

FIJACION DE ANHIDRIDO CARBONICO DURANTE LA OXIDACION DE LA GLUCOSA POR LEVADURAS *

06.57.08

A. O. M. STOPPANI, SUSANA L. S. DE FAVELUKES,
LUCIA CONCHES y F. L. SACERDOTE

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires
y Laboratorio de Metabolismo Celular, Comisión Nacional de la Energía Atómica

Es sabido que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fija anhídrido carbónico. En comunicaciones anteriores (7 a y b) se estudió el mecanismo de la fijación de $C^{14}O_2$ durante la oxidación de piruvato, acetato y acetaldehído por ese microorganismo y se demostró la incorporación del anhídrido carbónico a través del ciclo del ácido cítrico. En este trabajo se estudia la fijación de CO_2 durante la oxidación aeróbica y anaeróbica de la glucosa por levadura de fermentación alta (*S. cerevisiae*) y baja (*S. carlsbergensis*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Son los mismos empleados en los trabajos anteriores (7 a y b). La levadura de fermentación baja era la cepa Nº 1436 de la sección Micología del Instituto Malbrán y se cultivó en el siguiente medio: glucosa, 10 g; urea, 1 g; fosfato monopotásico, 2 g; sulfato de amonio, 0,5 g; extracto de levadura Difco, 3 g; mosto de cerveza, 200 ml, y agua hasta 1 l. La antimicina A fué provista por la Wisconsin Alumni Research Foundation.

Las incubaciones se efectuaron en el vaso de reacción descrito en la figura 1. A es una ampolla de decantación de 125 ml de volumen cuyo tubo de evacuación se cortó a 5 mm por debajo de la llave. El orificio superior se cerró con un tapón de goma atravesado por un trocar (O) y un tubo de vidrio conectado al compensador de volumen VC: el extremo superior del tubo se cerró con la llave de tres vías, G, para entrada de gas. Cuatro aparatos iguales se montaron en batería sobre un agitador eléctrico para reacción de Kahn. La suspensión de levadura se colocó en la ampolla de decantación; se añadió la glucosa, y luego el bicarbonato radiactivo. Inmediatamente se cerró el orificio superior de la ampolla con el tapón del compensador de volumen cuyo émbolo,

* Presentado en la Sociedad Argentina de Biología el 3 de octubre de 1957.

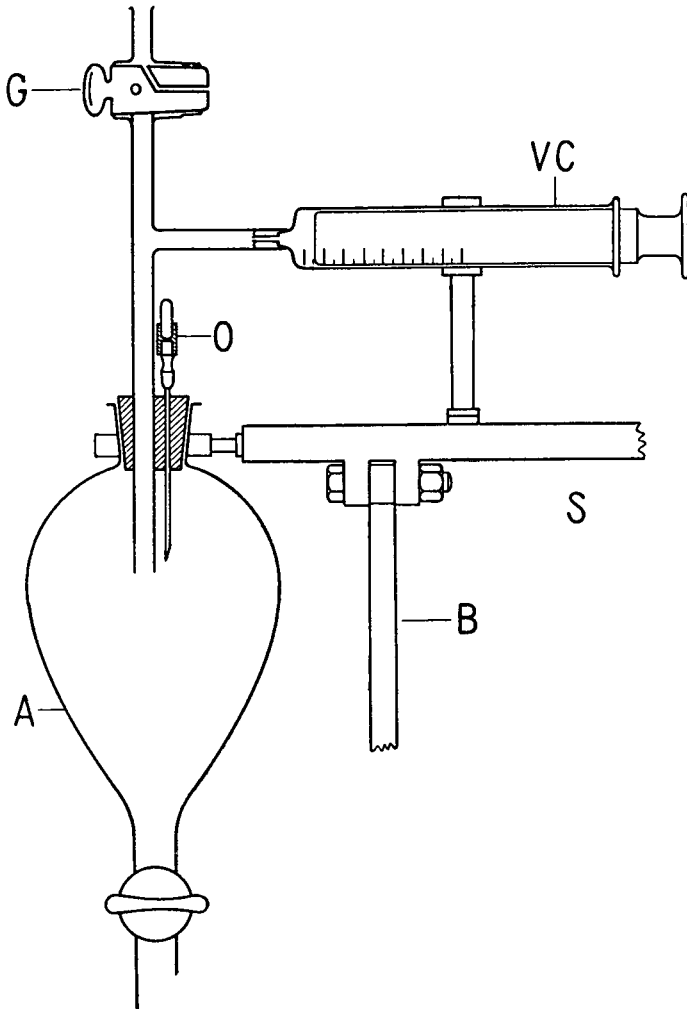


FIGURA 1

Aparato para incubación de levadura con $C^{14}O_2$. A, Cámara de reacción; G, entrada de gases; O, salida de gases; VC, compensador de volumen; B, pie móvil del soporte (S) de agitador tipo Kahn.

lubricado con aceite de parafina se ajustó previamente a 10 ml, iniciándose la agitación. Las muestras se tomaron después de los tiempos indicados en cada caso en la forma antes descrita. En las incubaciones bajo atmósfera de nitrógeno, después de colocar la levadura en la ampolla de decantación se pasó nitrógeno de

cilindro durante 5 minutos. Luego, mientras fluía todavía el gas, por el trocar, con jeringa de tuberculina provista de una aguja delgada se añadió en forma sucesiva la glucosa y el bicarbonato radiactivo. Después de retirar la aguja se cerró la llave G, el orificio O, y se puso en marcha la agitación. El consumo de oxígeno y la formación de anhídrido carbónico de la levadura se midieron por el método directo de Warburg.

Los resultados se expresan como en los trabajos anteriores (7 a y b). La distribución relativa de C^{14} fijado en presencia de glucosa se ha corregido respecto a los blancos correspondientes. Para ello se resta a la actividad incorporada a cada compuesto durante la fijación de $C^{14}O_2$ en presencia de glucosa, la actividad correspondiente en el testigo. Los valores hallados se suman y se establece su proporción porcentual que figura en la columna de distribución "corregida". En esta forma se establece con más precisión la influencia del sustrato sobre la distribución del C^{14} .

