

Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona
(Prof. F. Ponz)

Fermentación alcohólica endógena en la levadura*

Ramón Parés-Farrás**

(Recibido para publicar el 15 de abril de 1956)

Introducción

Utilizando una técnica manométrica, BARKER (3) pudo demostrar que la mayor parte de las fuentes de carbono añadidas al medio como sustrato, no eran completamente oxidadas por el alga *Prototheca zophii*. Así, por ejemplo, el oxígeno consumido era tan sólo un 30 % del teóricamente necesario para oxidar a anhídrido carbónico y agua la glucosa desaparecida del medio. Como no se pudo demostrar la presencia de productos intermedios de la oxidación, BARKER emitió la hipótesis de que parte del sustrato era asimilado por la célula, probablemente bajo la forma de un polisacárido de reserva.

La incompleta oxidación de ciertos sustratos observada por BARKER en *Prototheca zophii*, posteriormente también se puso de manifiesto en muchos otros microorganismos, particularmente bacterias y levaduras (7, 8).

Utilizando levadura de pan, STIER, NEWTON y SPRINCE (30) y STIER y NEWTON (31) suministraron pruebas experimentales de la síntesis de polisacáridos durante la absorción aeróbica de glucosa.

También con levadura de pan, WINZLER y BAUMBERGER (33)

* Parte de la Memoria doctoral leída en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona en marzo de 1956

** Becario del Patronato Juan de la Cierva.

mostraron que el calor producido durante la respiración corresponde solamente a la oxidación del 75 % de la glucosa absorbida.

PICKETT y CLIFTON (18) comprobaron la hipótesis de BARKER en *Saccharomyces cerevisiae*. Estudiaron directamente el incremento del carbono celular, determinando el azúcar reductor contenido en la célula después de su hidrólisis ácida. En sus experimentos encuentran en el medio una considerable cantidad de productos intermediarios.

A partir de los datos obtenidos en observaciones manométricas, WINZLER y BAUMBERGER (33) establecieron la siguiente relación estaquiométrica para la asimilación aeróbica de la glucosa en la levadura.



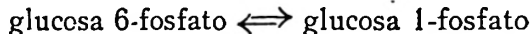
Sin embargo, atendiendo al incremento de carbono observado en la célula directamente mediante análisis químico, PICKETT y CLIFTON (18) admiten que sólo es asimilado la mitad del valor que se expresa en la ecuación anterior.

En la fermentación de glucosa por células de levadura, VAN NIEL y ANDERSON (16) encontraron que en reposo divisional, dos terceras partes de la glucosa absorbida son degradadas, produciendo cantidades equimoleculares de anhídrido carbónico y etanol. La determinación del aumento de peso seco de las células puso de manifiesto que el tercio restante era asimilado. Resultados concordantes encontraron más tarde FALES y BAUMBERGER (10).

Por métodos citológicos, también se ha demostrado el almacenamiento de glucógeno o de un polisacárido parecido en las células de levadura. LINDEGREN (14) señala que en medios ricos en azúcar y sin otras sustancias nutritivas, puede demostrarse con lugol el acumulo de grandes cantidades de gránulos de glucógeno en el citoplasma de la levadura. Según dicho autor, bajo circunstancias favorables, este glucógeno puede llegar a constituir hasta un 40 % o más del peso seco de las células.

Probablemente la formación de glucógeno comprende la síntesis de glucosa 6-fosfato por la reacción de la hexoquinasa. Mediante una fosfoglucomutasa vendría luego su conversión a glucosa 1-fosfato, que finalmente, por la influencia de la fosforilasa, se convertiría en glucógeno (1).

La reacción



puede verificarse in vitro con enzimas aisladas. En estas condiciones ha demostrado ser completamente reversible.

En células vivas de levadura, el glucógeno asimilado también debería poder volver al estado de glucosa 6-fosfato, y de aquí

ser degradado siguiendo el mismo camino que el de la glucosa que se consume inmediatamente después de ser absorbida. Sin embargo, STIER y STANNARD (29) y luego ROTHSTEIN y BERKE (24), han señalado que, en ausencia de sustrato exterior, la respiración del glucógeno tiene lugar muy lentamente. En condiciones anaeróbicas, los autores señalados (23, 24) y otros (27, 28, 33), encuentran una fermentación endógena prácticamente nula. El glucógeno de las células de levadura no podría ser fermentado más que muy lentamente durante una prolongada anaerobiosis (26).

ROTHSTEIN y BERKE (23, 24) encuentran que la adición de cantidades adecuadas de 2.4-dinitrofenol (DNP) o de azida sódica, pueden inducir la producción anaeróbica de considerable cantidad de dióxido de carbono en células de levadura sin sustrato exterior.

La acción del DNP y la azida sódica sobre la asimilación aeróbica en los microorganismos ya había sido muy estudiada anteriormente por otros autores (7, 8). Concentraciones apropiadas de estos inhibidores enzimáticos aumentan el consumo de oxígeno, acercándolo al valor teórico para el cual sería oxidada la totalidad del sustrato tomado del medio exterior.

