



Metabolismo II- (vias glicolíticas)

1- Un investigador aisló una bacteria mutante que tiene bloqueada la glicólisis entre la formación de acetaldehído y etanol. Esta mutante no es capaz de crecer en condiciones de anaerobiosis en glucosa pero sí es capaz de crecer en presencia de O_2 . Mencione una posible explicación bioquímica para esta observación.

2- Parte A.- Se obtiene un microorganismo que produce CO_2 , etanol, y los ácidos acético y láctico como productos finales de la fermentación. El mismo fue inoculado en un medio de alta (medio A) o baja (medio B) concentración de glucosa. Luego de 72 hs de incubación, se cuantificaron los productos finales de la fermentación en el medio de cultivo. Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Medio A	Medio B
CO_2	2	50
Láctico	50	15
Acético	3	60
Etanol	2	40

Los datos están expresados como moles por mol de glucosa

a) Explique cuál sería la causa y el significado fisiológico de este cambio en el perfil de fermentación.

Parte B.- Se sabe que la enzima clave en ese cambio metabólico es la piruvato formato liasa (PFL). Un cultivo creciendo en alta glucosa se centrifugó y las células se resuspendieron en medio con baja glucosa. A distintos tiempos desde el cambio se midió la densidad óptica y la actividad PFL (Fig 1)

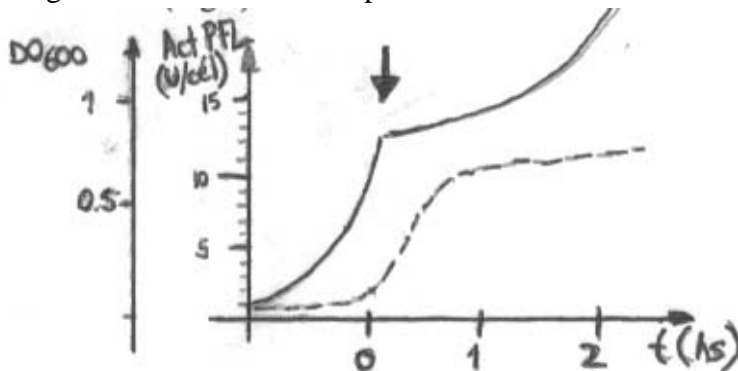


Fig.1 Actividad PFL en condiciones de alta o baja glucosa. Un cultivo creciendo en alta glucosa fue transferido a baja glucosa en el momento indicado por la flecha. Se midió la densidad celular como densidad óptica a 600 nm (—) y la actividad PFL como unidades de enzima por célula (-----).

Para analizar el mecanismo que media la activación de PFL se realizó un experimento de Western blot utilizando anticuerpos específicos de PFL (Fig. 2). Se realizó también un experimento de Northern blot con una sonda específica de PFL (Fig. 3)

t(min) 0 15 30 60



Fig.2. Western blot con anticuerpos anti-PFL. A distintos tiempos después del cambio se tomaron células y se prepararon extractos totales en buffer de muestra. En cada calle se sembró igual cantidad de proteína.

0 15 30 60

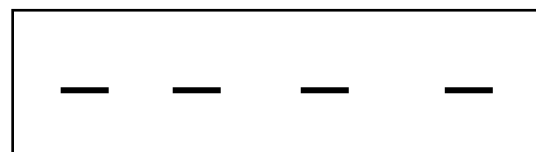


Fig.3. Northern blot con sonda específica de PFL. A distintos tiempos después del cambio se tomaron células y se preparó RNA total. En cada calle se sembró igual cantidad de RNA

b) Describa e interprete las figuras 1, 2 y 3.

c) Considerando que la velocidad de síntesis de la proteína PFL está directamente relacionado con el nivel de mRNA específico, proponga un modelo de regulación que explique los cambios observados durante la transición de alta a baja glucosa. Imagine el mecanismo que media esos cambios.