RESULTADOS

1) *Fijación de anhídrido carbónico durante la oxidación de la glucosa.* — La levadura asimila anhídrido carbónico durante la oxidación de la glucosa (fig. 2). En ausencia de sustrato la radiactividad fijada es pequeña y sigue el ritmo del consumo de oxígeno. En presencia de glucosa hay al principio una fuerte fijación de C^{14} que excede ampliamente a la velocidad de oxidación de la glucosa, pero luego la incorporación de anhídrido carbónico se efectúa con ritmo menor (fig. 2). La brusca fijación inicial diferencia la incorporación de anhídrido carbónico con glucosa de la que tiene lugar con acetaldehído, acetato y piruvato (7 a y b) donde la velocidad de fijación es en general paralela a la oxidación del sustrato. La diferencia se evidencia comparando la fijación en presencia de cantidades equivalentes de piruvato y glucosa (fig. 3). En los experimentos anteriores con acetato y piruvato (7 a y b) la incorporación de $C^{14}O_2$ se estudió a pH 2,5 para asegurar una rápida oxidación de esos sustratos. No siendo la glucosa un electrólito, la influencia de la acidez del medio pudo ser estudiada en experimentos a pH 2,5 y 7.4. La tabla 1 muestra que la fijación de anhídrido carbónico en medio ácido es al principio más lenta que en medio alcalino no obstante el igual consumo de oxígeno en ambos medios. La diferencia puede atribuirse a la

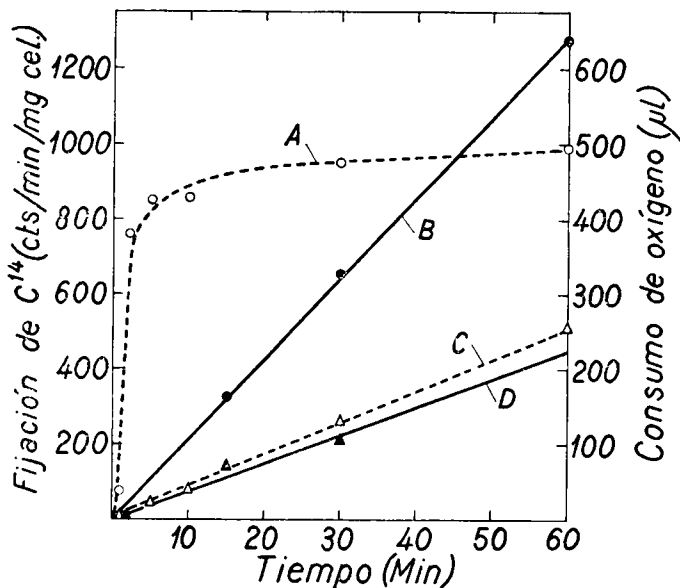


FIGURA 2

Fijación de C¹⁴O, y consumo de oxígeno durante la oxidación de la glucosa por *S. cerevisiae*. Levadura, 28.5 mg/ml. Glucosa, 0.005 M. Fosfato pH 7.4, mM. 23°. Aire en la fase gaseosa. En el experimento de fijación de anhídrido carbónico radioactivo. 4.2 μmoles de C¹⁴O₃ HNa (3.1 10⁶ cts/min). Volumen final en el experimento manométrico, 2.0 ml. y en el de fijación de anhídrido carbónico, 10 ml. A, Fijación de C¹⁴ en presencia de glucosa, y C, por el testigo. B, Consumo de oxígeno en presencia de glucosa, y D, por el testigo.

Tabla 1

Influencia del pH sobre la fijación de C¹⁴O₂ por *S. cerevisiae* en presencia de glucosa.

285 mg de levadura en 10 ml de fosfato 0,4 mM 4,2 μmoles de C¹⁴O₃HNa (3,1 10⁶ cts/min). 50 μmoles de glucosa.

Duración de la oxidación (min)	C ¹⁴ fijado (cts/min/mg cel.)	
	pH 2,5	pH 7,1
2	248	760
5	630	852
30	990	952

menor concentración de iones bicarbonato en el medio inicialmente ácido. Posteriormente el pH sube llegando a ≈ 5 (medido con indicadores). En cambio en los vasos con pH 7,4, no hubo variaciones significativas de la concentración de iones hidrógeno.

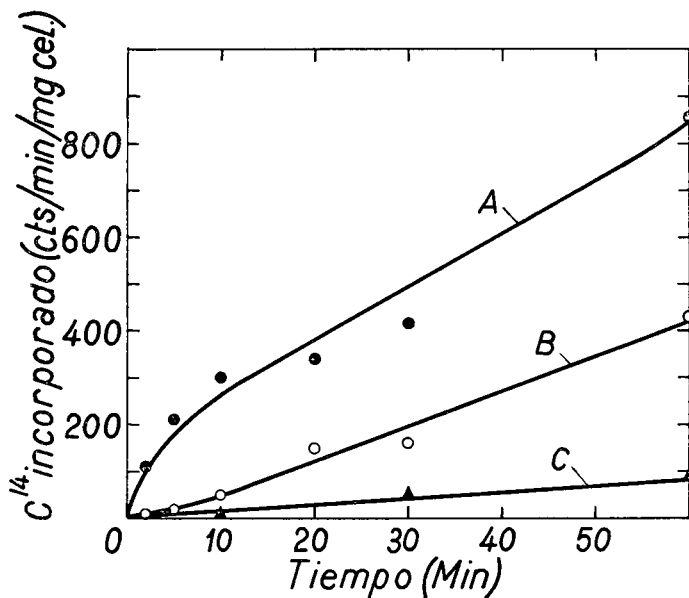


FIGURA 3

Comparación de la fijación de $C^{14}O$, durante la oxidación de la glucosa y ácido pirúvico por *S. cerevisiae*. Levadura, 492 mg. Glucosa, 50 μ moles. Ácido pirúvico, 100 μ moles. Fosfato 0,4 mM. pH 2,8. 4,2 μ moles de $C^{14}O_3$ HNa ($3,1 \cdot 10^6$ cts/min). 27°. Aire en la fase gaseosa. A, Fijación de C^{14} en presencia de glucosa; B, en presencia de ácido pirúvico, y C, por el testigo.

