

La Biosíntesis de Trehalosa en *Saccharomyces cerevisiae*: Aspectos Generales y Modelación Metabólica

José I. Hernández-Oropeza*, Juan S. Aranda-Barradas

Departamento de Bioingeniería, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional. Av. Acueducto s/n La Laguna Ticomán, 07340, Gustavo A. Madero, Distrito Federal, México. jaranda@ipn.mx

RESUMEN

Diversas evidencias experimentales han mostrado que existe una estrecha relación entre el contenido intracelular del disacárido trehalosa y el aumento de la viabilidad y la vida de anaquel de *Saccharomyces cerevisiae*, levadura utilizada industrialmente en la producción de pan y cerveza, lo que mejora su calidad como insumo. Por tal motivo, resulta particularmente interesante entender el estado metabólico y las condiciones del cultivo bajo las que se intensifica la biosíntesis del dímero. Los estudios cuantitativos relacionados con la modelación matemática del fenómeno son, sin embargo, relativamente pocos. En este trabajo, se presenta una breve revisión sobre el metabolismo de *S. cerevisiae*, destacando la función de la trehalosa en la fisiología de la levadura. Adicionalmente, se incluye una descripción del análisis de velocidades de reacción en las rutas bioquímicas generales del microorganismo, y la aplicación del análisis en la modelación metabólica de la biosíntesis de trehalosa.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, trehalosa, modelo metabólico.

ABSTRACT

Experimental evidence has shown a close relationship between intracellular trehalose content with the increment of cell viability and longer shelf life, which improves *Saccharomyces cerevisiae* yeast quality as an input in the baking and brewery industries. Therefore, understanding the metabolic state and the cell culture operating conditions for increased disaccharide synthesis would be important for yeast production improvement. Quantitative studies related to the mathematical modeling of trehalose accumulation are, however, relatively scarce. In this work, we present a brief review on yeast metabolism, emphasizing the role of trehalose in yeast physiology. Moreover, we include an overview of the metabolic flux analysis theory and its application to the metabolic modeling of trehalose biosynthesis in *S. cerevisiae*.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, trehalose, metabolic model.

INTRODUCCIÓN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es probablemente el microorganismo más ampliamente utilizado por el hombre a través del tiempo; aunque no se tuviera, en un principio, conciencia plena de la participación del microorganismo en la elaboración de diversos alimentos como el pan o las bebidas alcohólicas (Aranda & Salgado, 2002). La levadura es utilizada como insumo en la industria de panificación, por tanto se han desarrollado procesos para producir biomasa de levadura para ese uso específico. Las aportaciones de la microbiología, la bioquímica, la ingeniería bioquímica y otras disciplinas más que convergen en el amplio concepto de biotecnología, han hecho de la producción de la levadura un proceso mejor fundamentado en conocimientos científicos e ingenieriles (Rosen, 1989). Diversos estudios han mostrado que la viabilidad y la vida de anaquel de *S. cerevisiae* están relacionadas en proporción directa con el contenido intracelular de trehalosa. La trehalosa es un dímero de glucosa caracterizado por un enlace glucosídico α -(1,1), que estabiliza estructuras proteicas del citoplasma por sustitución de moléculas de agua en la esfera de solvatación, confiriendo al microorganismo una cierta resistencia a la deshidratación durante el proceso de secado (Gélinas *et al.*, 1989). También hay evidencia de la trehalosa como sustancia de reserva celular (Elbein *et*

al., 2003), lo que explica un incremento en la viabilidad y la vida de anaquel de la levadura. Todo lo anterior permite establecer la importancia de comprender las condiciones fisiológicas y de cultivo bajo las cuales se intensifica la biosíntesis de la trehalosa en curso del proceso de producción de la levadura.

Se conocen diversos procesos de producción de *S. cerevisiae* en los que se logra inducir empíricamente una biosíntesis intensificada de trehalosa, aumentando la cantidad acumulada en el microorganismo (Eturgay *et al.*, 1997; Parrou *et al.*, 1997). No obstante, a pesar de esta evidencia experimental y de los conocimientos bioquímicos disponibles sobre el metabolismo de *S. cerevisiae*, los estudios cuantitativos que incluyen la modelación matemática de la acumulación de trehalosa en la levadura son relativamente pocos.

