

Tesis de Posgrado

Estudio y mejoramiento genético de levaduras osmotolerantes

Loray, María Alicia

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Loray, María Alicia. (2002). Estudio y mejoramiento genético de levaduras osmotolerantes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3440_Loray.pdf

Cita tipo Chicago:

Loray, María Alicia. "Estudio y mejoramiento genético de levaduras osmotolerantes". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3440_Loray.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



*Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas*

*Estudio y mejoramiento genético
de levaduras osmotolerantes*

Autor: Lic. María Alicia Loray

*Director: Dra. Lucía Castellanos de Figueroa
Co-director: Prof. Dr. Milan Höfer*

*Tesis para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires*

2002

Nº 3440



*Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas*

*Study and genetical improvement
of osmotolerant yeasts*

Author: Lic. María Alicia Loray

*Director: Dra. Lucía Castellanos de Figueroa
Co-director: Prof. Dr. Milan Höfer*

*Doctoral Thesis
Universidad de Buenos Aires*

2002

RESÚMEN

Entre las levaduras existen especies osmotolerantes como *D. hansenii*, *T. delbrueckii*, *S. octosporus*, y especies consideradas no osmotolerantes como, por ejemplo, *S. cerevisiae*. Algunas levaduras osmotolerantes son utilizadas en la producción de determinados productos alimenticios mientras otras se encuentran como organismos contaminantes en varios alimentos. Sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura empleada tradicionalmente en la industria para la producción de diversos productos. Algunos de estos bioprocesos se desarrollan en medios con alta presión osmótica y esto limita su rendimiento en los procesos mencionados.

Se realizaron diversas fusiones de protoplastos entre levaduras osmotolerantes y diferentes cepas industriales de *S. cerevisiae* con el objeto de obtener híbridos que reúnan características de interés industrial de ambos parentales, para luego caracterizarlos principalmente en cuanto a su comportamiento en medios hiperosmóticos.

Las fusiones de protoplastos realizadas entre las levaduras *S. cerevisiae* P-158 y *Torulaspora delbrueckii* CBS-813 y entre *S. cerevisiae* UCD-522 y *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7393, dieron como resultado productos de fusión estables que adquirieron el carácter osmotolerante. Estos productos de fusión y las cepas parentales fueron estudiados con respecto a su tolerancia osmótica y a otros aspectos fisiológicos como: morfología, asimilación y fermentación de azúcares, patrones electroforéticos de cromosomas y proteínas, cinética de crecimiento en medios de diferente osmolaridad, producción de polihidroalcoholes y mecanismos de transporte de monosacáridos a través de la membrana plasmática. Al estudiar el efecto que tienen elevadas concentraciones de NaCl sobre el funcionamiento celular y el desarrollo del cultivo se observó: disminución de la $\mu_{\max}$ de crecimiento; disminución del rendimiento en la producción de biomasa; aumento de la síntesis y de la retención intracelular de polioles; alteración del potencial de membrana ($\Delta\psi$) de las células; alteración del transporte de monosacáridos; disminución de la velocidad de consumo específico de oxígeno en presencia de glucosa; alteración de los patrones electroforéticos de proteínas totales y de membrana plasmática.

Palabras clave: Levaduras - osmotolerancia - halotolerancia - osmorregulación - polioles - fusión de protoplastos - transporte a través de membrana.

ABSTRACT

The most useful yeast for the industry is still being *Saccharomyces cerevisiae*, however this specie is not osmotolerant, and because some particular industrial processes are carried out on high osmotic environment, the yields of those processes are not as high as desired.

There are some osmotolerant yeast species like *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Schizosaccharomyces octosporus*. Some of them are used on food manufacturing industry, but also are found as contaminant on other processes.

The aim of this work was to develop yeast strains capable to being used as *S. cerevisiae* but also with the osmotolerant characteristic. We have carried out protoplast fusion between different industrial strains of *S. cerevisiae* and osmotolerant yeasts and we studied and characterized the obtained hybrids.

The fusion between *S. cerevisiae* P-158 and *T. delbruecki* CBS-813, and between *S. cerevisiae* UCD-522 and *D. hansenii* NRRL Y-7393, yielded stabled hybrids which showed the desired characteristics of the parental strains.

The fusion products as wells as their parental strains were studied in order to characterize their physiological behavior in high osmotic environments and also in general aspects as morphology, sugar assimilation and fermentation, proteins and chromosomal electrophoretical profiles, growth kinetics, polyhydroxyalcohols production and monosaccharides membrane transport mechanism.

Studying the impact of high NaCl concentrations to the cell physiology, we observed that the maximum specific growth rate and the biomass yields decreased; the synthesis and accumulation of intracellular poliols increased; a membrane potential were modified; the monossaccharides transport were altered; the specific comsuption oxygen rate in media contained glucose decreased and that the electrophoretical profiles of total and plasmatic membranes proteins were modified.

Key words: Yeasts - osmotolerance - halotolerance - osmoregulation - polyols - membrane transport - protoplast fusion.

Este trabajo de tesis doctoral fue realizado en la Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI), Tucumán, Argentina y en el Botanisches Institut der Universität Bonn, Alemania, con el aporte financiero del Programa BID-CONICET II, del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT), del Servicio Alemán de Intercambio Académico (Deutscher Akademischer Austauschdienst, DAAD), de la Unión Europea y de PROIMI.

A mis padres

A mi esposo

A nuestros dos hijos

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Lucía Inés Castellanos de Figueroa, por haber confiado en mí y por haberme apoyado siempre, en lo personal y en lo laboral, a través de estos largos años y aún a la distancia. También a ella agradezco el haberme dado la invaluable oportunidad de viajar a Alemania y realizar allí parte de este trabajo.

Al Prof. Dr. Milan Höfer por haberme abierto las puertas de su laboratorio en Bonn y por la co-dirección de este trabajo.

Al Dr. Faustino Siñeríz quien como director de PROIMI me permitió formar orgullosamente parte de su personal.

Al Ing. Danley A.S. Callieri por haberme dado un lugar dentro del grupo de Genética de Levaduras y por su aporte profesional.

Al Dr. Mario Baigorí por su aporte científico a este trabajo y por su amistad.

A Claudio Delfini y Erika Gießler-Andersen por su soporte técnico y por el afecto que me brindaron.

A todos mis compañeros y amigos de PROIMI y del Botanisches Institut.

A Linda Hughes por su cariño y por estar y colaborar conmigo siempre que la necesité.

A Virginia Sánchez y Cecilia Carmarán por su amistad y colaboración

A Luis Ducrey por su apoyo y comprensión como esposo y por su aporte profesional a este trabajo.

A Ian e Ivana por la paciencia brindada a su mamá durante todo este tiempo.

A Níobe, Marcelo, Alicia y Norberto quienes con su trabajo y dedicación de abuelos me permitieron encontrar el tiempo necesario para poder concluir la escritura de esta tesis.

A la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por haberme formado profesionalmente.

A la Universidad Nacional de Tucumán por el aporte financiero.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (Deutscher Akademischer Austauschdienst, DAAD) por el aporte financiero.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Levaduras

1.1. Definición y taxonomía

1.2. Biodiversidad y hábitats

1.3. Levaduras y biotecnología

1.4. Características celulares

1.5. Membranas de levadura

1.5.1. Composición química de las membranas en levaduras

1.5.2. Mecanismos de transporte de solutos a través de membrana

Difusión (física) simple

Transporte mediado por proteínas

Transporte activo

2. Osmotolerancia y osmorregulación

2.1. Osmorregulación

2.2. Osmotolerancia

3. Levaduras osmotolerantes

3.1. Osmorregulación en levaduras

3.1.1. Acumulación de solutos compatibles. Polioles

3.1.2. Metabolismo del glicerol

Producción de glicerol

Permeabilidad al glicerol

Transporte de glicerol

3.1.3. Cambios metabólicos inducidos por el estrés osmótico

4. Breve descripción de las levaduras estudiadas en este trabajo

Género *Torulaspora*

Género *Debaryomyces*

Género *Saccharomyces*

BIBLIOGRAFÍA

OBJETIVOS GENERALES

CAPÍTULO I - Selección y mejoramiento de cepas de levadura	53
OBJETIVOS	54
MATERIALES Y MÉTODOS	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
A- Caracterización de levaduras de acuerdo a su capacidad osmotolerante	60
B- Modificación y mejoramiento genético de levaduras	64
i) Obtención de protoplastos de <i>T. delbrueckii</i>	64
ii) Fusión de protoplastos	67
I- <i>S. cerevisiae</i> P-158 (levadura de pan) y <i>S. octosporus</i> - Zig 1 (azúcar tolerante)	67
II- <i>S. cerevisiae</i> -522 (levadura de vino) y <i>D. hansenii</i> (halotolerante)	70
III- <i>S. cerevisiae</i> P-158 (levadura de pan) y <i>T. delbrueckii</i> (azúcar y halotolerante)	72
BIBLIOGRAFÍA	74
 CAPÍTULO II - Caracterización de las cepas parentales de fusión y de los híbridos	77
OBJETIVO	78
MATERIALES Y MÉTODOS	78
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84
A- Caracterización de los híbridos obtenidos luego de la fusión de protoplastos entre <i>D. hansenii</i> NRRL Y-7393 y <i>S. cerevisiae</i> UCD-522	84
I. Caracterización morfológica	85
II. Crecimiento en diferentes condiciones de presión osmótica	86
III. Pruebas bioquímicas	88
IV. Electroforesis de campo pulsado (PFGE)	90
V. Cinética de crecimiento	92
B- Caracterización de los híbridos obtenidos luego de la fusión de protoplastos entre <i>T. delbrueckii</i> CBS 813 y <i>S. cerevisiae</i> P-158	100
BIBLIOGRAFÍA	106
 CAPÍTULO III - Transporte de monosacáridos	109
OBJETIVO	111
MATERIALES Y MÉTODOS	112
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	124
I) Transporte de monosacáridos	124
a) Transporte de D-xilosa y 2-DG	124

b) Transporte de intercambio.....	128
c) Alteración del consumo de D-glucosa por la presencia de competidores.....	131
II) Cinética del transporte de D-xilosa y de D-glucosa.....	134
a) Cinética de D-xilosa.....	134
b) Cinética de D-glucosa.....	135
III) Efecto del NaCl sobre el transporte de monosacáridos.....	137
a) Cinética del transporte de D-glucosa en condiciones de estrés de sal.....	137
b) Transporte de D-xilosa, glucosa y 2-DG en presencia de elevada concentración de NaCl.....	138
c) Consumo de oxígeno en células ayunadas de <i>D. hansenii</i> y HM92 en presencia y ausencia de NaCl.....	150
IV) Análisis del mecanismo de transporte activo de glucosa, en las dos cepas halotolerantes: Evidencia de cotransporte H^+ /glucosa.....	155
BIBLIOGRAFÍA.....	161
 CAPÍTULO IV - Transporte de glicerol	165
OBJETIVOS.....	167
MATERIALES Y MÉTODOS.....	168
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	170
1) Transporte de glicerol al interior de las células en presencia o ausencia de estrés osmótico.....	170
2) Crecimiento en medios de cultivo con glucosa o glicerol como fuente de carbono y con distintas concentraciones de NaCl.....	179
BIBLIOGRAFÍA.....	182
 CAPÍTULO V - Síntesis de proteínas en medios hiperosmóticos	185
OBJETIVO.....	186
MATERIALES Y MÉTODOS.....	186
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	192
A) Proteínas totales.....	192
B) Proteínas de membrana plasmática.....	194
BIBLIOGRAFÍA.....	197
 CONCLUSIONES	198

ABREVIATURAS

$\Delta\psi$: potencial de membrana [mV]
 $\Delta\mu\text{H}^+$: gradiente electroquímico del H^+
 ΔpH : gradiente de pH
 μ_{max} : velocidad específica máxima de crecimiento [h^{-1}]
2-DG : 2-deoxi-D-glucosa
abs. : absorbancia
 a_w : actividad de agua
C : coulomb
c.c.o. : consumo específico de oxígeno
c.o.f. : células osmóticamente frágiles
cel/ml : número de células por mililitro
CHEF : Clamped Homogeneous Electrophoresis Field
DNP : 2-4-dinitrofenol
FIGE : Field Inverted Gel Electrophoresis
J : joule
Kb : kilobases
kda : kilodalton
 K_T : constante media de saturación del sistema de transporte [mM]
PF : producto de fusión
PFGE : electroforesis de campo pulsado (Pulse Field Gel Electrophoresis)
 pH_O : pH extracelular de saturación
 pK_a : constante media aparente de saturación con H^+ del transportador
pmf : fuerza motora del H^+
ps : peso seco [g/l]
rpm : revoluciones por minuto
S : concentración de sustrato [mM]
 S_e : concentración extracelular de sustrato [mM]
 S_i : concentración intracelular de sustrato [mM]
TPP⁺ : tetrafenilfosfonio
 v : velocidad de transporte [$\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]
V : voltio
 V_{max} : velocidad máxima de transporte [$\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]
 $Y_{p/s}$: rendimiento de producto en función del sustrato
 $Y_{x/s}$: rendimiento de biomasa en función del sustrato

INTRODUCCIÓN

1. Levaduras

1.1. Definición y taxonomía

Las levaduras constituyen un grupo heterogéneo de organismos incluido en el reino Hongos, división Eumycota. Son organismos unicelulares carentes de clorofila, característica que los obliga a una vida saprófita o parásita. Tienen pared celular gruesa, un núcleo bien organizado, y no poseen medio de locomoción. Se reproducen sexualmente por medio de esporas y vegetativamente por brotación, fisión o por un proceso intermedio entre los anteriores (brotación-fisión). El tipo de reproducción mitótica depende del género (Phaff *et al.*, 1978; Rose, 1969).

Desde el punto de vista taxonómico las levaduras se dividen de acuerdo a su reproducción sexual (Ascomycotina o Basidiomycotina) o por falta de ciclo sexual conocido (Deuteromycotina). Las categorías taxonómicas inferiores se basan en las distintas características morfológicas, fisiológicas y genéticas (Barnett, 1992).

1.2. Biodiversidad y hábitats

Hasta el presente se han descripto alrededor de 700 especies de levaduras aunque estas representan sólo una fracción de la diversidad de levaduras existentes en el planeta. Se

calcula que dentro de los ascomycetes existen alrededor de 62.000 géneros y 669.000 especies aún no descriptas (Walker, 1998).

Dentro de algunas especies descriptas no se conoce bien la relación que hay entre la biodiversidad genética y fisiológica de las células. Por ejemplo, se desconoce la función de alrededor del 50% de los 6.000 genes identificados en el proyecto del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (Walker, 1998). Esto demuestra que aún existen propiedades desconocidas de estos organismos explotados por el hombre durante miles de años.

Aunque las levaduras no son tan ubicuas como las bacterias, están distribuidas ampliamente en los ambientes naturales. Las células de levadura no poseen clorofila (no son fotosintéticas) y son estrictamente quimiorganotróficas, es decir, que para crecer requieren formas orgánicas de carbono. Las fuentes de carbono que pueden metabolizar las levaduras son diversas e incluyen: azúcares simples y compuestos, polioles, ácidos orgánicos y grasos, alcoholes alifáticos, hidrocarburos y varios compuestos poliméricos y heterocíclicos. Las levaduras son capaces de utilizar distintas fuentes de carbono y la selectividad nutricional determina la diversidad de especies en nichos determinados, o sea que tienen gran especialización de hábitat (Phaff *et al.*, 1978). Por otra parte, como carecen de movilidad, estos microorganismos dependen de vectores animales o de la actividad humana para su dispersión natural (Walker, 1998).

1.3. Levaduras y biotecnología

El término "levaduras" generalmente se asocia al de fermentación. Esto se debe a que estos organismos han sido empleados por siglos, en casi todo el mundo, en diversos procesos fermentativos destinados a la fabricación de bebidas (vino, cerveza, sake, etc.), de pan, miso y otras comidas. Sin embargo, durante mucho tiempo, se ignoró por completo su naturaleza. Recién a partir del siglo XIX las levaduras se convirtieron en objeto de especial atención científica con las contribuciones de Cagniard de la Tour, Kotzing y Schwann sobre aspectos morfológicos y reproductivos, y de Pasteur acerca de su metabolismo (Phaff *et al.*, 1978, Oliver, 1991).

A lo largo del siglo XX los avances científicos y tecnológicos se vieron reflejados en el desarrollo de la industria cervecera y demás industrias relacionadas. Sin embargo, en los últimos años la importancia industrial de las levaduras se extendió más allá de los usos tradicionales de la fermentación hacia otras áreas de importancia económica (Figura 1).

Los productos biotecnológicos obtenidos a partir de levaduras influyen sobre diversos sectores de interés comercial como: alimentos, bebidas, químicos, enzimas industriales, productos farmacéuticos, agro y medio ambiente. La diversidad de los procesos metabólicos de las levaduras se refleja en la variedad de tecnologías que se desarrollan a partir de estos organismos.

Aunque *S. cerevisiae* ha sido y aún es la especie de levadura más explotada por la industria, otras levaduras están teniendo importantes papeles en la biotecnología moderna (Walker, 1998).

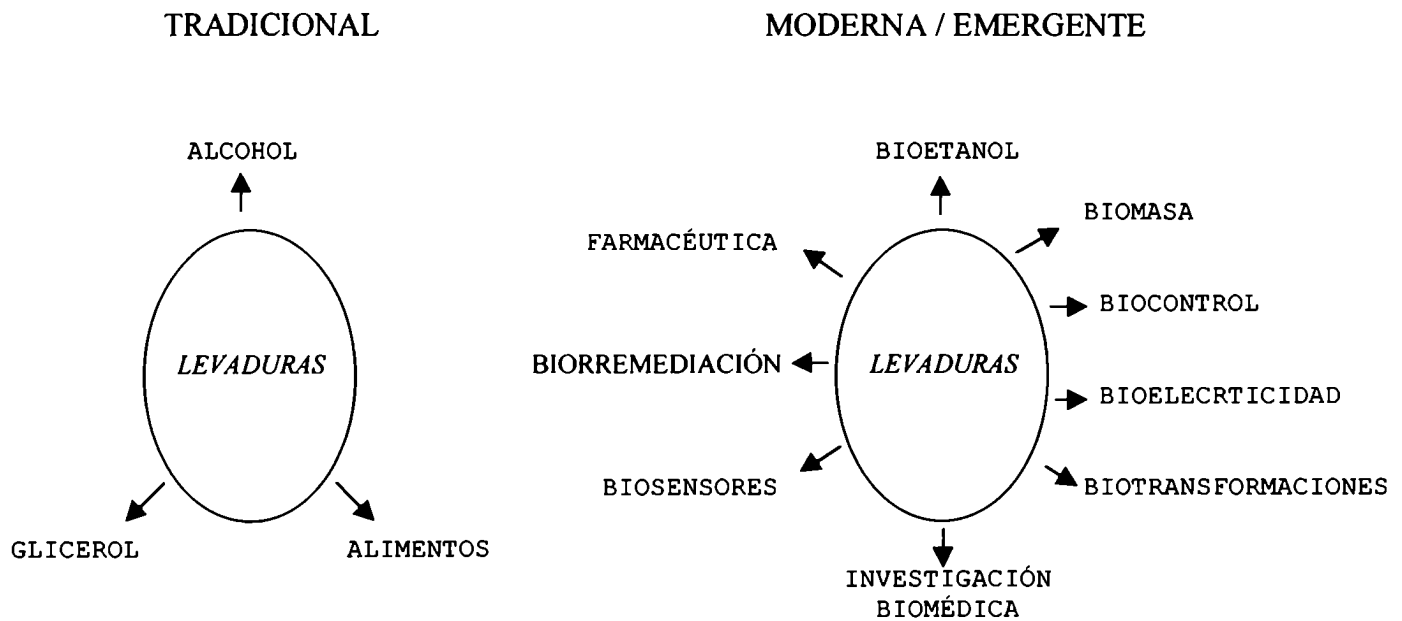


Figura 1: Diferentes aplicaciones de las levaduras en biotecnología

1.4. Características celulares

Las células de levadura poseen una gran diversidad en cuanto al tamaño, forma y color. Aún células individuales de una cepa pura de una especie particular pueden presentar heterogeneidad morfológica y colorimétrica. Los efectos más profundos sobre la morfología celular son provocados por alteraciones de las condiciones ambientales físicas y químicas.

El tamaño celular puede variar ampliamente. Phaff *et al.* (1978) establecieron que algunas levaduras miden entre de 2-3 μm de largo mientras otras especies pueden alcanzar 20-50 μm . El ancho celular es menos variable con un rango entre 1-10 μm .

Las levaduras que pertenecen a los ascomycetes tienen un ciclo de vida bifásico, una fase asexual o mitótica y otra sexual. La característica sexual está dada por el "tipo conjugante", por ejemplo las células a , α y a/α de *S. cerevisiae*. Las células haploides a y α pueden sufrir apareamiento (mating), un proceso que culmina con la fusión nuclear y la creación del diploide a/α .

Con respecto a la forma celular, las levaduras pueden ser: elipsoidales/ovoideas (especies de *S. cerevisiae*), cilíndricas con extremos hemiesféricos (*Schizosaccharomyces*), apicales/forma de limón (*Hanseniaspora* y *Saccharomyces*), ojivales (*Dekkera* y *Brettanomyces*), forma de botella (células dividiéndose por brotación-fisión, ej. *Pityrosporum*), triangulares (*Trigonopsis*), curvadas (*Cryptococcus creanensis*), filamentosas (con pseudohifas e hifas ceptadas, ej. *Candida albicans* y *Yarrowia lipolytica*), esféricas (*Debaryomyces*) o elongadas (varias levaduras dependiendo de las condiciones de crecimiento). La diferenciación celular de formas vegetativas a células de levadura en formas filamentosas (tubos germinales, pseudohifas e hifas verdaderas) ocurre en diversas especies de levadura. Un comportamiento polimórfico se origina como consecuencia por cambios nutricionales en el ambiente y hasta ocurre en la normalmente elipsoidal *S. cerevisiae*.

Varias levaduras son pigmentadas como por ejemplo *Phaffia rhodozyma* que produce un pigmento denominado astaxantina con diversos usos en biotecnología.

1.5. Membranas de levadura

Todas las células están rodeadas por la membrana plasmática, una estructura que es esencial para su viabilidad y funcionamiento. Sus funciones más importantes son las de separar el citoplasma del ambiente circundante y controlar el pasaje selectivo de nutrientes y la exportación de productos metabólicos (frecuentemente de alto valor económico). La membrana plasmática no es la única estructura membranosa de una célula. En el citoplasma de microorganismos eucariotas, el núcleo celular, mitocondrias, vacuolas, el complejo de Golgi y otros compartimentos están rodeados por membranas que, de acuerdo a sus propiedades particulares de permeabilidad, determinan tareas específicas en coordinación con el metabolismo celular. Esta habilidad de los diferentes sistemas de membranas representa una de las características más importantes para uso tecnológico de los microorganismos.

Las membranas biológicas que rodean las células y las que están en su interior aseguran que una reacción bioquímica particular, dentro de un compartimento dado, pueda ocurrir sin ser perturbada por otras reacciones de otros compartimentos. El intercambio de intermediarios entre los compartimentos es mediado por los transportadores catalíticos unidos a membranas que son llamados transportadores y canales que realizan la permeabilidad selectiva de las membranas biológicas. Otro importante papel de las membranas biológicas en el control del metabolismo celular es proveer del marco estructural para los complejos multienzimáticos tales como la cadena respiratoria o la fotosíntesis (en plantas).

La membrana plasmática representa la estructura celular más externa que está en contacto inmediato con el medio circundante. En términos de su ubicación, la membrana plasmática es probablemente la membrana más importante para propósitos biotecnológicos. Cualquier factor del medioambiente que actúe sobre células vivas tiene su primer efecto sobre la membrana plasmática. Las técnicas de ingeniería genética dependen de la permeabilidad transitoria de las membranas plasmáticas de bacterias y eucariotas a plásmidos y otros vectores. Además, la habilidad de la membrana plasmática de exportar selectivamente productos metabólicos tiene una importancia económica significativa (Sigler & Höfer, 1997).

A partir de estos ejemplos es obvio que la permeabilidad selectiva de las membranas biológicas es un aspecto clave en el contexto de un interés tecnológico particular. Por lo tanto, el conocimiento de su estructura y función es una parte muy importante de una estrategia biotecnológica exitosa.

1.5.1. Composición química de las membranas en levaduras

La estructura básica de las membranas de levaduras consiste, como en otras membranas biológicas, en una bicapa de moléculas de fosfolípidos estabilizada por esteroides (Höfer, 1997; Sigler & Höfer, 1997) (Figura 2). Esta estructura es la principal responsable de la impermeabilidad de la membrana a moléculas hidrofílicas y a iones. En contraste con los eucariotas superiores donde el colesterol es el esteroide más abundante, la membrana plasmática de levaduras contiene principalmente ergosterol y cantidades menores de

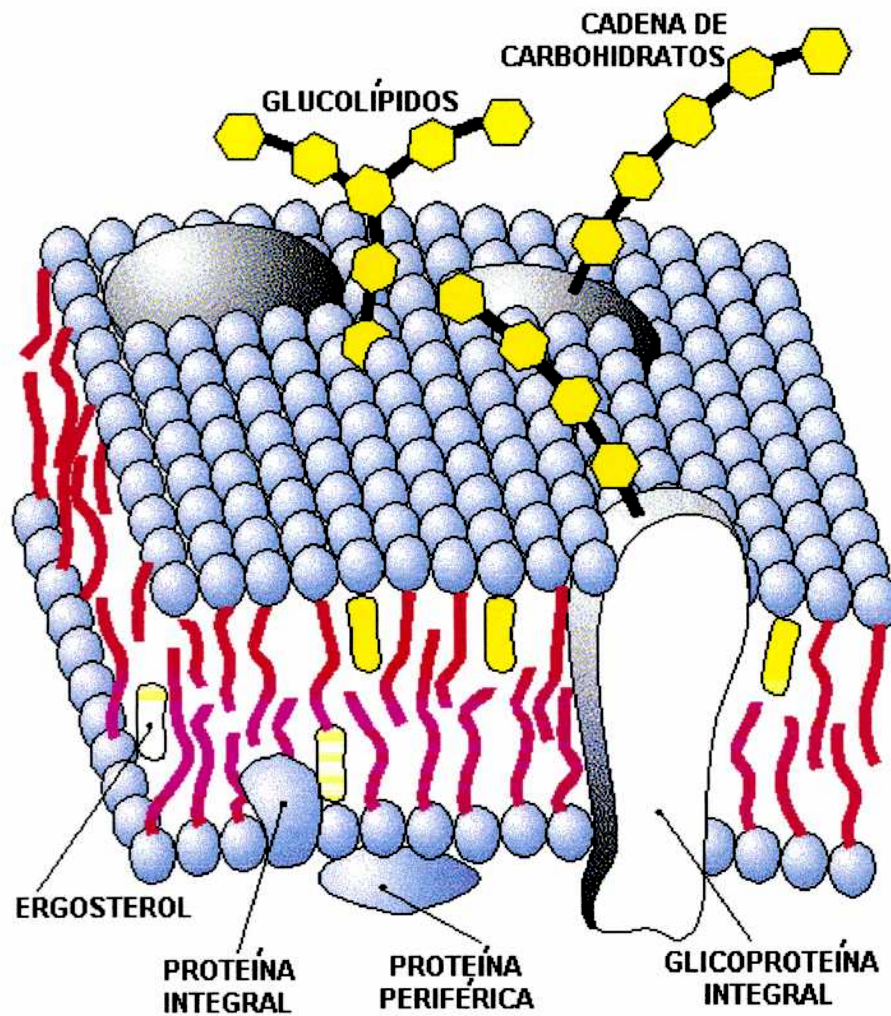


Figura 2: Representación esquemática de las membranas biológicas

zosterol (van der Rest *et. al.*, 1995). Proteínas integrales de membrana embebidas en la bicapa de fosfolípidos proveen a las membranas de permeabilidad selectiva. La diversidad de propiedades fisiológicas de las membranas biológicas depende en gran medida de su composición lipídica. La mayoría de las moléculas de fosfolípidos encontradas en las membranas microbianas son glicerolípidos compuestos de una moléculas de glicerol en la cual dos grupos alcoholes están esterificados con ácidos grasos de cadenas largas y el tercer

grupo alcohol con ácido fosfórico. La gran variedad de fosfolípidos presentes en las membranas se debe a la variabilidad en largo y en número de uniones dobles en los residuos de ácidos grasos. Una base orgánica, tal como colina, etanolamina, inositol o el aminoácido serina es luego unida al resto del fosfato. Las membranas biológicas son estructuras dinámicas. Existe una rápida difusión lateral dentro de una monocapa, rotación alrededor de ejes largos y flexibilidad de las cadenas alifáticas especialmente cerca del centro de la bicapa. La migración de lípidos de una monocapa a la otra (flip-flop) es rara. La bicapa lipídica se comporta como un fluido bidimensional en el cual las moléculas constituyentes (incluyendo las proteínas de membrana) pueden moverse lateralmente. La fluidez de la membrana depende de su composición y de la temperatura. El ergosterol también afecta la fluidez de la membrana por interacción de los anillos planos y rígidos con las colas hidrofóbicas de los residuos de ácidos grasos. El ergosterol también decrece la permeabilidad de la membrana plasmática de levaduras a moléculas hidrofílicas pequeñas y probablemente incrementa la flexibilidad y estabilidad mecánica de la membrana. Esta molécula migra fácilmente entre las monocapas (flip-flop). La mayoría de las funciones específicas de las membranas son llevadas a cabo por las diversas proteínas asociadas a ellas. En la membrana plasmática de levaduras el 50% en peso corresponde a proteínas, mientras la membrana mitocondrial interna puede contener el 75% en peso de proteínas. En la membrana plasmática hay alrededor de 50 moléculas de lípidos por cada molécula de proteína. Las proteínas de membrana están unidas a la bicapa de fosfolípidos tanto por uniones covalentes, extendiendo las cadenas polipeptídicas a través de la bicapa (proteínas integrales de membrana) o por uniones polares con glicolípidos o con proteínas integrales, en la superficie de la membrana

(proteínas periféricas). Las proteínas integrales también pueden moverse lateralmente en la bicapa lipídica.

1.5.2. Mecanismos de transporte de solutos a través de membrana

Las membranas por estar constituidas principalmente por uniones hidrofóbicas son impermeables a moléculas hidrofílicas. Diversas proteínas en la membrana actúan como transportadores permitiendo el intercambio de material entre la célula y su medio ambiente y entre compartimentos subcelulares y el citosol. La superficie polar a cada lado de la membrana es la interfase entre las fases acuosas y la región hidrofóbica de la membrana y facilita el pasaje de moléculas de solutos hidrofílicos. La permeabilidad de la membrana a diversas sustancias es variable. Depende de las propiedades tanto del soluto como de la membrana (Höfer, 1997). Varios procesos de transporte ocurren espontáneamente. Algunos ocurren debido a la interacción entre las moléculas disueltas y la membrana y son análogos de las reacciones químicas no catalizadas. Sin embargo, la mayoría de los procesos de transporte son mediados por transportadores específicos o canales y recuerdan las reacciones catalizadas por enzimas. Por otra parte, al transporte de solutos se lo denomina **transporte activo** o **transporte pasivo** según requiera o no, respectivamente, aporte de energía metabólica para llevarse a cabo. El **transporte activo** es siempre mediado por un transportador o un canal. El transporte pasivo cuando es mediado por un transportador se denomina **difusión facilitada**.

Difusión (física) simple:

Los gases (O_2 , CO_2), alcoholes (C_2H_5OH), ácidos orgánicos disociados (CH_3COOH), bases (NH_3) y otras moléculas pequeñas sin carga migran a través de la membrana por **difusión simple (o física)** impulsada por el movimiento térmico molecular (Figura 3). La fuerza impulsora es la

energía libre del gradiente de concentración de las moléculas de soluto. La difusión de cada especie molecular es

independiente de todas las demás. La velocidad de transporte obedece la

primera ley de Fick, es decir, que a una

temperatura dada es

determinada sólo por la diferencia de

concentración del

soluta (ΔC). El transporte por difusión simple no presenta cinética de saturación.

El agua penetra la membrana rápidamente debido a su tamaño molecular muy pequeño lo que le permite pasar a través de los espacios entre las cadenas de ácidos grasos de

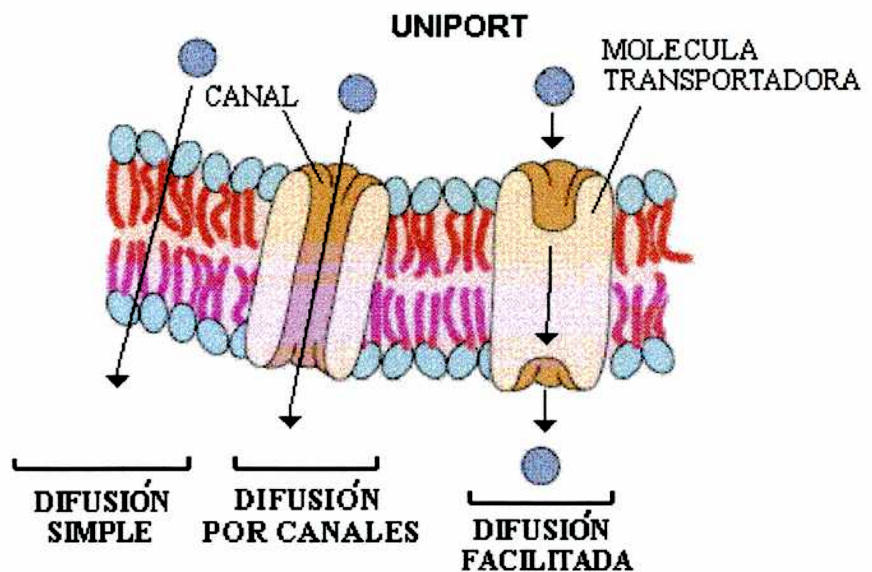


Figura 3: Mecanismos de transporte pasivo, sin aporte de energía metabólica: Algunos nutrientes atraviesan la bicapa lipídica por difusión simple, solubilizándose en los lípidos de la membrana. Moléculas con carga difunden a través de canales proteicos dirigidos por el potencial de membrana. Otras sustancias ingresan por difusión facilitada, impulsadas por su gradiente de concentración y translocadas por proteínas transportadoras.

los lípidos. El transporte de agua es un proceso pasivo acoplado al transporte activo de solutos (incluyendo iones) y/o a las diferencias de presión osmótica a cada lado de la membrana.

Algunos iones pequeños (H^+ , Na^+ , K^+ , Cl^-) pasan a través de la membrana sin interactuar con algún componente particular (permeabilidad pasiva o no específica). Cada ion que atraviesa la membrana es, en general, acompañado de otro ion de signo opuesto o un ion del mismo signo atraviesa la membrana en dirección opuesta. De esta manera, el transporte iónico es eléctricamente neutro, **electroneutro** (sin translocación de carga neta). Por otra parte el transporte de iones que ocurre sin compensación de carga de lo llama **electrogénico** y genera potencial de membrana. La permeabilidad no específica de iones pequeños a través de la membrana es más lenta que la mediada por canales.

Transporte mediado por proteínas:

La mayoría de los solutos atraviesan las membranas biológicas más rápidamente que lo que se esperaría por sus coeficientes de permeabilidad estimados y su cinética de transporte se asemeja a la de una reacción catalizada por una enzima. La velocidad de transporte no obedece la primera ley de Fick, pero alcanza una velocidad máxima de transporte con el incremento de los gradientes de concentración. Esto es la **cinética de saturación** y es característica del transporte mediado por proteínas (transportadores). El transporte mediado por transportadores difiere además de la difusión simple en: especificidad de substrato (distinción aún entre isómeros ópticos), competición por el transportador cuando están presentes múltiples substratos y sensibilidad a inhibidores específicos (Höfer, 1997).

Estas propiedades están determinadas por las proteínas de transmembrana (transportadores) las cuales, como las enzimas, se unen a la molécula de sustrato (solute) en un lado de la membrana y la translocan al otro lado donde la molécula unida es liberada. *Luego los transportadores desocupados (libres) vuelven a su conformación previa con el sitio de unión al sustrato expuesto hacia el compartimento original y así el siguiente ciclo de translocación puede comenzar.* Es decir, los transportadores sufren cambios conformacionales exhibiendo afinidades diferentes por el sustrato a cada lado de la membrana. La velocidad del transporte mediado es determinada por la concentración del complejo transportador-sustrato y es limitado por el número de moléculas de transportador presentes en la membrana.

Otro sistema de transporte mediado por proteínas son los **canales iónicos**. Estos catalizan el pasaje de iones a través de las membranas (Figura 3). La difusión de iones vía canales de membrana es controlada por la diferencia eléctrica entre ambos lados de la membrana, el **potencial de membrana** ($\Delta\psi$). Cuando el potencial es alto los canales están cerrados, cuando la membrana se despolariza los canales se abren y los iones pasan a través de la membrana, regenerando el potencial. La interacción de los canales con los iones es débil por lo que poseen una más baja especificidad de sustrato que los transportadores.

Los transportadores pueden operar con o sin gasto de energía metabólica. En el último caso, el transporte mediado por transportadores de moléculas no cargadas es dirigido por el gradiente de concentración químico del soluto. Cuando las moléculas transportadas son iones su flujo es dirigido por el gradiente de concentración electroquímico a través de la membrana. Se denomina **difusión facilitada** al transporte mediado por proteínas que ocurre

en favor del gradiente (electro)químico e independiente de energía metabólica (Figura 3). Por otra parte, el transporte mediado por transportadores que requieren el aporte de energía metabólica y genera gradientes (electro)químicos de soluto es el **transporte activo**.

Transporte activo:

Este tipo de transporte crea y continuamente regenera gradientes con gasto de energía metabólica. En células de levadura el transporte activo suministra nutrientes y mantiene las concentraciones intracelulares de iones y metabolitos permitiendo mantener constantes los flujos metabólicos a pesar de las variaciones ambientales. El transporte activo mantiene el balance osmótico entra las células y su medio ambiente y participa en la conversión de la energía libre (producto del transporte de electrones en la cadena respiratoria) a su forma química en ATP.

Hay dos modos de transporte activo dependiendo de la forma en que se acopla a la energía metabólica (Figura 4 y 5). **Transporte activo primario** es una interacción directa de las moléculas del transportador con energía metabólica, la cual en levaduras es provista por ATP. Estas proteínas transportadoras tienen dos actividades catalíticas, la hidrólisis de ATP y la translocación de iones. Ellas son llamadas **ATPasas transportadoras o bombas de iones**. Las ATPasas transportadoras conocidas translocan sólo iones pequeños (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-). Las células de levadura tienen solamente ATPasas transportadoras que translocan iones H^+ y Ca^{2+} . El bombeo de H^+ genera un gradiente electroquímico el cual impulsa numerosos procesos de **transporte activo secundario**. Estos no están directamente acoplados a energía metabólica. Su fuerza impulsora es la energía libre del gradiente de H^+ generado por un

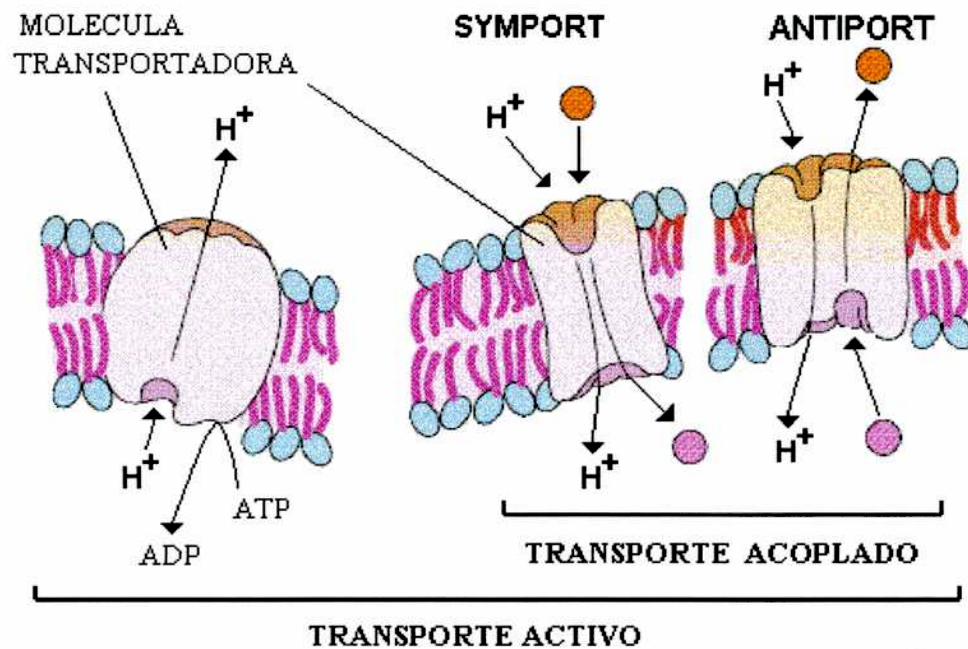


Figura 4: Mecanismos de transporte activo, con aporte de energía metabólica: La captación del nutriente es impulsada por la fuerza motora del protón. Una ATPasa expulsa activamente protones de la célula y a través de otra proteína transportadora los protones reingresan al citosol simultáneamente con la molécula del nutriente (symport). Cuando el reingreso de los protones está acoplado a la salida de un ion el proceso se denomina antiport.

sistema de transporte primario. Esta fuerza impulsora acopla el transporte de un soluto con los H^+ que fluyen en favor de su gradiente de concentración (cotransporte con H^+). El proceso puede ser **symport** (ambos en la misma dirección) o **antiport** (en direcciones opuestas); **uniport** es un transporte de iones, principalmente a través de canales, dirigido sólo por el potencial de membrana (Figura 5).

La membrana plasmática necesita ser energizada para realizar en forma efectiva la incorporación de nutrientes (carbohidratos, aminoácidos). En membrana de levaduras y otros eucariotas (Figura 6), la H^+ -ATPasa de membrana plasmática genera el gradiente electroquímico de H^+ a través de la membrana por hidrólisis del ATP citosólico el cual se

origina a partir de glucólisis o de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Esta ATPasa bombea protones fuera de la célula polarizando así la membrana plasmática que queda con su lado citoplasmático más negativo y alcalino que el lado externo. El potencial de membrana resultante se define como negativo. Además de la ATPasa de membrana plasmática (ATPasa tipo P), existe una H^+ -ATPasa en la membrana mitocondrial interna (F_0F_1 -ATPasa) y una H^+ -ATPasa en la membrana vacuolar (ATPasa tipo V) (Figura 6).

Según la teoría de Mitchell (1966), el gradiente de

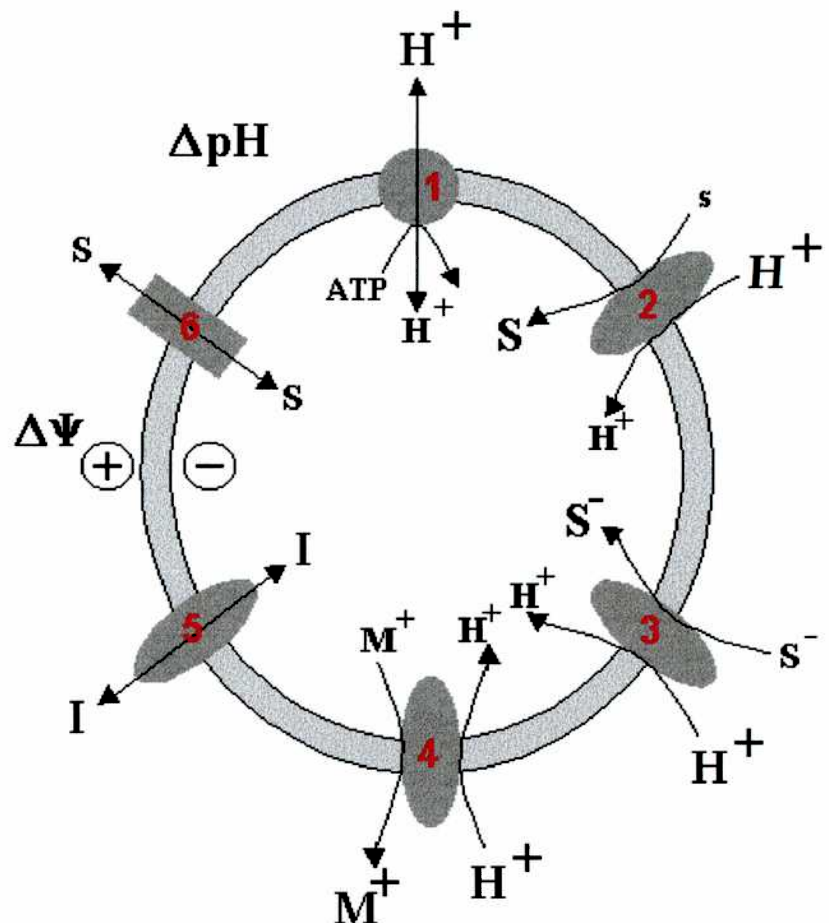


Figura 5: Representación esquemática de varios sistemas de transporte en la membrana de levadura: **1)** Transporte activo primario por la H^+ -ATPasa, la bomba de protones que genera el gradiente electroquímico del H^+ , $\Delta\mu_{H^+}$. **2-5)** Transporte activo secundario: symport de moléculas de soluto S no cargadas (**2**, electroquímico) o cargadas negativamente (**3**, electroneuro), dirigido por el $\Delta\mu_{H^+}$ o por ΔpH , respectivamente. ΔpH también dirige el antiport electroneuro (**4**) de moléculas de soluto M cargadas positivamente, mientras el uniport electrogénico (**5**) de iones I cargados tanto positivamente como negativamente, es dirigido por el potencial de membrana $\Delta\psi$. **6)** Transporte pasivo de moléculas no cargadas S en favor de su gradiente de concentración catalizado por una molécula transportadora (difusión facilitada).

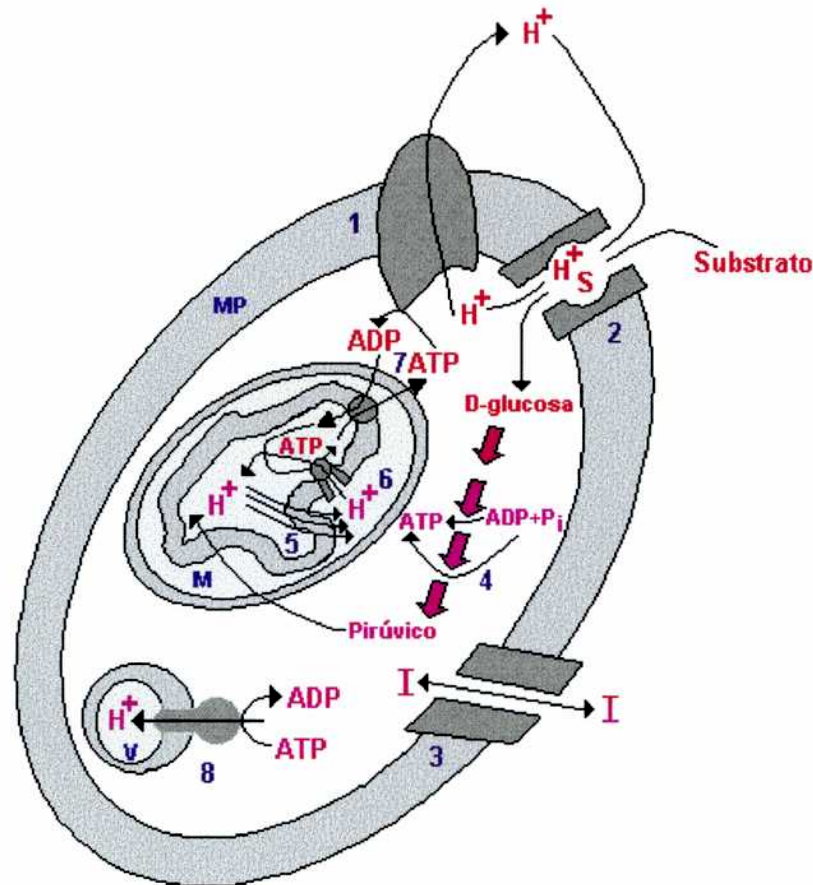


Figura 6: Representación esquemática de la variedad de los sistemas de transporte en una célula de levadura. Los diferentes sistemas de transporte están compartimentalizados en organelos subcelulares:

- 1) H^+ -ATPasa (H^+ -bomba) en membrana plasmática (ATPasa del tipo P). La hidrólisis del ATP libera la energía libre necesaria para generar un $\Delta\mu_{H^+}$ a través de la membrana plasmática.
 - 2) Symport H^+ /sustrato. Acumula sustrato dentro de la célula usando la energía libre del $\Delta\mu_{H^+}$.
 - 3) Canal iónico. Transporta iones compensando diferencia de cargas entre el medio intra y extracelular ($\Delta\mu_{H^+}$ y H^+ -symport).
 - 4) Glucólisis. Producción de ATP a través del catabolismo de la D-glucosa a piruvico.
 - 5) Piruvico en la mitocondria. Se oxida a CO_2 a través del ciclo del ácido cítrico y a H_2O en la cadena respiratoria.
 - 6) H^+ -ATPasa (H^+ -bomba) en membrana interna mitocondrial (ATPasa del tipo F). Convierte la energía libre del $\Delta\mu_{H^+}$ generado por la cadena respiratoria en la forma química de ATP.
 - 7) Translocador ATP/ADP. Cataliza el intercambio de ATP/ADP entre el interior de la mitocondria y el citosol.
 - 8) H^+ -ATPasa (H^+ -bomba) en membrana vacuolar (ATPasa del tipo V). Genera $\Delta\mu_{H^+}$ a través de la vacuola.
- MP: membrana plasmática.
M: mitocondria. V: vacuola

protones generado a través de las membranas representa una forma de energía intermedia que puede utilizarse para la síntesis de ATP o para la acumulación de solutos. La mayoría de los

sistemas de transporte de solutos en levaduras están acoplados al gradiente electroquímico del protón, de manera que los solutos son cotransportados con protones. Los sistemas de cotransporte (o symport) pueden ser tanto electroneutros, cuando están acoplados a un anión, o electrogénicos cuando cotransportan una molécula de nutriente eléctricamente neutra (azúcar) (Figura 6). Este último proceso despolariza la membrana. La energía para repolarizar es suministrada por la cadena respiratoria o por una H^+ -ATPasa regenerando así el potencial de membrana y/o el gradiente de pH.

2. Osmotolerancia y osmorregulación

El funcionamiento de las macromoléculas celulares depende de un ambiente químico apropiado que en todas las formas de vida consiste en agua. La molécula de agua es pequeña y en la célula es la molécula dominante por peso y número. La disponibilidad de agua frecuentemente impone límites al proceso de la vida y en los ambientes deficientes en ella sólo pueden prosperar formas de vida muy especializadas. Los desiertos son tal vez los ambientes donde es más notoria la escasez en moléculas de agua. Sin embargo, existen otros ambientes en los cuales las células sufren deficiencia en agua aún cuando las moléculas de ésta son abundantes. El potencial químico del agua en esos ambientes está disminuido por la unión de las moléculas de agua con las de otros compuestos, determinando que la cantidad disponible de agua libre sea insuficiente (Blomberg, 1988).

Potencial de agua de las soluciones:

Se utilizan distintos términos para describir la disponibilidad de agua de una solución tal como actividad de agua, potencial de agua, potencial osmótico y osmolalidad. Todos estos términos están interrelacionados y cualquiera de ellos puede utilizarse indistintamente. Sin embargo en las relaciones de agua microbianas se utilizan con mayor frecuencia los términos actividad de agua y potencial de agua (Scott, 1957; Brown, 1976, 1978; Galinski, 1995).

La actividad de agua a_w de un substrato define la cantidad de agua libre disponible y se expresa como:

$$a_w : p/p_0$$

donde p es la presión de vapor de agua en la solución y p_0 es la presión de vapor del agua pura. (Brown, 1976). Este concepto tiene gran influencia sobre el crecimiento microbiano.

Un crecimiento máximo no tiene lugar a $a_w = 1,00$ pero sí en algún valor óptimo más bajo dependiendo de la cepa. En general disminuyendo el valor de a_w de un medio de crecimiento en condicione óptimas resulta en un decrecimiento en la velocidad de crecimiento. Cuando alcanza "cero", los microorganismos mueren o sobreviven en un estado de dormancia (Jermini & Schmidt-Lorenz, 1987).

La interconversión de actividad de agua en potencial de agua de una solución puede realizarse mediante la siguiente relación:

$$\psi \text{ (sol): } 1,37 \times 10^3 \times \ln a_w$$

donde $\psi \text{ (sol)}$ se expresa en bars (Griffin, 1981). El potencial de agua es una propiedad coligativa de una solución y está relacionado a otras propiedades coligativas como la depresión del punto de congelamiento, la depresión de la presión de vapor y la elevación del

punto de ebullición (Nobel, 1974). El potencial de agua de una solución es, a concentraciones bajas, una función de la cantidad de partículas (iones o moléculas) (Brown, 1976). Sin embargo a concentraciones crecientes el tipo de molécula de soluto es cada vez más importante.

Si dos soluciones de diferente potencial de agua son separadas una de otra por una membrana semipermeable el agua fluirá desde la solución de alto a la de bajo potencial. Este flujo se llama ósmosis y está involucrado en diversos fenómenos biológicos como deshidratación de células, funcionamiento de los riñones, apertura de los estomas de las hojas, etc. (Blomberg, 1988).

Potencial de agua de las células:

El potencial de agua total de una célula ψ_t (cel) se define como:

$$\psi_t (\text{cel}): \psi_o (\text{cel}) + \psi_p (\text{cel}) + \psi_m (\text{cel})$$

donde ψ_o (cel) representa el potencial osmótico debido a los iones y moléculas disueltos en el citoplasma, ψ_p (cel) es el potencial de turgencia de la célula y ψ_m (cel) es el potencial de la matriz celular (Gardner & Ehlig, 1965). El potencial de turgencia de la célula es una función de la cantidad de moléculas y iones disueltos en el citoplasma y la magnitud de la elasticidad de la pared celular (Zimmerman, 1978). El potencial de la matriz es despreciable bajo condiciones de no deshidratación extrema (Blomberg, 1988).

2.1. Osmorregulación

Comúnmente se emplea el término Osmorregulación para definir el conjunto de procesos activos llevados a cabo por una célula durante la adaptación a la resistencia o fuerza osmótica impuesta por el medio ambiente (Csonka & Hanson, 1991). En este periodo de adaptación pueden reconocerse tres etapas (Blomberg, 1988) :

1) Deshidratación: fenómeno puramente fisicoquímico que implica flujo pasivo de agua desde la célula para restablecer el equilibrio osmótico entre ella y su medio ambiente, lo que produce la pérdida de turgencia.

2) Osmorregulación adaptativa: adaptación fisiológica al nuevo ambiente mediante alguna estrategia acorde a la fisiología celular que permite recuperar la relación turgencia /volumen celular.

3) Regulación Homeostática: el organismo alcanza un estado estable, totalmente adaptado al medio de bajo potencial de agua y comienza el crecimiento.

Las membranas biológicas son altamente permeables al agua, sin embargo la permeabilidad a los solutos es generalmente mucho más baja. Así una célula expuesta a un bajo potencial de agua, es decir donde el ψ (sol) es menor que el ψ_t (cel), inevitablemente se deshidratará por el proceso de ósmosis. Sin embargo, la magnitud de la pérdida de agua dependerá de las propiedades elásticas de la pared celular. Esta deshidratación osmótica inicial es un proceso rápido, con una escala de tiempo en segundos (Brown & Edgley, 1980) y que se detiene cuando se alcanza el equilibrio osmótico entre la célula y el medio ambiente.

