



PRODUCCIÓN DE TREHALOSA A PARTIR DE LEVADURAS NO-CONVENCIONALES

TREHALOSE PRODUCTION FROM NON-CONVENTIONAL YEASTS

J.C. González-Hernández^{1*}, M.A. Alcántar-Covarrubias¹, C. Cortés-Rojo²

¹Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Ing. Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia, Ave. Tecnológico # 1500, Colonia Lomas de Santiaguito, C. P. 58120, Morelia, Michoacán, México.

²Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3 Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México.

Recibido 4 de Noviembre 2013; Aceptado 24 de Enero de 2014

Resumen

La trehalosa es un disacárido formado por dos moléculas de D-glucosa, cuya estructura y propiedades fisicoquímicas únicas le confieren gran estabilidad. Este carbohidrato se acumula en el citosol de las levaduras bajo condiciones de estrés abiótico debido a su efecto protector contra la desecación, altas temperaturas, congelación, alta salinidad y oxidación. Debido a estas propiedades, la trehalosa tiene importantes aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y en la investigación. Se realizó un análisis comparativo de la producción de trehalosa en las levaduras no-convencionales *Saccharomyces kluyveri*, *Candida shehatae* y *Candida guilliermondii*, evaluando el efecto de dos temperaturas de crecimiento (28 y 34 °C) y dos métodos de ruptura celular (mecánica con perlas de vidrio o térmica mediante ebullición). La tasa de crecimiento (células/mL) de las células cultivadas a 34 °C disminuyó en comparación con el crecimiento a 28 °C. *S. kluyveri* produjo la mayor cantidad de biomasa en comparación con las levaduras del género *Candida*, *C. shehatae* fue la única levadura en la cual no se detectó producción de trehalosa bajo ninguna condición de temperatura. Se determinó que *C. guilliermondii* produce la mayor cantidad de trehalosa en relación a las otras dos especies de levaduras en base a la prueba de Tukey-Kramer.

Palabras clave: *Candida shehatae*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces kluyveri*, temperatura, estrés.

Abstract

Trehalose is a disaccharide constituted by two molecules of D-glucose, whose unique structural and physicochemical properties are responsible for its high stability. This carbohydrate accumulates inside the cytosol of yeast during abiotic stress due to its protective effect against desiccation, high temperatures, freezing, high salinity and oxidation. For this reason, trehalose has important applications in food, cosmetic, pharmaceutical industries and research. In this study, it was performed a comparative analysis of trehalose production in non-conventional yeasts *Saccharomyces kluyveri*, *Candida shehatae* and *Candida guilliermondii* evaluating the effect of two growth temperatures (28 and 34°C) and two methods of cell breakage (mechanical or thermal disruption by bead beating or boiling, respectively). The growth rate (cells/mL) of the cells cultured at 34°C was lower in comparison with the growth at 28°C. *S. kluyveri* produced the higher amount of biomass in comparison with the yeasts from the *Candida*, *C. shehatae* was the only yeast in which no trehalose production was detected at any temperature. Based on Tukey-Kramer test, it was determined that *C. guilliermondii* yields the higher amount of trehalose in contrast to the two other species of yeast tested.

Keywords: *Candida shehatae*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces kluyveri*, temperature, stress.

*Autor para la correspondencia. E-mail: jcg1974@yahoo.com
Tel. (+52-433) 3121570. Ext. 231., Fax (+52-433) 3121570. Ext. 211

1 Introducción

La trehalosa (α -D-glucopiranosil (1,1) - α -D-glucopiranosido) es un azúcar no reductor que no se hidroliza fácilmente en medios ácidos ni por la α -glucosidasa (Jain y Roy, 2009). La combinación de su estructura molecular y sus propiedades fisicoquímicas le confieren a este disacárido una gran estabilidad (Birch, 1963; Elbein, 1974). Este carbohidrato se ha aislado de una amplia gama de organismos como bacterias (Whatmore y Reed, 1990; Kempf y Bremer, 1998; Murphy y col., 2005), hongos (Noventa-Jordão y col., 1996), levaduras (Lillie y Pringle, 1980; Hottiger, 1987; de Virgilio y col., 1994), insectos (Becker y col., 1996) y plantas (Crowe y col., 1992; Drennan y col., 1993; Blazquez y col., 1998; Goddijn y Smeekens, 1998). Muchos de estos organismos producen y almacenan trehalosa desde un 10 % hasta un 20 % de su peso seco (Elbein y col., 2003). Los niveles de este carbohidrato en las levaduras varían en función de la edad de las células, su estado nutricional, las condiciones ambientales y su etapa de crecimiento (Elbein y col., 2003); respecto a este último factor, las levaduras en fase exponencial presentan bajas concentraciones de trehalosa. Sin embargo, los niveles aumentan al entrar en la fase estacionaria, lo cual ha sido asociado a su capacidad de sobrevivir a la deshidratación (Gadd y col., 1987). Otras de las funciones biológicas de la trehalosa es constituir un azúcar de reserva (fuente de energía) y de protección a las membranas ante el estrés abiótico producido por la desecación, altas temperaturas, congelación, alta salinidad, oxidación y radiación (Crowe y col., 1984; Colaco y col., 1992). Además, la trehalosa puede desempeñar una función estructural al ser componente de los glucolípidos de corinebacterias y micobacterias (Elbein, 1974; Elbein y Mitchell, 1973).

Las propiedades de la trehalosa en estado sólido y en solución son las responsables de la función protectora de este disacárido (Jain y Roy, 2009), lo cual se ha aprovechado en la estabilización de proteínas y lípidos en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Komes y col., 2003; Richards y col., 2003). Además, la trehalosa se utiliza en la investigación como estabilizante de enzimas y tejidos (Ohtake y Wang, 2011).

Uno de los ejemplos mejor estudiados es la respuesta adaptativa; por medio de este mecanismo, las células que se encuentran en proliferación pueden soportar lesiones potencialmente mortales mediante la exposición previa de manera moderada al estrés en cuestión. Entre las levaduras, muchas de las

señales subyacentes implicadas en la tolerancia al estrés siguen siendo desconocidas. (Ansell y col., 1997). De hecho, las mutantes que carecen de la actividad funcional de trehalosa 6-fosfato sintasa no se adaptan a las condiciones de termotolerancia y halotolerancia adquirida (Brewster y col., 1993).