BURRIS y WILSON (6) y REINER y SPIEGELMAN (19) habían sugerido que la acción del DNP y la azida podía explicarse igualmente admitiendo que se inhibe la asimilación como que se movilizan las reservas, impidiéndose su almacenamiento. Corroborando a esta sospecha, el trabajo de ROTHSTEIN y BERKE (23) anteriormente citado, ha venido a confirmar experimentalmente la segunda alternativa.

BARRON, MUNTZ y GASVODA (4), encontraron que en la levadura, el ión uranilo inhibe la utilización aeróbica y anaeróbica de glucosa exterior. Más tarde ROTHSTEIN y LARRABEE (20) dieron varias pruebas experimentales que confirmaron la hipótesis propuesta por aquellos autores de que la acción del uranilo se lleva a cabo exclusivamente sobre la membrana celular.

Siguiendo los anteriores resultados, ROTHSTEIN, MEYER y HURWITZ (22) no encontraron ninguna acción del ión uranilo sobre la respiración endógena en la levadura. Los mismos autores (21) mostraron que la fermentación endógena inducida por el DNP o la azida tampoco era sensible a la acción de este inhibidor enzimático.

En el presente trabajo se muestra un procedimiento con el que también resulta posible inducir una considerable fermentación endógena del glucógeno sin la intervención de efectores químicos.

Material y métodos

1) MANEJO Y DETERMINACIÓN DE LA LEVADURA.

Se ha utilizado levadura fresca de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*). Para separar las materias extrañas contenidas en la levadura comercial, antes de utilizarse se lava dos veces con agua destilada, recogién dose por centrifugación. En el primer sedimento sólo se separa el 80 ó 90 % del material en suspensión. De este modo las células muertas y los fragmentos celulares se eliminan con el líquido sobrenadante.

La levadura lavada se dispersa nuevamente en agua destilada. El pH de la suspensión se lleva entre 3 y 4 con ClH O,1 N y utilizando papel como indicador. En todos los casos este pH se mantiene sensiblemente constante a lo largo de los experimentos, sin necesidad de la presencia de un tampón.

No ha sido necesario un control riguroso del pH por cuanto pudo comprobarse que pequeñas diferencias de acidez no modificaban apreciablemente los resultados.

Se han ensayado diversos procedimientos para determinar la concentración celular de una suspensión de levadura. La medida del peso seco resultó poco apropiada para poder preparar de antemano y en poco tiempo suspensiones de una concentración fija. El peso húmedo representa siempre un valor poco preciso, puesto que la cantidad de agua de una pequeña porción de levadura comprimida es siempre variable.

Las suspensiones de levadura lavada se sedimentan con facilidad. Después de diversos ensayos, decidimos tomar como medida de la concentración celular el sedimento constante expresado en milímetros de un mililitro de suspensión centrifugada a 1,800 revoluciones por minuto.

Para la determinación del sedimento se utilizan tubos de 2 ml. de capacidad, con un rabo capilar calibrado en divisiones de 0.002 ml. Para cada medida se toma con una pipeta una cantidad apropiada de suspensión y se coloca en el tubo de sedimentación. Cada vez se efectúa la misma operación en dos tubos. A 1.800 r. p. m. se centrifuga a sedimento constante. De la lectura del mismo puede obtenerse el valor del sedimento S en ml./ml.

Experiencias seriadas con una misma suspensión no dan diferencias en el sedimento superiores a 0.002 ml. Por lo tanto, trabajando con volúmenes apropiados para obtener sedimentos de alrededor de 0.080 ml., el mayor error no debe sobrepasar un $\pm 1'25$ %.

Conocido el valor de S , un sencillo cálculo permite hallar la dilución que deberá efectuarse para obtener una nueva sus-

pensión de levadura con un sedimento cualquiera S' , más pequeño que el anterior.

Todos los resultados se han obtenido con respecto a una determinada concentración celular expresada en ml./ml. de sedimento. Para poder comparar nuestros resultados con los de otros autores, se han obtenido las equivalencias entre peso húmedo medio, peso seco y sedimento (Cuadro I y fig. 1).

