

BIBLIOGRAFIA

1.- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson. 1986. Molecular Biology of the Cell Garland Publishing, Inc. New York & London. pp. 252-317.

2.- Joklik, W. K., H.P. Willett y D.B. Amos. 1986. Zinsser Microbiología. Editorial Médica Panamericana. 18ª Edición. pp. 284-293.

3.- Plummer, D.T. 1978. An Introduction to Practical Biochemistry. 2ª Edición. McGraw-Hill Book Co. pp. 218-219.

PRACTICA No. 6

TRANSPORTE DE AZUCARES EN LEVADURAS

INTRODUCCION

Los microorganismos en su ambiente natural se enfrentan tanto a condiciones adversas del entorno como a la competencia con otras formas de vida por la adquisición de los nutrientes escasamente presentes, y para preservar su sobrevivencia no solamente emplean la locomoción, quimiotaxis o la secreción de extracelulares sino también fabrican estructuras extracelulares como vainas, holdfast, materiales mucilaginosos, etc; mediante los cuales se fijan sobre objetos sólidos y aseguran la captación de materiales nutritivos.

Sin embargo, cualquiera que sea la habilidad desplegada para proveer se de nutrientes, estos materiales deben ser movilizados desde el medio exterior hasta el citoplasma donde son metabolizados, pero la membrana plasmática por sus características estructurales constituye una barrera al paso libre de solutos. Esta envoltura desempeña una actividad muy dinámica en la entrada de nutrientes así como en la excreción de productos de desecho; para que ésta translocación suceda, los microorganismos han desarrollado una gran variedad de mecanismos de transporte mediante los cuales los solutos son movilizados de un lado a otro de la membrana según las conveniencias de la célula.

OBJETIVO

Con la aplicación de agentes fisicoquímicos pretendemos dilucidar el mecanismo de transporte utilizado por Saccharomyces cerevisiae para captar glucosa.

FUNDAMENTO

Los procesos de transporte son una característica de las membranas biológicas y han sido estudiados tanto en sistemas bacterianos como eucarióticos. En los microorganismos se conocen cinco mecanismos de transporte de azúcares mediados por acarreador, éstos pueden ser clasificados de acuerdo a la fuente energética acoplada en: difusión facilitada, sistema de transporte activo sensible a choque osmótico frío, sistema de transporte activo ligado con H⁺, cotransporte con Na⁺ y el sistema de la fosfotransferasa. El primero es independiente de energía, en tanto que el segundo y el último están enlazados a la energía liberada por la hidrólisis de moléculas fosforiladas de alta energía; mientras que el sistema de transporte activo ligado a H⁺ y el de cotransporte con Na⁺ son dependientes de la diferencia de potencial electroquímico establecido a través de la membrana y generado por las reacciones de oxidoreducción que sufren las moléculas transportadoras que participan en la cadena de transporte de electrones.

102111465

TRANSPORTE DE AZÚCARES EN LEVADURAS

INTRODUCCION

Los microorganismos en su ambiente natural se enfrentan tanto a condiciones adversas del entorno como a la competencia con otras formas de vida por la adquisición de los nutrientes escasamente presentes, y para preservar su sobrevivencia no solamente emplean la locomoción, quimiotaxis o la secreción de extracelulares sino también fabrican estructuras extracelulares como vainas, holdfast, materiales mucilaginosos, etc; mediante los cuales se fijan sobre objetos sólidos y aseguran la captación de materiales nutritivos.

Sin embargo, cualquiera que sea la habilidad desplegada para proveer de nutrientes, estos materiales deben ser movilizados desde el medio exterior hasta el citoplasma donde son metabolizados, pero la membrana plasmática por sus características estructurales constituye una barrera al paso libre de solutos. Esta envoltura desempeña una actividad muy dinámica en la entrada de nutrientes así como en la excreción de productos de desecho; para que ésta translocación suceda, los microorganismos han desarrollado una gran variedad de mecanismos de transporte mediante los cuales los solutos son movilizados de un lado a otro de la membrana según las conveniencias de la célula.

