

## Actividades enzimáticas del metabolismo glicosídico en distintas especies de levaduras

I. GARCIA, C. ROMAY, L. GARCIA, A. ALONSO y C. PASCUAL

Departamento de Diagnóstico y Evaluación de Medicamentos  
Centro Nacional de Investigaciones Científicas  
Ave. 25 y calle 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana

Recibido el 9 de septiembre de 1985

### RESUMEN

Se evaluaron las actividades enzimáticas de la vía glicolítica, invertasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, polioldeshidrogenasa, velocidad de producción de CO<sub>2</sub> y de consumo de oxígeno y velocidad de extrusión de protones en cepas de levadura de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis* y *Kluyveromyces fragilis*.

Las actividades enzimáticas específicas de la vía glicolítica se corresponden con la velocidad de hexosa consumida por el flujo glicolítico.

La actividad de alcohol deshidrogenasa constituye el paso limitante de la vía fermentativa en las distintas especies con excepción de *S. cerevisiae*.

Los resultados han permitido caracterizar la vía glicolítica en cada especie.

### SUMMARY

The enzymatic activities of the glycolytic pathway, invertase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, polyoldehydrogenase, velocity for CO<sub>2</sub> production and oxygen consumption as well as the proton extrusion rate were determined in yeast strains corresponding to species of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis* and *Kluyveromyces fragilis*.

The specific enzyme activities of the glycolytic pathway correspond to the calculated velocity of hexose consumed by the glycolytic flux. Alcohol dehydrogenase activity constitutes the limiting step of fermentation in all species except for *S. cerevisiae*.

A characterization of the glycolytic pathway in each one of the species studied were made.

## INTRODUCCION

Numerosas especies de levadura utilizan como vía metabólica principal la vía de la fructosa bifosfato o vía de Embden-Meyerhof-Parnas para la conversión de hexosas y pentosas en piruvato. El destino que subsiguientemente toma el piruvato es lo que determina un patrón de fermentación característico, o la oxidación de la hexosa por el ciclo del ácido cítrico. Un conocimiento de los factores fundamentales involucrados en la vía glicolítica de distintas especies de levadura permitiría un manejo racional de las fermentaciones y ofrece la posibilidad de construir organismos más eficientes (Wood, 1981).

Con el objetivo de evaluar la capacidad potencial que presentan distintas especies de levadura de interés industrial en la utilización y fermentación de azúcares, se determinaron las actividades enzimáticas de la vía glicolítica y otras funciones relacionadas con esta vía en *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida tropicalis* y *Kluyveromyces fragilis*.

Los resultados obtenidos han permitido caracterizar la vía glicolítica en cada especie. A excepción de *S. cerevisiae*, que se distingue por su elevada capacidad de fermentación alcohólica, puede concluirse que la actividad de alcohol deshidrogenasa constituye el paso limitante de la vía fermentativa para el resto de las especies estudiadas.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas empleadas

- *Saccharomyces cerevisiae* 196-2 (a his 6) (obtenida de M. Luzzati, París, Francia).
- *Candida tropicalis* (obtenida del cepario del ICIDCA).
- *Candida pseudotropicalis* (C<sub>23</sub>) (aislada de residuos azucareros en el CNIC).
- *Kluyveromyces fragilis* 19-30 (obtenida del cepario del ICIDCA).
- *Candida utilis* (Y900) (obtenida de P. S. Danson, NRC Canadá).

### Medio de crecimiento

Se utilizó el medio mínimo descrito por Galzy (Galzy y Slonimski, 1957), con glucosa al 2 por ciento como fuente de carbono.

### Condiciones de crecimiento

Las cepas crecieron en agitación a 30°C durante toda la noche, se recolectaron a finales de la fase exponencial por centrifugación y se lavaron tres veces con agua desionizada. El crecimiento celular se controló mediante la lectura de la absorbancia a 420 nm.