2) *Distribución del C^{14}* . — Durante la oxidación de la glucosa en presencia de bicarbonato radiactivo numerosas sustancias fijan C^{14} (Tabla 2). La mayoría son solubles en metanol-agua, es decir de bajo peso molecular. Ello se debe a que en ausencia de compuestos nitrogenados no es posible la síntesis de proteínas celulares. Entre las sustancias que adquieren radiactividad los ácidos aspártico y glutámico son las principales. En segundo término aparecen los ácidos tricarbóxicos y el *l*-málico, y en último lugar, con menos del 2 % del C^{14} fijado, el fosfoglicerato, los hexosafosfatos, los ácidos succínico y fumárico y los aminoácidos alanina, serina y treonina. Si a la radiactividad fijada en presencia de glucosa se sustrae la correspondiente a los testigos (radiactividad corregida), se nota que la glucosa determina una mayor fijación en los ácidos tricarbóxicos, *l*-málico, fumárico y los hexosafosfatos, vale decir compuestos relacionados con la fermentación de la glucosa.

El C^{14} fijado durante la oxidación de sustratos endógenos tiene una distribución parecida (Tabla 3), si bien el número de compuestos marcados es menor y la proporción de C^{14} fijado en el ácido aspártico es mayor que en presencia de glucosa.

Tabla 2

Distribución del C^{14} fijado por *S. cerevisiae* durante la oxidación de glucosa en presencia de $C^{14}O_2$

285 mg de levadura suspendida en 10 ml de fosfato 0,4 mM pH 7,4 con 50 μ moles de glucosa y 4,2 μ moles de $C^{14}O_3HNa$ (3,1 10^6 cts/min) durante 2 horas

Sustancia	Radiactividad (%)	
	Total	Corregida
Acido aspártico	41,3	38,5
Acido glutámico	40,9	35,2
Acido málico	5,0	7,8
Acido cítrico (con aconítico e isocítrico)	5,2	10,0
Alanina	1,5	1,0
Serina	0,9	0,7
Aminoácidos básicos	1,1	1,1
Acido fumárico	0,8	1,6
Acido succínico	0,6	0,0
Acido fosfopirúvico	0,4	0,1
Acido fosfoglicérico	0,4	0,5
Hexosa fosfatos	1,3	2,7
Otros compuestos	0,6	0,8

Tabla 3

Distribución del C^{14} fijado durante la oxidación de sustratos endógenos por *S. cerevisiae* en presencia de $C^{14}O_2$

En iguales condiciones experimentales que en la Tabla 2. Glucosa ausente

Sustancia	Radiactividad (%)
Acido aspártico	51,1
Acido glutámico	36,0
Acido <i>l</i> -málico	4,1
Acido cítrico (con aconítico e isocítrico)	0,9
Alanina	2,0
Acido fumárico	1,0
Acido succínico	1,0
Otros compuestos	3,9

3) *Cinética de la fijación del anhídrido carbónico.* — La distribución del carbono radiactivo en los distintos compuestos a través del tiempo permite establecer la vía de incorporación del $C^{14}O_2$ al metabolismo de la levadura. Si un compuesto es precursor de otro la proporción relativa de carbono radiactivo disminuye en el primero cuando aumenta en el segundo (6) y la curva de distribución porcentual tiene pendiente negativa mientras que en el segundo compuesto la curva de distribución porcentual tiene primero pendiente positiva, pasa por un máximo y luego adquiere pendiente negativa. De acuerdo a estos principios se ha analizado la fijación de $C^{14}O_2$ durante la oxidación de la glucosa (fig. 4).

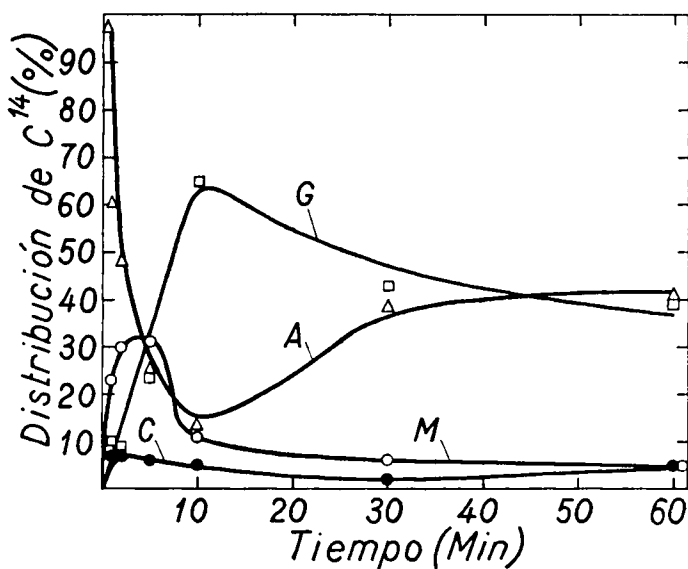


FIGURA 4

Distribución relativa de C^{14} fijado por *S. cerevisiae* durante la oxidación de glucosa en presencia de $C^{14}O_2$. Iguales condiciones experimentales que en la figura 2. Levadura incubada con glucosa.

Si el período de fijación es suficientemente breve sólo el ácido aspártico presenta curva con pendiente negativa e inicialmente (15 seg de fijación) es el único compuesto que en el cromatograma aparece radiactivo. Después de 10 min de oxidación la distribución de C^{14} en el ácido aspártico pasa por un mínimo y en el glutámico por un máximo. Al cabo de 60 minutos se llega

a una distribución estacionaria de C^{14} que subsiste 2 horas después de iniciado el experimento (los últimos 60 minutos se omiten en la figura 4).