OBJETIVO

Con la aplicación de agentes fisiocodúmicos pretendemos dilucidar el mecanismo de transporte utilizado por *Saccharomyces cerevisiae* para captar glucosa.

FUNDAMENTO

Los procesos de transporte son una característica de las membranas biológicas y han sido estudiados tanto en sistemas bacterianos como eucarióticos. En los microorganismos se conocen cinco mecanismos de transporte de azúcares medidos por acarreador, éstos pueden ser clasificados de acuerdo a la fuente energética acoplada en: difusión facilitada, sistema de transporte activo sensible a choque osmótico frío, sistema de transporte activo ligado con H^+ , cotransporte con Na^+ y el sistema de la fosfotransferasa. El primero es independiente de energía, en tanto que el segundo y el último están enlazados a la energía liberada por la hidrólisis de moléculas fosforiladas de alta energía; mientras que el sistema de transporte activo ligado a H^+ y el de cotransporte con Na^+ son dependientes de la diferencia de potencial electroquímico establecido a través de la membrana y generado por las reacciones de oxidoreducción que sufren las moléculas transportadoras que participan en la cadena de transporte de electrones.

Del sistema de transporte enlazado a la translocación de H^+ se conocen varios tipos como son los mecanismos simportador, antiportador y uniporador.

El estudio de los sistemas de transporte ha involucrado herramientas genéticas y bioquímicas como son el uso de cepas mutantes, compuestos antimetabolitos, reactivos con especificidad por grupos tiol proteicos, desacoplantes de la fosforilación oxidativa, agentes ionóforos, etc; disponiéndose hasta la fecha de información muy completa al respecto.

MATERIAL Y REACTIVOS

6 matraces Erlenmeyer de 50 ml
7 pipetas graduadas de 10 ml
9 pipetas graduadas de 5 ml
6 pipetas graduadas de 1 ml
1 gradilla

20 canicas

20 tubos de ensaye de 18 x 150 mm

20 tubos de ensaye de 13 x 100 mm

papel aluminio

Centrífuga

Baño de Hielo

Baño de Agua

Termómetro

Vortex

Espectrofotómetro

Mechero, tripié y tela de asbesto

1 vaso de precipitados de 600 ml

1 palangana de plástico

Suspensión de levaduras: Lavar por centrifugación una porción adecuada de levaduras empleando agua destilada a pH=3.8, una vez que el sobrenadante esté claro resuspender el paquete celular al volumen original y preparar una suspensión al 30% v/v.

50 ml de Glucosa 4 mg/ml

300 ml de agua destilada ajustada a un pH=3.8 con ácido acético

10 ml de azida de sodio 3.3 mM

10 ml de 2,4 dinitrofenol 1 mM

10 ml de Cianuro de sodio 1 mM

80 ml de Antrona al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado

24 ml de sulfato de zinc al 10% y 24 ml de NaOH 0.5N

METODOS

1.-Realizar una curva de calibración de glucosa por el método de la Antrona empleando una solución patrón de azúcar de 100 mg/ml, el rango de concentración deberá ser de 0 - 50 ug/ml.

2.-Preparar 6 matraces Erlenmeyer de 50 ml como se indica en el siguiente cuadro:

12.-Registre sus resultados.

Del sistema de transporte enlazado a la translocación de H⁺ se conocen varios tipos como son los mecanismos importador, antiportador y uniporador.