En las células de cualquier organismo el medio intracelular debe permanecer relativamente constante con respecto a la fuerza iónica, pH y niveles de metabolitos, para que el metabolismo activo ocurra. Así, en medios de baja osmolalidad, aquellos mecanismos homeostáticos que mantienen estos parámetros en los límites requeridos, predominan en el mantenimiento de la osmolalidad intracelular (Csonka & Hanson, 1991). Pero luego de la transferencia a un medio hiperosmótico las células deben adaptarse al cambio producido. Entre los organismos existen dos tipos de estrategias para enfrentar esta situación: la del tipo "sal en el citoplasma" y la de "osmolitos orgánicos" (Galinski & Trüper, 1994). La primera de la estrategias mencionadas consiste en permitir la entrada al citoplasma de sal o solutos para equilibrar osmóticamente el interior celular con al medio externo. Los representantes más conspicuos de esta estrategia son las halobacterias y un rango de eubacterias anaeróbicas (Zhilina & Zavarzin, 1990; Oren, 1991; Caumette *et al.*, 1991). La extrategia alternativa de adaptación osmótica y la más generalizada entre los organismos consiste en la exclusión de sal o solutos de la célula y la producción y acumulación intracelular de osmolitos orgánicos que permiten a la célula mantener un ambiente citoplasmático "normal". Estos compuestos por ser compatibles con la actividad celular fueron denominados **solutos compatibles** (Brown & Simpson, 1972). Cuando estos osmolitos orgánicos están presentes en el medio circundante, los organismos usualmente tienden a incorporarlos más que a sintetizarlos de *novo*. Aquellos organismos incapaces de producirlos por sí mismos pueden adquirir un cierto rango de osmotolerancia por la acumulación de estos osmolitos externos. (Figura 7). Un alto grado de evolución convergente parece haber existido entre procariotas y eucariotas en cuanto a la producción y acumulación de estos llamados solutos compatibles (Brown &

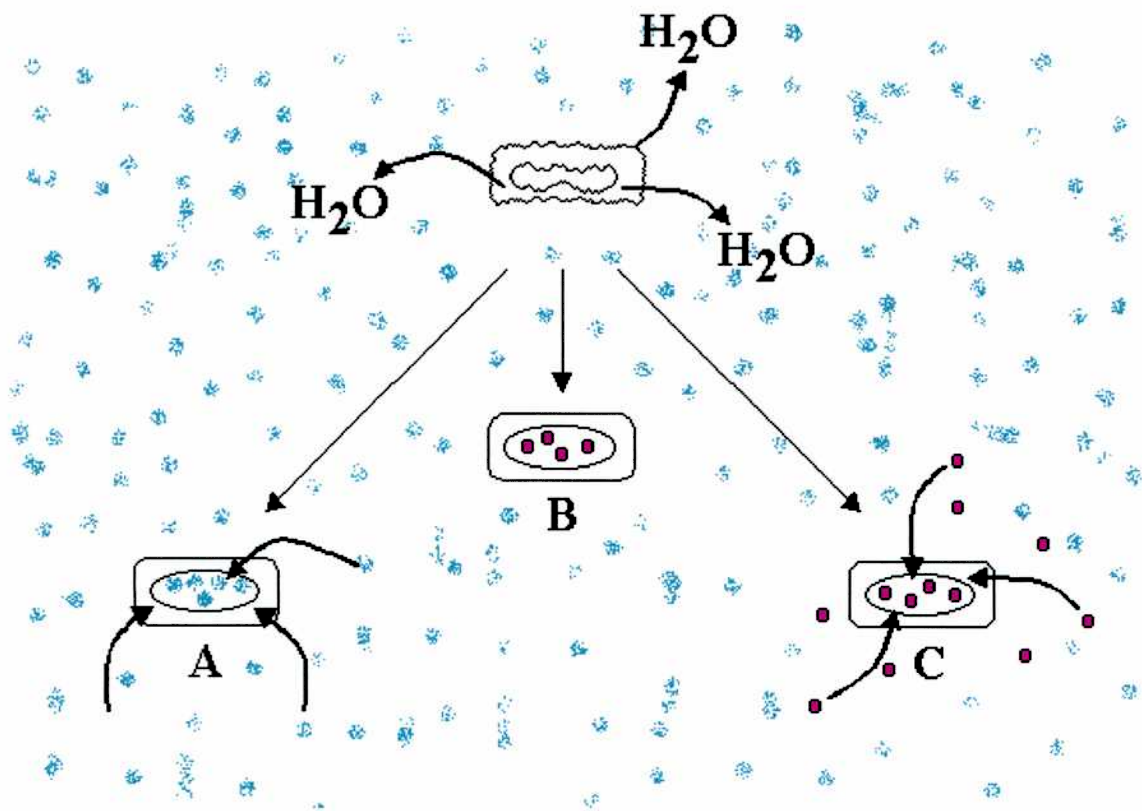


Figura 7: Tres posibles estrategias luego de un shock hiperosmótico. Luego de la deshidratación inicial y pérdida de turgencia, las células necesitan balancear el gradiente osmótico. **A)** Solutos externos entran a la célula, lo que requiere un ajuste de todos los componentes citoplasmáticos. **B)** Solutos externos son excluidos y solutos compatibles intrínsecos son sintetizados. **C)** Solutos externos son excluidos, pero otros componentes son acumulados desde el medio extracelular y usados como solutos compatibles.

Simpson, 1972) y están restringidos a pocas clases de compuestos: a) polihidroxiálcoholes (polioles), presentes en algas y hongos (Goto *et al.* 1990); b) aminoácidos y derivados y c) metilaminas, encontrados ambos en eubacterias, protozoos, plantas vasculares y peces (Steinkraus *et al.*, 1985).

Estos osmolitos compensatorios son compuestos de bajo peso molecular y compatibles con la fisiología celular pues protegen a las enzimas y proteínas estructurales de la célula de la inactivación, inhibición y desnaturalización provocadas por el bajo potencial

de agua del medio. Estos compuestos son preferencialmente excluidos de las esferas de hidratación de proteínas, promoviendo el ensamblaje de subunidades, estabilizando contra la desnaturalización y activando enzimas en presencia de solutos desnaturalizantes (Low, 1985). Es decir, que no sólo actúan como osmoestabilizadores sino también como osmoprotectores.

Mientras la primer estrategia requiere un extenso ajuste de la fisiología celular al nuevo ambiente citoplasmático, la segunda constituye una forma de adaptación más flexible que puede ajustarse a un rango de condiciones fisiológicas mucho más amplio.

Es evidente que el período de adaptación osmótica y el posterior crecimiento en un nuevo estado de estabilidad y equilibrio osmótico, constituyen un proceso que inevitablemente demanda gasto de energía por parte de las células ya que éstas deben mantener gradientes de concentración extra durante el estrés de potencial de agua.

2.2. Osmotolerancia

Se denomina osmotolerantes a los organismos que expuestos a un estrés de potencial de agua, logran equilibrar osmóticamente el medio interno celular con el medio externo, por haber adquirido evolutivamente un mecanismo de osmorregulación. Dentro de este grupo existen no sólo diferencias en cuanto al rango de potenciales osmóticos sino también respecto a la clase de soluto responsable del bajo potencial de agua del medio. Así por ejemplo, existen organismos halotolerantes (capaces de soportar concentraciones elevadas de sal en el

medio de crecimiento), azúcares tolerantes y aquellos que pueden adaptarse a elevadas concentraciones de sales como de azúcares.

En los ambientes de reducida actividad de agua existen representantes de los principales grupos de microorganismos: cianobacterias, eubacterias, archibacterias, algas, levaduras y hongos filamentosos, pero solamente las levaduras y los hongos filamentosos han desarrollado la capacidad de crecer en ambientes conteniendo concentraciones elevadas de azúcar (Hocking, 1993).

La figura 8 muestra la relación entre la velocidad de crecimiento de levaduras y la actividad de agua del

medio (a_w), en cepas con distinto grado de osmotolerancia. Levaduras como *S. cerevisiae* son consideradas **no osmotolerantes u osmosensibles**. Por

ejemplo, al transferirse estas levaduras desde un medio sin sal a otro con elevada concentración

salina sobreviven pocas células. Esto constituye un fenómeno que se denomina:

hipersensibilidad al estrés de agua. El término **osmotolerante** describe a levaduras que

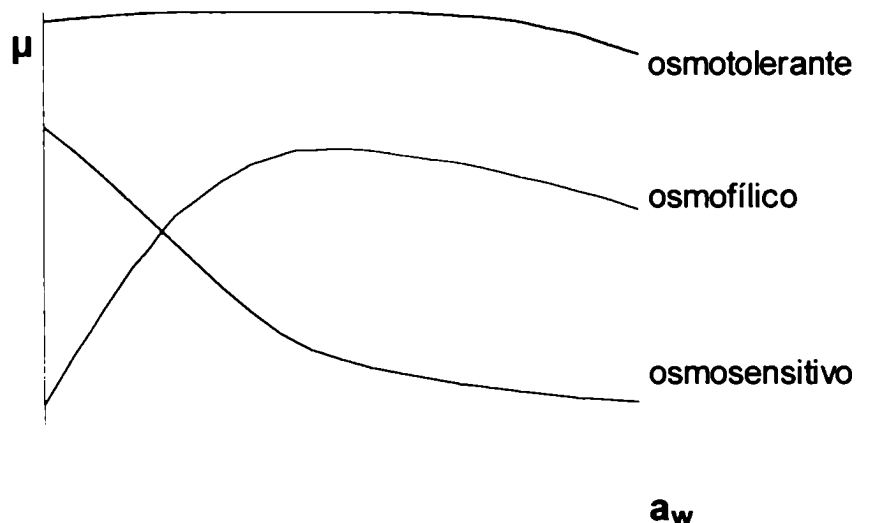


Figura 8: Variación de la velocidad de crecimiento (μ) en función de la actividad de agua (a_w) del medio extracelular. Respuesta de diferentes levaduras ante el estrés osmótico.

pueden tolerar un amplio rango de potenciales osmóticos pero no requieren de esas condiciones para crecer (ej. la levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii* y la azúcar y halotolerante *Torulaspora delbrueckii*). Por último, aquellas levaduras que únicamente crecen en ambientes con bajos potenciales de agua son denominadas **osmofilicas** obligadas. A este grupo pertenecen la levadura-hongo *Eramascus* y ciertas especies marinas de *Metschnikowia* las que requieren, respectivamente, altas concentraciones de azúcar y sal para poder crecer (Phaff *et al.*, 1978).

3. Levaduras osmotolerantes

Las levaduras osmotolerantes son importantes para la industria alimentaria. Algunas son utilizadas como organismos de fermentación en la producción, por ejemplo, de salsa de soja y de miso. Otras se encuentran como organismos contaminantes en diversos alimentos como jarabes de glucosa, leche condensada dulce, miel, mermeladas, frutas secas, concentrados de jugos de fruta, productos de confitería y panadería y carnes saladas. Los géneros más importantes son *Deabaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Zigosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Schizosaccharomyces* y *Torulaspora*. El proceso de osmorregulación se ha estudiado principalmente en *Saccharomyces*, *Zigosaccharomyces*, *Deabaryomyces* y *Hansenula* (Hocking, 1993).

3.1. Osmorregulación en levaduras

En levaduras hay diversas funciones celulares involucradas en osmorregulación. Estas funciones se representan en la figura 9 y son las siguientes (Blomberg, 1988; Hocking, 1993):

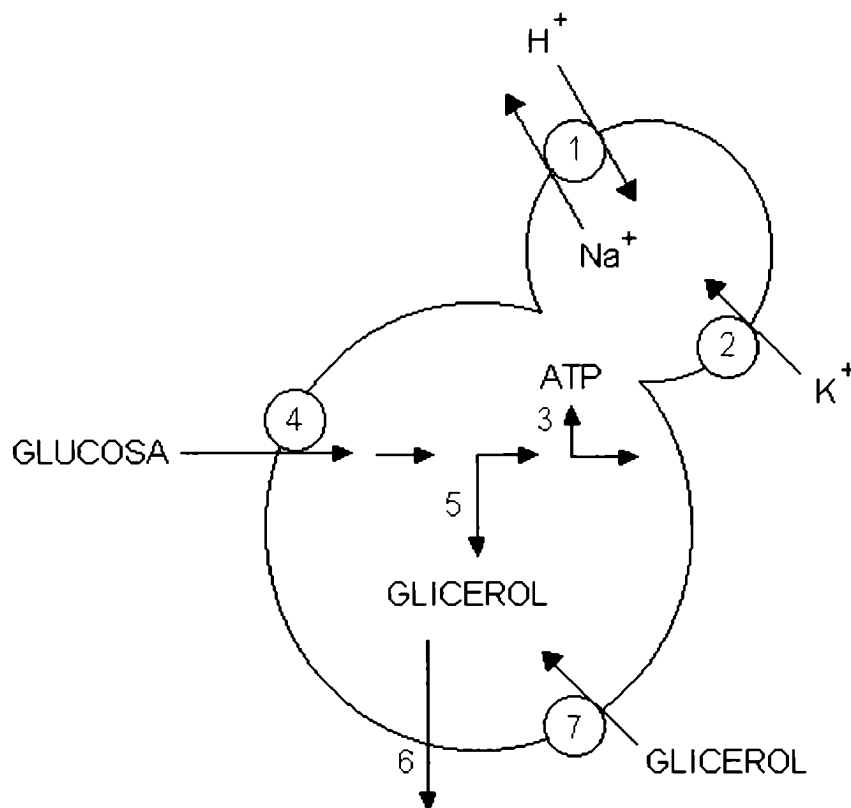


Figura 9: Representación esquemática de las funciones celulares involucradas en la osmorregulación en levaduras. 1) Expulsión de Na^+ (ATPasa del tipo P). 2) Incorporación de K^+ . 3) Aporte de energía. 4) Captación de glucosa. 5) Producción de glicerol. 6) Liberación de glicerol (Fps 1, difusión facilitada). 7) Incorporación de glicerol.

- 1) Expulsión de iones sodio: Para mantener las actividades enzimáticas en niveles apropiados las células aceptan niveles relativamente bajos de iones sodio. Esto se logra por la baja permeabilidad de las membranas a los iones y por la expulsión activa de Na^+ . En levaduras ocurre un intercambio electroneutro Na^+/K^+ como un sistema de transporte

secundario de tipo antiport dirigido por la ATPasa generadora del gradiente de H^+ y también se ha encontrado en *S. cerevisiae* una Na^+ - ATPasa que expulsa Na^+ y que opera a pH más alcalino.

- 2) Incorporación de potasio: El transporte de K^+ en levaduras requiere ATP y está acoplado a la bomba de protones que es la responsable de crear un gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática. Se encontró que en *S. cerevisiae* y *Zigosaccharomyces rouxii* el estrés osmótico, por descenso de la a_w del medio, provoca una disminución transitoria del K^+ intracelular y que esto, al menos en *Z. rouxii*, podría ser responsable del disparo de la respuesta adaptativa de las células consistente en la síntesis de ciertas proteínas y la acumulación de glicerol.
- 3) Aporte de energía: Los procesos de transporte de iones Na^+ y K^+ dependen de un aporte apropiado de energía, el cual explicaría en parte la disminución del rendimiento durante el crecimiento en medio con sal. Por ejemplo, tanto *D. hansenii* como *S. cerevisiae* disipan más calor por gramo de peso seco formado, como una respuesta al incremento en la salinidad del medio. Esto indica que más energía es dirigida al mantenimiento durante el crecimiento a bajos potenciales de agua.
- 4) Incorporación de glucosa: Glucosa u otro tipo de sustrato es necesario en la respuesta osmorregulatoria como un sustrato energético en la síntesis de ATP y como fuente de carbono en la producción de solutos compatibles. En levaduras osmotolerantes, el sistema de transporte de glucosa es en general menos afectado por bajos potenciales de agua que el de levaduras menos osmotolerantes, como *S. cerevisiae*.

5) Producción de polioles: Glicerol es el principal soluto compatible inducible en levaduras.

El proceso de producción de glicerol está estrechamente ligado al catabolismo de la glucosa, puesto que uno de los intermediarios en glucólisis sirve como sustrato.

6-7) Acumulación de glicerol: Durante el crecimiento en bajos potenciales de agua las levaduras acumulan principalmente glicerol como soluto compatible para lograr restablecer la relación volumen / turgencia de las células. Se ha demostrado en bacterias y en levaduras que la acumulación de un soluto compatible es el principio central en la respuesta osmorregulatoria a bajos potenciales de agua.

3.1.1. Acumulación de solutos compatibles. Polioles

La mayoría de los hongos producen polioles y cuando son expuestos a bajos potenciales de agua aumentan notoriamente la producción y acumulación de los mismos. Los polioles que las levaduras predominantemente producen durante la utilización del azúcar son glicerol, eritritol y D-arabitol. Sin embargo una especie individual de levadura usualmente no produce más de dos de ellos (Blomberg, 1988). En células de levadura que crecen en condiciones de estrés osmótico el glicerol es el principal soluto compatible osmóticamente activo. Regula la relación turgencia /volumen de la célula y es uno de los compuestos menos tóxicos en un rango de concentraciones muy amplio. Los demás polioles de mayor número de carbonos, como eritritol, arabitol y manitol, responden menos a la salinidad del medio, siendo su producción más o menos constitutiva y pudiendo acumularse en las células en

concentraciones relativamente altas independientemente de la concentración de sal extracelular.

3.1.2. Metabolismo del glicerol

a) **Producción de glicerol.** En las levaduras el glicerol puede ser metabolizado, es decir, producido o utilizado a través de dos vías diferentes: 1) vía glicerol-3-fosfato o 2) vía dihidroxiacetona (Prior & Hohmann, 1997) (Figura 10). La primera es la ruta de síntesis de glicerol más común en levaduras e involucra el flujo glicolítico a través de la reducción de la dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato por la enzima citoplasmática glicerol-3 fosfato deshidrogenasa (GPD) y la posterior defosforilación de glicerol-3-fosfato a glicerol por la enzima glicerol-3-fosfatasa. La segunda es una ruta alternativa en el metabolismo del glicerol encontrada principalmente en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* que involucra a la dihidroxiacetona y a las enzimas dihidroxiacetona fosfatasa y glicerol deshidrogenasa. En las levaduras osmotolerantes *Z. rouxii* (van Zyl *et al.*, 1991) y *D. hansenii* (Adler *et al.*, 1985) se detectó actividad enzimática de glicerol dehidrogenasa y de dihidroxiacetona kinasa. En *Z. rouxii* se observó que las dos actividades enzimáticas son inducidas en condiciones de estrés osmótico, lo que sugiere que esta ruta metabólica interviene en el control de la acumulación del glicerol en tales condiciones. En *S. cerevisiae* se encontró muy baja actividad de estas enzimas lo que indica que la ruta de la dihidroxiacetona no es significativa en esta levadura (Prior & Hohmann, 1997). La producción de glicerol suele

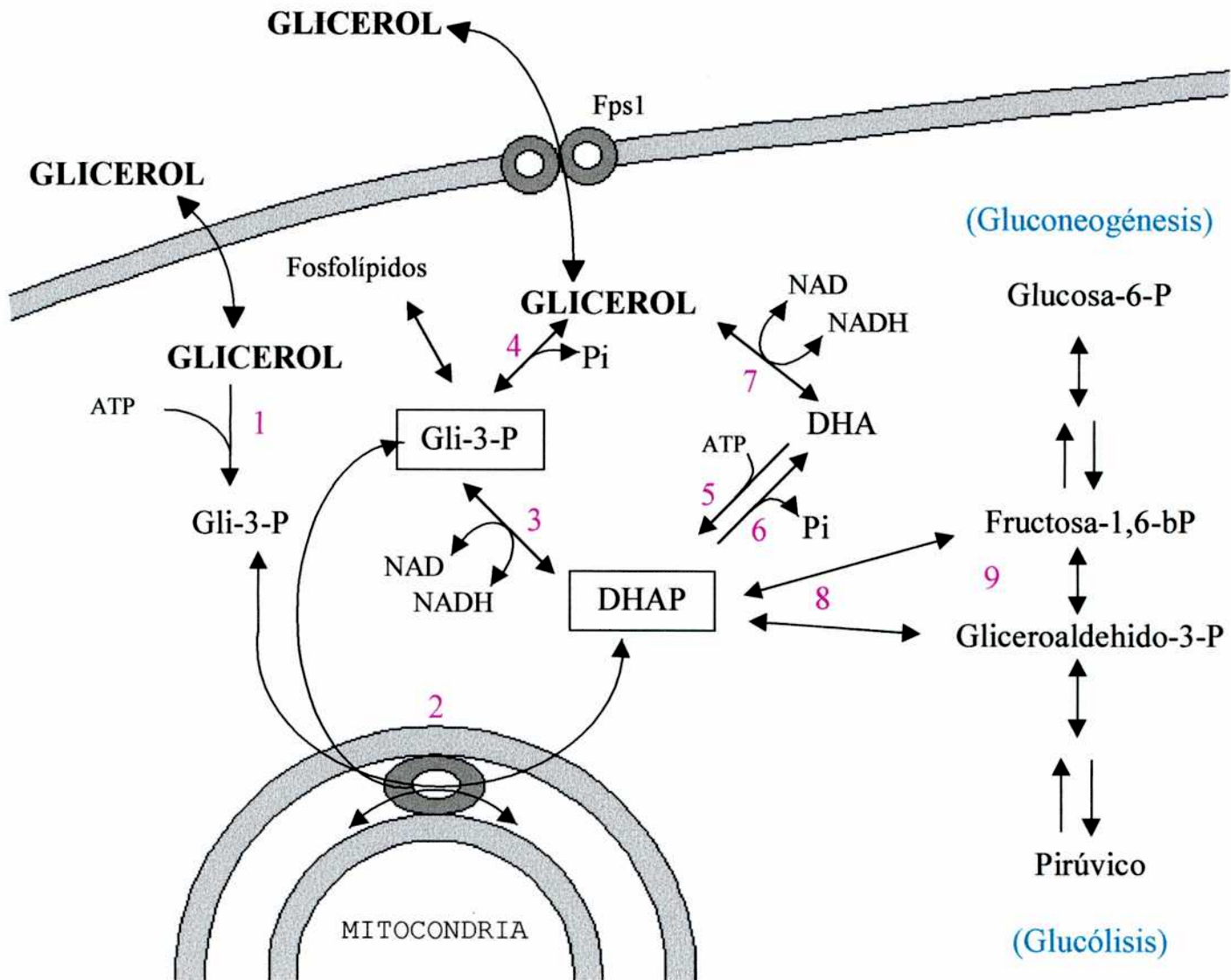


Figura 10: Producción, utilización y compartimentalización del glicerol en *S. cerevisiae*.

1) gliceroquinasa. 2) glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial dependiente de FAD. 3) glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica dependiente de NAD^+ . 4) glicerol-3-fosfatasa. 5) dehidroxiacetona kinasa. 6) dehidroxiacetona fosfatasa. 7) glicerol deshidrogenasa. 8) triosafosfato isomerasa. 9) aldolasa. La vía alternativa para la producción de glicerol a través de hidroxiacetona ha sido confirmada sólo para *S. pombe*. DHA: dehidroxiacetona. DHAP: dehidroxiacetona fosfato. Gli-3-P: glicerol-3-fosfato. DHAP y Gli-3-P recuadrados son los intermediarios más importantes.

estar relacionada tanto a la fase de crecimiento como al potencial de agua del medio. Por ejemplo, *D. hansenii* produce dos polioles, glicerol y arabitol (Adler & Gustafsson, 1980). El polirol predominante durante el crecimiento en medio basal es arabitol, pero al

disminuir el potencial de agua del medio se produce un incremento en la producción de glicerol. Sin embargo, la formación de arabitol permanece relativamente constante independientemente del potencial de agua del medio. La dinámica en la producción de los dos polioles durante el crecimiento en medio con sal, está relacionada a la fase de crecimiento: la producción de glicerol predomina durante la fase exponencial, mientras que la formación de arabitol prevalece al acercarse el cultivo a la fase estacionaria. El arabitol se produce a partir de uno de los intermediarios en la vía de las pentosas fosfato llamado ribulosa 5-fosfato (Spencer & Spencer, 1978). Previo y concomitante a la producción de arabitol el glicerol es utilizado y desaparece del cultivo. Parte del glicerol que es metabolizado al final de la fase exponencial serviría como sustrato en la producción de arabitol (Adler & Gustafsson, 1980). También *S. cerevisiae* incrementa la producción de glicerol al aumentar la concentración de sal en el medio de crecimiento. Es decir que estas dos levaduras, *D. hansenii* y *S. cerevisiae* desvían una proporción incrementada de la glucosa consumida en la producción de glicerol como respuesta al crecimiento en bajos potenciales de agua. Se ha encontrado en estas levaduras que las enzimas glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y la glicerol 3-fosfatasa son inducidas por incremento de la salinidad, siendo además muy superior el nivel de inducción en *S. cerevisiae*. Se encontró también que el aumento de la actividad específica de GPD está relacionado al aumento de la cantidad de moléculas de la enzima (Blomberg, 1988). Por otra parte, la levadura altamente osmotolerante *Z. rouxii*, produce relativamente pequeñas cantidades de glicerol durante el crecimiento en un medio de bajo potencial de agua pero su respuesta adaptativa consiste en retener intracelularmente una mayor cantidad del

poliol producido (Onishi, 1990). En *Z. rouxii* un descenso de la actividad de agua del medio produce poco o ningún efecto sobre la actividad de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.

- b) **Permeabilidad al glicerol:** El glicerol, así como otros polioles, atraviesa las membranas biológicas por difusión pasiva debido a su naturaleza lipofílica (Sutherland, *et al.*, 1997). Sin embargo, durante mucho tiempo existió la idea de la gran permeabilidad del glicerol a través de todas las bicapas lipídicas. Sin embargo, existe una gran variación en cuanto a la permeabilidad al glicerol entre los distintos tipos de membranas biológicas. El valor más elevado de permeabilidad se registró para liposomas y el más bajo para el género osmotolerante *Dunalliella* (Brown *et al.*, 1982). En bacterias la elevada permeabilidad al glicerol está asociada con difusión facilitada a través de proteínas de membrana (Blomberg, 1988). La composición lipídica de la membrana de un organismo puede afectar tanto la velocidad de la difusión pasiva como la de la difusión facilitada por proteínas. Las proteínas integrales de membrana usualmente requieren lípidos específicos para una actividad óptima y son inhibidas por otras especies de lípidos. Las actividades de las proteínas de membrana son también sensibles a la dinámica de la bicapa lipídica y del estado físico-químico el cual, al mismo tiempo, es determinado por la composición de lípidos de la membrana (Sutherland, *et al.*, 1997). En levaduras el aumento de salinidad del medio afectaría la fluidez de la membrana plasmática provocando cambios en la composición de la misma. Por ejemplo, en *Z. rouxii* las células se protegerían del estrés osmótico del medio por aumento de la saturación de los lípidos de membrana (Yoshikawa *et al.*, 1995). Así la fluidez de la membrana decrece como resultado del incremento de la

proporción de C18 : 1 / C18 : 2 en los ácidos grasos cuando las células crecen en presencia de alta concentración de NaCl. Esta mayor rigidez de la membrana permitiría mantener constante la concentración intracelular de Na^+ evitando la penetración de Na^+ extracelular y también limitaría la fuga de glicerol al exterior facilitando su acumulación en el interior de las células. También se observó en esta levadura (Hosono, 1992) que el aumento de la salinidad del medio determina un aumento de la cantidad de ergosterol libre en la membrana celular lo cual también colaboraría en la disminución de la fluidez de la membrana. El ergosterol es el principal esteroide en membranas de levaduras y los esteroides tienen un importante papel en la determinación de la organización estructural de las membranas biológicas, influenciando funciones tales como permeabilidad de solutos y las actividades de enzimas unidas a membrana.

- c) **Transporte de glicerol:** A pesar que el glicerol, por su naturaleza lipofílica, puede atravesar las membranas biológicas por difusión pasiva, los microorganismos producen frecuentemente proteínas que permiten un transporte más rápido a través de la membrana. Las proteínas transportadoras de glicerol en los microorganismos incluyen tanto sistemas de difusión facilitada como de transporte activo (Sutherland, *et al.*, 1997). En *Escherichia coli* el glicerol atraviesa la membrana citoplasmática a través de un mecanismo de poro proteico codificado por el gen *glpF*. En levaduras osmotolerantes como *D. hansenii*, *Pichia sorbitophila* y *Z. rouxii* existen sistemas constitutivos que transportan activamente el glicerol conjuntamente con H^+ o iones Na^+ permitiendo a las células un gradiente de glicerol en presencia de concentraciones elevadas de sal en el medio. Así compensan la fuga natural del poliol hacia el medio extracelular. En *S. cerevisiae* existen dos sistemas

de transporte para glicerol, uno de difusión facilitada y otro activo de cotrasporte con protones inducido durante el crecimiento con sustratos gluconeogénicos. Ambos sistemas son reprimidos por glucosa (Lages & Lucas, 1997). El sistema mencionado de difusión facilitada en *S. cerevisiae* estaría relacionado con el gen FPS1 que codifica para una proteína perteneciente a la familia MIP que constituye un grupo de proteínas canal presentes en un amplio rango de organismos desde bacteria hasta humanos (Sutherland, *et al.*, 1997).

3.1.3. Cambios metabólicos inducidos por el estrés osmótico.

El estrés salino tiene dos principales efectos perjudiciales sobre las células: la pérdida de presión de turgencia y la toxicidad de los iones Na^+ en el metabolismo celular (Figura 11). La adaptación de las células de levadura a estas condiciones requiere la inducción de I) mecanismos que logren elevar la concentración intracelular de glicerol para restablecer la presión de turgencia y II) la modificación de los sistemas de transporte a través de la membrana plasmática para expulsar del citosol a los iones Na^+ (Park *et al.*, 2001).

I) Los mecanismos por los cuales las levaduras mantienen concentraciones elevadas de glicerol en equilibrio con el estrés osmótico externo son: i) un incremento en la producción de glicerol, ii) una reducción de la pérdida de glicerol a través de la membrana celular y iii) incorporación del glicerol que se había perdido de la célula. En general estos

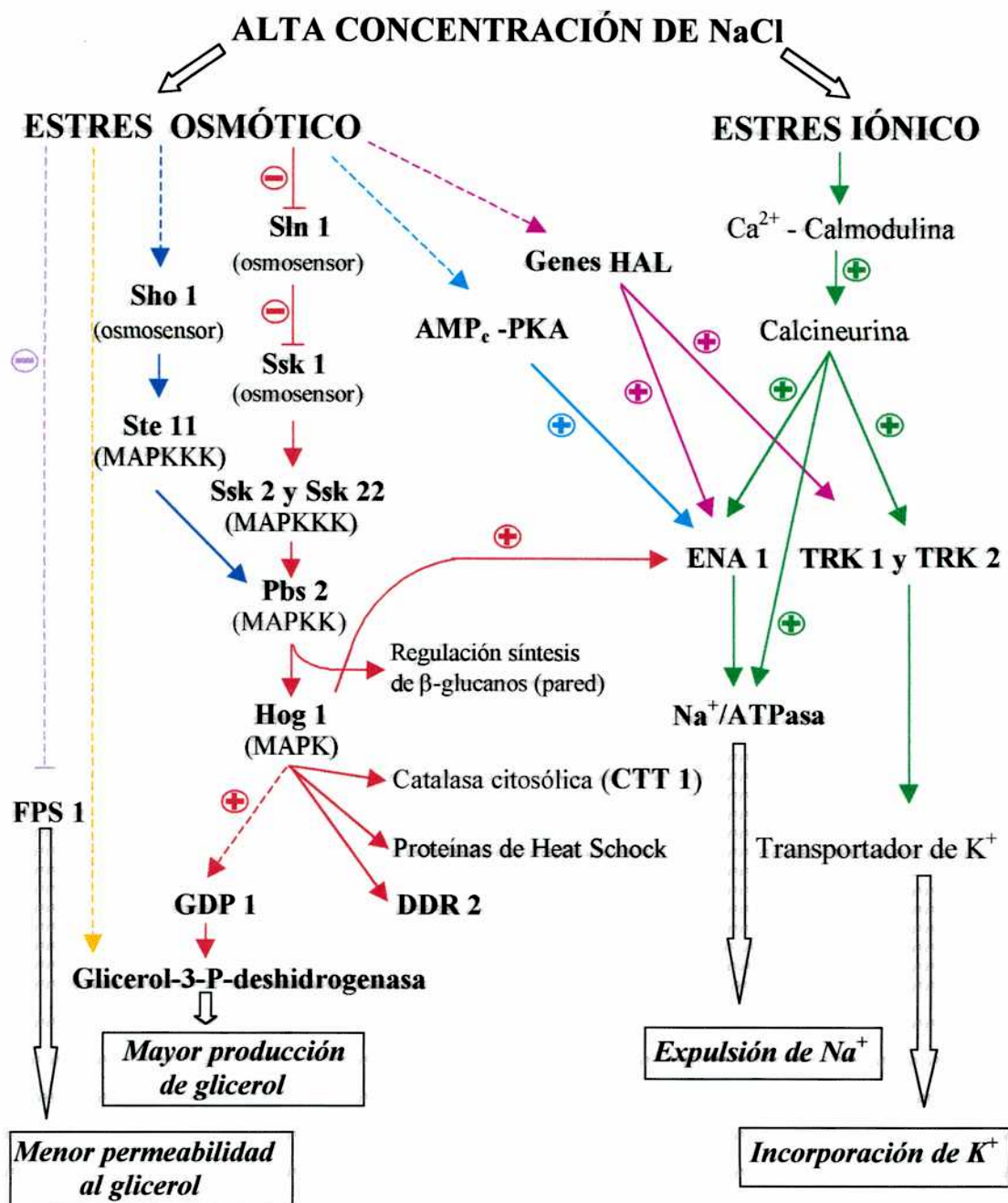


Figura 11: Esquema de las cascadas de activación metabólica inducidas por el estrés osmótico y por el exceso de iones sodio (estrés iónico). ➔ : cascada de inducción de la síntesis de glicerol (via Hog). Es activada por dos mecanismos independientes a partir de dos osmosensores diferentes en la membrana, Sho1 y Sln1-Ssk1. Ambas rutas de activación (azul y rojo respectivamente) convergen en la proteína Pbs2. ➔ : Vía independiente de la cascada Hog para la activación de la enzima Glicerol-3-P-deshidrogenasa. ➔ : Inhibición del gen FPS1 que codifica para la proteína de canal que controla el pasaje de glicerol desde la célula al exterior. ➔ : El complejo Ca^{2+} -calmodulina activa a la proteína calcineurina que a su vez induce la expresión de los genes ENA1 y TRK1/TRK2. ➔ : Cascada regulatoria de la proteína quinasa A dependiente de AMP_c que regula la expresión del gen ENA1. ➔ : Los genes de halotolerancia (HAL) inducen la expresión de los genes para los transportadores de Na^+ y K^+ .

mecanismos son regulados a través de cascadas de proteínas-quinasas denominadas MAPK (Mammalian mitogen-activated protein kinase cascades). Son módulos proteicos transmisores de señales a partir de estímulos ambientales y que se encuentran tanto en células eucariotas superiores como en levaduras (Bisland-Marchesan *et al.*, 2000). Una cascada MAPK típica está compuesta por tres proteínas-quinasas, una MAPK, una MAPK kinasa (MAPKK) y una MAPKK kinasa (MAPKKK). Las células de levadura poseen diversas cascadas MAPK que transmiten diferentes estímulos extracelulares (por ejemplo, feromonas de apareamiento, osmolaridad elevada, osmolaridad reducida y escasez de nitrógeno). *S. cerevisiae*, considerada como levadura referente, responde al incremento en la osmolaridad del medio extracelular activando la cascada Hog1 MAPK. Esta cascada es esencial en la supervivencia de la levadura en medios de alta osmolaridad porque el blanco principal en esta cascada de activación es la inducción de la síntesis de glicerol. Por eso a esta vía se la conoce con el nombre HOG (high-osmolarity glicerol response).

La ruta HOG es activada por dos mecanismos independientes (Bisland-Marchesan *et al.*, 2000). El primero involucra un osmosensor o sensor de turgencia de dos componentes, integrado por las proteínas Sln1 (de transmembrana) y Ssk1 que activan a las proteínas-quinasas Ssk2 y Ssk22 (homólogas de MAPKKK). Una vez activadas, estas MAPKKKs fosforilan a la proteína Pbs2 (MAPKK). Pero la fosforilación de Pbs2 también puede ocurrir a través de un segundo mecanismo, el cual involucra a la proteína de transmembrana Sho1 (osmosensor) y la MAPKKK Ste11. Así ambas rutas de activación convergen a nivel de la proteína Pbs2 la cual puede ser activada por fosforilación por parte de Ssk2, Ssk22 o Ste11 MAPKKK. Una vez activada la Pbs2 MAPKK fosforila la Hog1 MAPK, la cual induce diversas respuestas de

estrés. Existe un gran número de genes que se sabe son inducidos por Hog1 MAPK en respuesta al estrés osmótico. Entre ellos hay genes responsables en la adaptación osmótica como aquellos para enzimas involucradas en la síntesis de glicerol (GPD1, GPP2 y GLO1) y en la expulsión de iones Na^+ (ENA1 / PMR2A) y genes involucrados en la respuesta general de estrés como aquellos para la catalasa citosólica (CTT1), proteínas de heat shock (HSP12, HSP70 y HSP104) y una proteína inducida por daño al ADN (DDR2) (Bisland-Marchesan *et al.*, 2000). No se conocen todavía las proteínas que son blancos inmediatos de Hog1 y necesarias para generar las respuestas al estrés osmótico. Recientemente Bisland-Marchesan *et al.* (2000) han encontrado una proteína, Rck2 kinasa que interactúa con Hog1 y cuya actividad es regulada por Hog1 MAPK sugiriendo que Rck2 es uno de los substratos hasta ahora no conocidos.

Uno de los blancos finales de inducción a partir de Hog1 es el gen GPD1 que codifica para la enzima citosólica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa que es la enzima principal en la producción de glicerol en *S. cerevisiae*. Debido a que mutantes en la ruta HOG son parcialmente defectuosos en la producción de glicerol inducida por estrés osmótico debe existir una segunda ruta, independiente de la ruta HOG, que afecta la producción de glicerol. Pero este segundo control debe ocurrir a nivel post-traducciona ya que mutantes hog1 son enteramente deficientes en la expresión de GPD1 inducida por estrés osmótico (Thevelein, 1994).

El estrés osmótico no sólo afecta la producción de glicerol sino que también reduce fuertemente la permeabilidad de las células a este poliol. Se encontró que las células de levadura controlan en parte la acumulación de glicerol regulando su exportación mediada por

la proteína Fps1. Fps1p es un miembro de la familia MIP de proteínas de canal estrechamente ligadas a los facilitadores de glicerol bacterianos. La proteína está localizada en la membrana plasmática. El papel fisiológico de Fps1p parece estar relacionado más a la exportación de glicerol que a su importación a la célula. Fps1 es inhibido durante el estrés osmótico y se activa rápidamente cuando las células son liberadas del estrés. Esta regulación sería independiente de las vías regulatorias HOG y PKC (Enriquez-Freire *et al.*, 1999).

II) Cambios en el potencial de agua externo no sólo someten a las células a un estado de estrés osmótico sino también a un estrés por la presencia de iones tóxicos como el Na^+ o Li^+ . Las células de levadura, como las demás células eucariotas, utilizan sistemas de transporte primario (mediados por las ATPasas de tipo P) y transportes secundarios (mediados por proteínas canal y cotransportadores) para mantener elevada la concentración intracelular de K^+ (ión óptimo para la fisiología celular) y baja la concentración intracelular de Na^+ y Li^+ . La inducción y regulación del transporte de estos iones están interrelacionadas. *S. cerevisiae* expulsa activamente los iones Na^+ y Li^+ a través de la Na^+ -ATPasa tipo P, codificada por el gen ENA1 (también llamado PMR2). ENA1 se expresa en condiciones normales de crecimiento pero su expresión se incrementa sensiblemente por efecto de estrés osmótico, por aumento de la cantidad intracelular de iones tóxicos y por pH alcalino (Park *et al.*, 2001). La inducción del gen ENA1 es mediada principalmente por Hog1 (MAPK) y por la fosfatasa calcineurin activada a su vez por el complejo Ca^{2+} -calmodulina. Calcineurin además actúa directamente sobre la ATPasa mencionada, activándola (Matsumoto, *et al.*, 2001). También los genes HAL (genes de halotolerancia) estarían involucrados en la

regulación de ENA1: el gen HAL1 codifica un efector de la expresión de ENA1, HAL8 y HAL9 codificarían activadores de la respuesta de ENA1 al estrés de sal (Nadal *et al.*, 1999). También en *S. cerevisiae* existe un sistema de transporte de K^+ de alta afinidad, codificado por los genes TRK1 y TRK2. Este sistema es activado tanto por la escasez de potasio como por el exceso de sodio. El sistema admite también iones Na^+ pero incrementa su afinidad por K^+ evitando la entrada de un exceso de Na^+ cuando los niveles de este catión en el medio son demasiado elevados (Nadal *et al.*, 1999). La activación por exceso de sodio sería mediada por calcineurin pero el sistema Trk1-Trk2 podría estar regulado también por dos proteínas kinasas codificadas por los genes HAL4 y HAL5. Por lo tanto calcineurin y los genes HAL constituirían dos vías de control independientes (Mulet *et al.*, 1999).

También la ruta metabólica y regulatoria a través de la proteínaquinasa A dependiente de AMPc (AMPc-PKA) tendría participación en la respuesta celular al estrés osmótico principalmente regulando la expresión del gen ENA1 que codifica la ATPasa expulsora de Na^+ pero regulando también la expresión de otras diversas proteínas (Marquez & Serrano, 1996; Norbeck & Blomberg, 2000).

Las células de levadura contienen otra cascada de tipo MAPK, la cascada de la proteína-kinasa C (PKC) que sería activada bajo condiciones de estrés hiposmótico (Thevelein, 1994). La cascada PKC está involucrada en la integridad y morfogénesis de la pared celular mediante su participación en el control de la síntesis de β -glucanos. También se ha encontrado que esta cascada regulatoria juega un papel en el control transcripcional de los genes para las subunidades catalíticas de las enzimas quitín-sintetasas. Debido a que una rápida pérdida de glicerol por parte de las células es uno de los principales eventos durante

un descenso de la presión osmótica externa, los componentes controladores de la permeabilidad al glicerol, como por ejemplo la proteína facilitadora para glicerol codificada por FPS1, podrían ser blancos de esta cascada PKC. Por otra parte, la ruta HOG (la otra cascada MAPK) también estaría implicada en la arquitectura de la pared celular de *S. cerevisiae* a través del control de la síntesis de β -glucanos. La proteína PBS2, perteneciente a esta cascada regulatoria, actuaría en la regulación transcripcional de EXG1 un gen que codifica la principal glucanasa de levaduras. La participación de la ruta HOG en la arquitectura de la pared celular con la activación de la ruta PKC bajo condiciones hiposmóticas sugiere una interconexión entre estas dos cascadas regulatorias y transductoras de señales. Se propuso que las vías PKC y HOG tendrían papeles opuestos en la regulación de la plasticidad de la pared celular (García-Rodríguez. *et al.*, 2000).

4. Breve descripción de las levaduras estudiadas en este trabajo

Género *Torulaspora*

El género *Torulaspora* se caracteriza por la presencia de células redondas y pequeñas y por la producción de ascosporas también redondas. Asexualmente se reproducen por brotación. Levaduras pertenecientes a este género se encuentran frecuentemente en jugos de fruta (Deak & Beuchat, 1993), en masas fermentadas (Almeida & Pais, 1996) y en bebidas alcohólicas (Sanni & Loenner, 1993). Algunas especies son osmotolerantes.

Torulaspora delbrueckii se usó en Japón como levadura osmotolerante en panadería. La característica de osmotolerancia la hace especialmente útil en la fabricación de panes dulces y en pastelería. Sin embargo, posee como desventaja el tamaño pequeño de sus células lo que dificulta la recuperación de la biomasa durante la producción. Por esta razón, investigadores japoneses construyeron mediante la técnica de fusión de protoplastos cepas diploides o poliploides las cuales poseen células de mayor tamaño (Spencer & Spencer, 1997). *T. delbrueckii* también se utiliza en la fabricación de ciertos vinos dulces (Henschke, 1997).

Género *Debaryomyces*

Este género está representado por nueve especies, todas osmotolerantes (Spencer & Spencer, 1997). Las células son esféricas u ovals cortas, presentándose simples, de a pares o formando cadenas cortas. Se reproducen asexualmente por brotación. Por conjugación forman esporas que son también esféricas y generalmente se presentan una o dos por asco (Kurtzman & Fell, 1988).

Debaryomyces hansenii es una levadura halotolerante capaz de crecer en un rango inusualmente amplio de concentraciones de sal. En condiciones de estrés salino establece el balance osmótico con el medio mediante la producción y acumulación de dos polihidroalcoholes, glicerol y arabitol (Adler *et al.*, 1985). Esta levadura se encuentra frecuentemente en leche, cuajo, quesos, frutas, jugos de uva, vino, cerveza, salsas,

embutidos, carnes, sake-moto, sake, tabaco, miso, hongos, aire, fluidos de curtiembre, agua; en el hombre y otros animales.

Género *Saccharomyces*

Las levaduras pertenecientes a este género se reproducen asexualmente por brotación multilateral. Las células son globosas, elipsoidales o cilíndricas. Pueden formar pseudohifas pero no hifas septadas. La fase vegetativa es predominantemente diploide (o de ploidía superior) y la conjugación ocurre durante o inmediatamente después de la germinación de las ascosporas. Las ascosporas son globosas a elipsoidales cortas, con pared lisa y puede haber de 1 a 4 por asco. Estas levaduras se caracterizan por fermentar activamente, por no producir almidón o compuestos similares y por no crecer con nitrato como única fuente de carbono (Kurtzman & Fell, 1988).

Saccharomyces cerevisiae junto a otras especies muy cercanas filogenéticamente constituyen un grupo de levaduras utilizadas por la humanidad durante miles de años en la fabricación de pan, de vino y para otros propósitos similares. Hasta el momento, *S. cerevisiae* es la especie de levadura más estudiada y conocida. Tiene un gran valor industrial. Fue usada por siglos en las industrias tradicionales basadas en levaduras y actualmente también es utilizada en la producción de proteínas heterólogas de diferentes orígenes (Henschke, 1997). Cada proceso industrial requiere cepas con determinadas características, necesarias para la obtención del producto con las cualidades deseadas.

Las levaduras de vino deben, en primer lugar, catalizar en forma rápida, completa y eficiente la conversión de los azúcares de la uva en etanol, sin el desarrollo de aromas indeseados. Deben poseer una elevada tolerancia al sulfito que se agrega como agente antimicrobiano y antioxidante, al estrés osmótico y al etanol y tener una alta estabilidad genética. Luego en la producción de diferentes clases de vino (blanco, tinto, dulce, espumante) otras características particulares cobran un interés especial. Por ejemplo, para la fabricación de vino espumante son importantes las propiedades autolíticas y de floculación; la producción de vino dulce se beneficia con el uso de cepas con elevada osmotolerancia y escasa producción de ácidos volátiles (Henschke, 1997).

En la industria panadera, una buena cepa de levadura es aquella con rápida velocidad de crecimiento en condiciones aeróbicas, para reducir el tiempo de producción, y con alta velocidad de fermentación en la masa del pan. Los azúcares disponibles para la levadura en la fermentación de la masa provienen de dos fuentes: la harina contiene pequeñas cantidades de azúcares libres como glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa y una variedad de glucofructanos; la segunda fuente de azúcares fermentables es la maltosa producida por la hidrólisis del almidón llevada a cabo por amilasas del trigo que se activan durante la producción de la masa. Por lo tanto, una buena levadura de panadería debe también fermentar rápidamente la maltosa y tener elevada cantidad de invertasa y otras enzimas relacionadas para hidrolizar la sacarosa y los glucofructanos.

Aunque la levadura de panadería es producida en condiciones altamente aeróbicas es luego utilizada en la manufactura de la masa del pan en circunstancias donde el oxígeno está

limitante o ausente. Así una buena levadura de panadería debe representar un compromiso entre las contrastantes demandas de producción y de uso (Oliver, 1991).

BIBLIOGRAFÍA

Adler, L. and Gustafsson, L. (1980). Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology* 124, 123-130.

Almeida, M.J. and Pais, C. (1996). Leavening and freeze tolerance of yeasts isolated from traditional corn and rye bread doughs. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 12: 4401-4404.

Barnett, J.A. (1992). The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: a short review for non-taxonomists. *Yeast* 8, 1-23.

Bilsland-Marchesan, E. Ariño, J., Saito, H., Sunnerhagen, P. and Posas, F. (2000). Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1. *Molecular and Cellular Biology* 20, 11: 3887-3895.

Blomberg, A. (1988). Osmoregulation and Osmotolerance in Yeast. Ph. D. Thesis. Department of Marine Microbiology, University of Göteborg, Göteborg, Sweden.

Brown, A.D. (1976). Microbial water relations. *Bacteriological Reviews* 40, 803-846.

Brown, A.D. (1978). Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Advances in Microbial Physiology* 17, 181-242.

Brown, A.D. and Simpson, J.R. (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *Journal of General Microbiology* 72, 589-591.

Brown, A.D. and Edgley, M. (1980). Osmoregulation in Yeast. *In: Genetic engineering of osmoregulation*. Rains, D.W., Valentine, R.C. and Hollaeder, A. (eds.). Plenum Press, New York p. 75-90.

Caumette, P., Cohen, Y. and Matheron, R. (1991). Isolation and characterization of *Desulfovibrio halophilus* sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from Solar Lake (Sinai). *Systematic and Applied Microbiology* 13, 33-38.

Csonka, L.N. and Hanson A.D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: Genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology* 45, 569-606.

Deak, T and Beuchat, L.R. (1993). Yeasts associated with fruit juice concentrates. *Journal of Food Protection* 56, 777-782.

Enriquez-Freire, E., Lopez, R. and Peña, A. (1999). Potassium ion efflux induced by cationic compounds in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 14, 1: 147-157

Galinski, E.A. and Trüper, H.G. (1994). Galinski E.A., Trüper H.G. (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 95-108.

Galinski, E.A. (1995). Osmoadaptation in Bacteria. *In: Advances in Microbial Physiology*. R. K. Poole (ed). Academic Press, London. 37, 273- 328.

García-Rodríguez, L.J., Durán, A. and Roncero, C. (2000). Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity response (HOG) pathway: Evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *Journal of Bacteriology* 182, 9: 2428-2437.

Gardner, W.R. and Ehlig, C.F. (1965). Physical aspects of the internal water relations of plant tissues. *Plant Physiology* 40, 705-710.

Goto, K., Motoyoshi, T., Tamura, G., Obata, J. and Hara, S. (1990). Chromosomal transformation in *Saccharomyces cerevisiae* with DNA isolated by pulse field gel electrophoresis. *Agricultural Biological Chemistry* 54, 1499-1504.

Griffin, D.H. (1981). Fungal Physiology. John Wiley and Sons, New York, p. 153.

Henschke, P.A. (1997). Wine yeast. *In*: Yeast sugar metabolism. Biochemistry, genetics, biotechnology and applications. Zimmermann, F.R. and Entian, K.D. (eds.). Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster, Pennsylvania U.S.A. p. 527-560.

Hocking, A.D. (1993). Responses of xerophilic fungi to changes in water activity. *In* Stress Tolerance of Fungi. Jennings, D.H. (ed.). Marcel Dekker, Inc. New York. p.233-255.

Höfer, M. (1997). Membranes. *In*: Yeasts in Natural and Artificial Habitats. Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p. 95-132.

Hosono, K. (1992). Effect of salt stress on lipid composition and membrane fluidity of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of General Microbiology* 138, 91-96.

Jermimi, M.F.G. and Schmidt-Lorenz, W. (1987). Growth of osmotolerant yeasts at different water activity values. *Journal of Food Protection* 50, 5: 404-410.

Kurzman, C. and Fell, J.W (eds.) (1998). *The yeast, a taxonomic study*. Fourth edition Elsevier Science B.V., Amsterdam, New York.

Lages, F. and Lucas, C. (1997). Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica acta* 1322, 8-18.

Low, P.S. (1985). Molecular basis of the biological compatibility of nature's solutes. *In: Transport Processes – Iono- and Osmoregulation*. Gilles-Baillien, R. (ed.). Springer-Verlag Berlin. p. 469-477.

Marquez, J.A. and Serrano, R. (1996). Multiple trnasduction pathways regulate the sodium-extrusion gene PMR2/ENA1 during salt stress in yeast. *FEBS Letters* 382, 89-92.

Matsumoto, T.K., Pardo, J.M., Takeda, S., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (2001). Tobacco and Arabidiopsis SLT1 mediate salt tolerance of yeast. *Plant Molecular Biology* 45, 4: 489-500.

Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G. and Serrano, R. (1999). A novel machanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the HAL4 and HAL5 protein kinases modulate the TRK1-TRK2 potassium transporter. *Molecular and Cellular Biology* 19, 5: 3328-3337.

Nadal, E. de, Calero, F., Ramos, J. and Ariño, J. (1999). Biochemical and genetic analyses of the role of yeast casein kinase 2 in salt tolerance. *Journal of Bacteriology* 181, 20: 6456-6462.

Norbeck, J. and Blomberg, A. (2000). The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo-instigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 2: 121-137.

Oliver, S.G. (1991). "Classical" Yeast Biotechnology. *In: Biotechnology hand Books* (vol. 4). Tuite, M.F. and Oliver, S.G. (eds.). Plenum Press. New York and London. p. 213-248.

Onishi, H. (1990). Yeasts in fermented foods. *In: Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (eds.) Yeast technology*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hong Kong. p. 167-198.

Oren, A. (1991). *In: General and Applied Aspects of Halophlic Bacteria*. Rodriguez-Varela, F. (ed.). Plenum Press, New York. p. 25-31.

Park, S.Y., Seo, S.B., Lee, S.J., Na, J.G. and Kim, Y.J. (2001). Mutation in *PMR1*, a Ca^{+} -ATPase in Golgi, confers salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by inducing expression of *PMR2*, an Na^{+} -ATPase in plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 31: 28694-28699.

Prior, B.A. and Hohmann, S. (1997). Glycerol production and osmoregulation. *In: Yeast Sugar Matabolism. Biochemistry, genetics, biotechnology and applications*. Zimmermann, F.K. and Entian, K.D. (eds.). Technomic publishing company, Inc. Lancaster, Pensylvania, U.S.A. p. 313-337.

Sanni, A.I. and Loenner, C. (1993). Identification of yeasts isolated from nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiology* 10, 517-523.

Scott, W.J. (1957). Water relations of food spoilage microorganisms. *Advances in Food Research* 7, 83-127.

Sigler, K. and Höfer, M. (1997). Biotechnological aspects of membrane function. *Critical Reviews in Biotechnology* 17, 2: 69-86.

Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (1978). Production of polyhydroxy alcohols by osmotolerant yeasts. *In: Primary Products of Metabolism*. Rose, A.H. (ed.). Academic Press New York, London. p. 393-425.

Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (1997). Taxonomy: The name of the Yeast. *In: Yeasts in natural and artificial habitats*. Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (eds.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. p. 11-32.

Steinkraus, K.H., Ayres, R., Olek, A. and Farr, D. (1985). Factors influencing permeability of the cell membrane of the osmotolerant yeast *Saccharomyces rouxii* grown in the presence and absence of 18% NaCl. *International Journal of Food Microbiology* 1, 291-299.

Sutherland, F.C.W., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Prior, B.A. and Kilian, S. (1997). Characteristics of Fps1-dependent and-independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 179, 24: 7790-7795.

Thevelein, J.M. (1994). Signal Transduction in Yeast. *Yeast* 10, 1753-1790.

van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. and Konings, W.N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biosynthesis. *Microbiological Reviews* 59, 304-322.

Walker, G.M. (1998). Yeast physiology and biotechnology. John Wiley & Sons (eds.). Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.

Yoshikawa, S., Mitsui, N., Chikara, K., Hashimoto, H., Shimosaca, M. and Okasaki, M. (1995). Effect of salt stress on plasma membrane permeability and lipid saturation in the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80, 2: 131-135.

Zhilina, T.N. and Zavarzin, G.A. (1990). Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria.. *FEMS Microbiology Reviews* 87, 315-322.

Zimmerman, U. (1978). Physics of turgor and osmoregulation. *Annual Review of Plant Physiology* 29, 121-148.

OBJETIVOS

En los procesos industriales donde la presión osmótica es elevada, la osmotolerancia es una característica preciada. Sin embargo, *S. cerevisiae* que es la levadura utilizada tradicionalmente en la industria para la fabricación de diversos productos, crece pobremente en medios hiperosmóticos. Por otra parte, se conoce poco sobre la fisiología de levaduras capaces de crecer en soluciones concentradas de sales o azúcares, es decir osmotolerantes.

El propósito de este trabajo fue obtener cepas híbridas entre levaduras osmotolerantes y cepas industriales de *S. cerevisiae* que reúnan las características deseables de ambos tipos de levadura: el carácter osmotolerante y los parámetros de interés industrial. Para ello se fijaron los siguientes objetivos de trabajo:

- 1) Seleccionar levaduras con marcada tolerancia osmótica.
- 2) Construir, mediante la técnica de fusión de protoplastos, cepas híbridas entre las levaduras osmotolerantes seleccionadas y cepas industriales de *S. cerevisiae*.
- 3) Estudiar las levaduras parentales y aquellas resultantes del proceso de fusión (productos de fusión) mediante análisis comparativos de:

Crecimiento en medios de distinta osmolaridad.

- Capacidad de fermentar y/o asimilar diferentes hidratos de carbono.

Producción y acumulación de polioles.

Mecanismos de transporte de solutos a través de la membrana plasmática y su posible alteración en medios hiperosmóticos.

Patrones electroforéticos de cromosomas y de proteínas.

CAPÍTULO I

SELECCIÓN Y MEJORAMIENTO DE CEPAS DE LEVADURA

Saccharomyces cerevisiae es la levadura empleada tradicionalmente en la industria para la producción de diversos productos. Algunos de estos bioprocesos se desarrollan en medios que poseen presión osmótica alta. Por ejemplo: la producción de bebidas como el sake o el miso, donde los mostos son fermentados en presencia de elevadas concentraciones de azúcares o sales (Onishi, 1990); la industria panadera, particularmente en la manufactura de masas y panes dulces, donde es común el agregado de sacarosa o fructosa que llegan a concentraciones elevadas de hasta 25% en peso o más, y aún en la fabricación de masas saladas en las que se adiciona cantidades significativas de NaCl (Evans, 1990).

S. cerevisiae posee un cierto grado de osmotolerancia pero crece muy pobremente en medios de cultivo con alta presión osmótica. Esto limita el rendimiento de esta especie de levadura en los procesos mencionados.

La fusión de protoplastos es una técnica efectiva y ampliamente utilizada para intercambiar información genética entre cepas, aún entre aquellas de diferentes especies o géneros, pudiéndose obtener así cepas industriales genéticamente modificadas (Ouchi *et al.*, 1979; Spencer *et al.*, 1980, 1985 y 1988). Por definición un **protoplasto** es una célula que no conserva restos de pared celular (Bacon *et al.* 1969, Brenner *et al.* 1958). Cuando esta condición no se cumple absolutamente, se considera que la estructura es un **esferoplasto** (Darling *et al.* 1969). En ambas formas las células son osmóticamente frágiles, estallan en un

medio no estabilizado osmóticamente. A pesar de las diferencias puntualizadas, los términos protoplasto y esferoplasto suelen ser usados en forma indistinta. La regeneración de la pared celular, en la mayor parte de los casos, se realiza en medios agarizados y es posible potenciar su engrosamiento mediante polietilenglicol (PEG) (Svoboda & Piedra, 1983). A las células resultantes del proceso de fusión se las llama comúnmente **productos de fusión (PF)**. Cuando estos productos reúnen características de ambas cepas parentales se los denomina también **híbridos**.

El mecanismo de la formación de híbridos mediante la fusión de protoplastos no se conoce aún en forma completa. Probablemente consista en la transferencia de unos pocos genes desde un núcleo a otro que sería dominante respecto al primero (Spencer *et al.*, 1985). Así el genoma de la cepa receptora se mantiene en su forma original con el agregado de unos pocos caracteres. Es improbable que un gran número de caracteres sean transferidos durante una fusión. Sin embargo, una vez integrado el carácter deseado en el genoma es posible introducir otros a través de sucesivas fusiones (Spencer *et al.*, 1990).

Se realizaron diversas fusiones entre levaduras osmotolerantes y diferentes cepas industriales de *S. cerevisiae* con la intención de estudiar las características y comportamiento de los PF resultantes.

OBJETIVOS

- Caracterización y selección de cepas de levadura osmotolerantes. Aquellas levaduras seleccionadas serán utilizadas como cepas de partida en el siguiente punto.

- Modificación y mejoramiento genético de cepas industriales a través de la técnica de fusión de protoplastos.

MATERIALES Y METODOS

Cepas:

Saccharomyces cerevisiae P-158 (levadura de pan)

Saccharomyces cerevisiae LPnu (levadura de pan)

Saccharomyces cerevisiae L16 (levadura de pan)

Saccharomyces cerevisiae LPO6 (levadura de pan)

Saccharomyces cerevisiae UCD 522 (Montrachet) (levadura de vino)

Saccharomyces cerevisiae Epernay (levadura de vino)

Saccharomyces cerevisiae NCYC UK 1062 (levadura de cerveza)

Saccharomyces cerevisiae Brasil-Dest.(levadura de destilería)

Saccharomyces cerevisiae diastaticus 625 (p-) CR

Zigosaccharomyces rouxii U.K.

Zigosaccharomyces rouxii Sr-x-2RC

Zigosaccharomyces bailii CBS-Delft

Zigosaccharomyces bailii NCYC 1427

Zigosaccharomyces cidri NCYC 1567

Schizosaccharomyces octosporus - Zig 1

Schizosaccharomyces octosporus - Zig 2

Schizosaccharomyces octosporus - Zig 3

Torulaspora delbrueckii CBS-813

Debaryomyces hansenii NRRL Y-7393

Las cepas pertenecen al cepario de PROIMI. Fueron guardadas en glicerol 30% a -18°C y durante los estudios mantenidas en medio completo YEPD agarizado, a 4 °C.

Medios de cultivo:

YEPD en g/l: Extracto de levadura 10, peptona 20, glucosa 20

YEP en g/l: Extracto de levadura 10, peptona 20

YEPglucosa-x: YEP + glucosa anhidra x g/l (x = 400, 500, 600 ó 700)

YEPsacarosa-x: YEP + sacarosa x g/l (x = 550 y 600)

YEPD + x M NaCl (x = 2, 2,5 y 3)

Cuando los medios se utilizaron sólidos se agregó 20 g/l agar.

El pH se ajustó en 4,5-5,0

Medios de regeneración y selección:

YEP-Gal + 1,6 M KCl + agar 30 g/l (YEP-Gal: YEP + galactosa 20 g/l)

YEPD + 2 M NaCl + 15 g/l agar

YEPD-700 + 0,6 M KCl + agar 30 g/l (YEPD-700: YEP + glucosa 700 g/l)

YEPD-700 + 15 g/l agar

Crecimiento en medios con distintas presiones osmóticas

Las levaduras fueron sembradas en estrías, en placas de Petri que tenían los diferentes medios agarizados. Se controló y comparó el crecimiento durante 8 días de incubación a 30 y 37 °C según correspondió.

Obtención de protoplastos

Se realizó según el método de Spencer *et al.*, 1988:

Se cosecharon por centrifugación (9.980 g, 1 min) las células de cultivos en fase exponencial, crecidos en YEPD y se resuspendieron en solución de pretratamiento. Luego de incubar 30 min a 37°C se cosecharon las células y se resuspendieron aproximadamente 5×10^7 cel/ml en solución de enzima y se incubaron a 37°C .

Los protoplastos obtenidos se centrifugaron y se lavaron 4 veces con KCl (0,6; 1,2; 1,4 o 1,6 M) como estabilizador osmótico.

Las levaduras osmotolerantes requirieron concentraciones más elevadas de estabilizador osmótico (KCl 1,2; 1,4 o 1,6 M) que las cepas de *S. cerevisiae* (KCl 0,6 M). Las concentraciones de KCl 1,2 y 1,6 M fueron previamente determinadas como óptimas para *D. hansenii* y *S. octosporus* respectivamente. La concentración de KCl 1,4 M para *T. delbrueckii*, fue determinada en el presente trabajo.

Previamente se definió en este laboratorio que la enzima Suc d'*Helix pomatia* es la más efectiva para levaduras osmotolerantes (10% v/v para *D. hansenii* y *S. octosporus*). Se estableció que la concentración óptima para *T. delbrueckii* es 20% (v/v) de dicha enzima (desarrollado al final de este punto).

Solución de pretratamiento: tampón Tris-HCl 0,1M (pH 7,4), EDTA 0,01M, KCl 0,6; 1,2; 1,4 o 1,6 M y β -mercaptoetanol 0,1M.

Soluciones de enzima: Se prepararon en tampón ácido cítrico-KH₂PO₄ (pH 5,6) más KCl 0,6; 1,2; 1,4 o 1,6 M. Para *S. cerevisiae* se usó la enzima Novozym 234: 2,0 mg/ml. Para levaduras osmotolerantes se usó Suc d'*Helix pomatia*: 10 - 20 % (v/v).

Metodología para optimar la formación de protoplastos de *T. delbrueckii*: De cultivos en fase exponencial, se cosecharon las células por centrifugación (9.980 g, 10 min), se lavaron y resuspendieron en solución de pretratamiento. Luego de incubar 30 min a 37 °C se cosecharon nuevamente las células y se resuspendieron en solución de enzima en una concentración aproximada de 5x10⁷ cel/ml y se incubaron a 37 °C.

Para optimar la concentración del estabilizador osmótico se ensayaron soluciones de KCl 1,0; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5 y 1,6 M, más 10 % v/v de enzima Suc d'*Helix pomatia*. Para optimar la concentración de enzima, se probaron soluciones con 10; 20 y 30 % de enzima con KCl 1,4 M.

En ambos ensayos de optimización se tomaron periódicamente, dos muestras (50µl) de la mezcla de incubación (células-enzima). Estas se diluyeron, por separado, en 2,0 ml de la correspondiente solución de estabilizador y en 2,0 ml de H₂O destilada. Luego de agitar vigorosamente se midió absorbancia a 800 nm. En el agua destilada estallan los protoplastos y esferoplastos y en la solución de KCL quedan tanto las células intactas, como las osmóticamente frágiles (c.o.f: protoplastos o esferoplastos).

Cálculos:

$$\% \text{ c.o.f } (t_n) = \frac{\text{abs KCl } t_n - \text{abs H}_2\text{O } t_n}{\text{abs KCl } t_0} \times 100$$

% c.o.f (t_n): % de células osmóticamente frágiles producidas al tiempo n respecto a las células iniciales.

abs H₂O t_n : absorbancia de la dilución en agua en el tiempo n

abs KCl t_n : absorbancia de la dilución en la correspondiente solución de KCl en el tiempo n

abs KCl t_0 : absorbancia de la dilución en la correspondiente solución de KCl en el tiempo 0.

$$\% \text{ de células totales incubadas en el tiempo n} = \frac{\text{abs KCl } t_n}{\text{abs KCl } t_0} \times 100$$

Todos los lavados y diluciones fueron hechos con KCl como estabilizador osmótico, en concentraciones de 1,0; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5 o 1,6 M, según correspondió.

Fusión de protoplastos

Las suspensiones de protoplastos en KCl de ambas cepas a fusionar, se centrifugaron¹ y los sedimentos obtenidos fueron resuspendidos en volúmenes iguales de CaCl₂ 0,4 M (ó 0,8M para osmotolerantes). Luego ambas suspensiones se mezclaron y centrifugaron (9.980 g, 15 seg). El sedimento fue resuspendido suavemente en 1,5 ml de solución de fusión e incubado por 25 min a 30°C. Luego se adicionó el volumen total de la mezcla de fusión a una mezcla de partes iguales de CaCl₂ 0,8 M y agar 3% fundido y se sembró rápidamente las placas de Petri que tenían los medios de regeneración apropiados. Cuando se utilizó medios de regeneración selectivos se sembró como control las cepas tratadas igualmente pero sin mezclarlas entre sí. Las placas fueron incubadas durante aproximadamente 5 días a 30 y 37 °C hasta la aparición de colonias.

¹ En la fusión de *T. delbrueckii* x *S. cerevisiae*, los protoplastos de *T. delbrueckii* fueron muertos por calor. Para ello se sometieron a un shock térmico incubándolos en baño de agua a 70 °C durante 15 min. Al cabo de ese tiempo, una muestra de los protoplastos tratados fue teñida con azul de metileno y se observó luego al microscopio óptico. En su totalidad los protoplastos estaban teñidos de azul, indicando que el 100% estaban muertos.

A continuación se prosiguió con lo indicado en el protocolo de fusión.

Solución de fusión: polietilenglicol (PEG) MW 6000 30% en amortiguador Tris-HCl (pH 8,1), adicionado con Cl_2Ca 20 mM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A- Caracterización de levaduras de acuerdo a su capacidad osmotolerante

Diferentes cepas de levaduras fueron caracterizadas en base a su capacidad de crecimiento en medios con distinta presión osmótica. Las cepas se sembraron en medios agarizados y/o líquidos con distintas concentraciones de glucosa, sacarosa y cloruro de sodio (NaCl).

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1.1: Crecimiento de cepas de levadura en medios con elevada presión osmótica.

Cepas:	Medio con:								
	g/l glucosa				g/l sacarosa		M NaCl		
	400	500	600	700	500	600	2	2,5	3
<i>S. cerevisiae</i> P-158 (Baker's yeast)	+++	++	-	-	+++	+++	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> LPnu (Baker's yeast)	+++	++	-	-	+++	+++	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> L16 (Baker's yeast)	+++	++	-	-			-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> LPO6 (Baker's yeast)	+++	++	-	-			-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> 522 (Montrachet) (wine yeast)	+++	++	-	-	+++	+++	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> Epernay (wine yeast)	++	+	-	-			-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> NCYC UK 1062 (Brewery yeast)	++	+	-	-	++	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> Brasil-Dest. (Destillery yeast)	+++	++	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> var <i>diastaticus</i> 625 (p-) CR	+++	++	-	-			-	-	-
<i>Z. rouxii</i> U.K.	+++	+++	+++	++	++	++			
<i>Z. rouxii</i> Sr-x-2RC	+++	+++	++	+	++	++	++	-	-
<i>Z. bailii</i> CBS-Delft	++	-	-	-	+++	-			
<i>Z. bailii</i> NCYC 1427	++	+	+		+++	-			
<i>Z. cidri</i> NCYC 1567	++	+	+		+++	-			
<i>S. octosporus</i> - Zig 1	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-
<i>S. octosporus</i> - Zig 2	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
<i>S. octosporus</i> - Zig 3	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
<i>T. delbrueckii</i> CBS-Delft	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	++	-
<i>D. hansenii</i> NRRL Y-7393	+	-	-	-	++	+	+++	++	-

- +++ crecimiento muy abundante
- ++ crecimiento normal
- + crecimiento leve
- no crecimiento
- no determinado

Estos resultados ponen de manifiesto que no sólo un bajo valor de a_w es el factor limitante o condicionante del crecimiento de un microorganismo determinado, sino también el tipo de soluto responsable de dicho valor de a_w . Así por ejemplo, *S. octosporus* es capaz de tolerar concentraciones elevadas de glucosa y sacarosa pero incapaz de crecer en medios con alto porcentaje de NaCl; *D. hansenii* por lo contrario, crece mucho mejor en bajos potenciales de agua determinados por elevadas concentraciones de NaCl. Existen levaduras como *T. delbrueckii* que puede tolerar en el medio de crecimiento, amplios rangos de concentraciones tanto de azúcares como de sales.

Al comparar el crecimiento de algunas cepas de *S. octosporus* (osmotolerantes) a 30 y 37 °C, se observó que en medios de elevada presión osmótica aumenta la resistencia a mayores temperaturas (tabla 2). *S. octosporus* no creció a 37°C en YEPD (20 g/l de glucosa), sin embargo tuvo crecimiento positivo a 37 °C con 600 y 700 g/l de glucosa. Este tipo de resistencia cruzada fue también observado por otros autores. Bhajekar & Kulkarni (1991) encontraron que cepas de *D. hansenii*, *Z. mellis* y *K. anitilarrum* muestran un marcado aumento de la resistencia al calor al incrementar la concentración de sacarosa en el medio de crecimiento, o sea, disminuyendo la a_w . Otros autores comprobaron que células de *S. cerevisiae* adaptadas osmóticamente, como consecuencia de un corto período de acondicionamiento en 0,7 M NaCl, tenían una termotolerancia incrementada respecto de células no acondicionadas (Blomberg, 1988). Por otra parte, observaron que células

Tabla 1.2: Efecto del shock osmótico sobre la resistencia al calor en *S. octosporus*.

Condiciones de crecimiento	Cepa		
	<i>S. octosporus</i> - Zig 1	<i>S. octosporus</i> - Zig 2	<i>S. octosporus</i> - Zig 3
YEPD 30 °C	+	+	+
YEPD-600 30 °C	+	+	+
YEPD-700 30 °C	+	+	+
YEPD 37 °C	-	-	-
YEPD- 600 37 °C	+	+	-
YEPD- 700 37 °C	+	+	+

+ crecimiento

- no crecimiento

de levadura poseían mayor termotolerancia después de ser tratadas con etanol, pudiendo ser éste un resultado indirecto de la disminución del potencial de agua del medio, ya que la concentración de etanol que rindió máxima termotolerancia era isotónica a 0,7 M NaCl. La presencia conjunta de osmotolerancia y termotolerancia parecería ser unidireccional, puesto que células de *S. cerevisiae* térmicamente condicionadas no adquirieron osmotolerancia (Blomberg, 1988).

A partir de la caracterización realizada a las levaduras (Tabla 1) se seleccionaron 5 cepas para utilizarlas como parentales en ensayos de fusión de protoplastos. *S. cerevisiae* P-158 (levadura de pan) y *S. cerevisiae* 522 (Montrachet) (levadura de vino) fueron elegidas como modelos de levaduras de características y usos industriales pero poco osmotolerantes. También se seleccionaron tres cepas verdaderamente osmotolerantes, *S. octosporus* - Zig 1

(azúcar tolerante), *D. hansenii* NRRL Y-7393 (halotolerante) y *T. delbrueckii* CBS-Delft (azúcar y halotolerante).

B- Modificación y mejoramiento genético de levaduras.

i) Obtención de protoplastos de *T. delbrueckii*:

Se puso a punto la técnica de formación de protoplastos para *T. delbrueckii*. Se establecieron las condiciones óptimas en cuanto a la concentración de estabilizador osmótico y de enzima lítica de pared celular.

Cuando se digiere total o parcialmente la pared celular de una levadura se obtienen **células osmóticamente frágiles** (protoplastos o esferoplastos, respectivamente) que estallan a menos que el medio extracelular esté osmóticamente estabilizado con respecto al medio intracelular (Brenner *et al.* 1958).

Para determinar la concentración óptima de estabilizador se siguió la formación de **células osmóticamente frágiles (c.o.f.)** en incubaciones con diferentes concentraciones de KCl, tanto en el pretratamiento como en la solución enzimática. De las mezclas de células y enzima con diferentes concentraciones de KCl, se tomaron muestras cada 5 min que fueron luego diluidas por separado en la correspondiente solución de estabilizador y en agua destilada, midiéndose la absorbancia a 800 nm de ambas suspensiones. De la suspensión en KCl, según la isotonicidad de la solución respecto al medio intracelular, se recuperó un porcentaje de las c.o.f. producidas en cada tiempo más aquellas células aún intactas. De lo contrario, en agua destilada todas las c.o.f. estallan y sólo se recuperan las células intactas.

Se calculó para cada tiempo (t_n), el porcentaje de c.o.f. producidas hasta ese momento respecto a la concentración de células intactas al inicio (t_0) y además, el porcentaje de células totales remanentes a dicho tiempo n (ver Materiales y Métodos).

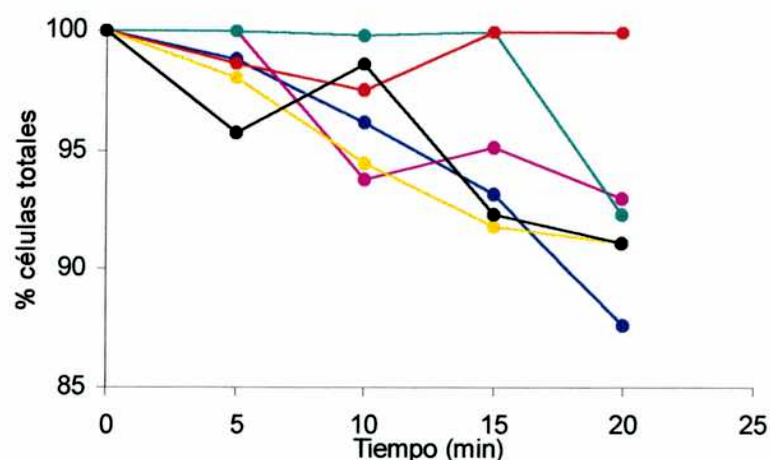


Figura 1.1: Porcentaje de células totales remanentes durante la formación de protoplastos de *T. delbrueckii* en presencia de diferentes concentraciones de KCl, ● 1M; ● 1.2M; ● 1.3M; ● 1.4M; ● 1.5M; ● 1.6M.

En la Figura 1.1 se observa

claramente que la cantidad de células totales remanentes se mantuvo constante a lo largo del tiempo con 1,4 M KCl, mientras que con las otras concentraciones del estabilizador osmótico dicha cantidad disminuyó gradualmente. Al calcular el porcentaje de c.o.f. con respecto a la concentración inicial de células (Figura 1.2) se pudo concluir que, para lograr un medio

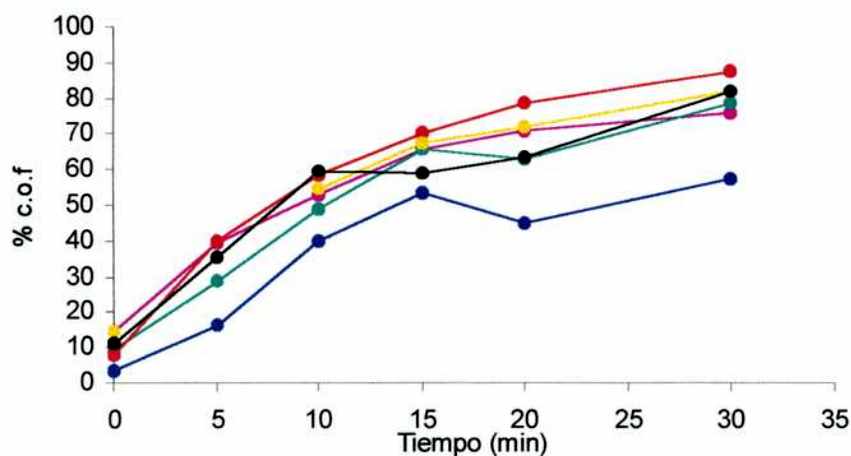


Figura 1.2: Porcentaje de células osmóticamente frágiles (c.o.f.) obtenidas durante la formación de protoplastos de *T. delbrueckii*, en presencia de diferentes concentraciones de KCl, ● 1M; ● 1.2M; ● 1.3M; ● 1.4M; ● 1.5M; ● 1.6M.

isotónico con respecto al medio intracelular de *T. delbrueckii*, la concentración óptima de KCl como estabilizador osmótico es de 1,4 M pues con ella se obtuvo, a los 30 min de digestión enzimática, un 90% de células

osmóticamente frágiles siendo éste el porcentaje más alto respecto al obtenido con las demás concentraciones de estabilizador.

Una vez definida la concentración óptima de estabilizador osmótico, se siguió el mismo esquema de trabajo para ensayar distintas concentraciones de la enzima *Suc d'Helix pomatia* (10, 20 y 30 % v/v). En

la Figura 1.3 se observa que una concentración enzimática de 30 % v/v fue excesiva, ya que el porcentaje de células

totales disminuyó rápidamente, contrariamente a lo que ocurrió con las otras dos concentraciones de enzima, con las que la cantidad de células totales se mantuvo constante en el tiempo. A partir de la Figura 1.4, se

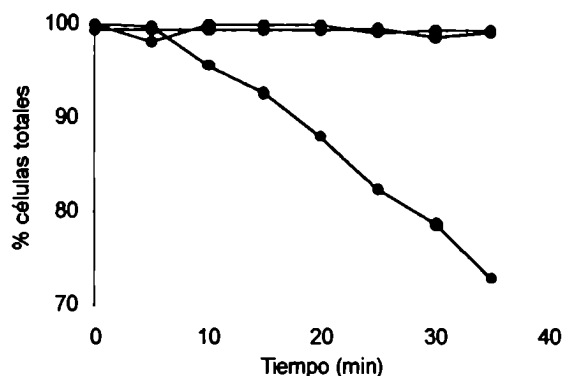


Figura 1.3: Porcentaje de células totales remanentes durante la formación de protoplastos de *T. delbrueckii* en presencia de diferentes concentraciones de enzima, ● 10% v/v; ● 20% v/v; ● 30% v/v.

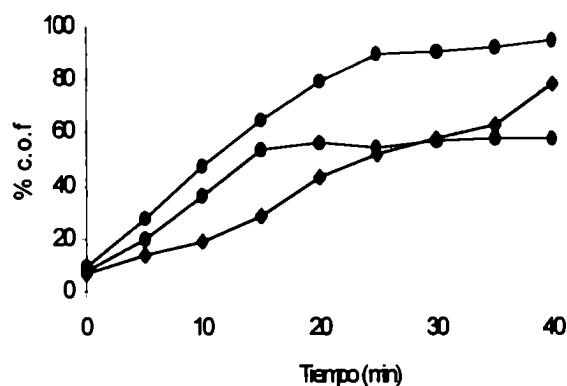


Figura 1.4: Porcentaje de células osmóticamente frágiles (c.o.f.) obtenidas durante la formación de protoplastos de *T. delbrueckii*, en presencia de diferentes concentraciones de enzima, ● 10% v/v; ● 20% v/v; ● 30% v/v.

puede concluir que la concentración óptima de enzima fue 20 % v/v porque con ella se obtuvo la mayor velocidad de formación de protoplastos y el más alto porcentaje final de los mismos (95%).

En conclusión, para la obtención de protoplastos de *T. delbrueckii* se definió las concentraciones óptimas de estabilizador osmótico y de enzima:

1,4 M KCl y 20% v/v de Suc d'*Helix pomatia*, respectivamente.

ii) Fusión de protoplastos:

Se realizaron tres ensayos de fusión de protoplastos entre cepas de distintos géneros (fusiones intergenéricas):

S. cerevisiae P-158 (levadura de pan) x *S. octosporus* - Zig 1 (azúcar tolerante)

S. cerevisiae UCD 522 (levadura de vino) x *D. hansenii* NRRL Y-7393 (halotolerante)

S. cerevisiae P-158 (levadura de pan) x *T. delbrueckii* CBS-813 (azúcar y halotolerante).

I- *S. cerevisiae* P-158 (levadura de pan) y *S. octosporus* - Zig 1 (azúcar tolerante)

S. cerevisiae P-158 es una cepa aislada a partir de una preparación de levadura comercial de panadería. No es tolerante a altas concentraciones de sal y tiene un cierto grado de tolerancia a azúcares. *S. octosporus*, por el contrario, es una levadura que desarrolla muy bien en medios con alto contenido de azúcar (osmotolerante). Esta fusión (Figura 1.5) se realizó con el fin de obtener cepas híbridas que conserven las propiedades de interés industrial de

S. cerevisiae y con una mayor tolerancia a concentraciones elevadas de glucosa en el medio.

La mezcla de fusión obtenida a partir de los protoplastos de ambas cepas se sembró en lacas de Petri con medio YEP-Gal con 1,2 M KCl. Este es un medio selectivo en el que regeneraban la pared celular los protoplastos de *S. cerevisiae* y los productos de fusión pero no desarrollaban los de *S. octosporus* porque esta levadura no es capaz de asimilar galactosa.

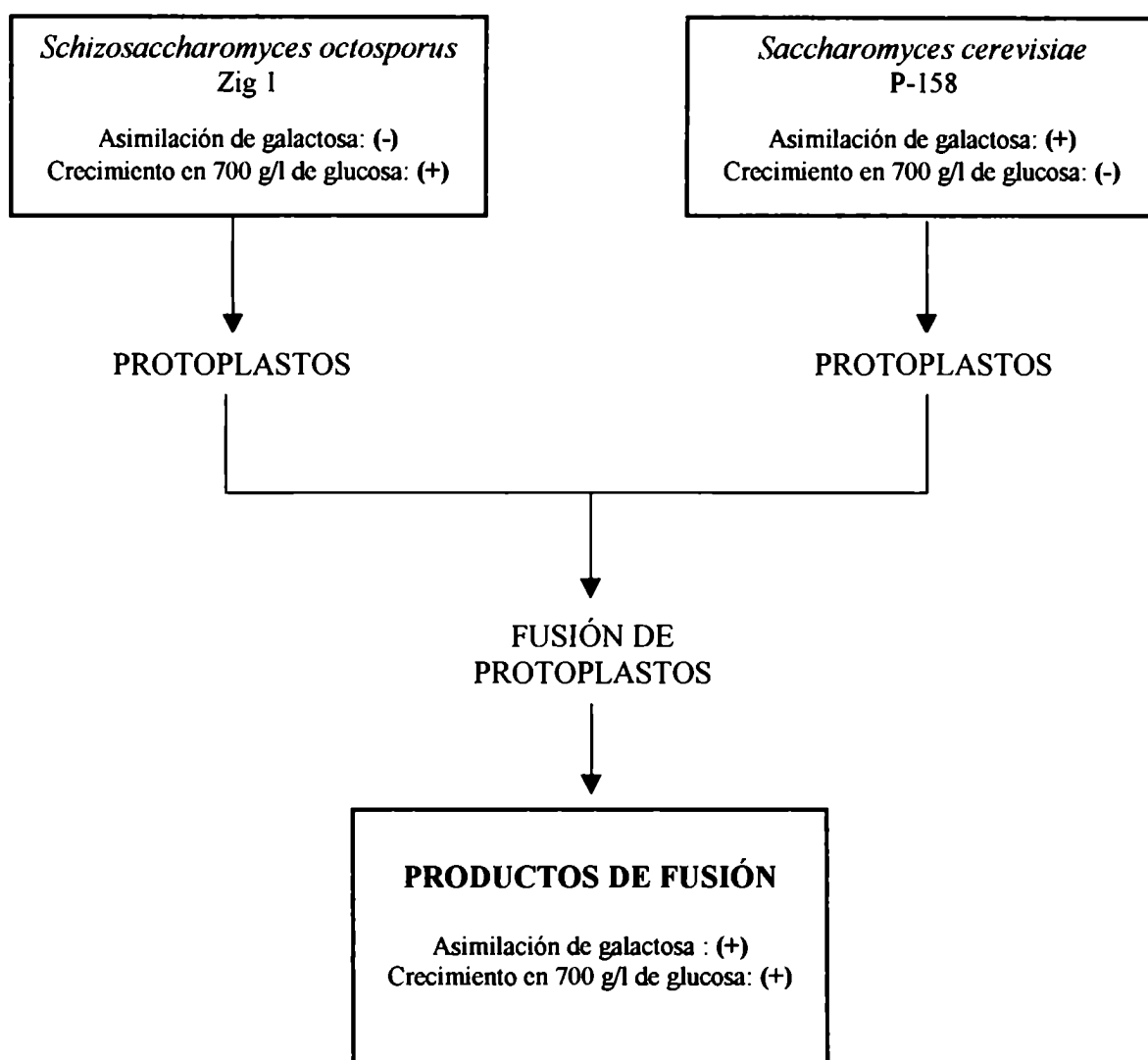


Figura 1.5: Esquema de la fusión entre protoplastos de *S. octosporus* - Zig 1 y *S. cerevisiae* P-158.

Luego de 6 días de incubación a 30 °C, aparecieron colonias que podían corresponder tanto a híbridos como a *S. cerevisiae*. Posteriormente dichas colonias fueron transferidas a medio YEPD-70 (con 700 g/l de glucosa) donde sólo células híbridas, que hubieren heredado del parental *S. octosporus* la característica de osmotolerancia, podían crecer, descartando así la presencia de la otra cepa parental, *S. cerevisiae*. Al cabo de 5 días, aparecieron colonias, todas morfológicamente similares a *S. cerevisiae* (las células de *S. cerevisiae* son ovales y se

dividen por brotación, por el contrario las células de *S. octosporus* son de forma alargada y se dividen por fisión). Nuevamente estas colonias fueron transferidas a los dos medios utilizados para su selección, YEP-Gal e YEPD-700, para corroborar las características que les otorgaban la categoría de híbridos. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, todas las colonias crecieron en el medio con galactosa, pero ninguna lo hizo en el medio con alta concentración de glucosa. Estos resultados se pueden explicar si los productos de fusión obtenidos hayan sido inestables y revirtieron, al menos en cuanto a la característica de osmotolerancia, sobre la cual se ejerció la presión de selección. La reversión tuvo lugar rápidamente aún cuando se mantuvo constante la presión de selección (700 g/l glucosa). Sipiczki (1979) también obtuvo híbridos inestables a partir de una fusión entre *S. octosporus* y *S. pombe*, con una alta frecuencia de reversión hacia *S. octosporus* bajo condiciones no selectivas de crecimiento.

Los intentos realizados por diversos autores en generar híbridos entre especies o géneros distintos han tenido diferentes grados de éxito. Por ejemplo, productos de fusión que fueron estables en el tiempo, como los híbridos prototróficos resultantes de la fusión entre cepas auxotróficas de *S. cerevisiae* y *Saccharomycopsis lipolytica* (van Broock *et al.*, 1980) o los aislados usando un procedimiento de selección basado en la restauración de la mutación *petit*, presente en cepas de *S. cerevisiae* y *S. diastaticus*, luego de fusionarlas con levaduras de los géneros *Pichia*, *Hansenula* y *Schizosaccharomyces* (Spencer & Spencer, 1982). Existen también trabajos en los que el resultado de las fusiones no fue tan exitoso, por ejemplo, la fusión intergenérica entre *Candida tropicalis* y *Saccharomycopsis fibuligera*, donde los híbridos obtenidos fueron inestables en su mayoría y rindieron segregantes como

uno u otro parental (Provost *et al.*, 1978). Este ejemplo es similar al presentado en este trabajo, donde todos los híbridos fueron como la cepa parental *S. cerevisiae* al perder la característica de osmotolerancia heredada en un principio a partir del otro parental, *S. octosporus*.

II- *S. cerevisiae*-522 (levadura de vino) y *D. hansenii* (halotolerante)

S. cerevisiae UCD 522 es una cepa utilizada en la producción de vino y *D. hansenii* NRRL Y-7393 es una levadura capaz de tolerar elevadas concentraciones de sal en el medio de crecimiento (halotolerante), Figura 1.6. La presión de selección en este ensayo fue fuertemente dirigida a la obtención de híbridos. Se utilizaron medios en los que no desarrollaban ninguna de las cepas parentales. *S. cerevisiae* es capaz de tolerar sólo hasta un 1,4 M de NaCl en el medio de crecimiento y tiene muy buen crecimiento a 37 °C; *D. hansenii* es capaz de crecer hasta en 2,6 M de NaCl pero no crece a 37 °C. Teniendo en cuenta estas características el medio de regeneración de los productos de fusión fue YEPD con 2 M NaCl y las placas fueron incubadas a 37°C. En estas condiciones sólo los híbridos resultantes del proceso de fusión podían crecer, puesto que *S. cerevisiae* no crece en medios con alto contenido de sal, y *D. hansenii* no crece a 37°C. A los 7 días se aislaron 25 colonias, que al desarrollar bajo las condiciones de osmolaridad y temperatura impuestas, correspondían en su totalidad a PF con características de ambos parentales. Como control, protoplastos de *S. cerevisiae* y de *D. hansenii* fueron sembrados, por separado, sobre el mismo medio selectivo e incubados a 37 °C. Luego de 8 días el crecimiento fue negativo.

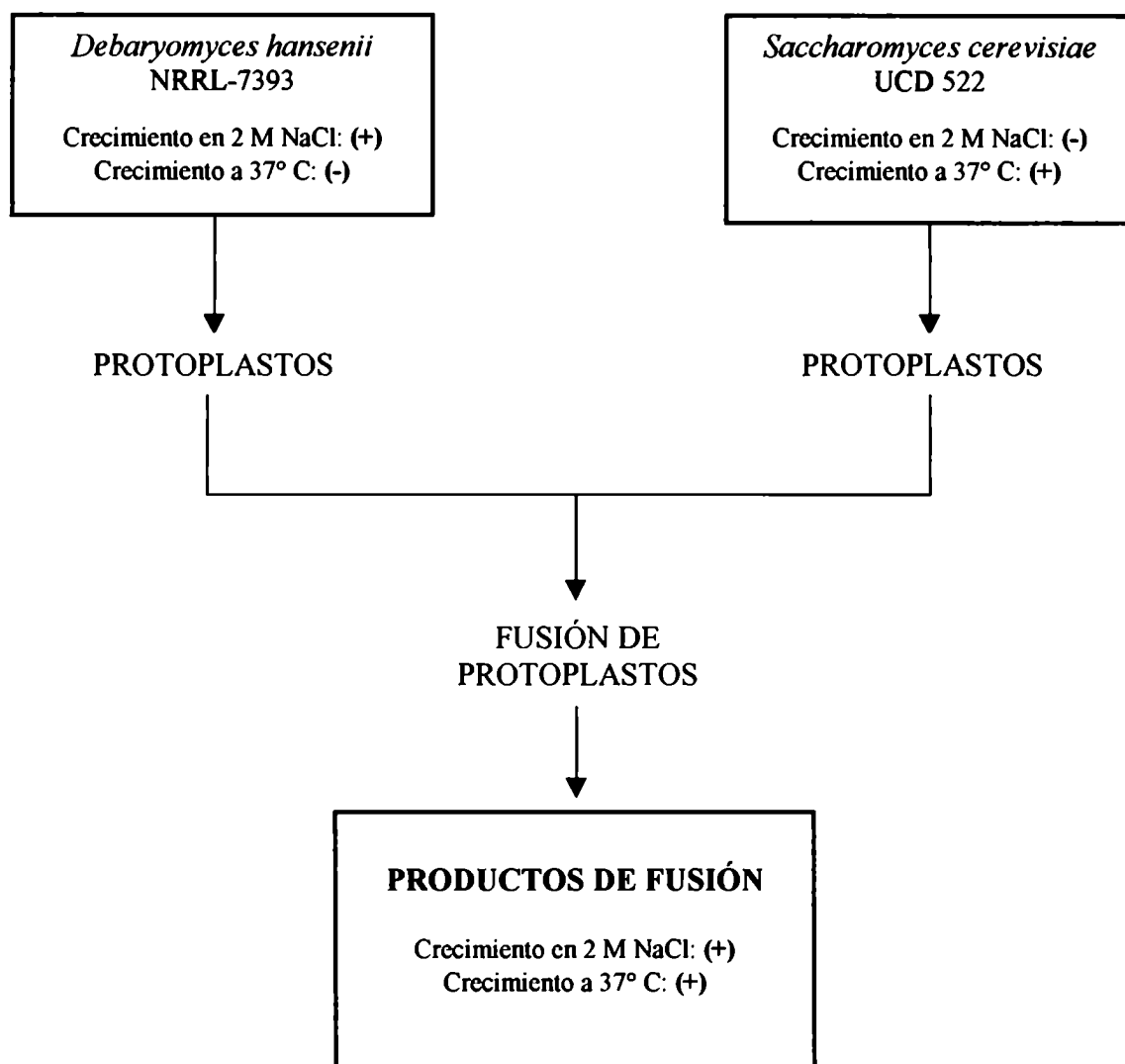


Figura 1.6: Esquema de la fusión entre protoplastos de *D. hansenii* NRRL-7393 y *S. cerevisiae* UCD 522.

De todas las colonias aisladas, se eligieron al azar 2 PF para realizar los ensayos posteriores, que se denominaron HM92 y HM93. Estas cepas híbridas, si bien fueron mantenidas en medio basal YEPD, fueron siempre controladas para verificar su estabilidad

III- *S. cerevisiae* P-158 (levadura de pan) y *T. delbrueckii* (azúcar y halotolerante)

S. cerevisiae es la misma levadura utilizada en la Fusión I. No es tolerante a altas concentraciones de sal y tiene un cierto grado de tolerancia a azúcares. *T. delbrueckii* es tolerante a elevadas concentraciones de sales y azúcares (azúcar y halotolerante). Se empleó en esta oportunidad la técnica de fusión de protoplastos pero utilizando un parental como dador muerto. Los protoplastos de *T. delbrueckii* se mataron por calor (15 minutos a 70 °C). Los protoplastos muertos no son viables, sólo sirvieron para que hubiera intercambio de material genético, durante el proceso de fusión, con el otro parental. Como medio de regeneración y selección se usó YEPD-700 (700 g/l de glucosa), en el cual no crecía ni el parental *S. cerevisiae*, por la alta concentración de azúcar, ni *T. delbrueckii* porque eran protoplastos no viables. En el medio de regeneración sólo podían desarrollar células híbridas. En la Figura 1.7 se muestra el esquema de esta fusión. Esta fusión se realizó con el objeto de obtener PF que mantengan las características importantes de *S. cerevisiae* más un aumento significativo de tolerancia a bajos potenciales de agua.

Se controló que los protoplastos de *T. delbrueckii* eran no viables mediante la siembra en YEPD con 0,6 M KCl de muestras de la suspensión tratada con calor. Después de 6 días a 30 °C no aparecieron colonias. Como segundo control, se regeneraron protoplastos de *S. cerevisiae* en YEPD más 0,6 M KCl. Las células que regeneraron su pared se sembraron en el medio selectivo. Después de 6 días a 30 °C, el crecimiento fue negativo.

Luego de 5 días de incubación a 30 °C, de las placas con el medio de regeneración se aislaron 13 colonias, que fueron transferidas a medio selectivo (con 700 g/l de glucosa) donde también desarrollaron. Estas colonias fueron consideradas híbridos resultantes del proceso de

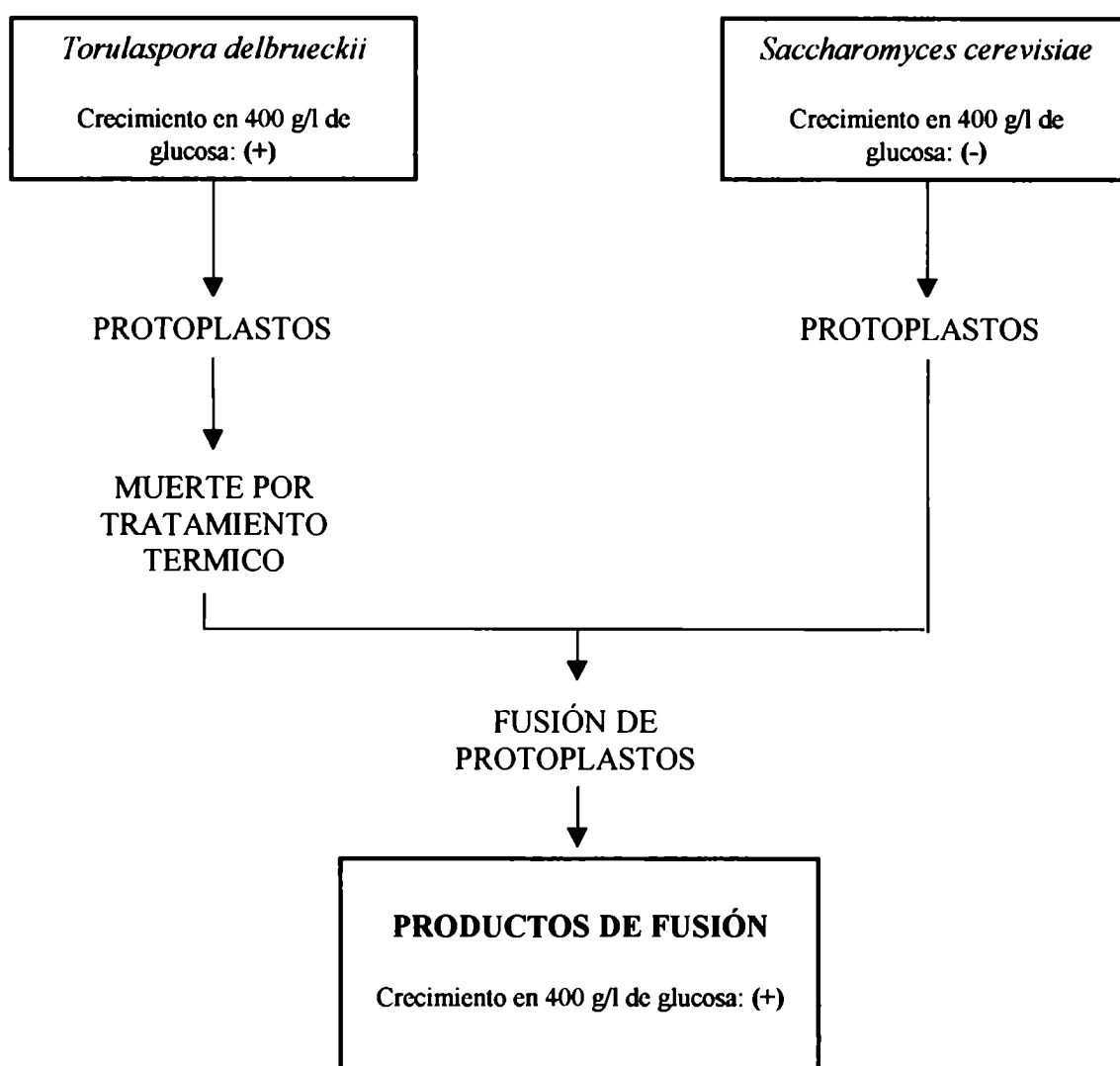


Figura 1.7: Esquema de la fusión entre protoplastos de *T. delbrueckii* CBS-813 y *S. cerevisiae* P-158.

fusión, puesto que *S. cerevisiae* no puede crecer en este medio de elevada presión osmótica y los protoplastos de *T. delbrueckii* eran no viables. Para descartar la posibilidad de que el crecimiento observado correspondiera a células de *S. cerevisiae* que hubieran desarrollado por la existencia de algún factor proveniente de las células muertas, se sembró una suspensión de protoplastos muertos de *T. delbrueckii* en placas con medio de regeneración y luego se sembró

en las mismas placas *S. cerevisiae*. No se observó crecimiento. Así quedó demostrado que se trataba de células híbridas resultantes del proceso de fusión.

Los 13 PF eran morfológicamente similares a *S. cerevisiae* y crecían en medio con 700 g/l de glucosa como el parental *T. delbrueckii*. Se seleccionaron al azar, 3 colonias, a las que se denominó PB1, PB2 y PB3, que fueron usadas en los estudios posteriores.

Los PF fueron estables y se mantuvieron en el medio con alta concentración de azúcar para evitar una posible reversión.

En conclusión, se obtuvieron PF estables de las fusiones: a) *D. hansenii* x *S. cerevisiae*-522 y b) *T. delbrueckii* x *S. cerevisiae* P-158. Se decidió tomar a los híbridos obtenidos en la primera como principal modelo de estudio dado que existía más información sobre la fisiología y ecología de *D. hansenii* que de *T. delbrueckii*. Estos conocimientos facilitaron la planificación de los experimentos posteriores logrando así mejor interpretación y discusión de los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA

Bacon, J.S.D., Jones, D., Ottolenghi, P. (1969). Cell wall residues in yeast protoplast preparations. *Journal of Bacteriology* 99, 3: 885-887.

Bhajakar, D. and P.R. Kulkarni (1991). Effect of osmotic shock on osmotolerant yeasts. *Die Nashrung* 35, 8: 835-839.

Blomberg, A. (1988). Osmoregulation and Osmotolerance in Yeast. Ph. D. Thesis. Department of Marine Microbiology, University of Göteborg, Göteborg, Sweden.

Brenner, S., Dark, F.A., Gerhardt, P., Seynos, M.H., Kandler, O., Kellenberger, K., Klieneberger-Nobel, E., McQuillen, K., Rubio-Huertos, M., Salton, M.R.J., Strange, R.E., Tomcsik, J. and Weibull, C. (1958). Bacterial protoplasts. *Nature* 181, 1713-1715.

Darling, S., Theilade, J. and Birch-Andersen, A. (1969). Kinetic and morphological observations on *Saccharomyces cerevisiae* during spheroplast formation. *Journal of Bacteriology* 98, 2: 797-810.

Evans, I.H. (1990). Yeast strains for baking: Recent developments. *In: Yeast technology*. Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokio Hong Kong, p. 14-54.

Onishi, H. (1990). Yeasts in fermented foods. *In: Yeast technology*. Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (eds.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hong Kong. p. 167-198.

Ouchi, K., Wickner, R.B., Thoe, A. and Akiyama, H. (1979). Breeding of killer yeasts for sake brewing by cytoduction. *Journal of Fermentation Technology* 57, 483-487.

Provost, A., Bourguignon, C., Fournier, P., Ribet, A.M. and Heslot, H. (1978). Intergeneric hybridization in yeasts through protoplasts fusion. *FEMS Microbiology Letters* 3, 309-312.

Sipiczki, M. (1979). Interspecific protoplast fusion in yeasts. *Current Microbiology* 3, 37-40.

Spencer, J.F.T., Land, P. and Spencer, D.M. (1980). The use of mitochondrial mutants in the isolation of hybrids involving industrial yeast strains. II. Use in isolation of hybrids obtained by protoplast fusion. *Molecular and General Genetics* 178, 651-654.

Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (1982). The use of mitochondrial mutants in the isolation of hybrids involving industrial yeast strains. III. Restoration of mitochondrial function in petites of industrial yeast strains by fusion with respiratory competent protoplasts of other yeast species. *Current Genetics* 4, 177-180.

Spencer, J.F.T., Bizeau, C., Reynolds, N. and Spencer, D.M. (1985). The use of mitochondrial mutants in hybridization of industrial yeast strains. VI. Characterization of the hybrid *Saccharomyces diastaticus* X *Saccharomyces rouxii*, obtained by protoplast fusion, and its behaviour in simulated dough-raising tests. *Current Genetics* 9, 649-652.

Spencer, J.F.T., Spencer, D.M. and Reynolds, N. (1988). Genetic manipulation of non-conventional yeasts by conventional and not conventional methods. *Journal of Basic Microbiology* 28, 321-333.

Svoboda, A. and Piedra, D. (1983). Reversion of yeast protoplasts in media containing polyethylen glycol. *Journal of General Microbiology* 129, 3371-3377.

van Broock, M.R. de, Sierra, M.F. and Figueroa, L.I. de (1981). Intergeneric fusion of yeast protoplasts. In: Current Developments in Yeast Research. Stewart, G.G. Russell, I. (eds). Toronto, p.171-176.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS PARENTALES DE FUSIÓN Y DE LOS HÍBRIDOS

El grado de tolerancia osmótica de un microorganismo depende del rango de valores de actividad de agua (a_w) en el que es capaz de desarrollar. La a_w de un substrato expresa la cantidad de agua disponible en él y conforme este valor disminuye, la velocidad de crecimiento de un microorganismo en ese medio también decrece (Jermini & Schmidt-Lorenz, 1987). El agregado de azúcares o sales a un medio de crecimiento produce una disminución del valor de a_w del mismo (Jermini & Schmidt-Lorenz, 1987; Singh & Norton, 1991).

La respuesta general de los microorganismos ante un descenso de la a_w del medio es la acumulación intracelular rápida de compuestos orgánicos (Yancey *et al.*, 1982). Estos compuestos actúan como osmolitos compensadores disminuyendo la a_w interna y restableciendo así el balance osmótico entre el medio intra y extracelular.

Se demostró que los polihidroxiálcoholes (polioles) son compuestos utilizados por hongos y levaduras como osmolitos compensadores (Brown, 1978; André *et al.*, 1991); también se denominan solutos compatibles (Brown & Simpson, 1972).

T. delbrueckii es una levadura que posee células pequeñas, redondeadas y que pueden tolerar elevadas concentraciones de sales y de azúcares en los medios de crecimiento (Spencer & Spencer, 1997). Sin embargo, se conoce muy poco sobre su fisiología y su mecanismo osmorregulatorio. *D. hansenii* es considerada una levadura halotolerante por su capacidad de

crecer en medios con altas concentraciones de sal. En ambientes con elevada concentración salina, esta levadura compensa osmóticamente su medio intracelular por la acumulación de dos polioles, glicerol y arabitol (Adler *et al.*, 1985). *S. cerevisiae*, que posee un grado de osmotolerancia mucho menor que las otras dos levaduras mencionadas, responde al estrés osmótico impuesto por el medio de crecimiento aumentando la producción y acumulación de glicerol (André *et al.*, 1991).

En el capítulo I se desarrollaron las fusiones realizadas entre las levaduras osmotolerantes, *D. hansenii* y *T. delbrueckii*, con dos cepas diferentes de *S. cerevisiae*. Se obtuvieron híbridos estables que tenían el carácter osmotolerante de las primeras más otras características del parental *S. cerevisiae*. Se estableció el siguiente objetivo de trabajo:

OBJETIVO

Estudiar y caracterizar los PF de las dos fusiones mencionadas y los respectivos parentales, fundamentalmente en relación a su capacidad osmotolerante y otros aspectos fisiológicos.

MATERIALES Y METODOS

Cepas:

S. cerevisiae P-158 (levadura de pan)

S. cerevisiae UCD-522 (Montrachet) (levadura de vino)

D. hansenii NRRL Y-7393

T. delbrueckii CBS-813

Híbridos HM92, HM93, PB1, PB2 y PB3

Medios de cultivo:

YEPD en g/l: extracto de levadura 10, peptona 20, glucosa 20

YE en g/l: extracto de levadura 5

YEP en g/l: extracto de levadura 10, peptona 20

YEPD + x M NaCl (x = 2, 2,5 y 3)

YEPglucosa-x: YEP + x g/l glucosa (x = 300, 400, 500, 600 ó 700)

YEPsacarosa-x: YEP + x g/l sacarosa (x = 300, 400, 500, 600 ó 700)

YNB (Yeast nitrogen base; sin fuente de carbono y con aminoácidos, DIFCO) 6,7 g/l + 10 g/l fuente de carbono.

