el sustrato entre los diferentes cultivos. En los cultivos con 10 mM de fuente de carbono, se midió una actividad de 44 mU/mg de proteína con un valor de $Km_{Fru6P}=0.5$ mM en los cultivos con glucosa, mientras que los cultivados con fructosa mostraron una actividad de 90 nmol/min/mg de proteína y un valor de $Km_{Fru6P}= 1.3$ mM (Fig. 17).

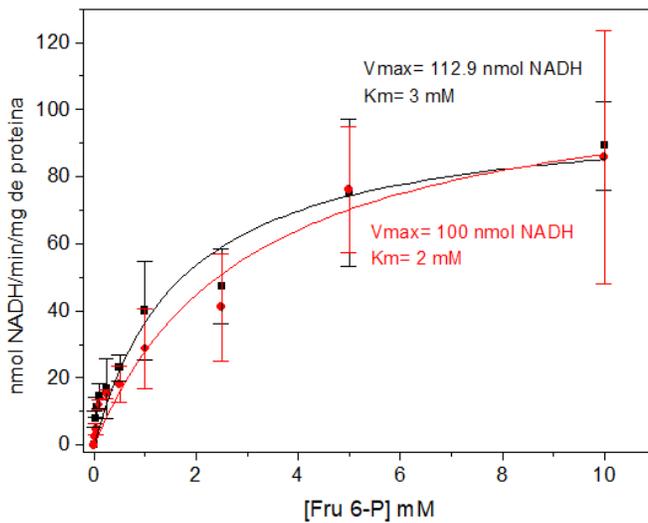


Fig. 16. Actividad de ATP-PFK determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 100 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de Fru6P contra actividad, a una concentración fija de ATP (2.5 mM). Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

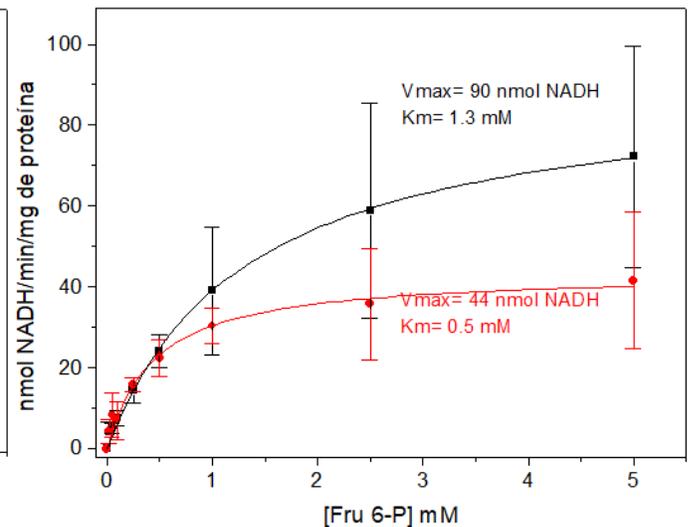


Fig. 17. Actividad de ATP-PFK determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 10 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de Fru6P contra actividad, a una concentración fija de ATP (2.5 mM). Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

Esta PFK es dependiente de ATP como cofactor para su actividad por lo que también se determinó su afinidad por este metabolito, el valor de la Km fue similar sin importar el origen del extracto citosólico ya que esta osciló entre 0.1 y 0.3 mM (Fig. 18 y 19).

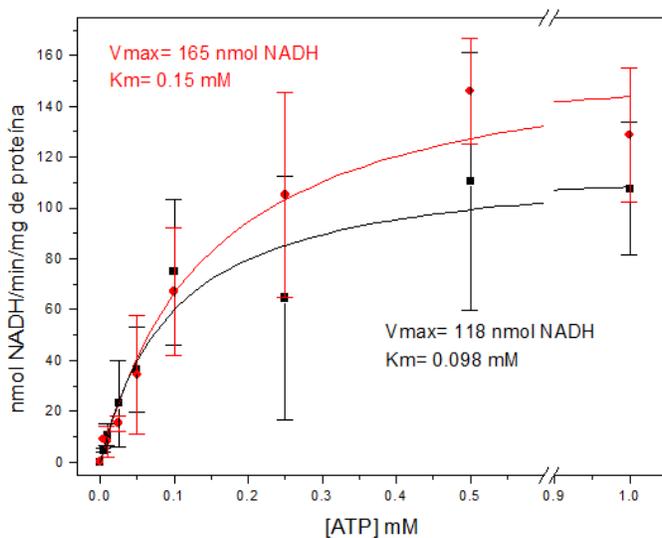


Fig. 18. Actividad de ATP-PFK determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 100 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de ATP contra actividad, a una concentración fija de Fru6P (5mM). Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