3- Se realizaron cultivos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas utilizando las siguientes cepas de *E coli*: wt, Δ transportadores de glucosa y Δ formato-hidrogeno liasa (enzima que cataliza la oxidación del ácido fórmico a CO₂). Se utilizó un medio base con glucosa como única fuente de carbono y rojo de metilo (indicador de pH que vira al azul en condiciones alcalinas y amarillo en condiciones acidas). Además, en condiciones anaeróbicas se agregaron campanas de Durham. Indique los resultados esperados a las 48 hs de incubación y justifique metabólicamente los mismos. Si uds no supiera en que tubo esta cada cepa, podría diferenciar las mismas por los resultados?

4- Las bacterias lácticas se dividen en dos grupos, homofermentativas y heterofermentativas. La enzima clave de las primeras es la **aldolasa**, que cliva la fructosa 1,6 bifosfato en dos moléculas de 3 carbonos. El gliceraldehído 3 fosfato es luego convertido a piruvato y finalmente a lactato. El segundo grupo, en cambio, carece de la enzima aldolasa y para fermentar las hexosas debe oxidarlas a 6-fosfogluconato y luego decarboxilar éste para generar una pentosa fosfato, La pentosa-fosfato es clivada luego por la enzima clave **fosfocetolasa** a triosa-fosfato (que conduce a piruvato como en el grupo de las homofermentativas) y acetil-fosfato, que es luego reducido a etanol para alcanzar el balance redox y utilizar los electrones del NADH que se generó durante la formación de la pentosa-6-P.

a) Compare las dos rutas en cuanto a rendimiento energético (moles de ATP por mol de glucosa).

b) Si Ud tiene dos bacterias lácticas que pertenecen a distinto grupo, y las pone a crecer sin agitación en medio que contiene glucosa como única fuente de carbono, puede distinguir cuál es cuál? Cómo?

5- *Streptococcus bovis* es un microorganismo capaz de vivir a expensas de la fermentación de la glucosa en medios de cultivos con un rango de pH que oscila entre 6,5 y 5 utilizando diferentes vías fermentativas. Para entender el mecanismo de obtención de energía para su crecimiento, se estudiaron dos enzimas principales en las rutas fermentativas y la influencia del pH externo sobre el pH interno de este microorganismo. Se realizaron diferentes ensayos para la medición del pH interno de *S. bovis* cultivando en un medio ajustado a diferentes pH. Se utilizó un marcador fluorescente para determinar en cada cultivo el pH interno de *S. bovis*. Con los resultados obtenidos se realizó el siguiente gráfico (fig. 1).

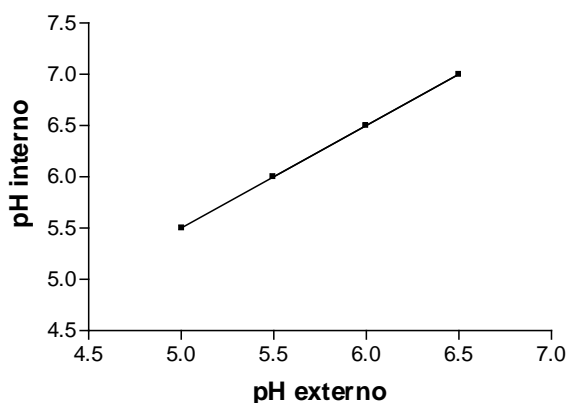


Fig 1. Relación entre el pH interno bacteriano en relación al pH del medio de cultivo

Se creció *S. bovis* en medio 98-5 ajustado a pH: 5,0; 5,5; 6,0 y 6,5. Se incubaron durante 12 hs a 39°C y luego se agregó BCCP (indicador de pH interno). Se incubaron durante 1 h y posteriormente se cosecharon y lavaron las células con solución salina. Se realizaron espectros de absorbancia para determinar el valor del pH interno.