El pH se ajustó en 4,5-5,0. Cuando los medios se utilizaron sólidos se agregó 20 g/l agar.

Caracterización Morfológica

Las células fueron crecidas en medio líquido YEPD, 30 °C, 200 rpm. A partir de los cultivos en mitad de la fase exponencial se efectuaron diluciones apropiadas para observar al microscopio óptico. Se midió con micrómetro el eje superior e inferior de 150 células distribuidas en 10 campos ópticos. Se calculó el largo promedio de cada eje celular y el desvío estándar correspondiente.

Crecimiento a Diferentes Presiones Osmóticas

Las cepas fueron crecidas en medio líquido YEPD, 30 °C, 200 rpm. A partir de los cultivos en fase esponencial se hicieron (por duplicado) estrías en medios agarizados con diferentes concentraciones de NaCl , glucosa y sacarosa (YPD + x M NaCl; YEP + x g/l glucosa o sacarosa). Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 8 días. Se observó crecimiento e intensidad del mismo.

Pruebas Bioquímicas

Las cepas fueron crecidas en medio líquido YEPD, 30 °C, 200 rpm. Las células se cosecharon en la mitad de la fase exponencial de crecimiento, se lavaron y resuspendieron en agua destilada estéril. Estas suspensiones celulares acuosas fueron aireadas con agitación magnética durante dos horas.

- **Asimilación:** Se prepararon Placas de Petri con medio agarizado YNB + 20 g/l de la fuente de carbono correspondiente. Se sembraron con 1-2 µl de las suspensiones celulares obtenidas luego de dos horas de aireación y se incubaron a 30 °C. Se observó el crecimiento diariamente durante 8 días. Los experimentos se hicieron por duplicado.

- **Fermentación:** Tubos de vidrio de 20 ml fueron llenados con 6 ml de medio YE + 10 g/l del azúcar correspondiente e inoculados por duplicado con 50 µl de cada suspensión celular. Los tubos se sellaron con tapón de 50% vaselina-50% parafina, para mantener el cultivo en condiciones de anaerobiosis, y se incubaron a 30 °C con agitación. Se observaron diariamente durante 8 días. Si la levadura era capaz de fermentar el azúcar presente en el

medio, el CO₂ liberado desplazaba hacia arriba el tapón de vaselina-parafina dando en dicho caso una lectura positiva. De lo contrario, se consideraba negativa.

Tanto en los ensayos de asimilación como de fermentación, los medios base y las soluciones patrones de azúcares, fueron preparados en concentración 2X, esterilizados por separado y luego combinados en los volúmenes adecuados para rendir las concentraciones finales indicadas en cada caso.

Separación de cromosomas

- Preparación de DNA cromosomal intacto: Se prepararon protoplastos (Materiales y Métodos, Capítulo I) y se mezclaron (1:1) con agarosa LMPT (bajo punto de fusión) al 1% en KCl 0,6 M para *S cerevisiae* y en KCl 1,2 M para las levaduras halotolerantes. Se dejó solidificar la mezcla en moldes, para luego cortar los bloques en rodajas finas. Se incubaron las rodajas con proteinasa K (2 mg/ml) en amortiguador NDS (EDTA 0,5 M; Tris-HCl 0,1 M; lauril sarcosinato de sodio 1%; pH 9,5) a 50 °C durante 20 a 24 h y luego se conservaron a 4 °C en amortiguador NDS hasta realizar las electroforesis.

- Preparación del gel: Los bloques se sembraron en geles de agarosa tipo I (baja electroendoosmosis) 1% en amortiguador TBE 0,5x (TBE 10x: EDTA 0,02 M, tris-borato 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, pH 8,0). Los pocillos se cargaron con los bloques previamente fundidos a 65 °C.

- Sistema de electroforesis:

Electroforesis con inversión de campo (FIGE): El sistema FIGE consta de una cuba electroforética convencional y una fuente de poder programable. Esta fuente de poder

alterna el campo eléctrico según los requerimientos deseados. Como se trabaja con sólo dos electrodos la variación del campo es de 180° con respecto a la dirección de la corrida. El equipo utilizado (Gene-Tic, BIOCENT) posee un microprocesador con el cual se programaron las distintas condiciones de corrida.

Electroforesis de campo pulsado, CHEF: Se empleó un equipo CHEF-DR II (Bio-Rad), que es un sistema basado en la técnica de CHEF (clamped homogeneous electric fields). Este equipo consta de 6 electrodos dispuestos en forma hexagonal lo que permite variar alternativamente el campo eléctrico en un ángulo máximo de 120°.

- **Condiciones de corrida:** Fueron establecidas por modificación de las diferentes variables en juego como, tiempo de pulsado (el tiempo de pulsado se puede variar durante toda la corrida, ya sea lineal o exponencialmente), voltaje aplicado y tiempo total de corrida.
- **Tinción del ADN:** Luego de la corrida electroforética, el ADN fue teñido, sumergiendo el gel en una solución 5 mg ml⁻¹ de bromuro de etidio.

Cinética de crecimiento

Ensayo en medio con alto contenido de sal: Se realizó en Erlenmeyers de 125 ml con 10 ml de medio: a) YEPD y b) YEPD + 2 M NaCl. Se inocularon con 5 x 10⁶ cel/ml, se incubaron a 30°C, 200 rpm y se tomaron muestras periódicamente.

Ensayo en medio con alto contenido de azúcar: Se realizó en Erlenmeyers de 250 ml con 25 ml de medio YEPglucosa-400. Se inocularon con 5 x 10⁶ células/ml, se incubaron a 30 °C, 400 rpm y se tomaron muestras periódicamente.

- **Extracción de polihidroxi alcoholes:** A determinados tiempos, se tomaron dos muestras de 1,5 ml de cultivo, una de las cuales fue rápidamente centrifugada (1 min a 9.800 g). El sobrenadante, que contenía los polioles extracelulares, fue transferido a un tubo de vidrio con tapa e incubado en un baño de agua en ebullición durante 10 min, junto a la muestra paralela de cultivo no centrifugada. La muestra con células, que tenía los polioles extracelulares más los intracelulares (polioles totales), fue luego centrifugada. Ambas fueron mantenidas a -20 °C hasta ser analizadas (Adler *et al.*, 1985).

- **Determinaciones analíticas**

Biomasa: Se determinó por centrifugación de 5 ml de cultivo. Las células se lavaron 2 veces con agua destilada y se secaron 12 h a 120 °C. Se pesó en balanza analítica.

Glucosa, etanol y polihidroxi alcoholes: Se determinaron sus concentraciones por HPLC. Se utilizó un equipo Gilson, con una bomba 305, una columna (300 x 7,8 mm) Rexex Organic ROA (Phenomenex), un refractómetro diferencial 2142 LKB y un integrador chromatopac CR 301 (Shimadzu). Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: temperatura, 55 °C; eluente, 0,02 N ácido sulfúrico; velocidad de flujo, 0,6 ml/min; volumen de muestra, 20 µl. La concentración de cada sustancia se determinó según curvas de calibración realizadas con soluciones patrones.

Las concentraciones intra y extracelulares de los polihidroxi alcoholes fueron expresadas en relación a la biomasa como µmol poliol/mg p.s.

Cálculos:

Velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}): Se calculó aplicando la ecuación de la recta en la porción lineal de la curva de crecimiento. μ_{max} es la pendiente de la recta.

$$y = a x + b$$

donde y es el Ln de la biomasa (ordenadas); a es la pendiente ($\mu_{\max}$), x es el tiempo (abscisas); b es la ordenada al origen.

Rendimiento de biomasa (Y_{xs}) y de etanol (Y_{ps}): Se calculó como la concentración máxima obtenida de biomasa y etanol en relación a la concentración inicial de glucosa (g glucosa y etanol/g de glucosa inicial).

Los resultados que se presentan son valores promedio de ensayos independientes realizados por duplicado o por triplicado. Los errores estándares fueron inferiores al 5% en las determinaciones de biomasa e inferiores al 10% en las demás determinaciones. Para determinaciones analíticas a partir de fluidos biológicos se considera aceptable una desviación estándar del 10% (Quattocchi *et al.*, 1992).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A- Caracterización de los híbridos obtenidos luego de la fusión de protoplastos entre *D. hansenii* NRRL Y-7393 y *S. cerevisiae* UCD 522

Las cepas parentales *D. hansenii* y *S. cerevisiae*, así como los PF HM92 y HM93 fueron sometidas a los siguientes estudios:

- I. Caracterización morfológica.
- II. Crecimiento en medios con alta presión osmótica (diferentes concentraciones de NaCl y de azúcar).

- III. Pruebas bioquímicas de asimilación y fermentación de azúcares.
- IV. Separación electroforética de los cromosomas mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado en geles de agarosa (PFGE).
- V. Cinética de crecimiento: medición de la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$), rendimiento en biomasa, producción de etanol y polihidroxialcoholes.

I. Caracterización morfológica

Las cuatro cepas crecidas en medio YEPD agarizado formaron colonias de aspecto cremoso y color blanquesino, a simple vista silmiliares entre sí. Crecidas en YEPD líquido, *D. hansenii* floculó pero no así los PF, HM92 y HM93 ni *S. cerevisiae*-522. No se observaron flóculos en cultivos de *D. hansenii* realizados en YEPD + 2 M NaCl.

En cuanto a la forma y tamaño celular (Foto 2.1), se observó que las células de *S. cerevisiae* eran preferentemente ovales, de tamaño promedio de $6,97 (\pm 0,32) \times 6,05 (\pm 0,38) \mu\text{m}$ y las de *D. hansenii* de forma esférica y más pequeñas, midían en promedio $4,25 (\pm 0,45) \times 4 (\pm 0,49) \mu\text{m}$. Los PF eran muy similares entre sí en forma y tamaño y diferentes respecto a las dos cepas parentales. La forma de las células era de tipo ovoide aunque más irregular que en *S. cerevisiae* y de un tamaño promedio de $4,85 (\pm 0,53) \times 3,75 (\pm 0,49) \mu\text{m}$ para HM92 y de $4,96 (\pm 0,43) \times 3,70 (\pm 0,50) \mu\text{m}$ para HM93.

Las cuatro cepas se reproducen vegetativamente por medio de brotación multilateral. Las células se encontraban en forma individual, de a pares o formando cadenas cortas.

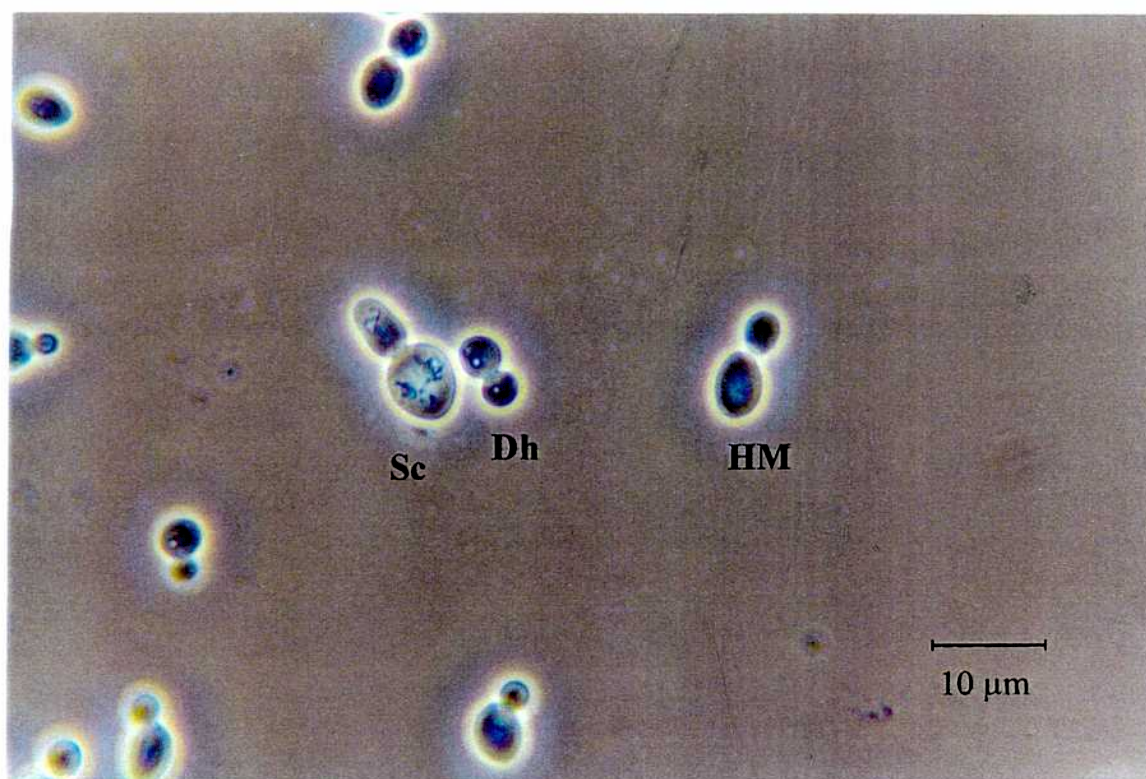


Foto 2.1: Células de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Debaryomyces hansenii* (Dh) e híbrido HM92 (HM) cosechadas a partir de cultivos en fase exponencial realizada en medio YEPD (aumento 1000 X).

II. Crecimiento en diferentes condiciones de presión osmótica

Se realizaron ensayos para probar las cepas respecto a su habilidad de tolerar distintos niveles de presión osmótica durante su crecimiento en medios agarizados. La osmolaridad del medio de cultivo se varió empleando diferentes concentraciones de sal (NaCl) y de azúcar (glucosa o sacarosa). Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 2.1:

Tabla 2.1: Crecimiento en diferentes condiciones de presión osmótica. Las cepas fueron crecidas en medio YEPD con 2; 2,5 y 3 M NaCl y en medio YEPD con 300, 500, 600 y 700 g/l de glucosa o sacarosa.

Cepas	M NaCl			g/l Glucosa				g/l Sacarosa			
	2	2,5	3	300	500	600	700	300	500	600	700
<i>D. hansenii</i>	+++	++	-	+	- (++)	- (+)	- (-)	+++	++	+	+/-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	++	+++	++	+/-	+++	+++	+++	++
HM92	+++	++	-	++	+(++)	- (+)					
HM93	+++	++	-	+	- (++)	- (+)					

+ crecimiento (+++ muy abundante; +/- escaso)

- no crecimiento

() resultado obtenido con un inóculo obtenido de un cultivo en 2 M NaCl (células ya adaptadas a condiciones de elevada presión osmótica)

■ no determinado

Se puede observar que la tolerancia a elevadas presiones osmóticas depende, entre otros factores, del tipo de soluto involucrado. Tanto *D. hansenii* como los dos PF crecieron bien en elevadas concentraciones de NaCl pero sólo crecieron hasta 300 g/l de glucosa. *S. cerevisiae* no desarrolló en las concentraciones de sal indicadas, pero creció bien hasta 600 g/l de glucosa. Cuando se uso sacarosa, la tolerancia a altas concentraciones aumentó tanto para *D. hansenii* como para *S. cerevisiae* respecto a lo observado para glucosa. Cuando se trabajó con inóculos provenientes de cultivos realizados con 2 M de NaCl, es decir, con células ya adaptadas a elevadas tensiones osmóticas, la tolerancia a altas concentraciones de glucosa aumentó para *D. hansenii* y para ambos PF. Brown (1978) observó que una cepa de *S. cerevisiae* mejoraba su tolerancia a concentraciones elevadas de glucosa cuando el inóculo provenía de un medio salino (1,7 M NaCl) respecto a cuando provenía de uno basal. También observó que *S. cerevisiae* podía aumentar su tolerancia a elevadas concentraciones de sal si

era “adaptada” mediante transferencias en serie a medios con valores decrecientes de actividad de agua (a_w). Sin embargo esta adaptación no logró extender la tolerancia de *S. cerevisiae* a más de 2 M de NaCl.

III. Pruebas bioquímicas

Se estudió la capacidad que tenían las levaduras de asimilar y fermentar distintos azúcares. Los resultados de los ensayos se muestran en las Tablas 2.2 y 2.3:

Tabla 2.2: Asimilación de fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Cepas			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. hansenii</i>	HM92	HM93
D-glucosa	+	+	+	+
D-Galactosa	+	+	+	+
D-Ribosa	-	+	+	+
L-D-Xilosa	-	+	+	+
Arabinosa	-	+	+	+
L-Rhamnosa	-	+	-	-
Sacarosa	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+
α - α -Trehalosa D+	+	+	+	+
Cellobiosa D+	-	+	-	-
Melibiosa	-	-	-	+sw
Lactosa	+s	+	-	+s
Raffinosa	+	+	-	+sw
Almidón	-	-	-	-
Glicerol	-	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+
Eritritol	-	+	-	+sw
D-Glucitol/Sorbitol	-	+	+	+
D-Manitol	-	+	+	+
DL-Lactato	-	-	-	-
Succinato	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+

+ reacción positiva

+s reacción positiva lenta (más de 5 días para dar reacción positiva)

+w reacción positiva débil

+sw reacción débil y lenta

- reacción negativa

Tabla 2.3: Fermentación de hidratos de carbono.

Fuente de carbono	Cepas			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. hansenii</i>	HM92	HM93
D-glucosa	+	-	+	+
D-galactosa	+	-	+s	+s
Maltosa	+	-	-	+s
Sacarosa	+	-	+s	+s
Melibiosa	-	-	-	+s
Lactosa	-	+s	-	-
Cellobiosa	+s	+s	-	-
Melezitosa	-	+s	+s	+s
Rafinosa	+	-	-	-

+ reacción positiva

+s reacción positiva lenta (más de 5 días para dar reacción positiva)

+w reacción positiva débil

+sw reacción débil y lenta

- reacción negativa

Los PF mostraron semejanzas y diferencias respecto de los parentales y también se observaron algunas respuestas intermedias, HM93 asimila eritritol. Esto pone en evidencia la característica híbrida de estos PF. Además puede observarse que los PF adquirieron nuevas características luego del proceso de fusión, como no asimilar rafinosa (HM92) o hacerlo débilmente (HM93) mientras los parentales asimilan el azúcar. La capacidad de fermentar melibiosa de HM93 es otra característica nueva si se tiene en cuenta que *D. hansenii* ni *S. cerevisiae* lo hacen, o la incapacidad de los PF de fermentar celobiosa aunque ambos parentales la fermentan. Los resultados obtenidos demuestran que la técnica de fusión de protoplastos es una herramienta efectiva en la modificación de levaduras y en la obtención de nuevas cepas.

IV. Electroforesis de campo pulsado (PFGE)

En la electroforesis convencional, moléculas superiores a 20 kb migran en forma independiente a su tamaño (McDonell, *et al.*, 1977).

En la electroforesis de campo pulsado el campo eléctrico aplicado varía alternativamente en dos direcciones, esto hace que las moléculas deban reorientarse en respuesta al cambio y el tiempo que tardan en lograrlo depende de su tamaño (Bustamante *et al.*, 1993). De este modo se logran separar largos segmentos de ADN, a tal grado que puede trabajarse con cromosomas enteros desde 30 hasta 2000 kb (Carle & Olson, 1985).

El uso de diversos sistemas de PFGE ha permitido armar cariotipos de diversas cepas de levaduras (McDonell, *et al.*, 1977; Johnston *et al.*, 1988) así como también aislarse cromosomas para ser utilizados en experimentos de transformación celular (Goto *et al.*, 1990).

Como los híbridos tenían características de ambos parentales se estudió si esto también ocurría a nivel de los complementos cromosómicos.

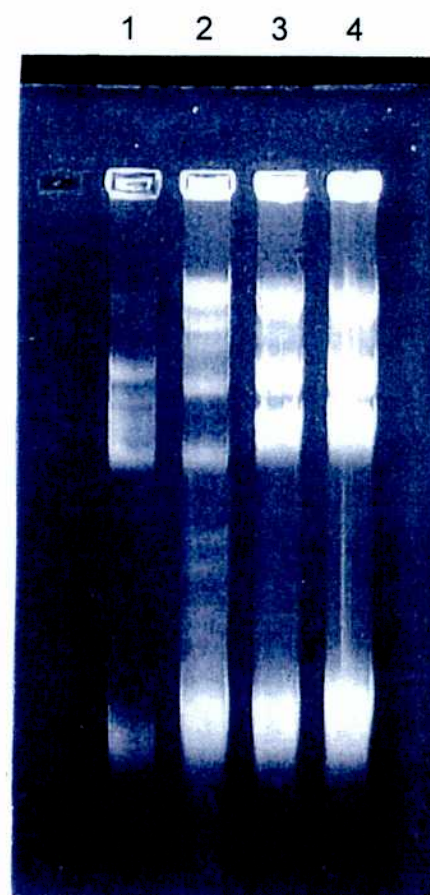
No existen antecedentes sobre separación de cromosomas en *D. hansenii*. En *S. cerevisiae* diferentes autores obtuvieron, con distintos sistemas de PFGE, patrones electroforéticos de 16 bandas que corresponden a los 16 cromosomas del juego haploide de la especie. A *S. cerevisiae* se la utilizó como patrón de referencia.

Se realizaron varias corridas electroforéticas hasta obtener en un mismo gel los cariotipos de cada una de las cepas. La mejor resolución de bandas se obtuvo con las siguientes condiciones:

Diferencia de potencial: 11 volts/cm de gel
 Tiempo de corrida: 20 horas
 Número de ciclos: 1
 Duración del pulso al comienzo: 1 seg
 Duración del pulso al final: 60 seg
 Incremento del pulso: exponencial
 % del tiempo del ciclo en alcanzar el 50% del pulso: 40
 Relación pulso hacia adelante/pulso inverso: 3:1
 Pausa como % del pulso hacia adelante: 2
 Concentración de agarosa: 1 %
 Temperatura: 10 °C

En las condiciones de corrida utilizadas se resolvieron en *S. cerevisiae* 12 bandas y en *D. hansenii* y los dos híbridos se observaron 6 a 7 bandas aunque algunas de ellas, por su ancho e intensidad, parecieron ser dos no resueltas (Foto 2.2). Fue interesante observar que los PF tenían bandas que se correspondían con algunas de *S. cerevisiae* y otras con bandas de *D. hansenii*. Esto demostraría, que en el complemento cromosómico de los híbridos estarían representados, al menos parcialmente, los dos conjuntos cromosómicos originales.

Foto 2.2: Separación de moléculas de ADN cromosomal mediante el sistema FIGE.
 Línea 1: *D. hansenii* NRRL Y-7393.
 línea 2: *S. cerevisiae* UCD-522.
 líneas 3 y 4: productos de fusión HM92 y HM93 respectivamente.



V. Cinética de crecimiento

Se estudió la capacidad de los PF y las cepas parentales de crecer en medios con alta concentración de sal. Se utilizó como medio YEPD con 2 M NaCl y medio basal YEPD para comparar el comportamiento de las levaduras con y sin estrés osmótico. Se determinó biomasa, glucosa residual, producción de etanol y polihidroxi-alcoholes.

La cepa parental *S. cerevisiae*, que no crece en medios con altos contenidos de sal, no sólo no creció en el medio con 2 M de NaCl sino que se observó lisis celular a las 16 horas de incubación.

En el medio con sal, se observó que la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) de los híbridos HM92 y HM93 (Figura 2.1 b y c) fue mayor que la $\mu_{\max}$ de la cepa parental osmotolerante *D. hansenii* (Figura 2.1a). Los valores correspondientes de $\mu_{\max}$ se muestran en la Tabla 2.4. Es importante destacar que en estas condiciones, *D. hansenii* alcanzó la mayor densidad celular a las 65 horas de crecimiento, tiempo en el que la glucosa fue consumida totalmente. Los híbridos, por el contrario, a las 35 horas alcanzaron la más alta densidad celular y consumieron toda la glucosa. La cepa parental osmotolerante no produjo etanol, mientras los híbridos HM92 y HM93 produjeron etanol (máximos de 2,5 y 3,75 g/l respectivamente) entre las 10 y 30 horas. Se puede asumir que la capacidad de los PF de producir etanol podría estar determinada por la información genética del otro parental *S. cerevisiae*.

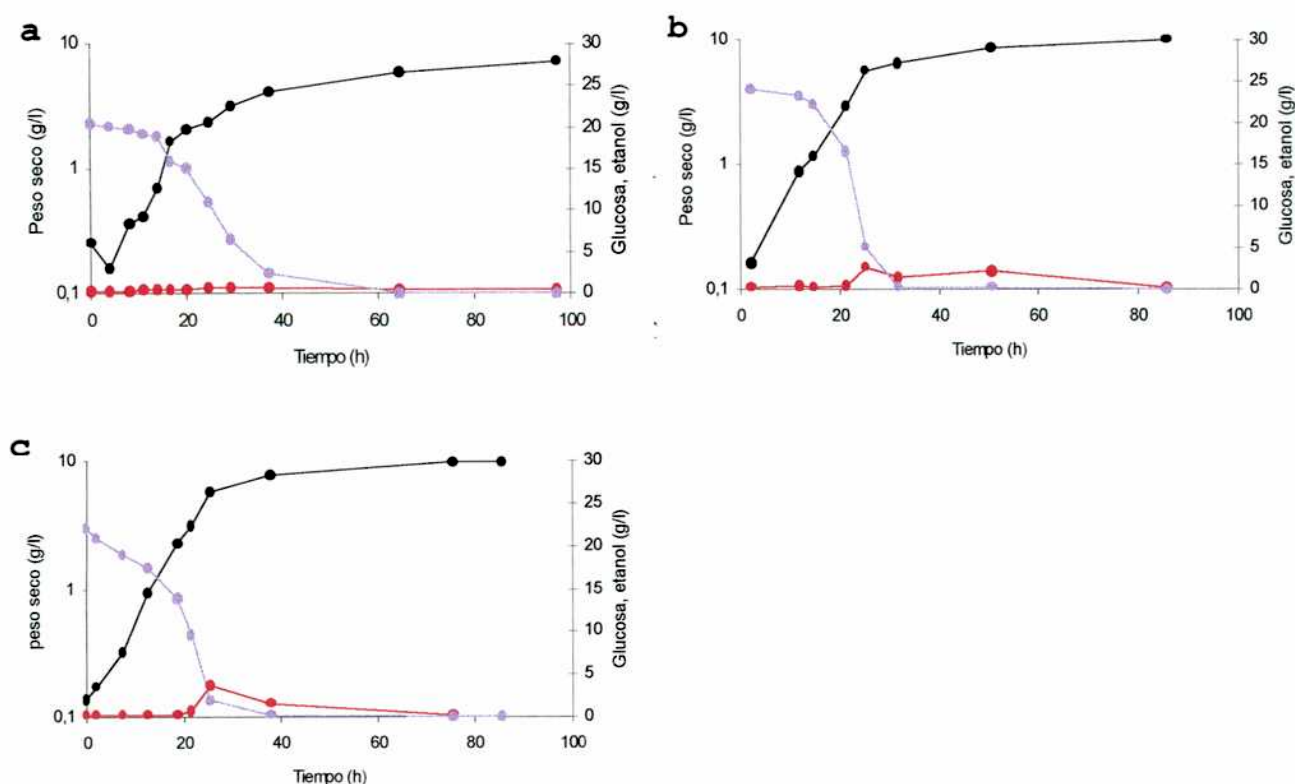


Figura 2.1: Crecimiento de las cepas en medio YEPD con 2 M NaCl. a) *D. hansenii*; b) HM92; c) HM93. ● Peso seco; ● glucosa residual; ● etanol.

Tabla 2.4: Velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$ h⁻¹) calculada a partir del crecimiento de las cepas en medio sin sal y en medio con 2M NaCl. Los valores son el promedio de determinaciones realizadas a partir de ensayos independientes. En cada caso se indica el desvío estándar correspondiente y, entre paréntesis, el número de ensayos realizados.

Medio de Crecimiento	<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. hansenii</i>	Híbrido HM92	Híbrido HM93
	$\mu_{\max}$	$\mu_{\max}$	$\mu_{\max}$	$\mu_{\max}$
YEPD	0,480 ± 0,011 (3)	0,296 ± 0,01 (3)	0,480 ± 0,009 (2)	0,492 ± 0,015 (3)
YEPD + 2,0 M NaCl	NC	0,090 ± 0,005 (3)	0,171 ± 0,009 (2)	0,171 ± 0,008 (3)

NC: No crece en estas condiciones.

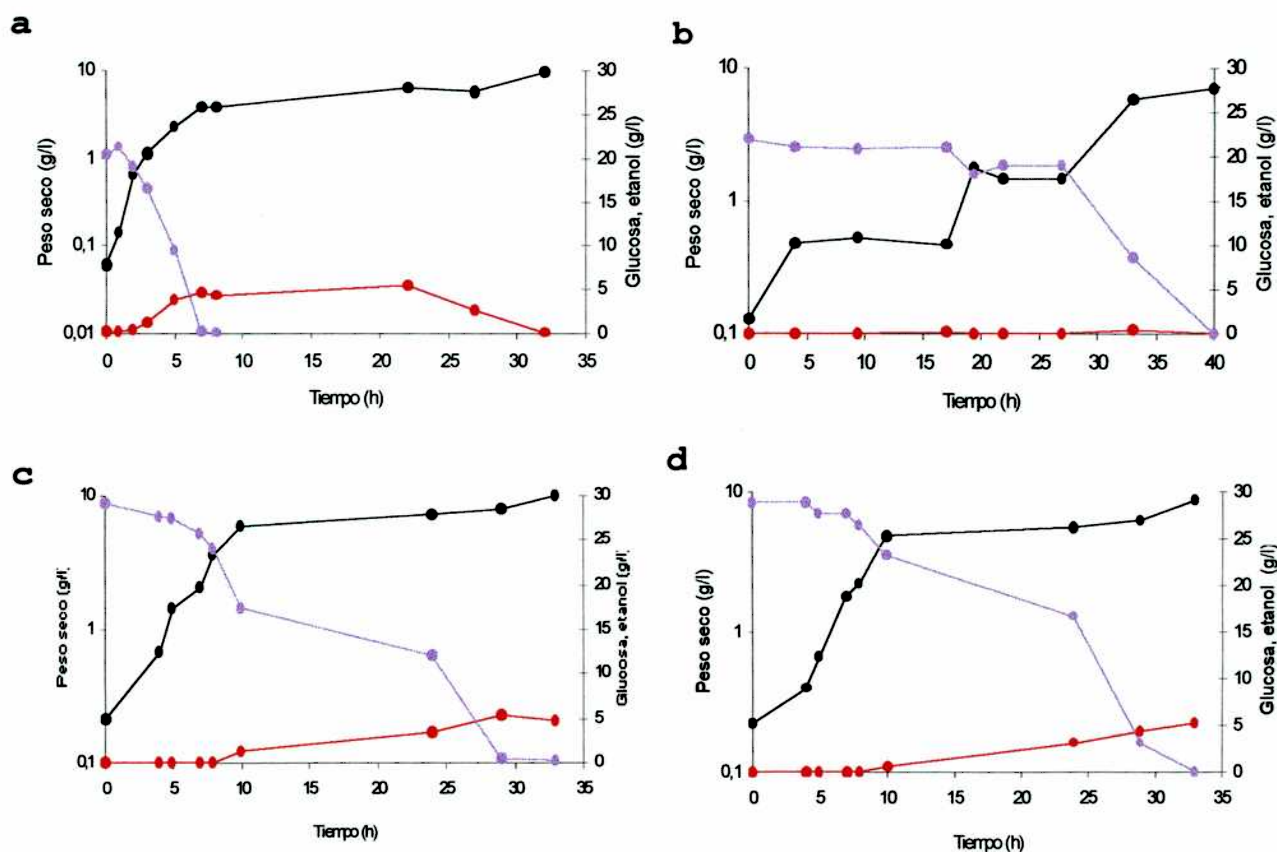


Figura 2.2: Crecimiento de las cepas en medio basal YEPD. a) *S. cerevisiae*; b) *D. hansenii*; c) HM92; d) HM93. ● Peso seco; ● glucosa residual; ● etanol.

consumió toda la glucosa a las 8 horas de crecimiento (fase estacionaria) y en este punto produjo la máxima concentración de etanol (5,5 g/l) (Figura 2.2a). *D. hansenii* consumió la glucosa a las 45 horas, es decir en menor tiempo que en el medio con 2 M de NaCl (Fig. 2.2b) y tampoco produjo etanol. Los híbridos consumieron totalmente la glucosa a las 30-35 horas y la producción máxima de etanol fue de 5 g/l (Figura 2.2 c y d), similar a la de *S. cerevisiae* y mayor que el etanol producido en el medio con alta presión osmótica (2,5 - 3,5 g/l; Figura 2.1 b y c).

En ambos ensayos, en medio con NaCl y basal, se calculó el rendimiento de la producción de biomasa y de etanol. Los resultados se muestran en la Tabla 2.5:

Tabla 2.5: Rendimiento (Y) de la producción de biomasa y de etanol respecto a la glucosa consumida, obtenidos durante el crecimiento en medio basal y en medio con 2M NaCl. Los valores son el promedio de determinaciones realizadas a partir de ensayos independientes. En cada caso se indica el desvío estándar correspondiente y, entre paréntesis, el número de ensayos realizados.

Rendimiento	<i>S. cerevisiae</i>		<i>D. hansenii</i>		Híbrido HM92		Híbrido HM93	
	Basal	ClNa	Basal	ClNa	Basal	ClNa	Basal	ClNa
Biomasa $Y_{x/s}$	0,17 ± 0,01 (3)	NC	0,47 ± 0,03 (3)	0,17 ± 0,01 (3)	0,34 ± 0,03 (2)	0,28 ± 0,03 (2)	0,26 ± 0,02 (3)	0,34 ± 0,03 (3)
Etanol $Y_{p/s}$	0,26 ± 0,02 (3)	NC	0,03 ± 0,002 (3)	0,03 ± 0,002 (3)	0,19 ± 0,01 (2)	0,13 ± 0,01 (2)	0,16 ± 0,01 (3)	0,17 ± 0,01 (3)

NC: No crece en estas condiciones.

Las cepas halotolerantes produjeron dos polioles, glicerol y arabitól. Si se compara el crecimiento de estas levaduras en medio sin presión osmótica y en medio con 2 M de NaCl, se observan cambios en la producción y acumulación de estos polioles. Con respecto al glicerol, en medio basal YEPD, la máxima producción y acumulación intracelular del poliol tuvieron lugar, durante la fase logarítmica de crecimiento y a medida que el cultivo entraba en la fase

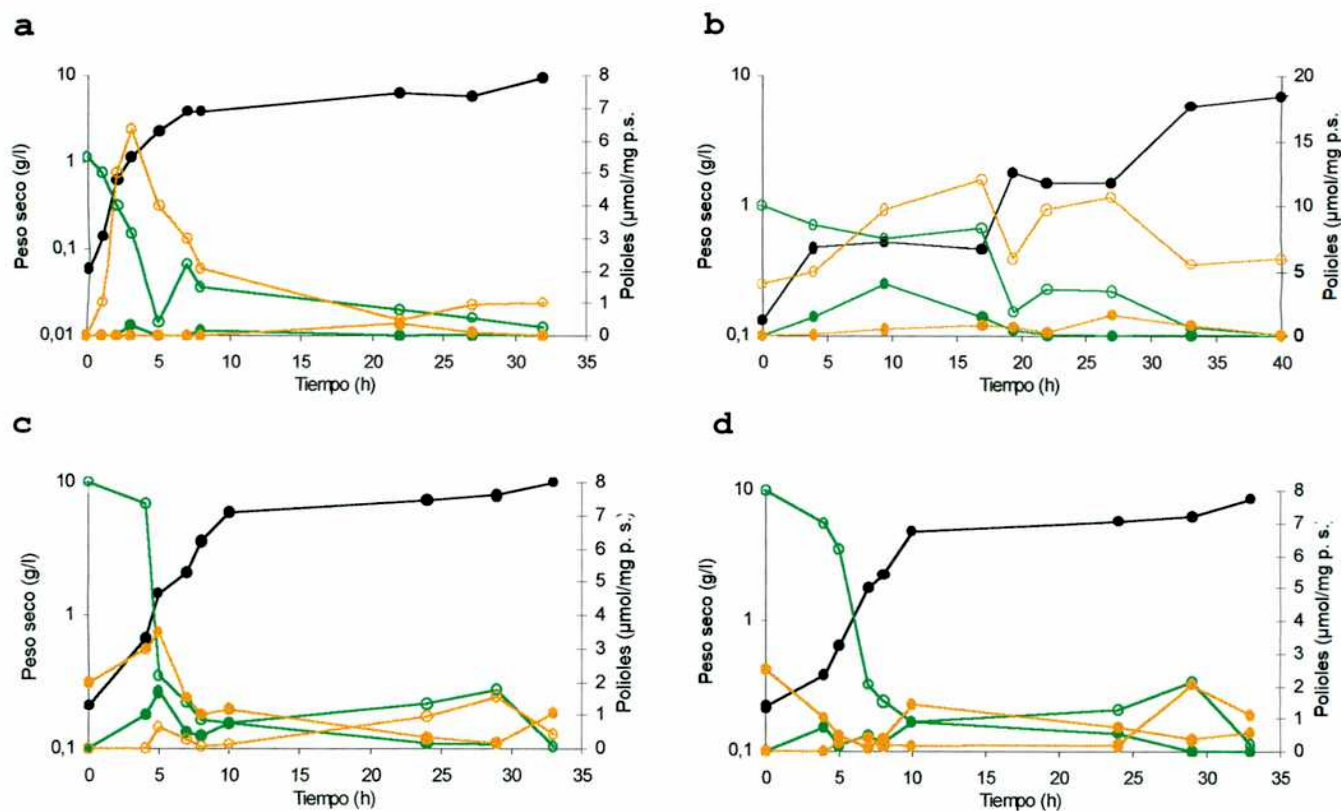


Figura 2.3: Producción de poliols durante el crecimiento en medio basal YEPD. a) *S. cerevisiae*; b) *D. hansenii*; c) HM92; d) HM93. ● Peso seco; ● glicerol intracelular; ○ glicerol extracelular; ● arabitol intracelular; ○ arabitol extracelular.

estacionaria decrecieron gradualmente (Figura 2.3 a, b, c y d). Sin embargo, cuando el crecimiento fue en YEPD + 2 M NaCl, tanto los productos de fusión HM92 y HM93 (Figura 2.4 b y c) como *D. hansenii* (Figura 2.4 a) acumularon, durante la fase logarítmica temprana, gran parte del glicerol producido para luego, hacia el final de esta fase, liberarlo al medio. En la fase estacionaria, las células aparentemente comenzaron a consumir el glicerol producido, puesto que durante este período también disminuyeron los niveles extracelulares del polioli (Figura 2.4 a, b y c). Como se mencionó anteriormente, el parental *S. cerevisiae*, no desarrolló en este medio como consecuencia del elevado contenido de sal.

Con respecto a la producción de arabitol, en el ensayo con medio basal YEPD *S. cerevisiae* produjo arabitol pero no lo acumuló intracelularmente (Figura 2.3 a). Como el arabitol extracelular decreció con el tiempo se podría asumir, también, que luego fue asimilado por las células. *D. hansenii* (Figura 2.3 b) en las primeras horas produjo arabitol excretando la mayor proporción de éste al medio de cultivo. Los PF (Figura 2.3 c y d) acumularon

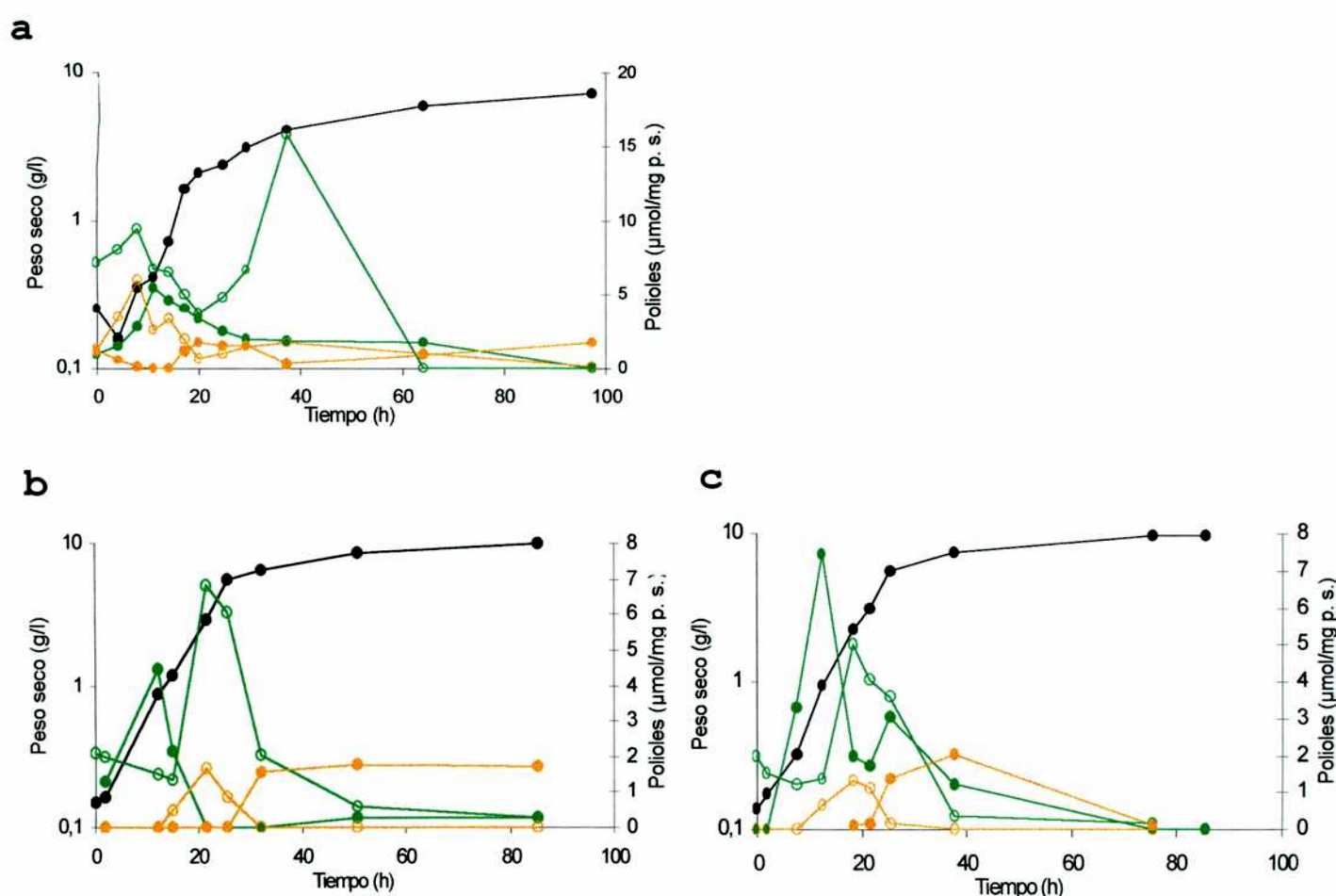


Figura 2.4: Producción de polioles durante el crecimiento en medio YEPD con 2 M NaCl. a) *D. hansenii*; b) HM92; c) HM93. ● Peso seco; ● glicerol intracelular; ○ glicerol extracelular; ● arabitol intracelular; ○ arabitol extracelular.

intracelularmente arabitol durante la fase log tardía para luego liberarlo, hacia el final de la fase estacionaria de crecimiento.

En el medio con alta presión osmótica *D. hansenii* y los PF tuvieron un comportamiento similar aunque el glicerol acumulado intracelularmente fue mayor que en el medio basal (Figura 2.3 a, b, c y d). Durante el crecimiento exponencial, mientras el glicerol intracelular fue alto, el arabitol se encontró en forma extracelular y luego, a medida que el glicerol intracelular disminuía, comenzó la acumulación de arabitol en el interior de las células.

Se puede observar que *D. hansenii* y los híbridos respondieron de manera similar al shock osmótico impuesto por el medio de crecimiento. No sólo aumentaron la producción de polioles, sino que tendieron a incrementar la concentración intracelular de los mismos, aunque varió, según la etapa del crecimiento, la proporción de un poliol con respecto a la del otro. La concentración intracelular de arabitol fue leve como respuesta a la salinidad del medio con 2 M NaCl, sin embargo el glicerol intracelular incrementó considerablemente. Este comportamiento es coincidente con el observado por otros autores para *D. hansenii* en condiciones similares de cultivo (Adler & Gustafsson, 1980; Larsson *et al.*, 1990), quienes observaron que en cultivos en lote con elevada salinidad la concentración intracelular de glicerol no se mantenía constante durante todo el ciclo de crecimiento. La concentración de glicerol decrecía en la fase exponencial tardía mientras que la de arabitol aumentaba cuando las células se aproximaban a la etapa estacionaria. Adler & Gustafsson (1980) encontraron una correlación directa entre la concentración interna de glicerol durante la mitad de la fase exponencial y la salinidad del

medio. Sin embargo, Larsson *et al.* (1990), realizando cultivos continuos de *D. hansenii*, demostraron que se correlaciona mejor la concentración intracelular de polioles totales con la salinidad del medio. Esta fue directamente proporcional a la concentración salina del medio y esencialmente independiente de la velocidad de crecimiento, aún cuando varió la proporción entre los dos polioles. El arabitol respondió levemente a la salinidad del medio pero pareció estar regulado con la velocidad de crecimiento (la concentración incrementó al disminuir la velocidad de crecimiento). La poca variación encontrada por estos autores entre la máxima acumulación de arabitol y la concentración de sal, los indujo a considerar al arabitol como un soluto compatible constitutivo. Por el contrario, propusieron al glicerol como soluto compatible inducible ya que su acumulación intracelular aumentó con el estrés salino. En el presente trabajo también se observó, en ambas condiciones de crecimiento (con y sin ClNa), poca variación de la concentración de arabitol acumulado en *D. hansenii*, HM92 y HM93 mientras se observó incremento del glicerol intracelular en el medio con presión osmótica alta.

Brown (1978) describió que *Z. rouxii* (levadura osmotolerante) también produce glicerol y arabitol. En cultivos en lote en un medio con baja actividad de agua *Z. rouxii* luego de consumir toda la glucosa, final de la fase exponencial de crecimiento, consume el glicerol producido presumiblemente para usarlo como fuente de energía; igual a lo observado en este trabajo. Las células incorporan el arabitol extracelular y el contenido intracelular del poliol se incrementa. En condiciones de estrés osmótico, el agotamiento de la fuente de energía puede conducir al consumo del soluto compatible primario, glicerol, y la substitución por el arabitol, soluto compatible secundario. El arabitol no es un buen protector enzimático como el glicerol,

así la actividad metabólica podría disminuir por la presencia del arabitol como principal soluto compatible, aunque esto ocurriría en la fase estacionaria.

Edgley & Brown (1983) compararon la respuesta de *Z. rouxii* y *S. cerevisiae* en la adaptación a medios con bajos potenciales de agua. Observaron que *Z. rouxii* respondió al estrés osmótico manteniendo constante la producción de glicerol pero incrementando su retención dentro de la célula, mientras *S. cerevisiae* respondió reteniendo una proporción intracelular constante de una cantidad mayor de glicerol sintetizado. En *S. cerevisiae* el desvío, impuesto por el estrés osmótico, de su metabolismo de carbohidratos a la producción de glicerol debe limitar considerablemente otras actividades biosintéticas esenciales, constituyendo un importante factor limitante de la tolerancia de las células a bajos potenciales de agua.

Los resultados obtenidos, coincidentes con los hallazgos de otros autores, ponen de manifiesto parte de una estrategia mediante la cual estos organismos logran balancear la osmolaridad intracelular con respecto a la osmolaridad del medio.

B- Caracterización de los híbridos obtenidos luego de la fusión de protoplastos entre *T. delbrueckii* CBS 813 y *S. cerevisiae* P-158

Los híbridos PB1, PB2 y PB3 fueron morfológicamente similares al parental *S. cerevisiae* pero adquirieron el carácter osmotolerante de *T. delbrueckii*. Se decidió entonces estudiar semejanzas y diferencias con las levaduras parentales. Para ello se realizó lo siguiente:

- Separación electroforética de los cromosomas de las dos cepas parentales y los tres híbridos mediante la técnica de electroforesis de campo pulsado en geles de agarosa (CHEF).
- Cultivos en lote en medio con elevada concentración de azúcar. Se determinó biomasa, consumo de glucosa, producción de etanol y de polihidroxialcoholes (glicerol y arabitol).

Separación de cromosomas

Mediante la técnica de electroforesis de campo pulsado (CHEF) se logró separar cromosomas de las cepas parentales, *T. delbrueckii* CBS 813 y *S. cerevisiae* P-158 y de los tres productos de fusión, PB1, PB2 y PB3 (Foto 2.3). Se utilizó una sola condición de corrida. Es importante mencionar que las variables durante la corrida electroforética deben ajustarse de forma tal de separar al mismo tiempo la mayor cantidad posible de cromosomas de cada una de las cepas, así se legitima las comparaciones posteriores entre los patrones de banda obtenidos. Se encontró que los tres PF poseían un patrón cromosómico similar entre sí pero además, el patrón de PB1 y PB3 fue coincidente con el de *S. cerevisiae*, mientras que el de PB2 mostró una banda adicional de baja movilidad, similar a la primera de las 6 bandas resueltas para *T. delbrueckii*. Oda & Tonomura (1995) también encontraron 6 bandas en el patrón electroforético de cromosomas de *T. delbrueckii* y como ya se dijo en el capítulo anterior, otros autores han logrado resolver 16 bandas para *S. cerevisiae* correspondientes al

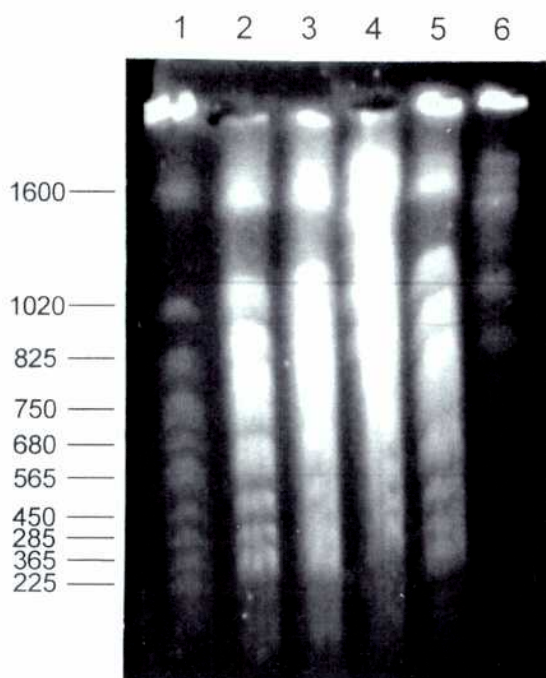


Foto 2.3: Separación de moléculas de ADN cromosomal mediante el sistema CHEF.

Línea 1: cepa de referencia

S. cerevisiae YNN 295 de Bio-Rad.

línea 2: *S. cerevisiae* P-158.

líneas 3, 4 y 5: productos de fusión PB1, PB2 y PB3 respectivamente.

línea 6: *T. delbrueckii* CBS-813.

Los tamaños moleculares (Kb) se indican (izquierda) según la cepa de referencia.

juego haploide de 16 cromosomas que posee esta especie. En esta oportunidad, bajo las condiciones de corrida establecidas, se han podido diferenciar alrededor de 12 bandas de las 16 teóricas mencionadas.

Por lo tanto, los PF a pesar de presentar el carácter osmotolerante de la cepa parental *T. delbrueckii*, poseen una morfología y un patrón electroforético de cromosomas muy similares a *S. cerevisiae*.

Cultivos en lote - Curvas de crecimiento.

Se estudió el crecimiento de los híbridos PB1 y PB2 y de los parentales en un medio con elevada concentración de glucosa. Se realizaron ensayos de fermentación en lote en medio YEPD-400. Esta concentración de glucosa (400 g/l) es lo suficientemente elevada

como para obligar a las células a adaptarse osmóticamente pero no tanto como para impedir el desarrollo de *S. cerevisiae* que es una levadura con limitada tolerancia osmótica. Se determinó la producción de biomasa, etanol, glicerol y arabitol así como también el consumo de azúcar.

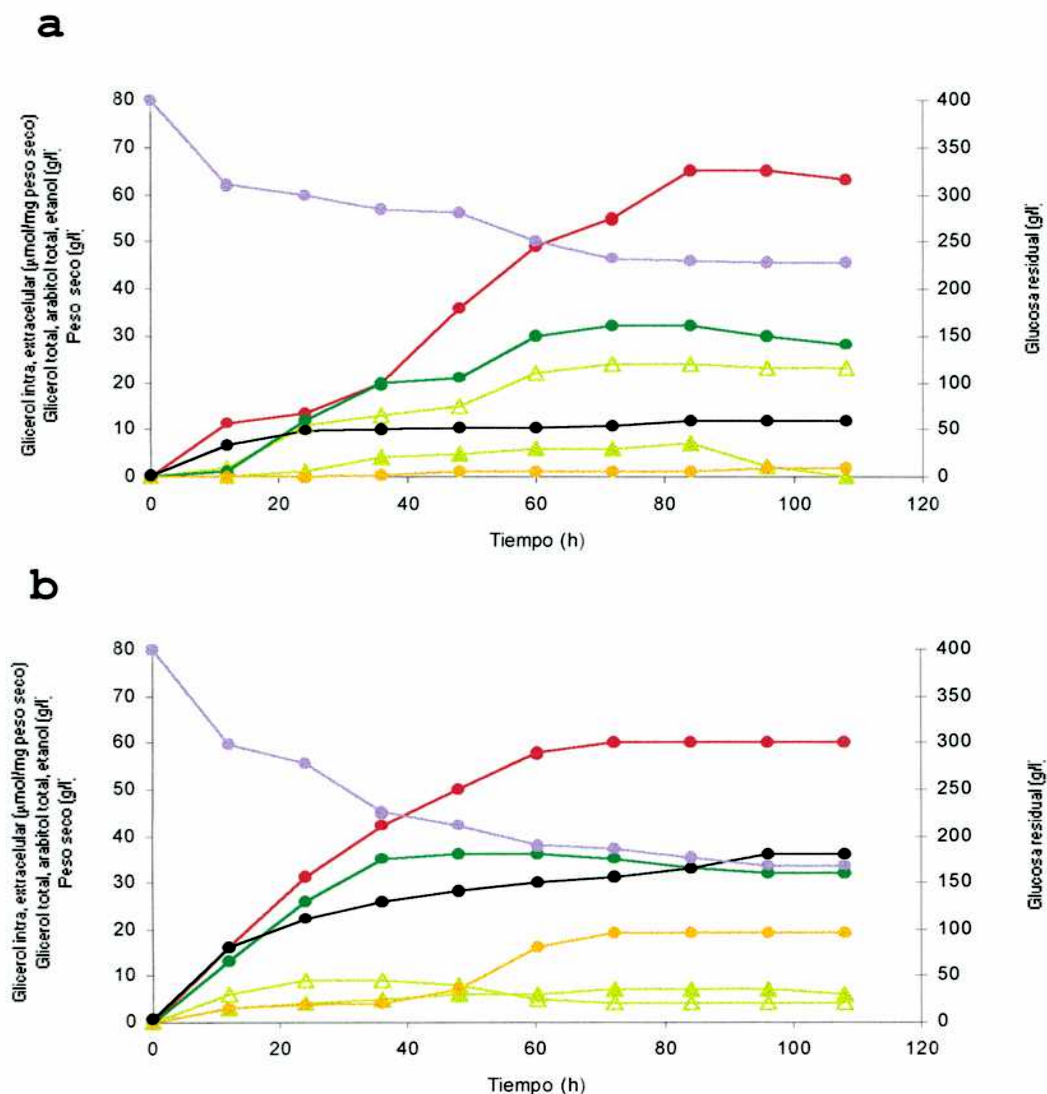


Figura 2.5: Producción de etanol y de polioles durante el crecimiento de las cepas en medio YEPD con 400 g/l de glucosa. a) *S. cerevisiae*; b) *T. delbrueckii*. ● Peso seco; ● glucosa residual; ● etanol; ● glicerol total; ▲ glicerol intracelular; ▲ glicerol extracelular; ● arabitol total.