No obstante la menor proporción de $C^{14}O_2$ fijado en los testigos sin glucosa también en esos experimentos se ha analizado (fig. 5) la distribución de C^{14} . El ácido aspártico es el único com-

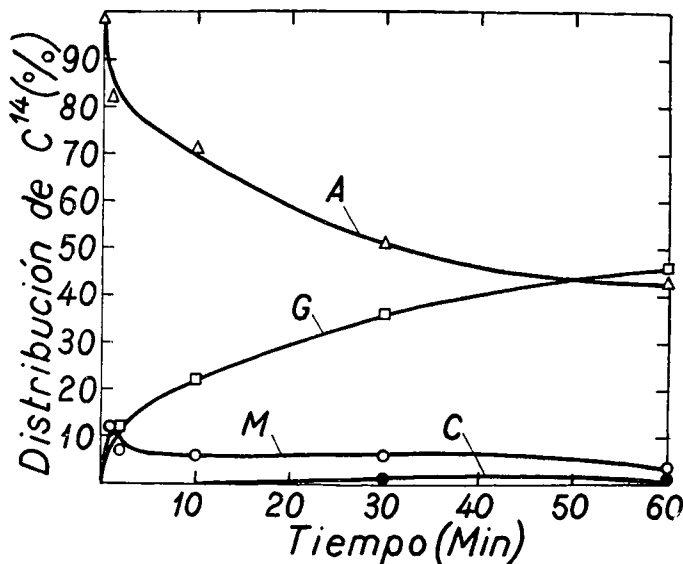


FIGURA 5

Distribución relativa de C^{14} fijado por *S. cerevisiae* durante la oxidación de sustratos endógenos. Iguales condiciones experimentales que en la Figura 2. Testigo sin glucosa.

puesto que tiene curva con pendiente negativa. Al cabo de un cierto tiempo se llega a un estado estacionario sin que se observen los máximos y mínimos de distribución que se produce en presencia de glucosa.

4) *Fijación de $C^{14}O_2$ durante la oxidación anaeróbica de la glucosa.* — La figura 6 muestra que la levadura fija $C^{14}O_2$ bajo atmósfera de nitrógeno. Con 5 minutos de incubación la cantidad de C^{14} fijada anaeróbicamente es notablemente mayor que en aerobiosis pero al cabo de 10 minutos la fijación aeróbica excede ligeramente la anaeróbica.

La distribución del C^{14} fijado, es fuertemente afectada por la ausencia de oxígeno. En primer lugar, la cantidad de C^{14} que se

incorpora a la proteína celular disminuye notablemente en condiciones anaeróbicas. En efecto al cabo de 5 minutos de incubación (fig. 6) la incorporación de C¹⁴ en la proteína celular fué, en aire 40 % y en N₂ 21 %; después de 10 minutos la diferencia fué todavía mayor, pues la incorporación en aire era 51 % y en

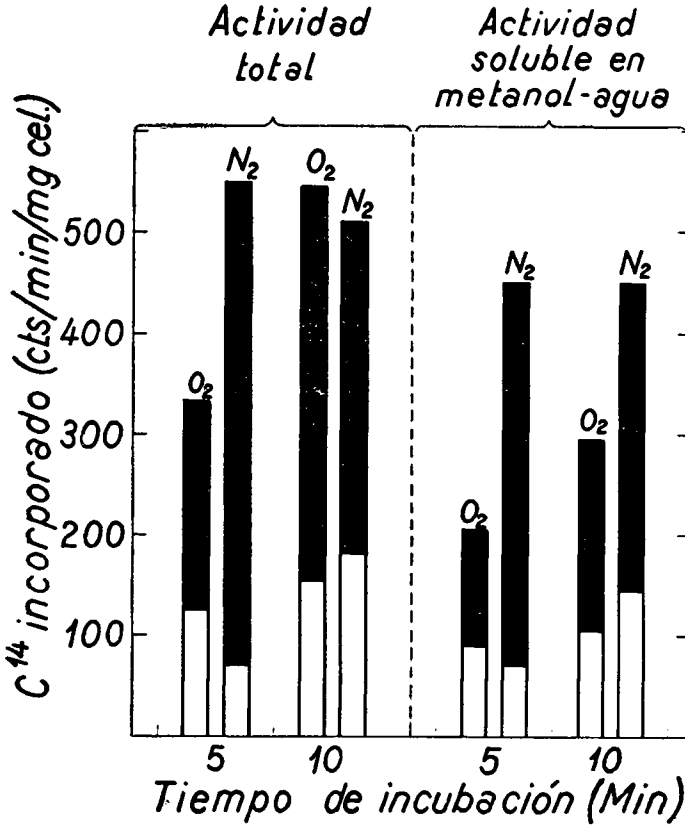


FIGURA 6

Fijación de C¹⁴O₂ por *S. cerevisiae* durante la oxidación aeróbica o anaeróbica de la glucosa. Levadura, 22,7 mg/ml. Glucosa, 0,005 M. En el experimento de fijación de anhídrido carbónico, 4,2 μmoles de C¹⁴O₃ HNa (3,1 10⁶ cts/min). Volumen final en el experimento manométrico, 2,0 ml, y en el de fijación de anhídrido carbónico, 10 ml. 18°. Las zonas grisadas representan la diferencia entre la fijación en presencia de glucosa y el testigo sin glucosa. Intercambio gaseoso en presencia de

glucosa: Q_{O_2} , 16,1; $-Q_{CO}$, 15,9 y $-Q_{CO_2}^N$, 19,0. Idem del testigo: Q_O 2,6; $-Q_{CO_2}$, 2,6 y $-Q_{CO_2}^{N_2}$, 0,3. Valores correspondientes a 10 min. de incubación.