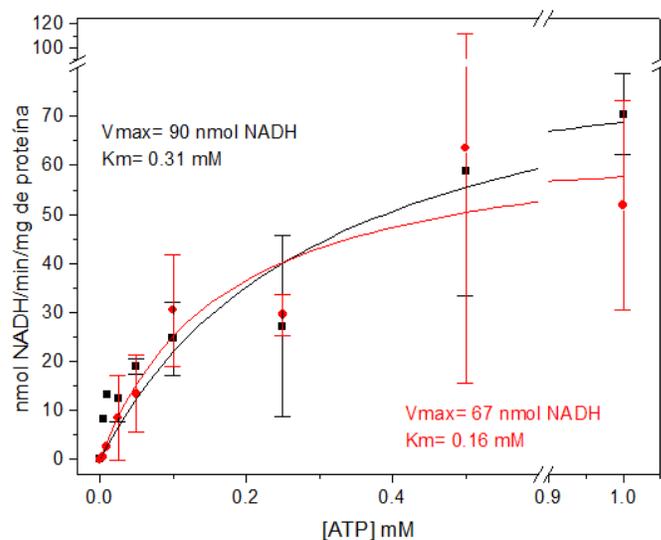


Fig. 19. Actividad de ATP-PFK determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 10 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de ATP contra actividad, a una concentración fija de Fru6P (5mM). Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

8.4.4 Fosfofructocinasa dependiente PPi

La actividad determinada en la PFK-1 dependiente de PPi resultó hasta 6 veces mayor que la determinada para la ATP-PFK-1, sugiriendo una mayor participación en la vía. Las actividades fueron semejantes entre una u otra fuente de carbono a concentraciones 100 mM, con 634 mU/mg de proteína y un valor de $Km_{Fru6P} = 2.3$ mM para los cultivos con glucosa y 568 mU/mg de proteína y un valor de $Km_{Fru6P} = 2.1$ mM para los cultivados en fructosa (Fig. 20) a una concentración fija de 1.5 mM PPi. En cuanto a las actividades obtenidas en los cultivos con 10 mM de fuente de carbono, al utilizar glucosa la actividad fue semejante que en los anteriores con 621 mU/mg de proteína; sin embargo, los cultivados en fructosa mostraron una actividad menor con 295 mU/mg de proteína, a pesar de que este valor es menor a comparación de los demás cultivos, su actividad fue 3 veces mayor que la ATP-PFK-1. En ambos cultivos el valor de la Km por Fru6P fue similar con 2.8 y 2.7 mM, respectivamente (Fig. 21). Esto nos indica que al cultivarse en glucosa o fructosa a

concentraciones altas o bajas se trata de la misma enzima la que se encuentra presente, ya que el valor de K_m por PPI no cambió en todos los cultivos.

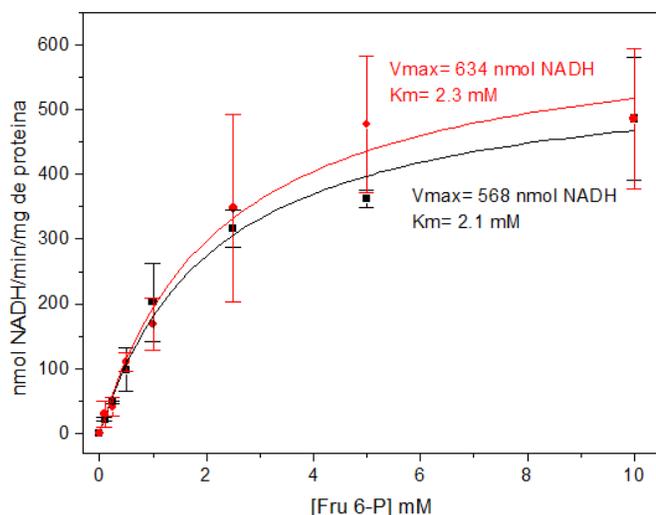


Fig. 20. Actividad de PPI-PFK-1 determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 100 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de Fru6P contra actividad, a una concentración fija de PPI (1.5mM). Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

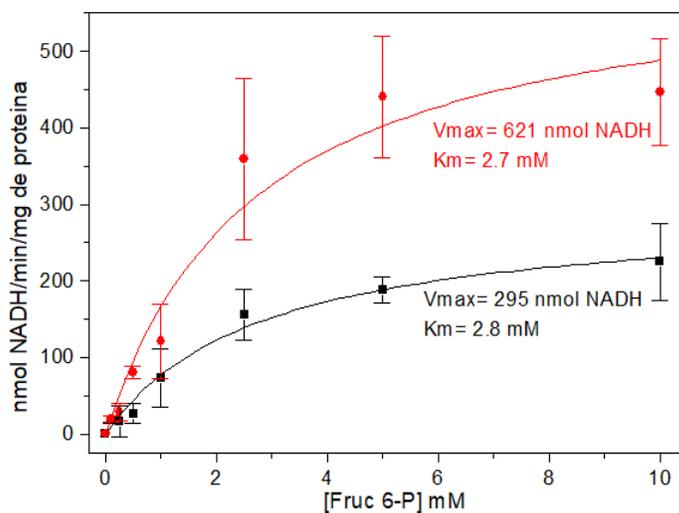


Fig. 21. Actividad de PPI-PFK-1 determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 10 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de Fru6P contra actividad, a una concentración fija de PPI (1.5mM). Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

En cuanto a la afinidad de esta enzima por PPI, en los cultivos con 100 mM, se obtuvieron valores de $K_{m_{PPI}} = 0.05$ y 0.02 mM para glucosa y fructosa respectivamente (Fig. 22). Utilizando 10 mM de fuente de carbono se obtuvo una $K_{m_{Fru6P}} = 0.047$ mM con glucosa y 0.013 mM con fructosa, siendo este cultivo donde se observó un ligero incremento en la afinidad de la enzima por este cofactor (Fig.23).

