



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

“EFECTO DE HIDROLIZADOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS
SOBRE EL CONSUMO DE
GLUCOSA POR LEVADURAS EN UNA FERMENTACIÓN”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.A. ANGÉLICA PATRICIA RAMOS PUEBLA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JORGE SORIANO SANTOS

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2011

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

Este trabajo contó con el apoyo del CONACyT a través de la beca 40400

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis
“EFECTO DE HIDROLIZADOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS SOBRE EL CONSUMO DE
GLUCOSA POR LEVADURAS EN UNA FERMENTACIÓN”

Que presentó

I.A. Angélica Patricia Ramos Puebla

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos

Asesor: Dra. Araceli Tomasini Campocosío

Asesor: Dra. María Antonieta Brizuela Herrada

Jurado:

Presidente: Dra. Araceli Tomasini Campocosío

Secretario: Dr. Gerardo Díaz Godínez

Vocal: Dra. Maura Tellez Tellez

Vocal: Dr. Saúl Tlecuítl Beristain

The image shows four handwritten signatures stacked vertically. The top signature is small and appears to be 'A. Campocosío'. The second signature is larger and more stylized, likely 'G. Díaz Godínez'. The third signature is also stylized, likely 'M. Tellez Tellez'. The bottom signature is the largest and most complex, likely 'S. Tlecuítl Beristain', and is enclosed within a large, hand-drawn oval.

“El conocimiento no es una ocupación de la mente,
sino un ejercicio que transforma el alma entera,
que afecta la vida en su totalidad”

Zambrano, M 1996, 57

A QUIENES SIEMPRE HAN ESTADO CONMIGO

Y HAN CONFIADO, Y CREIDO EN MI

DURANTE ESTA TRAYECTORIA:

MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a Dios por haberme permitido llegar hasta este momento y darme todos los recursos para lograr estar en donde hoy me encuentro.

Agradezco enormemente al Dr. Jorge Soriano Santos, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y por el apoyo que siempre recibí sin condición alguna, gracias por la confianza brindada en la realización de este maravilloso proyecto.

Quisiera tener más que palabras para agradecer toda la ayuda brindada de parte de la Dra. Araceli Tomasini Campocosio, quien siempre tuvo tiempo para esclarecer dudas y se mantuvo interesada en el proyecto desde el inicio de este, y siempre tuvo más de un consejo para resolver los inconvenientes presentados durante el desarrollo del proyecto, gracias por el conocimiento brindando, el apoyo incondicional y la confianza que desde siempre recibí.

A los revisores quien con su oportuna participación ayudaron a enriquecer este trabajo, gracias por la atención y por el tiempo dedicado.

A mis padres y hermanos por siempre estar apoyándome en todo lo que he decidido emprender, por confiar enormemente en mi y siempre ser un ejemplo de ser algo más, por la motivación que siempre he recibido de todos ustedes, por los momentos maravillosos que hemos pasado juntos, saben que los amo y son una parte esencial de mi vida y de todo lo que emprenda en ella. Gracias por ser la inspiración de mi vida.

A César por el amor, la comprensión y el apoyo que he tenido de su parte, por el aliento brindado cuando las cosas no iban como esperaba y la fortaleza que representas para mí, por alentarme a seguir preparándome y por ayudarme con la redacción de este trabajo.

A mi eterno y gran compañero Kaninchen quien a pesar de la distancia siempre ha estado a mi lado para apoyarme, brindarme un consejo o una palabra de aliento, gracias por estar en mi vida y por brindarme la oportunidad y la confianza de ser parte de mi vida, gracias por la enorme motivación que significas en mi vida.

A Tomás y Canelo quienes siempre llenan de alegría mis días, los amo enormemente.

Alex quien más de una vez mostró un interés por este proyecto.

Y no por menos importante, pero no terminare sin antes agradecer de manera especial a mis compañeros y amigos con los que conviví estos 2 años, Adriana, Erik y Raúl quienes siempre estuvieron cuando los necesite de alguna manera, por la grata convivencia y por hacer esto más llevadero en los momentos difíciles del trabajo, gracias por su amistad y apoyo incondicional, los estimo enormemente.

A mis compañeros del grupo de trabajo del S – 154, quienes mas de una vez se dieron un tiempo para aportar algún tipo de conocimiento y estuvieron apoyándome en todo momento, especialmente a Hugo, Jess, Pao, Jaime y Alejandro, gracias por hacerme sentir parte del grupo.

RESUMEN

La biomasa de las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* son un subproducto de la destilación alcohólica, este subproducto es desechado por las industrias creando contaminación con el agua y desperdiciando sustratos bioquímicos de interés, tales como proteínas y ácidos nucleicos. La utilización industrial de las levaduras del género *Saccharomyces* es de interés práctico en México ya que cada año se desperdician cantidades cercanas o mayores a 1,000 toneladas de levaduras por los desagües de las destilerías de alcohol de caña y de licores alcohólicos (ron, brandy, tequila, etc.), además de la levadura de las industrias cerveceras. En casos particulares como la levadura de la cerveza, es una levadura inactiva (células muertas de la levadura sin “poder”) después del proceso de elaboración de la cerveza, es una fuente de nitrógeno de bajo costo con buenas características nutricionales y un sabor muy amargo, generalmente reconocido como seguro (GRAS), aunque la levadura de desecho puede tener usos diferentes, como para alimentación humana, éste uso aun presenta inconvenientes con respecto al contenido de ácidos nucleicos ya que puede causar enfermedades relacionadas con la elevación del ácido úrico mejor conocido como gota.

Por ello existen métodos por los cuales se pueden extraer los ácidos nucleicos y ser utilizados principalmente como potenciadores de sabor.

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento básico para el uso integral de la levadura residual observando el efecto de hidrolizados de ácidos nucleicos sobre el consumo de glucosa por levaduras en una fermentación. Para ello se estudiaron dos especies diferentes de levadura (*Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis*) obtenidas de diferentes fuentes con fines de recaudar mayor información y comparar entre las muestras los resultados obtenidos. Para este fin, se realizó una hidrólisis termo alcalina con NH_4OH al 5.9% a condiciones de tiempo y temperatura controlados (30 min, 75°C) con el propósito de extraer los hidrolizados de ácidos nucleicos, posteriormente los hidrolizados de ácidos nucleicos se purificaron parcialmente por filtración en gel, empleando una columna empacada usando como soporte Sephadex G – 50, obteniendo perfiles de elusión similares,

identificando como componentes principales proteína y ácidos nucleicos, en las fracciones colectadas.

Para evaluar el efecto de los hidrolizados de ácidos nucleicos las fracciones colectadas fueron añadidas a un medio de cultivo por separado y en determinada proporción (de acuerdo a la concentración de nitrógeno de cada hidrolizado purificado) para mantener una relación carbono/nitrógeno de 31. En este medio se llevó a cabo la fermentación, teniendo como inóculo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la fermentación fue monitoreada cada 4 h en un periodo de 40 h, analizando la cantidad de biomasa producida y azúcares reductores presentes en el medio. El efecto observado fue la reducción de la fase lag o de adaptación de la curva de crecimiento microbiano de manera significativa (ANOVA, $P < 0.05$) con respecto a una fermentación control, además de un consumo inmediato de la glucosa y un aumento en la biomasa producida en las fermentaciones que contenían, como fuente de nitrógeno, las fracciones de los hidrolizados de ácidos nucleicos. Se observó además que este efecto es inversamente proporcional al peso molecular del hidrolizado de ácidos nucleicos y directamente proporcional al grado de pureza.

De acuerdo a los resultados obtenidos los hidrolizados de ácidos nucleicos obtenidos de la hidrólisis termo alcalina pueden ser aplicados a la industria como herramienta para disminuir costos y tiempos, además de darle un uso potencial y diferente a la levadura residual.

ABSTRACT

The biomass of the yeasts pertaining to the genus *Saccharomyces* are a byproduct of alcoholic distillation. This byproduct is discarded by industry giving rise to water contamination and wasting biochemical substrates of interest, such as protein and nucleic acids. The industrial use of the *Saccharomyces* genus yeasts is of practical interest in Mexico, since each year amounts close or higher to 1000 tons of yeasts are wasted into the sewages by the distilleries of sugar cane alcoholic beverages and other liquors (rum, brandy, tequila, etc.), aside from the yeasts of the beer industry. In particular cases, such as the beer yeast, this becomes an inactive yeast (dead yeast cells, "without power") after the beer elaboration procedure, it is a nitrogen source of low cost with good nutritional characteristics and a very bitter taste, generally recognized as safe (GRAS). Although wasted yeast can have different uses, as for example for human feeding, this use still poses inconveniences with respect to the nucleic acid content, as this could cause diseases related with elevation of uric acid such as gout. There are methods to extract nucleic acids allowing for their use as taste enhancers. The present study aims at contributing to the basic knowledge for the integrated use of residual yeast by observing the effect of the nucleic acid hydrolysate on glucose consumption by fermenting yeasts. For this, two different yeast species were studied (*Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*) obtained from different sources, to attain more information and to compare the results obtained among samples. A thermo-alkaline hydrolysis with 5.9% NH_4OH was performed at controlled time and temperature conditions (30 min, 75°C) to extract the nucleic acid hydrolysates. Afterwards, these hydrolysates were partially purified through gel filtration, using a packed column with Sephadex G-50 as support, obtaining similar elution profiles, and identifying proteins and nucleic acids as the main constituents of the collected fractions. To assess the effect of nucleic acid hydrolysates, the collected fractions were added to a culture medium separately and at a given proportion (according to the nitrogen concentration of each purified hydrolysate) to maintain a relation of carbon/nitrogen of Fermentation was performed in this medium, using *Saccharomyces cerevisiae* yeast as inoculum; fermentation was monitored every 4 h for a 40-h period, analyzing the amount of produced biomass and the presence of reducing sugars in the medium. A significant reduction (ANOVA, $P < 0.05$) of the lag phase or

adaptation of the microbial growth curve (with respect to a control fermentation) was observed in addition to an immediate consumption of glucose and an increase in the produced biomass in those fermentations that had nucleic acids hydrolysate fractions as nitrogen source. It was also observed that this effect was inversely proportional to the molecular weight of the nucleic acids hydrolysate and directly proportional to the degree of purity. Based on the obtained results, the nucleic acid hydrolysates obtained from the thermo-alkaline hydrolysis can be applied to the industry as a tool to diminish costs and times, aside from providing a potential and different use to the residual yeast.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS	vi
ÍNDICE DE CUADROS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Levadura	2
1.2.1 Características celulares	2
1.2.2 Composición de la levadura	2
1.2.3 Metabolismo de las levaduras	3
1.3 Usos de la levadura	4
1.4 Levadura residual	6
1.5 Métodos para la obtención de ácidos nucleicos	8
1.5.1 Hidrólisis química de ácidos nucleicos	9
1.5.2 Hidrólisis ácida	10
1.5.3 Hidrólisis alcalina	10
1.6 Uso de ácidos nucleicos	11
2. JUSTIFICACION	13
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	15
❖Objetivo General:	15
❖Objetivos Específicos:	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1 Fuentes de obtención del extracto alcalino	17

5.2	Producción de biomasa	17
5.2.1	Inoculación de biomasa	17
5.2.2	Propagación de biomasa	18
5.2.3	Producción de biomasa	18
5.3	Extracción térmica alcalina de ácidos nucleicos	19
5.4	Determinación de nitrógeno total y proteína cruda	20
5.5	Determinación de proteína	21
5.6	Purificación parcial por filtración en gel Sephadex G-50	22
5.7	Electroforesis SDS – PAGE	22
5.8	Caracterización fisicoquímica de los hidrolizados de ARN	25
5.8.1	Cuantificación de grupos amino libres	25
5.9	Fermentación	26
5.9.1	Composición del medio de cultivo	26
5.9.2	Condiciones de la fermentación	26
5.9.3	Medición de biomasa	27
5.9.4	Consumo de glucosa	27
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6.1	Producción de biomasa	29
6.2	Extracción alcalina de ácidos nucleicos	30
6.3	Purificación parcial del extracto nitrogenado	32
6.3.1	Especie <i>S. cerevisiae</i>	32
6.3.1.2	Levadura residual industria cervecera	35
6.3.1.3	Levadura <i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82	38
6.3.2	Especie <i>Kluyveromyces fragilis</i>	41
6.3.2.1	<i>K. fragilis</i> L/12-8-2	41
6.4	Espectro de absorción de los extractos alcalinos	44
6.5	Evaluación de la actividad biológica	46
6.5.1	Fermentaciones con adición de las fracciones A	46
6.5.2	Consumo de glucosa	48
6.5.3	Fermentaciones con adición de las fracciones B	50

6.5.4 Consumo de glucosa	52
7. CONCLUSIONES	54
8. APÉNDICES	56
Apéndice A	56
Apéndice B	57
Apéndice C	59
Apéndice D	60
Apéndice E	61
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del uso de la levadura	5
Figura 2. Estructura básica del ADN y ARN	9
Figura 3. Hidrólisis ácida fuerte de los ácidos nucleicos.	10
Figura 4. Mecanismo de reacción de una hidrólisis alcalina	11
Figura 5. Estructura de los principales compuestos potenciadores de sabor.	12
Figura 6. Estrategia experimental para la obtención de hidrolizados de ácidos nucleicos y la evaluación de la actividad biológica	16
Figura 7. Esquema del bio-reactor utilizado en la producción de biomasa.	19
Figura 8. Reacción del TNBS con los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis alcalina (Adler-Nissen, 1979).	25
Figura 9. Perfil electroforético SDS – PAGE de Tradi – Pan. M = Marcador, MO = Muestra original, EC = Extracto crudo, FA = Fracción A, Fracción B.	34
Figura 10. Perfil electroforético SDS – PAGE de la levadura residual. M = Marcador, MO = Muestra original, EC = Extracto crudo, FA = Fracción A, Fracción B.	37
Figura 11. Perfil electroforético SDS – PAGE de Levadura <i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82. M = Marcador, EC = Extracto crudo, FA = Fracción A, FB = Fracción B.	40
Figura 12. Perfil electroforético SDS – PAGE de Levadura <i>K. fragilis</i> L/12-8-2. M = Marcador, EC = Extracto crudo, FA = Fracción A.	43
Figura 13. Espectros de absorción de los extractos alcalinos de las primeras fracciones obtenidas por filtración en gel. TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, KF-2 = <i>K. fragilis</i> L/12-8-2, SCC = <i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82.	44

Figura 14. Espectros de absorción de los extractos alcalinos de las segundas fracciones obtenidas por filtración en gel. TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, KF-2 = <i>K. fragilis</i> L/12-8-2, SCC = <i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82.	45
Figura 15. Efecto de la adición de las fracciones A que contienen los hidrolizados de ácidos nucleicos sobre el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> . TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, SCC = <i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82	47
Figura 16. Efecto del consumo de glucosa durante la fermentación con <i>S. cerevisiae</i> , con la adición de las fracciones A, obtenidas por filtración en gel. TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, KF-2 = <i>K. fragilis</i> L/12-8-2, SCC = <i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82	49
Figura 17. Efecto de la adición de las fracciones B que contienen los hidrolizados de ácidos nucleicos sobre el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> . TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, KF-2 = <i>K. fragilis</i> L/12-8-2, SCC = <i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82	51
Figura 18. Efecto del consumo de glucosa durante la fermentación con <i>S. cerevisiae</i> , con la adición de las fracciones B, obtenidas por filtración en gel. TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, KF-2 = <i>K. fragilis</i> L/12-8-2, SCC = <i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82	53
Figura 19. Curva estándar para la determinación de proteína verdadera.	56
Figura 20. Curva estándar de peso molecular de Sigma (cat. MW – SDSV – 70L) de la columna G – 50	58
Figura 21. Curva estándar para determinación de grupos aminos libres	59
Figura 22. Curva estándar para determinación de azucares reductores	60

ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1. Perfil de elusión en Sephadex G – 50, del extracto crudo obtenido después del tratamiento alcalino de Tradi – Pan®.	33
Cromatograma 2. Perfil de elusión en Sephadex G – 50, del extracto crudo obtenido después del tratamiento alcalino de la levadura residual de la industria cervecera.	36
Cromatograma 3. Perfil de elusión en Sephadex G – 50, del extracto crudo obtenido después del tratamiento alcalino de <i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82	39
Cromatograma 4. Perfil de elusión en Sephadex G – 50, del extracto crudo obtenido después del tratamiento alcalino de <i>K. fragilis</i> L/12-8-2.	42
Cromatograma 5. Determinación de V_0 y V_T para la caracterización de la columna	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición aproximada de levaduras industriales (g/kg de masa seca)	3
Cuadro 2. Composición del medio de inoculación.	17
Cuadro 3. Composición del medio líquido para propagación de biomasa.	18
Cuadro 4. Soluciones stock para la preparación de geles de electroforesis SDS – PAGE.	23
Cuadro 5. Composición de los geles de electroforesis SDS – PAGE.	23
Cuadro 6. Composición de la solución amortiguadora muestra.	24
Cuadro 7. Estándar para electroforesis SDS – PAGE	24
Cuadro 8. Composición del medio de cultivo utilizado para llevar a cabo las fermentaciones con el hidrolizado de ácidos nucleicos.	27
Cuadro 9. Crecimiento observado en el bio-reactor	29
Cuadro 10. Crecimiento observado en matraces	29
Cuadro 11. Extracción alcalina de ARN a 76°C	30
Cuadro 12. Contenido de proteína en los extractos crudos obtenidos.	31
Cuadro 13. Determinación de proteína en la levadura Tradi - Pan®	35
Cuadro 14. Determinación de proteína en la levadura de la industria cervecera.	38
Cuadro 15. Determinación de proteína en la levadura <i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82	41
Cuadro 16. Determinación de proteína en la levadura <i>K. fragilis</i> L/12-8-2.	43
Cuadro 17. Parámetros cinéticos del consumo de glucosa durante la fermentación con <i>S. cerevisiae</i> , con la adición de las fracciones A, obtenidas por filtración en gel. TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, SCC = <i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82	49

Cuadro 18. Parámetros cinéticos del consumo de glucosa durante la fermentación con <i>S. cerevisiae</i> , con la adición de las fracciones A, obtenidas por filtración en gel.	53
Cuadro 19. Perfil de pesos moleculares utilizados para la caracterización de la columna.	58

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En un trabajo previo se estudió la “Caracterización de dos fuentes de *S. cerevisiae* para la obtención del factor de tolerancia a la glucosa”, en la cual se buscó una fuente rica de extracción del factor de tolerancia a la glucosa y se obtuvieron hidrolizados alcalinos de ácidos nucleicos donde debería encontrarse el factor de tolerancia a la glucosa, ya que la hipótesis planteaba que este factor debía estar presente en una extracción de proteínas de la levadura, sin embargo, se encontró que lo que se extrajo fueron ácidos nucleicos.