N_2 6 %. En segundo lugar la distribución de C^{14} en cada compuesto rotulado es fuertemente afectada por la ausencia de oxígeno. En nitrógeno, aumenta intensamente la incorporación a los ácidos aspártico, *l*-málico, fumárico y succínico, en grado menor en el cítrico, mientras que se mantiene comparativamente constante la fijación en el glutámico (fig. 7).

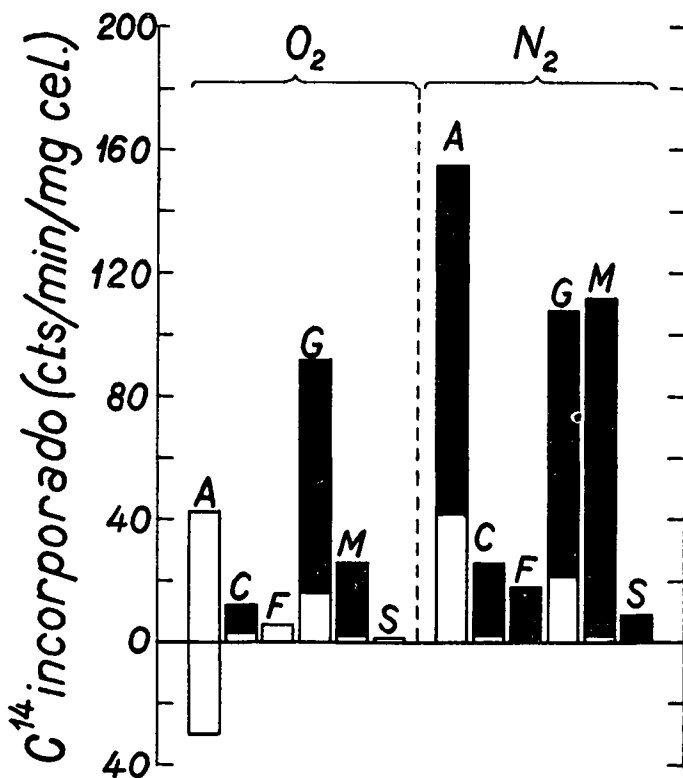


FIGURA 7

Distribución del C^{14} fijado durante la oxidación aeróbica o anaeróbica de la glucosa. Experimento de la figura 6. 5 minutos de incubación. Las zonas grisadas representan la diferencia entre la fijación en presencia de glucosa y el testigo sin glucosa. A, Aspártico; C, cítrico (con aconítico e isocítrico); F, fumárico; G, glutámico; M, *l*-málico y S, succínico.

5) *Influencia de la antimicina A sobre la fijación de $C^{14}O_2$.* — Este antibiótico inhibe selectivamente los procesos oxidativos intracelulares (¹), pues interfiere el transporte de los electrones a nivel

de la citocromo reductasa. Sobre la levadura, inhibe el consumo de oxígeno, y exagera la fermentación aeróbica de la glucosa que eleva al nivel de la fermentación anaeróbica (1). Estos resultados están confirmados por las medidas respiratorias consignadas al pie de la figura 8. El efecto de la antimicina A sobre la fijación

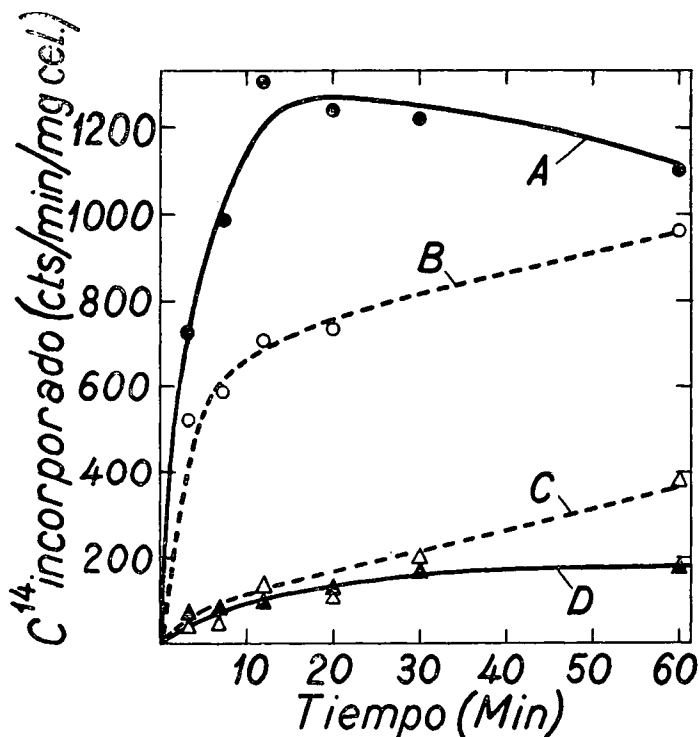


FIGURA 8

Fijación de $C^{14}O_2$ durante la oxidación de la glucosa en presencia de antimicina A. Levadura, 12 mg/ml. Glucosa, 0,005 M. 25°. Aire en la fase gaseosa. En el experimento de fijación de anhídrido carbónico, 4,2 μ moles de $C^{14}O_3$ HNa (3,1 10^6 cts/min). Antimicina A, 13 μ g/ml. Volumen final en el experimento manométrico, 2,0 ml, y en el de fijación de anhídrido carbónico, 6,0 ml. A, Fijación de C^{14} con glucosa y antimicina A; B, con glucosa; C, testigo, y D, con antimicina A. Intercambio gaseoso en presencia de glucosa: Q_{O_2} , 30,7 y $-Q_{CO_2}$, 37,3 glucosa y antimicina A, Q_{O_2} , 1,5

y $-Q_{CO_2}$, 46,2; antimicina A. Q_{O_2} , 1,5 y $-Q_{CO_2}$, 2,0, y del testigo Q_{O_2} , 2,3 y $-Q_{CO_2}$, 3,1.

de $C^{14}O_2$ está condicionado por la presencia de glucosa. Con glucosa la antimicina A exagera notablemente la fijación de $C^{14}O_2$ y la fermentación. En ausencia de glucosa la antimicina A dismi-

nuye ligeramente la incorporación de $C^{14}O_2$ al mismo tiempo que inhibe el consumo de oxígeno.