Por razones históricas, *Saccharomyces cerevisiae* ha predominado en la comunidad científica y se ha convertido en un sinónimo de levadura. Sin embargo, *S. cerevisiae* es una entre casi 800 especies de levaduras descritas hasta finales del siglo pasado (Kurtzman y Fell, 1998). Por otra parte, varias de estas especies pueden resultar interesantes debido a su uso potencial en aplicaciones tecnológicas relacionadas con su resistencia al estrés abiótico y la producción de trehalosa.

Existe también una fuerte correlación entre el contenido de la trehalosa y la resistencia al estrés en la levadura industrial para la fabricación de cerveza, pero solamente en ausencia de la fermentación (Van Dijk y col., 1995). Diferentes cepas de levadura para la producción de cerveza son deficientes en los genes requeridos para la degradación de la trehalosa en condiciones de bajas temperaturas (Arneborg y col., 1998). El contenido de la trehalosa en la levadura para la elaboración de cerveza, también ha sido propuesto como un indicador importante de la viabilidad de las células para optimizar la fermentación en el sector cervecero. De hecho, durante la fermentación en la elaboración de la cerveza, un alto nivel de trehalosa sostiene la viabilidad de las células durante las etapas iniciales, mejora la utilización de los carbohidratos y aumenta la producción del alcohol isoamílico y del isobutanol (Guldfeldt y Arneborg, 1998).

Las levaduras no-convencionales son aquellas levaduras que no pertenecen al género *Saccharomyces* (Domínguez y col., 1998). Nuestro grupo de investigación ha dedicado atención a este grupo de levaduras en algunas aplicaciones importantes dentro de los procesos de fermentación. Por ejemplo, hemos reportado que las cepas de levaduras convencionales y no-convencionales son capaces de producir etanol bajo distintas condiciones operativas y nutricionales, con distintos rendimientos en la producción de biomasa y etanol y se ha evaluado el comportamiento cinético de biomasa y etanol a nivel de matraz y a nivel de biorreactor durante la fermentación alcohólica. Se ha utilizado jugo de *Agave cupreata* y se han establecido como variables de estudio a nivel matraz tipo de levadura, concentración de azúcares y temperatura, (Diseño Box-Behnken). En biorreactor, se ha estudiado la aireación y la agitación (Diseño

factorial). Las variables de respuesta evaluadas en cada ensayo fueron el crecimiento celular, la cantidad producida de etanol, el consumo de azúcares y el pH. Se ha realizado la identificación de compuestos volátiles (metanol, etanol y alcoholes superiores) por cromatografía de gases (Pérez y col., 2013; González-Hernández y col., 2012). Sin embargo, en estos estudios no se ha abordado si la acumulación de trehalosa está relacionada con sus posibles aplicaciones en la fermentación.

El presente trabajo tiene como objetivo realizar un análisis comparativo de la producción de trehalosa en las levaduras no-convencionales *Candida shehatae*, *Saccharomyces kluyveri* y *Candida guilliermondii*.

2 Materiales y métodos

2.1 Cepas de las levaduras y condiciones de cultivo

Las cepas de *C. shehatae* (ITMLB04), *C. guilliermondii* (NRRL Y-2075 obtenida del United States Department of Agriculture) y *S. kluyveri* (ITMLB06) fueron mantenidas en medio rico YPD (1 % de extracto de levadura = Y, 1 % de bactopectona = P, 2 % de glucosa = D y 2 % de agar bacteriológico). Los pre-cultivos líquidos se realizaron en matraces mediante la inoculación de las levaduras en 100 mL de medio YPD y su posterior incubación a 28 °C o 34°C durante 24 h a 200 rpm (agitación orbital). Los cultivos (100 mL) se realizaron en condiciones similares durante 30 h [3×10^6 células/mL]. Los muestreos se realizaron cada dos horas. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 2438 g, se lavaron dos veces con agua destilada y se resuspendieron en agua destilada a una concentración de 0.5 g/mL (w/v) para la obtención de los extractos celulares.

2.2 Conteo celular

Se realizaron diluciones seriadas para efectuar el conteo del número de células por mililitro en una Cámara de Neubauer, se utilizó azul de metileno a una concentración del 1 % (Golden Bell, Sparks, NV, Estados Unidos de América) para diferenciar las células viables. La técnica de conteo fue realizada como la describió Hansen (2000).

2.3 Producción de biomasa

Las muestras se centrifugaron a 2438 g por 2 min y se resuspendieron en agua destilada. Para la determinación del peso seco, las muestras se sometieron a un secado a 80°C en un horno ARSA (AR-290D, Feligneo, S.A. de C.V. Zapopan, México) durante 12 h. Las muestras fueron depositadas en pequeñas charolas de aluminio (Alumark, DICON FoodService, México), las cuales fueron previamente pesadas, hasta llegar a un peso constante.

2.4 Consumo de sustrato

Para dicha determinación se utilizó la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) con ciertas modificaciones, la cual consiste en la evaluación espectrofotométrica de la conversión del DNS, de color amarillo, a ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico, de color pardo oscuro-marrón, cuya aparición es proporcional a la cantidad de azúcares reductores totales presentes en la muestra. Las muestras se centrifugaron a 2438 g durante 2 min, se tomaron 5 μ L del sobrenadante al cual se le agregaron 95 μ L de agua destilada y 100 μ L de DNS. Esta mezcla se calentó a temperatura de ebullición y a los 5 min la reacción se detuvo con un baño de hielo. La mezcla se ajustó a un volumen final de 1200 μ L con agua destilada. Los cambios en la absorbancia fueron medidos en un espectrofotómetro Jenway Genova (Bibby Scientific Ltd, Staffordshire, Reino Unido) a una longitud de onda de 540 nm a temperatura ambiente. La cuantificación de azúcares reductores totales se realizó mediante la comparación con una curva estándar de glucosa.

2.5 Medición del pH

Se utilizó un potenciómetro de Hanna Instruments (Woonsocket, RI, Estados Unidos de América) para medir los cambios en el pH de las muestras del cultivo. Se tomaron 2 mL de muestra en cada una de las determinaciones, las cuales se realizaron a temperatura ambiente.