A continuación se presenta una revisión de la bioquímica de *S. cerevisiae*, enfatizando las características y funciones biológicas de la trehalosa en la levadura. Además se incluyen las bases teóricas del análisis de velocidades de reacción en las principales rutas bioquímicas implicadas en la síntesis de trehalosa, así como su aplicación en la modelación metabólica de la acumulación intracelular del dímero en la levadura para panificación.

ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO DE *S. cerevisiae*

Existen dos aspectos del metabolismo de *S. cerevisiae* que resultan particularmente importantes: el metabolismo energético, que determina las rutas bioquímicas favorecidas para la transformación del sustrato mayoritariamente a biomasa o a etanol (Aranda & Salgado, 2002), y el metabolismo de los compuestos de reserva en la levadura, glucógeno y trehalosa, que se relacionan con

su viabilidad y vida de anaquel como producto terminado (Silljé *et al.*, 1999).

Metabolismo energético en S. cerevisiae

La glucosa es asimilada por el microorganismo mediante la glicólisis, luego de lo cual se produce piruvato (Moat *et al.*, 2002). Este intermediario puede ser metabolizado mediante dos procesos celulares diferentes (Fig. 1).

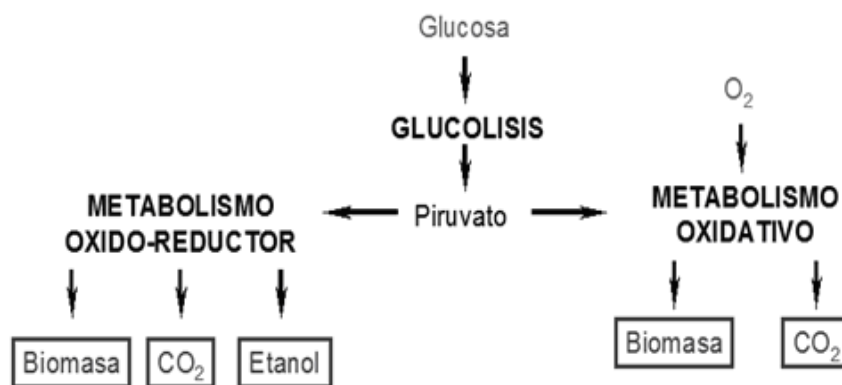


Fig. 1. Asimilación de la glucosa en *S. cerevisiae* (Modificado de Aranda & Salgado, 2002).

Por un lado, en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno (anaerobiosis no estricta), el piruvato es descarboxilado para producir etanol y CO_2 (Balls & Brown, 1925). Este régimen metabólico que se denomina generalmente metabolismo oxidativo-reductor. Por otro lado, cuando se introduce un caudal de aire al cultivo celular, la producción de etanol disminuye (Darlington, 1964; Sonnleitner & Käppeli, 1986; Stryer *et al.*, 2002). En estas condiciones oxidativas, el piruvato es transformado a acetilcoenzima A, que se incorpora al metabolismo respiratorio i.e., el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria

(Stryer *et al.*, 2002), aumentando la producción de biomasa. La activación de este régimen denominado metabolismo oxidativo, implica por tanto el consumo de oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. Se ha reportado que a concentraciones bajas de glucosa en un cultivo aireado, la levadura prácticamente no produce etanol (Crueger & Crueger, 1993), y el sustrato es casi íntegramente utilizado en la síntesis de biomasa. Sin embargo, *S. cerevisiae* produce etanol aún en presencia de oxígeno si la concentración de glucosa en el medio de cultivo es relativamente elevada

Artículos

(Wang *et al.*, 1979). Así, el metabolismo de *S. cerevisiae* dependen de la concentración de glucosa y oxígeno disuelto en el medio de

cultivo (Bekatorou *et al.*, 2006), como se muestra de forma cualitativa en la Fig. 2.