El estudio de los sistemas de transporte ha involucrado herramientas genéticas y bioquímicas como son el uso de cepas mutantes, compuestos antimetabólicos, reactivos con especificidad por grupos tiol protectores, desasociación de la fosforilación oxidativa, agentes ionóforos, etc; disponiéndose hasta la fecha de información muy completa al respecto.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 6 matraces Erlenmeyer de 50 ml
- 7 pipetas graduadas de 10 ml
- 9 pipetas graduadas de 5 ml
- 6 pipetas graduadas de 1 ml
- 1 gradilla
- 20 canicas
- 20 tubos de ensayo de 18 x 150 mm
- 20 tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- papel aluminio
- Centrífuga
- Baño de Hielo
- Baño de Agua
- Termómetro
- Vortex
- Espectrofotómetro
- Mechero, tripié y tela de asbesto
- 1 vaso de precipitados de 600 ml
- 1 palangana de plástico

Suspensión de levaduras: lavar por centrifugación una porción adecuada de levaduras empleando agua destilada a pH=3.8, una vez que el sobrenadante esté claro resuspendir el paquete celular al volumen original y preparar una suspensión al 30% v/v.

50 ml de glucosa 4 mg/ml
300 ml de agua destilada ajustada a un pH=3.8 con ácido acético

10 ml de azida de sodio 3.3 mM

10 ml de 2,4 dinitrofenol 1 mM

10 ml de Cianuro de sodio 1 mM

80 ml de Antrona al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado

24 ml de sulfato de zinc al 10% y 24 ml de NaOH 0.5N

MÉTODOS

1.- Realizar una curva de calibración de glucosa por el método de la Antrona empleando una solución patrón de azúcar de 100 mg/ml, el rango de concentración deberá ser de 0 - 50 ug/ml.

2.- Preparar 6 matraces Erlenmeyer de 50 ml como se indica en el siguiente cuadro:

RESULTADOS

1.- Antrona

MATRAZ	LEVADURAS (ml)	H ₂ O pH 3.8 (ml)	Cianuro de sodio 1mM (ml)	Azida de Sodio 1mM (ml)	Dinitrofenol 1 mM (ml)	Temperatura (°C)
1	4	6	-	-	-	28
2	4	6	-	-	-	0*
3	4	-	6	-	-	28
4	4	-	-	6	-	28
5	4	-	-	-	6	28
6	4	16	-	-	-	28

3.- Adicionar a los primeros cinco matraces 10 ml de una solución fría de glucosa 4 mg/ml, mezclar homogéneamente e incubar a las temperaturas indicadas.

4.- A los 20, 40 y 60 minutos de incubación, tomar muestras de 3 ml de cada matraz y depositarlas en tubos de ensayo de 13 x 100.

5.- Adicionar a los tubos 1.2 ml de NaOH 0.5 N y ZnSO₄ al 10%. Mezclar vigorosamente y centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.

6.- Para cada sobrenadante transferir 0.1 ml a un tubo de ensayo de 18 x 150 mm y diluir a 2 ml con agua destilada y mezclar. En un tubo de ensayo de 18 x 150 depositar 2 ml de agua destilada, éste servirá como blanco.

7.- Introducir todos los tubos en un baño de hielo durante 10 minutos.

8.- Sin sacar los tubos del baño de hielo, adicionar lentamente a cada uno 4 ml de Antrona al 0.2% en ácido sulfúrico de manera que se estratifique, y dejar reposar 10 minutos.
La capa superior deberá ser de un color blanco lechoso y la inferior amarilla, si se desarrolla un color verde el tubo deberá descartarse.

9.- Mezclar vigorosamente el contenido de los tubos empleando un Vortex y llevarlos inmediatamente a un baño de agua hirviente durante 10 minutos.

10.- Enfriar los tubos en un baño de agua fría.

11.- Determinar la densidad óptica de cada solución empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm.

12.- Registre sus resultados.

