

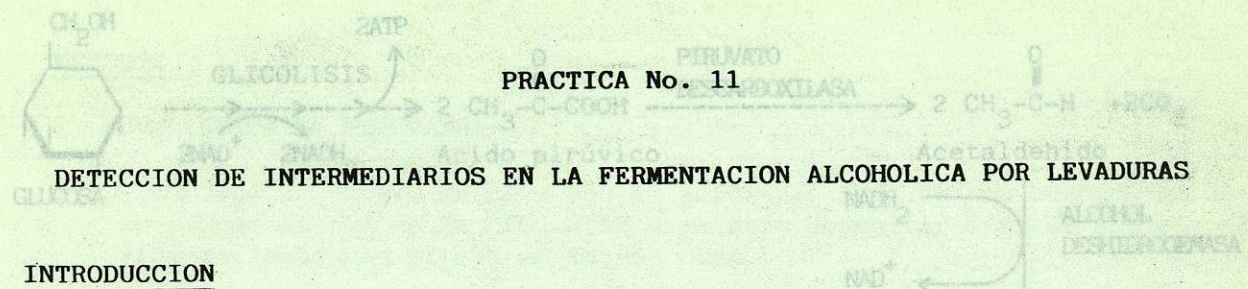
BIBLIOGRAFIA

1.-Dawes, I.W. e I.W. Sutherland. 1978. Fisiología de los microorganismos. H. Blume ediciones. 1ª Edición española. pp 58-59

2.-DeLaf, A.N.C. 1984. Microbiología. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. 2ª Edición. pp 63-67.

3.-Joklik, W.K., H.P. Willett y D.B. Amos. 1980. Zin-- aser Microbiología. Editorial Médica Paname-- ricana. 18ª Edición. pp 85-89.

4.-Stainer, R.Y., E.A. Adelberg y J.L. Ingraham. 1986. Ediciones Reppis, S.A. versión española de la 4ª Edición. pp 273-274.



DETECCION DE INTERMEDIARIOS EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA POR LEVADURAS

INTRODUCCION

Un gran número de microorganismos utilizan la ruta glicolítica para degradar a la glucosa y azúcares afines; mediante esta secuencia de reacciones catalizadas enzimáticamente, la hexosa es escindida en dos moléculas de ácido pirúvico con formación concomitante de  $NADH_2$ , extrayéndose sólo una pequeña parte del elevado contenido energético de esta molécula. En condiciones aeróbicas, el ácido carboxílico producido es oxidado posteriormente hasta  $CO_2$  y  $H_2O$  obteniéndose así una gran cantidad de energía, suficiente para apoyar el crecimiento celular, sin embargo, parte del abastecimiento de glucosa no es oxidado completamente sino se emplea como fuente de carbono.

En los organismos anaerobios o anaerobios facultativos el  $NADH_2$  producido durante el proceso glicolítico debe ser reoxidado para mantener el equilibrio de oxidoreducción; esto se logra mediante reacciones subsecuentes propias de cada organismo y de las condiciones de crecimiento; así a partir del ácido pirúvico se pueden formar una gran variedad de productos consiguiéndose en algunos casos generar energía adicional en forma de ATP. Estas reacciones ocurren en ausencia de oxígeno, y al proceso completo se le denomina **fermentación**.

Las levaduras llevan a cabo principalmente una fermentación alcohólica donde el acetaldehído formado por descarboxilación del ácido pirúvico es usado como aceptor de protones para reoxidar al  $NADH_2$  produciéndose por consiguiente etanol.

OBJETIVO

En este experimento intentaremos demostrar de una manera sencilla la participación del ácido pirúvico, acetaldehído y  $CO_2$  durante la fermentación alcohólica de glucosa por levaduras.

FUNDAMENTO

La fermentación alcohólica de azúcares consiste básicamente en la degradación de glucosa mediante la secuencia glicolítica que produce ácido pirúvico y  $NADH_2$ . Dos reacciones adicionales son necesarias para completar el proceso, en la primera el ácido pirúvico es descarboxilado por acción de la enzima PIRUVATO DESCARBOXILASA produciéndose acetaldehído; éste a su vez es reducido por la enzima ALCOHOL DESHIDROGENASA empleando los equivalentes reductores del  $NADH_2$ , generándose etanol. Con este par de reacciones se consigue mantener en equilibrio las condiciones de oxidoreducción del citosol. En la figura se esquematizan los eventos involucrados.