Los resultados presentados en la Figura 2.5 (a, b) y en la Figura 2.6 (a y b) muestran que *T. delbrueckii* tuvo la mayor producción de biomasa y el consumo más alto de glucosa. Sin embargo, la máxima concentración final de etanol (75 g/l) se obtuvo con el híbrido PB2. El rendimiento, expresado como g de etanol/g de azúcar inicial, fue 26% más alto que el de *T. delbrueckii*, aunque esta cepa mostró el mayor consumo de glucosa. Ambos híbridos, PB1 y PB2, produjeron más etanol que el parental *S. cerevisiae* aunque la producción de biomasa fue similar, lo cual significa una producción específica (g de etanol/g de peso seco) más alta.

Como se mencionó anteriormente, el crecimiento y el comportamiento de los microorganismos en medios de alta osmolaridad están relacionados a la producción de osmorreguladores, tales como el glicerol y el arbutol. Se determinó la producción de arbutol y glicerol durante el desarrollo del cultivo.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Fig. 2.5 (a, b) la producción de glicerol y su distribución dentro y fuera de las células muestra marcadas diferencias entre *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. La producción de glicerol en *T. delbrueckii* estuvo asociada al crecimiento del cultivo. La concentración de glicerol total (glicerol intracelular + glicerol extracelular) alcanzó un máximo de 35 g/l después de 48 h de incubación y luego se mantuvo constante. En *S. cerevisiae* la máxima concentración de glicerol total fue de 33 g/l después de 84 h y luego decreció levemente. En relación con la distribución del glicerol, en *T. delbrueckii* la concentración específica de glicerol intracelular (μmol glicerol/mg biomasa) fue el doble que la correspondiente a la fracción extracelular después de 60 h de incubación. De lo contrario *S. cerevisiae* secretó la mayor parte del glicerol producido por lo que la concentración intracelular fue más baja que la extracelular durante todo el desarrollo del cultivo. Se puede

concluir que ambos parentales sintetizaron glicerol durante el crecimiento con elevada presión osmótica, sin embargo *T. delbrueckii* acumuló en forma más eficiente el poliol mientras *S. cerevisiae*, aunque produjo tanto glicerol como *T. delbrueckii*, excretó la mayor parte de éste al medio.

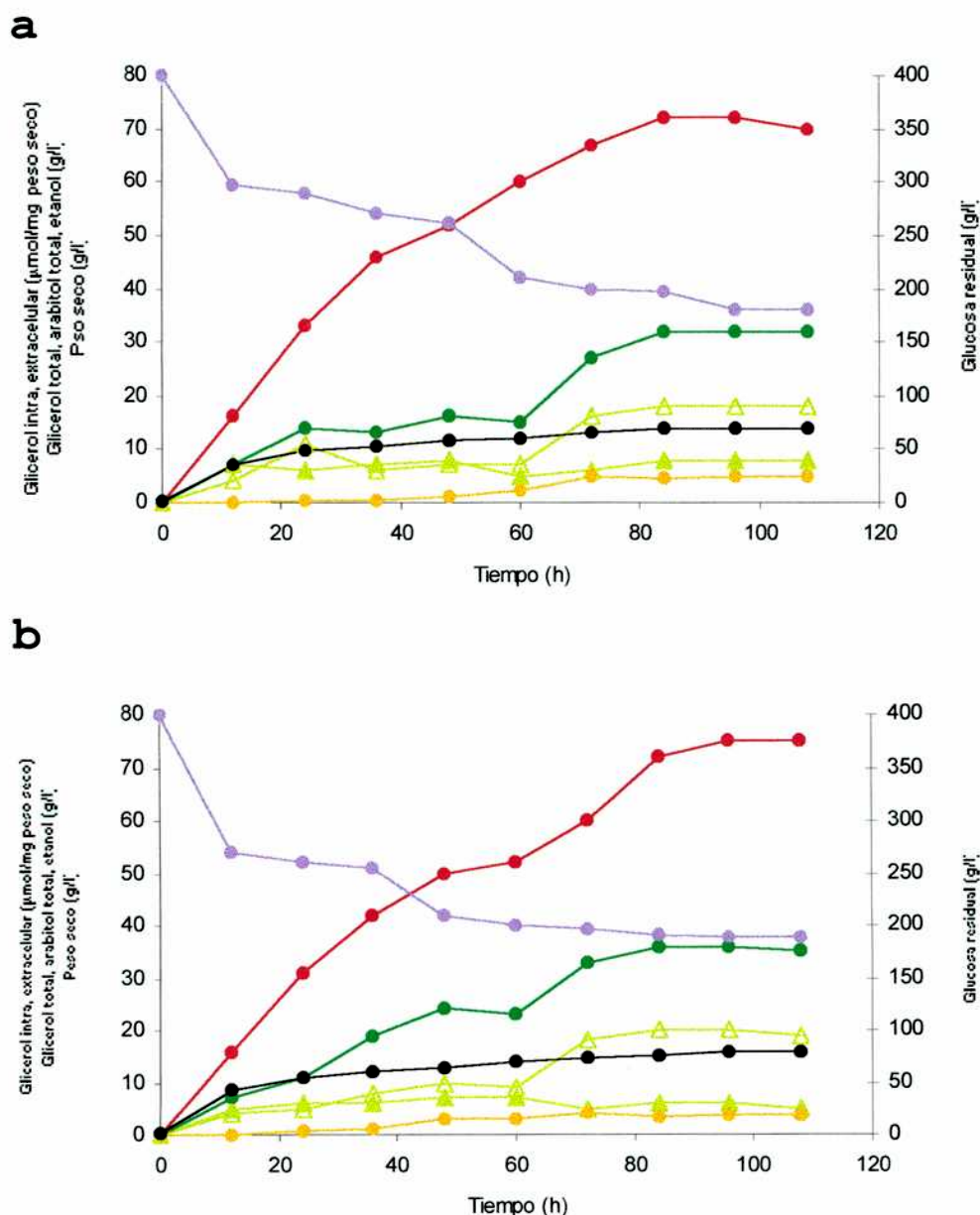


Figura 2.6: Producción de etanol y de polioles durante el crecimiento de las cepas en medio YEPD con 400 g/l de glucosa. a) PB1; b) PB2. ● Peso seco; ● glucosa residual; ● etanol; ● glicerol total; ▲ glicerol intracelular; ▲ glicerol extracelular; ● arabitol total.

Las cepas también produjeron arabitol. En *S. cerevisiae* la concentración máxima de glicerol total (2 g/l) fue 10 veces menor que la alcanzada por *T. delbrueckii*.

Como se muestra en la Fig. 2.6 (a, b) los híbridos produjeron similar cantidad de glicerol que las cepas parentales. Retuvieron el glicerol dentro de la célula durante la fase exponencial de crecimiento, aumentando su secreción luego de 60 h de cultivo.

La máxima concentración de arabitol producida por PB1 y PB2 fue 4 y 5 g/l, respectivamente, es decir aproximadamente el doble de lo producido por *S. cerevisiae*.

Si se compara el comportamiento de la cepa parental osmotolerante y la no tolerante se observan diferencias esenciales en las reacciones metabólicas para reducir la actividad de agua intracelular. La estrategia utilizada por *S. cerevisiae* fue la sobreproducción de glicerol y la excreción del glicerol excedente, mientras *T. delbrueckii* así como otras levaduras de elevada tolerancia osmótica (*Z. rouxii*, *D. hansenii*) retuvo una proporción mayor del poliol en lugar de incrementar su producción (Spencer & Spencer, 1978; Edgley & Brown, 1983; Blomberg, 1988).

BIBLIOGRAFÍA

- Adler, L. and Gustafsson, L. (1980). Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology* 124, 123-130.
- Adler, L., Blomberg, A. and Nilsson, A. (1985). Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology* 162, 300-306.

André, L., Hemming, A. and Adler, L. (1991). Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS* 286, 13-17.

Brown, A.D. (1978). Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Advances in Microbial Physiology* 17, 181-242.

Brown, A.D. and Sympton, J.R. (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *Journal of General Microbiology* 72, 589-591.

Bustamante, C., Gurrieri, S. and Smith, S.B. (1993). Towards a molecular description of pulsed-field gel electrophoresis. *Trends in Biotechnology* 11, 23-29.

Carle, G.F. and Olson, M.V. (1985). An electrophoretic karyotype for yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82, 3756-3760.

Edgley, M. and Brown, A.D. (1983). Yeast water relations: Physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. *Journal of General Microbiology* 129, 3453-34 63.

Goto, K., Motoyoshi, T., Tamura, G., Obata, J. and Hara, S. (1990). Chromosomal transformation in *Saccharomyces cerevisiae* with DNA isolated by pulse field gel electrophoresis. *Agricultural and Biological Chemistry* 54, 1499-1504.

Jermi, M.F.G. and Schmidt-Lorenz, W. (1987). Growth of osmotolerant yeasts at different water activity values. *Journal of Food Protection* 50, 5: 404-410.

Johnston, J.R., Contopoulou, C.R. and Mortimer, R.K. (1988). Karyotyping of yasts strains of several genera by field inversin gel electrophoresis. *Yeast* 4, 191-198.

- Larsson, C., Morales, L., Gustafsson, L. and Adler, L. (1990). Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *Journal of Bacteriology* 172, 4: 1769-1774.
- McDonell, M.W., Simon, M.N. and Studier, F.W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *Journal of Molecular Biology* 110, 119-146.
- Oda, Y. and Tonomura, K. (1995). Electrophoretic karyotyping of the yeast genus *Torulaspora*. *Letters in Applied Microbiology*. 21, 190-193.
- Quattocchi, O, Abelaira, S.I. and Laba, R. (1992). Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Merck.
- Singh, K.K. and Norton, R.S. (1991). Metabolic changes induced during adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to a water stress. *Archives of Microbiology* 156, 38-42.
- Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (1978). Production of polyhydroxy alcohols by osmotolerant yeasts. *In: Primary Products of Metabolism*. Rose, A.H. (ed.). Academic Press New York, London. p. 393-425.
- Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (1997). Taxonomy: The name of the Yeast. *In: Yeasts in natural and artificial habitats*. Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (eds.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. p. 11-32.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R D. and Somero, G N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 1214-1222.

CAPÍTULO III

TRANSPORTE DE MONOSACÁRIDOS

La membrana plasmática, debido a su acción como barrera de difusión, tiene un importante papel en la adaptación de células de levadura a un medio hiperosmótico. La permeabilidad selectiva a diferentes iones y solutos permite a las células restablecer y mantener el equilibrio osmótico entre el interior celular y el medio ambiente (Blomberg, 1988; Sigler & Höfer, 1997). Sin embargo, todavía se conoce poco acerca de cómo y en qué medida la presencia de alta concentración de sal en el medio externo afecta los procesos de transporte a través de la membrana plasmática.

En levaduras existen distintos tipos de procesos de transporte de solutos (Cartwright *et al.*, 1989). **Difusión simple:** una molécula de soluto pasa a través de los dominios lipídicos de la membrana sin involucrar ninguna de las proteínas presentes en ella. **Transporte mediado por proteínas:** puede ser de dos tipos: a) Mueve moléculas de solutos a través de la membrana a favor del gradiente de concentración y es denominado **difusión facilitada o no concentrativa**. b) Transporta las moléculas de soluto en contra del gradiente de concentración a expensas de energía metabólica y se lo describe comúnmente como **transporte activo**.

En levaduras la energía es liberada solamente por oxidación química, la cual ocurre principalmente en la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial interna. Las levaduras pueden también liberar energía bajo condiciones anaeróbicas por fermentación. La energía redox es eventualmente almacenada como adenosina trifosfato, ATP, el cual suministra

energía para todas las reacciones celulares endergónicas (requerimiento energético). La conversión de energía redox en ATP en las membranas biológicas está asociada con la generación en la cadena respiratoria y uso (por la F_0F_1 -ATPasa) del gradiente electroquímico del protón ($\Delta\mu_{H^+}$). Por otra parte, el ATP es hidrolizado por la ATPasa translocante de protones unida a membrana plasmática (tipo P) o a membrana de tonoplastos (tipo V), donde es generado el $\Delta\mu_{H^+}$. El transporte de muchos solutos al interior de las células (así como del citosol al interior de las organelas) en contra del gradiente de concentración, ocurre en cotransporte con H^+ . El cotransporte de H^+ acopla el transporte del soluto al flujo de protones en favor del gradiente electroquímico del protón.

El gradiente electroquímico del protón ($\Delta\mu_{H^+}$) consiste en las diferencias de potencial eléctrico y químico, representadas por el potencial de membrana ($\Delta\psi$) y el gradiente de concentración de protones (ΔpH), respectivamente. El $\Delta\mu_{H^+}$ tiene la dimensión de energía, su fuerza impulsora es la fuerza motora del protón (pmf),

$$\Delta\mu_{H^+} = (\Delta\psi + Z\Delta pH)F$$

$$pmf = \Delta\psi + Z\Delta pH,$$

donde Z es el factor de corrección de energía química a energía eléctrica ($Z = 2,303 RT/F$), siendo R la constante de los gases ($R = 8,314 [J K^{-1} mol^{-1}]$), T la temperatura absoluta [K], y F la constante de Faraday ($F = 96480 [C mol^{-1} \text{ de ion monovalente}]$). El factor 2,303 convierte el logaritmo natural en logaritmo común. A 30 °C, Z es 0,06V (o 60 mV).

La dependencia de un sistema de transporte en estudio respecto al aporte de energía metabólica, puede ponerse de manifiesto mediante el agregado de compuestos que actúan como desacoplantes energéticos. Uno de ellos es el 2,4-dinitrofenol (**DNP**), que tiene la propiedad de separar el flujo de electrones y el bombeo de iones H^+ para la síntesis de ATP. Así el DNP interrumpe el gradiente de H^+ y la energía proveniente de la transferencia de electrones no puede usarse para la síntesis de ATP. Las células entonces, quedan desacopladas de los mecanismos proveedores de energía y por lo tanto quedan desenergizadas. Además, los desacoplantes son ácidos débiles, que trabajan óptimamente a pH bajo. Así la eficiencia para despolarizar la diferencia de potencial eléctrico y suprimir el transporte activo decrece al aumentar el pH. A pH 5,0 el DNP inhibe el transporte y despolariza el potencial de membrana completamente (Hauer & Höfer, 1978).

La participación del potencial de membrana en el transporte de solutos puede ponerse en evidencia mediante el uso del catión lipofílico tetrafenilfosfonio (**TPP⁺**). Debido a su naturaleza hidrofóbica, el **TPP⁺** penetra fácilmente las membranas biológicas por difusión física y mientras su masa fluye despolariza las membranas (Hauer & Höfer, 1978; Prasad & Höfer, 1986).

OBJETIVO

Dado que el crecimiento de las cepas *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* y la cepa híbrida HM92, se vio afectado, en mayor o menor medida, por la presencia de altas concentraciones de NaCl en el medio, el objetivo de esta parte del trabajo fue

caracterizar en dichas cepas, el sistema de transporte de monosacáridos y analizar su posible alteración bajo condiciones de estrés de sal.

MATERIALES Y METODOS

Cepas:

Saccharomyces cerevisiae UCD 522

Debaryomyces hansenii NRRL Y-7393

Híbrido HM92.

Medios de cultivo:

YEPD: 10 g/l extracto de levadura, 20 g/l peptona, 20g/l glucosa más 20 g/l de agar cuando se usó medio sólido.

YEPD + x M NaCl (x = 1,4 o 2)

Condiciones de cultivo:

Las células fueron crecidas en medio líquido, YEPD (**células no adaptadas** a condiciones de estrés de sal) o YEPD + x M NaCl (**células adaptadas**). Los frascos de cultivo fueron inoculados con un precultivo en mitad de la fase logarítmica de crecimiento en medio YEPD (20 ml, 30 °C, 200 rpm), de manera de obtener una densidad celular inicial de 5×10^6 cel/ml. Los cultivos fueron incubados a 30 °C y a 200 rpm.

Solución de trabajo:

Las células fueron cosechadas en fase estacionaria temprana, lavadas dos veces con agua destilada y resuspendidas al 5% (p/v) en suspensión acuosa. La suspensión celular fue aireada sobre agitador magnético durante 3-4 horas a temperatura ambiente (ayunado de las células). Luego de la aireación, las células fueron lavadas una vez más y resuspendidas como antes. Finalmente, la suspensión celular fue mezclada en partes iguales con amortiguador fosfato de potasio 100 mM, pH 4,5. Cuando se trabajó con **células adaptadas** (crecidas en presencia de alta concentración de NaCl), el procedimiento fue exactamente el mismo, con la única diferencia que en los lavados y resuspensiones, en agua o amortiguador, se agregó la cantidad de NaCl necesaria para mantener en todo momento la isotonicidad con el medio de crecimiento.

Determinaciones analíticas

- **Biomasa:** En todos los experimentos se tomaron muestras para determinar el peso seco inicial. Las muestras se filtraron en membranas con poros de 0,8 μm , previamente secadas en estufa a 100 °C durante 24 horas. Se realizaron dos lavados con 1 ml de agua destilada por vez y los filtros con biomasa se colocaron nuevamente en estufa a 80 °C durante 24 horas. La determinación del peso seco se realizó por triplicado, en balanza analítica.
- **Contenido intracelular de Xilosa:** La pentosa fue determinada por el método de filtración (Höfer, 1989) utilizando orcinol como reactivo (Heller & Höfer, 1975). De las mezclas de reacción obtenidas a partir de las muestras procesadas y mezcladas con orcinol, se calculó la concentración intracelular de xilosa de la siguiente manera:

$$S_i (\text{xil}) = \frac{E \cdot f}{2 \cdot e_s \cdot m}$$

$S_i (\text{xil})$: concentración intracelular de xilosa [mM]

E: absorbancia a 650 nm de la mezcla de reacción

f: factor de dilución

2: contenido de agua intracelular correspondiente a 1 mg de peso seco [$\mu\text{l} \cdot \text{mg}^{-1}$]

e_s : absorbancia correspondiente a 1 nmol de xilosa (tomado de la curva de calibración)

m: peso seco en 1 ml de la suspensión de trabajo [mg].

- Contenido intracelular de glucosa y 2-deoxi D-glucosa (2-DG): Se midió la radiactividad en las muestras filtradas (radiactividad intracelular) y en las muestras intactas (actividad específica) en un contador de centelleo líquido (Analizador de centelleo Packard Tri-Carb 1600 CA). La concentración intracelular del azúcar se calculó del siguiente modo:

$$S_i (\text{azúcar}) = \frac{\text{dpm}}{ae \cdot 2 \cdot m}$$

$S_i (\text{azúcar})$: concentración intracelular de glucosa o 2-DG [mM]

dpm: desintegraciones por minuto (medidas en las muestras filtradas)

ae: actividad específica (dpm correspondiente a un nmol de 2-DG)

2: contenido de agua intracelular correspondiente a 1 mg de peso seco [$\mu\text{l} \cdot \text{mg}^{-1}$]

m: peso seco en 1 ml de la suspensión de trabajo [mg]

- Contenido remanente de glucosa: Se midió en el sobrenadante luego de la centrifugación de las muestras. La determinación de la hexosa se llevo a cabo por método enzimático

usando hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en la presencia de ATP y NAD⁺ (Boehringer).

I- Transporte de monosacáridos

a) Transporte de D-xilosa y 2-DG:

Se obtuvieron las suspensiones de trabajo con células de ambas cepas parentales (*D. hansenii*, *S. cerevisiae*) y del híbrido HM92, crecidas en YEPD o en YEPD + 2 M NaCl. Las suspensiones fueron colocadas en un baño de agua a 30 °C, con agitación. Los experimentos comenzaban cuando se agregaba el monosacárido apropiado en cada caso [D-xilosa o 2-deoxi- D-glucosa (2-DG)].

La D-xilosa se agregó fría en cantidad necesaria para tener una concentración inicial en la suspensión de trabajo de 20 mM (para *D. hansenii* y HM92) o 30 mM (para *S. cerevisiae*). Se tomaron periódicamente muestras de 1 ml. La pentosa intracelular se determinó como se indica en determinaciones analíticas.

El transporte de 2-DG fue estudiado midiendo la incorporación del isótopo radiactivo 2-deoxi-D-[1-³H]glucosa, 15,0 Ci/mmol (Amersham International plc, England). La concentración inicial del azúcar en la suspensión de trabajo fue de 2 mM. Se tomaron muestras de 1 ml a determinados intervalos de tiempo y las células fueron separadas por filtración (Höfer, 1989). Cada filtro con las células retenidas fue colocado en 10 ml de solución de centelleo (AQUALUMA, high counting efficiency Isc cocktail, Lumac-Isc b.y., Groningen, The Netherlands). Para medir la actividad específica de la suspensión celular, se tomaron tres muestras más de 100 µl y cada una fue colocada en 4 ml de solución de

centelleo. La concentración intracelular del azúcar se determinó por medición de la radiactividad intracelular como se indica en determinaciones analíticas.

Cuando se necesitó se agregó: i) desacoplante energético 2,4-dinitrofenol (DNP) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO, solvente que no es metabolizado por las células) en cantidad suficiente para obtener una concentración, en la suspensión de trabajo, de 10 mM DNP; ii) catión lipofílico tetrafenilfosfonio (TPP^+), 30 mM en la suspensión de trabajo; iii) NaCl 2 M; iv) cloruro de colina y benceno sulfonato de sodio en cantidades necesarias para tener una concentración 2M de los iones cloruro y sodio en las suspensiones celulares; v) otras sales como LiCl, KCl, CaCl_2 y MgCl, concentraciones de 1 y 2 M.

b) Transporte de intercambio:

Este ensayo se realizó con *D. hansenii* y HM92. Las suspensiones de trabajo fueron colocadas en un baño de agua a 30 °C, con agitación. Los experimentos se iniciaban cuando se agregaba el monosacárido apropiado en cada caso (D-xilosa o 2-DG).

Se permitió que las células acumularan intracelularmente D-xilosa (agregada fría, concentración inicial 10 mM) o 2-DG (isótopo radiactivo, concentración inicial 2 mM). A los 30 minutos de iniciado el experimento se adicionaron los monosacáridos (fríos) D-glucosa (5 mM), D-xilosa (25 mM) o 2-DG (5 mM) según correspondió, para analizar su posible competencia por el sistema de transporte con el azúcar previamente acumulado por las células. Durante todo el experimento se midió la concentración intracelular de D-xilosa, por

el método con orcinol como reactivo y de 2-DG cuantificando la radiactividad acumulada intracelularmente (métodos ya citados anteriormente en determinaciones analíticas).

c) Consumo de D-glucosa y competencia entre monosacáridos:

Este estudio se realizó con las tres cepas. Las suspensiones de trabajo de cada cepa se prepararon como se explicó antes, se incubaron a 30 °C, con agitación mecánica en baño de agua y el experimento se inició con el agregado conjunto de D-glucosa y uno de los posibles azúcares competidores, D-xilosa o 2-DG. La concentración inicial de glucosa en los tres casos fue de aproximadamente el doble del valor correspondiente de K_T (50 mM para *D. hansenii*, 10 mM para *S. cerevisiae* y 20 mM para HM92). Las concentraciones de xilosa y 2-DG eran equivalentes a 10 veces la concentración de glucosa usada para cada cepa, excepto la de xilosa para *S. cerevisiae*, que fue 50 veces superior debido al elevado K_T que posee esta cepa para D-xilosa.

El consumo de D-glucosa se estimó a intervalos de tiempo determinados midiendo la glucosa remanente en el sobrenadante (es decir, aún no transportada al interior de las células), luego de la centrifugación de las muestras. La determinación de la concentración del azúcar se indica en determinaciones analíticas.

II- Cinética del transporte de monosacáridos

a) Cinética de D-xilosa:

Se cosecharon las células de las tres cepas de cultivos con medio YEPD y se procedió como se explicó con anterioridad hasta obtener las suspensiones de trabajo. Una vez que se

tomaron las muestras para la determinación de peso seco (biomasa), se dividió el volumen restante equitativamente en tantas partes como concentraciones diferentes de xilosa a estudiar, en un rango de 30 a 200 mM. Las suspensiones se preincubaron en baño de agua a 30 °C con agitación.

Se realizaron experimentos individuales para cada concentración de xilosa, los que comenzaban cuando se agregaba el azúcar. Se tomaron tres muestras de 1 ml cada 1 minuto. Las muestras se procesaron según Höfer (1989) y la xilosa incorporada por las células fue medida utilizando orcinol (Heller y Höfer, 1975). Las concentraciones intracelulares de la pentosa fueron determinadas como se indicó anteriormente (Determinaciones analíticas y I a). Para cada concentración de azúcar se graficaron las concentraciones intracelulares medidas en función del tiempo. Se realizó la regresión lineal de los resultados y se determinó las velocidades iniciales de transporte del azúcar para cada concentración de la misma. Los parámetros cinéticos, K_T y V_{max} , fueron calculados gráficamente por el método de Eadie-Hofstee. Este método consiste en graficar las velocidades iniciales de transporte del azúcar, v (nmol azúcar / min por mg de peso húmedo de células) versus la velocidad inicial / concentración de sustrato (v/S) de acuerdo a la ecuación de Eadie-Hofstee:

$$v = -K_T (v/S) + V_{max}$$

Donde de la estimación gráfica (regresión lineal) de la pendiente de la línea obtenida se obtiene el valor de la constante media de saturación, K_T y la intersección con la ordenada (y), corresponde al valor de la velocidad máxima de transporte, V_{max} .

b) Cinética de D-glucosa:

Este estudio se realizó con las tres cepas, crecidas en medio basal YEPD y en medio YEPD + 2 M NaCl para las halotolerantes y 1,4 M para *S. cerevisiae*.

Los cultivos celulares fueron cosechados, lavados 2 veces con agua destilada* y resuspendidos al 5% (p/v) en agua destilada*. Dichas suspensiones fueron aireadas con agitación magnética durante 3 horas. Luego, las células fueron cosechadas, lavadas una vez más con agua destilada* y centrifugadas. Del pellet se pesaron 800 mg de células (peso húmedo) que se mezclaron con 4 ml de agua destilada*. De esta suspensión, se destinó 1 ml (2 muestras de 500 μ l) para las mediciones de peso seco y los 3 ml restantes se dividieron en dos volúmenes iguales de 1,5 ml que se mezclaron, cada uno, con 1,5 ml de amortiguador fosfato de potasio 100 mM*, pH 4,5 (para realizar el experimento por duplicado). La suspensión celular se preincubó a 30 °C con agitación. Paralelamente, se prepararon tubos Eppendorf, con 200 μ l de solución de tampón fosfato de potasio 100 mM*, pH 4,5 más D-glucosa, 2x respecto a la concentración que se debía analizar, más el compuesto radiactivo D-[U- 14 C]glucosa, 305 mCi/mmol (Amersham International plc, England). La incorporación del azúcar fue medida 5 y 200 mM. Los tubos Eppendorf fueron preincubados en las mismas condiciones de trabajo. Se realizó un experimento para cada concentración de glucosa los que comenzaron cuando se adicionó a cada Eppendorf 200 μ l de la suspensión celular.

Inmediatamente se tomó, de dicha mezcla de reacción, tres muestras de 100 μ l cada 5 segundos las que se transfirieron a tubos con 5 ml de tampón fosfato de potasio 50 mM*, mantenidos a 0 °C. El contenido de cada tubo fue filtrado y lavado 2 veces con una solución

de glucosa fría, en tampón fosfato 50 mM*, pH 4,5. La concentración de glucosa fría fue igual a la de glucosa radiactiva ensayada en cada oportunidad, con el propósito de eliminar cualquier asociación inespecífica de marca radiactiva con la membrana del filtro. Los filtros se pusieron en viales que contenían 10 ml de solución de centelleo (AQUALUMA, high counting efficiency Isc cocktail, Lumac-Isc b.y., Groningen, The Netherlands). La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido (Analizador de centelleo Packard Tri-Carb 1600 CA). Las concentraciones intracelulares de glucosa fueron determinadas como se indicó anteriormente (determinaciones analíticas). Las velocidades iniciales de transporte se determinaron igual que con D-xilosa (ítem II a). Los parámetros cinéticos, K_T y V_{max} , fueron calculados gráficamente por el método de Eadie-Hofstee como se explicó anteriormente (ítem II a).

* Los lavados, suspensiones y mezclas de reacción de los cultivos celulares crecidos en medio hiperosmótico se llevaron a cabo con soluciones de NaCl de igual concentración a la del medio de cultivo. Sin embargo, en algunos casos, células de las dos cepas halotolerantes crecidas en 2 M NaCl fueron sometidas, en la mezcla final de reacción, a concentraciones diferentes de NaCl (1,5 M o 2,6 M según el caso).

III) Efecto del NaCl sobre el transporte de monosacáridos

a) Cinética del transporte de D-glucosa en condiciones de estrés de sal:

Explicado en el ítem II b.

b) Transporte de D-xilosa y 2-DG y consumo de D-glucosa en presencia de elevada concentración de NaCl:

Explicado en el ítem I a y I c.

c) Medición del consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno fue estudiado en *D. hansenii* y en HM92. Las células fueron crecidas en medio basal YEPD y en YEPD + 2 M NaCl. Los cultivos se cosecharon y lavaron 2 veces con agua destilada o con agua destilada más diferentes concentraciones de NaCl (1, 1,5 ó 2 M). Finalmente la células se resuspendieron al 20% (p/v) en agua destilada, manteniendo la concentración salina utilizada en los lavados respectivos. Las suspensiones fueron aireadas durante 4-5 horas a temperatura ambiente. Durante ese tiempo se tomaron muestras de 25 μ l. Cada muestra se transfirió a una cámara que contenía 3,4 ml de tampón fosfato de potasio 50 mM a 30 °C y con agitación magnética. La respiración se registró con un electrodo de oxígeno tipo Clark. Primero se midió antes del agregado de azúcar (respiración endógena) y luego se midió después de la adición de glucosa (50 mM, concentración final).

El consumo específico de oxígeno [nmol de O₂/mg (p.s)/min] se calcula a partir de:

- 1) las pendientes obtenidas con el graficador,
- 2) el valor de tabla correspondiente a la concentración de oxígeno disuelto para una dada temperatura ambiente y presión normal (100% de oxígeno disuelto al iniciar cada ensayo) y
- 3) el valor de peso seco correspondiente en cada caso.

IV) Transporte acoplado de protones y 2-DG

a) Estequiometría H^+ /2-DG:

Cultivos celulares de *D. hansenii* y HM92 crecidos en medio YEPD, se trataron de la misma forma que en el punto I de esta sección hasta obtener suspensiones al 5% (p/v) de células en agua destilada. Estas suspensiones fueron aireadas 16-22 h en agua destilada. Luego se lavaron dos veces y se resuspendieron en agua destilada y se mantuvieron con agitación a temperatura ambiente 1 hora. Posteriormente se realizaron, a partir de cada suspensión celular, una serie de ensayos independientes. En cada uno se tomó 30 ml de suspensión y se los transfirió a una cámara con agitación magnética, a 30 °C y se agregó 0,1 mM $CaCl_2$ a fin de estabilizar el electrodo de pH. El pH fue registrado continuamente por un electrodo conectado a un pHmetro PHM 62 (Radiometer, Copenague, Dinamarca). Luego se adicionó una concentración determinada de 2-DG (2, 5, 10, 15 y 20 mM) y se registraron los cambios de pH de la suspensión celular. La velocidad inicial de cambio de pH fue extrapolada gráficamente al tiempo de la adición del azúcar. La cantidad de protones incorporada por las células se calculó luego de hacer la corrección respecto a la capacidad amortiguadora de la suspensión de levaduras. Esta corrección se realizó agregando una cantidad conocida de HCl 10 mM.

Para medir la estequiometría H^+ /2-DG en cada ensayo se tomaron muestras de la suspensión celular a intervalos de tiempo durante las mediciones de pH. En estas muestras se midió la velocidad inicial de incorporación del azúcar.

Por el método de Eadie-Hofstee se determinó gráficamente la constante media de saturación (K_T) y la velocidad máxima (V_{max}) tanto para la incorporación de H^+ como para

la del azúcar. Los valores de $V_{\max}$ correspondientes fueron utilizados para el cálculo de la estequiometría del cotransporte H^+ /azúcar.

b) Dependencia de las velocidades iniciales de influjo de la 2-DG respecto al pH de la suspensión de células:

Se hicieron suspensiones al 5% (p/v) en agua destilada (ítem I de esta sección), de *D. hansenii* y HM92 crecidas en medio YEPD. Las suspensiones se dividieron en 5 partes se mezclaron con igual volumen de tampón fosfato de potasio 100 mM de un dado valor de pH entre 5 y 7. Así se obtuvieron, para cada cepa, 5 suspensiones de trabajo con diferentes valores de pH. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

Las suspensiones se colocaron en baño a 30 °C, con agitación. Los experimentos iniciaban cuando se agregaba el isótopo radiactivo 2-deoxi-D-[1- 3H]glucosa (Amersham). La concentración inicial de azúcar en la suspensión fue de 10 mM para HM92 y de 50 mM para *D. hansenii*. La incorporación de 2-DG se analizó en muestras de 1 ml que se tomaron cada 1 minuto durante los 4 minutos iniciales del ensayo. Se midió la radiactividad intracelular y se calculó la concentración intracelular de 2-DG de la misma manera que se explicó en el ítem I a.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I) Transporte de monosacáridos

a) Transporte de D-xilosa y 2-DG

En el estudio de transporte de monosacáridos se utilizaron tradicionalmente diversos azúcares no metabolizables como 2-deoxiglucosa, 6-deoxiglucosa, glucosamina y xilosa con el fin de establecer los requerimientos básicos para el transporte (Novak *et al.*, 1990; Cartwright *et al.*, 1989; Höfer & Künemund, 1984; Does & Bisson, 1990).

En *S. cerevisiae* la xilosa es transportada al interior de las células por los transportadores de glucosa, aunque con menor afinidad (Does & Bisson, 1990; van Zyl *et al.*, 1993; Prior & Kötter, 1997). Considerando además que la xilosa se metaboliza muy lentamente y es muy sencilla su medición y cuantificación se la eligió como sustrato para una primera caracterización del sistema de transporte de monosacáridos en las cepas en estudio.

En *S. cerevisiae* los monosacáridos son transportados al interior de las células por difusión facilitada por lo que no se acumulan intracelularmente (Lagunas, 1993). Lo mismo se observó aquí con respecto al transporte de xilosa. En la Figura 3.1a se observa que la concentración intracelular máxima del azúcar (en el estado de equilibrio) no igualó la concentración externa y el transporte no fue inhibido con el agregado de DNP.

Contrariamente, *D. hansenii* y HM92 (Figuras 3.1b y c respectivamente) acumularon xilosa intracelularmente. El nivel de acumulación que alcanzó el híbrido fue el doble que el de la cepa parental. Además, se observó que el transporte de la pentosa era dependiente del aporte de energía metabólica, pues el agregado del desacoplante 2, 4-dinitrofenol (DNP) a

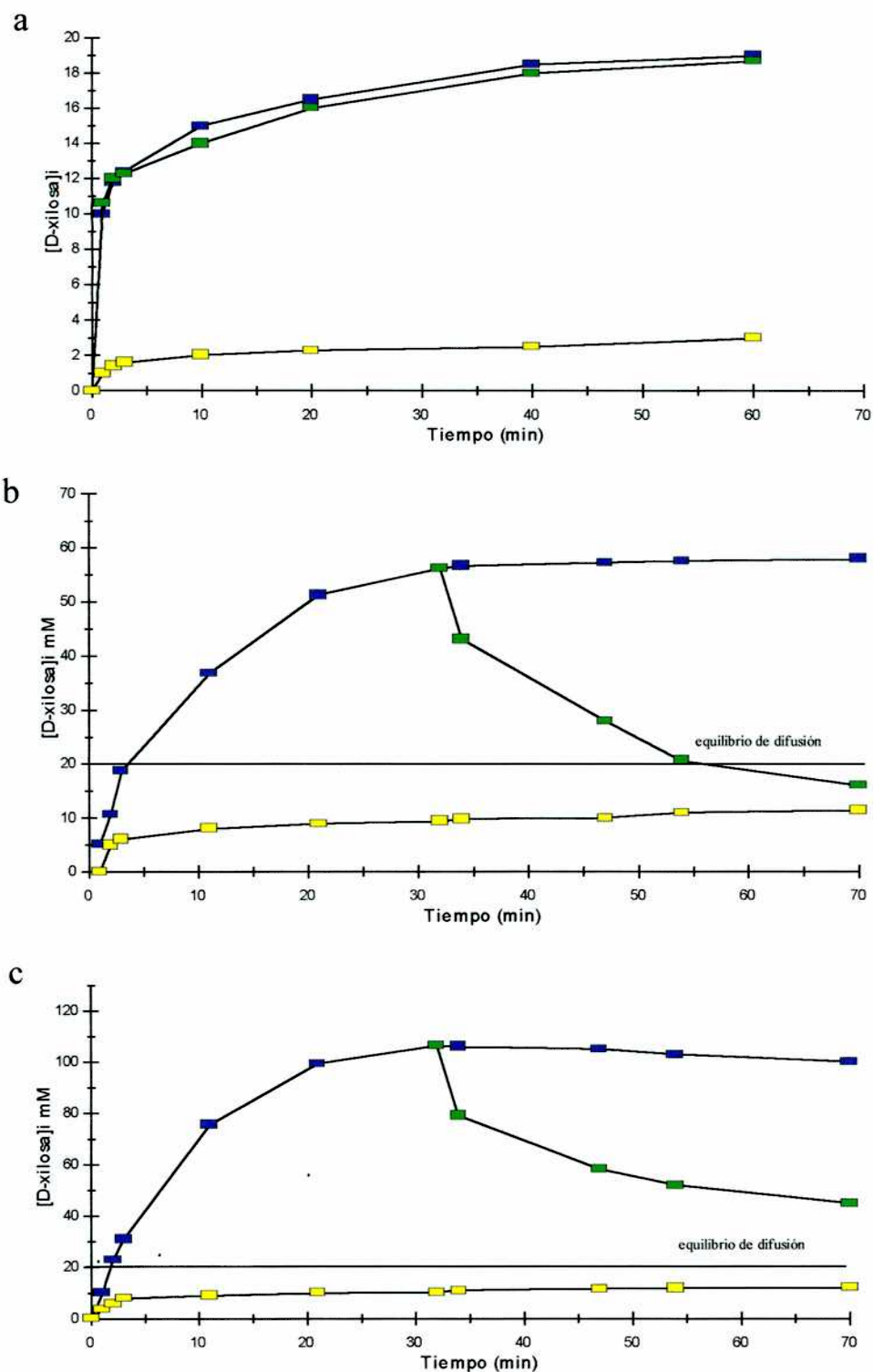


Figura 3.1: Transporte de D-xilosa en células de a) *S. cerevisiae*, b) *D. hansenii* y c) HM92, crecidas en YEPD. Efecto del agregado de 10 mM DNP (■) y de glucosa (■) sobre la captación de xilosa. Control (■).

las células que ya tenían xilosa acumulada intracelularmente, indujo una completa liberación de la pentosa al medio extracelular, reduciendo así el nivel del azúcar acumulado a valores inferiores al del equilibrio de difusión (Figuras 3.1b y c).

Para comprobar si el transporte de glucosa poseía, en estas cepas, las mismas características que el de xilosa, se repitió el mismo tipo de experimento, pero midiendo el transporte de 2-deoxi-D-glucosa (2-DG), análogo no metabolizable de la D-glucosa que, es además lentamente fosforilado (Foury *et al.*, 1977; Höfer & Nassar, 1987). Se utilizó 2-DG

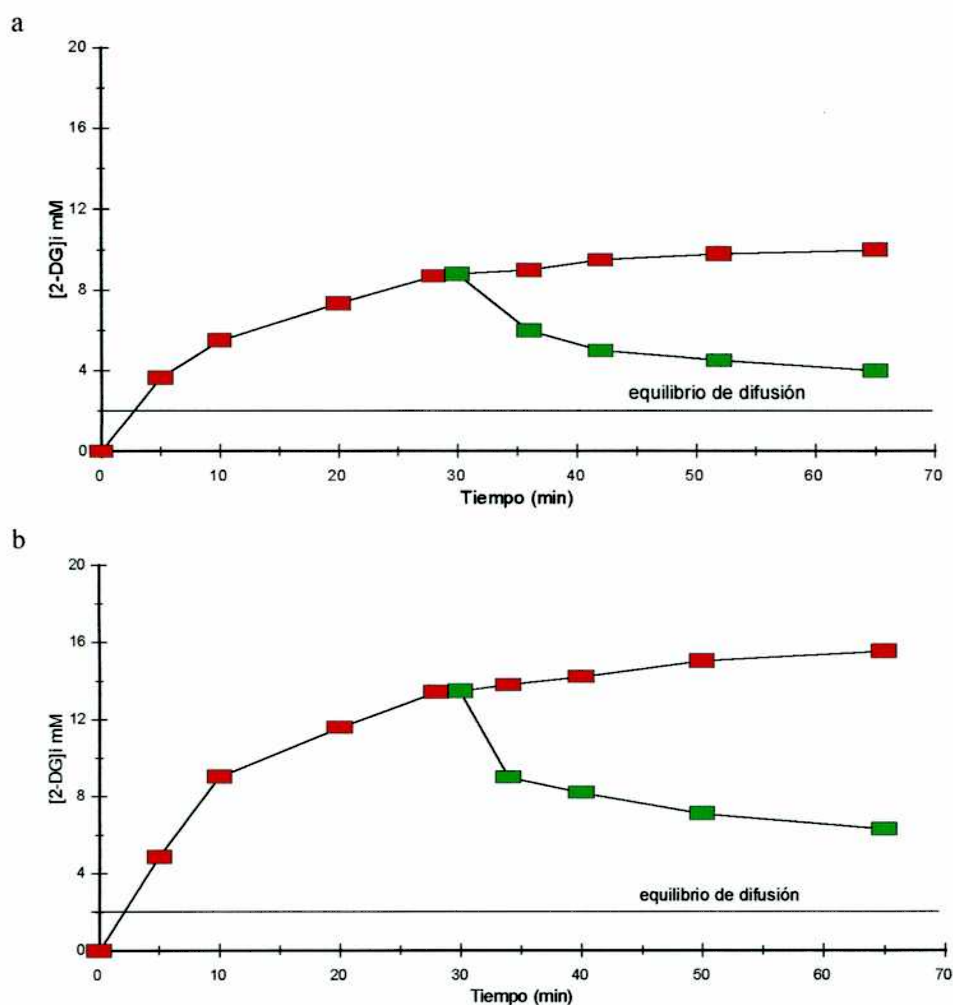


Figura 3.2: Transporte de 2-DG en células de a) *D. hansenii* y b) HM92, crecidas en YEPD. Efecto del agregado de 10 mM DNP (■) sobre la captación de 2-DG. Control (■).

debido a que la glucosa es rápidamente metabolizada, complicándose así la caracterización de su transporte. Se observó también, en ambas cepas, que el transporte de 2-DG fue acumulativo y que cuando se agregó DNP se indujo la liberación del azúcar al exterior celular. Se comprobó así, la dependencia del aporte de energía metabólica para la realización de dicho transporte (Figura 3.2a y b).

Cuando se estudió el transporte de xilosa comparándolo con distintas concentraciones iniciales (entre 5 y 200 mM), se observó que la mayor acumulación del azúcar se alcanzó con bajas concentraciones extracelulares pero disminuyó rápidamente con concentraciones crecientes de xilosa (Figura 3.3). Con concentraciones superiores a 100 mM de xilosa en *D. hansenii* y 200 mM en HM92 el sistema no fue capaz siquiera de equilibrar las concentraciones del azúcar a ambos lados de la membrana celular. La relación entre concentración interna y concentración externa del sustrato (S_i/S_e) es una medida de la eficiencia del sistema de transporte activo, la cual en sí misma está determinada por diferencias en la afinidad del transportador en cada lado de la membrana y su movilidad en cada dirección. Una característica de la mayoría de los sistemas de transporte activo es que esta relación no es constante, sino que disminuye con concentraciones externas crecientes del sustrato. El valor de la relación puede caer, aún por debajo del valor de unidad. El mecanismo de este fenómeno no es muy claro, pero posiblemente se deba a las complejas relaciones entre afinidades y movilidades del transportador en la región donde las concentraciones de soluto, a ambos lados de la membrana, están a niveles de saturación (Höfer, 1981). Kotik & Janáček (1975) propusieron, que podría tratarse de un mecanismo de autorregulación.

Cuando se agregó a las células glucosa y xilosa juntas (en concentraciones iguales) se produjo una completa inhibición del transporte de la pentosa. Este comportamiento fue observado en las tres cepas (Figura 3.1a, b, y c) y podría indicar que, en estas levaduras, los dos azúcares

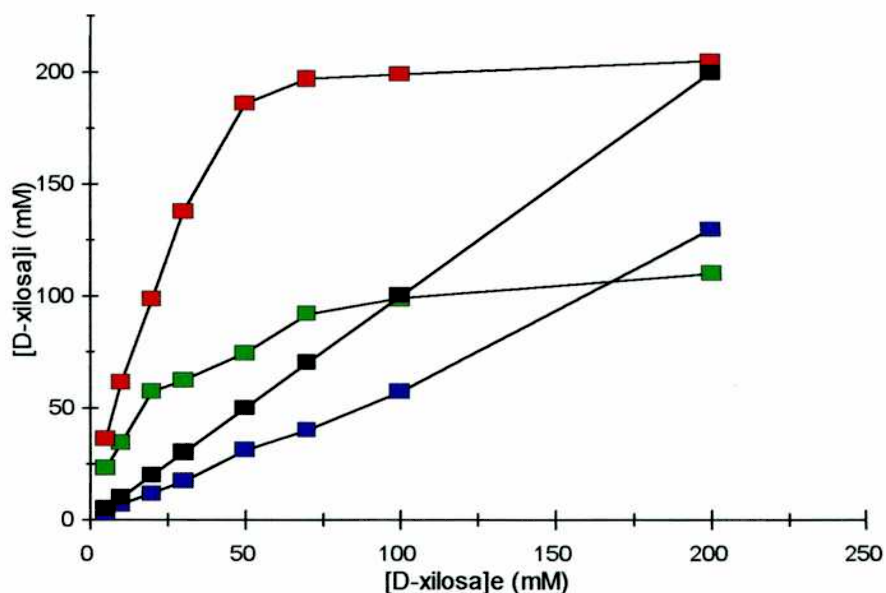


Figura 3.3: Acumulación intracelular máxima de D-xilosa en relación a la concentración externa de la pentosa. (■) *S. cerevisiae*; (■) *D. hansenii*; (■) HM92 ; (■) difusión.

compiten por el mismo transportador. Esto está demostrado en *S. cerevisiae* (Does & Bisson, 1990; van Zyl *et al.*, 1993; Prior & Kötter, 1997) pero no así en *D. hansenii* y, menos aún, en la cepa HM92. Por esta razón se realizaron estudios de transporte de intercambio entre estos monosacáridos durante la incorporación de D-xilosa. También se estudió el efecto de la pentosa y de la 2-DG sobre el consumo de D-glucosa:

b) Transporte de intercambio:

Es un fenómeno que se observa entre moléculas de dos substratos que son transportados, por el mismo transportador, a través de la membrana plasmática. La competencia que se establece entre los substratos por el transportador es afectada por la presencia del mismo en diferentes estados conformacionales y con distintas afinidades,

dependiendo del lado de la membrana en que se encuentre ubicado. En este proceso, moléculas de un sustrato, cuyo transporte estaba previamente en estado de equilibrio, son intercambiadas por las de otro. Un requerimiento necesario para que esto ocurra es que ambos sustratos sean transportados por el mismo transportador. El transporte de ambos

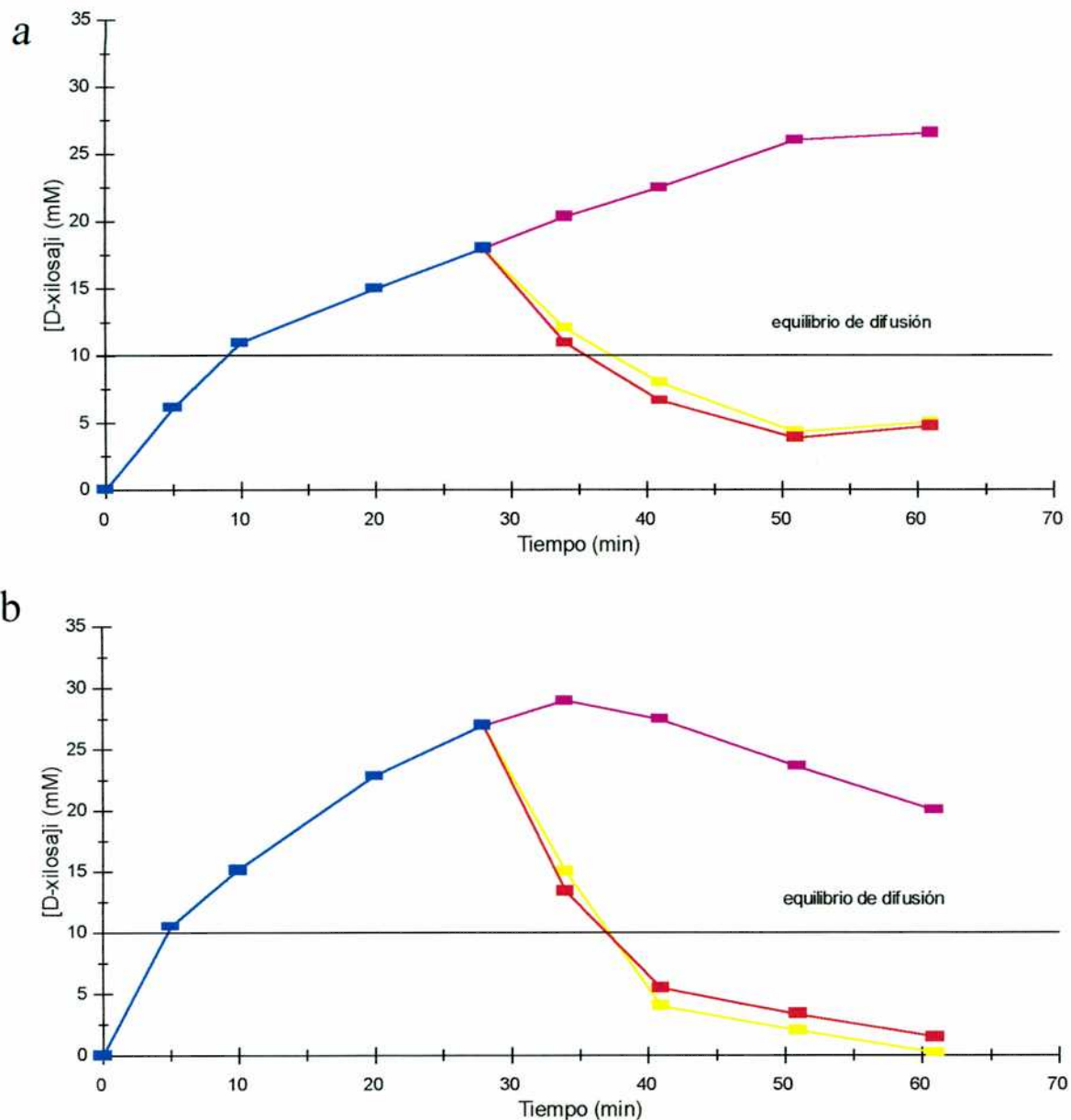


Figura 3.4: Transporte de intercambio entre xilosa, glucosa y 2-DG, en células de a) *D. hansenii* y b) HM92 con xilosa previamente acumulada en su interior. (■) Control; (■) agua; (■) D-glucosa; (■) 2-DG.

substratos, alcanza un nuevo estado de equilibrio en el cual la distribución de ellos es determinada por sus concentraciones relativas y sus afinidades en cada lado de la membrana, por el transportador.

Cuando se agregó D-glucosa o 2-DG en la suspensión de células de *D. hansenii* y de

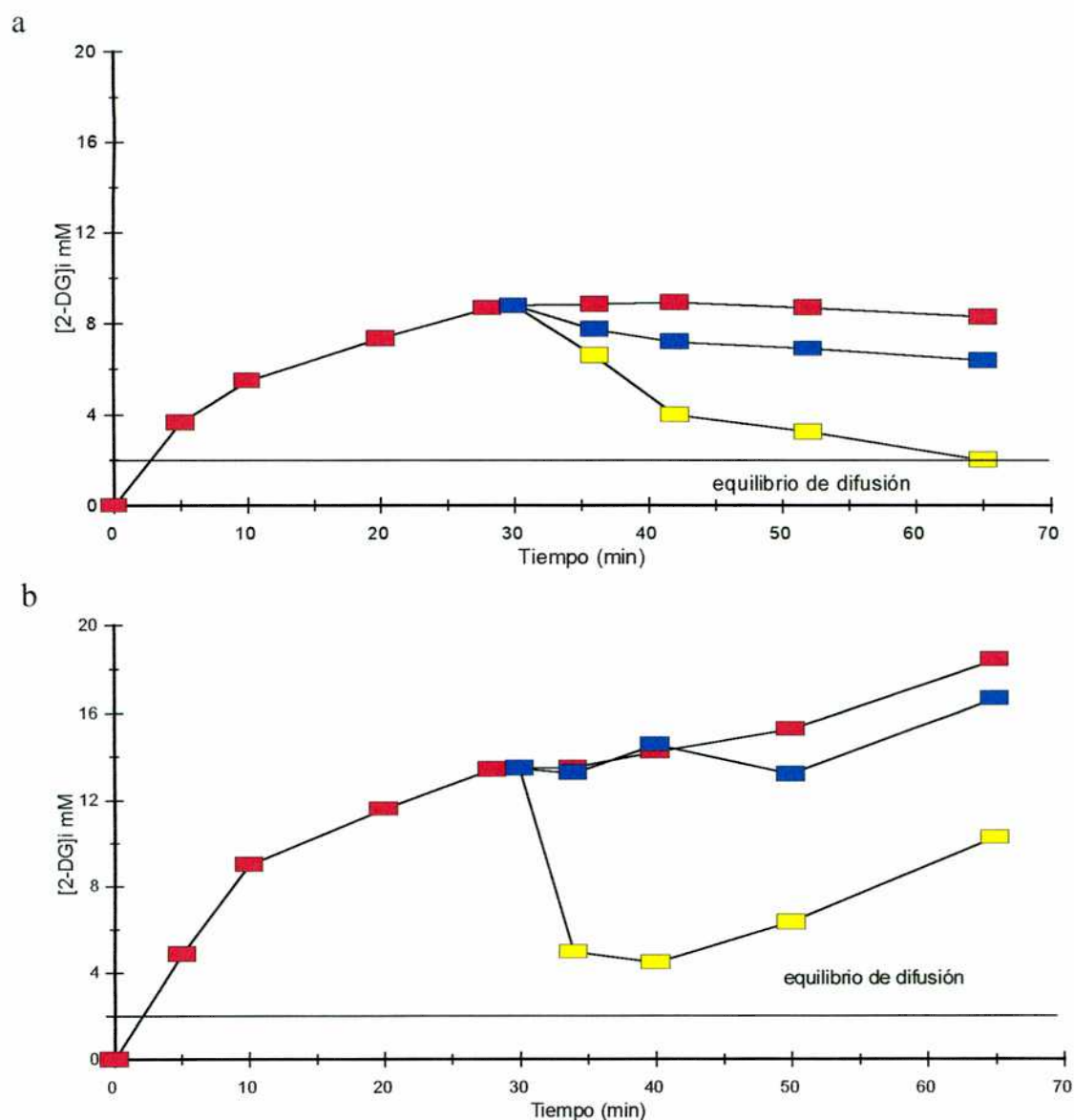


Figura 3.5: Transporte de intercambio entre xilosa, glucosa y 2-DG, en células de a) *D. hansenii* y b) HM92 con 2-DG previamente acumulada en su interior. (■) Control; (■) agregado de 10 mM D-glucosa; (■) agregado de 25 mM D-xilosa.