### Obtención de extractos enzimáticos

Se tomaron 100 mg de peso húmedo de células y se resuspendieron en 0,5 ml del tampón de la determinación enzimática, colocándose en un tubo que contenía un gramo de *glass beads* (60 mesh). El tubo se enfrió en baño de hielo, agitándose posteriormente en un vortex durante 1 min y manteniéndose 1 min en el baño; esta operación se repitió cuatro veces. El extracto

obtenido se centrifugó a 7 000 g durante 3 min. La concentración de proteína del extracto se determinó mediante el método de Biuret, utilizando albúmina sérica bovina como patrón de referencia.

### Determinaciones enzimáticas

Las enzimas estudiadas fueron: hexoquinasa (HK) (Bañuelos y Gancedo, 1978); fosfofructoquinasa (Pfk) (Gancedo y Gancedo, 1971); aldolasa (Ald) (Rutter y Hunsley, 1966); triosafato isomerasa (TPI) (Maitra y Lobo, 1971); gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (G1 y 3PD) (Maitra y Lobo, 1971); fosfogliceratoquinasa (PGI y K) (Maitra y Lobo, 1971); enolasa (Enol) (Clifton *et al.*, 1978); piruvatoquinasa (PK) (Bucher y Pfeleiderer, 1955); piruvato descarboxilasa (Polakis y Changesin, 1965); alcohol deshidrogenasa (ADH) (Wisensfeld *et al.*, 1975); poliol-deshidrogenasa (Scher y Horecker, 1966); lactato deshidrogenasa (LDH) (Kubowitz y Ott, 1943); glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD0) (Kuby y Noltman, 1966); 6-fosfogluconico deshidrogenasa (6PGD) (Pontremoli y Grazy, 1966) e invertasa (Hestrin *et al.*, 1955).

Todas las determinaciones se realizaron en un Spekol "Carl Zeiss" Modelo 210 a 340 nm.

### Determinaciones respirométricas

La producción de CO<sub>2</sub> y el consumo de oxígeno se determinaron en un microrrespirómetro de Warburg, de acuerdo con la técnica descrita por Umbreit (1957) a 30°C. En el compartimento principal se colocó 1 mg de peso seco de levadura en tampón fosfato de potasio 0,05 M pH 6,0 en un volumen total de 2,2 ml. La glucosa se colocó en el brazo lateral, iniciándose la reacción al verter la misma en el compartimento central. La concentración final de azúcar fue 100 mM.

En las mediciones de oxígeno se fijó el CO<sub>2</sub> liberado con un pedazo de papel de filtro Whatman No 1 de 2 x 2 cm, plegado y embebido en 0,2 ml de hidróxido de potasio 9 M.

Las mediciones de los manómetros se realizaron durante 70 min a intervalos de 10 min. Todos los valores se expresaron en  $\text{Umol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  peso seco.

### Determinación de la velocidad de extrusión de protones

La medición de la velocidad de extrusión de protones se realizó espectrofotométricamente a 540 nm, utilizando un método de alta sensibilidad con metil rojo como indicador (Pascual y Kotyk, 1982).

La concentración de células en cubeta fue de 2 a 4 mg de peso húmedo, la cual se calculó por mediciones de la absorbancia a 420 nm de la suspensión celular en agua (100 mg peso húmedo por ml). La concentración de glucosa utilizada para la determinación del Km y la velocidad máxima varió entre 0,19 a 18,5 mM (concentración final). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (25 a 30°C) en un Spekol "Carl Zeiss" 210.