En el experimento la actividad del factor de tolerancia a la glucosa se evaluó como el consumo de glucosa durante una fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

Uno de los resultados obtenidos en el trabajo, indicó que la fase de adaptación de la curva de crecimiento microbiano disminuye con los hidrolizados de ARN de diferentes pesos moleculares y de diferente pureza, esto en comparación de una fermentación control en la cual solo se tiene a la levadura *S. cerevisiae*. (Reyes, 2009), sin embargo, no se logró identificar cromo trivalente (Cr^{3+}) en los hidrolizados por lo que no se pudo asegurar la presencia del factor de tolerancia a la glucosa, tampoco se encontró ácido nicotínico en ningún extracto obtenido, como algunos autores proponen. Sin embargo, los hidrolizados de ácidos nucleicos presentaron un efecto sobre el consumo de glucosa en una fermentación con *S. cerevisiae*, lo que mostró que tenían actividad biológica.

Por lo cual persiste la duda de si en realidad los hidrolizados de ácidos nucleicos tienen efecto sobre el metabolismo de los carbohidratos aún en ausencia del cromo trivalente (Cr^{3+}) (Reyes, 2009).

1.2 Levadura

1.2.1 Características celulares

Las levaduras, por definición, son hongos unicelulares y organismos eucariotas que exhiben gran diversidad con respecto al diámetro celular, forma y color. Por ser un organismo eucarionte posee un alto grado de compartimentación celular, caracterizado por la presencia de su material hereditario dentro de un núcleo verdadero y estructuras subcelulares enmarcadas por membranas dentro de su citoplasma (Matile *et al.*, 1969). Sus células usualmente son de forma ovalada, aunque pueden ser esféricas, elípticas o cilíndricas, su tamaño puede variar desde 1 a 12 μm de diámetro, resultando la especie *Saccharomyces cerevisiae* una de las más grandes, especialmente cuando se encuentra en forma hexaploide (Van der Walt, 1971; Spencer y Spencer, 1997).

Las levaduras presentan estados vegetativos que se reproducen por fisión binaria o gemación y algunas pueden ser dimórficas o bifásicas y crecer como micelio bajo condiciones ambientales especiales (Ochoa y Vázquez, 2004). Su pared celular comprende del 15 al 25% de la masa seca de la célula y sus principales constituyentes son polisacáridos (80 – 90%), principalmente glucanos y mananos, (1 – 2%) quitina, (5 – 15%) proteínas y (2 – 14%) lípidos (Zinser y Daum, 1996).

1.2.2 Composición de la levadura

Los constituyentes macromoleculares de las levaduras comprenden polisacáridos y proteínas (>70%), polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos (Walker, 1998), fibra dietética, vitaminas y minerales. Además, presentan un exceso de aminoácidos esenciales (no sintetizados por el organismo humano) cuando se compara con el patrón de aminoácidos esenciales de la Food and Agriculture Organization (FAO), (1989), (Dziezak, 1987; Halász y Lásztity, 1991; Peixoto, 1996). El contenido de vitaminas B₁, B₂ y niacina, supera en magnitud al de alimentos tan importantes como la leche, queso y carnes.

En el Cuadro 1 se muestra la composición aproximada de dos diferentes tipos de levaduras, la levadura de pan y la levadura de cerveza, en el cual se aprecia que el contenido total de ácidos nucleicos (ADN + ARN) varía entre el 5 y el 13% según la tasa de crecimiento y la fase en la que se esté analizando, de los cuales solo del 1 – 2% corresponde a la concentración de ADN. (Wagner *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Composición aproximada de levaduras industriales (g/kg de masa seca)

Componente	Levadura panadera	Levadura de cerveza
Carbohidratos	180 – 440	390 – 600
Proteínas	380 – 590	370 – 420
Lípidos	40 – 50	39 – 45
Cenizas	45 – 75	73 – 81
Ácidos Nucleicos	52 – 95	39 – 43
Tiamina (Vit B ₁)	0.090 – 0.165	0.092 – 0.150
Riboflavina (Vit B ₂)	0.040 – 0.100	0.035 – 0.045
Piridoxina (Vit B ₆)	0.02 – 0.04	0.043 – 0.05

1.2.3 Metabolismo de las levaduras

Las levaduras son aerobias facultativas que en presencia de oxígeno son capaces de utilizar glucosa como fuente de carbono para producir CO₂, energía y biomasa; mientras que en condiciones anaerobias, como en fermentación alcohólica, no crecen eficientemente y la glucosa es convertida en bioproductos intermediarios tales como etanol, glicerol y CO₂. Por esta razón, la propagación de la levadura necesita de la suplementación de aire para lograr una producción óptima de biomasa (Bekatorou *et al.*, 2006). La mayoría de las levaduras

toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero les resulta favorable un medio ligeramente ácido con un pH entre 4.5 a 6.5 (Chaucheyras *et al.*, 1997).

La principal fuente de carbono y energía para algunas levaduras es la glucosa y otras además utilizan lactosa (Bekatorou *et al.*, 2006). En otros casos, emplean azúcares no hexosas, así como otras fuentes no convencionales.

La mayoría de las levaduras son capaces de asimilar fuentes de nitrógeno simples (orgánico e inorgánico), para biosintetizar aminoácidos y proteínas (Ostergaard *et al.*, 2000). Las fuentes de nitrógeno más comúnmente utilizadas son amonio, urea y aminoácidos, aunque se pueden emplear otras como poliaminas, ácidos nucleicos y vitaminas. Muchas especies sintetizan todas las vitaminas necesarias para su desarrollo, pero otras requieren biotina y otros compuestos.

Los requerimientos de fósforo de las células de levadura son utilizados para reacciones de transfosforilación en el metabolismo intermediario, y la concentración celular de fosfato libre es generalmente mantenida a muy bajos niveles (Kohlwein *et al.*, 1996).

1.3 Usos de la levadura

A lo largo del tiempo el uso de la levadura de manera activa ha ido evolucionando, sus aplicaciones van desde ser fuente de nutrientes, alimentos funcionales hasta el uso en la biorremediación (Figura 1).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza en la industria de alimentos y bebidas en formas diversas. En forma activa se emplea en la industria de panificación y productos horneados, en la fermentación alcohólica y otros procesos fermentativos como la producción de salsa de soya.

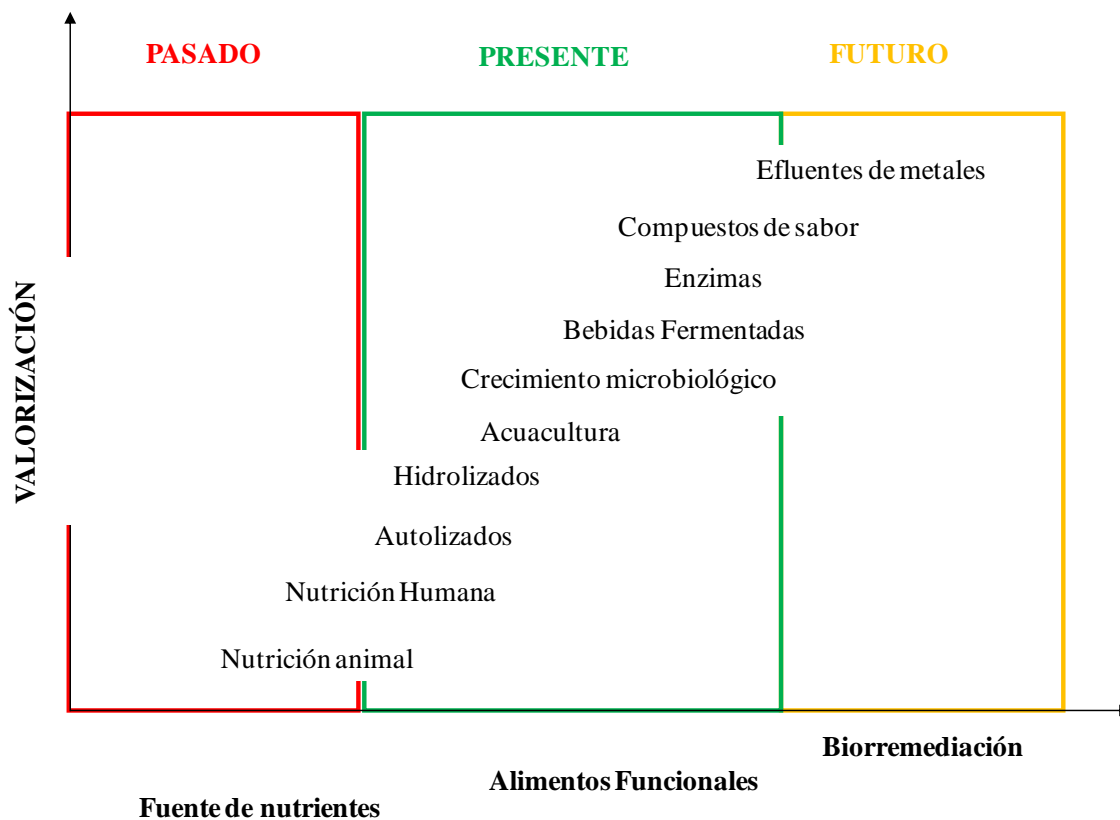


Figura 1. Evolución del uso de la levadura

Un concepto nuevo en las levaduras es la actividad probiótica que presentan solo ciertos géneros y especies, que tienen aplicación como ingredientes dietéticos que afectan beneficiosamente al huésped por estimulación selectiva del crecimiento y / o activan el metabolismo de las bacterias promotoras de la salud en el tracto intestinal. (Ferreira, 2009). *Saccharomyces boulardii* fue identificada principalmente como una especie separada de *Saccharomyces*, pero se demostró que su genoma es similar a *S. cerevisiae*, aunque presenta características más efectivas que la distinguen como un organismo probiótico comparado a otras cepas de *S. cerevisiae* (Ingram *et al.*, 2007; Ingram *et al.*, 2004). Otro caso particular es la actividad que muestra *Kluyveromyces fragilis*, esta especie tiene una amplia distribución en la naturaleza sobre todo en productos lácteos (Frank, 1997), usualmente fermenta los disacáridos y la lactosa (Pecota, 2005).

Las levaduras constituyen una fuente importante para la obtención de productos con actividad probiótica, ya sea como cepas vivas o utilizando derivados a partir de sus paredes celulares. Estos preparados han manifestado una comprobada actividad inmunoestimulante en animales de granja, así como mejoras en los procesos de la fisiología digestiva, contribuyendo a obtener mejores resultados productivos (Morales, 2004).

1.4 Levadura residual

La levadura de la cerveza puede ser conocida como levadura inactiva o residual (células muertas de la levadura sin “poder”) después del proceso de elaboración de la cerveza. Esta levadura es una fuente de nitrógeno de bajo costo con buenas características nutricionales y un sabor muy amargo, generalmente reconocido como seguro (GRAS; Ferreira, 2009).

Actualmente en México no se tienen cifras exactas de la cantidad de la levadura que es desechada de las industrias, se estima que cerca de 1,500 toneladas de levadura son desechadas por las destilerías de alcohol mexicanas, en lugares como California se reportan que 80, 000 botellas de cerveza producen 1,000 galones de levadura de desecho, mientras que en el área del Caribe se estima que se desechan 1700 Ton/año de levadura (Gómez y Viniegra, 1977). En las destilerías de alcohol y en las cervecerías se generan excedentes de levadura que inactivadas (por calor) no pueden usarse íntegramente para la obtención de diferentes derivados (Wagner *et al.*, 2008).

Las aplicaciones que comúnmente se le han dado son las siguientes:

- Alimentación animal

A nivel mundial la levadura de cerveza, después de la inactivación por el calor, es vendida principalmente como alimentación animal, debido a que las levaduras secas son una excelente fuente de proteína para cerdos y rumiantes (Huige, 2006).

El uso de la levadura *S. cerevisiae* como suplemento en la alimentación se ha mostrado como acertado en el crecimiento de los rumiantes (Gilling, 2004), traduciéndose la cantidad de alimento ingerido en un aumento de peso y en la cantidad y calidad de leche producida.

➤ Suplementos alimenticios

Los suplementos se preparan a partir de la levadura seca y molida, en los que la levadura se encuentra inactiva y en aquellos en los cuales la levadura está viva se usan como probióticos.

La biomasa de las levaduras puede utilizarse en la industria de alimentos para producir concentrados de proteína de la levadura. Los productos se encuentran generalmente en forma de polvos, tabletas, o en forma líquida. Esta última contiene enzimas para una mejor digestión, absorción y utilización de la levadura. Algunos de estos productos pueden ser rociados sobre los alimentos y pueden utilizarse como condimentos o mezclados con leche, jugos, sopas y salsas de carne.

➤ Potenciadores de sabor

Tradicionalmente se han empleado dos potenciadores de sabor: la salsa de soja y los extractos de levaduras, ambos obtenidos por hidrólisis enzimática de proteínas vegetales o animales, y conteniendo uno o varios compuestos tales como ácido glutámico, ácido guanílico e inosínico y sus sales, estos últimos obtenidos del ARN de la levadura.

➤ Extractos y autolisados de la levadura.

Los autolisados de levadura son concentrados de los componentes solubles de las células de levadura, que se producen predominantemente por autodigestión de las

células en condiciones de estrés nutricional. Los autolisados dan lugar a los extractos de levadura cuando se retiran los residuos celulares insolubles; además se emplean regularmente en la industria fermentativa como fuente de nitrógeno y otros nutrientes; y en producciones de alto valor agregado y como potenciadores de sabor en la industria alimenticia. (Vasallo *et al.*, 2001)

➤ Otros usos

Puede ser útil en el tratamiento contra el acné crónico, eczemas, diarrea infecciosa y algunas disfunciones cardiovasculares. (Girard y Dawson, 1995)

En el caso de la levadura desechada de las destilerías puede adicionarse a la gasolina como:

- ✘ Oxigenante.
- ✘ Recuperación de la energía que almacenan.

(Wagner *et al.*, 2008)

1.5 Métodos para la obtención de ácidos nucleicos

❖ Métodos enzimáticos.

Son procesos que se llevan a cabo a temperaturas bajas para minimizar reacciones colaterales y sobre todo para evitar la inactivación enzimática (las proteínas son muy lábiles

al calor), se pueden emplear las propias enzimas intracelulares o recurrir al uso de enzimas extracelulares.

❖ Métodos químicos.

Debido a su sencillez, alta eficacia y bajo costo son los únicos que han resistido los análisis económicos. El principal problema que se presenta es que deben conducirse reduciendo al máximo las posibles alteraciones de la composición de la biomasa, evitando la aparición de compuestos no naturales. (Wagner *et al.*, 2008)

1.5.1 Hidrólisis química de ácidos nucleicos

En general los ácidos nucleicos son químicamente muy estables especialmente en el caso del ADN, esto se debe a que la desoxirribosa carece de grupos reactivos; el 4'-OH está comprometido en el cierre del anillo y los 3'-OH y 5'-OH están formando enlaces fosfodiéster (Figura 2). El ARN es más reactivo debido a los grupos 2'-OH (Figura 2), esto se refleja en el tipo de hidrólisis que se lleve a cabo para la extracción de los ácidos nucleicos. (Luque *et al.*, 2001).

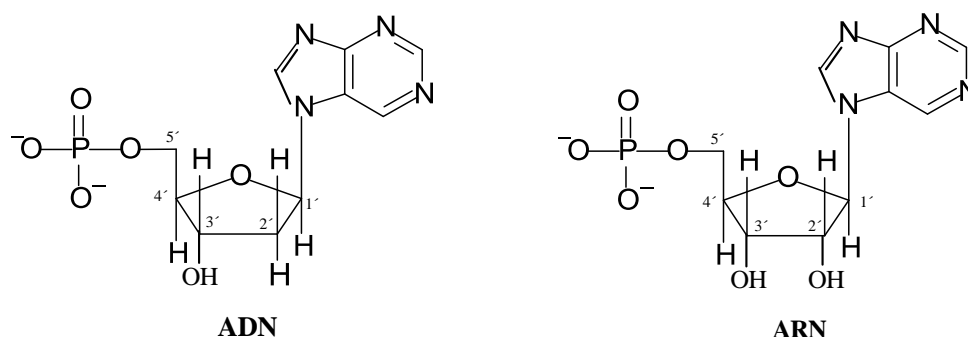


Figura 2. Estructura básica del ADN y ARN

1.5.2 Hidrólisis ácida

Los ácidos fuertes hidrolizan tanto los enlaces fosfodiéster entre los nucleósidos como los enlaces N – glicosídicos de cada nucleótido, (Figura 3), afecta por igual los enlaces del ADN como los del ARN, por lo cual este tipo de hidrólisis sirve para analizar la composición de bases de un ácido nucleico pero no para determinar su secuencia. (Luque *et al.*, 2001)

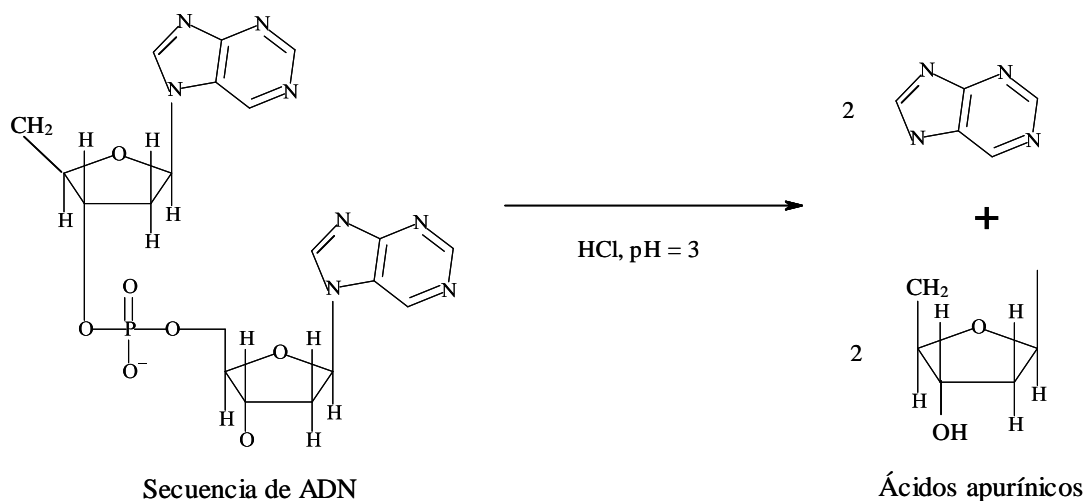


Figura 3. Hidrólisis ácida fuerte de los ácidos nucleicos.