MATRIZ	LEVADURA (ml)	H ₂ O 3% (ml)	Ciudad de sodio (ml)	Acido de sodio (ml)	Diferencia Temperatura (°C)
1	4	6	-	-	28
2	4	6	-	-	0
3	4	-	6	-	28
4	4	-	-	6	28
5	4	-	-	6	28
6	4	16	-	-	28

- 1.- Registrar sus resultados.
- 11.- Determinar la densidad óptica de cada solución empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm.
- 10.- Enfriar los tubos en un baño de agua fría.
- 9.- Mezclar vigorosamente el contenido de los tubos empleando un vortex y llevarlos inmediatamente a un baño de agua hirviendo durante 10 minutos.
- 8.- Sin sacar los tubos del baño de hielo, adicionar lentamente a cada uno 4 ml de Antrona al 0.2% en acido sulfúrico de manera que se estratifique, y dejar reposar 10 minutos. La capa superior deberá ser de un color blanco lechoso y la inferior amarilla, si se desarrolla un color verde el tubo deberá descartarse.
- 7.- Introducir todos los tubos en un baño de hielo durante 10 minutos.
- 6.- Para cada sobremuestra transferir 0.1 ml a un tubo de ensayo de 18 x 150 mm y diluir a 2 ml con agua destilada y mezclar. En un tubo de ensayo de 18 x 150 depositar 2 ml de agua destilada, éste servirá como blanco.
- 5.- Adicionar a los tubos 1.2 ml de NaOH 0.5 N y ZnSO₄ al 10%. Mezclar vigorosamente y centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 4.- A los 20, 40 y 60 minutos de incubación, tomar muestras de 3 ml de cada matriz y depositarlas en tubos de ensayo de 18 x 100.
- 3.- Adicionar a los primeros cinco matraces 10 ml de una solución fría de glucosa 4 mg/ml, mezclar homogéneamente e incubar a las temperaturas indicadas.

RESULTADOS

1.- Anote los valores de densidad óptica exhibidos por las soluciones patrón empleadas para obtener la Curva de Calibración.

Concentración de glucosa (ug/ml)	D.O. ₆₄₀
0	
10	
20	
30	
40	
50	

2.- Considerando como X a la concentración de glucosa y como Y a la densidad óptica, proporcione los datos solicitados en la tabla

X	Y	X ²	XY	Y ²
0	0	0	0	0
10		100		
20		400		
30		900		
40		1600		
50		2500		
$\sum X=150$	$\sum Y=$	$\sum X^2=5500$	$\sum XY=$	$\sum Y^2=$
N=6				

4.-Escribe la ecuación de la línea recta a la cual se ajustan sus datos

RESULTADOS

1.- Anote los valores de densidad óptica exhibidos por las soluciones patrón empleadas para obtener la Curva de Calibración.

Concentración de glucosa (µg/ml)	D.O. 640
0	
10	
20	
30	
40	
50	

2.- Considerando como X a la concentración de glucosa y como Y a la densidad óptica, proporcione los datos solicitados en la tabla

X	Y	X ²	XY	Y ²
0	0	0	0	0
10		100		
20		400		
30		900		
40		1600		
50		2500		
$\Sigma X = 150$	$\Sigma Y =$	$\Sigma X^2 = 5500$	$\Sigma XY =$	$\Sigma Y^2 =$
n=6				

3.- Someta los datos a regresión lineal para encontrar la ecuación de la línea recta al cual se ajustan. Utilice las ecuaciones siguientes:

Intersecto= $b = \frac{\Sigma X^2 \Sigma Y - \Sigma X \Sigma XY}{N \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$ Pendiente= $m = \frac{N \Sigma XY - \Sigma X \Sigma Y}{N \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$

Ecuación de la Línea Recta: $Y = mX + b$

	40 min	60 min
<u>CALCULOS</u>		
1		
2		
3		
4		
5		
6		

4.- Con la ecuación de la línea recta obtenida, haga los cálculos necesarios para obtener la concentración residual de glucosa en los tiempos señalados para cada uno de los matraces. A los valores obtenidos multiplíquelos por el inverso de la dilución total que sufrió su muestra (36).

CALCULOS

4.-Escribe la ecuación de la línea recta a la cual se ajustan tus datos