## RESULTADOS

Existe una extraordinaria diferencia entre las cepas correspondientes a distintas especies, en relación con la capacidad de fermentación de glucosa a través de la liberación de CO<sub>2</sub> y a la actividad respiratoria medida por el consumo de oxígeno, por lo que determina que cada

especie presente un coeficiente respiratorio característico (tabla 1). A partir de estos resultados se ha calculado la velocidad de consumo de glucosa en la fermentación, respiración y por el flujo glicolítico (tabla 2). Para conocer qué actividad específica es la responsable de las diferentes velocidades de fermentación, se estudiaron diez enzimas de la vía glicolítica (tabla 3). Es conocido que en *S. cerevisiae*, las actividades enzimáticas que limitan la vía son las correspondientes a la fosfofructoquinasa, y en determinadas condiciones, hexoquinasa y piruvatoquinasa, así como el transporte de azúcares. Los resultados obtenidos indican que para *C. tropicalis* las actividades enzimáticas más bajas son: fosfofructoquinasa y alcohol deshidrogenasa. En *C. utilis* las actividades menores se encuentran en la porción inferior de la vía glicolítica a nivel de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. *Candida pseudotropicalis* presenta una actividad específica de fosfofructoquinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa relativamente baja. La característica que presenta *K. fragilis* es una actividad no detectable de alcohol deshidrogenasa y baja actividad de hexoquinasa y fosfofructoquinasa.

Tabla 1  
VALORES OBTENIDOS PARA LA FERMENTACION Y EL CONSUMO DE OXIGENO  
EN PRESENCIA DE GLUCOSA 100 mM

Cepa	CO <sub>2</sub> (Umol · min <sup>-1</sup> · g <sup>-1</sup> )	O <sub>2</sub>	Rq
<i>S. cerevisiae</i>	225,06 ± 8,44	11,26 ± 2,13	20,99
<i>C. tropicalis</i>	108,38 ± 6,58	81,70 ± 1,78	2,32
<i>C. utilis</i>	56,11 ± 1,50	78,22 ± 0,19	1,72
<i>C. pseudotropicalis</i>	13,16 ± 1,92	17,14 ± 1,40	1,76
<i>K. fragilis</i>	0	31,32 ± 2,38	1,00

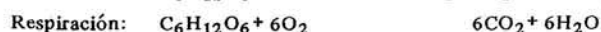
Rq =  $\frac{\text{CO}_2 \text{ total}}{\text{O}_2 \text{ consumido}}$

Tabla 2  
VALORES DE VELOCIDAD DE FERMENTACION, OXIDACION Y FLUJO GLICOLITICO  
CALCULADOS A PARTIR DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 1

Cepa	Velocidad de consumo de hexosa (Umol · min <sup>-1</sup> · g <sup>-1</sup> peso seco)		
	Fermentación	Oxidación	Flujo glicolítico
<i>S. cerevisiae</i>	112,53	1,87	114,40
<i>C. tropicalis</i>	54,19	13,60	67,80
<i>C. utilis</i>	28,05	13,03	41,08
<i>C. pseudotropicalis</i>	6,58	2,86	9,43
<i>K. fragilis</i>	0	5,22	5,22

Nota: En el cálculo se asume que todo el CO<sub>2</sub> es producido por la fermentación, y que todo el O<sub>2</sub> se consume en la respiración.

Se tuvieron en cuenta las siguientes ecuaciones:



El flujo glicolítico se calcula mediante la suma de la velocidad de hexosa que se utiliza en la fermentación más la que se utiliza en la oxidación.

Tabla 3  
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PRINCIPALES ENZIMAS DEL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS

Actividad enzimática específica ( $\text{Umol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>K. fragilis</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. pseudotropicalis</i>
Hexoquinasa	0,39	0,20	0,16	0,36	0,29
Fosfofructoquinasa	0,41	0,12	0,13	0,25	0,15
Aldolasa	0,77	0,29	0,82	0,50	0,66
Triosafofato isomerasa	6,30	10,20	6,21	8,98	6,36
Gliceraldehído-3P-deshidrogenasa	2,00	0,98	1,06	0,10	0,19
P-Gliceratoquinasa	2,71	0,95	0,67	0,03	0,34
Enolasa	0,92	0,77	0,95	0,42	0,60
Piruvatoquinasa	5,50	1,14	2,35	1,55	2,05
Piruvato descarboxilasa	0,84	0,49	0,42	0,30	0,13
Alcohol deshidrogenasa	1,21	0,01	0,00	0,38	0,07
Lactato deshidrogenasa	0,15	0,09	0,00	0,03	0,01
Poliol deshidrogenasa	0,43	0,00	0,05	0,12	0,02
Glucosa-6P-deshidrogenasa	0,18	0,16	0,14	0,24	0,16
6-fosfogluconico deshidrogenasa	0,19	0,18	0,16	0,28	0,20