1.5.3 Hidrólisis alcalina

El ARN se hidroliza rápidamente liberando sus nucleótidos en disoluciones diluidas de NaOH (pH 11). El medio básico afecta de manera distinta a los enlaces fosfodiéster, hidrolizando los del ARN pero no los del ADN. Los enlaces N – glicosídicos son resistentes a este tipo de hidrólisis. (Figura 4)

El ADN al contrario del ARN es resistente a la hidrólisis en medio alcalino, esto se debe a la ausencia de grupos 2'-OH en las unidades de desoxirribosa (Figura 2), lo que impide la hidrólisis ácida expuesta anteriormente. (Luque *et al.*, 2001)

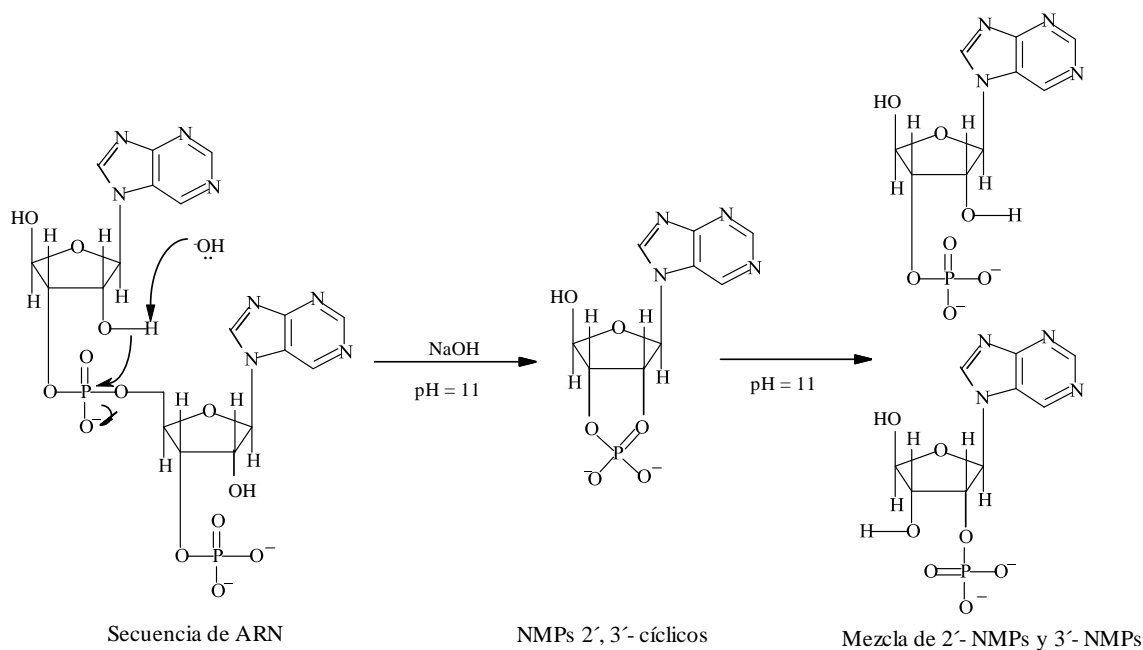


Figura 4. Mecanismo de reacción de una hidrólisis alcalina.
NMPs (nucleótidos mono fosfatos)

1.6 Uso de ácidos nucleicos

Las levaduras con un alto contenido de ácido nucleico (cerca del 10% ARN en base seca), son una excelente fuente de 5'- nucleótidos al procesar la biomasa por autólisis o hidrólisis parcial. El extracto de células de levaduras es usado como potenciador de sabor (sabor umami), los compuestos químicos responsables de este sabor umami son bases púricas, 5'- nucleótidos: inosinato disódico (IMP), guanilato disódico (GMP) y adenilato disódico (AMP), así como el glutamato monosódico (MSG), sales de inosin monofosfato, guanosin monofosfato y adenosin monofosfato, respectivamente. Sin embargo, la industria alimentaria

utiliza principalmente IMP y GMP (Figura 5). Esta aplicación incluye a productos cárnicos, salsas, sopas, patatas fritas y galletas, (Ferreira, 2009; Wagner *et al.*, 2008).

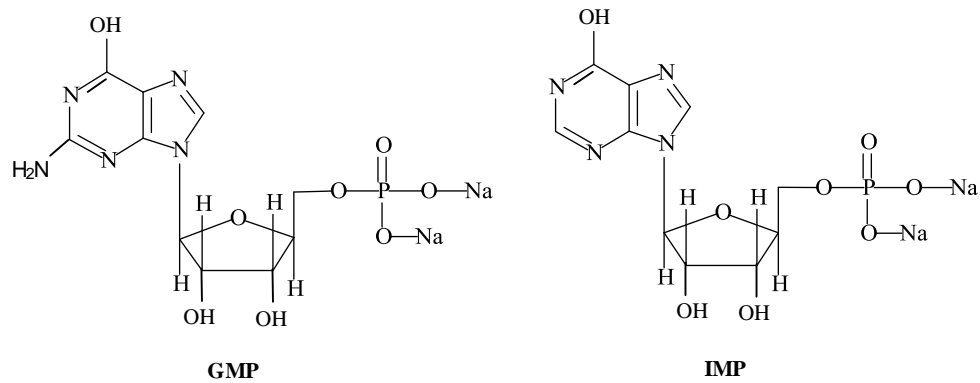


Figura 5. Estructura de los principales compuestos potenciadores de sabor.

2. JUSTIFICACION

La gran cantidad de levadura residual que es desechada de las destilerías de alcohol crean contaminación con el agua y se desperdician sustratos bioquímicos de interés, tales como la proteína y el ácido ribonucleico (Gómez y Viniegra, 1977), lo que obliga a buscar nuevas y diferentes alternativas para la reutilización de este tipo de levadura y al mismo tiempo darle un valor agregado aprovechando estos sustratos bioquímicos.

El principal problema que se tiene con este tipo de levadura es la elevada concentración de ácidos nucleicos ya que son perjudiciales para la salud, se ha observado que un extracto alcalino de ácidos nucleicos (Reyes, 2009; Zetić, 2001; Álvarez y Águila, 1983) podrían tener un efecto sobre el metabolismo de la glucosa en seres vivos superiores, esto no se puede asegurar debido a la falta de información del efecto de aminoácidos y bases nitrogenadas y ninguna información en microorganismos como la levadura, además que tampoco se ha investigado el efecto de extractos alcalinos de levadura sobre su metabolismo celular.

En un trabajo preliminar (Reyes, 2009) se observó que la adición de un extracto alcalino de levadura que contenía fundamentalmente una mezcla de proteína y ácidos nucleicos, en su mayoría ARN, (Edens *et al.*, 2002) provocó una disminución en la fase de adaptación, un aceleramiento de la curva de crecimiento, una mayor velocidad de consumo de glucosa y un aumento en la producción de la biomasa. Debido a los resultados obtenidos del trabajo preliminar es necesario corroborar la reproducibilidad del efecto observado bajo las mismas y otras condiciones de fermentación para tratar de explicar el fenómeno, debido a que si llegara a ser reproducible se podría tener una aplicación directa industrial, ya que actualmente las industrias buscan sistemas o herramientas de producción más eficaces, por lo cual este conocimiento podría aplicarse para disminuir tiempos y costos de producción de biomasa y otros metabolitos de la levadura durante una fermentación, así como darle un uso a la levadura residual para la obtención del extracto alcalino.

3. HIPÓTESIS

El hidrolizado alcalino de ácidos nucleicos de dos especies diferentes de levadura residual (*Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis*) serán capaz de reducir la fase de adaptación de la curva de crecimiento microbiano debido a que estimulan su metabolismo celular.

4. OBJETIVOS

❖ **Objetivo General:**

Evaluar el efecto de hidrolizados de ácidos nucleicos de levaduras residuales de dos especies diferentes *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis* en la curva de crecimiento microbiano de las mismas.

❖ **Objetivos Específicos:**

1. Establecer las condiciones de cultivo para la producción de biomasa de las dos especies diferentes de levadura (*S. cerevisiae* y *K. fragilis*).
2. Extraer los hidrolizados de ácidos nucleicos de ambas especies *S. cerevisiae* y *K. fragilis* mediante una extracción alcalina.
3. Purificar parcialmente y caracterizar (peso molecular relativo, espectro de absorción en el UV-Vis) los hidrolizados de ácidos nucleicos de ambas especies (*S. cerevisiae* y *K. fragilis*).
4. Obtener el perfil electroforético del hidrolizado de ácidos nucleicos.
5. Evaluar el efecto del hidrolizado de ácidos nucleicos extraídos con álcali de ambas especies (*S. cerevisiae* y *K. fragilis*) sobre una fermentación.
6. Evaluar parámetros cinéticos (velocidad específica de consumo, velocidad específica de crecimiento) obtenidos de la fermentación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 6 se muestra un esquema de la estrategia experimental para la obtención del extracto alcalino parcialmente purificado con capacidad de reducir la fase de adaptación de la curva de crecimiento microbiano. Durante el desarrollo de este trabajo, todos los análisis se efectuaron por triplicado con el fin de observar la reproducibilidad de cada experimento y los resultados fueron expresados como valores promedio.

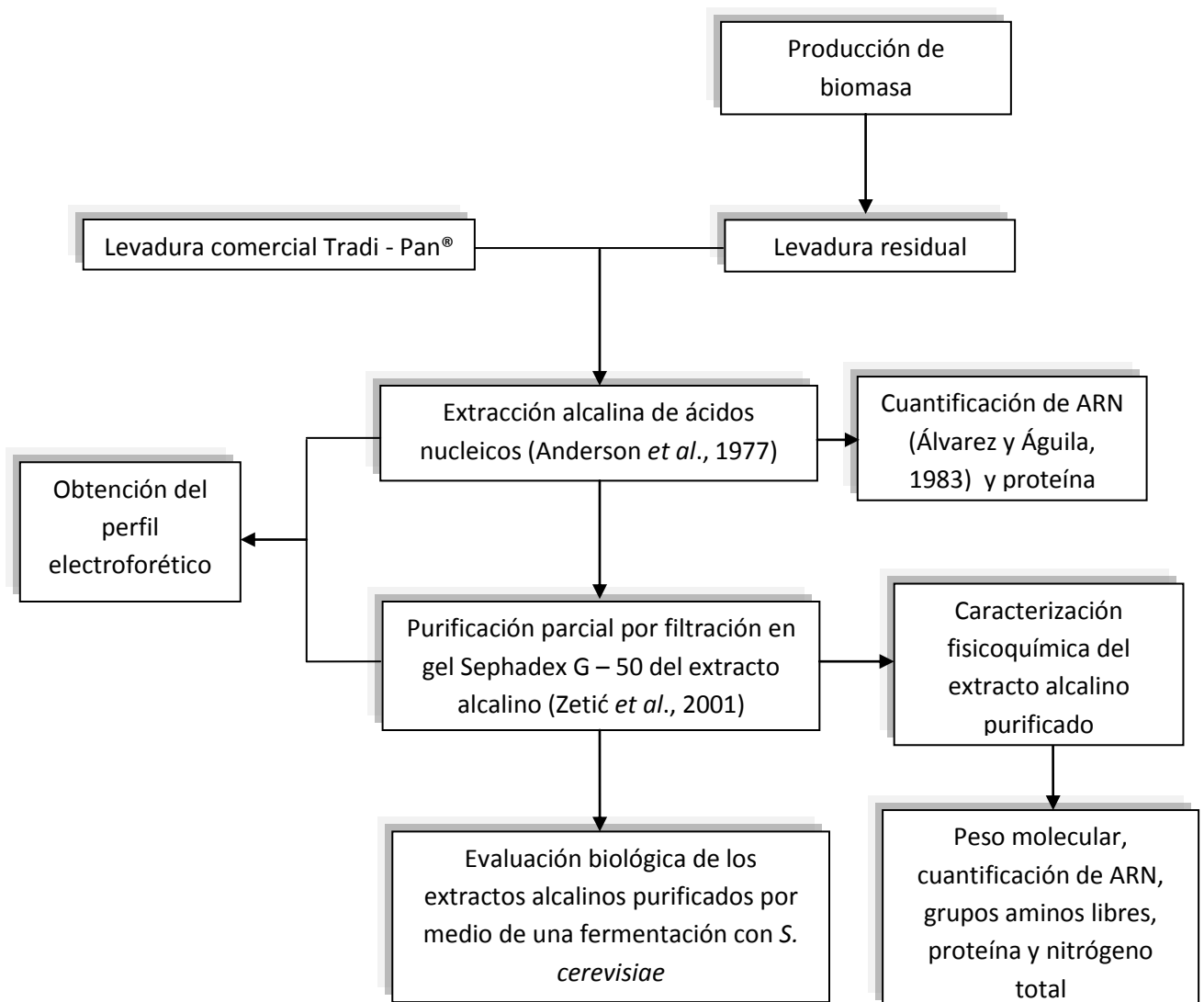


Figura 6. Estrategia experimental para la obtención de hidrolizados de ácidos nucleicos y la evaluación de la actividad biológica

5.1 Fuentes de obtención del extracto alcalino

Se utilizaron dos diferentes especies de levadura para la obtención del extracto alcalino, *S. cerevisiae* y *K. fragilis*.

La especie *S. cerevisiae* obtenida comercialmente de Tradi-Pan® (TP), fue tratada de manera activa; mientras que la levadura L/25-7-82, (SC-82), que es la empleada para un producto probiótico comercial denominado Floratil (Merck S. A., Río de Janeiro, R. J., Brasil) perteneciente a la Colección de Cultivos del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), fue tratada de manera “inactiva”, al igual que la obtenida de la industria cervecera (LR). La levadura *K. fragilis* L/12-8-2 (KF - 2), proveniente del ICIDCA, fue tratada solo de manera “inactiva”.

5.2 PRODUCCIÓN DE BIOMASA

5.2.1 Inoculación de biomasa

Las cepas SC – 82 y KF – 2, fueron sembradas por estría en medio sólido directamente en cajas petri que contenían un medio GPD, la composición de dicho medio se muestra en el Cuadro 2, se mantuvo constante la temperatura a 30°C, y se incubaron por un período de 24 – 48h dependiendo del crecimiento observado directamente en la caja petri.

Cuadro 2. Composición del medio de inoculación.

COMPUESTO	CANTIDAD (g/L)
Glucosa	20
Peptona de caseína	20
Extracto de levadura	10
Agar bacteriológico	15

Para corroborar la pureza de las cepas SC – 82 y KF – 2, se realizaron tinciones de Gram e inoculaciones por estría en medios de agar nutritivo y en agar papa dextrosa, para saber si no estaba contaminada con hongos o bacterias.

5.2.2 Propagación de biomasa

Para la propagación de la biomasa se inoculó con un asa estéril la mayor cantidad de la biomasa que fue producida en el medio GPD en matraces Erlenmeyer, que contenían un medio líquido, (Cuadro 3). Los matraces se mantuvieron en incubación con agitación constante de 150 rpm a una temperatura de 30°C durante 48 h.

Cuadro 3. Composición del medio líquido para propagación de biomasa.

COMPUESTO	CANTIDAD (g/L)
Glucosa	30
KH ₂ PO ₄	1.5
NH ₄ Cl	1.5
MgSO ₄	1.5

Corroborar la pureza de las cepas SC – 82 y KF – 2, se realizaron tinciones de Gram e inoculaciones por estría en medios de agar nutritivo y en agar papa dextrosa, para saber si no estaba contaminada con hongos o bacterias.

5.2.3 Producción de biomasa

Después de obtenida la biomasa del medio líquido se procedió a la medición por método indirecto de la misma, se midió la absorbencia a 560 nm, con valores obtenidos mayores a 0.9 se pudo inocular en diversos matraces erlenmeyer directamente de este medio a una

concentración del 10% en 250 mL de medio líquido, siempre y cuando se asegure que no hay contaminación en la biomasa obtenida. Los matraces se incubaron durante 48 h a una temperatura de 30°C, agitándose a 150 rpm, usando la misma composición del medio mencionado anteriormente.

Para obtener mayor cantidad de biomasa se inocularon bio-reactores (Figura 7) con capacidad de 1 L, inoculados con 10% de biomasa crecida (v/v), con agitación de 150 rpm, a 30°C y con una aeración de 80 mL/min durante 48 h.

Obtenida la biomasa requerida se sometieron a sedimentación por gravedad durante 48 h. a 5°C, se eliminó parte del sobrenadante. Posteriormente se procedió a centrifugar la muestra a 10,000 rpm, durante 20 min, a una temperatura de 4°C, se eliminó el sobrenadante y se procedió al secado de la biomasa producida.



Figura 7. Esquema del bio-reactor utilizado en la producción de biomasa.

5.3 Extracción térmica alcalina de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos de las levaduras fueron extraídos siguiendo la metodología propuesta por Anderson *et al.*, 1977. Se realizó una suspensión con la levadura considerando el 14%

de materia seca con 5.9% de NH₄OH, esta suspensión se calentó por 30 min a 76°C, posteriormente se procedió a centrifugar a 10,000 rpm durante 30 min a 4°C, al sobrenadante obtenido (extracto crudo) se le determinó el contenido de ácidos nucleicos a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm, se cuantificó al ácido ribonucleico (ARN) debido a que se encuentra en mayor proporción con respecto al ácido desoxirribonucleico (ADN), el cual solo representa del 1 – 2% de los ácidos nucleicos totales (Gómez y Viniegra 1977; Robins *et al.*, 1975 y Álvarez y Águila, 1983). Se utilizaron las siguientes ecuaciones para la cuantificación de ARN (Adams *et al.*, 1992)

$$\text{ARN (mg/mL)} = 0.064 A_{260} - 0.031 A_{280}$$

$$\% \text{ARN} = \frac{[\text{ARN(mg/mL)}] \times \text{F.D.} \times \text{Vsobrenadante}}{\text{Wmuestra}}$$

Donde: F.D. = Factor de dilución

5.4 Determinación de nitrógeno total y proteína cruda

Se colocaron 0.15 g del extracto crudo totalmente homogéneo, 0.8 g de catalizador CuSO₄ – K₂SO₄ (en proporción 1:9) y 3 mL de H₂SO₄ en un matraz Kjeldahl, donde se colocó en un digestor Labconco. Una vez terminada la digestión, la muestra se diluyó con 3 mL de agua destilada y se le adicionaron 15 mL de NaOH al 40%. La mezcla anterior fue destilada y el amoniaco se colectó en un matraz que contenía 10 mL de H₃BO₃ al 2% en presencia de 3 gotas de indicador (solución alcohólica de rojo de metilo 0.2% y solución acuosa de azul de metileno 0.1% en partes iguales). Se tituló con HCl 0.1N hasta el vire de color en el indicador.