A continuación se estudió el comportamiento de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato formato liasa (PFL) purificadas -intervinientes en la fermentación de la glucosa- en un rango de pH que varía entre 5 y 8.5, obteniéndose los siguientes resultados (fig. 2):

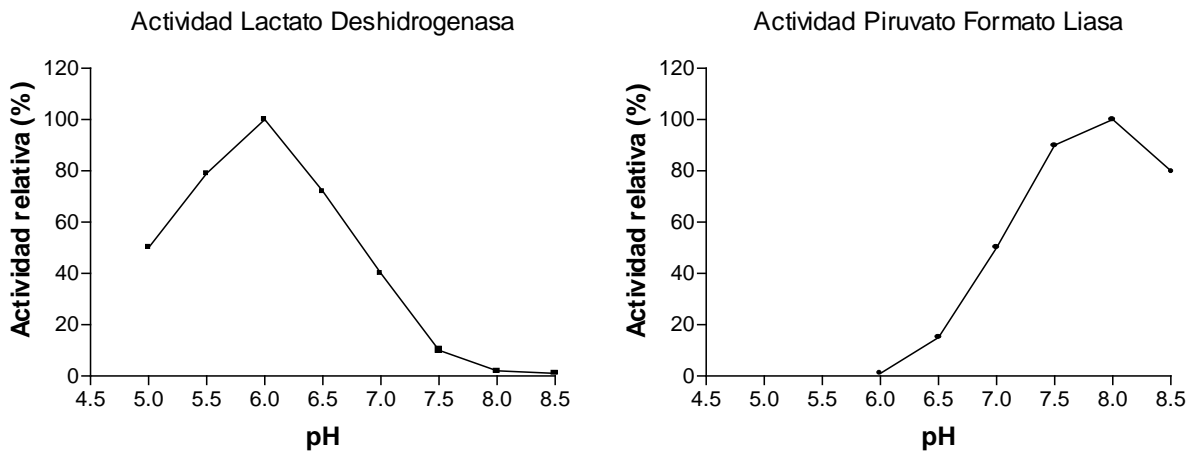


Fig 2: Actividad de lactato deshidrogenasa y piruvato formato liasa purificadas de extractos de *S. bovis*.

Las enzimas fueron purificadas de cultivos de *S. bovis* realizados a pH 7,0 y ensayadas sus actividades con protocolos estándar. La actividad de cada una fue analizada a los pH indicados en las gráficas.

Para completar el estudio sobre la fermentación de la glucosa por esta bacteria, se analizó la actividad de ambas enzimas -LDH y PFL- en presencia de diferentes metabolitos de la glucólisis. Solo se encontró efecto cuando al medio de incubación se le agregó fructosa 1,6 difosfato (FDF). Debido a esto, se analizaron las actividades enzimáticas en estudio en un rango fisiológico de FDF (0 y 1 mM). La actividad se midió a dos pH: 6 y 7. Los resultados obtenidos se presentan en los siguientes gráficos (fig. 3).

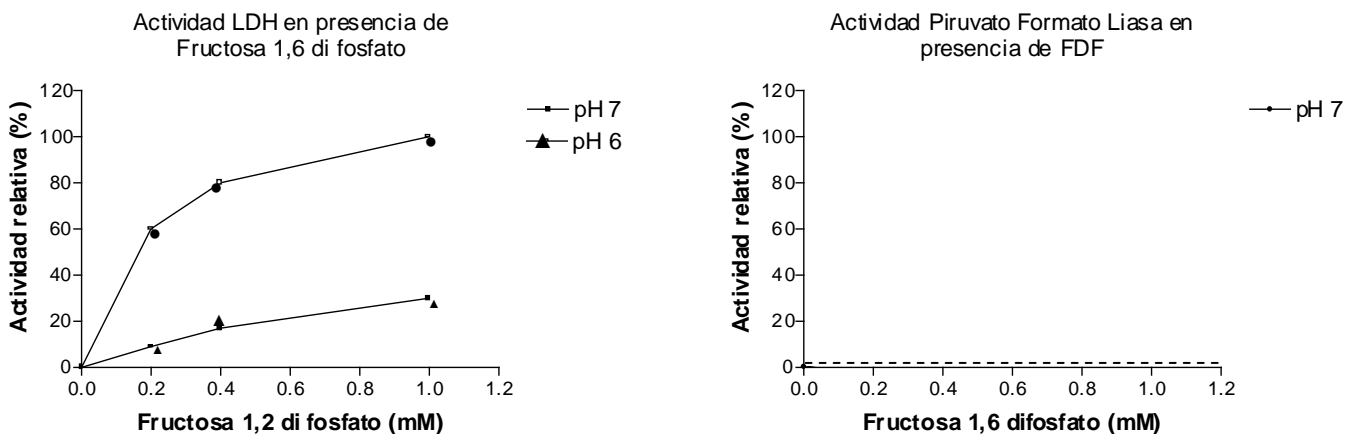


Fig 3: Efecto de la fructosa 1, 6 difosfato sobre las actividades LDH yPFL.