2 ml de 2,4-dinitrofenilhidracina saturada en HCl 2M  
4 ml de bisulfito al 3%



DETECCION DE INTERMEDIARIOS EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA POR LEVADURAS

INTRODUCCION

Un gran número de microorganismos utilizan la ruta glicolítica para degradar a la glucosa y azúcares afines; mediante esta secuencia de reacciones catalizadas enzimáticamente, la hexosa es escindida en dos moléculas de ácido pirúvico con formación concomitante de NADH<sub>2</sub> extrayéndose sólo una pequeña parte del elevado contenido energético de esta molécula. En condiciones aeróbicas, el ácido carboxílico producido es oxidado posteriormente hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O obteniéndose así una gran cantidad de energía, suficiente para apoyar el crecimiento celular, sin embargo, parte del apastecimiento de glucosa no es oxidado completamente sino se emplea como fuente de carbono.

En los organismos anaerobios o anaerobios facultativos el NADH<sub>2</sub> producido durante el proceso glicolítico debe ser reoxidado para mantener el equilibrio de oxidoreducción; esto se logra mediante reacciones subsiguientes propias de cada organismo y de las condiciones de crecimiento; así a partir del ácido pirúvico se pueden formar una gran variedad de productos consiguiéndose en algunos casos generar energía adicional en forma de ATP. Estas reacciones ocurren en ausencia de oxígeno, y al proceso completo se le denomina fermentación.

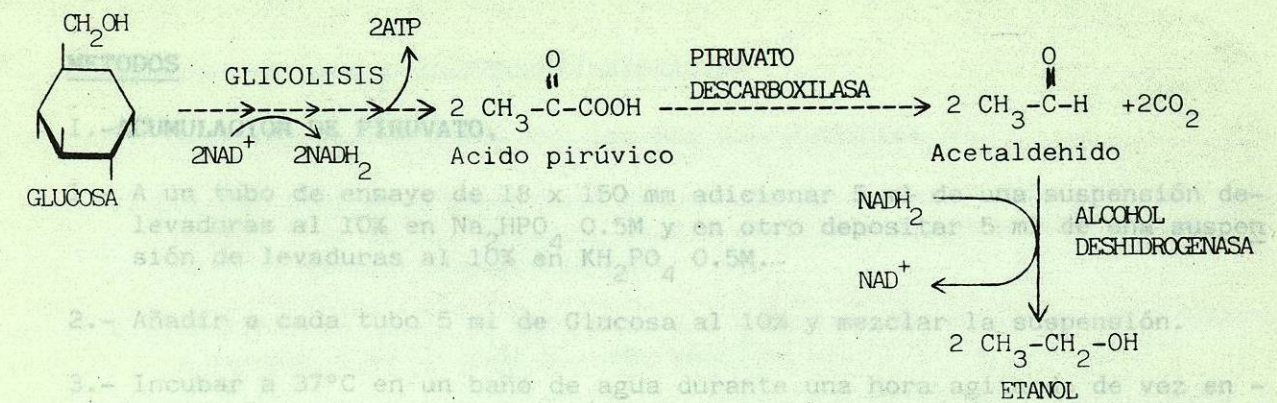
Las levaduras llevan a cabo principalmente una fermentación alcohólica en la que el acetaldehído formado por descarboxilación del ácido pirúvico es usado como aceptor de protones para reoxidar al NADH<sub>2</sub> produciéndose por consiguiente etanol.

OBJETIVO

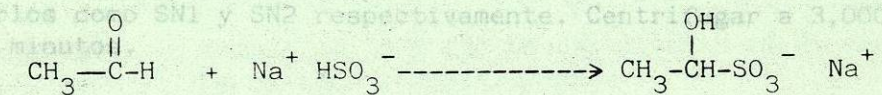
En este experimento intentaremos demostrar de una manera sencilla la participación del ácido pirúvico, acetaldehído y CO<sub>2</sub> durante la fermentación alcohólica de glucosa por levaduras.