HM92 con D-xilosa previamente acumulada en su interior, liberaron la pentosa inmediatamente al medio extracelular (Figura 3.4a y b). Cuando el azúcar acumulado intracelularmente fue 2-DG y se agregó D-xilosa a la suspensión celular, no se produjo transporte de intercambio entre ambos azúcares. Sin embargo, la adición de D-glucosa a la suspensión celular sí indujo la liberación de 2-DG acumulado intracelularmente (Figura 3.5a y b).

c) Alteración del consumo de D-glucosa por la presencia de competidores:

El consumo de glucosa se estudió indirectamente, midiendo el remanente en el sobrenadante, luego de la centrifugación de las muestras. Para analizar directamente la competencia de xilosa y 2-DG durante el transporte de glucosa, al inicio del experimento se agregaron estos azúcares en exceso conjuntamente con la glucosa. Este ensayo se llevó a cabo con *S. cerevisiae*, *D. hansenii* y HM92 (Figura 3.6a, b y c). En *S. cerevisiae* y en HM92 el consumo de D-glucosa no fue afectado por el agregado de D-xilosa. En *D. hansenii*, se observó un cierto retardo en el consumo de la glucosa. Sin embargo en las tres cepas, la 2-DG exhibió una competición significativa con la D-glucosa por el sistema de transporte.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, se puede concluir que *D. hansenii* y HM92, poseen al menos dos sistemas de transporte de monosacáridos, uno que transporta tanto D-xilosa como D-glucosa y el otro específico para hexosas.

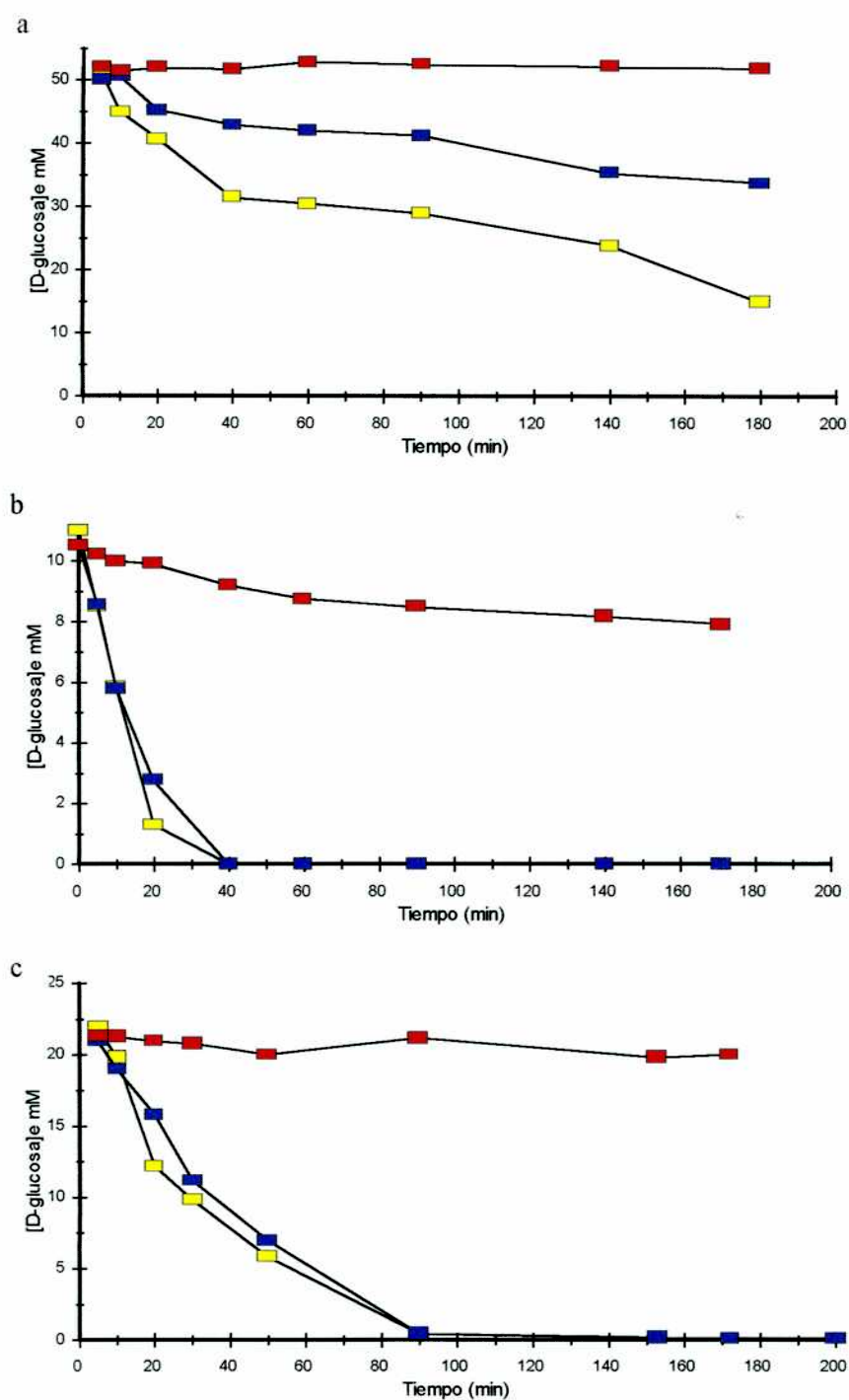


Figura 3.6: Alteración del consumo de D-glucosa por la presencia de competidores, en a) *D. hansenii*, b) HM92 y c) *S. cerevisiae*. (■) Control; (■) agregado de D-xilosa; (■) agregado de 2-DG.

El sistema de transporte responsable de que el híbrido HM92 acumule ambos azúcares en contra del gradiente de concentración provendría de la cepa parental *D. hansenii* (Figuras 3.4 y 3.5). Además como también acumuló D-xilosa y 2-DG, este sistema de transporte correspondería a uno de tipo no específico. Probablemente, las células de HM92 también posean el sistema de difusión facilitada para glucosa de *S. cerevisiae*, porque ambas cepas mostraron una similar falta de competición entre D-xilosa y D-glucosa (Figura 3.6 b y c).

Nobre *et al.* (1999) encontraron en células de *D. hansenii* crecidas con glucosa, que xilosa y glucosa compartían los mismos transportadores y que estos dos azúcares eran incorporados a las células por medio de difusión facilitada. En cambio, en células crecidas con xilosa concluyeron que los azúcares eran transportados activamente y por distintos transportadores dado la falta de inhibición mutua entre xilosa y glucosa. Los autores destacaron además que estos sistemas activos eran represibles por glucosa puesto que no se manifestaron en células crecidas con la hexosa. Contrariamente en esta tesis, se observó que la glucosa era transportada activamente en células crecidas a expensas de este azúcar. Sin embargo, al momento de comparar resultados debe considerarse una diferencia de metodología entre ambos trabajos: En éste presente las células fueron aireadas (ayunadas) durante aproximadamente 4 horas previo al inicio de cada ensayo, en cambio Nobre *et al.* aparentemente no realizaron este paso. Posiblemente durante el tiempo de ayunado ocurrió la inducción de los sistemas de transporte al quedar éstos libres de la represión por glucosa.

II) Cinética del transporte de D-xilosa y de D-glucosa

Se determinó la cinética del transporte de D-glucosa y D-xilosa por medición de la tasa de incorporación de los azúcares en un rango de concentración entre 5 y 200 mM, a 30 °C.

a) Cinética de D-xilosa:

Los valores de $V_{\max}$ obtenidos tanto para las dos cepas parentales como para la cepa híbrida fueron similares entre sí, sin embargo hubo diferencias significativas entre los valores de las constantes medias de saturación (K_T) (Tabla 3.1, Figura 3.7).

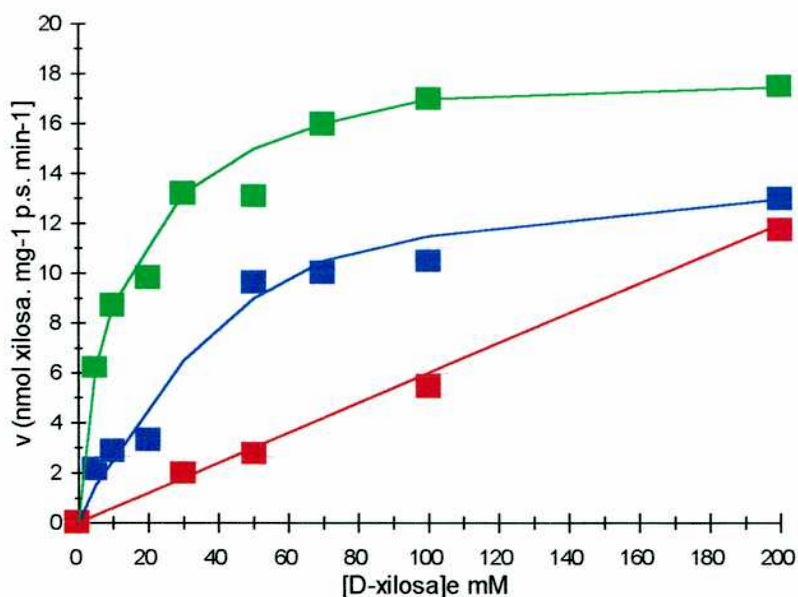


Figura 3.7: Variación de la $V_{\max}$ en el transporte de D-xilosa en función de la concentración externa de xilosa. (■) *D. hansenii*; (■) HM92; (■) *S. cerevisiae*.

Sorprendentemente, el valor más pequeño de K_T correspondió a HM92, lo que indica la

Tabla 3.1: Valores de K_T y $V_{\max}$ en el transporte de D-xilosa.

	K_T (mM)	$V_{\max}$ (nmol/mg p.s./min)
<i>S. cerevisiae</i>	168 ± 24	15 ± 1
<i>D. hansenii</i>	21 ± 3	10 ± 1
Híbrido HM92	10 ± 1	17 ± 2

existencia de un sistema de transporte para D-xilosa más eficiente que el de las cepas parentales.

b) Cinética de D-glucosa:

Se encontraron diferencias considerables entre las constantes medias de saturación (K_T) de las tres cepas (Figura 3.8a) durante la incorporación de D-glucosa. El valor de K_T de HM92 fue dos veces superior al K_T de *S. cerevisiae* y cuatro veces menor que el correspondiente a *D. hansenii*. Esto indicaría que la cepa híbrida posee un sistema de transporte de D-glucosa con una eficiencia intermedia comparado con el de las dos cepas parentales. Se observó también que el menor valor de V_{max} correspondió a HM92 (Figura 3.8b).

Comparando los valores de K_T obtenidos para glucosa y xilosa en las tres cepas se podría decir que en *S. cerevisiae* el sistema de transporte, compartido por ambos azúcares, fue mucho más eficiente cuando transportó xilosa. Sin embargo, *D. hansenii* y HM92 mostraron valores de K_T muy similares para los dos azúcares.

Otra observación interesante fue que, en las tres cepas, el transporte de D-glucosa mostró una cinética de tipo bifásica, con un componente de afinidad alta y uno de baja. Este tipo de cinética ha sido descripta y discutida ampliamente para el transporte de hexosas en *S. cerevisiae* (Bisson & Fraenkel, 1983 y 1984; Does & Bisson, 1989). Walsh *et al.* (1994) concluyeron que el sistema de incorporación de glucosa en *S. cerevisiae* estaba compuesto por diversas proteínas transportadoras que se expresaban en forma constitutiva pero que podían cambiar de una forma de afinidad alta a otra de baja. El cambio de afinidad del

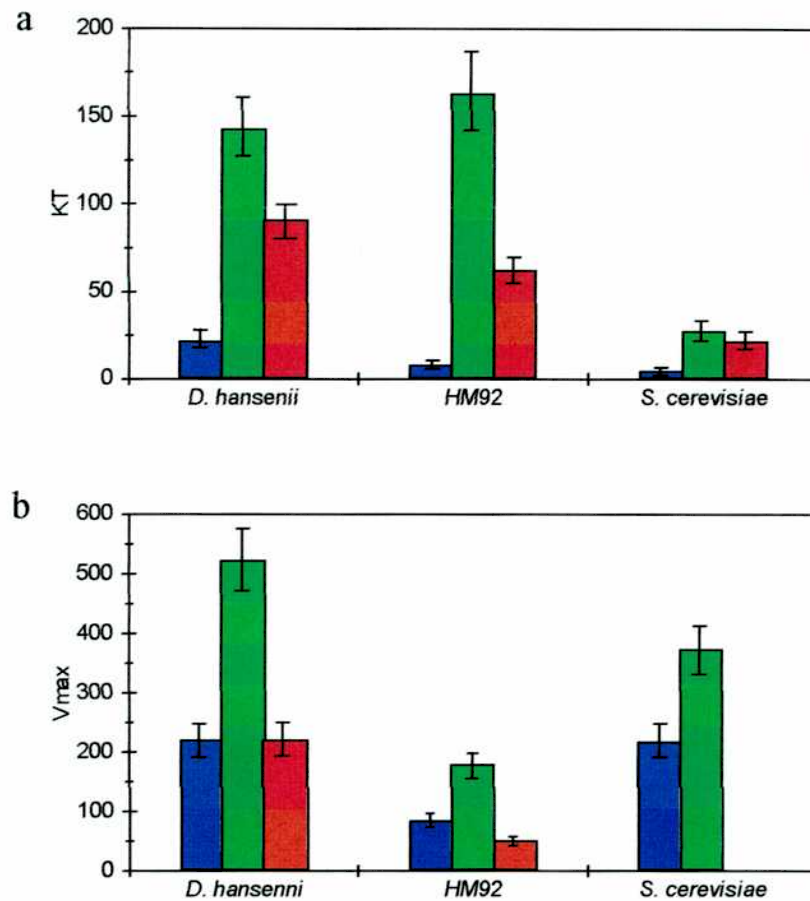


Figura 3.8: Efecto del NaCl sobre la cinética de D-glucosa en *D. hansenii*, *S. cerevisiae* y HM92. a) Variación de los valores de la constante media de saturación, K_T , b) Variación de los valores de la velocidad máxima de transporte, V_{max} . (■) Captación de glucosa en medio sin NaCl por células crecidas en medio basal YEPD; (■) Captación de glucosa en medio con NaCl por células crecidas en medio basal YEPD; (■) Captación de glucosa en presencia de la misma concentración de NaCl que en el medio de crecimiento de las células. En todos los casos la concentración de NaCl utilizada fue 1,4 M para *S. cerevisiae* y 2 M para *D. hansenii* y HM92.

transportador ocurría en respuesta directa a los cambios de concentración externa de glucosa o indirectamente, a través de segundos mensajeros e implicando la unión de un efector.

En los últimos años se han aislado una multitud de genes de proteínas transportadoras de hexosas, genes HXT (Ciriacy & Reinfenberger, 1997). Estas proteínas tienen diferentes

afinidades y pueden expresarse potencialmente en forma simultánea. La expresión de los genes HXT es regulada de diferentes y aún no bien conocidos modos, por la concentración externa de glucosa

Las dos pendientes observadas en el estudio de la cinética del transporte de glucosa serían entonces, las resultantes de la expresión de varias proteínas transportadoras con distintas afinidades por glucosa, en condiciones fisiológicas determinadas.

III) Efecto del NaCl sobre el transporte de monosacáridos

Los estudios descriptos anteriormente fueron llevados a cabo en ausencia de estrés osmótico. Los ensayos siguientes se realizaron con agregado de NaCl para analizar el efecto de la sal sobre el transporte de monosacáridos.

a) Cinética del transporte de D-glucosa en condiciones de estrés de sal:

Se estudió la cinética del transporte de D-glucosa en presencia de NaCl en las tres cepas. Para las halotolerantes se usó concentraciones entre 1,5 a 2,6 M NaCl. Para *S. cerevisiae* se usó la máxima concentración de NaCl tolerada durante el crecimiento (1,4 M NaCl). Para estudiar el transporte de D-glucosa en condiciones de estrés salino se comparó la respuesta de células adaptadas durante el crecimiento a determinada concentración salina y de células no adaptadas y sometidas a un shock osmótico durante el experimento de incorporación del azúcar (Figura 3.8).

El valor de K_T (Figura 3.8a) en las tres cepas fue más alto en presencia de sal. Esta diferencia fue mayor en células no adaptadas a alta concentración de sal durante el

crecimiento. Además, en células adaptadas, el valor de K_T se incrementó conforme al aumento de concentración de NaCl durante el experimento de incorporación del azúcar (1,5; 2 y 2,6 M NaCl). El valor de V_{max} más alto (Figura 3.8b) correspondió a las células no adaptadas y expuestas a alta concentración de NaCl.

b) Transporte de D-xilosa, glucosa y 2-DG en presencia de elevada concentración de NaCl:

Cuando se agregó 2 M NaCl a células de las levaduras halotolerantes, *D. hansenii* y HM92, crecidas en medio basal (YEPD), el transporte de D-xilosa fue inmediatamente interrumpido. (Figura 3.9a y b). Cuando se agregó NaCl a células que ya estaban incorporando xilosa (aproximadamente a los 30 minutos de iniciado el experimento), la pentosa fluyó rápidamente fuera de las células hasta alcanzar valores de concentración intracelular por debajo del de equilibrio de difusión. El mismo comportamiento se observó en *S. cerevisiae* (Figura 3.9c). Con el objeto de analizar si en células adaptadas a alta concentración de sal el transporte de xilosa se veía afectado, se repitió el mismo experimento pero utilizando células de *D. hansenii* y HM92 crecidas en medio hiperosmótico (YEPD + 2 M NaCl). Se mantuvo la misma concentración salina durante los procesos de lavado, aireación, suspensiones en el amortiguador de trabajo y durante el ensayo de transporte. Aún en estas células adaptadas al estrés osmótico el transporte de D-xilosa se vio inhibido (Figura 3.10a y b). Sin embargo, durante el experimento cuando la suspensión celular fue lavada dos veces con agua destilada con el objeto de eliminar la sal presente, el transporte de D-xilosa se inició inmediatamente (Figura 3.10a y b).

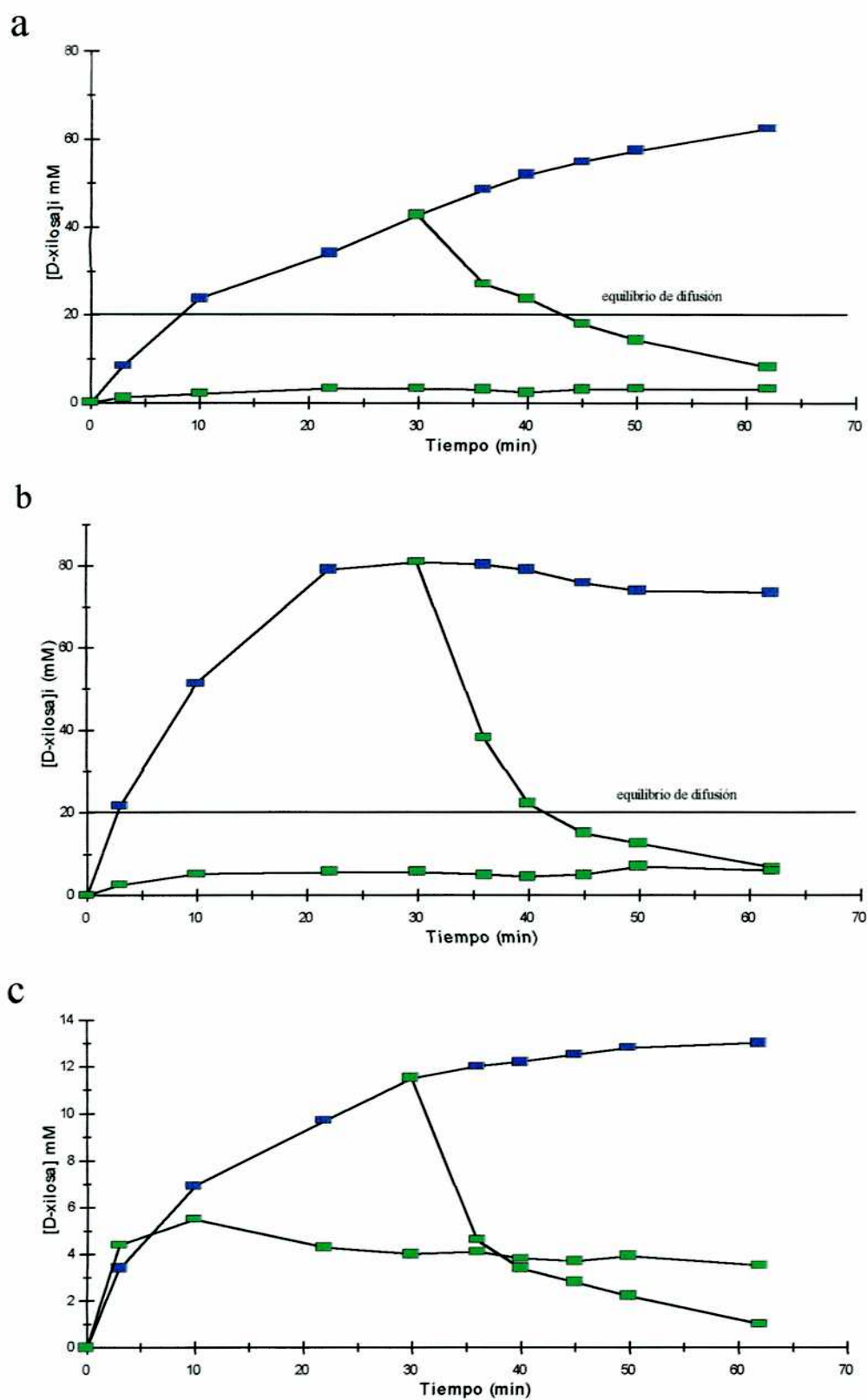


Figura 3.9: Efecto del NaCl sobre el transporte de D-xilosa en células crecidas en YEPD. a) *D. hansenii*, b) HM92 y c) *S. cerevisiae*. (■) Control; (■) NaCl agregado al inicio o a los 30 minutos.

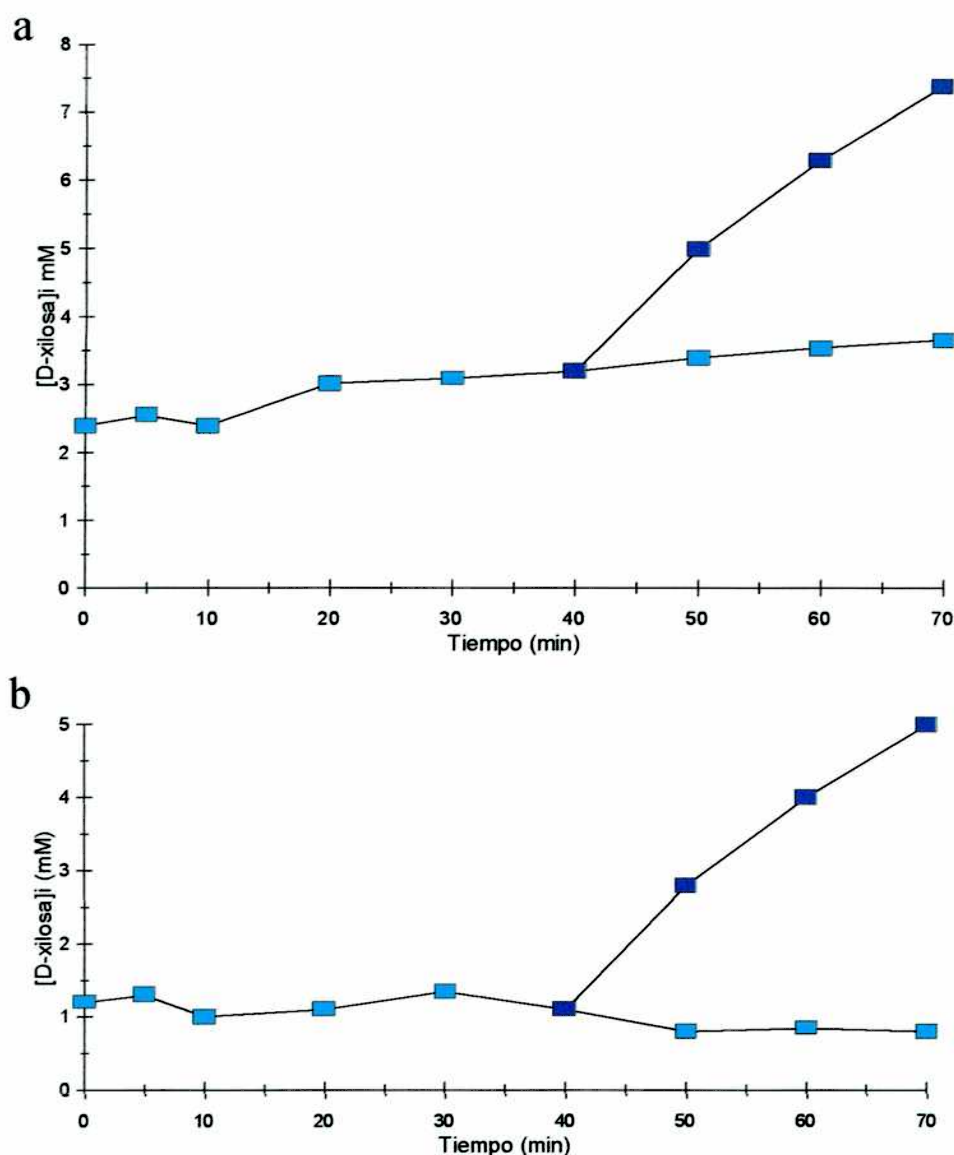


Figura 3.10: Efecto del NaCl sobre el transporte de D-xilosa en células crecidas en YEPD con 2M NaCl (células adaptadas). a) *D. hansenii* y b) HM92. (■) Control (células adaptadas en presencia de 2M NaCl); (■) células lavadas.

Luego se analizó en las cepas halotolerantes el efecto del NaCl sobre el transporte de glucosa y su análogo, 2-DG. Se repitió el mismo experimento realizado con xilosa pero reemplazando la pentosa por la 2-DG (Figura 3.11). Se observó que el agregado de la sal (2 M NaCl) a células libres de estrés que estaban incorporando 2-DG, produjo también la

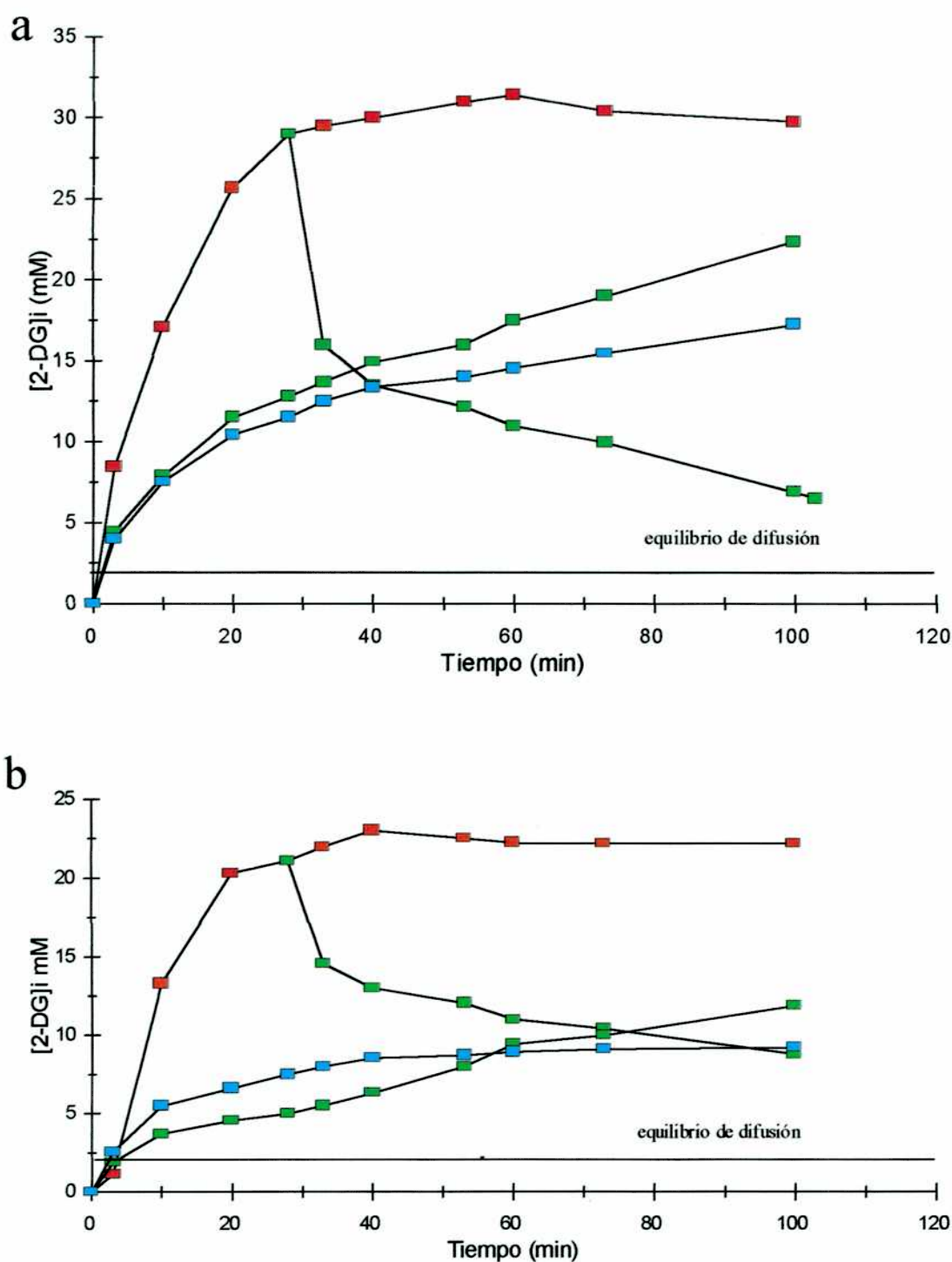


Figura 3.11: Efecto del NaCl en el transporte de 2-DG en células de a) *D. hansenii* y b) HM92 crecidas en YEPD (células no adaptadas) o en YEPD con 2M NaCl (células adaptadas). (■) Control (células no adaptadas y en ausencia de NaCl); (■) 2M NaCl agregado al inicio o a los 30 minutos (células no adaptadas); (■) células adaptadas, en presencia de 2M NaCl.

inmediata liberación del azúcar al exterior celular (Figura 3.11a y b). El agregado de sal al tiempo cero determinó una disminución en la velocidad del transporte, pero éste, aunque más lento, se llevó a cabo. Cuando el experimento se realizó a partir de células adaptadas a alta concentración de sal, el comportamiento fue similar, hubo un retardo en el transporte de 2-DG pero no una inhibición absoluta como en el caso del transporte de xilosa (Figura 3.11a y b). Al medirse, el consumo de D-glucosa (por el método indirecto, o sea en el sobrenadante) se observó una vez más, que bajo condiciones de estrés osmótico el sistema de transporte y toma del azúcar sufre un cierto grado de inhibición (Figura 3.12a y b). Sin embargo, tanto en células no adaptadas como en adaptadas de *D. hansenii* y de HM92, la glucosa fue tomada por las células, aunque más lentamente, para ser finalmente consumida en forma completa aún en presencia de alta concentración de NaCl (Figura 3.12 y 3.13).

Con el fin de distinguir entre el efecto inhibitorio sobre el transporte de azúcares del NaCl y el efecto osmótico en sí, el NaCl fue reemplazado por benceno sulfonato de sodio o por cloruro de colina. La porción aromática de la molécula de cada uno de estos compuestos no atraviesa la membrana celular pero sí lo hacen los iones Na^+ y Cl^- respectivamente. De esta manera, se puede analizar el efecto de los iones sodio y cloruro por separado, lo que no es posible realizar utilizando NaCl donde ambos iones están presentes. Las sales se agregaron en cantidad tal de obtener una concentración final de 2M para cada ion, es decir, igual a la de NaCl en los experimentos anteriores. Se estudió el consumo de glucosa en presencia de estas dos sales en *D. hansenii* y HM92, crecidas en medio basal YEPD. Antes

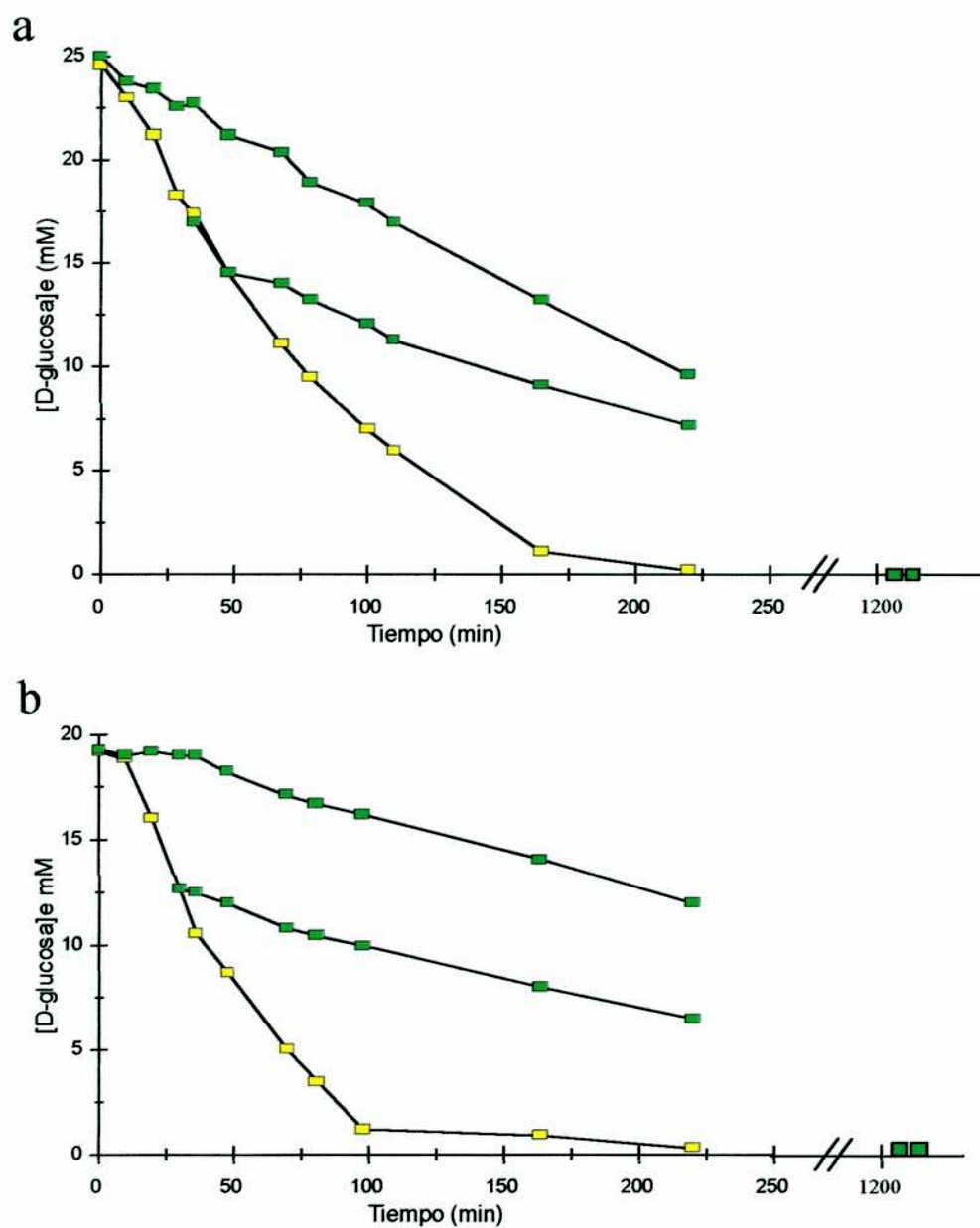


Figura 3.12: Efecto de 2M NaCl en el transporte de D-glucosa en células crecidas en YEPD de a) *D. hansenii* y b) HM92. (■) Control (células no adaptadas y en ausencia de NaCl); (■) 2M NaCl agregado al inicio o a los 30 minutos.

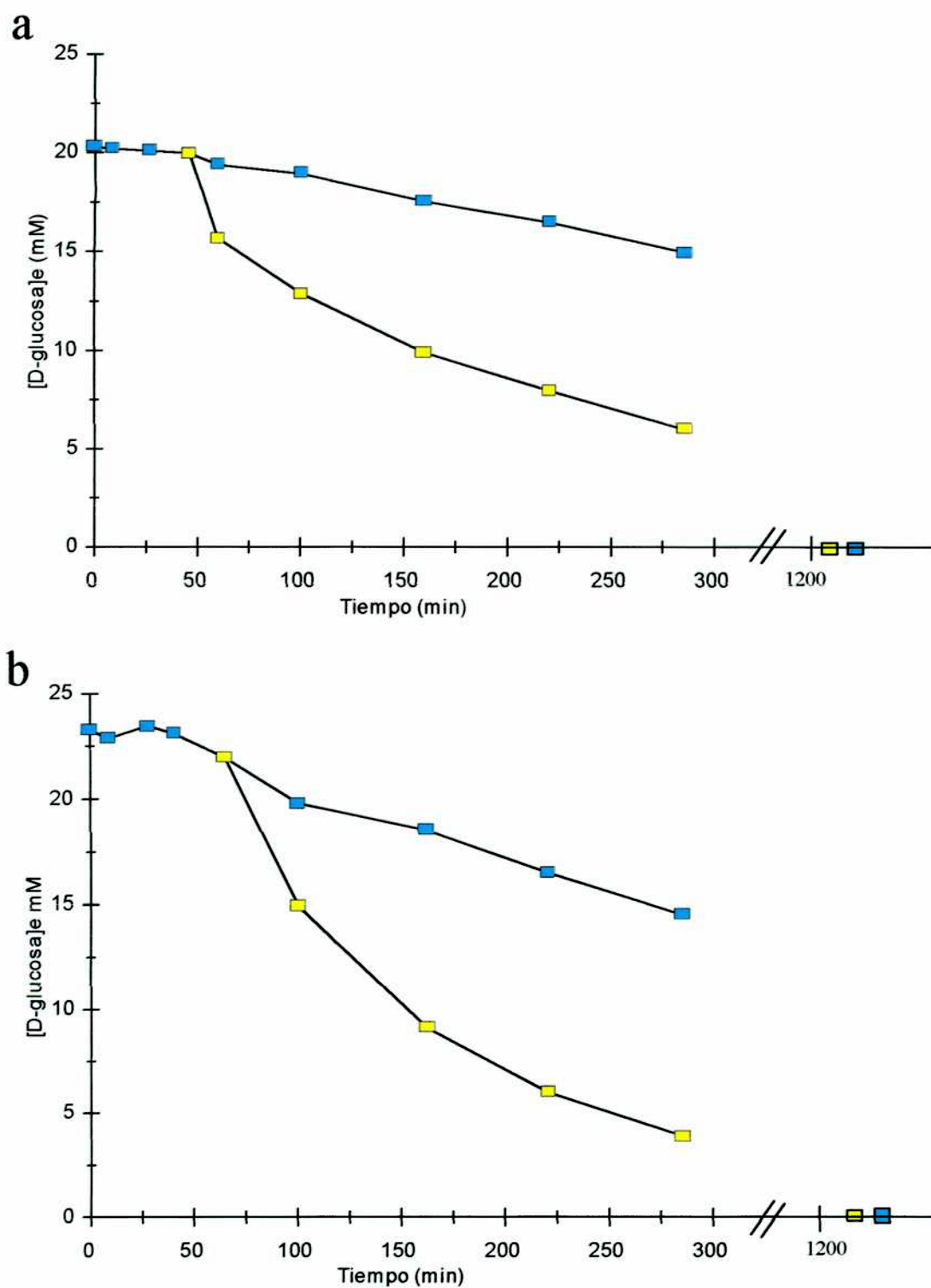


Figura 3.13: Efecto del NaCl sobre el consumo de D-glucosa en células de a) *D. hansenii* y b) HM92, crecidas con 2M NaCl (células adaptadas). (■) Control (células adaptadas, en presencia de 2M NaCl); (■) células lavadas.

de comenzar el ensayo las células se resuspendieron en solución acuosa y se airearon tres horas. Como control, se analizó nuevamente el consumo de glucosa en presencia de 2M NaCl y en ausencia de cualquiera de las tres sales mencionadas (Figura 3.14). Los resultados mostraron que el ion Na^+ fue el principal ion responsable de la inhibición del transporte de glucosa ya que en su presencia el consumo de la hexosa sufrió una inhibición semejante a la

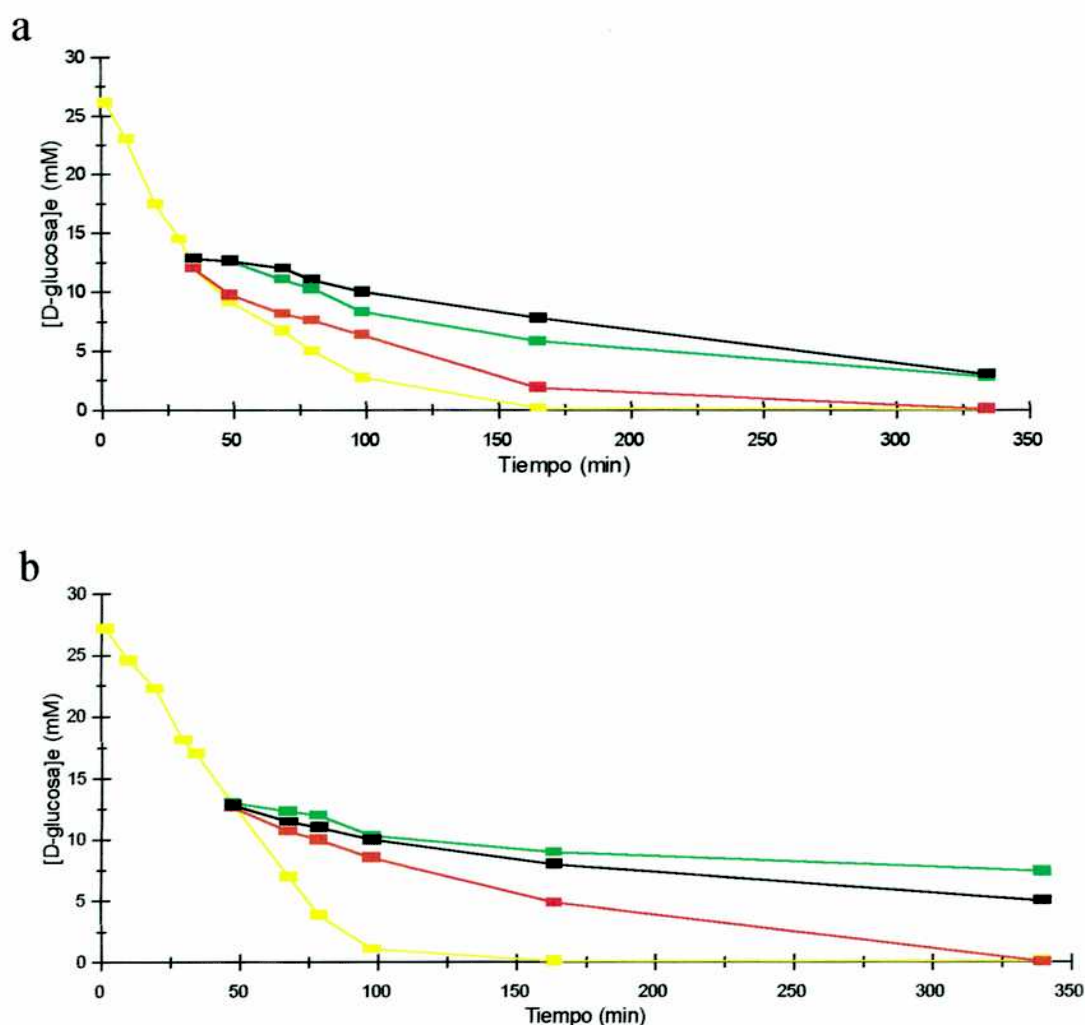


Figura 3.14: Efecto de los iones Na^+ y Cl^- en la captación de glucosa en células crecidas en YEPD de a) *D. hansenii*; b) HM92. (■) Control; (■) agregado de Na^+ , (■) Cl^- o (■) NaCl .

observada cuando se agregó NaCl, siendo más leve el efecto inhibitorio del ion Cl^- (Figura 3.14a y b). Se podría explicar este resultado considerando que el ion sodio es un catión y un aumento de su concentración intracelular tiende a despolarizar a la membrana plasmática, que normalmente está cargada negativamente por dentro y positivamente por fuera, alterando en consecuencia el potencial de membrana ($\Delta\psi$). Si el potencial de membrana tuviera

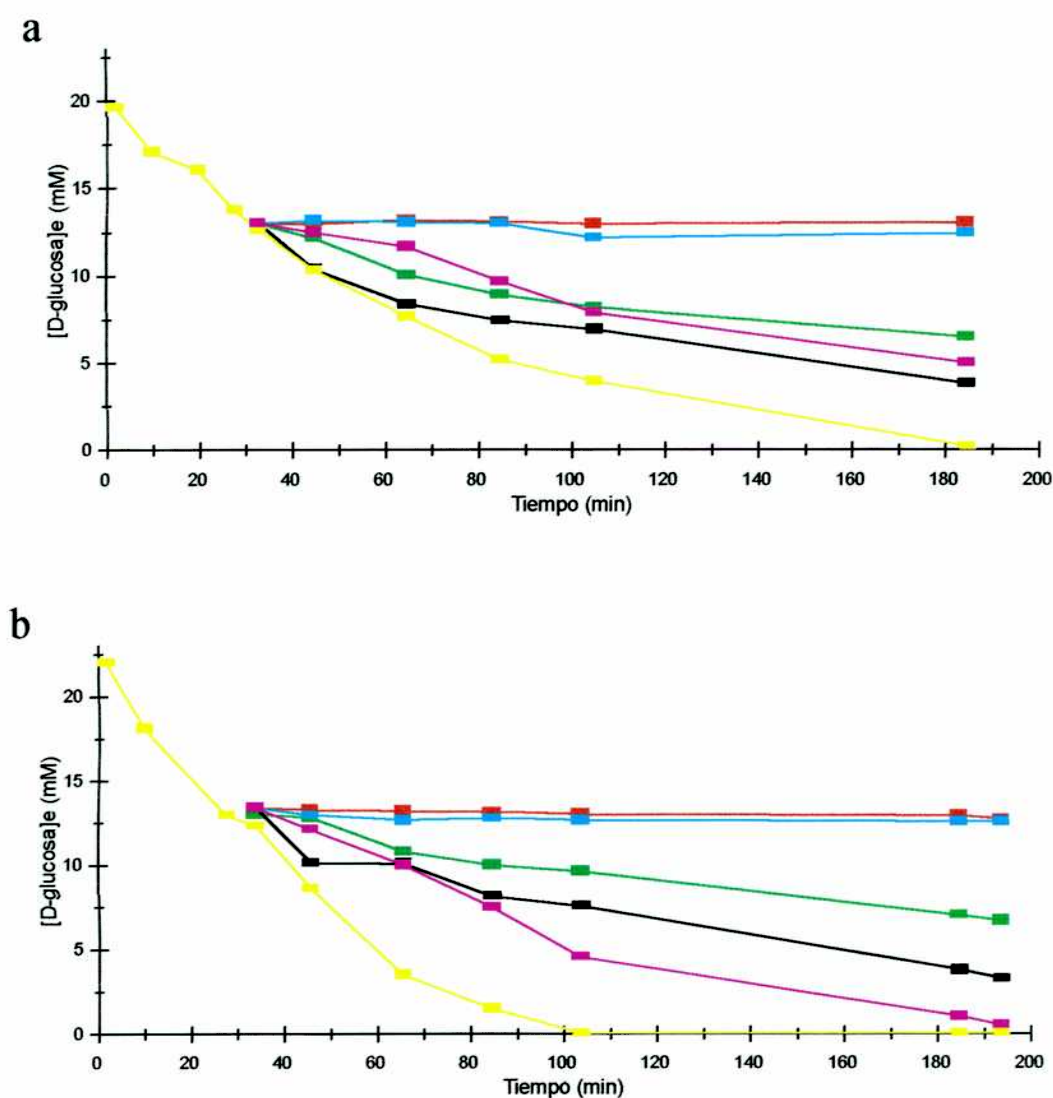


Figura 3.15: Efecto de diferentes cloruros en la captación de glucosa en células crecidas en YEPD de a) *D. hansenii*; b) HM92. (■) Control; (■) NaCl; (■) CaCl₂; (■) KCl; (■) MgCl₂; (■) LiCl.

participación en la energización del transporte de azúcares en estas dos levaduras, sería lógico que su alteración afectara en alguna medida dichos sistemas de transporte. Al investigar el efecto de otros cationes sobre el transporte de glucosa en ambas cepas halotolerantes, se encontró que los cationes bivalentes Ca^{++} y Mg^{++} fueron los más eficientes inhibidores de dicho sistema de transporte seguidos por Na^+ , Li^+ y K^+ (Figura 3.15).

Se ha demostrado que el catión lipofílico **Tetrafenilfosfonio** (TPP^+) despolariza las membranas plasmáticas celulares cuando es agregado en concentraciones milimolares (Hauer & Höfer, 1978; Prasad & Höfer, 1986). Suspensiones celulares de *D. hansenii* y HM92 fueron puestas en presencia de 30 mM de TPP^+ . Se estudió el transporte de D-xilosa y 2-DG bajo estas condiciones (Figura 3.16 y 3.17 respectivamente). La concentración de TPP^+ utilizada inhibió la acumulación de ambos azúcares. Cuando se agregó TPP^+ a células con 2-DG acumulada intracelularmente, se produjo la liberación del azúcar acumulado al exterior celular (Figura 3.16 y 3.17). Höfer & Nassar (1987) observaron en *Schizosaccharomyces pombe* que el efecto del TPP^+ es aún más pronunciado a pH 6,0 provocando una completa inhibición de la acumulación del azúcar o su total liberación de las células que lo tenían acumulado en su interior. A pH 4,5, como se usó en este trabajo, el efecto del TPP^+ sobre la acumulación de 2-DG fue más leve pues a ese valor de pH es donde el gradiente electroquímico del protón consiste principalmente del ΔpH (Höfer *et al.*, 1985). A $\text{pH} \leq 4,5$ se incrementa la difusión de H^+ hacia adentro de las células conforme aumenta el gradiente de pH a través de la membrana (Höfer & Künemund, 1984).

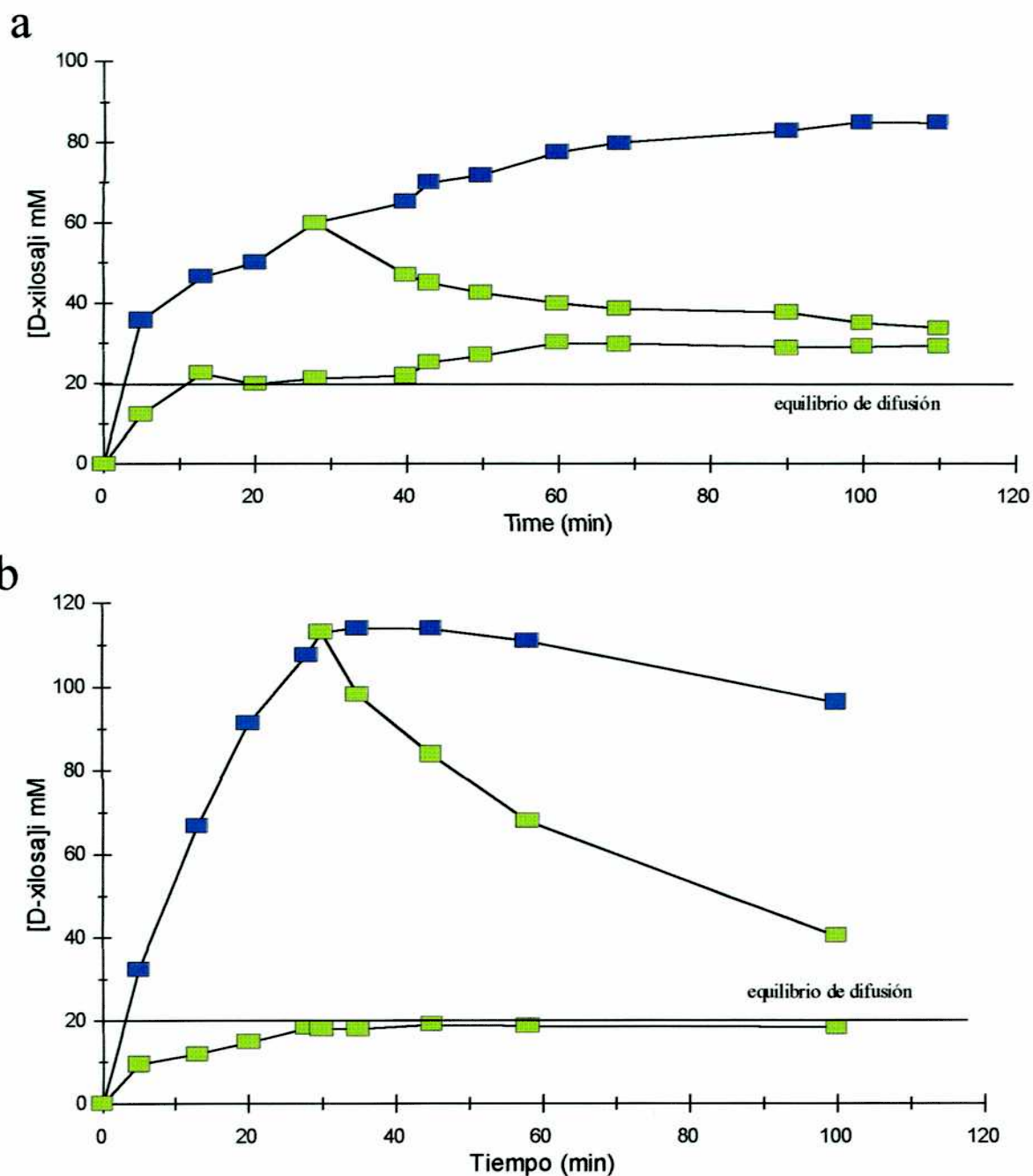


Figura 3.16: Efecto del TPP⁺ en el transporte de D-xilosa en células crecidas en medio basal YEPD. a) *D. hansenii* ; b) HM92. El TPP⁺ (■) fue agregado al inicio junto con la glucosa o a los 30 minutos de agregada la misma. Control sin agregado de TPP⁺ (■).