El cálculo de nitrógeno total se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\%N = \frac{(V_{HClm} - V_{HClB}) \times N \times m_{eq}}{W} \times 100$$

Donde:

%N = Nitrógeno total

V_{HClm} = Volumen de HCl gastado en la muestra

V_{HClB} = Volumen de HCl gastado en el blanco

N = Normalidad del HCl

m_{eq} = miliequivalente del nitrógeno (0.014)

W = Peso de la muestra (g)

El contenido de proteína cruda se calculó multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor de 6.25

$$\% \text{ Proteína} = \%N \times \text{Factor}$$

5.5 Determinación de proteína

La determinación de proteína verdadera se determinó por el método de Bradford (1976), el cual consiste en la mezcla 0.1 mL de la muestra con 5 mL del reactivo de Bradford, cuya concentración final fue de 0.01% (p/v) de azul brillante de Coomassie G – 250, 4.7% (p/v) de etanol y 8.5% (p/v) de ácido fosfórico; la mezcla se dejó reposar durante 5 min y se midió la absorbencia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm.

Los valores de absorbencia de las muestras se interpolaron para su cuantificación en una curva patrón, concentración vs. absorbencia (Ver Apéndice A) que se realizó usando

como patrón albúmina sérica bovina en concentraciones de 0.2 a 0.9 mg/mL, siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las muestras.

5.6 Purificación parcial por filtración en gel Sephadex G-50

El extracto crudo obtenido de la extracción alcalina, se hizo pasar a través de una columna (32 cm X 1 cm) de filtración empaquetada con Sephadex G-50 (1.5 a 30 kDa), (Zetić *et al.*, 2001) a la que previamente se determinó el volumen vacío (V_0) y el volumen total (V_T) de la columna utilizando azul dextrano (2 mg/mL) y DNP – alanina (0.5 mg/mL) respectivamente. (Ver Apéndice B). La columna se cargó con un volumen de muestra de 500 μ L que se eluyó con agua a un flujo constante de 0.35 mL/min. Se colectaron fracciones de 1.5 mL y a cada fracción colectada posteriormente se le midió la absorbencia a dos diferentes longitudes de onda, 260 y 280nm (Toepfer *et al.*, 1977). Se seleccionaron las fracciones que mostraron los picos mayores de absorbencia y se calculó la relación A_{260}/A_{280} , con el fin de determinar la pureza de las fracciones. Posteriormente a las fracciones seleccionadas se les realizó la determinación de nitrógeno total, proteína cruda y proteína verdadera, usando los mismos procedimientos descritos anteriormente, solo se modificó la normalidad del HCl = 0.01 N, debido a que las muestras contienen menor concentración de proteína.

5.7 Electroforesis SDS – PAGE

Se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes al extracto crudo y a las fracciones que fueron seleccionadas después de la purificación en gel. Las muestras se aplicaron a geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS – PAGE) para el análisis electroforético de acuerdo al método de Laemmli (1970). La composición de los geles (10 cm x 10 cm) se muestra en el Cuadro 4 y 5. Todas las muestras se diluyeron (1:1) en solución amortiguadora muestra (Cuadro 6), se calentaron durante 3 min en agua hirviendo y posteriormente se tomaron 20 μ L que fueron inyectados en los geles.

Cuadro 4. Soluciones stock para la preparación de geles de electroforesis SDS – PAGE.

Solución	Tris (M)	Glicina (g/L)	pH	SDS (%)
0.5 M Tris – HCl	0.5	--	6.8 ^c	--
1.5 M Tris –HCl	1.5	--	8.8 ^c	--
Búfer de corrida	15 (g/L)	72	8.3 ^d	0.5
SDS	--	--	--	10
Mezcla de acrilamida – bisacrilamida	% acrilamida (p/v)	% bisacrilamida (p/v)		
30% T ^a 2.67% C ^b	29.2	0.8		

^a % de concentración de acrilamida^b % de concentración de entrecruzamiento de acrilamida – bisacrilamida^c Ajustar el pH con HCl concentrado^d pH de solución

Cuadro 5. Composición de los geles de electroforesis SDS – PAGE.

Solución o reactivo	Gel concentrador (4%)	Gel separador (12%)
Agua desionizada	6.1 mL	3.5 mL
0.5 M Tris – HCl, pH 6.8	2.5 mL	--
1.5 M Tris – HCl, pH 8.8	--	2.5 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL
Acrilamida (30% T, 2.67% C)	1.3 mL	4.0 mL
Desgasificar al vacío	20 min	20 min
Persulfato de amonio (10%) ^a	100 µL	100 µL
TEMED	15 µL	10 µL

^a Preparar el mismo día.

Cuadro 6. Composición de la solución amortiguadora muestra.

Solución o reactivo	Volumen (mL)
Agua desionizada	4
0.5 M Tris – HCl, pH 6.8	1
Glicerol	0.8
SDS 10%	1.6
2 – β – mercaptoetanol	0.4
Bromofenol 0.05% (p/v)	0.2

La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 200 V durante 50 min a temperatura ambiente, posteriormente se tiñeron con solución al 0.1% (p/v) de azul brillante de Coomassie R – 250 en 40% metanol, 10% de ácido acético glacial durante 1 h. y se destiñeron en una solución de 40% metanol y 10% ácido acético glacial durante 3 h.

Para la determinación del peso molecular de las subunidades se aplicaron muestras de 15 μ L de un estándar (Sigma - Aldrich[®]) que contenía la siguiente composición. (Cuadro 7)

Cuadro 7. Estándar para electroforesis SDS – PAGE

Proteína	Peso Molecular (Da)
Albúmina Bovina	66, 000
Ovoalbúmina	45, 000
Gliceraldehído 3- Fosfato	36, 000
Anhidrasa Carbonica	29, 000
Tripsinogeno	24, 000
Tripsina	20, 000
α -Lacto- albúmina	14, 200
Aprotinina	6, 500

5.8 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS HIDROLIZADOS DE ARN

5.8.1 Cuantificación de grupos amino libres

Se utilizó el método de Adler – Nissen (1979), que consiste en la cuantificación de los grupos amino libres, que tiene su fundamento en la reacción de los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis con el ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS) como se muestra en la (Figura 8).

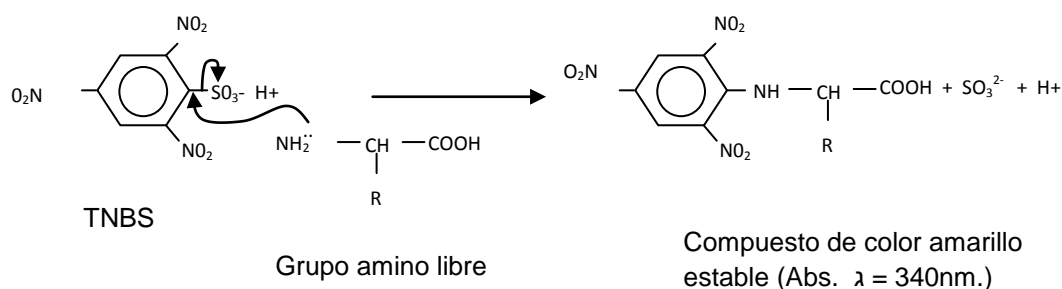


Figura 8. Reacción del TNBS con los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis alcalina (Adler-Nissen, 1979).

El ensayo consistió en mezclar 125 μ L de muestra en un tubo de ensaye con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.5 M; pH 8.2, con 1 mL de solución de TNBS al 0.1% en agua, esta mezcla fue incubada a 50°C durante 1 h. en oscuridad. Después fueron añadidos 2 mL de HCl 0.1 N para detener la reacción, los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente se midió la absorbencia en un espectro a una longitud de onda de 340nm.

Los valores de absorbencia de las muestras se interpolaron para su cuantificación en una curva de calibración, concentración vs. absorbencia (Ver Apéndice C) que se realizó usando como patrón leucina en concentraciones de 0.1 a 2.5 mM, siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las muestras.

5.9 FERMENTACION

5.9.1 Composición del medio de cultivo

El medio utilizado para la fermentación se diseñó de acuerdo al medio propuesto por Zetić *et al.*, 2001, la composición se muestra en el Cuadro 8, la relación carbono nitrógeno fue de 31 y se mantuvo constante para todos los ensayos, por lo que fue necesario determinar el contenido de nitrógeno total por el método de Kjeldahl en cada una de las fracciones obtenidas por filtración en gel, para así realizar el ajuste y mantener constante la relación C/N en todo el experimento.

5.9.2 Condiciones de la fermentación

La fermentación se llevó a cabo en matraces de 500 mL, conteniendo 200 mL de un medio de cultivo (Cuadro 8) y se inocularon 1×10^6 células/mL de *S. cerevisiae* (previamente cultivada en caldo dextrosa Sabouraud), con agitación de 150 rpm a una temperatura de 30°C. Se tomaron muestras cada 4 h por un período de 40 h, se evaluaron parámetros de velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de consumo y eficiencia de consumo.

Cuadro 8. Composición del medio de cultivo utilizado para llevar a cabo las fermentaciones con el hidrolizado de ácidos nucleicos.

Muestra	Control	TP ^a	TP ^b	LR ^a	LR ^b	SC-82 ^a	SC-82 ^b	KF-2 ^a
Compuesto	g/L							
Glucosa	50	50	50	50	50	50	50	50
Fuente de N	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.75	0	0	0	0	0	0
	H.A. (mL/L) ^c	0	6.81	3.4	1.35	0.93	5.76	2.91
KH ₂ PO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
CaCl ₂	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
MgSO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Relación C/N	31	31	31	31	31	31	31	31

^a Primeras fracciones puras obtenidas^b Segundas fracciones puras obtenidas^c Hidrolizados alcalino

TP = Tradi – Pan

LR – Levadura Residual Cervecera

SC – 82 = *S. cerevisiae* L/25-7-82KF – 2 = *K. fragilis* L/12-8-2

5.9.3 Medición de biomasa

La medición del crecimiento celular se realizó a cabo por conteo directo al microscopio utilizando una cámara de Neubauer (Brand, Germany), inmediatamente después de haber tomado la muestra.

5.9.4 Consumo de glucosa

El consumo de glucosa se realizó por el método de azúcares reductores. Utilizando una solución de ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS), se tomó 1 mL de muestra y se adicionó 1 mL

de la solución de DNS, se calentó a 100°C por 7 min y se enfrió en hielo. Después se adicionaron 8 mL de agua destilada y se mezclaron en vortex, dejando reposar la muestra de 5 – 10 min. Posteriormente se midió la absorbencia a 575 nm en un espectrofotómetro (Miller, 1959).

Los valores de absorbencia de las muestras se interpolaron para su cuantificación en una curva de calibración, concentración vs. absorbencia (Ver Apéndice D) que se realizó usando como patrón glucosa en concentraciones de 200 a 1000 mg, siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las muestras.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Producción de biomasa

La cantidad de biomasa obtenida se midió indirectamente por espectrometría el cual nos dio las absorbencias, además se determinó el peso seco para cada cepa que se creció en las diferentes condiciones, como se muestran en los Cuadros 9 y 10.

Cuadro 9. Crecimiento observado en el bio-reactor

Muestra	Absorbencia 560 nm	Materia Seca mg/mL	Materia Seca (g_{TOTALES})
<i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82	1.348	4.5	3.64
<i>K. fragilis</i> L/12-8-2	1.151	4.7	3.78

Cuadro 10. Crecimiento observado en matraces

Muestra	Absorbencia 560 nm	Materia Seca mg/mL	Materia Seca (g)
<i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82	0.602	2.3	2.74
<i>K. fragilis</i> L/12-8-2	0.807	1.8	2.15

De acuerdo a la literatura y tal como se puede apreciar la producción de biomasa en el Bio-reactor es más efectiva de acuerdo a la medición realizada, ya que las condiciones que se controlan en el Bio-reactor ayudan a las levaduras a su rápida reproducción, mientras que en el matraz su reproducción es más lenta debido a que el oxígeno puede comportarse como un sustrato limitante. (Bekatorou *et al.*, 2006)

Las pruebas realizadas para determinar y comprobar la pureza de la cepa inicial y de la biomasa que se obtuvo (tinciones Gram, siembra en medio agar papa dextrosa y agar nutritivo) fueron realizadas en todos los pasos para la producción de biomasa (inoculación, propagación y producción de biomasa), las cuales dieron negativas. Es decir, se comprobó que la biomasa obtenida y trabajada estaba libre de algún otro microorganismo como pudieran ser hongos y bacterias, por lo cual se siguió con la estrategia experimental.

6.2 Extracción alcalina de ácidos nucleicos

La extracción alcalina se realizó en la levadura comercial y en las levaduras residuales. Al extracto obtenido se le determinó %ARN y la pureza del mismo de acuerdo a la relación $A_{260/280}$. (Cuadro 11)

Cuadro 11. Extracción alcalina de ARN a 76°C

MUESTRA	Fuente	% ARN	Relación $A_{260/280}$
<i>S. cerevisiae</i>	Tradi – Pan [®]	7.6	2.033
<i>S. cerevisiae</i>	ICIDCA	5.1	2.23
L/25-7-82	(residual)		
<i>S. cerevisiae</i>	Industria cervecera	7.4	1.340
	(residual)		
<i>K. fragilis</i> L/12-8-2	ICIDCA	5.5	2.21
	(residual)		

El contenido de ARN en el extracto obtenido (extracto crudo) se encuentra dentro del intervalo reportado en la literatura para estas levaduras que es de 7 - 12% de ARN (Reyes, 2009; Wagner *et al.*, 2008).

La relación de absorbencias en el caso de la levadura cervecera tiene un valor de 1.34, lo cual indica que tiene un grado de pureza muy bajo, ya que la muestra está contaminada mayoritariamente por proteínas y no se tiene ARN puro en el extracto crudo obtenido, esto se comprueba al observar el contenido de proteína que contiene este extracto crudo (Cuadro 12).

Con respecto a las demás levaduras la relación de absorbencias presenta valores de 2 o mayores lo cual indica que se tiene casi en su totalidad ARN puro, y esto se comprueba de igual manera con el contenido de proteína que tiene cada extracto crudo obtenido (Ver Cuadro 12)

Cuadro 12. Contenido de proteína en los extractos crudos obtenidos.

MUESTRA	Proteína Cruda		Proteína
	% N ^a	%P ^b	mg/mL
Tradi – Pan [®]	5.8 ± 0.09	36.7 ± 0.01	41.80 ± 0.01
Levadura residual	5.8 ± 0.24	36.7 ± 1.5	70.65 ± 0.01
<i>S. cerevisiae</i> L/25-7-82	5.3 ± 0.26	33.4 ± 1.6	50.26 ± 0.02
<i>K. fragilis</i> L/12-8-2	5.7 ± 0.23	36.5 ± 1.5	39.87 ± 0.03

^a Porcentaje de Nitrógeno

^b Porcentaje de Proteína

El contenido de nitrógeno y de proteína son similares entre las levaduras en la determinación de proteína cruda, sin embargo, en la determinación realizada por Bradford (proteína), se obtiene que la levadura residual contiene mayor contenido de proteína por lo cual justifica un valor bajo en el contenido de ARN y en la relación $A_{260/280}$ teniendo un valor lejano a 2.

Al comparar lo obtenido de acuerdo a la relación de $A_{260/280}$ con el contenido de proteína en los extractos crudos, se observa que en efecto el extracto crudo obtenido por hidrólisis alcalina es una mezcla de ácidos nucleicos y de proteínas, de la misma manera se verifica que el extracto crudo proveniente de la industria cervecera contiene mayor contenido de

proteína comparado con las otras muestras, mientras las demás muestras contienen menos proteína pero una alta relación $A_{260/280}$.

6.3 Purificación parcial del extracto nitrogenado

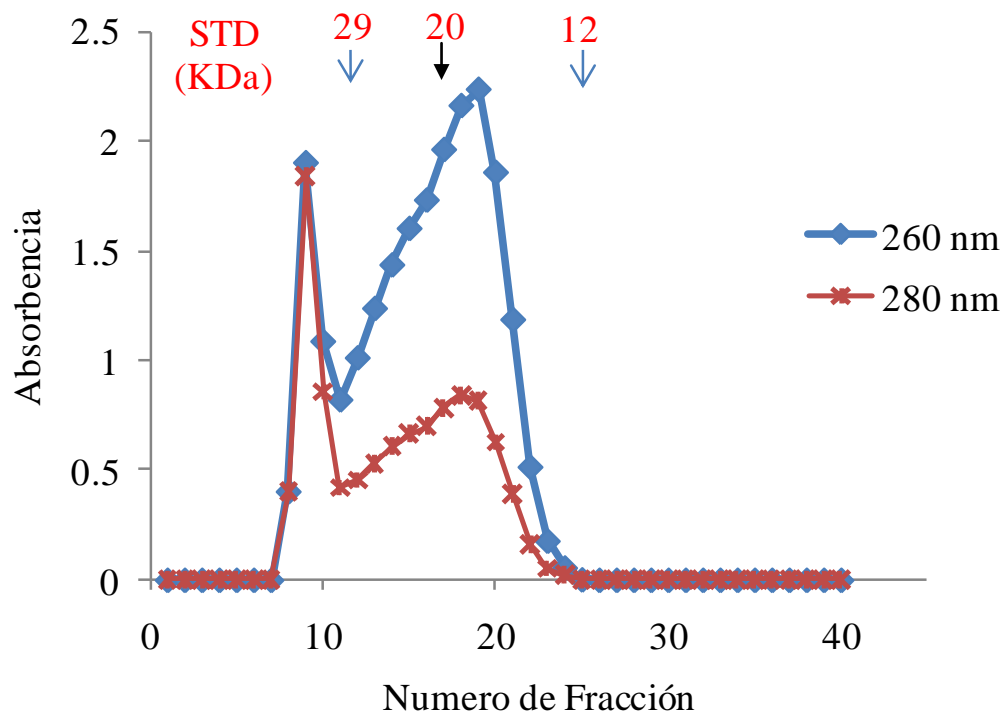
6.3.1 Especie *S. cerevisiae*

6.3.1.1 Tradi – Pan[®]

Después de haber obtenido el extracto crudo que contiene el hidrolizado de ácidos nucleicos se realizó una purificación parcial en una columna de filtración con Sephadex G – 50 para caracterizar el extracto crudo. El Cromatograma 1, muestra el perfil de elusión del extracto crudo. Se obtuvieron dos fracciones importantes: la fracción A presenta un peso molecular relativo promedio de 38 kDa, mientras que la fracción B, que es más abundante y soluble en agua tiene un peso molecular relativo promedio de 18 kDa. Gómez y Viniegra, 1977; Zetić *et al.*, 2001; Reyes, 2009, reportan un perfil similar de filtración en gel para la levadura *S. cerevisiae*. Los reportes muestran perfiles de elusión con las mismas fracciones (2 fracciones obtenidas) y pesos moleculares relativos similares a los obtenidos para la levadura Tradi – Pan. Estos autores obtuvieron una relación $A_{260/280}$ con valores que van desde 1 a 1.3 para las primeras fracciones y de 1.9 a 2.1 para las segundas fracciones obtenidas para sus muestras.