La antimicina A también afecta la distribución del C^{14} fijado (fig. 9), pues a los 12 minutos de incubación, aumenta la rotulación de los ácidos aspártico, fumárico, málico y succínico y disminuye la del glutámico. La fijación de C^{14} en los ácidos tricarbóxicos no se modifica. Diferencias similares se comprueban después de tres minutos de incubación si bien entonces no hay variaciones importantes en la fijación de C^{14} en el ácido aspártico.

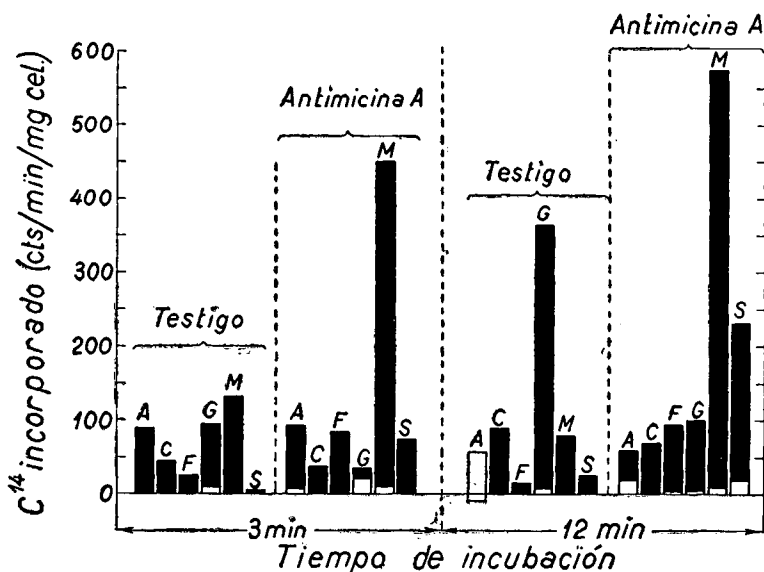


FIGURA 9

Influencia de la antimicina A sobre la distribución del $C^{14}O_2$ fijado durante la oxidación de la glucosa. Experimento de la figura 8. Las zonas grisadas representan la diferencia entre el C^{14} fijado en presencia de glucosa menos el correspondiente al testigo. A, C, F, G, M y S, como en la figura 7.

6) *Fijación y distribución del C^{14} en los ácidos aspártico y glutámico.* — Los ácidos aspártico y glutámico, por la cantidad de C^{14} incorporado y por su relación con los ácidos oxalacético y alfaetoglutámico, dos intermediarios esenciales del ciclo del ácido cítrico están estratégicamente situados para analizar la vía de incorporación del $C^{14}O_2$ al metabolismo de la levadura. El aumento del C^{14} fijado en estos aminoácidos, durante la incubación puede explicarse: 1) por variación de la concentración del amino-

ácido, y 2) por variación de su actividad específica. Esto último implica dos posibilidades: a) aumento en la actividad específica de cada carbono, y b) rotulación múltiple.

En el experimento de la Tabla 4 la concentración intracelular de glutámico se duplicó, mientras que la actividad específica aumentó en proporción notablemente mayor. La escasa variación en la cantidad de glutámico se explica por la falta de nitrógeno en el medio que previene la síntesis del aminoácido.

Tabla 4

Actividad específica y concentración de ácido glutámico en *S. cerevisiae* durante la oxidación de la glucosa.

492 mg de levadura en 10 ml de fosfato 0,4 mM pH 2,8. 50 μ moles de glucosa. 4,2 μ moles de $C^{14}O_3HNa$ (3,1 10^6 cts/min). En los tiempos indicados se toman muestras que se precipitan con 9 vol. de metanol. El ácido glutámico se aísla por cromatografía bidimensional sobre papel.

<i>Tiempo de oxidación</i>	<i>Concentración de ácido glutámico μmoles ($\frac{\quad}{mg\ cel.}$)</i>	<i>A ctividad específica del ácido glutámico (cts/min/μmol)</i>
2	0,41	34
5	0,38	220
10	0,81	230
20	0,83	320
30	0,68	350
120	0,32	820

La distribución de C^{14} en el ácido aspártico (Tabla 5) demuestra que al principio el C^{14} se incorpora en el carbono 4, pero luego tiende a fijarse también en el carbono 1. En el ácido glutámico (Tabla 6), el carbono 1 es el que fija al principio la mayor parte del C^{14} (79,0 %) y el carbono 5 el resto (21,0 %). La proporción en 1 disminuye durante el experimento y la del carbono 5 se mantiene constante, lo que significa que otros carbonos fuera de 1 y 5 se rotulan durante la oxidación de la glucosa, si bien en pequeña proporción.

7) *Fijación de anhídrido carbónico por la levadura de fermentación baja (*Saccharomyces carlsbergensis*).* — En esta leva-

Tabla 5

Distribución de C^{14} en el ácido aspártico

Mismo experimento que en la Fig. 2. El ácido aspártico se separa de los extractos de células por cromatografía bidimensional sobre papel. Se eluye, se mezcla con 31 μ moles de ácido aspártico inerte y se decarboxila en presencia de transaminasa y citrato de anilina (a); con cloramina T (b) o se oxida totalmente (c). El anhídrido carbónico se precipita como carbonato de bario. La radiactividad se calcula para espesor nulo. Medidas en duplicado.