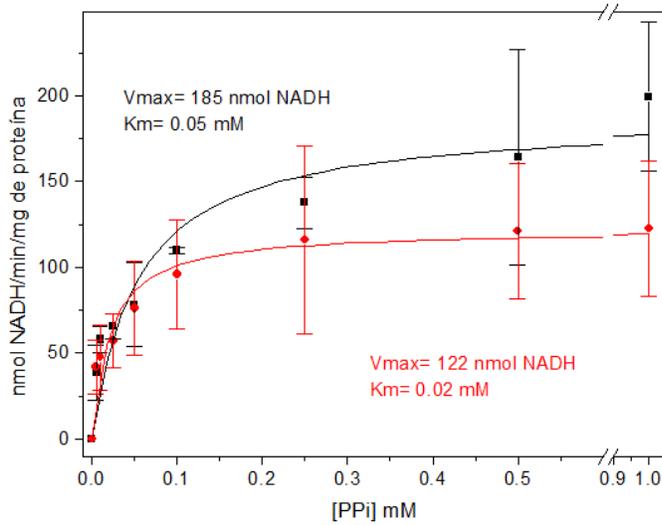


Fig. 22. Actividad de PPI-PFK-1 determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 100 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de PPI contra actividad, a una concentración fija Fru6P (5 mM). Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

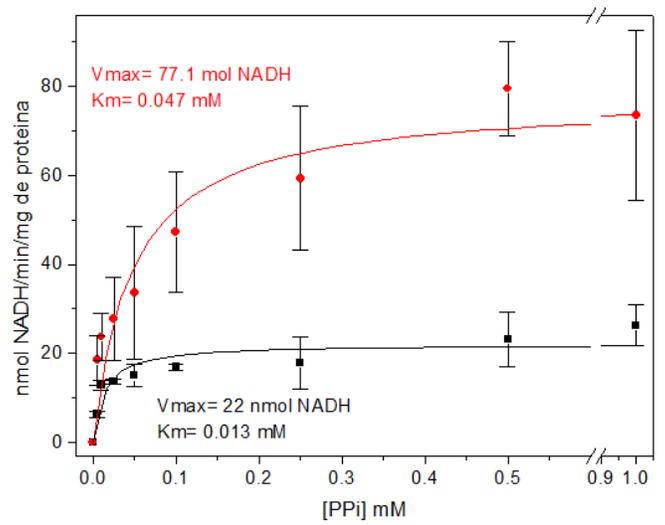


Fig. 23. Actividad de PPI-PFK-1 determinada en fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas en 10 mM de glucosa (●) o fructosa (■), respectivamente. Se grafica la concentración de PPI contra actividad una concentración fija de Fru6P (5mM). Los valores son el promedio \pm DS de 3 preparaciones independientes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando Origin 5.0 y la ecuación de Michaelis-Menten.

8.4.5 Resumen de actividades enzimáticas

A modo de resumen, se muestran las actividades de cada enzima en células de *E. gracilis* cultivadas con distintas fuentes de carbono (glucosa o fructosa) y a altas y bajas concentraciones (10 y 100 mM); además, se muestran los valores de K_m por sus respectivos sustratos (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de actividades enzimáticas evaluadas en *E. gracilis* Heterotrófica. Unidades de *Vmax* expresadas en mU/mg de proteína= nmol/min*mg de proteína, unidades de *Km* expresadas en mM. Los valores son el promedio \pm SD de 3 preparaciones independientes. Los valores fueron obtenidos con la ecuación de Michaelis-Menten en el programa de Origin 5.0.