La característica común a todas las especies es una elevada actividad de triosafofato isomerasa y piruvatoquinasa y una actividad muy baja de la enzima representativa de la formación de ácido láctico (lactato deshidrogenasa). Las actividades enzimáticas de la vía de hexosamonofato: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa presentan poca variación entre las cepas. La polioldeshidrogenasa, enzima representativa de la utilización de poliol presenta la actividad específica más elevada en *S. cerevisiae* y *C. utilis*.

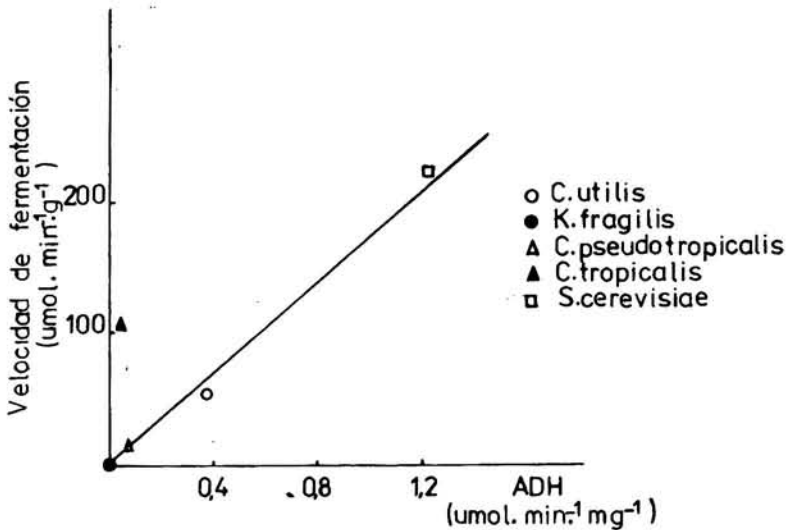


FIG. 1. Correlación entre la actividad de alcohol deshidrogenasa y la velocidad de fermentación.

La hidrólisis de sacarosa es la primera función que debe realizar la levadura para la utilización de este disacárido. Por tal motivo se caracterizó la actividad de invertasa mediante determinación de  $K_m$ , velocidad máxima y pH óptimo (tabla 4). *C. utilis* presenta dos pH óptimos, uno en la región ácida y otro en la región cercana a la neutra; mientras que *C. tropicalis* no presenta pH óptimo para la invertasa en la región ácida, como ocurre en el resto de las especies.

Tabla 4  
PARAMETROS CINETICOS DE LA INVERTASA DE CEPAS INDUSTRIALES

Cepa	$K_m$ (mM)	$V_{max.}$ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	pH óptimo
<i>S. cerevisiae</i>	1,2	30,2	4,5
<i>K. fragilis</i>	6,3	58,0	3,0
<i>C. pseudotropicalis</i>	0,1	44,5	3,2
<i>C. utilis</i>	0,2	26,5	3,1 - 6,3
<i>C. tropicalis</i>	0,5	49,5	7,0

A causa de que la actividad de extrusión de protones se encuentra íntimamente relacionada con la vía glicolítica, se estudió esta función en las distintas especies. Mientras que existe una elevada afinidad del sistema de extrusión de protones para la glucosa en todas las especies con poca variación, por el contrario existe una gran versatilidad de la velocidad máxima (tabla 5).