2.6 Extracción de muestras para la determinación de trehalosa

Las muestras fueron sometidas y extraídas por dos métodos de ruptura: a) calentamiento de las suspensiones celulares a una temperatura de ebullición usando un baño de agua por un tiempo de 15 minutos;

b) rompimiento de las células con perlas de vidrio (0.4 - 0.5 μm de diámetro), mediante tres ciclos de agitación de 1 min con un mezclador vortex (VM-11 Scientific., New York Estados Unidos de América) a su máxima potencia y 1 min en un baño de hielo entre cada agitación. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 2438g durante 5 minutos. El sobrenadante se congeló para las determinaciones de trehalosa.

2.7 Cromatografía en capa fina

Se preparó una solución estándar de 0.1 M de cada uno los siguientes carbohidratos: trehalosa, dextrosa, fructosa, arabinosa, manosa, xilosa y galactosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos de América). De los extractos y estándares preparados, se tomaron 48 μL y se agregaron 2 μL de pirimidina. Posteriormente, se tomó 1 μL de esta mezcla y colocó sobre una placa de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Alemania) y se reveló en una cámara cerrada con 1-butanol-isobutanol-agua (10:5:4 v/v) en la fase móvil. Las manchas fueron detectadas mediante la aplicación por spray a la placa de una solución que fue preparada con 5 mg/mL de vainillina en 10 % de H₂SO₄ y 5 % de etanol, la cual se calentó a 100 °C (González-Hernández y col., 2005).

2.8 Determinación de trehalosa por métodos enzimáticos

A los extractos celulares se les retiraron los azúcares reductores como se describe a continuación. Se tomaron 0.2 mL de los extractos a los cuales se les adicionaron 0.2 mL de solución borohidruro alcalino (previamente, se disolvió el borohidruro de sodio a una concentración de 10 mg/mL en hidróxido de sodio (50mM), se agitó la mezcla vigorosamente y se almacenó a 40 °C durante 30 min). Posteriormente, se adicionó 0.5 mL de una solución de ácido acético (200 mM) y se mezcló en un agitador vortex. Después de 5 min, se completó el volumen a 1.1 mL con 0.2 mL de la solución buffer de imidazol. Ésta fue la solución muestra que se analizó con el kit enzimático K-TREH 05/12 de Megazyme (Wicklow, Irlanda), de acuerdo a los procedimientos descritos en el instructivo del kit. Se tomaron 0.2 mL de las soluciones muestra a las cuales se les adicionaron 0.2 mL de una solución buffer de imidazol, 0.1 mL de una solución de NADP⁺ y ATP, más 0.02 mL de una suspensión de hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La solución se mezcló y después de 5 min, se leyó la primera

absorbancia (A_1). Posteriormente, se adicionaron 0.02 mL de una suspensión de trehalasa. Nuevamente, la solución se mezcló y después de 5 min, se leyó la segunda absorbancia (A_2). Se preparó una solución patrón con 200 mg de trehalosa dihidratada (la cual corresponde a 179 mg de trehalosa aproximadamente) en 1 L de agua destilada; se tomaron 0.2 mL de esta solución, los cuales se trataron del mismo modo que las soluciones muestra, para evaluar la actividad de la enzima trehalasa. La cantidad de NADPH formado en estas reacciones es estequiométrica con la cantidad de D-glucosa y por lo tanto corresponde al doble de la cantidad de trehalosa presente en las muestras. Los cambios de absorbancia fueron medidos en un espectrofotómetro Jenway Genova a una longitud de onda de 340 nm a 25 °C.

2.9 Análisis de variables para la producción de trehalosa

Las variables fueron establecidas como A: Especie de levadura (*C. shehatae* (1), *S. kluyveri* (2), *C. guilliermondii* (3)) y B: Temperatura (28 y 34 °C), los niveles de operación fueron establecidos en base a estudios previos. Una vez definidas las variables y niveles de operación, se utilizó un diseño factorial 3 X 2. El diseño experimental y el análisis estadístico fueron realizados mediante el programa Minitab versión 16. El diseño factorial 3 X 2 es aplicado a dos factores, en el cual uno tiene 3 niveles y otro 2 niveles. Estos experimentos permiten estudiar el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas (Gutiérrez y de la Vara, 2008).

2.10 Análisis estadístico

La prueba de Tukey-Kramer fue aplicada a los resultados obtenidos utilizando el programa JMP 6.0®.

3 Resultados y discusión

3.1 Cinéticas de crecimiento

El crecimiento celular de *C. shehatae*, *S. kluyveri* y *C. guilliermondii* a 28 °C y 34 °C, se muestran en la figura 1. Las cinéticas de crecimiento microbiano partieron de una concentración inicial de 3.0×10^6 células/mL, se detuvieron a las 30 h y no se evaluó la fase de muerte. En ambos tratamientos, *C. shehatae* presentó un periodo muy corto en su fase exponencial

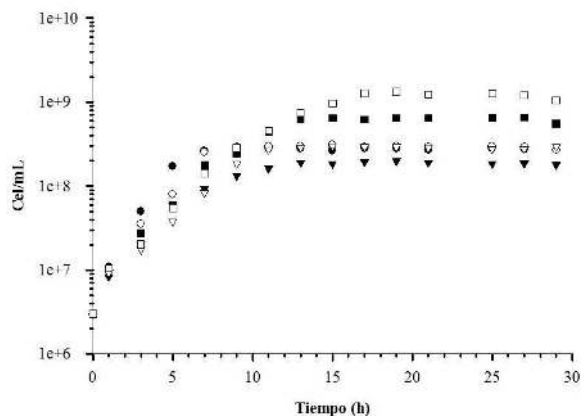


Figura 1. Crecimiento de *C. shehatae* (28 °C, o), *C. shehatae* (34 °C, ●), *S. kluyveri* (28 °C, ▽), *S. kluyveri* (34 °C, ▼), *C. guilliermondii* (28 °C, □), *C. guilliermondii* (34 °C, ■).

con respecto a *C. guilliermondii* y *S. kluyveri*. *C. guilliermondii* mostró una fase logarítmica más prolongada que el resto de los microorganismos utilizados. Las cinéticas de crecimiento se realizaron para analizar el comportamiento de las levaduras bajo estrés térmico, además son de gran utilidad para determinar el punto óptimo de la terminación de la fase exponencial y principio de la fase estacionaria. Además, se determinaron dichos puntos de las cinéticas de crecimientos, los cuales son los siguientes: a 28 °C, *C. shehatae* alcanzó la fase estacionaria a las 9 h, *S. kluyveri* a las 11 h y *C. guilliermondii* a las 17 h; a 34 °C, *C. shehatae* alcanzó la fase estacionaria a las 5 h y *S. kluyveri* y *C. guilliermondii* a las 13 h. De acuerdo con Gadd y col. (1987), la cantidad de trehalosa aumenta en la fase estacionaria, por ello se tomaron dichos puntos de las cinéticas de crecimiento para la extracción de dicho disacárido.