Al evaluar la relación $A_{260/280}$ para Tradi – Pan[®], se obtuvieron valores para la fracción A de 1.033 y para la fracción B de 2.741, lo que indica que en estas fracciones hay gran cantidad de ácidos nucleicos extraídos, principalmente ARN (Gómez y Viniegra 1977; Robins *et al.*, 1975; Álvarez y Águila 1983), además de que la fracción B presenta mayor grado de pureza con respecto a la fracción A. La relación $A_{260/280}$ indica el grado de pureza de ARN; mientras el valor del cociente sea más cercano a 2 o mayor, el ARN se encuentra más puro en la disolución (Adams *et al.*, 1992). Para corroborar esto se evaluó de la misma manera la relación $A_{280/260}$ que es de 0.96 para la fracción A, mientras que para la fracción B fue de 0.32. Lo anterior muestra que se trabajó con una mezcla de proteínas y ARN, pero que

mayoritariamente eran ácidos nucleicos (Edens *et al.*, 2002) ya que si el valor obtenido se encuentra fuera del intervalo 1.4 – 1.7, el contenido de proteína se considera mínimo y esto indica que la poca proteína está contaminada de ácidos nucleicos.



Cromatograma 1. Perfil de elución en Sephadex G – 50, del extracto crudo obtenido después del tratamiento alcalino de Tradi – Pan®.

El perfil electroforético de las fracciones A (F.A) y B (F.B) se muestra en la Figura 9, además se muestra el perfil electroforético de un estándar de filtración en gel (Sigma cat. M3913 – 1VL), la muestra antes del tratamiento alcalino (M.O) y la muestra después del tratamiento alcalino (E.C).

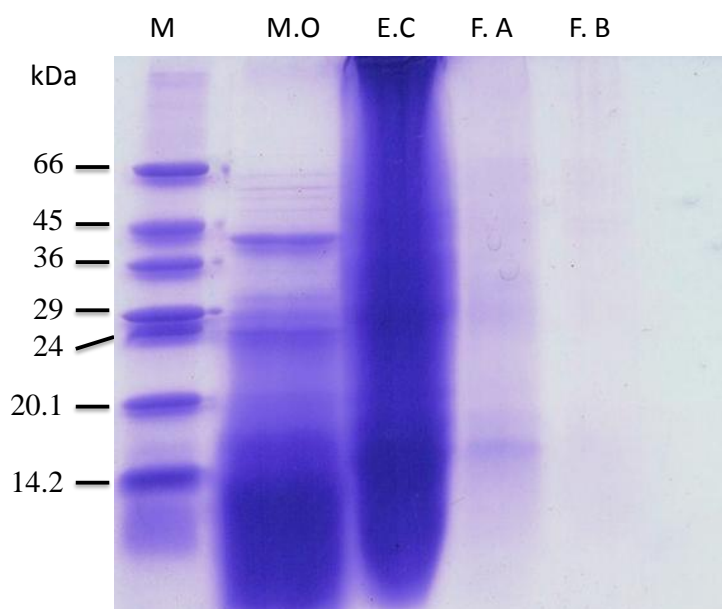


Figura 9. Perfil electroforético SDS – PAGE de Tradi – Pan. M = Marcador, MO = Muestra original, EC = Extracto crudo, FA = Fracción A, Fracción B.

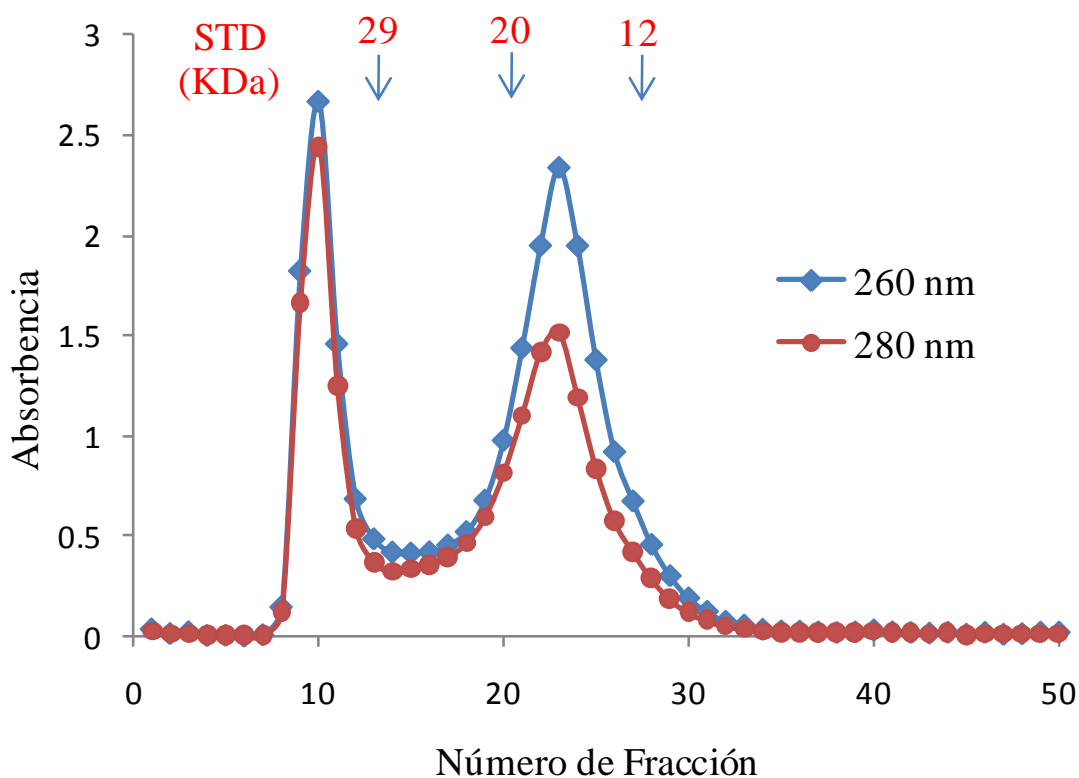
En el perfil electroforético se observa como el contenido de proteína va disminuyendo en cada uno de los pasos de la metodología. Existen bandas de peso molecular entre 24 y 14 kDa que se mantienen aún después del tratamiento alcalino. Algunas bandas desaparecen después de la extracción alcalina y de la purificación parcial, como es el caso de la fracción A en la cual se apreció una banda de peso molecular de aproximadamente 29 kDa y otra de 15 kDa, en los cuales también se corrobora que se tiene una mezcla de proteínas de bajo peso molecular y ácidos nucleicos que en su mayoría es ARN, mientras para la fracción B, no se lograron apreciar bandas de proteína, estos resultados del perfil electroforético se comprueban de acuerdo a las determinaciones de proteína realizadas, en las que nos indicaron que la fracción B no tiene proteína o su contenido es muy bajo, por lo cual no se esperaba encontrar bandas de proteína en el perfil electroforético, lo mismo sucede con la muestra original (M.O.) y el extracto crudo, que al observar que tiene una buena cantidad de proteína se esperaba ver bandas de proteína de diversos pesos moleculares en el perfil electroforético. (Cuadro 13)

Cuadro 13. Determinación de proteína en la levadura Tradi - Pan®

MUESTRA	Proteína Cruda	Bradford
	%P	mg/mL
Muestra original	36.75±4.19	41.80
Extracto crudo	17.69 ± 5.21	14.56 ± 0.12
Fracción A	0.583	0.42 ± 0.2
Fracción B	1.166	0.021 ± 0.001

6.3.1.2 Levadura residual industria cervecera

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que con el extracto crudo de Tradi – Pan, con el fin de observar diferencias o similitudes. El Cromatograma 2, muestra el perfil de elusión del extracto crudo. De igual manera, con Tradi – Pan® se obtuvieron dos fracciones importantes; la fracción A presenta un peso molecular relativo promedio de 36 kDa, mientras que la fracción B, que es más abundante y soluble en agua, tiene un peso molecular relativo promedio de 15 kDa. Gómez y Viniegra, 1977; Zetić *et al.* 2001; Reyes, 2009, reportan un perfil similar de filtración en gel para la levadura *S. cerevisiae*.



Cromatograma 2. Perfil de elución en Sephadex G – 50, del extracto crudo obtenido después del tratamiento alcalino de la levadura residual de la industria cervecera.

Para la relación $A_{260/280}$ se obtuvieron valores para la fracción A de 1.01 y para la fracción B de 1.93, lo que indica que en estas fracciones hay gran cantidad de ácidos nucleicos extraídos, principalmente ARN (Gómez y Viniegra 1977; Robins *et al.*, 1975; Álvarez y Águila, 1983); mientras que la fracción B presenta mayor grado de pureza con respecto a la fracción A. De la misma manera la relación $A_{280/260}$ es de 0.91 para la fracción A, mientras que para la fracción B fue de 0.64. Lo anterior muestra que se trabajó con una mezcla de proteínas y ARN, pero que mayoritariamente eran ácidos nucleicos (Edens *et al.*, 2002). Se puede concluir que se tienen similitudes de los resultados en cuanto a la levadura Tradi – Pan® y a lo reportado por otros autores. El perfil electroforético de las fracciones A y B se muestra en la Figura 10.

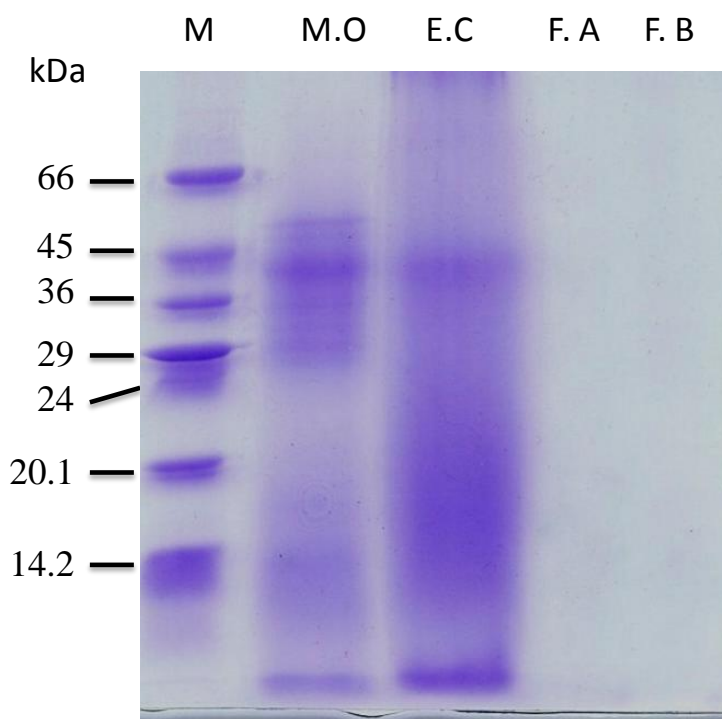


Figura 10. Perfil electroforético SDS – PAGE de la levadura residual. M = Marcador, MO = Muestra original, EC = Extracto crudo, FA = Fracción A, Fracción B.

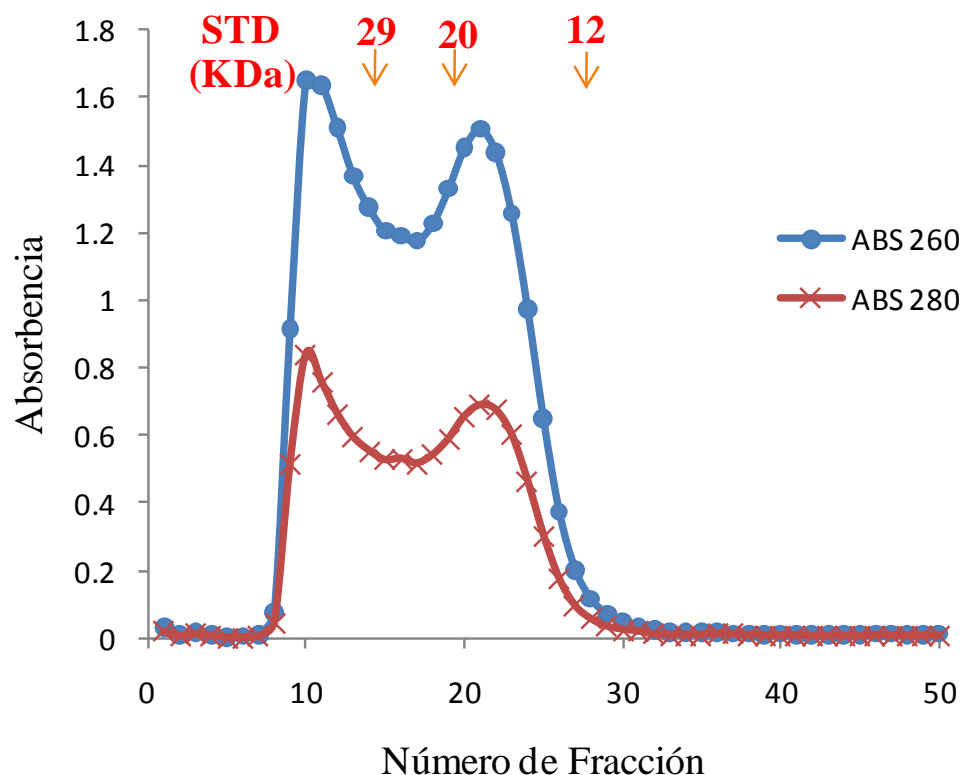
En el perfil electroforético se observa como el contenido de proteína va disminuyendo en cada uno de los pasos de la metodología. En el carril de M.O. se observan bandas que tienen un peso molecular entre 50 y 29 kDa, aún después del tratamiento alcalino, se puede observar una banda de peso molecular aproximado de 45 kDa. En este caso la fracción A y de la fracción B no logran apreciarse bandas de proteína, estos resultados del perfil electroforético se comprueban de acuerdo a las determinaciones de proteína realizadas, las que indican que la fracción A y B no tiene proteína o su contenido es muy bajo, por lo cual no se esperaba encontrar bandas de proteína en el perfil electroforético, lo mismo sucede con la muestra original (M.O.) y el extracto crudo, que al observar que tiene una buena cantidad de proteína se esperaba ver bandas de proteína de diversos pesos moleculares en el perfil electroforético. (Cuadro 14)

Cuadro 14. Determinación de proteína en la levadura de la industria cervecera.

MUESTRA	Proteína Cruda	Bradford
	%P	mg/mL
Muestra original	50.26	53.46
Extracto crudo	17.69 ± 0.67	11.59 ± 0.47
Fracción A	2.91	0.237 ± 1.9
Fracción B	4.08 ± 5.4	0.007 ± 0.0001

6.3.1.3 Levadura *S. cerevisiae* L/25-7-82

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que con los extractos anteriores, con el fin de observar diferencias o similitudes. El Cromatograma 3 muestra el perfil de elusión del extracto crudo. De igual manera que con los extractos anteriores se obtuvieron dos fracciones importantes: la fracción A presenta un peso molecular relativo promedio de 36 kDa, mientras que la fracción B, que es más abundante y soluble en agua, tiene un peso molecular relativo promedio de 17 kDa. Gómez y Viniegra, 1977; Zetić *et al.*, 2001; Reyes, 2009, reportan un perfil similar de filtración en gel para la levadura *S. cerevisiae*.



Cromatograma 3. Perfil de elución en Sephadex G – 50, del extracto crudo obtenido después del tratamiento alcalino de *S. cerevisiae* L/25-7-82

Para la relación $A_{260/280}$ se obtuvieron valores para la fracción A de 1.96 y para la fracción B de 2.1, lo que nos indica que en estas fracciones hay gran cantidad de ácidos nucleicos extraídos, principalmente ARN (Gómez y Viniegra, 1977; Robins *et al.*, 1975; Álvarez y Águila, 1983), además de que la fracción B presenta mayor grado de pureza con respecto a la fracción A; de la misma manera la relación $A_{280/260}$ es de 0.51 para la fracción A, mientras que para la fracción B fue de 0.45, se puede observar que se tienen similitudes de los resultados obtenidos anteriormente y a lo reportado por diversos autores. El perfil electroforético de las fracciones A y B se muestra en la Figura 11.

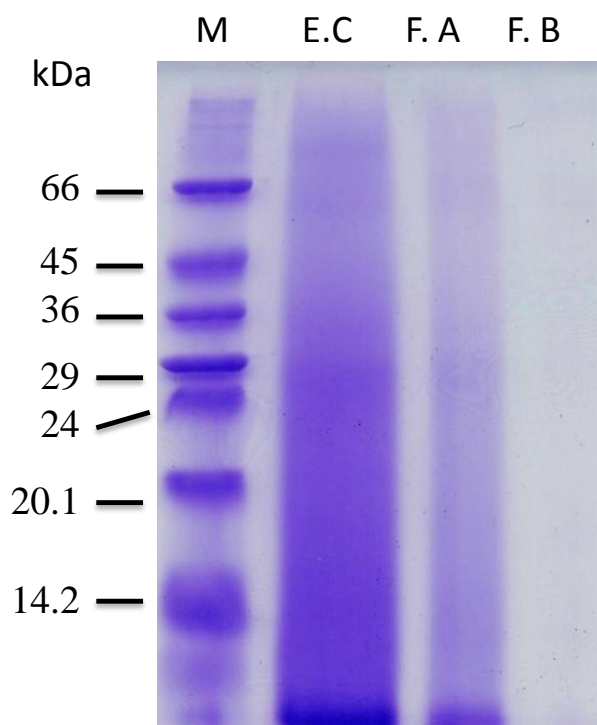


Figura 11. Perfil electroforético SDS – PAGE de Levadura *S. cerevisiae* L/25-7-82. M = Marcador, EC = Extracto crudo, FA = Fracción A, FB = Fracción B.