Tabla 5  
VALORES DE  $K_m$  Y  $V_{max.}$  OBTENIDOS PARA LA EXTRUSION DE PROTONES FRENTE A LA GLUCOSA

Cepa	$K_m$ (mM)	$V_{max.}$ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )
<i>S. cerevisiae</i>	2.87	52.40
<i>K. fragilis</i>	1.70	41.00
<i>C. pseudotropicalis</i>	0,78	25.20
<i>C. utilis</i>	0.50	12.60
<i>C. tropicalis</i>	1.20	25,50

## DISCUSION

La velocidad de fermentación y la velocidad de hexosa consumida por el flujo glicolítico en las condiciones de ensayo utilizadas en este estudio varía en orden decreciente como sigue: *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. pseudotropicalis* y *K. fragilis*.

La cepa con mayor capacidad fermentativa (*S. cerevisiae*), presenta el menor consumo de oxígeno, lo cual indica una eficiente represión catabólica de las enzimas respiratorias provocada por el azúcar.

Las cepas correspondientes a las especies *K. fragilis*, *C. utilis* y *C. tropicalis*, presentan capacidad respiratoria. De las funciones que utilizan oxígeno, el principal consumidor lo constituye, sin duda alguna, la cadena respiratoria, ya que otras reacciones que utilizan oxígeno como biosíntesis de ácidos grasos no saturados y ergosterol, son prácticamente despreciables.

El bajo nivel de hexosa que pasa por el flujo glicolítico en las cepas correspondientes a las especies *K. fragilis* y *C. pseudotropicalis* muy posiblemente se deba a que estas presentan distintos requerimientos que el resto de las cepas para que la vía fructosa bifosfato funcione a mayor velocidad, aunque no se descarta la existencia de otras vías alternativas para el catabolismo de azúcares. A partir del estudio enzimático se establece que las actividades específicas de la vía glicolítica detectadas dan cuenta del flujo de hexosa a través de esta vía. Por otra parte, la actividad específica de invertasa es muy superior al resto de las enzimas de la vía glicolítica, por lo que no debe constituir un factor limitante para la metabolización de este disacárido.

Resultado de notable interés es la correlación que existe entre la actividad de alcohol deshidrogenasa y la velocidad de fermentación en las cepas correspondientes a las distintas especies. Puede concluirse que la actividad de alcohol deshidrogenasa constituye el paso limitante de la vía fermentativa a excepción de *S. cerevisiae*, que es la especie caracterizada por una elevada capacidad de fermentación alcohólica por excelencia. La ATPasa de la membrana plasmática desempeña un papel fundamental en la velocidad de extrusión de protones en *S. cerevisiae* (Peña, 1980; Serrano, 1980; Serrano, 1983). Se ha demostrado (Pascual y Kotyk, 1982; Pascual *et al.*, 1983) que en esta especie la velocidad de extrusión de protones se correlaciona con la velocidad de fermentación. Sin embargo, existen condiciones (Serrano, 1980) en que puede lograrse una disociación entre estas dos funciones. Los resultados en el presente trabajo indican que la velocidad de extrusión de protones en las distintas especies no se correlaciona con la velocidad de fermentación. El caso más característico corresponde a la cepa *K. fragilis*, que no fermenta, pero presenta una velocidad de extrusión cercana a la de *S. cerevisiae*. Es muy probable que además de la ATPasa de la membrana plasmática otros factores como la ATPasa mitocondrial, liberación  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  y compuestos ácidos, desempeñen un papel predominante en la extrusión de protones de esas cepas. Los resultados presentados permiten caracterizar a las distintas especies estudiadas, conocer su capacidad fermentativa y metabólica, así como los sitios que potencialmente deben ser manipulados genéticamente para mejorar sus características productivas.