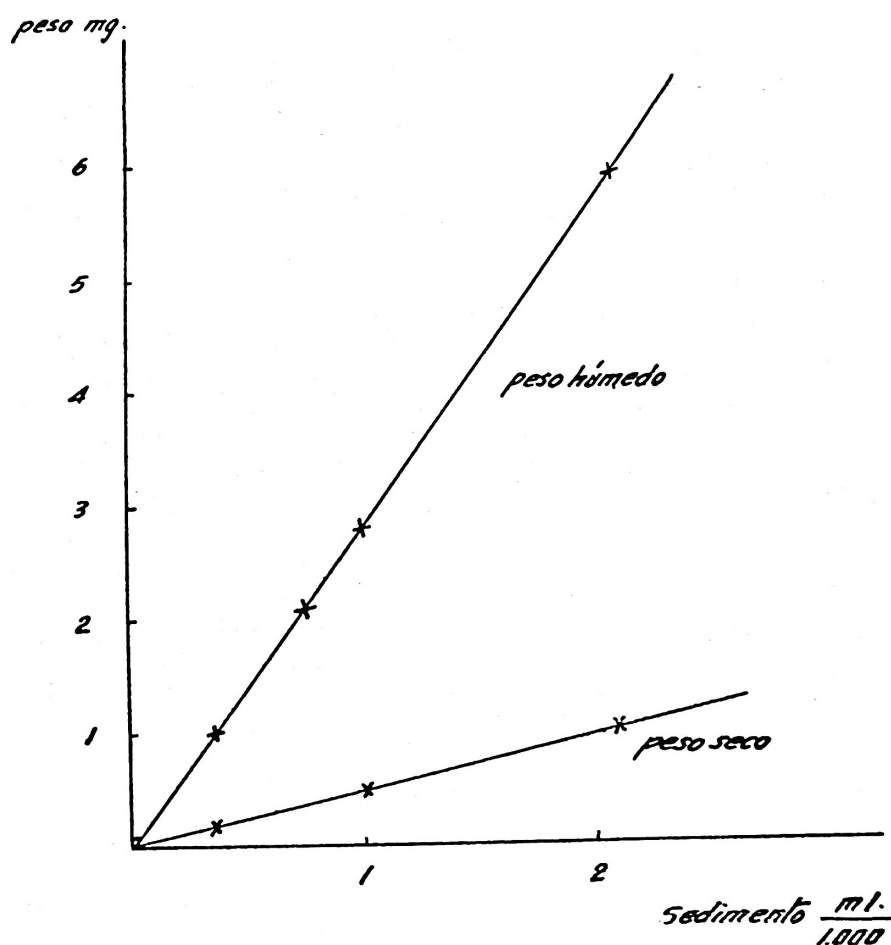


Fig. 1

El peso seco ha sido determinado por desecación a peso constante a 110° .

Probablemente, por nefelometría también podría llevarse a cabo un adecuado control de la concentración celular.

CUADRO I

Peso húmedo medio	Peso seco	Sedimento
1, g.	0,1701 g.	0,358 ml.
5,879 g.	1, g.	2,105 ml.
2,793 g.	0,4751 g.	1, ml.

2 UTILIZACIÓN ANAERÓBICA DE GLUCOSA EXTERIOR.

Para las experiencias de utilización de glucosa exterior, la levadura debe mantenerse previamente en agua destilada y con buena aireación. El objeto de este tratamiento estriba en eliminar las reservas endocelulares que influyen en la absorción de glucosa. La influencia de las reservas sobre la actividad respiratoria y fermentativa de la levadura ha sido extensamente estudiada por LINDEGREN (12, 13).

La operación previa de vaciado de reservas es empleada en la mayor parte de los trabajos sobre absorción de sustratos por la levadura. Sin embargo, existen discrepancias entre los autores en cuanto a la duración de la misma. Así, ROTHSTEIN y LARRABEE (20) como STIER y STANNARD (28) la efectúan en cinco horas, mientras que BOLCATO, SCEVOLA y VALCURONE (5) la prolongan hasta 24 horas. Nosotros no hemos encontrado diferencias apreciables entre las suspensiones sometidas a este tratamiento por más de tres horas. En consecuencia, en nuestros experimentos de absorción se ha mantenido previamente a la levadura en agua destilada sólo por espacio de tres a cuatro horas. Recientemente, ROTHSTEIN (25) ha señalado un tiempo de vaciado todavía inferior, de una a dos horas.

En los ensayos de absorción, el pH de las suspensiones debe controlarse después del tratamiento previo de vaciado de reservas. En suspensiones de levadura en agua destilada, el pH se altera sensiblemente después de una a dos horas de almacenamiento. Por el contrario, en presencia de glucosa se mantiene constante.

Para las medidas de absorción se ha seguido esencialmente el mismo procedimiento utilizado por ROTHSTEIN y LARRABEE (20).

En un baño maría a 30° C, se disponen por duplicado los ensayos que se van a verificar. En tubos relativamente largos y estrechos se coloca la glucosa y el inhibidor disueltos en la mitad del volumen final de solución. Para cada experimento se colocan dos tubos con glucosa sola.

A intervalos sucesivos de cinco minutos se añade a dos tubos cada vez la levadura dispersada en un volumen de agua mitad del total. Se agita suavemente y se cubre con un tapón de aceite de parafina. Siempre se ha trabajado con un volumen final de 8 ml.

Transcurridos 30 minutos, el contenido de los tubos correspondientes se centrifuga a 1,800 r. p. m. durante tres o cuatro minutos. Del líquido sobrenadante se toma el volumen conveniente para que diluido a 25 ml. resulte adecuado para la determinación de glucosa.

Para las concentraciones celulares empleadas, las condiciones de la absorción suponen, prácticamente, una completa anaerobiosis. Sin embargo, para concentraciones de levadura muy pequeñas, o para altos valores de inhibición, debe tenerse en cuenta el oxígeno inicialmente disuelto. Esta consideración tiene especial importancia en el estudio de inhibidores que afecten desigualmente a la respiración y a la fermentación de la glucosa.

Durante los 30 minutos de absorción tiene lugar cierto grado de sedimentación espontánea de la levadura. La absorción total es mayor cuando la levadura ha permanecido perfectamente dispersada durante todo el tiempo. Sin embargo, este hecho no modifica los resultados que persigue esta técnica, por cuanto lo que interesa determinar no es la absorción absoluta, sino la relación entre la absorción con inhibidor y la absorción sin inhibidor. Ambas están igualmente afectadas por la sedimentación.