Duración de la oxidación (min)	Radiactividad del			$\frac{a}{b}$ (%)	$\frac{b}{c}$ (%)
	C_3 (a) (cts/min)	$C_1 + C_2$ (b) (cts/min)	ΣC_{1-5} (c) (cts/min)		
2	661	745	730	90	102
5	345	423	450	76	94
10	111	196	181	61	107
30	338	562	545	61	103

Tabla 6

Distribución de C^{14} en el ácido glutámico.

Mismo experimento que en la Fig. 2. El ácido glutámico se separa de los extractos de células por cromatografía bidimensional sobre papel. Se eluye, se mezcla con glutámico inerte y se decarboxila con cloramina T (a); con ácido hidrazoico (b) o se oxida totalmente (c). El anhídrido carbónico se precipita como carbonato de bario. Se calcula la radiactividad para espesor nulo. Medidas en duplicado o triplicado

Duración de la oxidación (min)	Radiactividad del			$\frac{a}{b}$ (%)	$\frac{b}{c}$ (%)
	C_1 (a) (cts/min)	C_2 (b) (cts/min)	ΣC_{1-5} (c) (cts/min)		
5	326	87	413	79	21
10	647	205	830	78	25
30	351	129	551	63	23
60	855	336	1446	59	23

dura existe una deficiencia natural en la actividad oxidativa respiratoria, es decir que el metabolismo de la glucosa se desarrolla como en la levadura de fermentación alta, cuando ésta consume glucosa en atmósfera de nitrógeno o en presencia de antimicina A.

La Tabla 7, muestra que una preparación típica de *S. carlsbergensis*, fija anhídrido carbónico en un proceso metabólico dependiente de la fermentación de la glucosa. El C^{14} fijado se distribuye en forma parecida a la observada en la levadura alta en anaerobiosis, es decir hay una distribución relativamente preponderante en los ácidos dicarboxílicos: aspártico, málico, fumárico y succínico.

Tabla 7

Fijación de anhídrido carbónico por levadura de fermentación baja (*Saccharomyces carlsbergensis*)

7,5 mg de levadura. 10 μ moles de glucosa. 1,6 μ moles de $C^{14}O_3HNa$ (1,2 10^6 cts/min). Volumen total, 2,0 ml 20 min de incubación. 30°. Aire.

Adiciones	Formación de CO_2 (μl)	Consumo de oxígeno (μl)	C^{14} fijado (cts/min) ($\frac{\text{cts/min}}{\text{mg cel.}}$)
Glucosa	326	29	1600
Ninguna	37	32	350

Tabla 8

Distribución de C^{14} fijado por *S. carlsbergensis* durante la fermentación de la glucosa.

Experimento de la Tabla 7. C^{14} fijado en los compuestos solubles en metanol-agua (cts/min/mg cel), 1600 con glucosa y 300 en el testigo

Sustancia	C^{14} fijado ($\frac{\text{cts/min}}{\text{mg cel.}}$)		del C^{14} fijado en Distribución (%) presencia de glucosa	
	Con glucosa	Testigo	Observada	Corregida
Acido aspártico	480	66	30,0	32,0
Acido glutámico	107	21	6,7	6,6
Acido cítrico (con aconítico e isocítrico)	48	5	3,0	3,3
Acido l-málico	510	105	32,0	31,2
Acido fumárico	96	27	6,0	5,3
Acido succínico	152	63	9,5	6,8
Acido fosfoenolpirúvico	26	—	1,6	2,0
Treonina	40	—	2,5	3,1
Alanina	91	9	5,7	6,3
Otros compuestos	48	4	3,0	3,5

DISCUSIÓN

En trabajos anteriores se demostró que durante la oxidación de los ácidos pirúvico y acético por *S. cerevisiae* hay fijación de anhídrido carbónico por carboxilación de fosfoenolpirúvico formado durante la operación del ciclo del ácido cítrico. Como el ciclo es la etapa final de la oxidación de la glucosa (³), la fijación de C¹⁴O₂ en la oxidación aeróbica de esta última tiene una primera explicación. El ácido fosfoenolpirúvico se forma además en la fase anaeróbica del proceso de glucolisis, lo que implica una fijación fermentativa de anhídrido carbónico. Este último proceso queda demostrado por los hechos siguientes: 1) En la fijación aeróbica de C¹⁴O₂ la velocidad de fijación es inicialmente muy superior a la del consumo de oxígeno en contraposición a lo que se observa durante la oxidación de ácido pirúvico, acético o acetaldehído. 2) En presencia de nitrógeno la levadura fija anhídrido carbónico con ritmo mayor que en aerobiosis, especialmente al principio de la fijación. 3) La antimicina A, que inhibe completamente la oxidación, exagera la incorporación de anhídrido carbónico radiactivo; y 4) En la levadura de fermentación baja a pesar de la escasa actividad oxidante tiene lugar una fijación de anhídrido carbónico muy parecida a la de la levadura de fermentación alta.

La síntesis de oxalacetato por la reacción de Utter y Kurahashi (¹²), es decir carboxilación del ácido fosfoenolpirúvico (observaciones con J. Cannata a publicar) es el mecanismo principal de incorporación de anhídrido carbónico al metabolismo de la levadura. Así lo demuestra la rápida incorporación al aspartato que es el primer compuesto que aparece con C¹⁴ en los cromatogramas. Si la fijación se produjera a través de la reacción "málica" (Ochoa), el ácido málico debería aparecer en los cromatogramas con curva de pendiente negativa, lo que no ocurre. El oxalacetato formado puede: 1) transaminarse a aspartato; 2) reducirse a *l*-malato, y 3) pasar oxidativamente a citrato. Las dos primeras reacciones no requieren oxígeno, más aún, un medio reductor las estimula y el malato por reducción ulterior lleva a fumarato y succinato. En cambio la formación de citrato y alfacetoglutarato (precursor del glutamato) son procesos oxidativos. La antimicina A, la anaerobiosis y la adaptación a esta última (levadura de

fermentación baja) exageran la incorporación de C^{14} hacia los ácidos dicarboxílicos, mientras que el oxígeno produce el efecto contrario y aumenta la formación de glutamato.