Hexocinasa				
Cultivo	<i>Vmax</i>	<i>Km</i> (sustrato)	<i>Km</i> ATP	<i>Vmax/Km</i>
Gluc 100 mM	43 \pm 12	Glc 0.97 \pm 0.28	0.05 \pm 0.01	44.3
Gluc 10 mM	22 \pm 12	Glc 0.13 \pm 0.03	0.04 \pm 0.02	169
Fruc 100 mM	41 \pm 10	Fru 1.1 \pm 0.4	0.07 \pm 0.02	37.3
Fruc 10 mM	42 \pm 6	Fru 0.20 \pm 0.06	0.05 \pm 0.02	210
Hexosa Fosfato Isomerasa				
Cultivo	<i>Vmax</i>	<i>Km</i> (sustrato)		<i>Vmax/Km</i>
Gluc 100 mM	2358 \pm 978	Glc6P 0.31 \pm 0.02		7606
Gluc 10 mM	2355 \pm 994	Glc6P 0.18 \pm 0.09		13083
Fruc 100 mM	2189 \pm 308	Fru6P 0.38 \pm 0.08		5760
Fruc 10 mM	2291 \pm 651	Fru6P 0.17 \pm 0.05		13474
ATP-PFK-1				
Cultivo	<i>Vmax</i>	<i>Km</i> (sustrato)	<i>Km</i> ATP	<i>Vmax/Km</i>
Gluc 100 mM	107 \pm 30	Fru6P 2 \pm 0.8	0.18 \pm 0.06	53
Gluc 10 mM	47 \pm 26	Fru6P 0.5 \pm 0.4	0.16 \pm 0.05	94
Fruc 100 mM	114 \pm 38	Fru6P 3 \pm 1.1	0.098 \pm 0.04	38
Fruc 10 mM	90 \pm 36	Fru6P 1.3 \pm 0.9	0.31 \pm 0.11	69
PPi-PFK-1				
Cultivo	<i>Vmax</i>	<i>Km</i> (sustrato)	<i>Km</i> PPi	<i>Vmax/Km</i>
Gluc 100 mM	591 \pm 255	Fru6P 3 \pm 0.9	0.03 \pm 0.02	197
Gluc 10 mM	546 \pm 37	Fru6P 2.3 \pm 0.9	0.05 \pm 0.03	237
Fruc 100 mM	410 \pm 180	Fru6P 2.3 \pm 0.4	0.04 \pm 0.013	178
Fruc 10 mM	242 \pm 91	Fru6P 2.1 \pm 1.4	0.01 \pm 0.001	115

9. Discusión

Las densidades celulares de *E. gracilis* obtenidas en los cultivos con 100 mM de fuente de carbono no mostraron diferencia, ya que la cinética de crecimiento indica que la duplicación celular se llevó a cabo a la misma velocidad en el mismo tiempo de cultivo. Esto sugería que el metabolismo de estas hexosas aparentemente se lleva a cabo de la misma manera.

En los cultivos sin adaptación a bajas concentraciones de fuente de carbono se determinó que por debajo de concentraciones de 30-40 mM de sustrato el consumo y la duplicación celular se detuvo, sugiriendo que por debajo de estas concentraciones la glucosa y fructosa no son consumidas, resultados que coinciden con Jasso-Chávez y Moreno-Sánchez (2003) que reportaron el mismo comportamiento de *E. gracilis* cultivada en 75 mM glucosa. Esto podría explicarse por la presencia de un transportador de baja afinidad por estas hexosas, por lo que no detecta concentraciones bajas y no es completamente consumido comparado con otras fuentes de carbono como glutamato o malato, tal como sucede en *Entamoeba histolytica*, donde el transportador de glucosa es de baja afinidad, siendo un punto limitante en el consumo de glucosa (Reeves, 1974) y de igual modo en modelos cinéticos se ha mostrado un coeficiente alto de control sobre la vía (Saavedra *et al.*, 2005).

Este comportamiento cambió en los cultivos adaptados a baja concentración de fuente de carbono, mejorando el consumo de sustrato a concentraciones inferiores a 30 mM, coincidiendo con lo reportado por Graves (1977) y Kempner (1982) que sugieren que el consumo de glucosa exógena puede mejorar después de una adaptación de las células manteniéndolas en un tiempo prolongado a este sustrato como única fuente de carbono, aunado a que las condiciones de cultivo, como pH ácido, estimulan su consumo. Boehler y Danforth (1968) sugieren que se debe a la posible activación de un transportador específico, de alta afinidad a estos sustratos.

Las concentraciones de paramilo obtenidas en estos cultivos son similares a los reportados en estudios previos con una concentración máxima de $2 \text{ mg}_{\text{eq glucosa}}/10^7$ céls cultivadas en glucosa (Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez, 2003) y superiores a resultados obtenidos por Rodríguez-Zavala y cols (2010) quienes obtuvieron un rendimiento máximo de $0.624 \text{ mg}_{\text{eq glucosa}}/\text{L}$ de cultivo, utilizando un medio de glucosa suplementado con NH_4Cl .

En el caso de los cultivos 10 mM, la escasa producción del paramilo indica que *E. gracilis* oxida esta reserva por la vía glucolítica para continuar alimentando el metabolismo energético, debido a la poca concentración de fuente de carbono disponible, tal como menciona Vogel & Barber (1968) que la degradación del paramilo responde a las bajas concentraciones de glucosa libre en la célula y coincide con la disminución de fuente de carbono. Este resultado también es similar con el rendimiento obtenido por Feregrino-Mondragón (2019) quién utilizó desechos de cultivos con alto contenido protéico y bajas concentraciones de carbohidratos obteniendo un máximo de $1.5 \text{ g}_{\text{eq glucosa}}/\text{L}$ de cultivo.