Para la determinación de la glucosa se ha utilizado el método de FOLIN-WU (9, 11, 17), con electrofotómetro.

Como se ha indicado anteriormente, se centrifuga la suspensión de levadura después de los 30 minutos de absorción. Para una concentración inicial de glucosa del 0'3 % se toman 1 ó 2 ml. del líquido sobrenadante, según que la absorción haya sido más o menos intensa. Este volumen se diluye a 25 ml. con agua destilada. De aquí se procede a la determinación de glucosa con 2 ml. de solución, siguiendo la técnica ordinaria de FOLIN-WU.

Se ha comprobado que si en una solución de glucosa 0'3 % se dispersa levadura (0,03 ml./ml.) y se centrifuga inmediatamente, en el sobrenadante se mantiene la concentración inicial de glucosa. Por lo tanto, las determinaciones en el sobrenadante deben expresar con bastante fidelidad la glucosa realmente utilizada por las células.

No es necesario tomar ninguna precaución frente a eventuales sustancias solubles que la levadura pueda haber cedido al

medio durante la absorción. Ensayos con defecación previa de proteínas no dieron ninguna diferencia.

3) MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE ANHÍDRIDO CARBÓNICO.

Para la determinación del anhídrido carbónico se ha utilizado la técnica manométrica de WARBURG (2, 32).

En el cuadro II se encuentran los valores de las constantes empleadas.

CUADRO II

$\alpha = 0,66 \text{ ml. CO}_2/\text{ml. (30}^\circ \text{ C.)}$.
 $P_0 = 10,000 \text{ mm.}$
 $T = 273 + 30 = 303^\circ \text{ K.}$
 $v_1 = 4 \text{ ml.}$
 $v_g = \text{volumen de la fase gaseosa hasta la división 150 del manómetro. Determinado para cada uno de ellos por previo calibrado con mercurio.}$

Para producir condiciones anaeróbicas, se pasa corriente de nitrógeno por los frascos durante 30 minutos. El nitrógeno es previamente purificado por paso a través de pirogalato alcalino (1 volumen de ácido pirogálico al 25 % + 5 volúmenes de potasa cáustica al 30 %). La presión del nitrógeno se mantiene constante por medio de una válvula de agua de 30 cm. de altura.

Durante el paso de nitrógeno y durante la producción de anhídrido carbónico, los frascos se mantienen dentro del baño del aparato de WARBURG a 30° C. ($\pm 0,05^\circ \text{ C}$) y con una agitación de 3 cm. de amplitud y 100 oscilaciones por minuto.

4) MECANISMO DE AIREACIÓN.

Cuando ha convenido mantener constante la presión parcial de oxígeno en una suspensión de levadura, se ha hecho pasar a su través una fuerte corriente de aire mediante un inyector de 14,5 cm. de agua de presión, que corresponde aproximadamente a unos 3 l./min.

Resultados

1. Producción de anhídrido carbónico sin glucosa exterior.

a) Células sin incubación.

Se han obtenido varias comprobaciones del pequeño metabolismo endógeno anaeróbico que presenta la levadura en ausencia de sustrato exterior. En el cuadro III se representan los resultados obtenidos en varios experimentos.

b) Células previamente incubadas aeróbica y anaeróbicamente.

Se estudió si el aumento de las reservas glucídicas de las células incrementaba la producción anaeróbica de anhídrido carbónico. Se dispersaron 5 g. de levadura fresca en una solución de glucosa al 5 % hasta un volumen total de 100 ml. Se mantuvo a 30° C, permaneciendo constante la presión parcial de oxígeno por continua inyección de aire. El propio paso de gas impide toda sedimentación de las células.

CUADRO III

μl. de CO₂ desprendidos en atmósfera de nitrógeno en 1/2 h. y a 30° C., por 4 ml. de una suspensión en agua destilada de células de levadura previamente lavadas.

*Concentración celular 0,03 ml./ml.
pH, 3-4.*

Sin previa incubación en glucosa	Previa 1 h. de incubación en glucosa al 5 %	
	Incubación anaeróbica	Incubación aeróbica
7		49
7		40
9		35
Media 8		41
7		41
11		—
9		41
Media 9		41
10		46
8		38
	29	35
	31	28
	28	39
	Media 29	34

Después de un determinado tiempo de *incubación*, la suspensión de levadura es centrifugada. El sedimento se lava dos veces con agua destilada, se coloca a un pH de 3 a 4 y se diluye a una concentración celular fija.

La suspensión de levadura incubada y puesta en condiciones anaeróbicas produce una cantidad considerablemente mayor de anhídrido carbónico que sin incubación (cuadro III).

Las células incubadas anaeróbicamente presentan también un considerable aumento del metabolismo endógeno (cuadro III). Sin embargo, el incremento es más considerable cuando la incubación tiene lugar con aireación (cuadros III, IV y V).

Para incubaciones de corta duración, la influencia del oxígeno es más considerable (cuadro III y IV).