La actividad de los controles se midió en ausencia de FDF en cada pH indicado. La actividad en los gráficos está representada como porcentajes por mayores al control.

Indique:

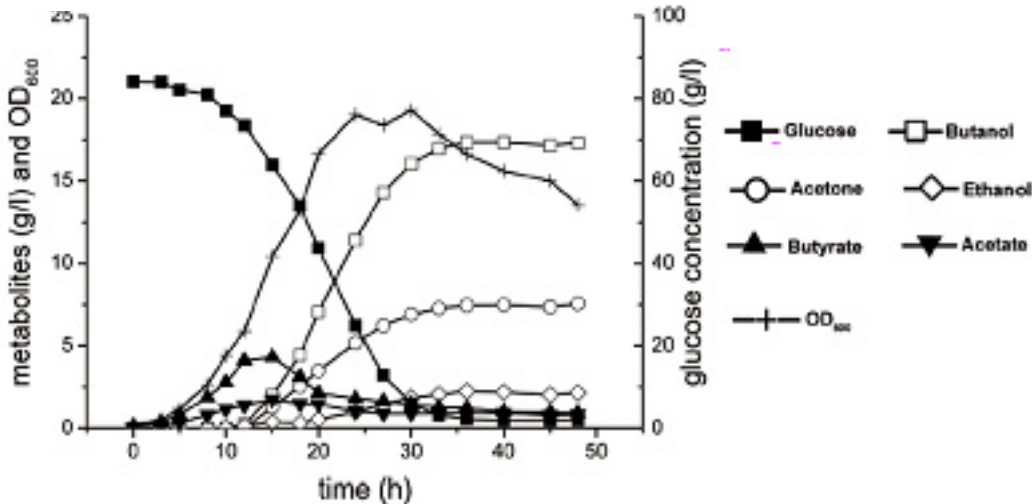
- a) En qué rutas fermentativas intervienen las enzimas estudiadas?
- b) El pH del medio de cultivo afecta a este microorganismo? De qué manera?
- c) Qué productos finales de la fermentación espera encontrar en cultivos crecidos a pH 6,5? Y a 5,5? Justifique.
- d) Cual es el efecto de la FDF?

Realice un esquema representando la fermentación de la glucosa por *S. bovis* e incorporando los conocimientos adquiridos en los diferentes experimentos (fig 1, 2 y 3).

6.- *Clostridium acetobutylicum* es un microorganismo que se utiliza para la producción industrial de butanol y otros productos. En un laboratorio de investigación se desarrolló una cepa con elevada producción de solventes y tolerante a los mismos.

Se muestra las curvas de crecimiento de esta cepa cuando se la creció con glucosa como única fuente de carbono (Fig 1)

Fig 1: Crecimiento de *C. acetobutylicum*



- Cuáles son los principales productos de la fermentación a las 15 hs de crecimiento? Y a las 40?
- Podría estimar la diferencia de pH del medio en ambos puntos de la curva? (no se piden números, sino una comparación de pH)

Para conocer en más detalle las causas del cambio en el perfil de fermentación que se obtiene a lo largo de la curva, se realizó el siguiente experimento: se crecieron bacterias durante 15 hs como en el experimento de la Figura 1, y al cabo de ese tiempo las células se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron en medio tamponado a distintos pHs y se continuó la incubación por 24 hs más manteniendo condiciones constantes de pH (Fig 2). Al cabo de esta incubación se determinaron los productos obtenidos en cada caso.