FUNDAMENTO

La fermentación alcohólica de azúcares consiste básicamente en la degradación de glucosa mediante la secuencia glicolítica que produce ácido pirúvico y NADH<sub>2</sub>. Dos reacciones adicionales son necesarias para completar el proceso, en la primera el ácido pirúvico es descarboxilado por acción de la enzima PIRUVATO DESCARBOXILASA produciéndose acetaldehído; éste a su vez es reducido por la enzima ALCOHOL DESHIDROGENASA empleando los equivalentes reductores del NADH<sub>2</sub>, generándose etanol. Con este par de reacciones se consigue mantener en equilibrio las condiciones de oxidoreducción del citosol. En la figura se esquematizan los eventos involucrados.



- Añadir a cada tubo 5 ml de Glucosa al 10% y mezclar la suspensión.
- Incubar a 37°C en un baño de agua durante una hora agitando de vez en cuando.
- Para conseguir la acumulación del ácido pirúvico y poderlo detectar, la fermentación se llevará a cabo en condiciones ligeramente alcalinas para inactivar a la enzima Piruvato Descarboxilasa. La identificación se hará mediante dos pruebas cualitativas coloreadas. La acumulación de acetaldehído se logrará adicionando sulfito de sodio al medio de cultivo, este agente acompleja al acetaldehído formando un producto bisulfítico de adición soluble en agua, la reacción es como sigue:



- Con los sobrenadantes S1 y S2 realizar la Prueba del Nitroprusiato de Sodio. El acetaldehído es regenerado por tratamiento con ácido o base y es identificado haciéndolo reaccionar con agente específico que forma un producto coloreado.

La producción de CO<sub>2</sub> durante la fermentación se detectará visualmente observando la liberación de burbujas.

A) PRUEBA DEL NITROPRUSIATO DE SODIO

MATERIAL Y REACTIVOS

- 20 tubos de ensaye de 18 x 150 mm
- 10 tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- 1 gradilla
- 1 piceta con agua destilada
- 6 pipetas graduadas de 5 ml
- 1 espátula
- 1 centrifuga
- 1 baño de agua
- 1 balanza granataria
- 5 ml de suspensión de levaduras al 10% en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M
- 5 ml de suspensión de levaduras al 10% en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5M
- 10 ml de suspensión de levaduras al 10% en agua
- 20 ml de Glucosa al 10% en agua
- 2 ml de Nitroprusiato de sodio al 0.5% en agua recientemente preparado
- 4 ml de ácido tricloroacético al 10%
- 10 ml de hidroxido de amonio concentrado
- 6 gramos de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 0.5 gramos de sulfito de sodio
- 2 ml de NaOH al 10%
- 2 ml de 2,4 dinitrofenilhidracina saturada en HCl 2M
- 4 ml de Bpiridina al 3%



METODOS PRUEBA DE LA 2,4 DINITROFENILHIDRACINA

I.-ACUMULACION DE PIRUVATO.