En el carril de E.C. se observan bandas que tienen un peso molecular entre 29 y 24 kDa, aún después del tratamiento alcalino, se puede observar una banda de peso molecular aproximado de 45 kDa. En este caso la fracción A presenta una banda tenue de 29 kDa, mientras que de la fracción B no logran apreciarse bandas de proteína, estos resultados del perfil electroforético se comprueban de acuerdo a las determinaciones de proteína realizadas, en las cuales nos indican que la fracción B no tiene proteína o su contenido es muy bajo, por lo cual no se esperaba encontrar bandas de proteína en el perfil electroforético, lo mismo sucede con el extracto crudo, que al observar que tiene una buena cantidad de proteína se esperaba ver bandas de proteína de diversos pesos moleculares en el perfil electroforético. (Cuadro 15)

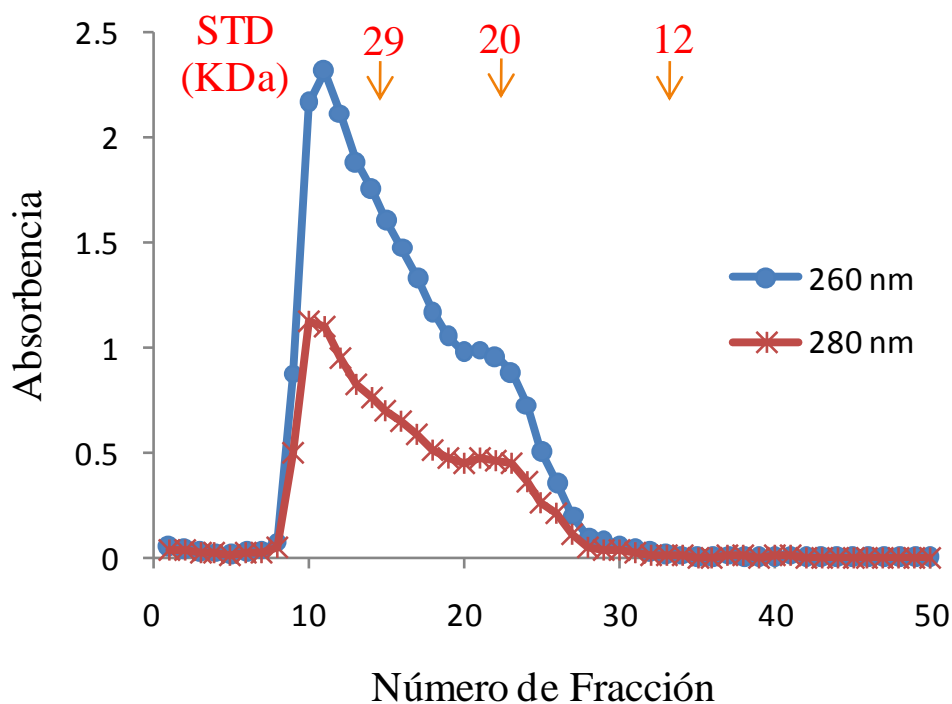
Cuadro 15. Determinación de proteína en la levadura *S. cerevisiae* L/25-7-82

MUESTRA	Proteína Cruda	Bradford
	%P	mg/mL
Extracto crudo	11.34 ± 1.23	15.16 ± 1.2
Fracción A	3.27 ± 0.12	0.132 ± 1.4
Fracción B	5.76 ± 0.76	0.012 ± 3.2

6.3.2 Especie *Kluyveromyces fragilis*

6.3.2.1 *K. fragilis* L/12-8-2

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que con los extractos anteriores, con el fin de observar diferencias o similitudes. El Cromatograma 4, muestra el perfil de elusión del extracto crudo. Se observa una sola fracción en la purificación, la fracción presentó un peso molecular relativo promedio de 33 kDa, aunque solo se haya tenido una fracción importante, se observó que en comparación con los otros de la otra especie (*S. cerevisiae*) tienen pesos moleculares relativos semejantes y que se encuentran dentro del rango reportado por diferentes autores. (Reyes, 2009; Gómez y Viniegra, 1977; Zetić *et al.*, 2001).



Cromatograma 4. Perfil de elución en Sephadex G – 50, del extracto crudo obtenido después del tratamiento alcalino de *K. fragilis* L/12-8-2.

La relación $A_{260/280}$ dio valores para la única fracción (F.A) de 2.1 lo que indica que en esta fracción hay gran cantidad de ácidos nucleicos extraídos, principalmente ARN (Gómez y Viniegra, 1977; Robins *et al.*, 1975; Álvarez y Águila, 1983), tiene un grado alto de pureza como lo indica la relación $A_{280/260}$ que es de 0.51 y por lo tanto el contenido de proteína es mínimo tal como se puede corroborar en el perfil electroforético de la fracción A, Figura 12.

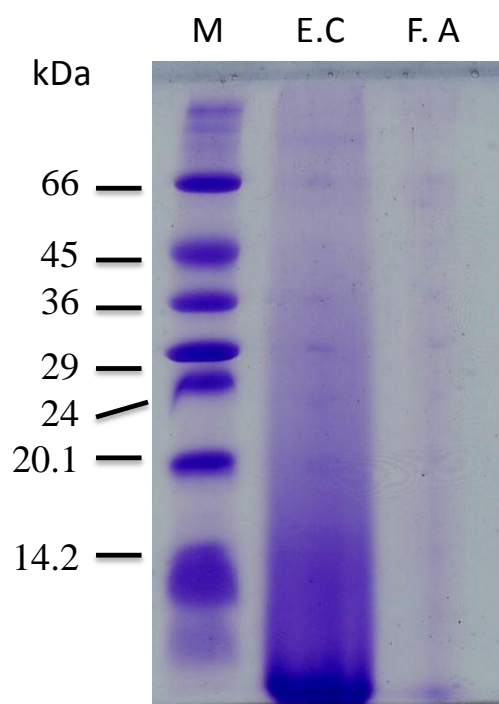


Figura 12. Perfil electroforético SDS – PAGE de Levadura *K. fragilis* L/12-8-2. M = Marcador, EC = Extracto crudo, FA = Fracción A.

En el perfil electroforético se observa como el contenido de proteína va disminuyendo en cada uno de los pasos de la metodología. Existen bandas que se mantienen aún después del tratamiento alcalino. Algunas bandas desaparecen después de la extracción alcalina y de la purificación parcial, como la fracción A, donde se observan ciertas bandas que se tenían en el E.C., mientras otras desaparecen debido a la purificación a la cual fue sometida el E.C, tal como se puede observar en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Determinación de proteína en la levadura *K. fragilis* L/12-8-2.

MUESTRA	Proteína Cruda	Bradford
	%P	mg/mL
Extracto crudo	11.34 ± 1.23	15.16 ± 1.2
Fracción A	3.27 ± 0.12	0.132 ± 1.4

6.4 Espectro de absorción de los extractos alcalinos

Después de realizar la purificación parcial de los extractos alcalinos que contienen los hidrolizados de ácidos nucleicos, se obtuvieron espectros de absorción de las fracciones A y B de todas las muestras que fueron eluidas en la columna empacada con Sephadex G – 50. La Figura 13, muestra los espectros de absorción de las primeras fracciones (Fracciones A), obtenidas en las muestras eluidas.

Los resultados obtenidos muestran como estas fracciones tienen alta cantidad de proteína. Para el caso de las muestras TP – 1 y L.R. – 1 se observa una fuerte absorbencia a 280nm que es característico de las proteínas, mientras que las muestras SCC – 1 y KF – 2, presentan una mayor absorbencia a 260nm que es característico de los ácidos nucleicos. (Reyes, 2009)

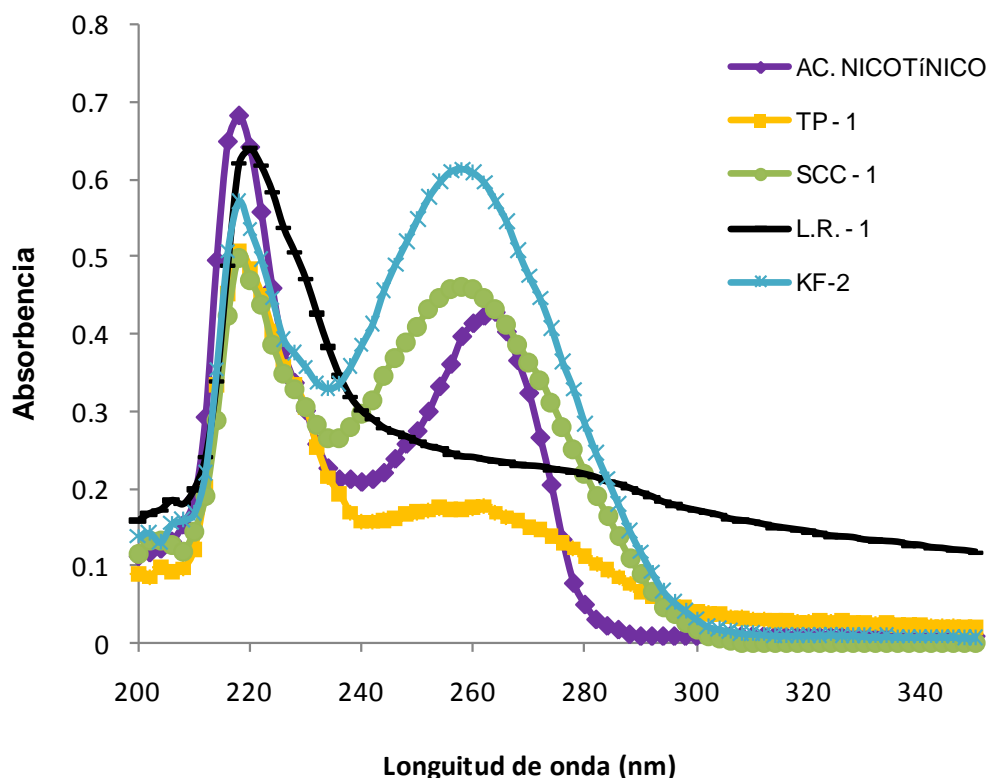


Figura 13. Espectros de absorción de los extractos alcalinos de las primeras fracciones obtenidas por filtración en gel. TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, KF-2 = *K. fragilis* L/12-8-2, SCC = *S. cerevisiae* L/25-7-82.

Los resultados para las segundas fracciones (fracción B) son similares y se muestran en la Figura 14. Se observó que todas las fracciones B presentaron mayor similitud al espectro de absorción de una solución estándar de ácido nicotínico que las fracciones A.

Gómez y Viniegra, 1977; Toepfer *et al.*, 1977; Edens *et al.*, 2002 y Reyes, 2009 reportan un espectro similar al obtenido, en los cuales se menciona que este perfil obtenido es característico de anillos purina y pirimidina correspondientes al ARN en solución.

Al evaluar la relación $A_{260/280}$ en las fracciones B eluidas de la columna se observan valores de 1.9 a 2.7 característico de soluciones de ARN (Adams *et al.*, 1992) y de soluciones estándar de nucleósidos, tales como adenosina y uridina, que tienen máximos de absorción a 260nm. Todas las fracciones B mostraron una fuerte absorbancia a 260nm característico de los ácidos nucleicos.

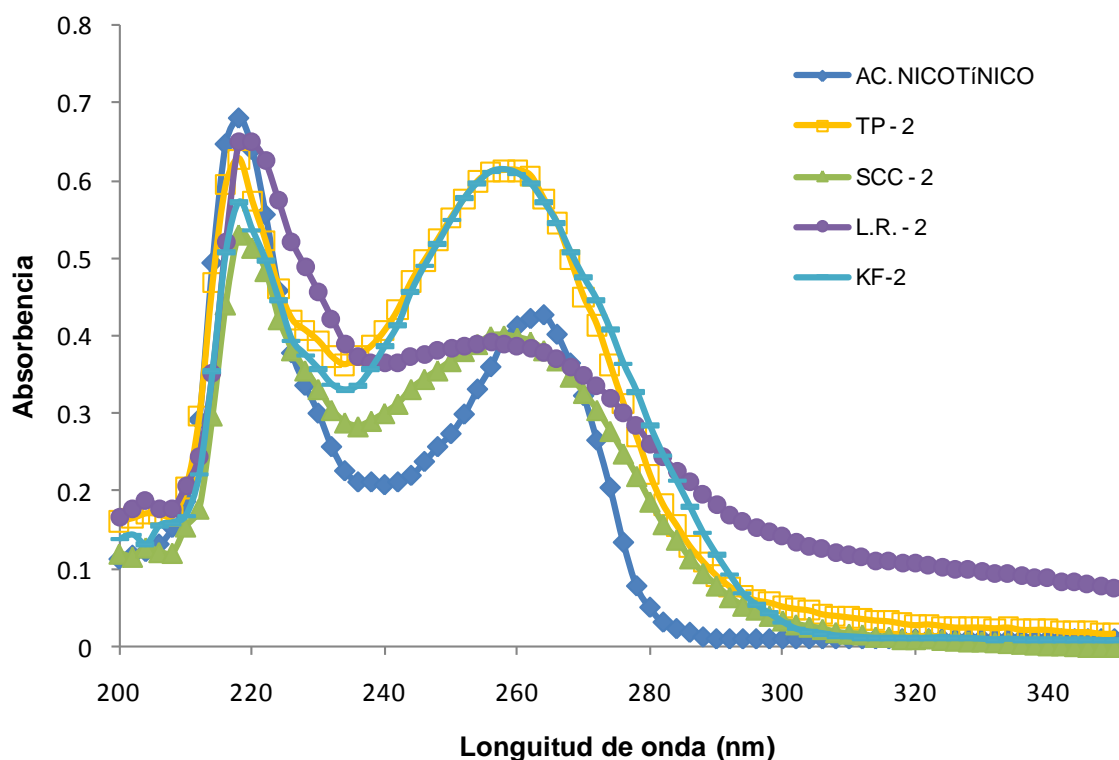


Figura 14. Espectros de absorción de los extractos alcalinos de las segundas fracciones obtenidas por filtración en gel. TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, KF-2 = *K. fragilis* L/12-8-2, SCC = *S. cerevisiae* L/25-7-82.

6.5 Evaluación de la actividad biológica

6.5.1 Fermentaciones con adición de las fracciones A

Se evaluó la actividad biológica de las fracciones A y B que contienen los hidrolizados de ácidos nucleicos, obtenidas por filtración en gel de la columna Sephadex G – 50. La actividad fue evaluada como el consumo de glucosa y el aumento de biomasa durante una fermentación con *S. cerevisiae*. Se utilizó el medio de cultivo reportado por Reyes, 2009; Zetić *et al.*, 2001, manteniendo la relación carbono – nitrógeno de 31 en todos los ensayos realizados para las fermentaciones, de tal manera que en todos los ensayos no hubiese una fuente de nitrógeno adicional que pudiera influir en el crecimiento de la levadura y se tuviera una alteración en los resultados obtenidos. Las fermentaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 30°C con agitación constante de 120 rpm.

En la Figura 15 se muestra el crecimiento celular de *S. cerevisiae* al adicionar las primeras fracciones (Fracciones A) obtenidas por la columna G – 50. Se encontraron diferencias significativas (ANOVA, $P < 0.05$) sobre el crecimiento celular de *S. cerevisiae* para todas las fracciones con respecto al control, (*S. cerevisiae* en medio mínimo sin fracción alcalina purificada), mientras que las fracciones de TP – 1 y SCC – 1 no mostraron diferencia significativa entre ellas, pero si existió diferencia significativa con respecto a la fracción L.R. – 1.

La velocidad específica de crecimiento para el control fue de $\mu = 0.178 \text{ h}^{-1}$, mientras que para las muestras TP – 1 fue de $\mu = 0.257 \text{ h}^{-1}$, SCC – 1 $\mu = 0.2601 \text{ h}^{-1}$ y para LR. – 1 $\mu = 0.252 \text{ h}^{-1}$, lo cual indicó y confirmó al ser comparadas que solo existe diferencia significativa entre el control y todas las muestras y la diferencia mencionada anteriormente entre TP – 1 y SCC – 1 con respecto a L.R. – 1.

En la Figura 15 se muestran las cinéticas de la curva de crecimiento microbiano, así como el ajuste de las mismas para las fracciones A obtenidas y la fermentación control, utilizándose el modelo de la ecuación logística para ajustar los datos experimentales y poder calcular las variables de estudio.

La actividad biológica de las fracciones que contienen los hidrolizados de ácidos nucleicos se determinó con la reducción de la fase de adaptación o fase lag de la curva de crecimiento microbiano de *S. cerevisiae*, debido a que los ácidos nucleicos principalmente nucleótidos de ARN y polipéptidos son precursores de coenzimas que están encargadas de los procesos de óxido – reducción principalmente del ciclo de Krebs (Reyes, 2009; Roussel *et al.*, 1999).

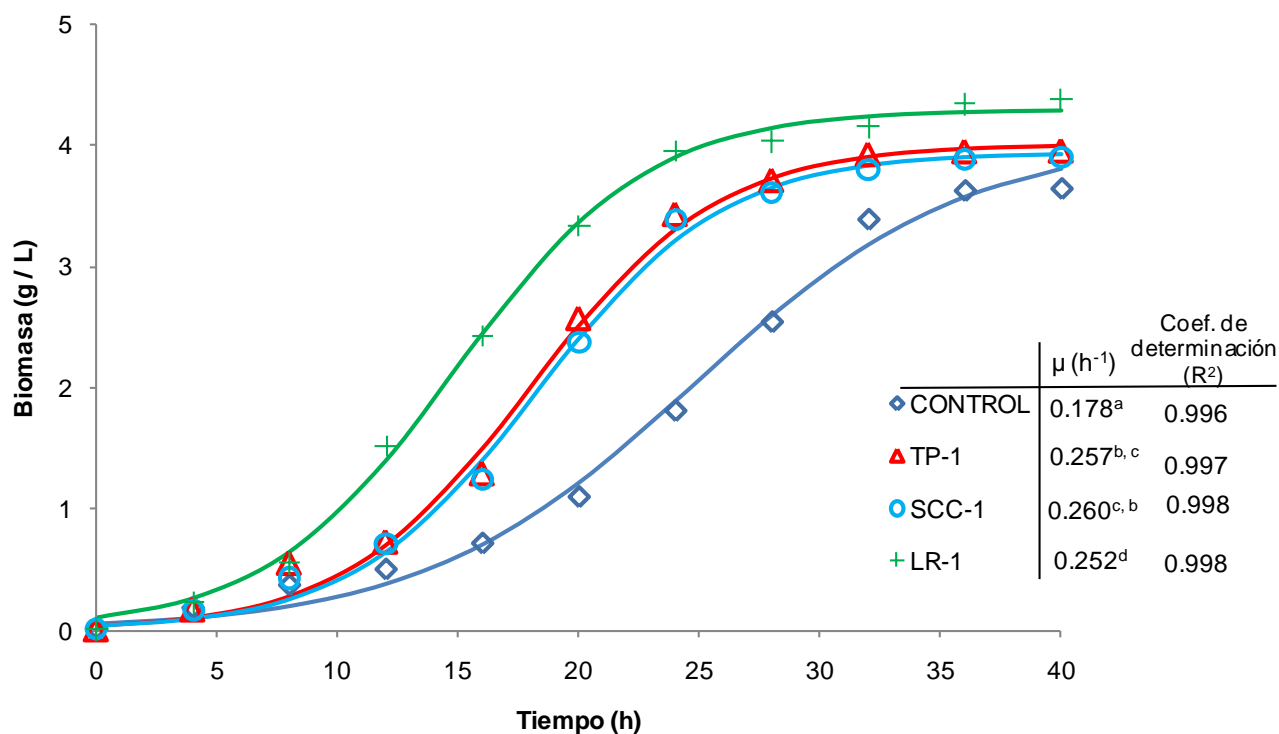


Figura 15. Efecto de la adición de las fracciones A que contienen los hidrolizados de ácidos nucleicos sobre el crecimiento de *S. cerevisiae*. TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, SCC = *S. cerevisiae* L/25-7-82

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Reyes, 2009, en los cuales también se presenta esta reducción de la fase de adaptación de la curva de crecimiento microbiano, además de influir el grado de pureza y el peso molecular de sus respectivas muestras.