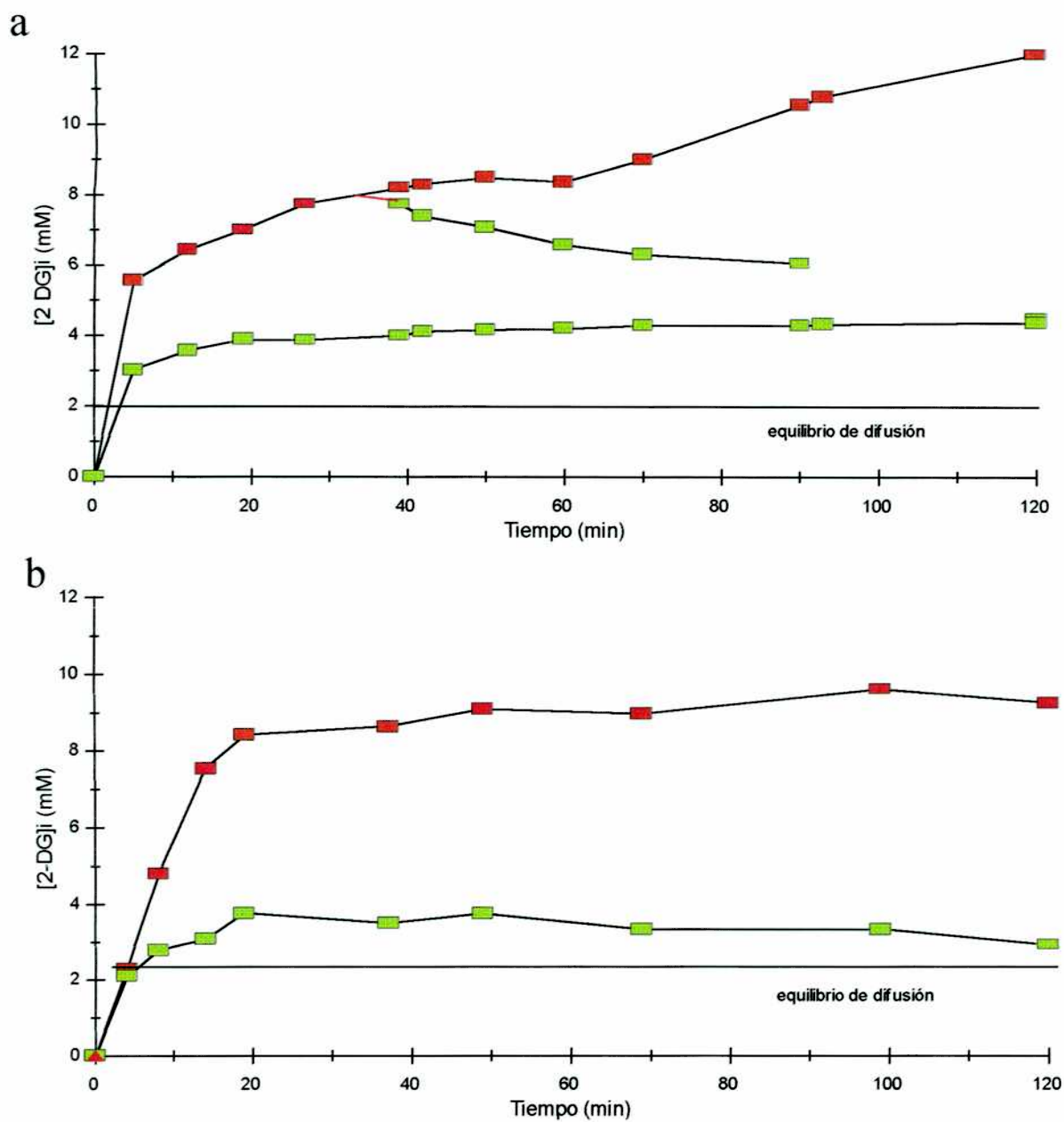


Figura 3.17: Efecto del TPP⁺ en el transporte de 2-DG en células crecidas en medio basal YEPD. a) *D. hansenii* ; b) HM92. El TPP⁺ (■) fue agregado al inicio junto con la 2-DG (tiempo 0) o a los 30 minutos de agregada la misma. Control sin agregado de TPP⁺ (■).

La inhibición de la acumulación de azúcares por efecto del TPP⁺ es una evidencia de la participación del potencial de membrana en la energización del transporte de azúcares en las dos cepas estudiadas.

La inhibición del consumo de glucosa provocada por cationes también concuerda con la conclusión anterior, puesto que altas concentraciones de cationes también despolarizan la membrana plasmática de levaduras.

c) Consumo de oxígeno en células ayunadas de *D. hansenii* y HM92 en presencia y ausencia de NaCl

La energía utilizada por el transporte activo es extremadamente difícil de medir pues las células requieren, al mismo tiempo, energía para otros procesos metabólicos. El método más aceptado consiste en determinar el consumo adicional de oxígeno durante el desarrollo del transporte de solutos (Höfer, 1981). Las suspensiones celulares son previamente aireadas para permitir el equilibrio del oxígeno disuelto a la temperatura de trabajo. Luego, con un electrodo de oxígeno, se registra en forma continua el consumo de oxígeno (o respiración) basal, es decir, antes del agregado del azúcar. Finalmente, se registran las pendientes de consumo de oxígeno al adicionar el azúcar y se corrigen con respecto a los valores de respiración basal obtenidos con antelación.

El objetivo de este estudio fue analizar:

Si las células al cabo de las 3 o 4 horas de aireación y en ausencia de fuente de carbono sufrían alguna deficiencia energética que pudiera alterar, en grado significativo, el posterior transporte de solutos.

- Si en presencia de altas concentraciones de NaCl las células exigían algún cambio de balance energético durante el proceso de osmorregulación.

El ensayo se realizó con *D. hansenii* y HM92, a partir de cultivos en medio basal YEPD y en medio con NaCl. Las células se lavaron dos veces con agua destilada o con agua destilada más la correspondiente concentración de NaCl, es decir, que se efectuaron lavados en condiciones isotónicas respecto al medio de crecimiento. Las suspensiones se airearon 4 horas tiempo en el cual se midió la velocidad de consumo específico de oxígeno (c.e.o.).

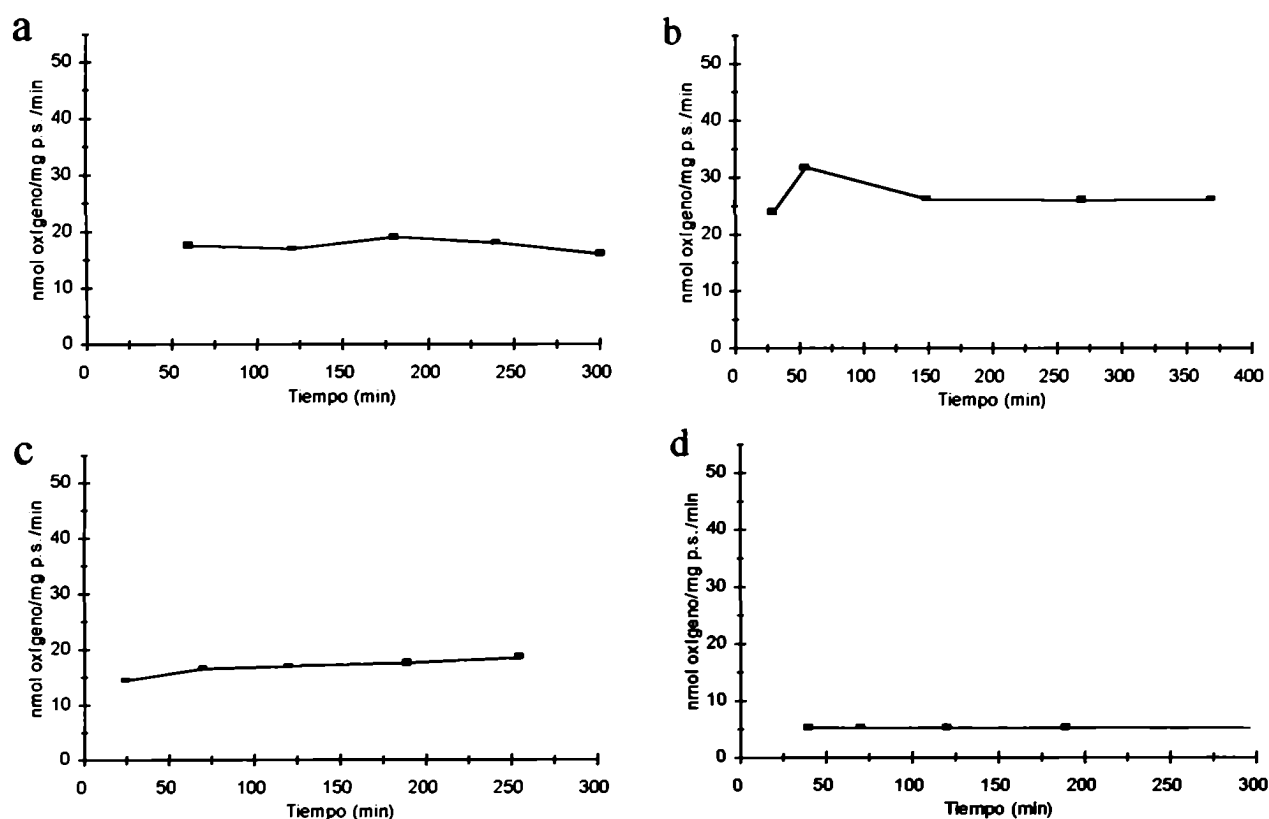


Figura 3.18: Velocidad de consumo específico de oxígeno (c.e.o.) en células crecidas en YEPD sin NaCl. *D. hansenii* (a y c); HM92 (b y d). Sin agregado de NaCl al tampón de trabajo (a y b); Agregado de 2 M NaCl al amortiguador de trabajo (c y d). (■) Consumo de oxígeno basal; () consumo de oxígeno luego del agregado de glucosa.

De acuerdo con los resultados obtenidos tanto para *D. hansenii* como para HM92, la velocidad de c.e.o basal y luego del agregado de glucosa se mantuvo prácticamente constante durante las cuatro horas de aireación y ayunado (Figura 3.18). Esto se observó tanto en células adaptadas a alta concentración de sal (Figura 3.19) como en células no expuestas a estrés osmótico durante el crecimiento (Figuras 3.18). Se puede concluir que las células no sufrieron un debilitamiento energético significativo durante el período previo al inicio de los experimentos de transporte de solutos.

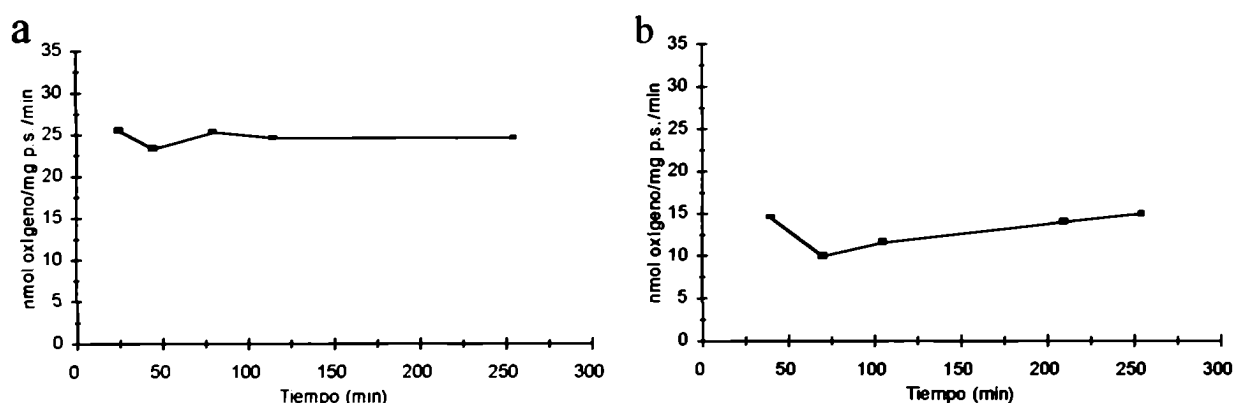


Figura 3.19: Velocidad de consumo específico de oxígeno (c.e.o.) en células crecidas en YEPD +2 M NaCl. a) *D. hansenii*; b) HM92. (■) Consumo de oxígeno basal; (○) consumo de oxígeno luego del agregado de glucosa.

Como la velocidad de c.e.o se mantuvo constante durante el período de tiempo estudiado, se calculó el promedio de las mediciones realizadas. Luego se comparó los valores promedio obtenidos en diferentes condiciones de estrés osmótico. En ausencia de sal se observó que los valores de la velocidad de c.e.o en presencia de glucosa fueron muy similares para células no adaptadas osmóticamente de *D. hansenii* y HM92 (22,4 y 21,6 nmol O₂/mg p.s./min respectivamente, Figura 3.20a y b). También para ambas levaduras se observó que en células

no adaptadas a altas concentraciones de sal durante el crecimiento, el c.e.o en presencia de glucosa (Figura 3.20a y b) disminuyó conforme aumentó la concentración de NaCl en el amortiguador de trabajo. Por otra parte, cabe destacar que en células adaptadas (crecidas en 2 M de NaCl) el c.e.o observado en presencia de glucosa y de 2 M de NaCl (Figura 3.20a y b) fue mayor que el registrado cuando la misma concentración de sal fue agregada a células no adaptadas (Figura 3.20a y b).

La disminución de la velocidad de consumo de oxígeno observada en presencia de glucosa y de sal se debería a dos factores: a) el efecto inhibitorio ejercido por la sal en el transporte de glucosa (como se mostró anteriormente en este capítulo, Figuras 3.11, 3.12 y 3.13) determinaría que su incorporación a la célula sea más lenta limitando la disponibilidad del azúcar como substrato respirable. b) Las condiciones de estrés de sal desviarían el metabolismo de la glucosa hacia la producción de glicerol en células crecidas en medio con glucosa, o inducirían la retención de glicerol (Neves *et al.*, 1997) cuando éste es la única fuente de carbono y energía. Como ya se mencionó anteriormente el glicerol producido y acumulado intracelularmente permite equilibrar osmóticamente el medio interno celular con el medio externo (hiperosmótico) al mismo tiempo que actúa como osmoprotector de enzimas y estructuras celulares.

Teniendo en cuenta que aún en células osmóticamente adaptadas, el transporte de la glucosa en presencia de elevada concentración de sal fue similar al de células sometidas a shock osmótico (Figuras 3.11 y 3.13), el efecto diferente del NaCl observado sobre la velocidad de c.e.o. en estos dos tipos de células se debería a que las crecidas en presencia de

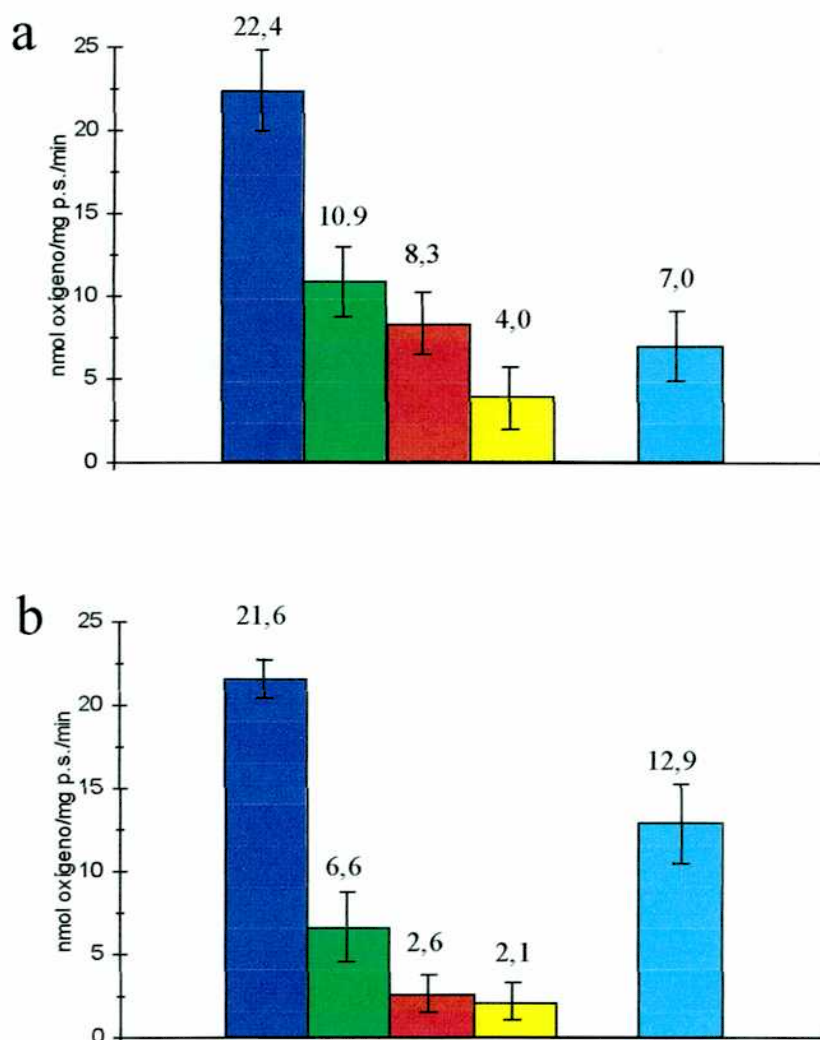


Figura 3.20: Velocidad de consumo específico de oxígeno (c.e.o.) en presencia de glucosa y de distintas concentraciones de NaCl (■ 0M; ■ 1M; ■ 1,5M; ■ 2M) en células crecidas en YEPD sin sal y en (■) células crecidas en YEPD + 2 M NaCl (con 2 M NaCl en el amortiguador de trabajo). a) *D. hansenii*; b) HM92.

alta concentración de sal tuvieron elevadas cantidades de glicerol acumuladas intracelularmente y por lo tanto desviaron una menor proporción del metabolismo de la glucosa hacia la producción de este poliol.

Neves *et al.* (1997) observaron también en *D. hansenii* el efecto inhibitorio de cantidades crecientes de NaCl o KCl sobre las velocidades de c.e.o. y fermentación de la glucosa en células crecidas en glucosa y en ausencia de sal en el medio. Los mismos autores encontraron *que en células osmóticamente adaptadas* (células crecidas en glucosa en la presencia de 0,5-3 M NaCl o KCl y lavadas luego en forma isotónica con el medio de crecimiento) el efecto de alta concentración de sal sobre la velocidad de c.e.o. era menos pronunciado que el observado en células no adaptadas. Como puede observarse, estos resultados concuerdan con los presentados en este trabajo.

IV) Análisis del mecanismo de transporte activo de glucosa, en las dos cepas halotolerantes: Evidencia de cotransporte H^+ /glucosa.

El transporte de azúcares a través de la membrana plasmática de células de levaduras, se ha estudiado en pocas especies (Höfer & Nassar, 1987). En la mayoría de los sistemas de transporte analizados, la fuerza impulsora del transporte de azúcar es el gradiente electroquímico de protones, $\Delta\mu_{H^+}$, generado por una H^+ -ATPasa unida a la membrana plasmática (Goffeau & Boutry, 1986). Las moléculas de azúcar son translocadas a través de la membrana en cotransporte con protones.

En esta tesis se determinó si el transporte activo de la glucosa en *D. hansenii* y en HM92, correspondía al tipo de sistema de cotransporte azúcar/ H^+ . Se tuvieron en cuenta los distintos parámetros que caracterizan a este tipo de transporte, evaluando su manifestación en los modelos en estudio. Los ensayos se realizaron a partir de cultivos con medio basal YEPD,

utilizando suspensiones celulares no amortiguadas, previamente aireadas durante varias horas. Se eligió la 2-DG como sustrato de transporte para realizar la caracterización del sistema de transporte de la glucosa ya que se demostró en ensayos anteriores que la glucosa y la 2-DG eran translocados al interior de las células por un mismo transportador (Figura 3.4 y 3.5) y que el análogo de la glucosa era acumulado intracelularmente (Figura 3.4).

Cuando se agregaron distintas concentraciones de 2-DG a suspensiones celulares de HM92 no amortiguadas, el transporte de dicho azúcar fue acompañado de una marcada alcalinización de las suspensiones. Esto puso en evidencia el cotransporte de protones inducido por el 2-DG (Figura 3.21).

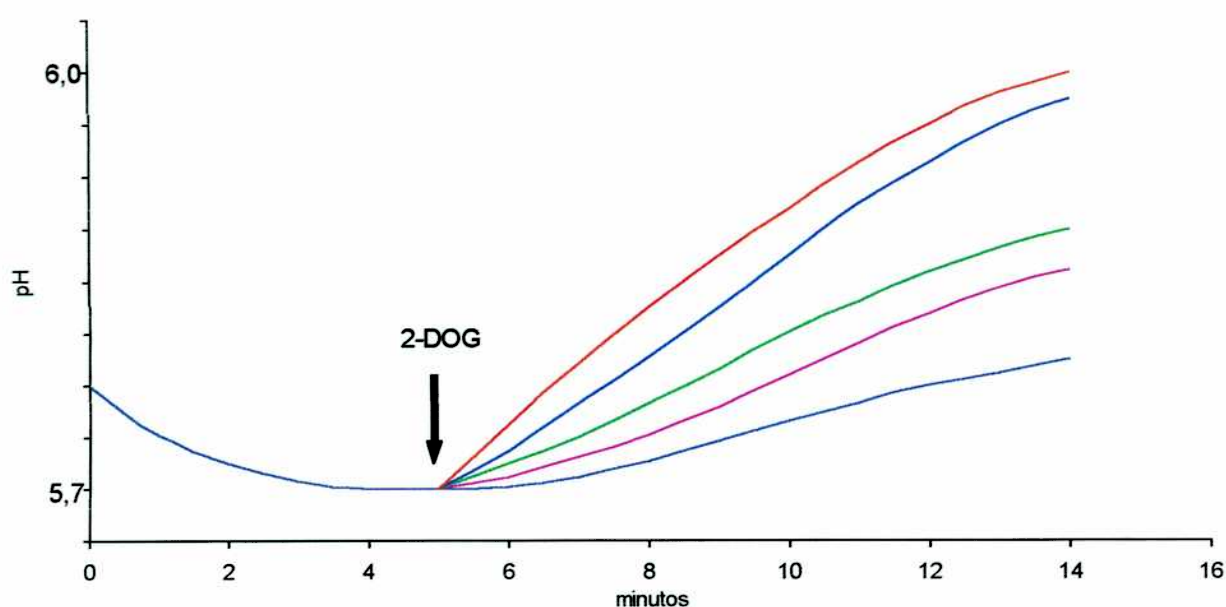


Figura 3.21: Alcalinización de las suspensiones celulares de HM92 por el agregado de diferentes concentraciones de 2-DG (■ 2 mM, ■ 5 mM; ■ 10 mM; ■ 15 mM; ■ 20 mM).

A partir de la pendiente de variación de pH obtenida para cada concentración de 2-DG se calculó la velocidad inicial de consumo de H^+ . Cuando se graficó las velocidades iniciales del transporte de protones (v_i) en función de la relación de dichos valores y los correspondientes recíprocos de las concentraciones de 2-DG (v_i/S) (Figura 3.22c y d) se calculó, por ajuste lineal, una constante media de saturación, $K_T(H^+)$, 5 veces más baja que la obtenida para el transporte de 2-DG [$K_T(H^+) = 1 \text{ mM}$, $K_T(2\text{-DG}) = 6 \text{ mM}$]. Sin embargo, el

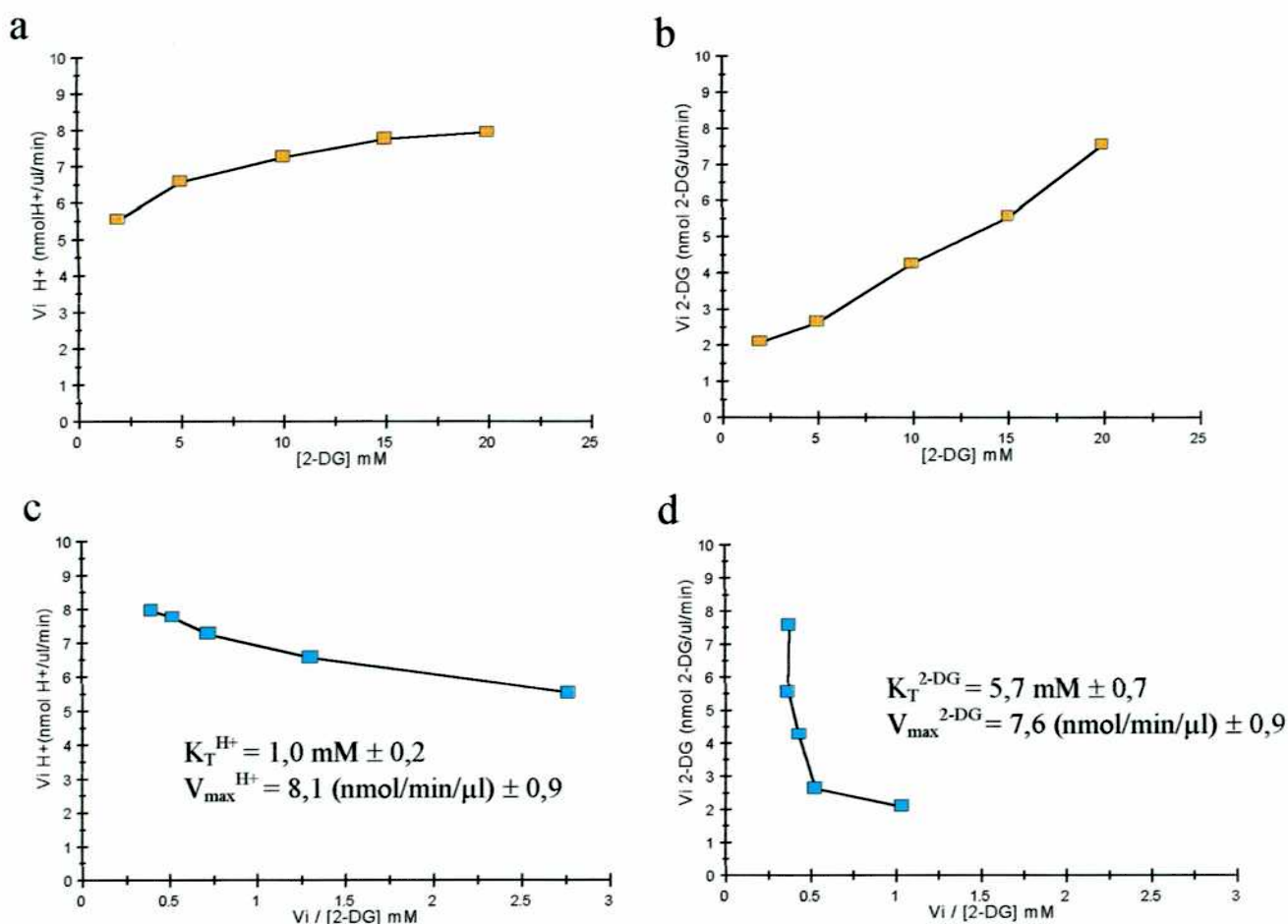


Figura 3.22: Cotransporte de protones inducido por 2-DG: Variación de los valores de velocidades iniciales de transporte, v_i , de a) protones y b) 2-DG en función de la concentración externa de 2-DG. Cálculo de los valores de K_T y $V_{\max}$ para c) protones y d) 2-DG en relación a la concentración externa de 2-DG (gráficos de Eady-Hofstee).

cálculo y comparación de las velocidades máximas de transporte para 2-DG y para los protones [$V_{\max}$ (2-DG) y $V_{\max}$ (H^+)] revelaron una estequiometría de cotransporte $H^+/2\text{-DG}$ de 1,0 (Figura 3.22 c y d). La significancia fisiológica de esta relación estequiométrica hallada es la evidencia del flujo acoplado de protones con el del soluto transportado, 2-DG.

Se concluyó que el sistema de transporte de glucosa en la cepa HM92 es del tipo cotransporte H^+ /azúcar ya que el transporte de 2-DG indujo una estequiometría de cotransporte de protones igual a la unidad y que la ocurrencia de dicho transporte fue dependiente del potencial de membrana (efecto del TPP^+ sobre la acumulación del 2-DG, Figura 3.19).

Los mecanismos de cotransporte con H^+ muestran una dependencia característica de las velocidades de transporte respecto a los valores de pH externos (Höfer & Nassar, 1987). En la Figura 3.23a se muestra el efecto que tuvo, en células de HM92, el pH extracelular (entre 5 y 7) sobre el influjo de 2-DG (10 mM). A valores crecientes de pH extracelular (pH_o), disminuye la velocidad de transporte del soluto. Para el transportador unido a membrana es posible calcular, a una dada concentración de substrato (preferentemente en el nivel de su valor de K_T), la constante media aparente de saturación con protones, pK_a , por la dependencia de la velocidad de transporte respecto al pH_o . En estas condiciones, la disminución de la velocidad inicial de transporte de monosacáridos (v_i) por el incremento del pH_o , se toma como una medida de la porción de moléculas del transportador que se protonan en el lado externo de la membrana plasmática. A la mitad de la velocidad máxima el 50% de las moléculas del transportador se encuentran en la forma desprotonada y consecuentemente, ese pH_o corresponde al pK_a del transportador. Por lo tanto, graficando las v_i de incorporación

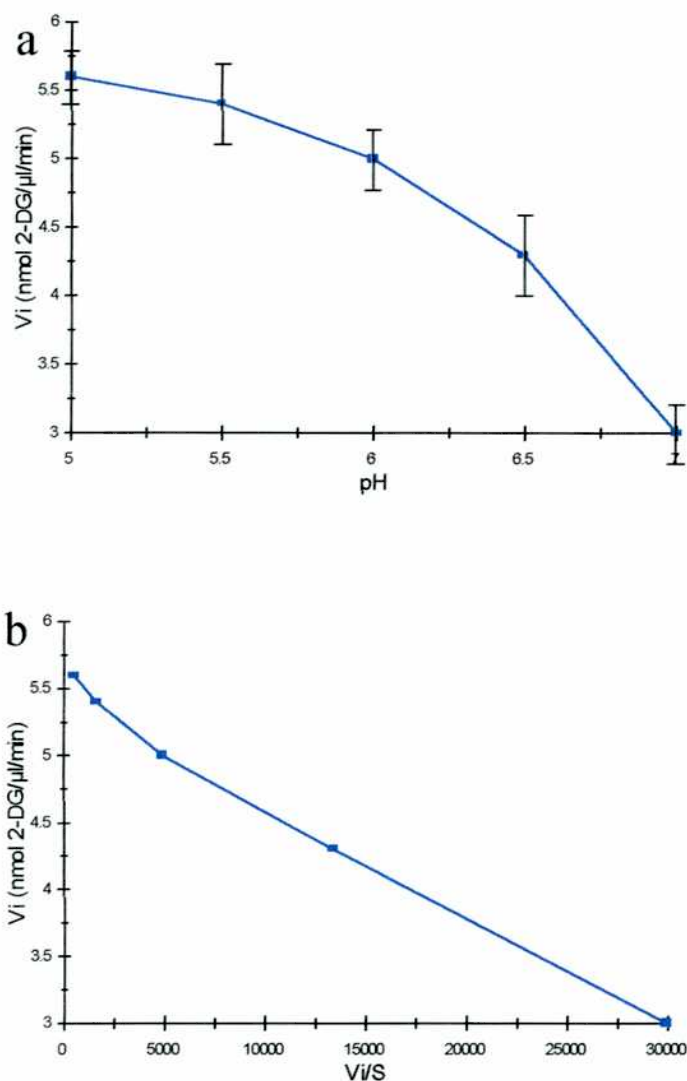


Figura 3.23: a) Dependencia de los velocidades iniciales de transporte respecto de los valores de pH externos. b) Gráfico de Eadie-Hofstee de las velocidades de captación de 2-DG en relación a la concentración de protones. Cálculo del valor de pK_a (constante media de saturación con protones).

del azúcar en función de la relación v_i/S ($S = [H^+]$) (Figura 3.23 b, gráfico de Eadie-Hofstee), se calcula por regresión lineal el valor de K_T para protones y a partir de ese valor se obtiene el de pK_a . Así se calculó (para una concentración de 2-DG = 10 mM) una constante media de saturación aparente del carrier con protones de $0,9 \times 10^{-7}$ M ($pK_a = 7,05$) (Figura 18b). Dicho

valor de pK_a concuerda con el calculado por otros autores en otras levaduras como *S. pombe*, $pK_a = 7,0$ (Höfer & Nassar, 1987), *R. glutinis*, $pK_a = 6,7$ (Höfer & Misra, 1978) o para el alga verde *Chlorella vulgaris*, $pK_a = 6,9$ (Komor & Tanner, 1974).

Los mismos experimentos se realizaron con *D. hansenii*. Se observó también la alcalinización de las suspensiones celulares no amortiguadas inmediatamente después del agregado de 2-DG. Sin embargo, no fue posible calcular una estequiometría razonable del co-transporte $H^+/2$ -DG. Además, en esta cepa el transporte de 2-DG no mostró la dependencia característica de la velocidad de transporte respecto al pH.

Mientras el transporte acoplado con protones puede ser fácilmente demostrado en ciertas levaduras, se conocen también casos en los que han fallado los intentos de demostrar este fenómeno. Lambert *et al.* (1987), analizando el transporte de solutos en varias especies de levaduras, llegaron a la conclusión que en aquellas levaduras que poseen una pared celular con alta capacidad para el intercambio de cationes, la demostración del co-transporte de H^+ es extremadamente difícil ya que dicho intercambio de cationes puede enmascarar las mediciones de los flujos de H^+ . Por otra parte Nobre *et al.* (1999) pudieron detectar en *D. hansenii* el cotransporte de protones acompañando la incorporación a las células de glucosa y xilosa pero sólo en presencia de sal. Propusieron que la presencia de sal determinaría indirectamente variaciones significativas en la fuerza motora del protón, las cuales serían críticas para la detección de la incorporación de protones. También encontraron que el ayunado de las células inducía gradualmente el sistema H^+ /symport de glucosa y que

la transferencia de un medio con glucosa a otro con xilosa como fuente de carbono conducía a la aparición del sistema H^+ /symport de xilosa y de glucosa, concluyendo que el sistema H^+ /symport de glucosa era represible por la misma hexosa y que el de xilosa requería inducción por el substrato.

Es posible que alguna característica similar a las descritas por los autores mencionados o alguna otra particularidad fisiológica o estructural de las células de *D. hansenii*, hayan impedido establecer en este trabajo, los parámetros característicos del sistema H^+ /symport de transporte de azúcares. De todas maneras, la existencia del sistema de cotransporte H^+ /azúcar en células de HM92 es una prueba indirecta de su existencia también en la cepa parental *D. hansenii*, teniendo en cuenta que *S. cerevisiae*, la otra cepa parental, no presenta un sistema de tipo activo para el transporte de azúcares.

BIBLIOGRAFÍA

Blomberg, A. (1988). Osmoregulation and Osmotolerance in Yeast. Ph. D. Thesis. Department of Marine Microbiology, University of Göteborg, Göteborg, Sweden.

Cartwright, Ch.P., Rose, A.H., Calderbank, J. and Keenan, M.H.J. (1989). Solute transport. *In: The Yeast* vol. 3, 2nd edition. Metabolism and physiology of yeasts. Rose, A.H. and Harrison, J.S. (eds.). Academic Press London, San Diego, New York, Berkeley, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto. p. 5-56.

Does, A.L. and Bisson, L.F. (1990). Isolation and characterization of *Picchia heedii* mutants defective in xylose uptake. *Applied and Enviromental Microbiology* 56, 3321-3328.

Foury, F., Boutry, M. and Goffeau, A. (1977). Efflux of potassium induced by Dio-9, a plasma membrane ATPase inhibitor, in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry* 252, 4577-4583.

Goffeau, A. and Boutry, M. (1986). Three proton-pumping ATPases in yeast. *Microbiological Sciences* 3, 164-168.

Hauer, R. and Höfer, M. (1978). Evidence for interactions between the energy-dependent transport for sugars and the membrane potential in the yeast *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*). *Journal of Membrane Biology* 43, 335-349.

Heller, K.B. and Höfer, M. (1975). Temperature dependence of the energy-linked monosaccharide transport across the cell membrane of *Rhodotorula gracilis*. *Journal of Membrane Biology* 21, 261-271.

Höfer, M. and Misra, P. (1978). Evidence for a proton/sugar symport in the yeast *Rhodotorula gracilis* (*glutinis*). *Biochemical Journal* 172, 15-22.

Höfer, M. (1981). Active transport. *In*: Transport across biological membranes. First English edition. Pitman Publishing, London. p. 56-102.

Höfer, M. and Künemund, A. (1984). Tetraphenylphosphonium ion is a true indicator of negative plasma membrane potential in the yeast *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Journal* 225, 815-819.

Höfer, M., Nicolay, K. and Robillard, G. (1985). The electrochemical H^+ -gradient in the yeast *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 17, 175-182.

Höfer, M. and Nassar, F.R. (1987). Aerobic and anaerobic uptake of sugars in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of General Microbiology* 133, 2163-2172.

Höfer, M. (1989). Accumulation of electroneutral and charged carbohydrates by proton cotransport in *Rhodotorula*. *Methods in Enzymology* 174, 629-653.

Komor, E. and Tanner, W. (1974). The hexose-proton cotransport system of *Chlorella*. *Journal of General Physiology* 64, 568-581.

Kotik, A. and Janáček, K. (1975). *Cell membrane transport. Principles and techniques*. 2nd edition, Plenum Press, New York. p. 139-158.

Lagunas, R. (1993). Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 104, 229-242.

Lammert, T., Prasad, R. and Höfer, M. (1987). Relevance of cation-exchange capacity of cell wall in detecting H⁺-symport in yeasts. *Biochemistry International* 4, 753-759.

Neves, M. L., Oliveira, R. P. and Lucas, M. (1997). Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* 143, 1133-1139.

Nobre, A., Lucas, C. and Leao, C. (1999). Transport and utilization of hexoses and pentoses in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 8: 3594-3598.

Prasad, R. and Höfer, M. (1986). Tetraphenylphosphonium is an indicator of negative membrane potencial in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 861, 377-380.

Prior, B. A. and Kötter, P. (1997). Pentose utilization by Yeasts. *In: Yeast Sugar Metabolism. Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications.* Zimmermann, F.K. and Entian, K.D. Technomic Publishing Company Inc. Lancaster, Pennsylvania, U.S.A. p. 435-455.

Sigler, K. and Höfer, M. (1997). Biotechnological aspects of membrane function. *Critical Reviews in Biotechnology* 17, 2: 69-86.

CAPÍTULO IV

TRANSPORTE DE GLICEROL

Debaryomyces hansenii produce glicerol y arabitol (Adler & Gustafsson, 1980, Capítulo II). El principal poliol que se sintetiza durante el crecimiento en medio basal es arabitol. A medida que baja la actividad de agua del medio, se produce un incremento en la producción de glicerol. La dinámica de la producción de los dos polioles durante el crecimiento en medio con sal está relacionada con la fase de crecimiento. Así el glicerol predomina durante la fase exponencial, mientras que la formación de arabitol prevalece cuando el cultivo llega a la fase estacionaria (Adler & Gustafsson, 1980). El arabitol se produce a partir de uno de los intermediarios en la vía de las pentosas fosfato, la ribulosa 5-fosfato (Spencer & Spencer, 1978). El glicerol sintetizado previamente es metabolizado concomitantemente con la síntesis de arabitol y prácticamente desaparece del cultivo. Parte del glicerol que es asimilado en la fase exponencial tardía, sirve como sustrato para la producción de arabitol (Adler & Gustafsson, 1980).

La producción de glicerol en *S. cerevisiae* es similar a la de *D. hansenii*, puesto que está relacionada tanto a la fase de crecimiento como al potencial de agua del medio (Larsson & Gustafsson, 1987). Tanto *D. hansenii* como *S. cerevisiae* desvían una parte considerable de la glucosa consumida a la producción de glicerol como una respuesta de adaptación al crecimiento en medios con bajos potenciales de agua.

Se ha propuesto para ambas levaduras, que la síntesis de glicerol ocurre a través de la reducción de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en glicerol 3-fosfato (G3P) por la enzima citoplasmática sn-glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) y la subsecuente defosforilación, por una fosfatasa específica o inespecífica, en glicerol (Adler *et al.*, 1985). Para la formación de glicerol es necesaria una concentración equimolecular de NADH cuando se produce la reducción de DHAP a G3P.

En *S. cerevisiae* la actividad específica de la enzima GPDH es inducida por incremento de la salinidad. Sin embargo, no se observa aumento de actividad cuando se bloquea la síntesis de proteínas por el agregado de cicloheximida. Esto indica que el aumento de actividad específica refleja una síntesis de novo de GPDH y no representa una modificación de proteínas preexistentes. Mediante análisis de inmunoblot se verificó que existe una relación directa entre la actividad específica de GPDH y la cantidad de moléculas de GPDH (Blomberg, 1988). En *D. hansenii* la actividad específica de la enzima GPDH también se incrementa en presencia de sal en el medio, aunque este incremento es mucho menor al observado en *S. cerevisiae*. En medio con 0,7 M NaCl la velocidad de producción de glicerol de esta levadura es 5 veces más alta que los valores correspondientes a *D. hansenii* (Blomberg, 1988; André *et al.*, 1988b).

En *D. hansenii* la principal (o tal vez la exclusiva) ruta catabólica del glicerol es la del G3P que involucra la enzima glicerol kinasa (GK) que cataliza la conversión de glicerol a glicerol 3-P y la enzima mitocondrial G3P deshidrogenasa, que convierte el G3P en dihidroxi-acetona fosfato (DHAP) (Blomberg, 1988).

Los polioles atraviesan las membranas biológicas por difusión pasiva debido a su naturaleza lipofílica. Sin embargo, en respuesta al estrés osmótico, las células de varios organismos retienen intracelularmente diferentes proporciones de estos compuestos producidos, en particular de glicerol. Dos factores estarían implicados en la capacidad de las células de retener glicerol (Blomberg, 1988; Blomberg & Adler, 1989). En primer lugar la deshidratación osmótica *per se*, parecería regular la permeabilidad de las membranas al glicerol. Así, la cantidad de glicerol acumulado podría estar parcialmente determinada por cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática al poliol. Un segundo factor suplementario o alternativo, en la regulación de los niveles intracelulares de glicerol es la existencia de sistemas de transporte activos, como se ha demostrado para *Z. rouxii*, *D. hansenii*, *P. sorbitophila* y *S. cerevisiae* (van Zyl *et al.*, 1990; Lucas *et al.*, 1990; Lages & Lucas, 1995; Lages & Lucas, 1997).

OBJETIVOS

- Analizar el transporte de glicerol y su posible alteración en presencia de NaCl en *S. cerevisiae*, *D. hansenii* y en HM92.
- Comparar el crecimiento de estas levaduras en medios con distinta osmolaridad según la fuente de carbono utilizada: glucosa o glicerol.

MATERIALES Y METODOS

Cepas:

S. cerevisiae UCD-522 (Montrachet) (levadura de vino)

D. hansenii NRRL Y-7393

Híbrido HM92

Medios de cultivo:

YEPD (**a**): 10 g/l extracto de levadura, 20 g/l peptona y 20g/l glucosa

YEPD + 0,5 (**b**), + 1 (**c**), + 2 M NaCl (**d**).

YEPG (**e**): 10 g/l extracto de levadura, 20 g/l peptona y 2% (v/v) glicerol

YEPG + 0,5 (**f**), + 1 (**g**), + 2 M NaCl (**h**).

Determinaciones analíticas:

Concentración celular en ensayo de cinética de crecimiento: Se determinó midiendo la absorbancia a 620 nm.

Biomasa en ensayo de incorporación de glicerol: Se determinó por filtración de 1 ml de la suspensión celular de trabajo. Las células se lavaron 2 veces con agua destilada y se secaron 12 h a 120 °C. Se pesó en balanza analítica. Se realizó por triplicado

Contenido intracelular de glicerol radiactivo: Los filtros con los pellets celulares se sumergieron, para su disolución, en viales plásticos que contenían 10 ml de solución de centelleo (AQUALUMA, high countine efficiency Isc cocktail, Lumac-Isc b.y., Groningen, The Netherlands) y la radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido (Analizador de centelleo Packard Tri-Carb 1600CA) (Höfer, 1989).

$$S_i = \frac{\text{dpm}}{\text{Ae} \times 2 \times \text{ps}}$$

S_i : Concentración intracelular de glicerol (mM)

dpm : desintegraciones por minuto

Ae : Actividad específica (dpm/nmol de glicerol)

2: proporción del contenido de agua intracelular por unidad de peso seco celular en $\mu\text{l mg}^{-1}$

ps : peso seco en mg

Cinética de crecimiento: Se realizó en Erlenmeyers de 250 ml, con 25 ml de los medios de cultivo a, b, c, d, e, f, g ó h. Los frascos se inocularon con 5×10^6 células ml^{-1} a partir de precultivos de YEPD en fase exponencial y se incubaron a 30 °C en un agitador a 200 rpm. Se sacaron muestras periódicamente.

Incorporación de glicerol: Se realizaron cultivos de *S. cerevisiae*, *D. hansenii* y HM92 en los medios a, c, d, e, g según correspondió. Las células se cosecharon por centrifugación (5000 g, 10 min) en fase exponencial tardía de crecimiento, se lavaron dos veces con agua destilada helada y se resuspendieron al 5% (p/v) en agua destilada helada. Luego, la solución acuosa resultante se mezcló en partes iguales con amortiguador fosfato de potasio (KH_2PO_4) 100 mM, pH 4,5, y se obtuvo una suspensión celular con una concentración final aproximada de 5 mg peso seco/ml. Cuando se trabajó con células que crecieron en presencia de sal, se usó una solución de dicha sal de igual concentración a la que tenían en el medio, para los lavados y suspensiones celulares. De esta forma se mantuvo a las células en presencia de una concentración constante de NaCl durante todo el experimento. De cada suspensión de trabajo se tomaron fracciones de 15 ml que se incubaron a 30 °C en agitador mecánico (50 rpm).

Algunas se preincubaron durante 2 minutos con 10 mM del desacoplante 2,4-dinitrofenol (DNP) o con 0,5, 1 o 2 M NaCl. Cuando se inició el experimento se agregó U ^{14}C glicerol (Amersham, 149 mCi/mmol, solución acuosa de etanol 50% v/v). La concentración inicial de glicerol fue de 10 mM. Se tomaron periódicamente, muestras de 1 ml durante 70 minutos. Estas muestras se filtraron en membranas de 0,8 μm . La incorporación de glicerol se determinó midiendo la radiactividad intracelular como se explica en determinaciones analíticas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) Transporte de glicerol al interior de las células en presencia o ausencia de estrés osmótico:

Se cosecharon células de *S. cerevisiae* crecidas en YEPD y YEPD + 1M NaCl, en fase exponencial tardía y se estudió la incorporación de glicerol radiactivo (Figura 4.1). Las células crecidas en el medio sin sal (Figura 4.1 a) acumularon glicerol en contra del gradiente de concentración hasta un valor que fue el correspondiente a 3 veces el del equilibrio de difusión (10 mM). El agregado de DNP previno la acumulación de glicerol radiactivo en el interior de las células. La acción del DNP indicó la dependencia del ΔpH y el potencial de membrana ($\Delta\psi$) en el transporte de este soluto. Cuando se agregó al comienzo del experimento 1 M NaCl, se inhibió la acumulación de glicerol alcanzándose el equilibrio de concentraciones.

De la misma manera fueron estudiadas las células crecidas en YEPD + 1 M NaCl.

Como se puede observar (Figura 4.1 a), las células acumularon glicerol 30 veces el valor de equilibrio, pero esta acumulación fue inhibida totalmente por el agregado de DNP.

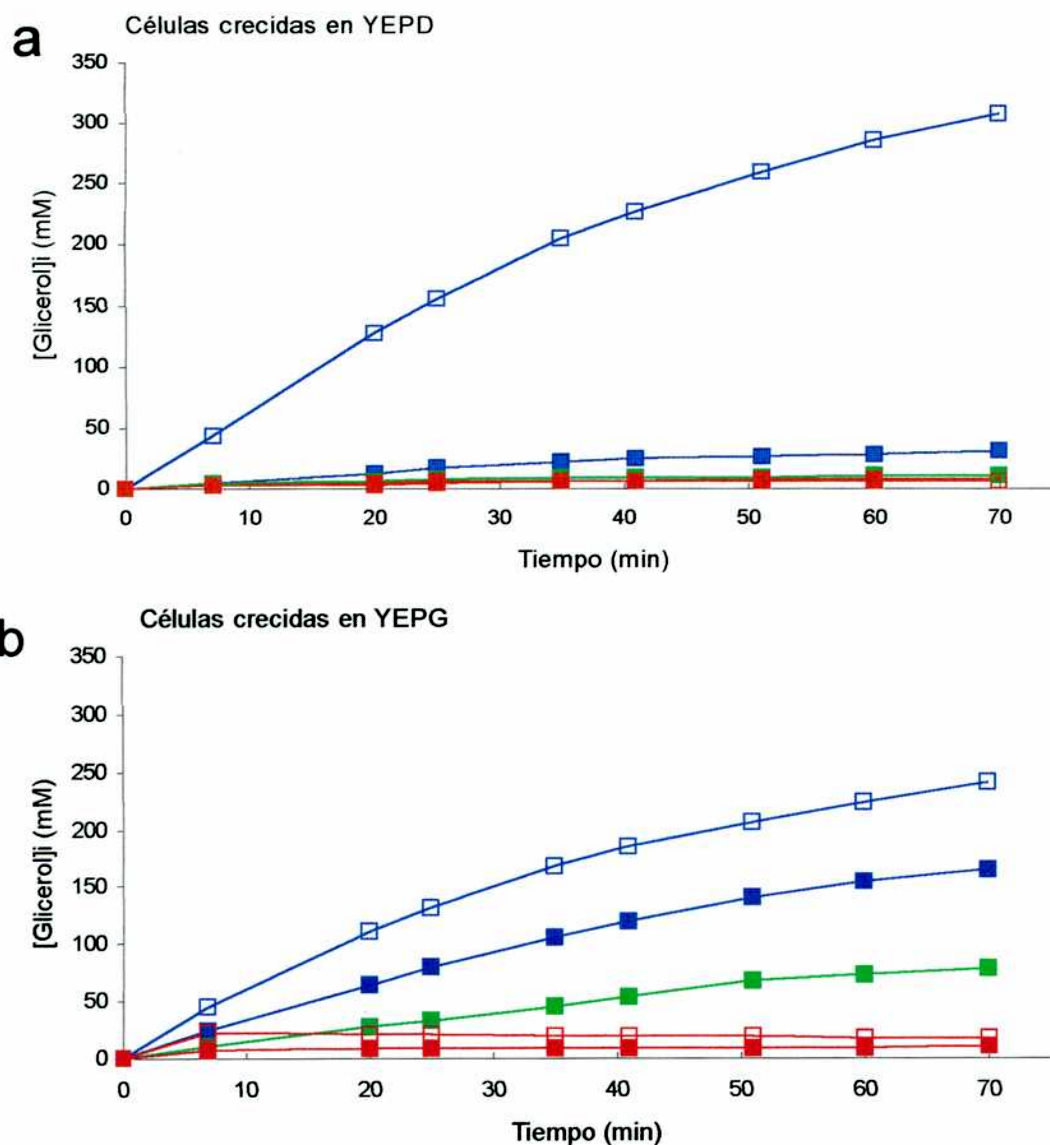


Figura 4.1: Incorporación de glicerol radiactivo por células de *S. cerevisiae* crecidas a) en YEPD o b) en YEPG, (□) sin NaCl (células no adaptadas) o (■) con 1M NaCl (células adaptadas). Agregado al inicio del ensayo de: (■) 1M NaCl a células no adaptadas; (■) DNP a células no adaptadas; (□) DNP a células adaptadas.

Los ensayos anteriores se repitieron pero con cultivos de *S. cerevisiae* realizados en YEPG y en YEPG + 1 M NaCl. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que en ausencia de sal las células crecidas en YEPG (Figura 4.1 b) acumularon 5 veces más glicerol *que aquellas células crecidas en glucosa* (15 veces mayor que el valor correspondiente al equilibrio de difusión). Al agregarse 1 M NaCl al comienzo del experimento, con células no adaptadas y a diferencia de lo ocurrido en YEPD, hubo acumulación de glicerol, aunque ésta acumulación fue la mitad de la observada en ausencia de sal (Figura 4.1 b). Sin embargo, como consecuencia del estrés osmótico al que fueron sometidas las células, éstas podrían haber sufrido alteración del potencial de membrana y una fuerte deshidratación inicial, con la consiguiente reducción del volumen celular y el inicio de un período de adaptación a las nuevas condiciones (Morales y colaboradores, 1990). Así los valores calculados de concentración interna de glicerol estarían subestimados por haberse considerado un volumen celular mayor. Lages & Lucas (1997) midieron en células de *S. cerevisiae* una caída del volumen celular de más de la mitad (62,5%) del valor obtenido en ausencia de sal luego de agregar 1M de NaCl. Si se tomara en cuenta esta diferencia para corregir el valor de volumen intracelular en presencia de 1 M NaCl y se volvieran a calcular los datos de glicerol acumulado, se concluiría que las células en condiciones de estrés por el agregado de 1 M NaCl acumularon más glicerol que en ausencia de sal. La acumulación del polirol en presencia de 1 M NaCl en células adaptadas, crecidas en YEPG + 1 M NaCl (Figura 4.1 b), fue similar a la observada para células crecidas en YEPD + 1 M NaCl (Figura 4.1 a).

La adición de DNP a células crecidas con glicerol como fuente de carbono, inhibió la acumulación del polirol (Figura 4.1 b). Sutherland *et al.* (1997) y Lages & Lucas (1997)

describieron el mismo efecto en células de *S. cerevisiae* crecidas en YEPG, o sea que el agregado de DNP inhibió la acumulación del poliol.

La diferencia que se observó en la acumulación de glicerol entre las células crecidas en glucosa y las crecidas en glicerol (5 veces superior en las últimas) podría deberse a la presencia de un sistema de transporte activo de glicerol (de alta afinidad) en *S. cerevisiae*, inducido durante el crecimiento en glicerol. Según estudios realizados por otros autores (Lages & Lucas, 1997 y Sutherland *et al.*, 1997), en *S. cerevisiae* existirían dos sistemas de transporte para glicerol. Uno de baja afinidad, probablemente difusión facilitada, presente en células crecidas en glucosa y otro de alta afinidad, cotransporte H^+ -glicerol, inducido por el crecimiento en sustratos gluconeogénicos (glicerol, etanol, acetato). Posiblemente este último sistema no esté involucrado directamente en la osmorregulación pero tenga una función metabólica ya que es inducido por el cambio de glucólisis a gluconeogénesis (Sutherland *et al.*, 1997). Esto explicaría las diferencias observadas en este trabajo en la acumulación de glicerol cuando el crecimiento se realizó sin sal y con dos sustratos diferentes, glicerol y glucosa. En las células crecidas en YEPD funcionaría el sistema de difusión facilitada y por eso el máximo de glicerol acumulado no estuvo tan alejado del valor de equilibrio de difusión. Por otra parte, en células que crecieron en glicerol predominaría el sistema activo que habría sido inducido por el sustrato (glicerol) durante el crecimiento, explicándose así que el glicerol se haya acumulado en contra del gradiente de concentración.