## REFERENCIAS

- BAÑUELOS, M. y C. GANCEDO (1978). *In situ study of the glycolytic pathway in S. cerevisiae*. Arch. Microbiol. **117**: 200.
- BUCHER, T. y G. PFLEIDERER (1955). *Methods in Enzymology*. Ed. W. A. Wood Academic Press, New York. **I**: 435-440.
- CLIFTON, D.; S. B. WEINSTOCK y D. G. FRAENKEL (1978). *Glycolysis mutants in S. cerevisiae*. Genetics **88**: 1-11.
- GANCEDO, J. M. y C. GANCEDO (1971). *Fructose 1,6 Diphosphatase, Phosphofructokinase and Glucose 6 phosphate dehydrogenase from fermenting and non-fermenting yeast*. Arch. Microbiol. **76**: 132-138.
- GALZY, P. y P. P. SLONIMSKI (1957). *Variations de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique ou sur le glucose comme seule source de carbone*. C. R. Acad. Sci. (París) **245**: 2423.
- HESTRIN, D. S.; D. S. FEINGOLD y M. S. SCHRAMM (1955). *Methods in Enzymology*. Ed. Colowich, S. P. y Kaplan, N. O., Acad. Press, New York. **I**: 251-257.
- KUBY, S. A. y E. A. NOLTMAN (1966). *Methods in Enzymology*. Ed. Colowich, S. P. and Kaplan, N. O., Acad. Press, New York. **IX**: 116-125.
- KUBOWITZ, F. y P. OTT (1943). Biochem. Z **314**: 94. Referido en *Methods in Enzymology*. **IX**: 296-297 (1966). Ed. W. A. Wood Academic Press Inc. New York.
- MAITRA, P. K. y Z. LOBO (1971). *A kinetic study of glycolytic Enzyme Synthesis in Yeast*. J. Biol. Chem. **246**: 475-488.

- PASCUAL, C. y A. KOTYK (1982). *A simple spectrophotometric method for determining proton release from yeast cells*. Anal. Biochem. **123**: 201-204.
- PASCUAL, C.; C. ROMAY y K. SIGLER (1983). *Proton extrusion in Saccharomyces cerevisiae mutants in very dilute suspensions* Folia Microbiológica **28**: 353-362.
- PEÑA, A. (1980). *The transport of cations in yeast. Characteristic and postulated mechanisms*. En: Stewart, G. S. and Russel, J. Ed. *Advances in Biotechnology*, Pergamon Press, pp. 305-310.
- POLAKIS, E. S. y B. N. CHANGESIN (1965). *Enzyme activities in S. cerevisiae during aerobic growth on different carbon sources*. Biochem. J. **97**: 284-297.
- PONTREMOLI, S. y E. GRAZY (1966). *Methods in Enzymology*. Ed. W. A. Wood Academic Press, New York and London, **IX**: 137-141.
- RUTTER, W. J. y J. R. HUNSLEY (1966). *Methods in Enzymology*. Ed. W. A. Wood Acad. Press, New York and London. **IX**: 480-486.
- SCHER, B. M. y B. L. HORECKER (1966). *Methods in Enzymology*. Ed. W. A. Wood Acad. Press, New York and London. **IX**: 166-170.
- SERRANO, R. (1983). *In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase*. FEBS Lett. **56**: 11-14.
- SERRANO, R. (1980). *Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory deficient yeast*. Eur. J. Biochem, **105**: 419-424.
- UMBREIT, W. W.; R. H. BURRIS y J. F. STAUFFER (1957). *Manometric Techniques*, 3rd. edn., Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- WISENFELD, M.; L. SCHIMPFESSEL y R. CROKAERT (1975). *Multiple forms of mitochondrial alcohol dehydrogenase in S. cerevisiae*. Biochem. Biophys. Acta. **405**: 500-512.
- WOOD, W. A. (1981). *Basic biology of microbial fermentation*. En: Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemical. Ed. Hollaender Basic Life Sciences Plenum Press New York. **18**: 3-17.