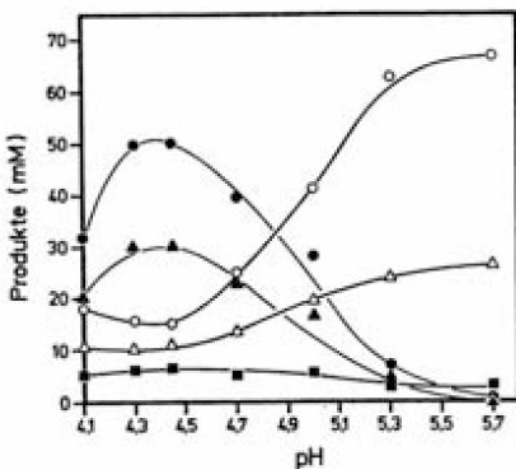


Fig. 2: Determinación de los productos finales de la fermentación

● acetone, ▲ butanol, ■ ethanol, △ acetate, ○ butyrate

- En base a estos resultados, puede estimar por qué cambia el patrón de fermentación de *C. acetobutylicum* después de las 15 hs de crecimiento en la Fig. 1?

d) Teniendo en cuenta las rutas de fermentación de *Clostridium acetobutylicum*, señale las rutas más activas a 15 hs y a 40 hs en un cultivo similar al de la Fig. 1. Justifique.

7. *Termoproteus tenax* es una arquea hipertermófila capaz de crecer quimiolitotroficamente en H_2 , CO_2 y S^0 , y quimiorganoheterotroficamente en la presencia de S^0 y sustratos orgánicos como glucosa, almidón o amilosa. *T. tenax* posee dos vías diferentes para el catabolismo de la glucosa: una variante de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof -Parnas (EMP) y la vía no-fosforilativa de la ruta de Entner-Doudoroff (ED). Para investigar la importancia de estas vías catabólicas *in vivo* se realizaron los siguientes experimentos:

a. Para estudiar la utilización relativa *in vivo* de estas dos vías degradativas se analizó el flujo de carbono en células crecidas en presencia de $(1-^{13}C)$ glucosa determinando la distribución de marca en el amino ácido alanina incorporada en la proteína celular. Dependiendo de la vía usada, la marca en el ^{13}C del precursor se espera en posición C-1 (ED) o en posición C-3 (EMP) de la alanina, que es el producto de la aminación directa del piruvato.

El análisis de alanina en hidrolizados de células dio los siguientes resultados:

^{13}C en posición C-1: 3.8% +/- 0.2 %

^{13}C en posición C-3: 7.0 % +/- 0.3%

b. Se estudió una enzima que pudiera estar potencialmente involucrada en regular el metabolismo de glucosa. Se purificó y caracterizó la enzima glucosa deshidrogenasa que cataliza la oxidación irreversible de la glucosa usando NAD^+ o $NADP^+$ como cosustratos y es la primera enzima en la vía de ED.

La enzima se purificó a homogeneidad. El PM por SDS-PAGE fue de 41 kDa.

Se midió la actividad en presencia y ausencia de $NADP^+$ y su PM por filtración en gel (Tabla I)

Tabla I: Actividad específica y PM de la glucosa deshidrogenasa de *T. Tenax* purificada a homogeneidad.

	Actividad específica (U/mg.prot.)	PM por filtración en gel (kDa)
Ausencia de $NADP^+$	1.0	600
Presencia de $NADP^+$	202.0	84

Se determinaron las propiedades cinéticas de la enzima: curvas de saturación en presencia de glucosa, xilosa, $NADP^+$ y NAD^+ mostraron cinética clásica de Michaelis-Menten.

En presencia de $NADP^+$: $Km_{glucosa}$ 0.3 mM, V_{max} 40 U/mg. prot.

Km_{xilosa} 8.0 mM, V_{max} 60 U/mg.prot.

En presencia de glucosa: Km_{NAD^+} 86 mM

Km_{NADP^+} 0.7 mM

La actividad no fue modificada por la presencia de ATP, ADP o AMP.

Preguntas:

a. Qué puede concluir sobre la funcionalidad de las vías de EMP y ED en la arquea *T. tenax*?

b. Cómo podrían interpretarse los resultados obtenidos en presencia y ausencia de $NADP^+$? Justifique brevemente.