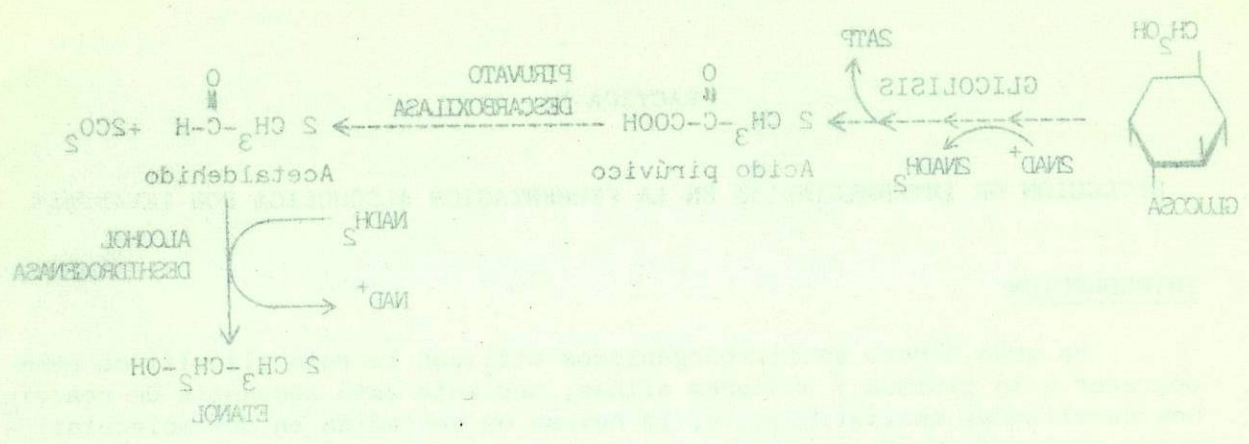
- 1.- A un tubo de ensaye de 18 x 150 mm adicionar 5 ml de una suspensión de levaduras al 10% en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M y en otro depositar 5 ml de una suspensión de levaduras al 10% en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5M.
- 2.- Añadir a cada tubo 5 ml de Glucosa al 10% y mezclar la suspensión.
- 3.- Incubar a 37°C en un baño de agua durante una hora agitando de vez en cuando.
- 4.- Observar la velocidad de desprendimiento de burbujas en los tubos y registrarla.
- 5.- Al terminar la incubación agregar 2 ml de acido tricloroacetico al 10% a ambos tubos y mezclar vigorosamente.
- 6.- Distribuir el contenido de cada tubo a un par de tubos de 13 x 100 mm y rotularlos como SN1 y SN2 respectivamente. Centrifugar a 3,000 r.p.m.- por 10 minutos.
- 7.- Con los sobrenadantes SN1 realizar la Prueba del Nitroprusiato de sodio y con los SN2 la prueba de la dinitrofenilhidracina para identificar la presencia de piruvato.

II.-DETECCION DE PIRUVATO

A) PRUEBA DEL NITROPRUSIATO DE SODIO

- Efectuar lo siguiente con los tubos SN1:
- 1.- En un tubo de ensaye de 18 x 150 mm agregar con una espátula suficiente (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solido hasta llenar una altura de 1 cm a partir del fondo.
  - 2.- Adicionar 2 ml de sobrenadante SN1 y mezclar.
  - 3.- Agregar 4 gotas de una solución recientemente preparada de Nitroprusiato de sodio al 0.5% y mezclar vigorosamente.
  - 4.- Por la pared interna del tubo depositar lentamente 5 ml de NH<sub>4</sub>OH concentrado de manera que se estratifique. **NO MEZCLAR.**
  - 5.- Colocar el tubo de ensaye en la gradilla y dejar reposar 15 minutos.
  - 6.- Observar la aparición de un anillo verde o azul en la interfase y comparar la intensidad del color entre los dos sobrenadantes SN1.

NOTA: Cuando en el sobrenadante ocurren compuestos con grupo tiol libre, aparecerá un anillo de color rosa antes de que aparezca el color verde o azul característico.



Para conseguir la acumulación del acido piruvico y poderlo detectar, la fermentación se llevará a cabo en condiciones ligeramente alcalinas para inactivar a la enzima Piruvato Descarboxilasa. La identificación se hará mediante pruebas cualitativas coloradas. La acumulación de acetaldehido se logrará adicionando sulfato de sodio al medio de cultivo, este agente acompaña al acetaldehido formando un producto diazotico de adición soluble en agua, la reacción es como sigue:



El acetaldehido es regenerado por tratamiento con acido o base y es identificado haciendo reaccionar con agente específico que forma un producto colorado.

La producción de CO<sub>2</sub> durante la fermentación se detectará visualmente observando la liberación de burbujas.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 50 tubos de ensaye de 18 x 150 mm
- 10 tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- 1 gradilla
- 1 piqueta con agua destilada
- 6 pipetas graduadas de 5 ml
- 1 espátula
- 1 centrifuga
- 1 baño de agua
- 1 balanza granataria
- 5 ml de suspensión de levaduras al 10% en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M
- 5 ml de suspensión de levaduras al 10% en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5M
- 10 ml de suspensión de levaduras al 10% en agua
- 20 ml de Glucosa al 10% en agua
- 2 ml de Nitroprusiato de sodio al 0.5% en agua recientemente preparado
- 4 ml de acido tricloroacetico al 10%
- 10 ml de hidroxido de amonio concentrado
- 6 gramos de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 0.5 gramos de sulfato de sodio
- 2 ml de NaOH al 10%
- 2 ml de 2,4 dinitrofenilhidracina saturada en HCl 2M
- 4 ml de Biquinidina al 3%



MÉTODOS

I.-ACUMULACION DE PIRUVATO.