La temperatura de incubación afectó el crecimiento microbiano, ya que se observó un decremento en la tasa de crecimiento (células/mL) de las células cultivadas a 34 °C comparándolo con el crecimiento de las mismas a 28 °C.

En la tabla 1, se reporta el tiempo de duplicación (t_D) y la velocidad específica de crecimiento (μ) de las levaduras a 28 °C y 34 °C. El tiempo de duplicación de las dos especies de levaduras del género *Candida* disminuyó con el aumento de la temperatura, por lo tanto dichas levaduras presentaron mayor adaptación a 34 °C. En contraste, *S. kluyveri* mostró un incremento en el tiempo de duplicación, por lo tanto presentó menor adaptación a 34 °C. En consecuencia, la velocidad específica de crecimiento de las levaduras del género *Candida* aumentó paralelamente al incremento de la temperatura, mientras que la velocidad específica de crecimiento de *S. kluyveri* mostró un decremento en su valor.

Los resultados de la variación del pH extracelular correspondientes a cada una de las levaduras no-convencionales utilizadas a 28 °C y 34 °C se muestran en la figura 2. En la fase exponencial, el pH del medio extracelular disminuyó, lo cual está relacionado con el desarrollo de dos fenómenos. En primer lugar, la disminución del pH podría estar relacionado con la actividad de la ATPasa de protones de la membrana plasmática, la cual participa en la regulación del pH interno mediante el bombeo protones al exterior de las células (Goffeau y Slayman, 1981; Serrano, 1984); en segundo lugar, podría estar ocurriendo la excreción de ácidos orgánicos (Wurst y col., 1980). Como referencia, en condiciones de fermentación, el pH intracelular de *S. cerevisiae* se mantiene entre 5.5 y 5.75, mientras el pH extracelular es de 3.0 (Imai y Ohno, 1995).

Tabla 1. Velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_D) de las levaduras en medio YPD, a 28 °C y 34 °C, 200 rpm. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar de una $n = 3$.

	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) y tiempo de duplicación (h)			
	28°C		34°C	
	μ	t_D	μ	t_D
<i>C. shehatae</i>	0.32 ± 0.01	2.16 ± 0.09	0.49 ± 0.03	1.43 ± 0.10
<i>S. kluyveri</i>	0.30 ± 0.07	2.42 ± 0.60	0.16 ± 0.02	4.51 ± 0.58
<i>C. guilliermondii</i>	0.19 ± 0.02	3.70 ± 0.46	0.34 ± 0.01	2.03 ± 0.03

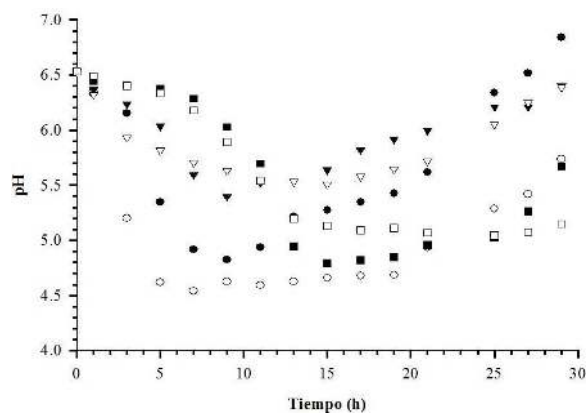


Figura 2. Cambios de pH durante las fermentaciones para *C. shehatae* (28 °C, o), *C. shehatae* (34 °C, ●), *S. kluyveri* (28 °C, ▽), *S. kluyveri* (34 °C, ▼), *C. guilliermondii* (28 °C, □), *C. guilliermondii* (34 °C, ■).

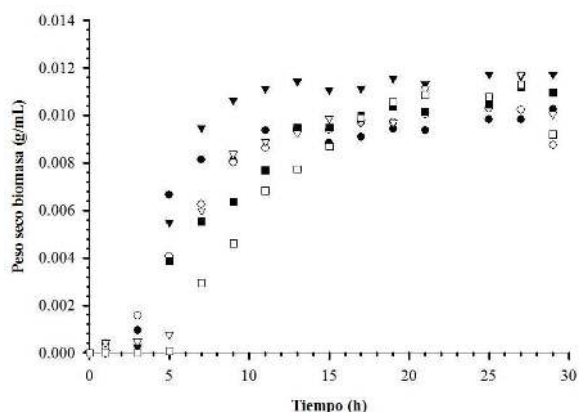


Figura 3. Peso seco de la biomasa de *C. shehatae* (28 °C, o), *C. shehatae* (34 °C, ●), *S. kluyveri* (28 °C, ▽), *S. kluyveri* (34 °C, ▼), *C. guilliermondii* (28 °C, □), *C. guilliermondii* (34 °C, ■).

Las levaduras mostraron una mayor acidificación del medio una vez alcanzada la fase estacionaria. Por otra parte, en las cinéticas de crecimiento realizadas el pH inicial del medio de cultivo disminuye hasta 2 unidades (fig. 2). En algunos casos, el pH inicial del medio disminuye de 2 a 3 unidades de pH y los valores obtenidos fueron de 4.5 para *C. shehatae*, 5.5 para *C. guilliermondii* y 6.0 para *S. kluyveri*, cuando se alcanzó la fase estacionaria. Sin embargo, las células de levadura son capaces de mantener su pH interno entre 6 y 7.5 cuando el pH extracelular varía desde 3.5 a 9 (Salhany y col., 1975; den Hollander y col., 1981; Borst-Pauwels y Peters, 1977).