El tiempo de incubación influye mucho en la producción anaeróbica de anhídrido carbónico, pero un cuarto de hora es suficiente para inducir un aumento significativo (cuadros III y IV).

CUADRO IV

μ l. de CO_2 desprendidos en atmósfera de nitrógeno en 1/2 h. y a 30° C., por 4 ml. de una suspensión en agua destilada de células de levadura previamente lavadas.

Concentración celular 0,03 ml./ml.
pH, 3-4.

Previa incubación en glucosa al 5 %		Tiempo de incubación
Incubación anaeróbica	Incubación aeróbica	
8 12 Media 10	23 24 23,5	1/2 h.
	24 16 16 Media 19	1/4 h.
	41 44 42 Media 42	1 h.

Con el tiempo, la producción de anhídrido carbónico de las células previamente incubadas va decreciendo (cuadro V).

CUADRO V

μ l. de CO_2 desprendidos en atmósfera de nitrógeno y a 30°C ., por 4 ml. de una suspensión en agua destilada de células de levadura previamente lavadas.

Concentración celular 0,03 ml./ml.

pH, 3-4.

Previa 1 h. de incubación en glucosa 5 %.

Incubación anaeróbica		Incubación aeróbica	
μ l. de CO_2 en 1/2 h.	μ l. de CO_2 en 2 h.	μ l. de CO_2 en 1/2 h.	μ l. de CO_2 en 2 h.
29	89	35	91
31	92	28	93
28	81	39	96
Media 29	87	34	93

2. Acción del uranilo sobre la producción de anhídrido carbónico inducida por incubación.

Para una concentración celular de 0,03 ml./ml., pequeñas cantidades de nitrato de uranilo inhiben fuertemente la utilización de glucosa exterior. No hay diferencias significativas entre las inhibiciones producidas para concentraciones mayores de $4 \times 10^{-5} \text{ M}$., por lo menos hasta 10^{-3} M . (cuadro VI). Este resultado induce a pensar que para las condiciones establecidas de trabajo se ha alcanzado la inhibición máxima.

CUADRO VI

Acción del nitrato de uranilo sobre la utilización de glucosa exterior por la levadura

Concentración de inhibidor	mg. de glucosa absorbida en 1/2 h.		Inhibición %
	Con inhibidor	Sin inhibidor	
$4 \times 10^{-5} \text{ M}$	5	22	77 %
	4	22	82 %
	Media 4,5	22	80 %
10^{-4} M	4	22	82 %
	4	22	82 %
	Media 4	22	82 %
10^{-3} M	3	22	86 %
	3	23	86 %
	Media 3	22,5	86,5 %

Para la misma cantidad de células, una concentración de uranilo de 10^{-3} M. no inhibe apenas la producción anaeróbica de anhídrido carbónico de células incubadas. No existe diferencia entre la inhibición conseguida a una concentración de 10^{-3} M. y a 10^{-4} M. También aquí debe tratarse de una inhibición máxima o poco alejada de la misma (cuadro VII).

CUADRO VII

Acción del nitrato de uranilo sobre la producción anaeróbica de CO_2 inducida por incubación aeróbica y en ausencia de sustrato exterior

Concentración de inhibidor	$\mu\text{l. de } \text{CO}_2 \text{ desprendidos en } 1/2 \text{ h.}$		Inhibición
	Con inhibidor	Sin inhibidor	
4×10^{-3} M	—	36	—
	38	42	9 %
	39	36	—
	—	—	—
	Media 38,5	38	0
10^{-4} M	44	50	12 %
	49	51	4 %
	51	55	8 %
	—	—	—
	Media 48	52	7,5 %
10^{-3} M	39	43	9.5 %
	31	41	24 %
	36	31	—
	—	—	—
	35	38	8 %

3. Acción del fluoruro sobre la producción de anhídrido carbónico inducida por incubación.

Una concentración de 10^{-2} M de fluoruro sódico inhibe fuertemente y aproximadamente igual la utilización de glucosa exterior y la producción anaeróbica de anhídrido carbónico de una suspensión en agua destilada de células de levadura previamente incubadas (cuadros VIII y IX).

CUADRO VIII

Acción del fluoruro sódico sobre la utilización de glucosa por la levadura

Concentración de inhibidor	mg. de glucosa absorbidos en 1/2 h.		Inhibición
	Con inhibidor	Sin inhibidor	
10 ⁻³ M	4	22	82 %
	4	21	81 %
	4	21,5	81.5 %

CUADRO IX

Acción del fluoruro sódico sobre la producción anaeróbica de CO₂ por células de levadura previamente incubadas

Concentración de inhibidor	μl. de CO ₂ desprendidos en 1/2 h.		Inhibición
	Con inhibidor	Sin inhibidor	
10 ⁻³ M	6	36	83 %
	12	37	68 %
	16	39	74 %
	Media 9	37	76 %

Discusión

1) NATURALEZA ENDÓGENA DEL ANHÍDRIDO CARBÓNICO PRODUCIDO.