- 1.- A un tubo de ensaye de 18 x 150 mm adicionar 5 ml de una suspensión de levadura al 10% en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M y en otro depositar 5 ml de una suspensión de levadura al 10% en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5M.
- 2.- Añadir a cada tubo 5 ml de glucosa al 10% y mezclar la suspensión.
- 3.- Incubar a 37°C en un baño de agua durante una hora agitando de vez en cuando.
- 4.- Observar la velocidad de desprendimiento de burbujas en los tubos y registrarlas.
- 5.- Al terminar la incubación agregar 5 ml de ácido tricloroacético al 10% a ambos tubos y mezclar vigorosamente.
- 6.- Distribuir el contenido de cada tubo a un par de tubos de 13 x 100 mm y rotularlos como SMI y SN2 respectivamente. Centrifugar a 3,000 r.p.m. por 10 minutos.
- 7.- Con los sobrenadantes SMI realizar la Prueba del Nitroprusiato de sodio y con los SN2 la prueba de la dinitrofenilhidracina para identificar la presencia de piruvato.

II.-DETECCION DE PIRUVATO

A) PRUEBA DEL NITROPRUSIATO DE SODIO

- Efectuar lo siguiente con los tubos SMI:
- 1.- En un tubo de ensaye de 18 x 150 mm agregar con una espátula suficiente (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sólido hasta llenar una altura de 1 cm a partir del fondo.
  - 2.- Adicionar 5 ml de sobrenadante SMI y mezclar.
  - 3.- Agregar 4 gotas de una solución recientemente preparada de Nitroprusiato de sodio al 0.5% y mezclar vigorosamente.
  - 4.- Por la pared interna del tubo depositar lentamente 5 ml de NH<sub>4</sub>OH concentrado de manera que se estratifique. NO MEZCLAR.
  - 5.- Colocar el tubo de ensaye en la gradilla y dejar reposar 15 minutos.
  - 6.- Observar la aparición de un anillo verde o azul en la interfase y comparar la intensidad del color entre los dos sobrenadantes SMI.

NOTA: Cuando en el sobrenadante ocurren cambios con grupo tiol libre, aparecerá un anillo de color rosa antes de que aparezca el color verde o azul característico.

B)PRUEBA DE LA 2,4 DINITROFENILHIDRACINA

RESULTADOS

Realizar lo siguiente con los dos sobrenadantes SN2:

- 1.-Colocar 2 ml de sobrenadante en un tubo de ensaye de 18 x 150 mm y adicionar 1 ml de una solución de 2,4 dinitrofenilhidracina saturada en HCl 2M, mezclar homogéneamente.
- 2.-Transferir 5 gotas de esta mezcla a otro tubo de ensaye de 18 x 150 mm y agregar 1 ml de NaOH al 10%, mezclar.
- 3.-Enseguida añadir 3 ml de agua destilada y mezclar nuevamente. Dejar reposar durante 15 minutos.
- 4.-Si la solución toma una coloración café rojiza oscura indicará la presencia de piruvato. Compare la intensidad de color desarrollada con los dos sobrenadantes SN2 y registre la.

III.- ACUMULACION DE ACETALDEHIDO

- 1.- En dos tubos de ensaye de 18 x 150 mm depositar 5 ml de una suspensión de levadura al 10% en agua respectivamente.
- 2.- Añadir 0.5 gramos de sulfito de sodio a uno de los tubos y mezclar.
- 3.- Adicionar a ambos tubos 5 ml de glucosa al 10% y homogenizar.
- 4.- Incubar los tubos a 37°C en baño de agua durante una hora.
- 5.- Después de la incubación distribuir el contenido de cada tubo en un par de tubos de ensaye de 13 x 100 mm rotulados SNA y SNB respectivamente.
- 6.- Centrifugar los 4 tubos a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 7.- Emplear solamente los sobrenadantes SNA para hacer la identificación de acetaldehido, los sobrenadantes SNB quedarán en reserva.