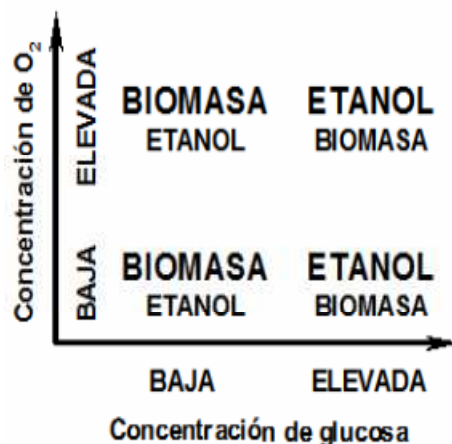


Fig. 2. Influencia de las concentraciones de O₂ y de glucosa sobre el metabolismo de *S. cerevisiae* (Modificado de Aranda & Salgado, 2002). En un proceso de producción de biomasa se requiere establecer bajas concentraciones de glucosa y procurar una elevada concentración de O₂ disuelto.

Las diferentes respuestas que se han observado en el metabolismo de la levadura *S. cerevisiae*, cuando se cultiva bajo distintas concentraciones de glucosa y oxígeno disuelto, pueden ser explicadas por la saturación de la oxidación del NADH a nivel cadena respiratoria (Barrera-Martínez *et al.*, 2011), e influyen en la acumulación de compuestos de reserva en la levadura.

Metabolismo de sustancias de reserva en S. cerevisiae

Las células de *S. cerevisiae* son capaces de acumular sustancias de reserva energética como la trehalosa y el glucógeno (Grba *et al.*, 1975). Estos compuestos de

reserva permiten explicar las características de la levadura que será utilizada como insumo tanto en la industria de panificación como en la de elaboración de bebidas alcohólicas (Aranda & Salgado, 2002). Entre tales características se encuentran la viabilidad de la levadura, el poder fermentativo o la velocidad de consumo de glucosa, la velocidad de generación de anhídrido carbónico y la vida de anaquel.

La trehalosa

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranososa) (Fig. 3), es un carbohidrato no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas mediante un enlace

Artículos

glucosídico α -(1,1) (Matthews *et al.*, 2002).
Distintos organismos, incluyendo plantas,

animales, bacterias, algas y levaduras, son capaces de sintetizarlo (Elbein *et al.*, 2003).

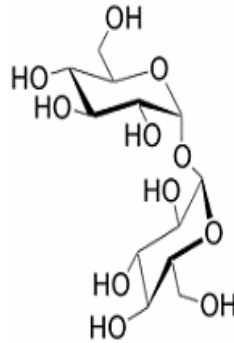


Fig. 3. Estructura de la trehalosa (Matthews *et al.*, 2002).

La trehalosa tiene la función biológica de proteger a ciertas estructuras celulares como membranas y proteínas presentes en el citosol cuando la célula no se encuentra en condiciones óptimas de cultivo (Singer & Lindquist, 1998) (Fig. 4a). Además, el

dímero se hidroliza durante la gemación (Thevelein, 1984), lo que significaría que también tiene una función como carbohidrato de reserva en la reproducción de la levadura (Fig. 4b).

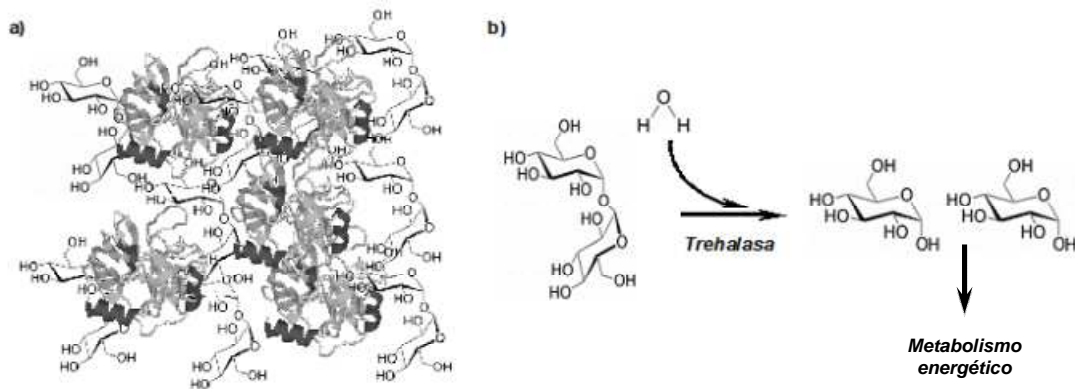


Fig. 4. En *S. cerevisiae*, la trehalosa presenta dos funciones principales: a) metabolito de protección celular sustituyendo esferas de solvatación de una estructura proteica, y b) como molécula de reserva (Hernández-Oropeza, 2010).