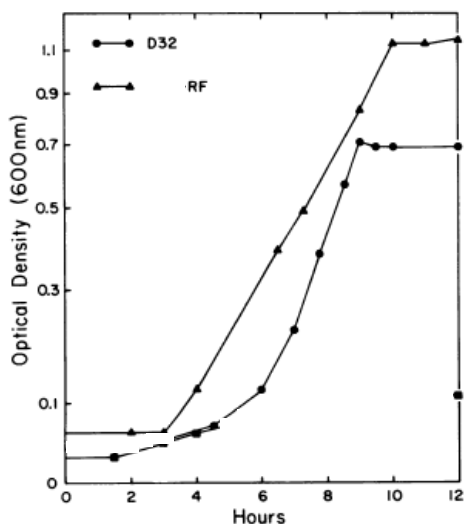
c. En base a la caracterización de los parámetros cinéticos de la glucosa deshidrogenasa de *T. tenax*, cuáles serían a su criterio los sustratos y co-sustratos usados *in vivo*? Justifique.

d. Teniendo en cuenta los estudios cinéticos, se podría sugerir que la glucosa deshidrogenasa de *T. tenax* es una enzima clave en la regulación del flujo del carbono por la vía de ED en esta arquea? Justifique

e. Mencione en forma muy general qué diferencias o similitudes presenta la vía ED de *T. tenax* respecto de la vía ED de *Pseudomonas* o *E. coli*.

8. *Lachnospira multiparus* es una bacteria utilizada en digestores de celulosa. Este microorganismo es capaz de degradar la pectina a ácido poligalacturónico (APG) y metanol. Durante su crecimiento solo utiliza los APG produciendo un patrón de fermentación típico: acético, láctico, fórmico, etanol, CO₂ e H₂.

Se estudió el crecimiento en medio con pectina como única fuente de carbono (Fig. 1) y se analizó el perfil de la fermentación (Tabla 1) de dos aislamientos de diferente origen.



Productos de fermentación	<i>L. multiparus</i>	<i>L. multiparus</i>
	D32	RF
Acético	12,03	16,70
Propiónico	0,17	0,18
Butírico	0,0	2,06
Etol	1,25	0,0
Metanol	5,50	0,0
Láctico	2,07	0,04
Fórmico	3,42	0,09
CO ₂	17,2	12,60
H ₂	1,63	0,13

Figura 1: Crecimiento de *L. multiparus* D32 y RF.

Se realizaron cultivos utilizando 0,2% de pectina como única fuente de carbono. A cada tiempo se extrajo una muestra y se midió el crecimiento (A_{600}).

Tabla 1: Productos finales de la fermentación.

Se obtuvo el medio libre de células a las 12 hs de incubación y se cuantificaron los diferentes productos a través de una cromatografía gaseosa. Los valores están expresados en mmol/l.

Debido a los cambios observados en el patrón de fermentación entre los cultivos se estudió la pureza de los aislamientos por DGGE. Mientras que en el aislamiento D32 sólo se encontró *L. multiparus*, en el aislamiento RF se determinó la existencia de dos microorganismos: *L. multiparus* y *Eubacterium limosum*. Este último microorganismo es capaz de utilizar metanol y H₂-CO₂ como fuente de energía para la producción de butirato como producto final de la fermentación pero incapaz de utilizar pectina o etanol.

- Analice e interprete la figura y la tabla.
- Como podría explicar los cambios producidos en el perfil de fermentación de *L. multiparus* en presencia de *E. limosum*?
- Infiriendo que la concentración del segundo microorganismo es muy baja, como explicaría las diferencias de crecimiento de *L. multiparus*?

9. *Pseudomonas aeruginosa* es descrita como una bacteria aeróbica no fermentativa ya que no es capaz de crecer utilizando glucosa, gluconato o piruvato como única fuente de carbono en condiciones anaeróbicas. Inesperadamente, se encontraron células viables en cultivos anaeróbicos con piruvato luego de 18 días de incubación. Se decidió estudiar este hecho, para lo cual se realizaron cultivos anaeróbicos en presencia y ausencia de piruvato (Fig. 1A) y posteriormente se

analizaron los productos generados además de la desaparición de piruvato del medio (Fig 1 B). No se detectaron ácido fórmico ni etanol.