IV.-DETECCION DE ACETALDEHIDO

A)PRUEBA DE LA BIPIRIDINA

Efectuar lo siguiente solamente con los sobrenadantes SNA:

- 1.-Colocar 2 ml de sobrenadante en un tubo de 18 x 150 mm y adicionar 0.5 ml de una solución recientemente preparada de nitroprusiato de sodio al 0.5%.
- 2.-Enseguida añadir 2 ml de Biperidina al 3% en agua y mezclar, dejar reposar 15 minutos; si está presente el acetaldehido se observará un color rosa. Comparar las intensidades de color dadas por los dos sobrenadantes.



B) PRUEBA DE LA S, 4 DINITROFENILHIDRACINA

Realizar lo siguiente con los dos sobresantes S2S:

- 1.- Colocar 2 ml de sobresante en un tubo de ensaye de 18 x 150 mm y adicionar 1 ml de una solución de S, 4 dinitrofenilhidracina saturada en HCl 5M, mezclar homogéneamente.
- 2.- Transferir 5 gotas de esta mezcla a otro tubo de ensaye de 18 x 150 mm y agregar 1 ml de NaOH al 10%, mezclar.
- 3.- Enseguida añadir 3 ml de agua destilada y mezclar nuevamente. Dejar reposar durante 15 minutos.
- 4.- Si la solución toma una coloración café rojiza oscura indicará la presencia de piruvato. Compare la intensidad de color desarrollada con los dos sobresantes S2S y registre.

III.- ACUMULACION DE ACETALDEHIDO

- 1.- En dos tubos de ensaye de 18 x 150 mm depositar 5 ml de una suspensión de levadura al 10% en agua respectivamente.
- 2.- Añadir 0.5 gramos de sulfito de sodio a uno de los tubos y mezclar.
- 3.- Adicionar a ambos tubos 5 ml de glucosa al 10% y homogenizar.
- 4.- Incubar los tubos a 37°C en baño de agua durante una hora.
- 5.- Después de la incubación distribuir el contenido de cada tubo en un par de tubos de ensaye de 13 x 100 mm rotulados S2A y S2B respectivamente.
- 6.- Centrifugar los 4 tubos a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 7.- Emplear solamente los sobresantes S2A para hacer la identificación de acetaldéhid, los sobresantes S2B quedarán en reserva.

IV.- DETECCION DE ACETALDEHIDO

A) PRUEBA DE LA BIPIRIDINA

Efectuar lo siguiente solamente con los sobresantes S2A:

- 1.- Colocar 2 ml de sobresante en un tubo de 18 x 150 mm y adicionar 0.2 ml de una solución recientemente preparada de nitroprusiato de sodio al 0.2%.
- 2.- Enseguida añadir 2 ml de Bipiridina al 3% en agua y mezclar, dejar reposar 15 minutos; si está presente el acetaldéhid se observará un color rosa. Comparar las intensidades de color dadas por los dos sobresantes.

DISCUSION

RESULTADOS

1.- En la siguiente tabla registrar los resultados obtenidos durante la detección de piruvato y CO<sub>2</sub>.

CONDICIONES DE LA FERMENTACION	PRESENCIA DE PIRUVATO		VELOCIDAD DE DESPRENDIMIENTO DE CO <sub>2</sub>
	Prueba del Nitroprusiato	Prueba de la DNFH	
GLUCOSA + Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			
GLUCOSA + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			

(+++): fuertemente positiva, (++) : medianamente positiva; (+): debilmente positiva  
 (-): ausencia de color o de desprendimiento de burbujas

2.- En la siguiente tabla anotar sus resultados observados en la detección de acetaldéhid tras la fermentación de glucosa por S. cerevisiae

CONDICIONES DE LA FERMENTACION	PRESENCIA DE ACETALDEHIDO
	Prueba de la Bipiridina
GLUCOSA+SULFITO DE SODIO	
GLUCOSA-SULFITO DE SODIO	

(+++): fuertemente positiva, (++) : medianamente positiva; (+): debilmente positiva, (-): ausencia de color.