En etapas posteriores de la fase estacionaria se observó un incremento en el pH del medio que en algunos casos llegó a un valor cercano a la neutralidad

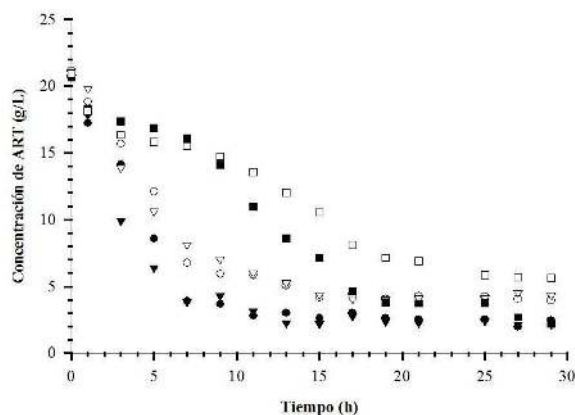


Figura 4. Consumo de azúcares reductores totales (ART) por *C. shehatae* (28 °C, o), *C. shehatae* (34 °C, ●), *S. kluyveri* (28 °C, ▽), *S. kluyveri* (34 °C, ▼), *C. guilliermondii* (28 °C, □), *C. guilliermondii* (34 °C, ■).

(fig. 2); dicho efecto puede relacionarse con el reingreso de los protones al interior de la célula por medio de sistemas especializados de intercambiadores de protones y cationes, con la finalidad de mantener el pH intracelular estable, en consecuencia se efectúa la salida de un ión sodio y/o potasio para mantener su homeostasis (Prior y col., 1996; Ramírez y col., 1998).

La producción de biomasa de *C. shehatae*, *S. kluyveri* y *C. guilliermondii* a 28 °C y 34 °C se muestra en la figura 3. En ambas condiciones, *S. kluyveri* produce la mayor cantidad de biomasa en comparación con las levaduras del género *Candida*. La producción de biomasa se mantiene estable en la fase estacionaria. Se ha demostrado que *S. kluyveri* produce mayor cantidad de biomasa que *S. cerevisiae* en un cultivo de glucosa tipo batch aeróbico (Moller, 2001).

El consumo de sustrato de las levaduras está expresado en concentración de azúcares reductores totales (ART) y se presenta en la figura 4. Las cinéticas de crecimiento microbiano partieron de una concentración inicial de ART de 20 g/L, la cual disminuyó hasta 3 g/L aproximadamente al término de las fermentaciones (30 h). A 28 °C, *C. shehatae* y *S. kluyveri* catabolizaron la mayor cantidad de glucosa presente en el medio durante las primeras 13 h de la fermentación. *C. guilliermondii* lo hizo de una forma más lenta en las primeras 18 h; posteriormente, la cantidad de ART se mantuvo constante hasta que se detuvieron las cinéticas de crecimiento. A 34 °C, *C. shehatae* catabolizó la mayor cantidad del sustrato durante las primeras 7 h de la fermentación, *S. kluyveri* lo hizo en las primeras 13 h y *C. guilliermondii* a las 17 h. Los azúcares son utilizados por todas las levaduras

conocidas. El transporte de los monosacáridos comunes (glucosa, fructosa y manosa) en *S. cerevisiae* es un proceso de difusión facilitada, sin embargo, la situación puede ser diferente en otras levaduras (Flores y col., 2000). Por otro lado, la actividad de la ATPasa de protones de la membrana plasmática puede estar relacionada con la presencia de glucosa en el medio de crecimiento. En *Schizosaccharomyces pombe*, al igual que en *S. cerevisiae*, la actividad ATPasa de protones de la membrana plasmática se incrementa por la glucosa (Ghislain y col., 1992). Además, Serrano (1983) confirmó que la glucosa induce un estado activado de la ATPasa de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*.

Una vez que las levaduras alcanzaron la fase estacionaria, los microorganismos consumieron el sustrato de una forma más lenta. La fase estacionaria es la etapa cuando no hay aumento neto en el número de células (Werner-Washburne y col., 1993). Las células de levadura entran a la fase estacionaria cuando faltan nutrientes en el medio, como los azúcares, nitrógeno, fósforo y azufre (Lillie y Pringle, 1980).

3.2 Identificación de la presencia de trehalosa

En la figura 5A se muestra la cromatografía realizada de los diferentes azúcares utilizados como estándares, los cuales fueron: galactosa, manosa, arabinosa, sacarosa, dextrosa, xilosa, xilitol y trehalosa. En la cromatografía de *C. guilliermondii*, se detectó la presencia de trehalosa en ambas condiciones de temperatura utilizando el calentamiento como método de extracción (fig. 5B). Del mismo modo, en la cromatografía de *S. kluyveri* a 28 °C se detectó la presencia de trehalosa utilizando las perlas de vidrio como método de extracción, el resto de las marcas de detección no se aprecia con claridad (fig. 5C). Sin embargo, en la cromatografía de *C. shehatae* no se aprecia la detección de trehalosa bajo ninguna condición de temperatura (fig. 5D).

González-Hernández y col. (2005) realizaron un análisis comparativo del crecimiento celular, determinaron el contenido intracelular de Na⁺ y K⁺ y la producción de trehalosa en *Debaryomyces hansenii* y *S. cerevisiae* cultivadas bajo condiciones de estrés salino. Las levaduras fueron cultivadas en ausencia y en presencia de 0.6 o 1.0 M de NaCl y KCl. *D. hansenii* creció mejor y acumuló más Na⁺ en comparación que *S. cerevisiae*. Se reportó que *D. hansenii* sintetizó mayor concentración de trehalosa en

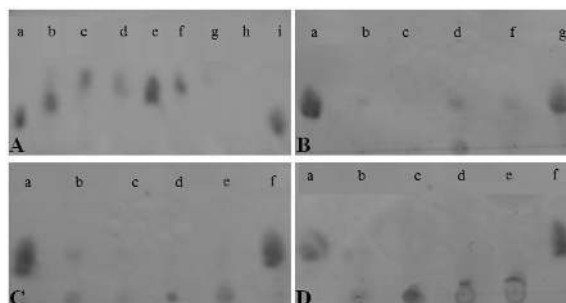


Figura 5. A. Cromatografía en capa fina de los estándares de azúcares: a. Trehalosa, b. Galactosa, c. Manosa, d. Arabinosa, e. Sacarosa, f. Dextrosa, g. Xilosa, h. Xilitol, i. Trehalosa. Identificación de trehalosa por cromatografía en capa fina en *C. guilliermondii* (B), *S. kluyveri* (C), *C. shehatae* (D): a. Control de trehalosa, b. 28 °C, obtenido con perlas, c. 34 °C, obtenido con perlas, d. 28 °C, obtenido mediante calentamiento, e. 34 °C, obtenido mediante calentamiento, f. Control de trehalosa.

comparación que *S. cerevisiae*.