Según Lages & Lucas (1997) en *S. cerevisiae* el sistema activo de toma de glicerol es represible por glucosa pero la desrepresión por sí sola no sería suficiente para que aparezca

actividad de transporte, sino que sería necesario el crecimiento sobre sustratos gluconeogénicos como única fuente de carbono. Si se considera entonces, que en *S. cerevisiae* el sistema activo de toma de glicerol es inducible por el propio sustrato y que en células adaptadas a alta concentración de sal hubiera una producción endógena incrementada de glicerol para restablecer el balance osmótico con el medio externo (Larsson & Gustafsson, 1987; Blomberg, 1988), y una liberación del mismo al exterior de las células por la reducida capacidad de retención (Brown, 1978), esta concentración creciente de glicerol podría inducir a la vez, a su propio sistema de transporte. En células crecidas en YEPD + 1 M NaCl la inducción tendría lugar, posiblemente, luego de consumida toda la glucosa, es decir, al quedar el sistema liberado de la represión por el azúcar y el cultivo a expensas del consumo del glicerol producido. Por eso, ante el agregado externo de glicerol durante el experimento, estas células con su sistema de transporte ya inducido, son capaces de transportar el glicerol radiactivo inmediatamente al entrar en contacto con él, acumulándolo en contra del gradiente de concentración (Figura 4.1 a).

Lages & Lucas (1997), estudiando la incorporación de glicerol radiactivo en células de *S. cerevisiae*, no encontraron una correlación directa entre la concentración de sal externa y el valor máximo de glicerol acumulado. Sin embargo, al agregar glicerol frío o CCCP (desacoplante), las células liberaron al medio el glicerol radiactivo acumulado en proporción directa a la concentración externa de NaCl presente en cada caso. Esto sugeriría que la adaptación al estrés osmótico durante el experimento no involucró al sistema de transporte de glicerol pero si indujo la inhibición de su consumo. Estos resultados concuerdan con otros citados en la bibliografía que sugieren que la vía del glicerol-3-fosfato en *S. cerevisiae* estaría

regulada osmóticamente por control en dos niveles, la enzima glicerol-3P-deshidrogenasa, activada bajo estrés osmótico (Blomberg & Adler, 1989; Albertyn *et al.*, 1994) y la glicerol kinasa, inhibida bajo estrés osmótico (Albertyn *et al.*, 1994; Blomberg, 1997).

A partir del trabajo de Luyten *et al.* (1995) existe una evidencia molecular del sistema de transporte de glicerol que poseen las células de *S. cerevisiae* crecidas en medio con glucosa ya que estos autores encontraron actividad de una permeasa en estas condiciones. Existe una alta homología entre el gen FPS1 correspondiente a esta enzima y el gen del facilitador para glicerol de *E. coli*, llamado GlpF, estando ambos incluidos en la familia MIP de las proteínas de canal (Luyten *et al.*, 1995; van Os *et al.*, 1994). La estructura molecular de la proteína Fps1 y las similitudes que tiene con la proteína facilitadora para glicerol de *E. coli* (Luyten *et al.* 1995), sugieren un tipo de transporte mediado diferente al de cotransporte.

Con la cepa parental *D. hansenii* y con el híbrido HM92 se realizaron experimentos en las mismas condiciones utilizadas para *S. cerevisiae*. Las células desarrolladas en medio YEPD con y sin el agregado de distintas concentraciones de NaCl, se cosecharon en fase de crecimiento exponencial media o tardía. También se trabajó con células de HM92 crecidas en medio YEPG. Luego se estudió la incorporación de glicerol radiactivo.

En ambas cepas (Figura 4.2 a y b) se observó que células crecidas en YEPD sin sal acumulaban glicerol en contra del gradiente de concentración. *D. hansenii* (Figura 4.2 a), al cabo de 70 minutos, se acumuló 12 veces más glicerol que el valor del equilibrio de difusión (10 mM). HM92 (Figura 4.2 b), en ese tiempo, acumuló 40 veces dicho valor. Se observó de

igual manera, que células de HM92 desarrolladas en YEPG acumularon la misma concentración de glicerol que en el ensayo anterior.

Cuando se agregó 2 M NaCl al comienzo del experimento, las células de ambas

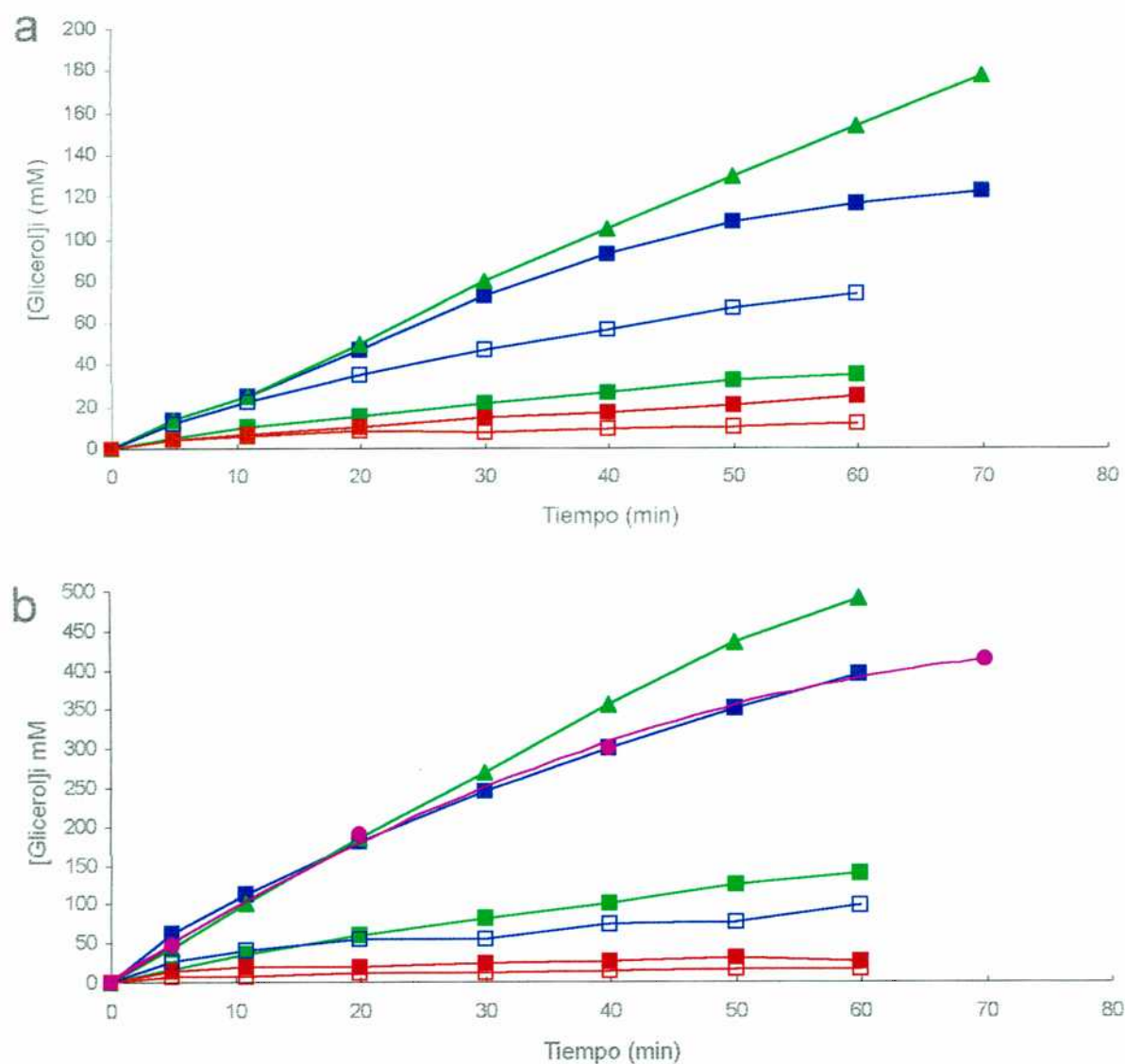


Figura 4.2: Incorporación de glicerol radiactivo por células de a) *D. hansenii* y b) HM92 crecidas en YEPD, (□) sin NaCl (células no adaptadas) o (■) con 1M NaCl (células adaptadas). Agregado al inicio del ensayo de: (■) 1M NaCl a células no adaptadas; (■) 10 mM DNP a células no adaptadas; (□) 10 mM DNP a células adaptadas. (●) Células de HM92 crecidas en YEPG sin NaCl (células no adaptadas).

levaduras acumularon glicerol pero en forma más lenta y alcanzando valores de concentración interna significativamente menores que cuando no se agregó la sal. Con la adición de 0,5 M NaCl, las células acumularon más glicerol que en ausencia de la sal. Como se mencionó antes, otros autores (Lucas *et al.*, 1990) encontraron en *D. hansenii* evidencia de la existencia de un sistema activo y constitutivo de transporte de glicerol, Na⁺-glicerol symport, el cual mantiene un gradiente de glicerol como una función del gradiente de Na⁺. Además éste puede aceptar K⁺ como co-substrato cuando la concentración de Na⁺ es lo suficientemente baja. Así se explicaría lo observado en el presente trabajo, que aún en ausencia de NaCl las células de *D. hansenii* (Figura 4.2 a) y también las del híbrido (Figura 4.2 b), transportaron y acumularon glicerol en contra del gradiente de concentración. Se puede considerar, que el glicerol fue transportado conjuntamente con iones K⁺ presentes en el amortiguador de trabajo (KH₂PO₄). El gradiente de Na⁺ se mantendría en la dirección opuesta, concentración más elevada en el exterior celular, mediante un mecanismo de intercambio Na⁺-H⁺. Éste bombea Na⁺ fuera de las células usando el gradiente de H⁺, mantenido a expensas de energía metabólica por la bomba de protones de la membrana plasmática. A diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, en *D. hansenii* la concentración intracelular de Na⁺ es relativamente baja y no se incrementa en forma significativa al aumentar la concentración de cloruro de sodio (Norkrans, 1968; Norkrans & Kylin, 1969). Lucas *et al.* (1990) observaron también que la velocidad máxima de acumulación de glicerol en *D. hansenii* se incrementaba hasta concentraciones extracelulares de 1M NaCl. El resultado que se obtuvo con 0,5 M de NaCl en este trabajo está de acuerdo con esto (Figura 4.2 a).

Las células adaptadas a condiciones de estrés osmótico, es decir, crecidas en YEPD + 2 M NaCl y mantenidas bajo en esas condiciones de estrés durante todo el experimento (Figura 4.2 a y b), acumularon también menor cantidad de glicerol marcado que células no adaptadas. En todos los experimentos realizados las células se cosecharon en fase exponencial de crecimiento y ya se demostró anteriormente (Figuras 2.10 y 2.11), que es durante la fase exponencial cuando las células produjeron y acumularon glicerol intracelularmente en concentraciones variables según la presión osmótica externa. Es probable que las células de *D. hansenii* y de HM92 adaptadas osmóticamente tuvieran, cuando fueron cosechadas, un nivel de glicerol intracelular superior al presente en células crecidas en YEPD sin NaCl. Esto pudo condicionar el sistema de transporte de glicerol. Cuando éste se estudió con glicerol radiactivo, la velocidad de transporte fue menor porque el poliol estaba previamente acumulado en el interior de las células.

La disminución del volumen celular, mencionada anteriormente, por efecto de la concentración salina elevada, debería considerarse en el caso del agregado de 2 M NaCl al comienzo del experimento. Sin embargo, no debería tenerse en cuenta para las células adaptadas desde el crecimiento a altas concentraciones de sal, ya que se demostró (Morales *et al.*, 1990) que células de *D. hansenii* adaptadas a alta concentración de cloruro de sodio, poseen el mismo volumen que las crecidas en un medio sin sal.

El híbrido HM92 acumuló la misma cantidad de glicerol radiactivo en células crecidas en YEPG y en YEPD en ausencia de sal (Figura 4.2 b). En estas condiciones el glicerol acumulado fue dos veces superior al observado en las células de *S. cerevisiae* desarrolladas en el medio con glicerol como fuente de carbono (Figura 4.1 b) y cuatro veces mayor al

acumulado por células de *D. hansenii* crecidas en YEPD (Figura 4.2 a). Esto podría indicar que el PF HM92 posee los sistemas de transporte de glicerol de ambas cepas parentales: el cotransporte Na^+ -glicerol de *D. hansenii* y el cotransporte H^+ -glicerol de *S. cerevisiae*. Se puede asumir que en el híbrido, este último sistema está desregulado y por lo tanto no requiere ser inducido para su funcionamiento como sí es necesario en *S. cerevisiae*.

Si consideramos los resultados obtenidos con *D. hansenii* y HM92, se puede decir que fue evidente la dependencia del transporte de glicerol con respecto al ΔpH y el potencial de membrana, $\Delta\psi$. Esta evidencia se comprobó cuando se observó que la incorporación del poliol se inhibía con el agregado de DNP en células crecidas en YEPD con y sin agregado de 2M NaCl (Figura 4.2 a y b).

2) Crecimiento en medios de cultivo con glucosa o glicerol fuente de carbono y con distintas concentraciones de NaCl :

En estos ensayos se estudió el crecimiento de *S. cerevisiae*, *D. hansenii* y HM92 en los medios de cultivo YEPD o YEPG a los que se agregó distintas concentraciones de NaCl (Figura 4.3, Tabla 4.1).

El parental *S. cerevisiae* (Figura 4.3 a, Tabla 4.1), en el medio YEPG tuvo una velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) de $0,27 \text{ h}^{-1}$ y una fase lag de 2 horas. Cuando se agregó NaCl, la μ_{max} disminuyó en relación al aumento de concentración de sal y la fase lag fue más larga (14 horas con 1 M de NaCl). El crecimiento se inhibió con 2 M de NaCl. Si se comparan estos resultados con los de los ensayos en YEPD con sal, se observa nuevamente

una disminución de $\mu_{\max}$ conforme al aumento de concentración de NaCl en el medio. Sin embargo las $\mu_{\max}$ que se obtuvieron en los medios con glucosa fueron superiores que en los medios correspondientes con glicerol. El NaCl en una concentración de 2M en el medio con glucosa inhibió el crecimiento de *S. cerevisiae*. Lages & Lucas (1997) observaron que *S. cerevisiae* tenía un crecimiento muy lento en medio mínimo y que éste era mayor en YEPG. Esto indica que el desarrollo del cultivo en el medio complejo estuvo influenciado por componentes que poseen tanto la peptona como el extracto de levadura y no sólo por el glicerol.

Tabla 4.1: $\mu_{\max}$ obtenidas en medio YEPG e YEPD con distintas concentraciones de NaCl. Los valores son el promedio de determinaciones realizadas a partir de ensayos independientes. En cada caso se indica el desvío estándar correspondiente y, entre paréntesis, el número de ensayos realizados.

Medio de Crecimiento	<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. hansenii</i>	Híbrido HM92
	$\mu_{\max}$	$\mu_{\max}$	$\mu_{\max}$
YEPG	0,274 $\pm$ 0,014 (3)	0,240 $\pm$ 0,009 (3)	0,380 $\pm$ 0,018 (3)
YEPG + 0,5 M NaCl	0,206 $\pm$ 0,009 (2)	0,272 $\pm$ 0,012 (2)	0,340 $\pm$ 0,016 (2)
YEPG + 1,0 M NaCl	0,0068 $\pm$ 0,002 (3)	0,160 $\pm$ 0,009 (3)	0,330 $\pm$ 0,017 (3)
YEPG + 2,0 M NaCl	-----	0,070 $\pm$ 0,004 (3)	0,060 $\pm$ 0,005 (3)
YEPD	0,480 $\pm$ 0,020 (3)	0,296 $\pm$ 0,013 (3)	0,480 $\pm$ 0,026 (3)
YEPD + 0,5 M NaCl	0,272 $\pm$ 0,014 (2)	0,250 $\pm$ 0,014 (2)	0,380 $\pm$ 0,020 (2)
YEPD + 1,0 M NaCl	0,127 $\pm$ 0,011 (2)	0,116 $\pm$ 0,005 (2)	0,390 $\pm$ 0,018 (2)
YEPD + 2,0 M NaCl	-----	0,090 $\pm$ 0,005 (3)	0,170 $\pm$ 0,009 (3)

En *D. hansenii* (Figura 4.3 b, Tabla 4.1), como en *S. cerevisiae*, se observó que tanto en YEPD como en YEPG la $\mu_{\max}$ disminuyó al aumentar la concentración de NaCl. Sin embargo, en medio YEPG sin sal (a diferencia de lo observado en *S. cerevisiae*) la $\mu_{\max}$ fue menor que la del medio con 0,5 M NaCl. Como se mencionó anteriormente, Lucas *et al.* (1990) observaron que en *D. hansenii*, el gradiente de Na⁺ de transmembrana dirigía el

transporte activo de glicerol. De acuerdo con esto, la ausencia o la baja concentración de Na^+ para ser cotransportado con el glicerol podría dar por consecuencia una incorporación más lenta de este sustrato y por lo tanto, un crecimiento más lento a expensas del mismo.

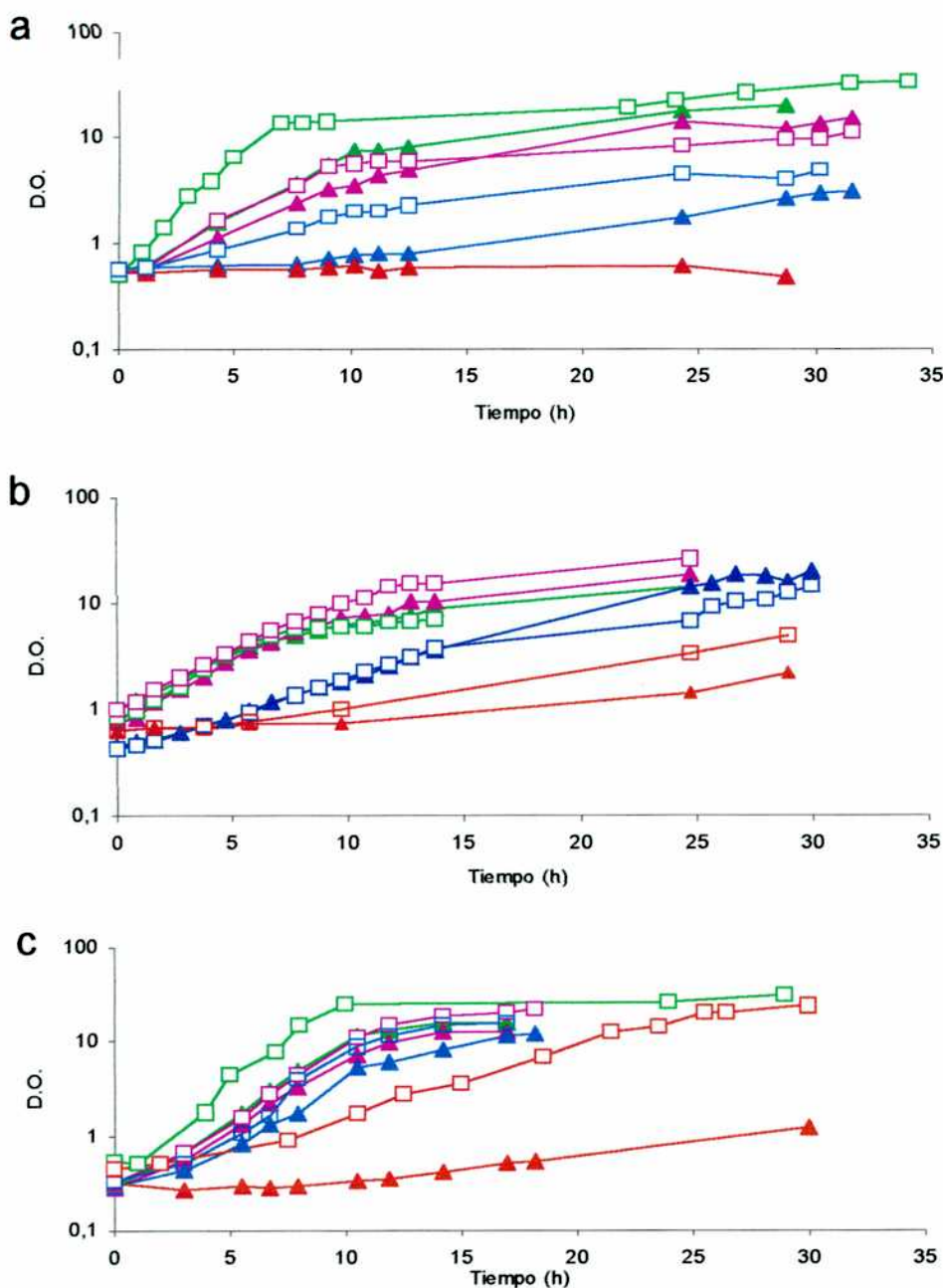


Figura 4.3: Crecimiento en medio YEPD y en medio YEPG, con diferentes concentraciones de NaCl. a) *S. cerevisiae*, b) *D. hansenii* y c) HM92.

□ YEPD; □ YEPD 0,5M NaCl; □ YEPD 1,0M NaCl; □ YEPD 2,0M NaCl
 ▲ YEPG; ▲ YEPG 0,5M NaCl; ▲ YEPG 1,0M NaCl; ▲ YEPG 2,0M NaCl.

El híbrido HM92 (Figura 4.3 c, Tabla 4.1) tuvo un comportamiento similar a *D. hansenii* cuando fue cultivado con NaCl aunque las $\mu_{\max}$ fueron más altas que en la cepa parental. Además, en HM92 así como en *S. cerevisiae*, la $\mu_{\max}$ más elevada correspondió al crecimiento en medio sin sal. La posible existencia del sistema de cotransporte H^+ -glicerol de *S. cerevisiae* en el híbrido (Capítulo III) independizaría a las células de la presencia de iones Na^+ en el medio de crecimiento para la incorporación de glicerol.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler, L. and Gustafsson, L. (1980). Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology* 124, 123-130.
- Adler, L., Blomberg, A. and Nilsson, A. (1985). Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology* 162, 300-306.
- Albertyn, J., Hohmann, S. and Prior, B. (1994). Characterization of the osmotic-stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate independently. *Current Genetics* 25, 12-18.
- Blomberg, A. (1988). Osmoregulation and Osmotolerance in Yeast. Ph. D. Thesis. Department of Marine Microbiology, University of Göteborg, Göteborg, Sweden.
- Blomberg, A. and Adler, L. (1989). Roles of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD^+) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 171, 2: 1087-1092.

Blomberg, A. (1997). Osmoresponsive proteins and functional assesment strategies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis*, 18, 8: 1429-1440.

Brown, A.D. (1978). Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Advances in Microbial Physiology* 17, 181-242.

Höfer, M. (1989). Accumulation of electroneutral and charged carbohydrates by proton cotransport in *Rhodotorula*. *Methods in Enzymology* 174, 629-653.

Lages, F. and Lucas, C. (1995). Characterization of a glycerol/H⁺ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. *Yeast* 11, 11-119.

Lages, F. and Lucas, C. (1997). Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1322, 8-18.

Larsson, C. and Gustafsson, L. (1987). Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Sacchoromyces cerevisiae* during salt stress. *Archives of Microbiology* 147, 358-363.

Lucas, C., Da Costa, M. and Van Uden, N. (1990). Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 6, 187-191.

Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W., Prior, B., Thevelein, J. and Hohmann, S. (1995). Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and it is inactive under osmotic stress. *EMBO Journal* 14, 1630-1371.

Morales, C., André, L. and Adler, L. (1990). A procedure for enrichment and isolation of mutants of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* having altered glycerol metabolism. *FEMS Microbiology Letters* 69, 73-78.

Norkrans, B. (1968). Studies on marine occurring yeasts: Respiration, fermentation and salt tolerance. *Archives of Microbiology* 62, 358-372.

Norkrans, B. and Kylin, A. (1969). Regulation of potassium to sodium ratio and the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *Journal of Bacteriology* 100, 836-845.

Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (1978). Production of polyhydroxy alcohols by osmotolerant yeasts. *In: Primary Products of Metabolism*. Rose, A.H. (ed.). Academic Press New York, London. p. 393-425.

Sutherland, F.C.W., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Prior, B.A. and Kilian, S. (1997). Characteristics of Fps1-dependent and-independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 179, 24: 7790-7795.

van Os, C.H., Deen, P.M.T. and Dempster, A. (1994). Aquaporins: water selective channels in biological membranes. Molecular structure and tissue distribution. *Biochimica et Biophysica Acta* 1197, 291-309.

CAPÍTULO V

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN MEDIOS HIPEROSMÓTICOS

La regulación de la mayoría de las respuestas biológicas depende del reconocimiento entre moléculas señal y receptores específicos. Sin embargo, la osmorregulación difiere en que la información del medio ambiente no está dada por una molécula específica sino que es un parámetro físico-químico: la actividad de agua exterior (Csonka y Hanson, 1991). Existen dos tipos de fenómenos osmorregulatorios: a) respuestas a largo plazo o en estado de equilibrio que se manifiestan durante el crecimiento de los organismos en un medio de osmolaridad constante y b) respuestas a corto plazo o transcientes que ocurren rápidamente después de un cambio en la osmolaridad externa. Las respuestas a corto plazo deben estar ligadas a los mecanismos homeostáticos para lograr mantener el nuevo estado de equilibrio osmótico. El disparo de estas respuestas ocurre a nivel de expresión de genes y de actividad de proteínas.

Como se explicó en capítulos anteriores, cuando las células son expuestas a un medio hiperosmótico sufren cambios en la producción y acumulación de polioles y también en los sistemas de transporte de solutos a través de la membrana plasmática. En todos ellos las moléculas involucradas son proteínas: enzimas y transportadores.

OBJETIVO

Analizar, mediante electroforesis, los cambios asociados a los patrones de proteínas totales y de membrana plasmática, inducidos durante el crecimiento de células de *S. cerevisiae*, *D. hansenii* y de HM92 en un medio hiperosmótico.

MATERIALES Y METODOS

Cepas:

Saccharomyces cerevisiae UCD 522 (Montrachet) (levadura de vino)

Debaryomyces hansenii NRRL Y-7393

Híbrido HM92.

Medios de cultivo:

YEPD (a): 10 g/l extracto de levadura, 20 g/l peptona y 20g/l glucosa

YEPD + 1,4 M (b), + 2 M (c) NaCl.

A) Proteínas totales

Extractos crudos: Se obtuvieron protoplastos de cada levadura como se explicó en el capítulo I. Los protoplastos se lavaron 3 o 4 veces con KCl 0,6 M o 1,2 M según correspondía. Se resuspendieron en amortiguador fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0). Se agregó 10 mM fluoruro de metilfenilsulfonilo, PMSF (inhibidor de proteasas) y 0,1% dodecil

sulfato de sodio, SDS (desorganiza las membranas). Se observó microscópicamente la ocurrencia de lisis celular. Luego se agregó sulfato de protamina (1mg/ml) para precipitar el ADN. Finalmente la mezcla se centrifugó a 9.980 g, 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se lo guardó a -20 °C hasta el momento de ser utilizado.

Geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE): Los geles se realizaron planos y discontinuos, de 1,5 mm de espesor con dos partes contiguas, diferentes en cuba vertical: 1) Gel separativo (inferior): acrilamida 12% (p/v), SDS 0,1% (p/v), tampón Tris-HCl 0,6 M (pH 8,8), TEMED (tetrametiletilendiamina) 0,1% (v/v) y APS (persulfato de amonio) 0,04% (p/v). 2) Gel de concentración (superior): acrilamida 4,8% (p/v), SDS 0,1% (p/v), tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8), TEMED 0,1% (v/v) y APS 0,04% (p/v).

Tratamiento y siembra de las muestras: Los extractos crudos se mezclaron 1:1 (v:v) con el tampón de siembra (0,06M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,025% azul de bromofenol) y se colocaron en baño a ebullición, 5 min para desnaturalizar las proteínas. Se sembró 40µl de cada mezcla muestra-tampón que equivalía a 25 µg de proteínas y 10 µl del marcador de peso molecular (Sigmamarker, wide range: 6,5-205 Kda, SIGMA).

Electroforesis: Previo a la siembra de las muestras se corrió el gel durante 1 hora en el amortiguador de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina y 0,1% SDS, pH 8,3). Posteriormente a la siembra el gel se corrió a 83 V, 25 mA durante 10 horas.

Tinción con plata (Oakley *et al.*, 1980): Se colocó el gel en solución fijadora (50% metanol, 12% acético, 0,5 ml/l formaldehído 37%) durante 12 horas. Se lavó 2 veces, 20 min cada vez, primero con una solución 50% y luego con otra 30% de etanol. Se realizó un pretratamiento de 1 min con $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/l). Se lavó 4 veces con agua destilada, 20 seg cada vez. Se impregnó con solución de plata (2 g/l nitrato de plata más 0,75 ml/l formaldehído 37%), 20 min. Se lavó 2 veces con agua destilada, 20 seg. Se sumergió y agitó suavemente en solución reveladora (60 g/l $\text{Na}_2 \text{CO}_3$, 0,5 ml/l formaldehído 37%, 4 mg/l $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) hasta la aparición de bandas. Se lavó 2 veces con agua destilada, 1 min y la reacción se detuvo agregando la mezcla de metanol 50%: acético 12%.

B) Proteínas de membrana plasmática

Aislamiento de la membrana plasmática (Modificación de la técnica de Dufour *et al.* 1988): 1) las levaduras se cultivaron en medio **a**, **b** o **c** según correspondía. 2) Cuando los cultivos alcanzaron la fase logarítmica tardía de crecimiento, las células se cosecharon y se las lavó dos veces con agua destilada helada. Se centrifugó a 755 g, 5 min cada vez. 3) Se midió el peso fresco y el pellet se resuspendió al 40% (p/v) en el medio de lisis (250 mM sacarosa, 50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7,5) y se mantuvo en hielo. 4) Se agregaron perlas de vidrio (Glasperlen, 0,45-0,50 mm, Brawn Biotecinternational GmbH), previamente enfriadas en hielo, aproximadamente 25 ml de perlas / 20g de células (peso fresco). 5) Se agregaron inhibidores de proteasas: se agregó una concentración de 1/1000 (v/v) de las soluciones patrón correspondientes a 1 mg/ml de peptina A, leupeptina, antipaina y quimostatina más 1/20 (v/v) de la solución patrón de 20 mM PMSF. Todas las soluciones

patrón se realizaron en DMSO 2% v/v. 6) Las suspensiones celulares se agitaron vigorosamente durante 20 seg y se las puso nuevamente en hielo. 7) Se repitió la operación anterior varias veces hasta comprobar microscópicamente la existencia de un 90% de células rotas. 8) Se recuperaron los restos celulares, libres de perlas de vidrio, con sucesivos lavados con el medio de lisis. 9) El lisado celular se centrifugó a 1500 g, 5 min, 4 °C (centrífuga Sorval, rotor SS34). 10) Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 2445 g, 5 min, 4 °C. 11). Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 23500 g, 40min, 4 °C. 12) Se recuperó el precipitado (mitocondrias y membranas) y se lo resuspendió en una solución que tenía: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM sulfato de magnesio, pH 7,5. Se homogeneizó la suspensión con un homogeinizador manual de vidrio con mortero de teflón. 13) Se trasvasó el contenido del tubo a un vaso de precipitado con una barra magnética y se lo colocó sobre un agitador. 14) Rápidamente se redujo el pH de 7 a 5,2 con una solución 1 M CH₃COOH. 15) Se centrifugó nuevamente a 10800 g, 25-30 seg, 4 °C. 16) Se recuperó el sobrenadante y rápidamente se elevó el pH de 5,2 a 7,5 con una solución 1 M NaOH. 17) Se centrifugó a 74000 g, 18min (ultracentrífuga Beckman L8-M, rotor Ti 70). 18) Se recuperó el precipitado (membranas) y se lo resuspendió en la solución de almacenado, MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), pH 6. 19) Se homogeneizó con un homogeneizador de vidrio y teflón. 20) Posteriormente, se distribuyó en viales más pequeños y se guardó a -80 °C. 21) Una muestra pequeña de la solución homogénea se separó y se le midió el contenido de proteínas por el método de Bradford. La pureza de la suspensión de membranas se verificó con un test de contaminación.

Test de contaminación: Determina el grado de contaminación con mitocondrias. El ensayo se realizó por duplicado, a 30 °C, en un volumen final de 1 ml que contenía 6 mM ATP, 9 mM MgCl_2 , 50 mM MES (pH 6), 10 mM azida sódica. Se realizó un blanco que tenía los mismos componentes anteriores más 3 ml de SDS 1% (p/v). También se preparó un tubo sin azida sódica (con este se realizó la medición de la ATPasa total: mitocondrial más de membrana plasmática). La reacción se inició con el agregado de 10 μl de la suspensión de membranas y se detuvo con el agregado de 3 ml de SDS 1% (p/v). Fueron exceptuados los tubos que ya tenían SDS. El P_i , liberado como consecuencia de la hidrólisis del ATP, se midió de la siguiente manera: se agregó a cada tubo 1 ml del reactivo molibdato de amonio (50 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 400 ml de 10 N H_2SO_4 , H_2O bidestilada csp 1 l), inmediatamente después se agregó 1 ml de reactivo de Elon (5 g de sulfato de p-metilaminofenol (Elon-Kodak), 15 g de NaHSO_3 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), H_2O bidestilada csp 500 ml). Luego de cada agregado se agitó vigorosamente. Después de 15 min a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 660 nm. En cada caso se substrajo el valor del blanco y se expresó como porcentaje, la diferencia entre los valores medidos en los tubos sin azida sódica (ATPasa total) y en los tubos con azida sódica (ATPasa de membrana plasmática). La diferencia porcentual obtenida representaba la proporción de membrana mitocondrial presente en la mezcla.

Geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE): Los geles se realizaron planos y discontinuos y tenían 0,75 mm de espesor: 1) Gel separativo (inferior): acrilamida 12% (p/v), tampón Tris-HCl 0,75 M con SDS 0,2% (pH 8,6), TEMED

(tetrametiletilendiamina) 0,05% (v/v) y APS (persulfato de amonio) 0,05% (p/v). 2) Gel de concentración (superior): acrilamida 5,2% (p/v), tampón Tris-HCl 0,25 M con SDS 0,1% (p/v) (pH 6,8), TEMED 0,3% (v/v) y APS 0,1% (p/v).

Tratamiento y siembra de las muestras: Las suspensiones de membranas fueron tratadas con tricloroacético (TCA) para precipitar proteínas: Volúmenes de muestra correspondientes a 10-15 µg de proteínas se mezclaron con 100 µl de agua y 400 µl de TCA (15% en agua destilada). Se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 14.000 rpm, 30 min, 4 °C en centrífuga Sorval, rotor SS34. Los precipitados se lavaron con 1 ml de agua bidestilada y se centrifugaron nuevamente a 14.000 rpm, 5 min, 4 °C en centrífuga Sorval, rotor SS34. Los precipitados se resuspendieron en el tampón de siembra [SDS 1,5% (p/v), ditioneitol (DTT) 20 mM, EDTA 2 mM, sacarosa 6%, azul de bromofenol 0,025% (p/v) y tampón Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8] en volúmenes adecuados para tener una concentración final de proteínas de 0,5 µg/µl.

Se sembró 20µl de cada mezcla muestra-tampón, que equivalían a 10µg de proteínas, y 10 µl del marcador de peso molecular (SDS-GH SIGMA: 29-205 Kda)

Electroforesis: El tampón de corrida estuvo compuesto por 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0,1% SDS (pH 8,3). Posteriormente a la siembra, el gel se corrió a 180V, durante 50 min (equipo Miniprotean II, Biorad).

Tinción del gel: Una vez terminada la corrida electroforética, el gel se sumergió en la solución de tinción [0,1% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% (v/v) metanol, 10% ácido acético] durante 30 min. Luego se realizaron sucesivos lavados con 40% metanol : 10% ácido acético, hasta decolorar el fondo y tener bandas nítidamente visibles.

Secado de los geles: Los geles se colocaron en bastidores entre láminas de celofán (Gel Air celophan-BIORAD) y se secaron a 45-55 °C durante 20 min y luego se dejaron a temperatura ambiente 24 horas más.

RESULTADOS Y DISCUSION

A) Proteínas totales

Se estudió el efecto que ejercía sobre la concentración total de proteínas, la presión osmótica del medio del crecimiento en las dos cepas halotolerantes (*D. hansenii* y HM92). Para ello se hicieron crecer ambas levaduras en YEPD sin sal y en YEPD + 2 M NaCl. El cultivo se cosechó al final de la fase log de crecimiento. Las células fueron tratadas con el fin de obtener protoplastos para preparar los extractos crudos. Con éstos se realizó una corrida electroforética en gel de poliacrilamida 12%, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El gel, que posteriormente fue teñido con plata, reveló que *D. hansenii* y HM92 incrementaron la concentración de algunas proteínas como consecuencia del crecimiento en

el medio hiperosmótico (Foto 5.1). Las proteínas inducidas por estas condiciones estaban comprendidas en un amplio rango de pesos moleculares. *D. hansenii* fue la cepa que tuvo mayor número de proteínas inducidas (Foto 5. 1, calle 5). En ambas cepas se observó que dos de las bandas más inducidas en el medio con sal (Foto 5. 1, calle 3 y 5) correspondían a pesos

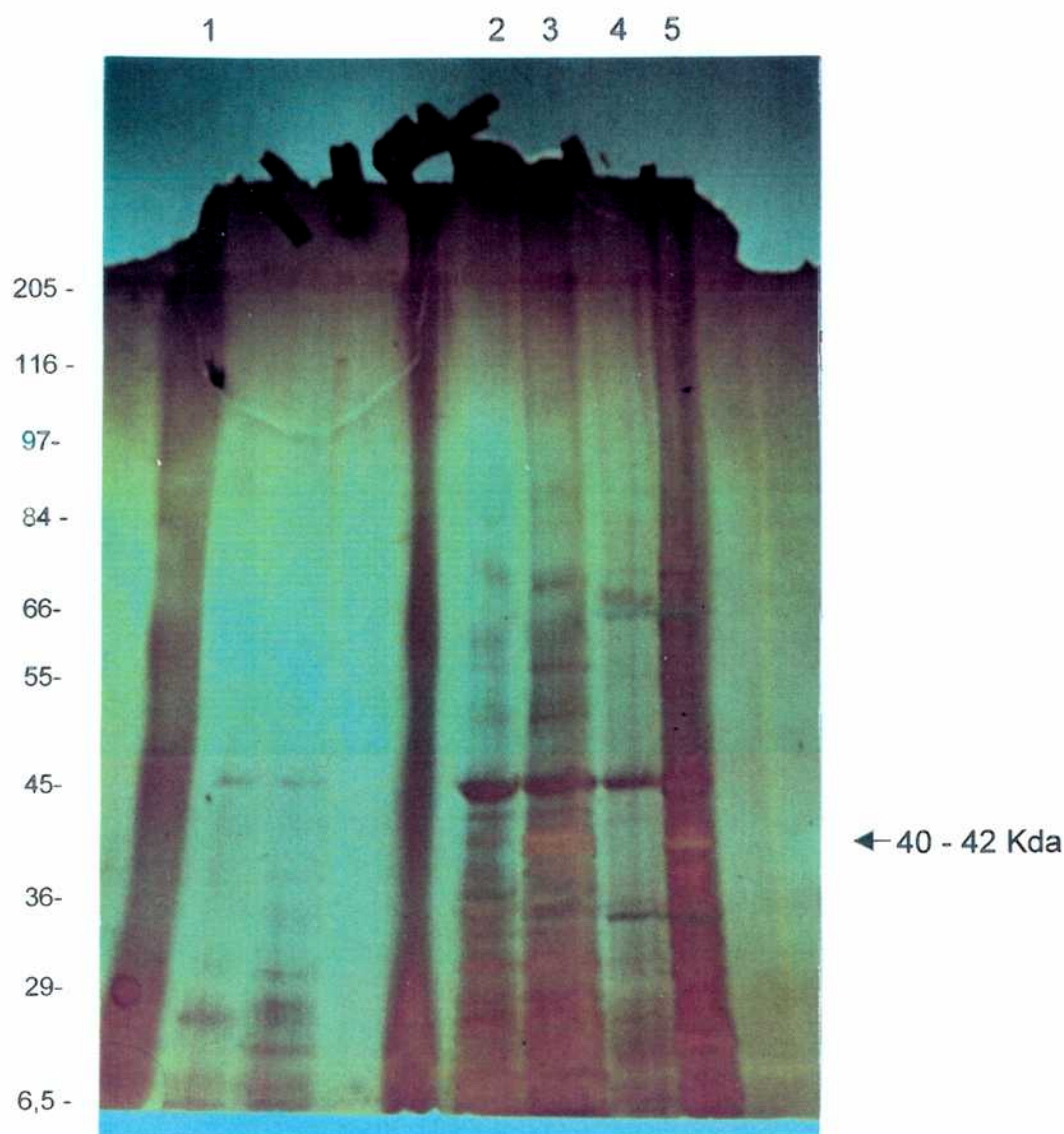


Foto 5.1: Electroforesis de proteínas totales en gel de poliacrilamida 12% con SDS (SDS-PAGE) de las cepas halotolerantes HM92 (líneas 2 y 3) y *D. hansenii* (líneas 4 y 5). Las cepas fueron crecidas en medio YEPD (líneas 2 y 4) y en medio YEPD + 2M NaCl (líneas 3 y 5). Los pesos moleculares (Kda) se indican (izquierda) según el marcador de peso molecular (línea 1).

moleculares de aproximadamente 40-42 Kda. Nilson y Adler (1990) aislaron y purificaron la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD^+) de *D. hansenii* que, en la ruta de síntesis del glicerol, es la responsable de la reducción de la dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3 fosfato. Estos autores observaron que esta proteína en una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida presentó una banda predominante correspondiente a un peso molecular de 42 Kda. Si tenemos en cuenta que en este trabajo también se observó una banda de un peso molecular de aproximadamente 42 Kda, inducida en el medio con sal, y que en estas mismas condiciones de crecimiento se observó también aumento en la producción de glicerol, podríamos asumir que esta banda corresponde a la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.

B) Proteínas de membrana plasmática

Los ensayos siguientes se realizaron teniendo en cuenta que un medio hiperosmótico provoca alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular y en los sistemas de transporte de solutos a través de ella. Se estudió el efecto del NaCl en la patrn de las proteínas de membrana plasmática. Se realizaron cultivos de *D. hansenii* y HM92 en YEPD e YEPD + 2 M NaCl. En estos ensayos se incorporó al estudio también a *S. cerevisiae*. Los cultivos de esta última se realizaron en YEPD e YEPD + 1,4 M NaCl (máxima concentración de NaCl en la que puede crecer, Capítulos III y IV). De cada cultivo se obtuvo la fracción celular correspondiente a membrana plasmática. Se utilizó para ello la técnica de Dufour *et al.* (1988) modificada. La pureza de las membranas se comprobó con un test que permite cuantificar la contaminación de las membranas con mitocondrias. El test determina la

presencia de ATPasa mitocondrial y se basa en la detección de características propias de la actividad de la ATPasa de membrana plasmática, como su estricta especificidad por el ATP y su insensibilidad a 10 mM de azida sódica. En todos los casos el ensayo arrojó como resultado un porcentaje mínimo de contaminación mitocondrial que varió entre 0 y 2%.

Las muestras se trataron con tricloroacético (TCA) para precipitar las proteínas. Luego se las sembró en un mini gel con 12% de acrilamida más SDS (SDS-PAGE). Después de la corrida, el gel fue teñido con Coomassie Blue. En la Foto 5. 2 se observa que las calles que

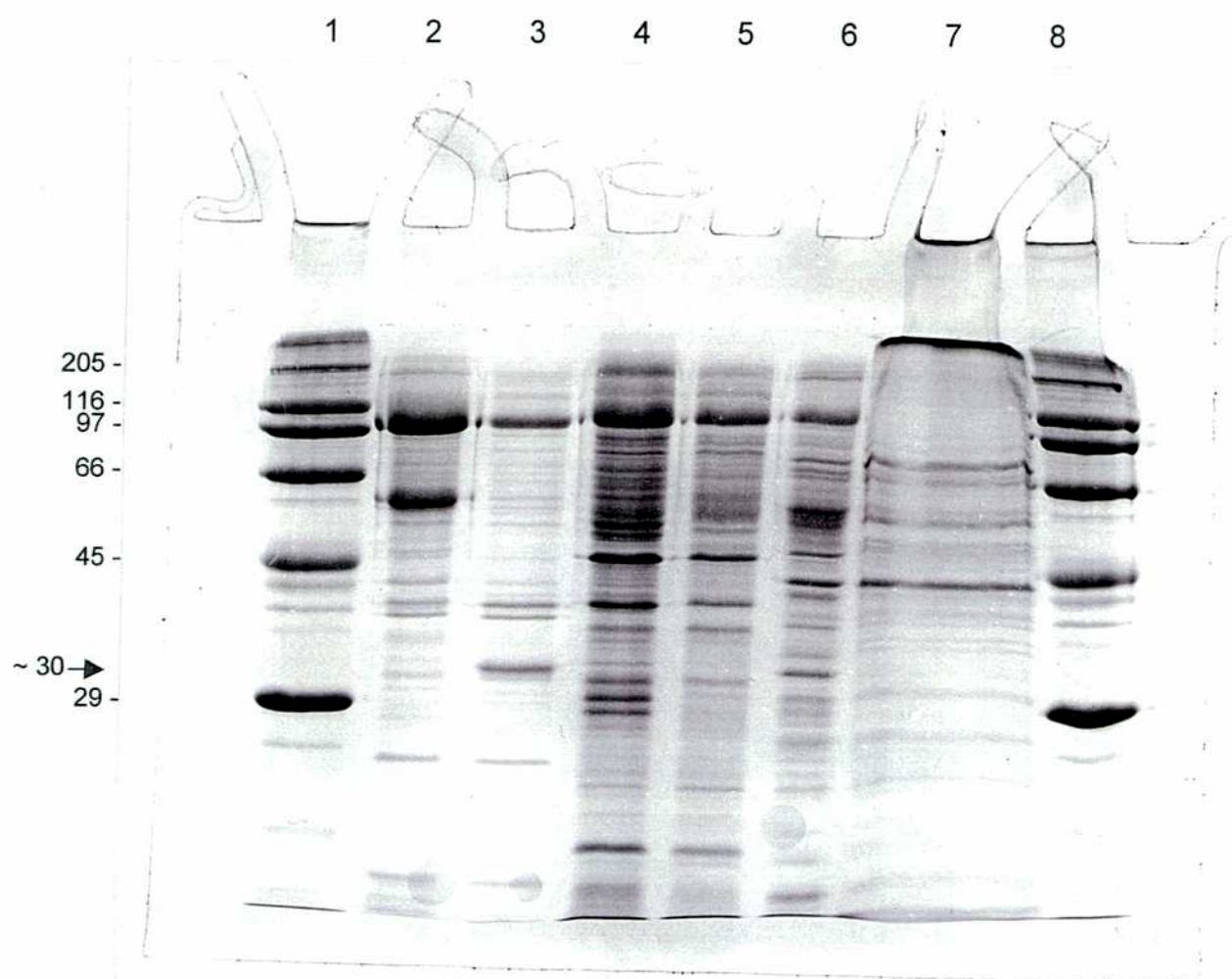


Foto 5.2: Electroforesis de proteínas de membrana plasmática en gel de poliacrilamida 12% con SDS (SDS-PAGE) de las cepas *D. hansenii* (líneas 2 y 3), HM92 (líneas 4 y 5) y *S. cerevisiae* (líneas 6 y 7). Las cepas fueron crecidas en medio YEPD (líneas 2, 4 y 6) y en medio YEPD + 2M NaCl (líneas 3, 5 y 7). Los pesos moleculares (Kda) se indican (izquierda) según el marcador de peso molecular (líneas 1 y 8).

corresponden a las células crecidas con NaCl tienen bandas de menor intensidad. Esto indica que cuando las células crecieron en el medio con elevada presión osmótica hubo una disminución de la concentración total de proteínas en la membrana. Sin embargo, en el caso de HM92 crecido en 2 M NaCl (Foto 5.2, calle 3) se observó una banda intensamente teñida que equivalía a un peso molecular de aproximadamente 32 Kda. Esta banda no se observó cuando la cepa creció en YEPD (Foto 5.2, calle 2). Con *D. hansenii* no se observó ninguna banda extra en ninguna condición de cultivo. *S. cerevisiae*, en medio sin sal, produjo una banda intensa de similar peso molecular a la observada en el híbrido que se atenuó en presencia de NaCl. Fisher *et al.*, (1994) estudiaron las proteínas sintetizadas por el alga *Dunaliella* crecida en medio con alto contenido de NaCl. Estos autores detectaron dos proteínas que eran inducidas en esas condiciones de cultivo. Una tenía un peso molecular de 150 Kda, la otra de 60 Kda y estaban en la membrana plasmática. Por la similitud en la intensidad de las bandas y el modo de inducción que ambas sufrían pensaron que podrían interactuar funcionalmente una con otra durante la adaptación osmótica del alga, aunque no se habían determinado sus funciones específicas.

Nosotros observamos que el perfil de proteínas obtenido con HM92 no se correspondía exactamente con el de ninguna de las dos cepas parentales en las condiciones de crecimiento utilizadas. El patrón de bandas del híbrido representó una mezcla de los patrones respectivos de ambas cepas.

Es indudable que la adaptación a un cambio osmótico en el medio de cultivo y el crecimiento en las nuevas condiciones ambientales implican cambios en la fisiología celular,

asociados a diversos tipos de proteínas. Los resultados obtenidos aquí respecto a los patrones diferenciales de proteínas totales y de membrana plasmática en distintas condiciones osmóticas son un claro indicio de esto y constituyen la base para la realización de futuros y más exhaustivos análisis.

BIBLIOGRAFÍA

Csonka, L.N. and Hanson A.D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: Genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology* 45, 569-606.

Dufour, J.P., Amory, A. and Goffeau, A. (1988). Plasma membrane ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology* 157, 513-533.

Fisher, M., Pick, U. and Zamir, A. (1994). A salt-induced 60-kilodalton plasma membrane protein plays a potencial role in the extreme halotolerance of the alga *Dunaliella*. *Plant Physiology* 106, 1359-1365.

Nilson, A. and Adler, L. (1990). Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogebase (NAD⁺) in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1034, 180-185.

Oakley, B.R., Kirsch, D.R. and Morris, N.R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 105, 361-363.

CONCLUSIONES

1) Se obtuvieron híbridos estables entre levaduras osmotolerantes y cepas de *S. cerevisiae* mediante la técnica de fusión de protoplastos.

a) Fusión *T. delbrueckii* x *S. cerevisiae* P-158:

- Se empleó con éxito la técnica de dador muerto, con la utilización de protoplastos de *T. delbrueckii* previamente muertos por calentamiento.
- Los P.F seleccionados, PB1, PB2 y PB3 fueron morfológicamente similares a *S. cerevisiae* pero capaces de crecer en medios con alta concentración de glucosa (hasta 700 g/l de glucosa) como el parental *T. delbrueckii*.
- PB1, PB2 y PB3 mostraron un patrón cromosómico muy similar entre sí y similar a la vez al del parental *S. cerevisiae*.
- En medio con 400 g/l de glucosa los híbridos produjeron etanol en concentraciones similares o aún mayores que las cepas parentales y polihidroxiálcoholes (glicerol y arabitol).

b) Fusión *D. hansenii* x *S. cerevisiae*-522:

- Se obtuvieron cepas híbridas (HM92 y HM93) con características propias de ambos parentales además de nuevas propiedades.
- Poseen el carácter osmotolerante de *D. hansenii*, pero tienen mayor velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) en medios con alta concentración de NaCl.
- Crecen a 37 °C como *S. cerevisiae*.

- Son morfológicamente muy similares entre sí y diferentes respecto a las cepas parentales.
 - Tienen patrones de fermentación y asimilación de azúcares distintos a los de ambos parentales.
 - Poseen un patrón cromosómico similar en número al de *D. hansenii* pero con algunas coincidencias en su composición con el de *S. cerevisiae*.
 - Producen etanol en medio basal (en concentraciones similares a *S. cerevisiae*) y también lo producen en medio con elevada presión osmótica aunque los valores obtenidos fueron menores.
- 2) Mediante la electroforesis de campo pulsado se obtuvo un patrón de 6-7 bandas para *D. hansenii*, revelando por primera vez que esta levadura posee un número cromosómico mucho menor que el de *S. cerevisiae* así como cromosomas de mayor tamaño que los de esta última.
- 3) El estudio de los sistemas de transporte de azúcares en las levaduras osmotolerantes reveló lo siguiente:
- *D. hansenii* y la cepa híbrida HM92 poseen al menos dos sistemas de transporte activo de monosacáridos, uno que transporta tanto xilosa como glucosa y otro específico para hexosas.
 - En HM92 la glucosa es transportada activamente en cotransporte de protones (sistema H⁺/symport). Este sistema debería provenir de la cepa parental *D. hansenii* aunque en ella no pudo demostrarse.
 - HM92 posee también el sistema de difusión facilitada para glucosa de *S. cerevisiae*.

4) El estudio del sistema de transporte de glicerol en *S. cerevisiae* y en las levaduras osmotolerantes *D. hansenii* y HM92 permitió concluir lo siguiente:

- Las cepas de *S. cerevisiae* y *D. hansenii* estudiadas, poseen los sistemas de transporte de glicerol observados por otros autores. Por lo tanto se puede asumir que en *S. cerevisiae* existen dos sistemas de transporte mediados para el glicerol: a) uno de baja afinidad, difusión facilitada, presente en células crecidas en glucosa y b) otro de alta afinidad, H⁺-glicerol symport, inducido durante el crecimiento en substratos gluconeogénicos, no involucrado en forma directa en la osmorregulación.
- *D. hansenii* posee un sistema activo y constitutivo de transporte de glicerol, Na⁺-glicerol symport, el cual no está sujeto a la represión por glucosa.
- En el PF HM92 coexisten los sistemas activos de transporte de glicerol que tienen las cepas parentales. El transporte con protones estaría desregulado en HM92 al no ser reprimido durante el crecimiento en glucosa.

5) Se observó que en la adaptación a elevadas concentraciones externas de NaCl las levaduras osmotolerantes, *D. hansenii*, HM92 y HM93, sufrieron diversas alteraciones en su fisiología y metabolismo celular:

- Disminución de la $\mu_{\max}$ de crecimiento.
- Disminución del rendimiento en la producción de biomasa.
- Aumento de la producción y de la retención intracelular de polioles, especialmente de glicerol.
- Alteración del transporte de monosacáridos como xilosa y glucosa.

- La alteración del ψ afectó el sistema de transporte de glucosa el cual disminuyó su afinidad por la hexosa (mayor K_T) ante crecientes cantidades de NaCl.
- Disminución del consumo específico de oxígeno en presencia de glucosa ante crecientes cantidades de NaCl.
- Alteración de los perfiles electroforéticos de proteínas totales y de membrana plasmática.



Dra. Lucía I. Castellanos de Figueroa
Director



Lic. María Alicia Loray
Tesista