La distribución de C^{14} en los ácidos aspártico y glutámico es consistente con la operación del ciclo del ácido cítrico en la levadura. El oxalacetato rotulado en el C 4 marca el aspártico en el carboxilo correspondiente. La rotulación del C 1 del aspártico se explica por el equilibrio del oxalacético con el fumárico, a través del málico. Las moléculas rotuladas aparentemente en forma simétrica del fumárico, envían C^{14} al carboxilo 1 del ácido aspártico. El ácido glutámico se rotula al comienzo del experimento en los carbonos 1 y 5, pero principalmente en el primero (79-78 %). Después de 30 minutos de incubación, 14-16 % del C^{14} fijado se encuentra en los C 2-4. La fijación en el C-1 está de acuerdo con la operación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La fijación en el C-5 se ha observado (^{2, 10}) en otros organismos (*Clostridium kluyveri* y oviducto de pollo). Una posibilidad es la formación de acetoacetato y su rotulación en C 1 por intermedio de CO_2 (Plaut y Lardy); otra es la fisión (^{11, 13}) del succinato-1-4- C^{14} (reacción de Thunberg - Wieland) formado por reducción del oxalacetato. En ambos casos se formaría acetato-1- C^{14} que rotularía el glutámico en el C-5. La formación de acetoacetato por condensación de acetyl-CoA es poco probable en presencia de un exceso de glucosa, que asegura una cantidad de oxalacetato capaz de canalizar la totalidad de los grupos acetilos hacia el ciclo del ácido cítrico. Tampoco la reacción de Thunberg - Wieland (¹³) parece apoyada por los experimentos de síntesis de ácido succínico a partir de acetato- C^{14} (⁸). La cinética de la distribución de C^{14} en el ácido glutámico formado por acetato- C^{14} puede aclarar el problema (observaciones a publicar).

RESUMEN

1) La levadura de fermentación alta (*S. cerevisiae*) fija anhídrido carbónico radiactivo durante la oxidación aeróbica y anaeróbica de la glucosa y la levadura de fermentación baja (*S. carlsbergensis*) durante la fermentación de la glucosa. 2) La fijación anaeróbica (atmósfera de nitrógeno, inhibición de la oxidación por antimicina A) tiene igual o mayor eficiencia que la aeróbica.

3) Fijan el C^{14} los ácidos aspártico, glutámico, *l*-málico, cítrico, fumárico, succínico, alanina, fosfoglicérico, fosfoenolpirúvico y los hexosafosfatos. 4) En ausencia de oxígeno o en presencia de antimicina A, la fijación de C^{14} en los ácidos *l*-málico, fumárico, succínico y aspártico aumenta y disminuye en el ácido glutámico. 5) El compuesto inicial de fijación es el ácido oxalacético formado por carboxilación del ácido fosfoenolpirúvico. 6) La distribución de C^{14} en los ácidos aspártico y glutámico concuerda con la operación del ciclo del ácido cítrico como vía oxidativa final en la levadura.

SUMMARY

1) Baker's yeast (*S. cerevisiae*) incorporates radioactive carbon dioxide during the aerobic and anaerobic oxidation of glucose, and brewer's yeast (*S. carlsbergensis*) during glucose fermentation. 2) The anaerobic fixation of carbon dioxide by baker's yeast (under nitrogen atmosphere, or in the presence of antimycin A) has the same or higher efficiency than the aerobic fixation. 3) After steady state fixation, the main reservoirs of C^{14} are aspartic and glutamic acids. Malic, tricarboxylic, fumaric, succinic, phosphoglyceric and phosphopyruvic acids, alanine and hexosephosphates become also radioactive. 4) In the absence of oxygen or in the presence of antimycin A, labelling of malic, fumaric, succinic and aspartic acids increases whereas that of glutamic acid decreases. 5) Carbon dioxide is incorporated by synthesis of oxalacetate through carboxylation of phosphopyruvate. 6) The distribution of C^{14} in aspartic and glutamic acids is consistent with the operation of the citric acid cycle as the main oxidative pathway in baker's yeast.

Se agradece la ayuda de E. R. Squibb & Sons Argentina, y la eficaz colaboración de las Dras. E. H. Ramos y M. M. Pigretti en los experimentos de degradación de aminoácidos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) AHMAD K., SCHNEIDER H. G. y STRONG F. M.: Arch. Biochem., 1950, 28, 281. — 2) HENDLER R. W. y ANFINSEN C. B.: J. Biol. Chem., 1954, 209, 55. — 3) KOSHLAND D. E. y WESTHEIMER F. H.: J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 3383. — 4) OCHOA S.: J. Biol. Chem., 1948, 174, 133. — 5) PLAUT G. W. E. y LARDY H. A.: J. Biol. Chem., 1951, 192, 435. — 6) SHEPPARD C. W. y HOUSEHOLDER A. S.: Cit. en Radioactive Isotopes por W. J. Whitehouse y J. L. Putman. Oxford University Press, 1953, p. 293. — 7) STOPPANI A. O. M., CONCHES L., FAVELUKES S. L. S. DE y SACERDOTE F. L.: a) Rev. Soc. argent. Biol., 1956, 32, 175; b) Anales Asoc. Quim. Arg., 1957, 45, 91. — 8) STOPPANI A. O. M., FAVELUKES S. L. S. DE y CONCHES L.: Anales Asoc. Quim. Argen. (en prensa). — 9) THUNBERG T.: Skand. Arch. Physiol., 1920, 40, 1. — 10) TOMLINSON N.: J. Biol. Chem., 1954, 209, 605. — 11) TOPPER Y. J. y STETTEN D.: J. Biol. Chem., 1954, 209, 63. — 12) UTTER M. F. y KURAHASHI K.: J. Biol. Chem., 1953, 207, 821. — 13) WIELAND H.: Ergeb. Physiol., 1922, 20, 477.