6.5.2 Consumo de glucosa

La adición de las fracciones A que fueron obtenidas por filtración en gel, que contienen el hidrolizado de ácidos nucleicos, además de la disminución de la fase de adaptación, tuvo un efecto similar sobre el consumo de glucosa en la cinética de las fermentaciones.

Al adicionar la fracción de TP – 1, LR. – 1 y SCC – 1 al medio de cultivo estas pueden actuar como factores de crecimiento debido a que eliminan la fase de adaptación o fase lag de la curva de crecimiento microbiano (Reyes, 2009), ésto se pudo observar debido a que al adicionarse las fracciones A de las muestras (mencionadas anteriormente) se observa un consumo inmediato de glucosa comparado con una fermentación control (fermentación sin adición de fracción A). Cuando la fermentación control es comparada con las fermentaciones a las cuales se les adicionó la fracción de TP – 1, LR. – 1 y SCC – 1 respectivamente, se aprecia una diferencia significativa en cuanto al rápido consumo de glucosa cuando estas fracciones fueron agregadas (Figura 16). (ANOVA, $P < 0.05$)

Al ser comparadas las fermentaciones con dichas fracciones se observó la diferencia significativa en el consumo de glucosa, esta diferencia fue mostrada anteriormente con respecto a la biomasa, en la cual, la adición de la fracción de TP – 1 y SCC – 1 no representan diferencia significativa en el consumo de glucosa, mientras que comparadas estas 2 fracciones con la fermentación de LR – 1 si existe una diferencia significativa con respecto al consumo de glucosa (ANOVA, $P < 0.05$). Al comparar la fermentación control con respecto a la fermentación con la adición de LR – 1 se observa que esta última es más eficiente. Lo anterior supone que las fracciones empleadas en las fermentaciones tienen actividad biológica ya que incrementan el consumo de glucosa, datos similares se reportan para la levadura *S. cerevisiae* (Zetić *et al.*, 2001) y para un extracto de levadura de *S. cerevisiae* (Reyes, 2009).

En el Cuadro 17 se muestran los parámetros cinéticos determinados como son: la velocidad específica de consumo de glucosa y eficiencia en el consumo de glucosa, mostrando las respectivas diferencias significativa (ANOVA, $P < 0.05$) que son similares a lo reportado por Reyes, 2009; Zetić *et al.*, 2001; Edens *et al.*, 2002.

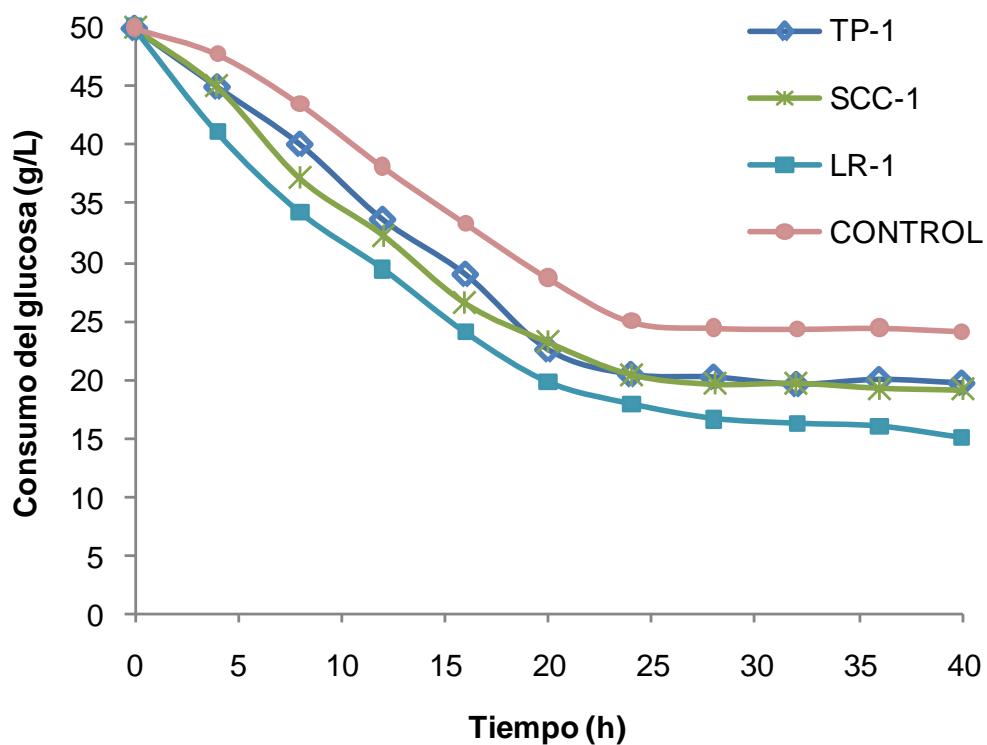


Figura 16. Efecto del consumo de glucosa durante la fermentación con *S. cerevisiae*, con la adición de las fracciones A, obtenidas por filtración en gel. TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, KF-2 = *K. fragilis* L/12-8-2, SCC = *S. cerevisiae* L/25-7-82

Cuadro 17. Parámetros cinéticos del consumo de glucosa durante la fermentación con *S. cerevisiae*, con la adición de las fracciones A, obtenidas por filtración en gel. TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, SCC = *S. cerevisiae* L/25-7-82

	Control	TP-1	SCC-1	LR-1
$Y_{x/s}$	0.140	0.130	0.126	0.125
q_s	1.26	1.98	2.06	2.01

$Y_{x/s}$ Rendimiento de crecimiento
 q_s Velocidad específica de consumo

6.5.3 Fermentaciones con adición de las fracciones B

En la Figura 17 se muestra el crecimiento celular de *S. cerevisiae* al adicionar las segundas fracciones (Fracciones B), obtenidas por la columna G – 50. Se encontraron diferencias significativas (ANOVA, $P < 0.05$) sobre el crecimiento celular de *S. cerevisiae*, para todas las fracciones con respecto al control (*S. cerevisiae* en medio mínimo, sin fracción alcalina purificada), mientras que las fracciones de TP – 2, KF – 2 y SCC – 2 no mostraron diferencia significativa entre ellas, pero estas si presentan diferencia significativa con la muestra L.R. – 2 a excepción de KF – 2 ya que las fracciones KF – 2 y L.R. – 2 no presentan diferencia significativa entre ellas. (ANOVA, $P < 0.05$)

La velocidad específica de crecimiento para el control fue de $\mu = 0.178 \text{ h}^{-1}$, mientras que para las muestras TP – 2 $\mu = 0.344 \text{ h}^{-1}$, SCC – 2 $\mu = 0.359 \text{ h}^{-1}$, KF – 2 $\mu = 0.350$ y para LR. – 2 $\mu = 0.347 \text{ h}^{-1}$, lo cual indicó y confirmó que al ser comparadas solo existe diferencia significativa entre el control y todas las muestras, además de observarse la diferencia significativa mencionada anteriormente entre las muestras TP – 2 y SCC – 2 con respecto a las muestras L.R. – 2 y la similitud entre L.R. – 2 y la muestra K.F. – 2.

En la Figura 17 se muestran las cinéticas de la curva de crecimiento microbiano, así como el ajuste de las mismas para las fracciones B obtenidas y la fermentación control, utilizándose el modelo de la ecuación logística para ajustar los datos experimentales y poder calcular las variables de estudio.

La actividad biológica de las fracciones que contienen los hidrolizados de ácidos nucleicos se determinó con la reducción de la fase de adaptación o fase lag de la curva de crecimiento microbiano de *S. cerevisiae*, debido a que los ácidos nucleicos, principalmente nucleótidos de ARN y polipéptidos son precursores de coenzimas que están encargadas de los procesos de óxido – reducción principalmente del ciclo de Krebs (Reyes, 2009; Roussel *et al.*, 1999).

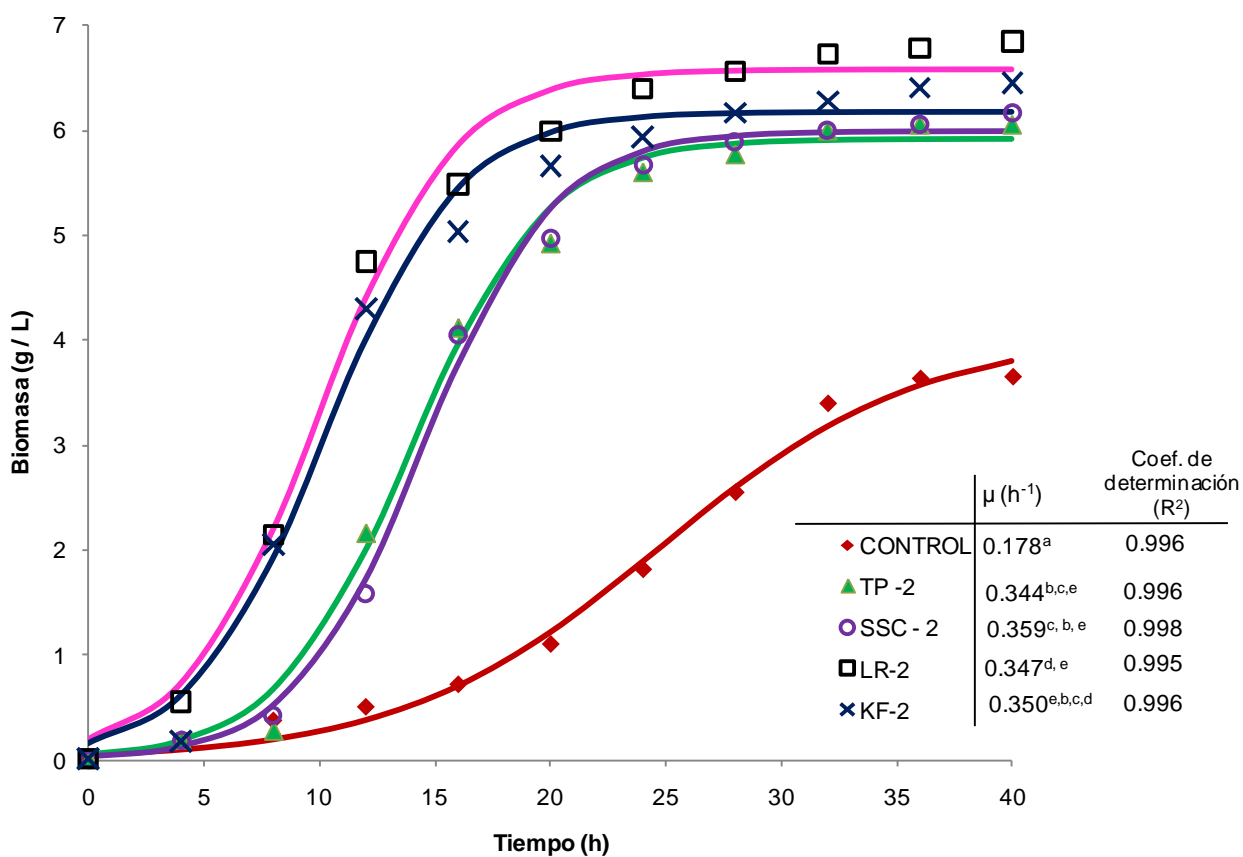


Figura 17. Efecto de la adición de las fracciones B que contienen los hidrolizados de ácidos nucleicos sobre el crecimiento de *S. cerevisiae*. TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, KF-2 = *K. fragilis* L/12-8-2, SCC = *S. cerevisiae* L/25-7-82

Los resultados de las fracciones B son similares a los obtenidos con las fracciones A y a lo reportado por Reyes, 2009, en los cuales también se presenta esta reducción de la fase de adaptación de la curva de crecimiento microbiano además de influir el grado de pureza y el peso molecular de sus respectivas muestras.

6.5.4 Consumo de glucosa

La adición de las fracciones B que fueron obtenidas por filtración en gel, que contienen el hidrolizado de ácidos nucleicos además de la disminución de la fase de adaptación tuvo un efecto similar sobre el consumo de glucosa en la cinética de las fermentaciones.

Al adicionarse las fracciones B de las muestras (mencionadas anteriormente) se observa un inmediato consumo de glucosa comparado con una fermentación control (fermentación sin adición de fracción), cuando la fermentación control es comparada con las fermentaciones a las cuales se les adicionó la fracción de TP – 2, LR. – 2, SCC – 2 y FK – 2 respectivamente, se aprecia una diferencia significativa en cuanto al rápido consumo de glucosa cuando estas fracciones son agregadas (Figura 18). (ANOVA, $P < 0.05$)

Al ser comparadas las fermentaciones con dichas fracciones no se observó la diferencia significativa en el consumo de glucosa, en cuanto al parámetro cinético de velocidad específica de consumo, por lo cual supone que se podría estar consumiendo a la misma velocidad pero la diferencia radica en la cantidad de biomasa que consume esta glucosa. Lo anterior supone que las fracciones empleadas en las fermentaciones tienen actividad biológica ya que incrementan el consumo de glucosa al igual que las fracciones A, datos similares se reportan para la levadura *S. cerevisiae* (Zetić *et al.*, 2001) y para un extracto de levadura de *S. cerevisiae* (Reyes, 2009).

En el Cuadro 18, se muestran los parámetros cinéticos determinados como lo son la velocidad específica de consumo de glucosa y eficiencia en el consumo de glucosa, mostrando las respectivas diferencias significativas (ANOVA, $P < 0.05$) que son similares a lo reportado por Reyes, 2009; Zetić *et al.*, 2001; Edens *et al.*, 2002.

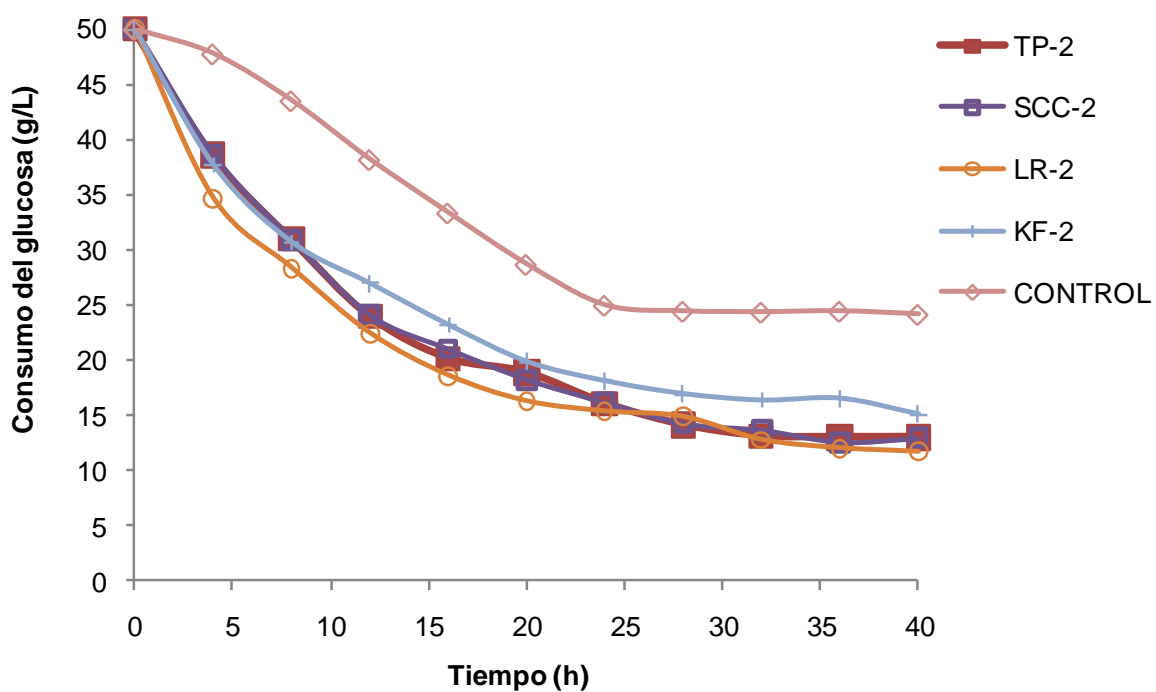


Figura 18. Efecto del consumo de glucosa durante la fermentación con *S. cerevisiae*, con la adición de las fracciones B, obtenidas por filtración en gel. TP = Tradi – Pan, LR = Levadura Residual, KF-2 = *K. fragilis* L/12-8-2, SCC = *S. cerevisiae* L/25-7-82

Cuadro 18. Parámetros cinéticos del consumo de glucosa durante la fermentación con *S. cerevisiae*, con la adición de las fracciones A, obtenidas por filtración en gel.

	Control	TP-2	SCC-2	LR-2	KF-2
$Y_{x/s}$	0.140	0.163	0.166	0.178	0.196
q_s	1.26	2.10	2.16	1.94	1.78

$Y_{x/s}$ Rendimiento de crecimiento
 q_s Velocidad específica de consumo

7. CONCLUSIONES

1. Los resultados del trabajo pueden ser aplicados a la industria como herramienta para disminuir costos y tiempos, además, darle un uso potencial y diferente a la levadura residual.
2. El bio-reactor bajo las condiciones de experimentación (30°C – 48h, agitación 250rpm, aireación: 80mL/min) fue más eficiente para la obtención de biomasa que en matraz.
3. El ARN se hidroliza por el tratamiento con NH₄OH al 5.9% a 76°C, ya que en los extractos de levadura analizados se encontraron fracciones de 12KDa – 41KDa. Los hidrolizados de menor MW_r son más puros que los de alto peso, de acuerdo a los valores de la relación $A_{260/280} > 1.6$
4. El contenido de ARN en las levaduras comerciales está dentro del rango que se encuentra reportado en la literatura para *S. cerevisiae* (39 – 95mg/g). Las diferencias de contenido de ARN entre la levadura de procedencia comercial y las no comerciales podría deberse a los distintos estados metabólicos de las levaduras.
5. Se encontró actividad biológica en los hidrolizados de ácidos nucleicos extraídos con el tratamiento alcalino sobre las fermentaciones, lo cual se ve reflejado en el acelerado consumo de glucosa, en una mayor producción de biomasa y una evidente disminución de la fase de adaptación con todas las fracciones alcalinas de las levaduras utilizadas en comparación con una fermentación control, aunque estadísticamente dicho efecto es más notorio entre el control y las segundas fracciones obtenidas por filtración en gel. (P < 0.05)
6. El grado de actividad biológica depende de la pureza del hidrolizado de ácidos nucleicos obtenidos así como de su peso molecular, entre más puro y de menor peso

molecular sean las fracciones obtenidas de la filtración en gel se presentó un mayor efecto con diferencia significativa. ($P < 0.05$)

7. Existe diferencia significativa con respecto al consumo de glucosa y a la producción de biomasa ($P < 0.05$) en las fermentaciones con los hidrolizados de ácidos nucleicos comparadas con la fermentación control y sobre sí mismas.