3.3 Producción de trehalosa

En la tabla 2, se presentan los resultados obtenidos de los métodos enzimáticos de la concentración de trehalosa de las levaduras en ambas condiciones de temperatura y ambos métodos de extracción. En las muestras obtenidas con calentamiento, *S. kluyveri* produjo alrededor de 290 μ M de trehalosa en medio YPD a 34 °C, dato que fue 100 veces mayor al obtenido a 28 °C. *C. guilliermondii* produjo alrededor de 460 μ M de trehalosa a 34 °C, dato que es superior al obtenido a 28 °C. En cuanto a *C. shehatae*, la producción de trehalosa es muy escasa en ambas condiciones de temperatura. Con base en los resultados obtenidos, el procedimiento con perlas de vidrio resultó un método no muy eficaz para romper las membranas celulares y por lo tanto, para obtener la trehalosa.

Riberio y col. (1999) reportaron que *C. guilliermondii* BR182 produce 62 mg de trehalosa / g levadura peso seco. Las levaduras utilizadas en sus experimentos se cultivaron en medio YED a 28 °C, a 160 rpm durante 16 h, posteriormente fueron sujetas a un pre-acondicionamiento de choque térmico de 40 °C durante 60 min. Además, Miyazaki y col. (1996) reportaron que *S. kluyveri* produce 8 % de trehalosa respecto al peso seco de las células. Las levaduras utilizadas en sus experimentos fueron cultivadas en medio YNG a 28 °C, a 200 rpm durante 24 h.

Tabla 2. Efecto de la temperatura sobre la producción de trehalosa en las levaduras no-convencionales. Los extractos fueron obtenidos mediante el calentamiento de las suspensiones celulares y el uso de perlas de vidrio. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar de una $n = 3$.

	Trehalosa (μM / g levadura)			
	Calentamiento		Perlas	
	28 °C	34 °C	28 °C	34 °C
<i>C. shehatae</i>	2.4 \pm 1.2	2.6 \pm 1.4	0.9 \pm 0.6	2.7 \pm 0.9
<i>S. kluyveri</i>	2.5 \pm 0.7	281.7 \pm 65.4	2.0 \pm 0.2	10.9 \pm 6.4
<i>C. guilliermondii</i>	186.0 \pm 14.9	456.8 \pm 28.9	1.0 \pm 0.4	2.7 \pm 0.3

Tabla 3. Análisis de varianza de dos factores para la respuesta de la producción de trehalosa por el calentamiento de las suspensiones celulares. *Nivel de significancia = 0.05; $R^2 = 85.89\%$.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
A: Especie	325734.84	2	162867.42	27.30	0.000*
B: Temperatura	72638.55	1	72638.55	12.17	0.004*
AB	37250.77	2	18625.39	3.12	0.081
Error	71589.17	12	5965.76		
Total	507213.33	17			

El peso molecular de la trehalosa (342.3 g/mol) y la conversión al producto final de trehalosa (μM de trehalosa/g levadura) fueron utilizados para realizar la comparación entre los datos. De este modo, el dato de *C. guilliermondii* BR182 (Riberio y col., 1999) es de 181.12 μM trehalosa/g levadura y el dato de *S. kluyveri* (Miyazaki y col., 1996) es de 23.37 μM trehalosa/g levadura. En relación a los datos obtenidos utilizando el método de calentamiento en la presente investigación, la producción de trehalosa a partir de *S. kluyveri* a 28 °C es menor que el dato obtenido por Miyazaki y col. (1996), sin embargo la producción de trehalosa a partir de *C. guilliermondii* a 28 °C es similar al dato obtenido por Riberio y col. (1999). En la literatura se reporta que las levaduras producen trehalosa bajo condiciones de estrés térmico, sin embargo, no existen reportes de *C. shehatae* como especie productora de trehalosa bajo alguna condición.

3.4 Análisis de varianza

Se realizaron tres análisis de varianza de dos factores con dos variables de respuesta (trehalosa y biomasa). El primer análisis corresponde al método

de calentamiento de las suspensiones celulares y, la variable de respuesta es la trehalosa (tabla 3). El segundo análisis corresponde al método de las perlas de vidrio, con la misma variable de respuesta (tabla 4). En el tercer análisis, la variable de respuesta es la biomasa (tabla 5). Los factores a analizar son la especie de levadura (A), la temperatura (B) y la interacción entre estos dos factores (AB). El nivel de significancia considerado fue de 0.05%.

En el primer análisis (tabla 3) correspondiente al método de calentamiento, la especie de levadura y la temperatura tienen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) por lo tanto, ambos influyen en la producción de trehalosa. La interacción de los factores no tiene diferencias significativas ($p > 0.05$). Además, el valor de R^2 (85.89%) indica buena confiabilidad en el método. González-Hernández y col. (2005) utilizaron el método de calentamiento de las suspensiones celulares de las cepas de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* para obtener la trehalosa, obteniendo resultados confiables con dicho método.

En el segundo análisis (tabla 4) correspondiente al método de perlas de vidrio, a diferencia de la tabla 3, sólo la temperatura tiene diferencias significativas.

Tabla 4. Análisis de varianza de dos factores para la respuesta de trehalosa por las perlas de vidrio en las suspensiones celulares. *Nivel de significancia = 0.05; $R^2 = 44.85\%$.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
A: Especie	29.99	2	14.99	1.51	0.260
B: Temperatura	48.03	1	48.02	4.84	0.048*
AB	18.76	2	9.38	0.95	0.416
Error	119.01	12	9.92		
Total	215.78	17			

Tabla 5. Análisis de varianza de dos factores para la respuesta de la biomasa. *Nivel de significancia = 0.05; $R^2 = 51.08\%$.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
A: Especie	0.000120	2	0.000060	3.67	0.057
B: Temperatura	0.000012	1	0.000012	0.74	0.405
AB	0.000072	2	0.000036	2.22	0.151
Error	0.000196	12	0.000016		
Total	0.000401	17			

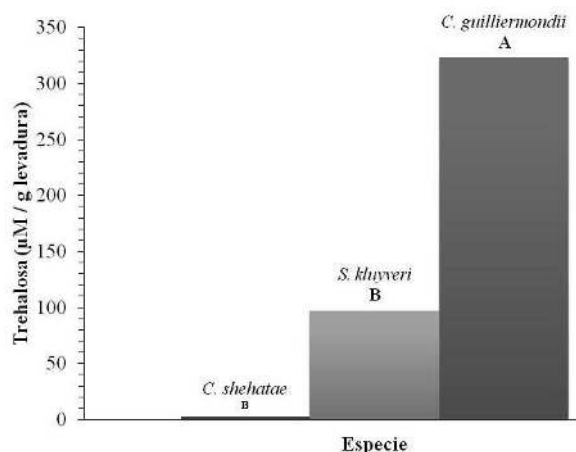


Figura 6. Diagrama de la prueba de Tuckey-Kramer para la producción de trehalosa.