En cuanto a las actividades enzimáticas, las actividades de la HK fueron semejantes en los cultivos con 100 mM y 10 mM y entre glucosa o fructosa como fuente de carbono, esto sugiere que la misma enzima fosforila ambas hexosas, tratándose de una HK no específica. Estas son similares a las reportadas por Graves (1978) quien encontró una actividad de 31.9 mU/mg de proteína utilizando glucosa como sustrato, además de ser valores superiores a los obtenidos cuando se utiliza acetato o etanol como fuente de carbono. En cuanto a la afinidad, en cultivos con 10 mM, el valor de *K_m* de estas enzimas por el sustrato fue ligeramente menor, lo que cual podría indicar una isoforma de la HK con mayor afinidad por estos sustratos que se activa después de un acondicionamiento a concentraciones bajas de fuente de carbono.

Estas actividades también podrían explicarse por la degradación del paramilo, al existir un déficit de sustrato exógeno el paramilo empieza a degradarse en glucosa libre por lo que es fosforilada por esta HK para continuar por su oxidación a través

de la glucólisis (Calvayrac *et al.*, 1981). En este trabajo no se encontró diferencia entre las actividades de la enzima utilizando glucosa o fructosa como sustrato, por lo que no se encontró actividad de una glucocinasa o fructocinasa específica como lo reporta Luchinni (1971), esto podría deberse a la fracción celular utilizada para los ensayos, ya que los resultados de Luchinni fueron obtenidos de una fracción soluble y otra particulada, mientras que en este trabajo se realizaron las mediciones en fracciones citosólicas enriquecidas.

La afinidad por ATP de la hexocinasa fue similar entre los distintos cultivos oscilando su K_m entre 0.04 y 0.07 mM de ATP, sugiriendo una alta afinidad por ATP ya que estos valores son similares a los reportados para otro protista como *E. histolytica* cuya hexocinasa tiene una K_m por ATP de 0.08mM (Saavedra *et al.*, 2005).

Pese a que se ha reportado que la HK puede inhibirse por su sustrato, en este estudio la actividad no se vio afectada por la glucosa 6 fosfato, utilizando concentraciones de hasta 50 mM. Este resultado se asemeja a la HKIV en mamíferos la cual no es sensible a altas concentraciones de G6P (TeSlaa & Teitell, 2014). Por otro lado, la HK también puede inhibirse por cofactores como el ATP, en este trabajo se utilizaron concentraciones de hasta 1 mM de ATP y se cuantificaron concentraciones intracelulares de 4 mM, por lo que podría haber probabilidad de que exista una regulación de la actividad por este cofactor, lo anterior, concuerda con lo reportado por Luchinni (1977) que menciona que las concentraciones del complejo Mg-ATP inhiben la actividad de la HK; sin embargo, hace falta realizar curvas de inhibición por ATP para demostrar este hecho.

La HPI parece no tener modificaciones en los distintos cultivos, ya que las actividades no variaron de una fuente de carbono a otra ni de las concentraciones de las mismas, Las actividades superaron hasta 3 veces los reportados para otros protistas como *Astasia longa*, cuya actividad reportada por Bégin-Heick (1969) fue de 704 mU/mg de proteína, de igual modo superan los valores de la HPI de otros protistas parásitos como *Leishmania donovani* de la cual se reporta una actividad

de 347.6 mU/mg de proteína (Kuile, 1999) y de *E. histolytica* que es de 608 mU/mg de proteína (Saavedra *et al.*, 2005).

Al realizar ensayos con 10 μ M eritrosa 4 fosfato disminuyó la actividad de la enzima, indicando que este metabolito es un inhibidor de la enzima tal como sucede en células de mamíferos (Chirgwin *et al.*, 1975; Marín-Hernández *et al.*, 2016).

La actividad medida de la ATP-PFK-1 fue hasta 4 veces mayor a los valores reportados para *E. gracilis* por Miyatake y colaboradores (1984) con actividades de hasta 120 mU/mg de proteína, actividades obtenidas bajo otras condiciones de cultivo y medición (presencia de luz, buffer a pH 6.5). Estos valores se asemejan a actividades reportadas para otros protistas como *Trypanosoma brucei* con una actividad de 60 mU/mg de proteína (Nwagwu & Opperdoes, 1982) y son mayores a la actividad de *T. cruzi* con valores de 42 mU/mg de proteína (Adroheret *et al.*, 1990).

Es posible que la actividad de la ATP-PFK-1 se vea afectada de forma alostérica por las concentraciones intracelulares de ATP, ya que en este trabajo se calcularon valores de 4 mM. Aunado a esto, se desconoce la concentración del ión Mg^{2+} intracelular por lo que podría haber grandes cantidades de ATP libre que esté actuando como inhibidor alostérico de la enzima, siendo un punto regulador en la vía.