8. Existe reproducibilidad del antecedente directo.

8. APÉNDICES

Apéndice A

Curva estándar para la determinación de proteína verdadera.

Los valores de absorbencia de las muestras se interpolaron para su cuantificación en la curva de calibración, concentración vs. Absorbencia (Figura 19) que se realizó usando como patrón albúmina sérica bovina en concentraciones de 0.2 a 0.9 mg/mL.

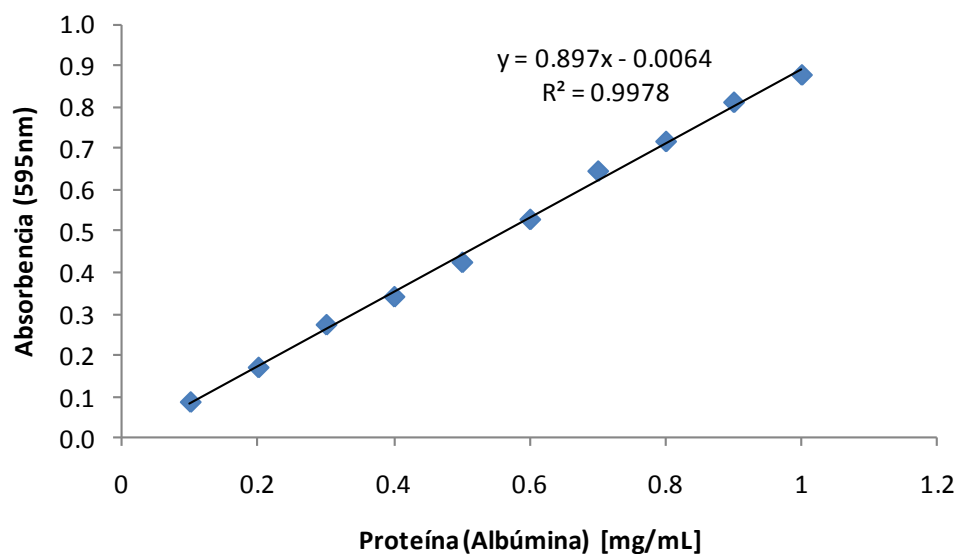


Figura 19. Curva estándar para la determinación de proteína verdadera.

La determinación de la proteína se realizó utilizando la ecuación de la recta que está dada por la curva patrón utilizada.

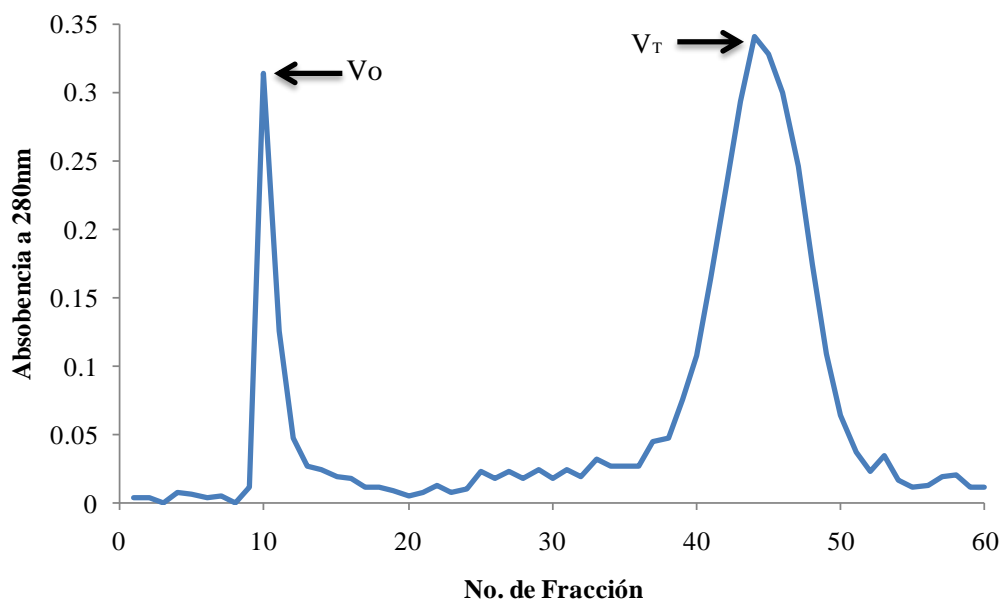
Apéndice B

Caracterización de la columna cromatográfica

Dimensiones: 32 x 1 cm

Se realizó la caracterización de columna G – 50, con azul de dextrano (PM 2000 kDa), en una concentración de 2mg/ml, para determinar el volumen vacío de la columna. La determinación para el volumen total de la columna se realizó con la adición de dinitro fenil L-alanina (DPL - A), en una concentración de 2mg/ml. Se adicionaron estos compuestos a la columna en una relación azul de dextrano - DPL – A 4:3, de esta solución se cargó la columna con 0.25mL de dicha solución.

A continuación se presenta el Cromatograma 5, para calcular el volumen vacío y volumen total de la columna.



Cromatograma 5. Determinación de V_o y V_T para la caracterización de la columna

Por lo cual V_o se obtuvo en la fracción No. 8 y V_T en la fracción No. 45, por lo cual $V_o = 12$ mL y $V_T = 67.5$ mL

Para obtener el perfil de pesos moleculares se utilizaron tres estándares diferentes de Sigma cat. MW – SDSV – 70L (Cuadro 19)

Cuadro 19. Perfil de pesos moleculares utilizados para la caracterización de la columna.

Proteína	PM	Log PM	Ve / Vo
Anhidrasa Carbonica	29,000	4.462	1.625
Inhibidor de Tripsina	20,000	4.303	2.5
Citocromo c	12,400	4.093	3.25

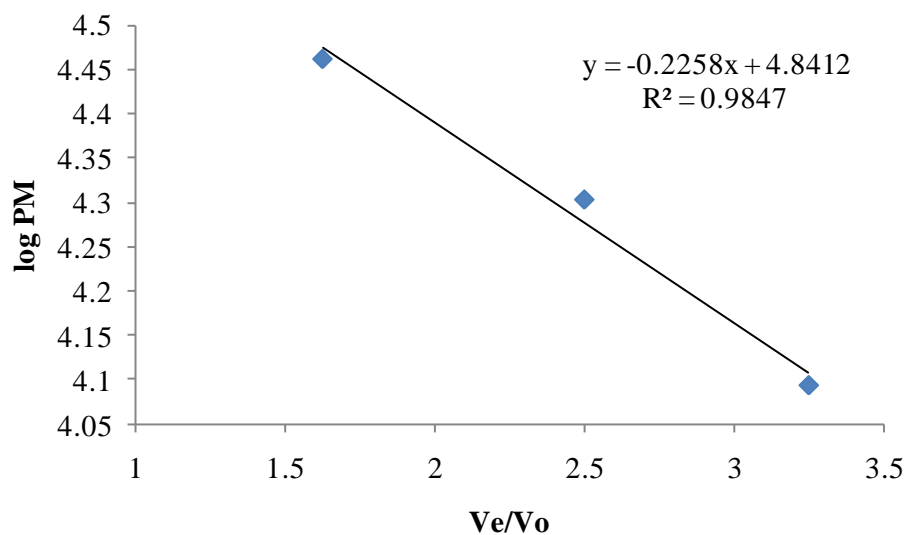


Figura 20. Curva estándar de peso molecular de Sigma (cat. MW – SDSV – 70L) de la columna G – 50

Apéndice C

Curva estándar para la determinación de grupos aminos libres

Los valores de absorbencia de las muestras se interpolaron para su cuantificación en la curva de calibración, concentración vs. Absorbencia (Figura 21) que se realizó usando como patrón leucina en concentraciones de 0.1 a 2.5 [mM]

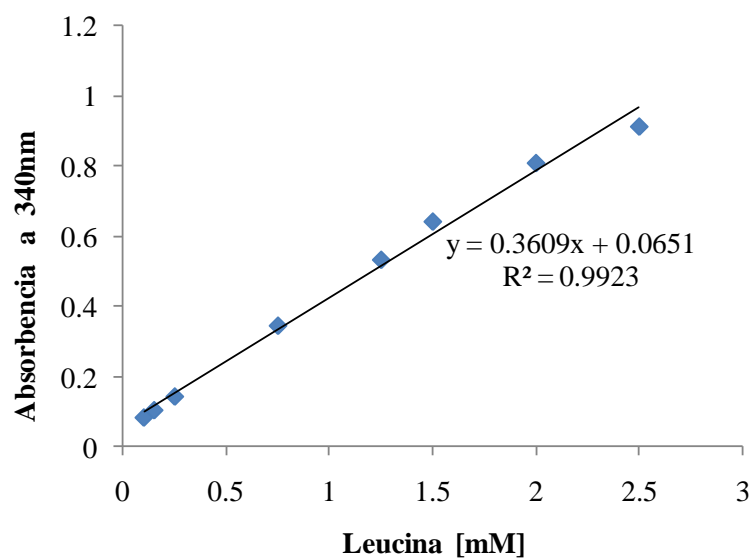


Figura 21. Curva estándar para determinación de grupos aminos libres

La determinación de la proteína se realizó utilizando la ecuación de la recta que está dada por la curva patrón utilizada.

Apéndice D

Curva estándar para la determinación de azúcares reductores.

Los valores de absorbencia de las muestras se interpolaron para su cuantificación en la curva de calibración, concentración vs. Absorbencia (Figura 22) que se realizó usando como patrón glucosa en concentraciones de 200 a 1000 mg

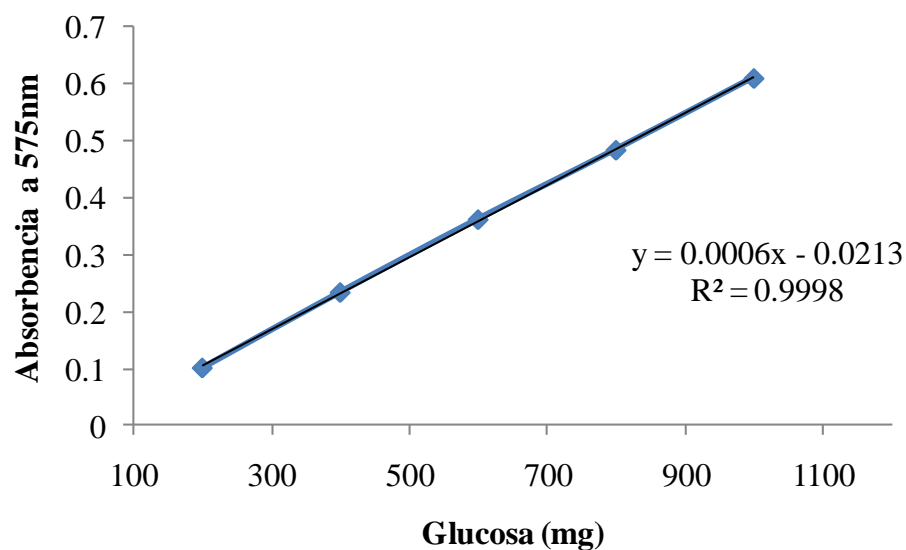


Figura 22. Curva estándar para determinación de azúcares reductores

La determinación de la proteína se realizó utilizando la ecuación de la recta que está dada por la curva patrón utilizada.

Apéndice E

Productividad

El presente trabajo fue presentado en el XXXII Encuentro Nacional y 1er Congreso Internacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. (AMIDIQ), celebrado del 3 al 6 de mayo de 2011 en la Riviera Maya, Quintana Roo, en la modalidad de Presentación Oral.

El presente trabajo fue presentado en el XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería celebrado del 19 al 24 de Junio de 2011 en Juriquilla, Querétaro, en la modalidad de Poster.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adams, R. L. P., Knowler, J. T. and Leader, D. P. Apendix: Methods of studying nucleic acids. En: the biochemistry of the nucleic acids. *Kluwer Academic Publishers*, Edición 11. 1992:324 – 325.

Adler – Nissen, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hidrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1979:27:1256 – 1262.

Álvarez, R. and Enriquez, A. Nucleic acid reduction in yeast. *Applied Microbiology and biotechnology*. 1988:29: 208 – 210.

Álvarez, R. and Águila B. Cinética de liberación de ácidos nucleicos y proteínas durante el tratamiento térmico con hidróxido de amonio en levadura panadera. *Revista Ciencias Biológicas*. 1983:14:2:345 – 354.

Anderson, R. A. and Mertz. Glucose tolerance factor: an essential dietary agent. *Trends in Biochemical Sciences*. 1977:2: 277 – 279.

Bekatorou, A.; Psarianos, C. y Koutinas, AA. Production of Food Grade Yeasts. *Food Technology and Biotechnology*. 2006: 44:3: 407-15.

Chaucheyras, F.; Millet, L. y Michalet, B. Effect of the addition of LEVUCCELL *Saccharomyces cerevisiae* on the rumen microflora of sheep during adaptation to high starch diets. *Evolution of the Rumen Microbial Ecosystem*. Proceedings of a symposium. Aberdeen, United Kingdom, March 1997:20 – 21.

Dziedzak, J. Yeast and yeast derivatives: Definitions, characteristics and processing. *Food Technology*. 1987: 2: 252 – 262.

Edens, N. K., Reaves, L.A., Bergana, M. S., Reyzer, I. L., O'mara P., Baxter J. H. and Snowden M. K.. Yeast extract stimulates glucose metabolism and inhibits rat adipocytes in vitro. *Journal Nutrition* 2002:132:1141 – 1148.

Ferreira, Pinho, O., Vieira E. y Tavarela J.G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 2009:1 – 8.

Frank, JF. Milk and dairy products en: Food Microbiology. *Fundamentals and Frontiers* 1997:101 - 116

Gilling, CJ. <http://www.probioticos.net/articulos>. Probióticos y su uso potencial en la práctica equina/Ponting. 2004.

Girard, I. D. y Dawson K. A. “Stimulatory activities from low-molecular weight fractions derived from *Saccharomyces cerevisiae* strain 1026”, 23rd Biennial Conference on Rumen Function, Chicago, Illinois. 1995:23 – 30.

Gómez Hernández J. y Viniegra González G., Extracción del ácido ribonucleico (ARN) de *Saccharomyces Cerevisiae*. *Revista Social Química Mexicana*. 1977, 21:3:97 – 102.

Halász, A. and Lásztity, R. Use of yeast biomass in food production. CRC Press Inc.: Boston. 1991.

Ingram, L.E., Burton, P.G., Warhurst, G., Clarke, I., Hoyle, D., Oliver, S.G., Stateva L., Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 2007:73:8: 2458 - 2467.

Ingram, L.E., Gent ME, Hoyle DC, Hayes A, Stateva LI, Oliver SG Comparative genomic hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genome Research* 2004:14:1043 – 1051.

Kohlwein, SD. Giunther Daum, Roger Schneiter and Fritz Paltauf. Phospholipids synthesis, sorting, subcellular traffic-the yeast approach. *Trends Cell Biology*. 1996: 6: 260-66.

Luque, C. J. Herraiez, M. A., Herraiez, S. A. Texto ilustrado de biología molecular, Ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones de la salud. Ed. Elsevier, España, 2001. pp 3

Matile, P., H.H Moor y C. Robinow. “Yeast cytology” en Rose, A. y J. Harrison (eds.), *The Yeast*, Londres – Nueva York, Academic Press, 1969:1:219 – 302.

Miller, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959:31: 426 – 428.

Morales, J.L. Aplicación de un suplemento probiótico en la recuperación de un reemplazo de ponedora. 2004, IV Congreso de Avicultura, Santiago. de Cuba.

Muller, G., Wied, S., Crecelius, A., Kessler, A., and Eckel, J., Phosphoinositolglycanpeptidos from yeast potentially induce metabolic insulin actions in isolated rat adipocytes, cardiomyocytes, and diaphragms. *Endocrinology*. 1997; 138: 3459 – 3475.

Ochoa, J.L. and Vázquez, R. Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológica. Número Especial I, 2004: 39-50.

Ostergaard, S. Olsson, L. and Nielsen, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology Molecular Biology* 2000:64: 34-50.

Pecota, DC. Tools for protein expression in *Kluyveromyces marxianus*: evaluation of a sequential integration method and a tetracycline inducible promoter. *American Chemical Society Division of Biochemistry and Technology Abstracts* 2005.

Peixoto, N. Procesamiento de productos de biomasa de levadura para alimentación humana; potencial, Mercado interno y externo. In workshop sobre producto de biomasa de levadura: Utilizacao em alimentacao humana e animal. Canapinas. Anais. Canapinas: ITAL. 1996: 90 – 98.

Reyes B. R. Caracterización de dos Fuentes de *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención del factor de tolerancia a la glucosa. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana 2009.

Roussel A. M., Anderson R. A. and Favier A. E. Trace elements in man and animals 10: Proceedings of the tenth international symposium on trace elements in man and animals, Held in May 2 – 7, in Evain, France. 1999:172:540 – 541.

Robbins, E. A., Sucher, R.W., Schuldt, Jr., Erich H., Sidoti, D. R., Seeley, R.D. and Newell, J. A. Yeast protein isolate with reduced nucleic acid content and process of making same. *United States Patent*. 1975

Spencer, J. and D. Spencer "Outside and inside: The morphology and cytology of the yeast cell", en Spencer, J. y Spencer, D. (eds.), *Yeast in natural and artificial habitats*, Berlín, Springer – Verlag 1997:80 – 94.

Toepfer, E.W., Mertz, W., Polansky, M. M., Roginski, E. E. and Wolf, W. R. Preparation of chromium-containing material of glucose tolerance factor activity from brewer's yeast extracts and by synthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1977: 25; 162 – 166.

Van der Walt, J. "Genus 16. *Saccharomyces Meyen* emend. Reess", en Lodder, J. (ed.), *The yeasts. A taxonomic study*, 2ª ed., Delf, North – Holland Publishing Company, 1971:555 – 718.

Vasallo, M.C., M.A. Otero, L. García, J. R. Dopico y J. C. López, "Effect of homogenization as pretreatment for the improvement of autolysis efficiency of *Kluyveromyces fragilis*", *Food Sciences and Technology International* 2001: 7: 5:445 – 450 .

Wagner R.J., Rambla Otero M.A., Legarreta Guerrero I. *Las Levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos*. Universidad Nacional de Quimiles 2008:107 – 149.

Walker, G.M. *Yeast physiology and biotechnology*. 1998. John Wiley and Sons (eds.), Chidnester.

Zetić G.V., Vesna, S.T., Slobodan, G., Lavoslav, L and Damir, K. Chorium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass. *Journal Biosciences*, 2001; 26:217 – 223.

Zinser, E. y Daum, G. Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast *S. cerevisiae*. *Yeast* 1996:11: 498-636.