Como la velocidad de producción de anhídrido carbónico en las células incubadas va disminuyendo en el transcurso del tiempo (cuadro V), no pueden hacerse más de dos lavados después de la incubación. Entonces cabría pensar que el anhídrido carbónico producido puede originarse a expensas del consumo de la glucosa exterior residual. Sin embargo, la consideración de los resultados consignados en el precedente apartado pone de manifiesto la naturaleza endógena del metabolismo medido. Por una parte, si fuese debido a residuos de glucosa exterior, con un cuarto de hora de incubación, con media hora y con una hora, se encontraría una misma velocidad de producción de anhídrido carbónico. Por el contrario, los resultados experimentales muestran que la producción de anhídrido carbónico

aumenta claramente con el tiempo de incubación (cuadro IV). De otro lado, el hecho de que este metabolismo no sea sensible a la acción del uranilo constituye otra prueba, a nuestro juicio concluyente, de que el anhídrido carbónico producido procede de un metabolismo fundamentalmente endógeno.

Con sólo dos lavados no es posible eliminar toda la glucosa. Precisamente, la acción del uranilo permite sugerir un orden de magnitud para el dióxido de carbono debido a glucosa exterior. En efecto, si una concentración de nitrato de uranilo de 10^{-3} M. inhibe el 86 % de la utilización de glucosa exterior, el 8 % de inhibición de la producción de anhídrido carbónico en las células incubadas expresa que la fracción de origen exógeno puede representar un 9 % del total.

El consumo relativamente rápido del glucógeno fermentable puede señalarse como una de las causas por las que se encuentra frecuentemente una fermentación endógena muy pequeña en las células vivas de levadura (23, 27, 28, 33).

2) PROCEDENCIA GLUCÍDICA DEL ANHÍDRIDO CARBÓNICO PRODUCIDO.

También existen varias razones que llevan a considerar al anhídrido carbónico producido por las células incubadas como resultado de una fermentación alcohólica endógena. En primer lugar, puede señalarse el hecho mismo de que dicha producción está ligada a la previa asimilación de glucosa que supone el proceso de incubación. Por otra parte, bajo nuestras condiciones de trabajo, es difícil poder asignar otro origen a una producción anaeróbica de anhídrido carbónico.

MEYERHOF, LOHMAN y SCHUSTER (15) mostraron que la inhibición de la glucolisis por el fluoruro sódico es debida a la inhibición de la enolasa. Otras enzimas comprendidas en el proceso también son inhibidas por el fluoruro, pero la sensibilidad de la enolasa es mucho mayor y determina el grado de inhibición de todo el sistema. Una concentración de fluoruro sódico de 10^{-2} M. inhibe prácticamente igual la utilización de glucosa exterior y el metabolismo endógeno de las células previamente incubadas (cuadros VIII y IX). Ahora bien, este mismo grado de inhibición sólo es compatible con el hecho de que el anhídrido carbónico producido en el último caso también sea debido a glucolisis. La acción del fluoruro constituye así otra prueba de la naturaleza glucídica del metabolismo endógeno de las células incubadas.

3) RESERVAS NO UTILIZABLES ESPONTÁNEAMENTE.

Sin previa incubación se produce una débil fermentación endógena (cuadro IV). Esto no supone que la célula se halle a un nivel extraordinariamente bajo de reservas glucídicas. ROTHSTEIN y BERKE (23) han mostrado que incluso en células de levadura vaciadas de reservas por prolongada permanencia en agua destilada a presión constante de oxígeno, el DNP y la azida son capaces de inducir una fermentación endógena apreciable. De acuerdo con los autores citados, parece que existe cierto nivel interior de glucógeno que no es normalmente fermentable.

4) INCUBACIÓN ANAERÓBICA.

Para conseguir una fermentación endógena espontánea podría utilizarse indistintamente incubación aeróbica o anaeróbica (cuadros III, IV y V). Este hecho confirma indirectamente los resultados obtenidos por PICKETT y CLIFTON (18) sobre la asimilación oxidativa de la glucosa en *Saccharomyces cerevisiae*. Efectivamente, aunque sólo se acepte una relación aproximada entre cantidad de glucógeno asimilado y velocidad de fermentación endógena, la comparación de los resultados obtenidos con uno y otro tipo de incubación están más de acuerdo con el porcentaje de asimilación oxidativa obtenido por dichos autores que con el deducido anteriormente de observaciones manométricas por WINZLER y BAUMBERGER (33). No obstante, parece probable que exista un nivel de saturación de la capacidad de asimilación de glucosa influenciado por las condiciones experimentales. En ausencia de fósforo y nitrógeno en el medio exterior, el metabolismo glucídico de la levadura queda aislado (14). Por este motivo, durante la incubación se alcanza posiblemente un nivel de glucógeno interior excepcionalmente alto. Atendiendo al efecto de las variaciones del tiempo de incubación aeróbica y anaeróbica sobre la fermentación alcohólica endógena subsecuente en uno y otro caso (cuadros III y IV), puede sugerirse que el nivel de saturación de glucógeno interior debe conseguirse antes con la incubación aeróbica. De ser así, la relación entre asimilación oxidativa y anóxica vendría muy influenciada por la duración de las experiencias.

Resumen y conclusiones

Se comprueba que las células de levadura, en ausencia de sustrato exterior, presentan un metabolismo anaeróbico muy pequeño.