Finalmente, las actividades de la PPI-PFK-1 fueron hasta 5 veces mayor para la ATP-PFK-1. Este resultado concuerda con lo reportado por Miyatake y cols (1984) y Enomoto (1988) que obtuvieron actividades de la dependiente de PPI de hasta 30 veces mayores sobre la dependiente de ATP. De igual modo, Mertens (1991) reporta que la PPI-PFK-1 tiene mayor eficiencia catalítica que la ATP-PFK, además esta enzima tiene participación en la vía glucolítica y la vía de la gluconeogénesis al realizar la reacción reversible fácilmente, pudiendo tener un rol importante en la regulación de estas vías (Miyatake *et al.*, 1984).

La *Km* determinada para la enzima PPI-PFK fue de 2 a 3 mM, valores superiores a los reportados por Miyatake y colaboradores (1984), con una *Km* de 0.025 mM. De

igual modo estos valores son mayores a los reportados para otros protistas como *E. histolytica* cuya K_m por su sustrato es de 0.4 a 0.7 mM (Saavedra *et al.*, 2005). Esto indica una baja afinidad de esta enzima por su sustrato que podría explicarse por las concentraciones de Fru6P que, si bien la concentración es suficiente para alcanzar la V_{max} , es menor a la concentración del producto de la enzima, la fructosa 1,6 bisfosfato que alcanza concentraciones de 5.5 a 7.2 mM, por lo que la reacción podría estar preferiblemente de reversa; sin embargo, para poder concluir esto es necesario realizar la cinética de la reacción en ambas direcciones. Otro punto que considerar es la afinidad de la enzima por el PPI, cuyo valor de K_m fue de 0.01 a 0.03 mM, valores ligeramente inferiores a lo reportado para *E. histolytica* cuya K_m por PPI es de de 0.05 mM. La concentración de PPI intracelular reportada para *E. gracilis* es de 0.53 μ M (Enomoto *et al.*, 1990), concentración menor a la K_m de la enzima, por lo que pudiese ser un punto limitante para la actividad de esta enzima y el flujo de la vía.

10. Conclusión

Este trabajo nos permite concluir que *E. gracilis* puede utilizar indistintamente glucosa y fructosa como fuente de carbono para su duplicación celular, inclusive estando en concentraciones menores de 30 mM. El consumo de concentraciones bajas de sustrato es dependiente de una previa adaptación a estos sustratos como única fuente de carbono.

La producción de paramilo es dependiente de la concentración de fuente de carbono, indistintamente si es glucosa o fructosa. En cultivos con alta concentración de fuente de carbono, la producción de paramilo inicia desde la fase exponencial y su oxidación inicia en la fase estacionaria del cultivo, una vez que la fuente de carbono llega a concentraciones no consumidas. Dado esto si el objetivo es la síntesis de grandes cantidades de paramilo, los cultivos de *E. gracilis* deben contener altas concentraciones de fuente de carbono.

Los resultados en las actividades enzimáticas sugieren que no hay cambios en la actividad enzimática de HK, siendo una misma enzima la responsable de fosforilar glucosa o fructosa; sin embargo, puede estar implicada en la mejora del consumo de la fuente de carbono a bajas concentraciones, ya que al cambiar la concentración de estas parece que se activa otra isoforma de la HK con mayor afinidad al sustrato.

No ocurre ningún cambio en la HPI dado que es la misma enzima en todos los cultivos, ya sea con diferente fuente de carbono o a distintas concentraciones, se conserva y dada su alta actividad no parece tener un control sobre el flujo glucolítico.

Por otro lado, la ATP-PFK parece expresarse del mismo modo que la HK, activándose una isoforma con distinta actividad y afinidad por su sustrato en cultivos con baja concentración de fuente de carbono; sin embargo, esta reacción es efectuada preferentemente por la PPI-PFK, por lo que no sería un paso limitante en el consumo de bajas concentraciones de hexosas. Finalmente, la actividad y

afinidad de la PPI-PFK parece conservarse en todos los cultivos, por lo que tampoco está implicada en la mejora del consumo de glucosa o fructosa.

Este trabajo nos amplía el campo de conocimiento de cómo es el consumo de hexosas y porqué se ve limitado en *E. gracilis* al estar en bajas concentraciones, sin embargo, para dilucidar completamente este control, hace falta evaluar otros parámetros cinéticos de estas enzimas, además de cuantificar la concentración de demás metabolitos implicados en la vía y evaluar la cinética del transportador.