La especie de levadura y la interacción de los factores no tienen diferencias significativas. Además, el valor de R^2 (44.85%) indica que el método de perlas utilizado no es confiable; de aquí se infiere que dicho método es inadecuado para romper las membranas celulares y obtener la totalidad de trehalosa sintetizada por las levaduras.

En el tercer análisis (tabla 5) correspondiente a la biomasa, la especie de levadura, la temperatura y la interacción de los factores no tienen diferencias

significativas; además, el valor de R^2 es de 51.08%.

En el análisis de varianza para el método de calentamiento (tabla 3) se determinó que la especie y la temperatura tienen diferencias significativas, por lo tanto se utilizó en el análisis la prueba de Tuckey-Kramer para determinar cuál y/o cuáles especies de levaduras provocan la diferencia (figura 6). En base a la gráfica se concluye que, *C. guilliermondii* tiene diferencias significativas en la producción de trehalosa y difiere de las otras dos especies de levaduras, mientras *C. shehatae* y *S. kluyveri* no difieren entre sí. Entre las 3 especies de levaduras utilizadas, *C. guilliermondii* es la mejor opción para obtener la mayor cantidad de trehalosa en los tratamientos experimentales realizados.

Conclusiones

Se ha reportado que la trehalosa juega un papel importante en el estrés por temperatura en bacteria y levaduras y que es un factor que desempeña un papel muy importante sobre el crecimiento de las levaduras y su metabolismo en general. El efecto de la temperatura sobre la producción de trehalosa fue explorado y de acuerdo a los resultados obtenidos, *C. guilliermondii* es la cepa no-convencional que produce mayor cantidad de trehalosa en el tratamiento de

extracción con calentamiento en los dos tratamientos térmicos evaluados. La comparación de *D. hansenii* con *C. guilliermondii* refleja aún más que esta última levadura podría ser un microorganismo ideal para la obtención de este disacárido, ya que *D. hansenii* es un microorganismo que crece bajo condiciones de estrés abiótico al ser una levadura marina, la misma no produce mayor cantidad de trehalosa que *C. guilliermondii*, bajo condiciones de estrés térmico. Las levaduras producen trehalosa bajo condiciones de estrés térmico, sin embargo no existen reportes de *C. shehatae* como especie productora de trehalosa bajo alguna condición de estrés, lo cual, se reporta en el presente trabajo.

Se realizó la prueba estadística de Tuckey-Kramer y se determinó que *C. guilliermondii* tiene diferencias significativas en la producción de trehalosa y difiere de las otras dos especies de levaduras utilizadas en el presente trabajo, mientras *C. shehatae* y *S. kluyveri* no difieren entre sí. Entre las 3 especies de levaduras utilizadas, *C. guilliermondii* es la levadura que produce mayor cantidad de trehalosa en los tratamientos realizados. Nuestros resultados son importantes y deben ser considerados en el análisis de la producción de trehalosa con otras levaduras no-convencionales. Aunque este trabajo proporciona información acerca de cómo las levaduras responden a una situación específica de estrés térmico y la producción de trehalosa, queda abierta la necesidad de ampliar el análisis de la respuesta que tienen otras levaduras bajo condiciones de estrés térmico. Además de la temperatura, es necesario evaluar el efecto de distintos parámetros y de otros tipos de estrés abiótico sobre el crecimiento y la producción de trehalosa de las levaduras no-convencionales utilizadas en la presente investigación para explorar si otro tipo de estrés puede mejorar en mayor grado la producción de trehalosa. Otra perspectiva es estudiar la factibilidad técnico-económica de la mejor condición experimental de la cepa no-convencional que produzca la mayor cantidad de trehalosa.

Las levaduras no-convencionales proveen oportunidades significativas para la biotecnología. Como resultado de los cambios naturales y los promovidos por el hombre, los ambientes extremos van en aumento. Estos factores, junto con la presencia de biomoléculas estables en este tipo de levaduras, sugieren que estos organismos pueden ser muy importantes en el futuro.

Agradecimientos

Se agradecen los donativos parciales de la DGEST (870.08-P).

Referencias

- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M. y Adler, L. (1997). The two isoenzymes for yeast NAD-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO Journal* 16, 2179-2187.
- Albertyn, J., Hohmann, S. y Prior, B.A. (1994). Characterization of the osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. *Current Genetics* 25, 12-18.
- Becker, A., Schloder, P., Steele, J.E. y Wegener, G. (1996). The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* 52, 433-439.
- Blazquez, M.A., Santos, E., Flores, C.L., Martínez-Zapater, J.M., Salinas, J. y Gancedo, C. (1998). Isolation and characterization of the Arabidopsis *TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant Journal* 13, 685-689.
- Borst-Pauwels, G.W. y Peters, P.H. (1977). Effect of the medium pH and the cell pH upon the kinetical parameters of phosphate uptake by yeast. *Biochimica Biophysica et Acta* 466, 488-495.
- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E. y Gustin, M.C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259, 1760-1763.
- Caprioli, M., Krabbe-Katholm, A., Melone, G., Ramløv, H., Ricci, C. y Santo, N. (2004). Trehalose in desiccated rotifers: a comparison between a bdelloid and a monogonont species. *Comparative Biochemical Physiology and Molecular Integrative Physiology* 139, 527-32.
- Colaco, C., Pinder, S., Roser, B., Sen, S., y Thangavelu, M. (1992). Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *BioTechnology* 10, 1007-1111.