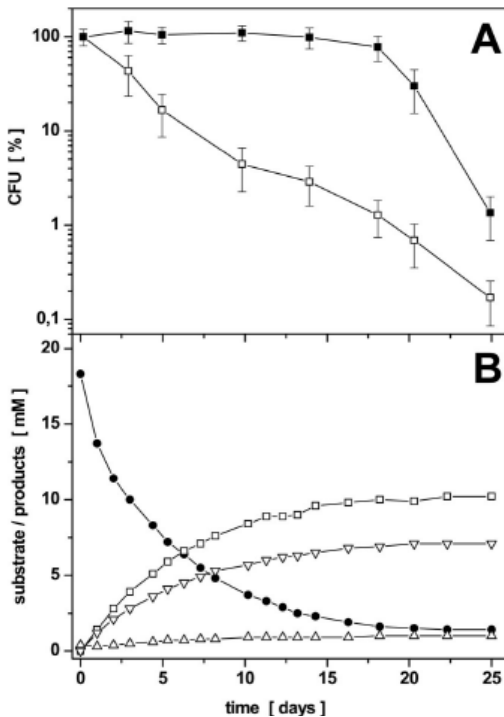


Fig 1: Incubación de *P. aeruginosa* en presencia de piruvato.

A.- Las células se crecieron a un $DO_{600} = 0,3$, se lavaron y resuspendieron en medio base en presencia (■) o ausencia (□) de 20 mM piruvato. Se incubaron en condiciones anaeróbicas tomando muestras a los diferentes tiempos. Se determinó el número de células viables en medio LB.

B.- Los productos del medio libre de células obtenidos del cultivo con piruvato fueron detectados por medio de HPLC. Lactato (□); piruvato (●); acetato (▽); succinato (Δ).

Para verificar la capacidad metabólica de *P. aeruginosa*, se tomaron muestras del cultivo a los 10 días, se centrifugaron y resuspendieron en medio fresco (Fig 2 B) o con el agregado de nitrato como aceptor de electrones (Fig 2 A).

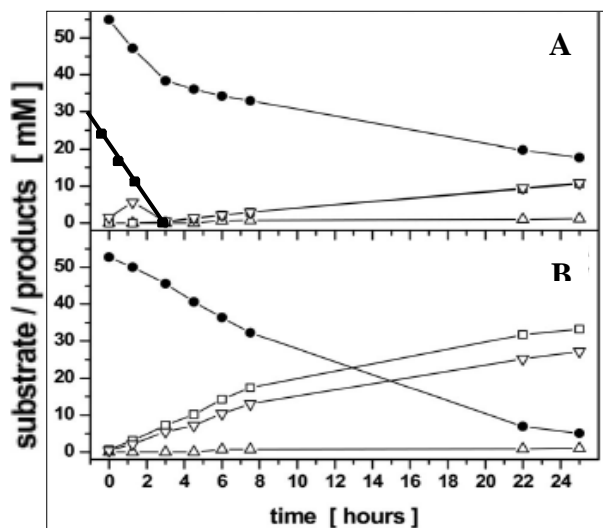


Fig. 2: Actividad metabólica de *P. aeruginosa*

Se tomaron muestras de cultivos con piruvato de 10 días de la figura 1. Las células fueron lavadas y resuspendidas en medio fresco mas nitrato (A) o en medio fresco (B). Se tomaron muestras cada hora y se determinó la concentración de sustratos y productos formados en el medio. Nitrato (■); lactato (□); piruvato (●); acetato (▽); succinato (Δ).

Preguntas

- Analice la Fig 1. Como explica las diferencias entre +/- piruvato. **Justifique.**
- Compare las figuras 2 A y B. Explique los procesos que están ocurriendo.
- Esta Ud de acuerdo con la descripción de *P. aeruginosa*? **Justifique.**

d) Grafique el crecimiento de *P. aeruginosa* que esperaría en las figuras 2 A y B. (OD_{600} inicial = 0,3)