



## EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS INTRACELULARES DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA DETERMINACIÓN DE SUS VELOCIDADES VOLUMÉTRICAS DE FORMACIÓN.

R. Axayácatl González G., Iliana del Carmen Barrera Martínez, Juan S. Aranda Barradas\*. Departamento de Bioingeniería, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del IPN. Av. Acueducto s/n, Col. La Laguna Ticomán, México, D.F. 07340. Tel/Fax 57296000 ext 56338, [jaranda@upibi.ipn.mx](mailto:jaranda@upibi.ipn.mx), [j.s.ab@hotmail.com](mailto:j.s.ab@hotmail.com)

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, Ingeniería Metabólica, compuestos intracelulares

**Introducción.** La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es usada como agente leudante en la industria panificadora, por lo que debe cumplir con ciertos estándares de calidad. Uno de ellos es la concentración intracelular de trehalosa, compuesto de reserva que le confiere estabilidad. Para obtener la concentración idónea de trehalosa en la levadura, se analizan las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de este con el fin de construir un modelo matemático que explique la acumulación de trehalosa. Para la validación del modelo se debe considerar el número de reacciones en la ruta y la cantidad de compuestos en estado pseudoestable con el objeto de obtener los grados de libertad del sistema, los cuales indican el número de compuestos (intracelulares y extracelulares) que se deben cuantificar. La selección de los métodos de extracción más adecuados para los compuestos intracelulares es de suma importancia, ya que con esto se asegura la correcta cuantificación de los mismos.

**Metodología.** A partir de la información reportada para el metabolismo de *S. cerevisiae*. De los compuestos totales en la ruta, se identificaron aquellos que podían ser cuantificados dentro (fase biótica) y fuera (fase abiótica) de la célula.

Para determinar la concentración de los compuestos intracelulares, se preparó una suspensión de levadura y se trató con tres diferentes métodos: 1) Inactivación celular: a la suspensión de levadura se le adicionó ácido perclórico 0.66 M en una proporción 1:1 en volumen. 2) Ruptura celular: se colocaron 5 mL de suspensión de levadura en un tubo Falcon® de 15 mL y se adicionaron esferas de vidrio de 1.0 mm de diámetro hasta cubrir el líquido. Posteriormente, se sometió el tubo a agitación en vórtex por 5 minutos. 3) Inactivación celular con ruptura: a la suspensión de levadura se le adicionó se adicionó ácido perclórico 0.66 M en una proporción 1:1 en volumen. Se transfirieron 5 mL de la mezcla anterior a un tubo Falcon® de 15 mL y se adicionaron esferas de vidrio de 1.0 mm de diámetro hasta cubrir el líquido. Posteriormente, se sometió el tubo a agitación en vórtex por 5 minutos. Para cuantificar la concentración de los compuestos intracelulares se utilizaron las siguientes técnicas: azúcares totales por antrona, azúcares

reductores por DNS y cuantificación de proteína por BRADFORD.

**Resultados y discusión.** Del análisis del metabolismo de *S. cerevisiae*, se construyó una ruta simplificada para la síntesis de trehalosa, con un total de 41 reacciones y 48 compuestos totales. De los compuestos dentro de la ruta construida, se identificaron los aquellos que son cuantificables en las fases biótica (proteína, trehalosa, glucógeno) y abiótica (glucosa, CO<sub>2</sub>, etanol y O<sub>2</sub>). Para los compuestos dentro de la fase biótica, se probaron 3 diferentes métodos de extracción, a fin de comparar y elegir al que mejores resultados arrojará, obteniéndose los resultados mostrados en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Métodos de extracción de compuestos intracelulares.

Componente / Tratamiento	Proteína mg/mL	Trehalosa mg/L	Glucógeno mg/mL
Control	0	1.59	0.0055
Ruptura	<b>166.29</b>	5.40	<b>0.0108</b>
Inactivación	0	5.05	0.0042
Inactivación con Ruptura	0	<b>9.52</b>	0.0074

**Conclusiones.** De las diferentes técnicas de extracción planteadas, la ruptura celular resultó ser el mejor método para la cuantificación de proteína y glucógeno, mientras que para la extracción de trehalosa, la combinación de inactivación celular con ruptura arrojó los mejores resultados. Actualmente, se continúa con el trabajo de investigación enfocado a la construcción del modelo matemático y su validación con el análisis de las velocidades de reacción.

**Agradecimiento.** Proyecto SIP-IPN 20090347.

### Bibliografía.

1. Aranda Barradas J. S.; Salgado Manjarrez E. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* biomass production and its uses in the food industry. . *Tecnología de Alimentos*, (37): 7-15.
2. Nielsen, J. (2001) Metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (55) 263-283.
3. Stephanopoulos, G.; Aristidou, A.; Nielsen, J. 1998. Metabolic Pathway Synthesis. 285-307. In: **Metabolic Engineering**. Academic Press. Academic Press. USA.