- Crowe, J., Crowe, L., y Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223, 701-703.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. y Crowe, L.M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review Plant Physiology* 54, 579-599.
- de Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T. y Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *European Journal Biochemical* 219, 179-186.
- den Hollander, J.A., Ugurbil, K., Brown, T.R. y Shulman, R.G. (1981). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the effect of oxygen upon glycolysis in yeast. *Biochemistry* 20, 5871-5880.
- Domínguez, A., Fermiñán, E., Sánchez, M., González, F.J., Pérez-Campo, F. M., García, S., Herrero, A.B., San Vicente, A., Cabello, J., Prado, M., Iglesias, F.J., Choupina, A., Burguillo, F. J., Fernández-Lago, L. López, M.C. (1998). Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *International Microbiol* 1, 131-142.
- Drennan, P.M., Smith, M.T., Goldsworthy, D., y van Staden, J. (1993). The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. *Journal Plant Physiology* 142, 493-496.
- Elbein, A.D. (1974). The metabolism of alpha, alpha-trehalose. *Advances Carbohydrate. Chemical. Biochemical* 30, 227-256.
- Elbein, A.D. y Mitchell, M. (1973). Levels of glycogen and trehalose in *Mycobacterium smegmatis* and the purification and properties of the glycogen synthetase. *Journal of Bacteriology* 113, 863-873.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I. y Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13, 17-27.
- Flores, C.L., Rodríguez, C., Petit, T. y Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 507-529.
- Gadd, G.M., Chalmers, K., y Reed, R.H. (1987). The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 48, 249-254.
- Ghislain, M., De Sadeleer, M. y Goffeau, A. (1992). Altered plasma membrane H⁺-ATPase from the Dio-9-resistant pma1-2 mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. *European Journal Biochemical* 209, 275-279.
- Goddijn, O.J.M. y Smeekens, S. (1998). Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant Journal* 14, 143-146.
- Goffeau, A. y Slayman, C.W. (1981). The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochemical Biophysical Acta* 639, 197-223.
- Guldfeldt, L. U. y Arneborg, N. 1998. The effect of yeast trehalose content at pitching on fermentation performance during brewing fermentations. *Journal of the Institute of Brewing* 104, 37-39.
- González-Hernández, J.C., Jiménez-Estrada, M. y Peña, A. (2005). Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles* 9,7-16.
- González-Hernández, J.C., Pérez, E., Damián R. y Chávez-Parga, M.C. (2012). Isolation, molecular and fermentative characterization of a yeast used in ethanol production during mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 7389-400.
- Gutiérrez, P. H. y De la Vara, S. R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. Editorial McGraw-Hill. México.
- Hansen, P.J. (2000). Use of a Hemocytometer. Disponible en: <http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/hemocytometer.html>. Accesado: 10 Febrero 2011.
- Hottiger, T., Boller, T. y Wiemken, A. (1987). Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Letters* 220, 113-115.

- Imai, T., y T. Ohno. (1995). The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology* 61, 3604-3608.
- Jain, N.K. y Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science* 18, 24-36.
- Joao, A.J., Polizeli, T.M.M.L., Thevelein, J.M. y Terenzi, H.F. (1997). Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiology Letters* 154, 165-171.
- Kempf, B. y Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives Microbiology* 170, 319-330.
- Komes, D., Lovric, T., Ganic, K.K. y Gracin, L. (2003). Study of trehalose addition on aroma retention in dehydrated strawberry puree. *Food Technology Biotechnology* 41, 111-120.
- Kurtzman, C.P. y Fell, J.W. (1998). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Elsevier Science, Amsterdam.
- Lillie, S.H. y Pringle, J.R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *Journal of Bacteriology* 143, 1384-1394.
- Miyazaki, J., Miyagawa, K. y Sugiyama, Y. (1996). Trehalose accumulation by a *Basidiomycotinous* yeast, *Filobasidium floriforme*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81, 315-319.
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Moller, K. (2001). Glucose metabolism in the petite-negative yeast *Saccharomyces kluyveri*. Ph.D. thesis, Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark.
- Murphy, H.N., Stewart, G.R., Mischenko, V.V., Apt, A.S., Harris, R., McAlister, M.S., Driscoll, P.C., Young, D.B. y Robertson, B.D. (2005). The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 14524-14529.
- Noventa-Jordão, M.A., de Lourdes, M., Polizeli, T.M., Bonini, B.M., Jorge, J.A., y Terenzi HF. (1996). Effects of temperature shifts on the activities of *Neurospora crassa* glycogen synthase, glycogen phosphorylase and trehalose-6-phosphate synthase. *FEBS Letters* 378, 32-36.
- Pérez, E., González-Hernández, J.C., Chávez-Parga, M.C. y Cortés-Penagos, C. (2012). Fermentative characterization of producers ethanol yeast from *Agave cupreata* juice in mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 451-461.
- Prior, C., S. Potier, J. L. Souciet, y H. Sychrova. (1996). Characterization of the NHA1 gene encoding a Na⁺/H⁺ antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 387, 89-93.
- Ohtake, S., y Wang, Y.J. (2011). Trehalose: current use and future applications. *Journal Pharmacy Science* 100, 2020-2053.
- Ramírez, J., O. Ramírez, C. Saldaña, R. Coria, y A. Peña. (1998). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K⁺/H⁺ exchanger. *Journal of Bacteriology* 180, 5860-5865.
- Riberio, M.J.S, Leão, L.S.C., Morais, P.B., Rosa, C.A. y Panek, A.D. (1999). Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 245-251.
- Richards, A.B., Krakowa, S., Dexter, L.B., Schmid, H., Wolterbeek, A.P.M., Waalkens-Berendsen, D.H., Shigoyuki, A. y Kurimoto, M. (2003). Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chemical Toxicology* 40, 871-898.
- Salhany, J.M., Yamane, T., Shulman, R.G. y Ogawa, S. (1975). High resolution 31P nuclear magnetic resonance studies of intact yeast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 4966-4970.
- Serrano, R. (1983). *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Letters* 156, 11-14.

- Serrano, R. (1984). Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Current Topics on Cellular Regulation* 23, 87-126.
- Shima, J., Hino, A., Yamada, C., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Mori, K. y Takano, Y. (1999). Stress tolerance indoughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial baker's yeast. *Apply Environmental Microbiol* 65, 2841-2846.
- Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P. y Thevelein, J. M. (1995). Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and non fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Environmental Microbiol* 61, 109-115.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G.C. y Singer, R.A. (1993). Stationary Phase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* 57, 383-401.
- Whatmore, A.M., y Reed, R.H. (1990). Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for Kp in turgor regulation. *Journal Genetics Microbiology* 136, 2521-2526.
- Wurst, M., Sigler, K. y Knotková, A. (1980). Gas chromatographic determination of extracellular metabolites produced by baker's yeast during glucose-induced acidification. *Folia Microbiology* 25, 306-310.