11. Referencias

1. Adroher, F., Osuna, A. & Lupiáñez, J. (1990). Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. II. Hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 94(1): 71-82.
2. Aemiro, A., Watanabe, S., Suzuki, K., Hanada, M., Umetsu, K. & Nishida, T. (2016). Effects of *Euglena (Euglena gracilis)* supplemented to diet (forage: concentrate ratios of 60:40) on the basic ruminal fermentation and methane emissions in *in vitro* condition. *Animal Feed Science and Technology*, 212:129-135.
3. Aguilar, A. & Pérez, R. (2008). La contaminación agrícola del agua en México: retos y perspectivas. *Problemas del Desarrollo. Revista Latinoamericana de Economía*, 39(153) 205-215.
4. Bégin-Heick, N. (1969). Oxygen toxicity and carbon deprivation in *Astasia longa*. *Canadian Journal of Biochemistry*, 48.
5. Boehler, R. & Danforth, W. (1968). Glucose utilization by *Euglena gracilis* var. bacillaris: Short-Term Metabolic studies. *Journal of Protozoology*, 15(1): 153-158.
6. Bouck, G. (1982). Flagella and the Cell Surface. En: Buetow, D (Eds.) *The biology of Euglena*. Academia Press.
7. Calvayrac, R., Laval-Martin, D., Briand, J. & Farineau, J. (1981). Paramylon synthesis by *Euglena gracilis* photoheterotrophically grown under low O₂ pressure. *Planta*, 153: 6-13.
8. Chirgwin, J., Parsons, F. & Noltmann, E. (1974). Mechanistic implications of the pH independence of inhibition of phosphoglucose isomerase by neutral sugar phosphates. *The Journal of Biological Chemistry*, 18(250).
9. Comisión Nacional del Agua. (2016). Estadísticas del agua en México, edición 2016. SEMARNAT, México. Consultado el 26 de agosto de 2017. Recuperado de: http://201.116.60.25/publicaciones/EAM_2016.pdf

10. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. CONACYT. (2015). [en línea] <http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/ambiente/74-en-mexico-solo-el-20-de-las-aguas-residuales-son-tratadas>
11. Dean, P., Major, P., Nakjang, S., Hirt, R. & Embley, M. (2014). Transport proteins of parasitic protists and their role in nutrient salvage. *Frontiers in Plant Science*, 5.
12. Enomoto, T., Kakihara, K., Miyatake, K. & Kitaoka, S. (1988). Occurrence and Characterization of Fructose 6-Phosphate, 2-Kinase and Fructose 2,6-Biphosphatase in *Euglena gracilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 92(3): 477-480.
13. Feregrino-Mondragon R. (2019). Remoción de materia orgánica por *E. gracilis* heterotrófica a partir de desechos de cultivos celulares. (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
14. Garibay, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez, M., Serrano, L. & Martínez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *Bio Tecnología*, 13 (3) 38-61
15. Gissibl, A., Sun, A., Care, A., Nevalainen, H. & Sunna, A. (2019). Bioproducts From *Euglena gracilis*: Synthesis and Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(108).
16. Graves, L. (1977). Effects of Different Substrates on Glucose Uptake and Hexokinase Activity in *Euglena gracilis*. *Journal of Protozoology*, 18(3), 534-546.
17. Grenson, M. (1964). Physiology and Cytology of Chloroplast Formation and “Loss” in *Euglena*. *International Review of Cytology*. 16:37-59.
18. Hurlbert, R. & Rittenberg, S. (1962). Glucose Metabolism of *Euglena gracilis* var. *bacillaris*; Growth and Enzymatic Studies*. *The Journal of Protozoology*, 9(2), 170-182
19. Jahreis, K., Pimentel-Schmitt, E., Brückner, R. & Titgemeyer, F. (2008). Ins and outs of glucose transport systems in Eubacteria. *FEMS Microbiological reviews*, 32: 891-907.

20. Jasso-Chávez, R. (2004). *Participación de las deshidrogenasas lácticas mitocondriales de Euglena gracilis en el metabolismo energético* (Tesis de Doctorado). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
21. Jasso-Chávez, R. & Moreno-Sánchez, R. (2003). Cytosol-mitochondria transfer of reducing equivalents by a lactate shuttle in heterotrophic *Euglena*. *European Journal of Biochemistry*, 270 4942-4951.
22. Kempner, E. (1982). Simulation and inhibition of Metabolism and Growth of *Euglena gracilis*. En: Buetow, D (Eds.) *The biology of Euglena*. Academia Press, New York.
23. Kirk, J. (1962). Effect of streptomycin on greening and biosynthesis in *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 56: 139-151.
24. Kuile, B. (1999). Regulation and Adaptation of Glucose Metabolism of the Parasitic Protist *Leishmania donovani* at the Enzyme and mRNA Levels. *Journal of Bacteriology*, 181(16): 4863-4872.
25. Leedale, G. (1982). Ultrastructure. En: Buetow, D (Eds.) *The biology of Euglena*. Academia Press, New York.
26. Lira-Silva, E., Ramírez-Lima, I., Olín-Sandoval, V., García-García, J., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R & Jasso-Chávez, R. (2011). Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*. *Journal of Hazardous Materials*, 193: 216-224.
27. Lucchini, G. (1971). Control of glucose phosphorylation in *Euglena gracilis* I. Partial characterization of a glucokinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 242, 365-370.
28. Marín-Hernández, A., Rodríguez-Zavala, J., Mazo-Monsalvo, I., Rodríguez-Enríquez, S., Moreno-Sánchez, R. & Saavedra, E. (2016). Inhibition of non-flux-controlling enzymes deters cancer glycolysis by accumulation of regulatory metabolites of controlling steps. *Frontiers in Physiology*, 7(412).
29. Matsuda, F., Hayashi, M. & Kondo, A. (2011). Comparative Profiling Analysis of Central Metabolites in *Euglena gracilis* under Various Cultivations

- Conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75 (11), 2253-2256.
30. Mertens, E. (1991). Hypothesis. Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme?. *Elsevier Science Publisher*. 285(1): 1-5.
31. Miyatake, K., Enomoto, T. & Kitaoka, S. (1984). Detection and Subcellular Distribution of Pyrophosphate: D-Fructose 6-Phosphate Phosphotransferase (PFP) in *Euglena gracilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48 (11), 2857-2859.
32. Morgan, J. & Tukey, H. (1964). Characterization of Leachate from Plant Foliage. *Plant Physiology*, 39(4), 590–593.
33. Nelson, D. & Cox, M. (2012). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th edition, W.H. Freeman and Company, New York.
34. Nwagwu, M. & Opperdoes, F. (1982). Regulation of glycolysis in “*Trypanosoma brucei*”: hexokinase and phosphofructokinase activity. *Acta - Tropica*. 39, 61-72.
35. Peña, Rosa. (2010). *Implementación de un sistema para la remoción de materia orgánica y nutrientes en aguas residuales municipales* (Tesis de Maestría). Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
36. Ragan, A. & Chapman, D. (1978). *A Biochemical phylogeny of the protists*. Academia Press, New York.
37. Reeves, R. (1974). Glycolytic Enzymes of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research*, 5:411-414.
38. Rodríguez-Zavala, J., Ortiz-Cruz, M., Mendoza-Hernández, G. & Moreno-Sánchez, R. (2010). Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 2160-2172.
39. Sahoo, D. & Seckbach, J. [Eds]. (2015). *The Algae World*. Springer, Dordrecht.

40. Santiago-Martínez, M., Lira-Silva, E., Encalada, R., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J., Zepeda-Rodríguez, A., Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E. & Jasso-Chávez, R. (2015). Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 288,104-112.
41. Saavedra, E., Encalada, R., Pineda, E., Jasso-Chávez, R. & Moreno-Sánchez, R. (2005). Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS Journal*. 272: 1767-1783.
42. Takeyama, H., Kanamaru, A., Yoshino, Y., Kakuta, H., Kawamura, Y. & Matsunaga. (1997). Production of Antioxidant Vitamins, β -carotene, Vitamin C and Vitamin E, by Two-Step culture of *Euglena gracilis* Z. *Biotechnology and Bioengineering*, 53(2), 185-190.
43. TeSlaa, T. & Teitell, A. (2014). Techniques to Monitor Glycolysis. En Jameson, D. (Eds.), *Methods in Enzymology* (pp. 91-114). Academia Press.
44. Torres, P., Rodríguez, A., Barba, L., Morán, A. y Narváez, J. (2005). Tratamiento anaerobio de lixiviados en reactores UASB. *Ingeniería y Desarrollo. Universidad del Norte*. 18, 20-60.
45. Tucci, S., Vacula, R., Krajcovic, J., Proksh, P. & Martin, W. (2010). Variability of wax ester fermentation in natural and bleached *Euglena gracilis* strains in response to oxygen and the elongase inhibitor flufenacet. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(1), 63-69.
46. Vogel, K. & Barber, A. (1968). Degradation of Paramylon by *Euglena gracilis*. *Journal of Protozoology*, 15(4): 657-662.
47. Wang, Y., Seppänen-Laakso, T., Rischer, H. & Wiebe, M. (2018). *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions. *PLOS ONE*, 13(4).
48. Yoval-Sánchez, B., Jasso-Chávez, R., Lira-Silva, E., Moreno-Sánchez, R. & Rodríguez-Zavala, J. (2011). Novel mitochondrial alcohol metabolizing enzymes of *Euglena gracilis*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 42(4), 261-354.

49. Zakryś, B., Milanowski, R. & Karnkowska, A. (2017). Evolutionary Origin of Euglena. En: Schwartzbach, D. & Shigeoka, S. (Eds.), Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology (pp. 3-19). Springer International Publishing.

12. Apéndice

12.1 Apéndice I. Composición del medio de cultivo Hutner.

- Solución stock K

2.94 mM fosfato monopotásico (KH_2PO_4)

- Solución stock N

0.76 mM fosfato diamónico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)

- Solución stock M

1.01 mM sulfato de magnesio (MgSO_4)

- Solución mineral A

0.138 mM sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$)

0.236 mM sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$)

0.0412 mM molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$)

0.0034 mM cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 - 6\text{H}_2\text{O}$)

- Solución mineral B

0.015 mM sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$)

0.048 mM ácido bórico (H_3BO_4)

0.08 mM yoduro de sodio (NaI)

- Solución de vitaminas (mg/100mL)

100 mg tiamina (B1)

50 mg cloruro férrico (FeCl_3)

100 μL (2 mg) stock al 2% de cianocobalamina (B12)

- Stock CaCl_2

100 mM cloruro de calcio (CaCl_2)