Se consigue inducir una fermentación alcohólica endógena en las cé-

lulas de levadura manteniéndolas previamente durante algún tiempo en una solución de glucosa.

Se ha encontrado que concentraciones de hasta 10^{-3} M. de nitrato de uranilo no afectan a la fermentación alcohólica inducida por previa incubación en glucosa.

El fluoruro sódico inhibe la fermentación alcohólica inducida tanto como a la utilización de glucosa exterior.

Puede inducirse una fermentación endógena en la levadura, tanto por incubación aeróbica como anaeróbica. En el primer caso se consiguen producciones más elevadas de anhídrido carbónico, particularmente para incubaciones de corta duración.

Se admite que la incubación consigue un nivel de glucógeno endocelular situado por encima del normal. Existe un límite de saturación para este cebamiento de las células. Este límite se alcanza más rápidamente en condiciones aeróbicas que anaeróbicas. En consecuencia, se concluye que los porcentajes de asimilación oxidativa y anóxica se hallan muy influenciados por la duración de las experiencias.

Al parecer, existe cierto nivel endocelular de glucógeno que no es normalmente fermentable o sólo puede serlo muy lentamente.

La intensidad de la fermentación inducida depende del tiempo de incubación.

Summary

ENDOGENOUS ALCOHOLIC FERMENTATION IN YEAST

During fermentation of glucose by yeast in a state of divisional rest, 2/3 parts of the glucose absorbed are degraded producing equimolecular quantities of CO_2 and ethanol (10, 16). Determination of the increase in dry weight of the cells showed that the remaining third was assimilated, probably under the form of glucogen. In spite of a certain intracellular content of glucogen yeast is not capable of producing an appreciable spontaneous endogenous alcoholic fermentation (23, 24, 26, 27, 28, 33).

Aerobically yeast also assimilates part of the glucogen used, probably in a proportion greater than during fermentation (18, 30, 31, 33). In spite of this, various authors have shown that glucogen respiration takes place only with great lenthitude (24, 29).

It has been supposed that the glucose-6-phosphate glucose-1-phosphate process would be found in vivo very displaced towards glucose-1-phosphate, although it has been shown that the action is completely reversible in vitro.

ROTHSTEIN and BERKE (23, 24) have found that the addition of adequate quantities of dinitrophenol DNP or sodium azide induces the anaerobic production of considerable amounts of carbon dioxide in yeast cells without exterior substrate. In the present work, the author shows how, without the intervention of chemical effectors, it is also possible to induce a considerable endogenous alcoholic fermentation in yeast.

In the experiments fresh baker's yeast washed twice in distilled water was used.

For determination of the quantity of yeast, measurements of sediment constant at 1.800 r. p. m. were done. In fig. 1 and in Table I are found the equivalents for dry and damp weight.

For the absorption measurements of glucose, fundamentally the procedure employed by ROTHSTEIN and LARRABEE (20) was followed. The period of emptying of reserves is brought about in distilled water and with three or four hours aeration. The pH of the suspensions is adjusted with HCl 0.1 N to 3.5 immediately before absorption. After 30 minutes absorption, centrifuging is done and glucose in the supernatant liquid is determined photocolorimetrically with the Folin-Wu (9, 11, 17) reactive.

Production of CO_2 is measured by the standard technique of Warburg (2, 32). Anaerobic conditions are obtained by replacing air by previously purified nitrogen.

Table III contains the results of various experiments in which on the one hand the slight anaerobic endogenous metabolism of yeast is shown

9 gr. of fresh yeast were dispersed in a 5 % solution of glucose to a total volume of 100 ml. The suspension was maintained at 30° C. and a strong current of air was passed for an hour. Afterwards, the suspension was centrifuged and the sediment washed twice in distilled water and put at pH 3.5. The suspension of yeast previously submitted to this treatment produces in anaerobic conditions a much greater amount of CO_2 than without incubation (Table III).

Endogenous metabolism can also be increased if the cells are incubated anaerobically (Table III). But the increase is greater when incubation is carried out with aeration (Tables III, IV and V). For incubations of short duration, the influence of oxygen seems to be more considerable (Tables III and IV).

Incubation time has a great influence in the anaerobic production of CO_2 , but 1/4 of an hour is sufficient to induce a significant increase (Tables III and IV).

With time, the production of CO_2 by cells previously incubated, diminishes (Table V).

As shown by ROTHSTEIN (20, 22), for a cellular concentration of 0.03 ml./ml. small quantities of uranyl nitrate strongly inhibit the utilization of exterior glucose (Table VI). For the same amount of cells the uranyl ion does not appreciably inhibit anaerobic production of CO_2 by the incubated cells at least up to a concentration of 10^{-3} M (Table VII). A concentration of 10^{-2} M of sodium fluoride strongly inhibits approximately in the same degree utilization of exterior glucose and anaerobic production of CO_2 in a suspension in distilled water of yeast cells previously incubated (Tables VIII and IX).

The fact that the production of CO_2 induced by incubation is not sensitive to uranyl and increases with incubation time (Table IV), shows its endogenous origin.

Production of CO_2 is connected with previous assimilation of glucose in the incubation process. It is inhibited by NaF in the same proportion as the exogenous fermentation. These facts show that the CO_2 produced really originates from an endogenous alcoholic fermentation.

Without previous incubation, endogenous fermentation is very weak (Table IV). However, this does not seem to mean that the cells are at an extraordinarily low level of glucidic reserves. ROTHSTEIN and LARRABEE (23) showed that even in yeast cells starved in distilled water the DNP and azide are capable of producing appreciable endogenous fermentation. In agreement with the authors quoted, we think that a certain interior level of glucogen exists which is not normally fermentable.

It seems probable that a saturation level exists of the assimilation capacity of glucose which can be influenced by experimental conditions. During incubation, an exceptionally high level of interior glucogen is probably reached.

According to the influence of oxygen in incubation on subsequent endogenous alcoholic fermentation (Tables III and IV), it can be suggested that the saturation level of glucogen within the cells should be reached earlier through aerobic incubation. This being so, the relation between oxidative and anoxic assimilation would be very much influenced by the duration of the experiments. This would perhaps explain some discrepancies between the authors in the percentages of glucose assimilation by yeast (18, 33).

Bibliografía

- (1) BALDWIN, E. : «Dynamic aspects of Biochemistry», University Press. Cambridge. Second Edition, 1952.
- (2) BAMANN, E., y MYRBACK, K. : Die Methoden der Fermentforschung. G. Thieme. Verlag. Leipzig, 1940.
- (3) BARKER, H. A. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **8**, 231, 1936.
- (4) BARRON, E. S. G., MUNTZ, J. A., y GASVODA, B. : *J. Gen. Physiol.*, **33**, 163, 1948.
- (5) BOLCATO, V., SCEVOLA, M. E., y VALCURONE, G. : *Die Naturwiss.*, **39**, 211, 1952.
- (6) BURRIS, R. H., y WILSON, P. W. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **19**, 361, 1942.
- (7) CLIFTON, C. E. : «Assimilation by bacteria». Bacterial Physiology. (Ed. C. H. Werkman and P. W. Wilson). Academic Press. New York, 1951.
- (8) CLIFTON, C. E. : «Oxidative assimilation by microorganisms». The Enzymes, II (2) : 912. Academic Press, New York, 1952.
- (9) ETCO : Photoelectric Colorimeter manual.
- (10) FALES, F. W., y BAUMBERGER, J. P. : *J. Biol. Chem.*, **173**, 1, 1948.
- (11) KING, E. J. : Micro-analysis in medical Biochemistry. Churchill, Ltd Londres, 1947.
- (12) LINDEGREN, C. C. : *Arch. Biochem.*, **8**, 119, 1945.
- (13) LINDEGREN, C. C. : *Arch. Biochem.*, **9**, 353, 1946.
- (14) LINDEGREN, C. C. : The structure of the yeast cell. Symposia of the Society for Exptl. Biol., VI, Structural Aspects of Cell Physiology. Academic Press, New York, 1952.
- (15) MEYERHOF, O. : Enolase. The Enzymes. I (2), 1.207, Academic Press, New York, 1951.
- (16) VAN NIEL, C. B., y ANDERSON, E. H. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **17**, 49, 1941.
- (17) PEREGRIN, E. S. : Manual técnico de análisis clínicos. Ed. Prieto, Granada, 5.ª edición, 1947.
- (18) PICKETT, M. J., y CLIFTON, C. E. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **21**, 77, 1943.
- (19) REINER, J. M., y SPIEGELMAN, S. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **30**, 347, 1947.
- (20) ROTHSTEIN, A., y LARRABEE, L. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **32**, 247, 1948.
- (21) ROTHSTEIN, A., y HURWITZ, L. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **37**, 57, 1951.
- (22) ROTHSTEIN, A., y MEIER, R. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **38**, 245, 1951.
- (23) ROTHSTEIN, A., y BERKE, H. : *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **36**, 195, 1952.

- (24) ROTHSTEIN, A., y BERKE, H. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **81**, 559, 1952.
- (25) ROTHSTEIN, A. : Some biochemical functions of the cell surface as deduced by isotope studies. International Conference on the peaceful uses of atomic energy. A/Conf. 8/P/267, 1955.
- (26) SCOTT, G. T., JACOBSON, M. A., y RICE, M. E. : *Arch. Biochem.*, **30**, 282, 1951.
- (27) SPIEGELMAN, S., y NOZAWA, M. : *Arch. Biochem.*, **6**, 303, 1945.
- (28) STIER, T. J. B., y STANNARD, J. N. : *J. Gen. Physiol.*, **19**, 461, 1936.
- (29) STIER, T. J. B., y STANNARD, J. N. : *J. Gen. Physiol.*, **19**, 479, 1936.
- (30) STIER, T. J. B., NEWTON, I., y SPRINCE, H. : *Science*, **89**, 85, 1939.
- (31) STIER, T. J. B., y NEWTON, I. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **13**, 345, 1939.
- (32) UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., y STAUFFER, J. F. : Manometric techniques and tissue metabolism. Burgess Publishing Co. Seven Print. Minneapolis, 1951.
- (33) WINZLER, R. J., y BAUMBERGER, J. F. : *J. Cell and Comp. Physiol.*, **12**, 183, 1938.