Existe una relación entre el contenido intracelular de trehalosa y la capacidad que tiene la célula de resistir al secado o a la congelación (Attfield *et al.*, 1994; Elbein *et al.*, 2003). La viabilidad de las levaduras secas o congeladas, una vez reconstituidas y en condiciones normales de cultivo, es más elevada cuando su concentración intracelular de trehalosa es mayor (Gélinas *et al.*, 1989). Estas observaciones tienen un evidente interés industrial si se considera a la levadura seca y reactivada como insumo biológico específico en la producción de pan.

Biosíntesis de trehalosa en *S. cerevisiae*

La biosíntesis de la trehalosa ocurre por completo en el citosol (Ertugay *et al.*, 1997). El nucleótido uridil-glucosa difosfato, UDPG, reacciona con la glucosa-6-fosfato para formar trehalosa-6-fosfato mediante la acción enzimática de la trehalosa-6-fosfato sintetasa (EC 2.4.1.15). Después, una fosfatasa específica (EC 3.2.1.28) rompe el enlace fosfato de la trehalosa-6-fosfato, formando trehalosa (Fig. 5). Ambas enzimas están asociadas en un complejo denominado trehalosa sintasa (François *et al.*, 1991; Bell *et al.*, 1998).

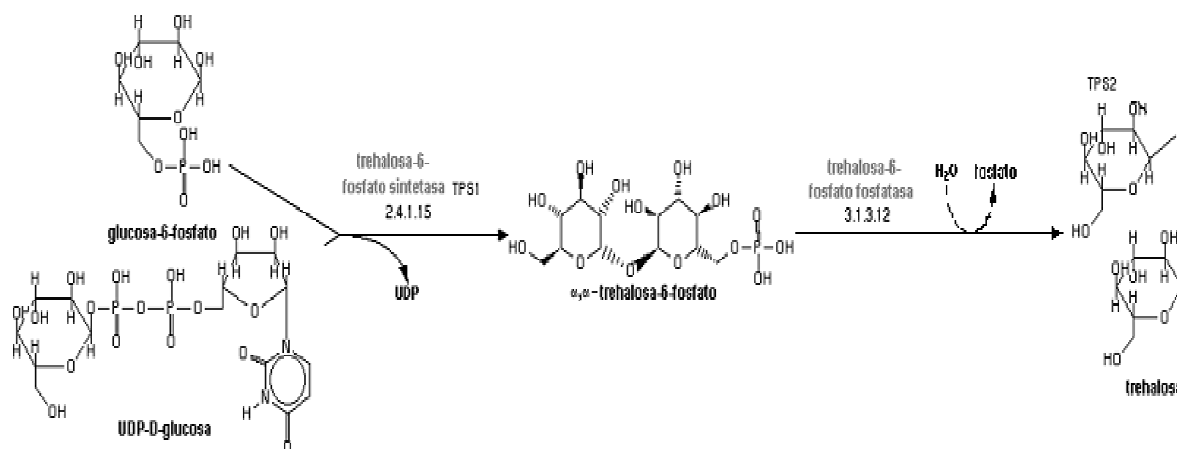


Fig. 5. Reacciones básicas para la biosíntesis de trehalosa en *S. cerevisiae* (Traducido y modificado de Cherry *et al.*, 1998), corresponden a las reacciones 14 y 15 de la Fig. 6.

Estudios sobre la biosíntesis de trehalosa en *S. cerevisiae*, abordados principalmente desde un punto de vista experimental, han demostrado que la levadura acumula este dímero bajo condiciones de cultivo poco favorables, tales como la limitación del crecimiento por glucosa o nitrógeno (Ertugay *et al.*, 1997; Parrou *et al.*, 1997; Jørgensen *et al.*, 2002; Aranda *et al.*, 2004), temperaturas elevadas de cultivo (Hottiger *et al.*, 1987;

Ertugay *et al.*, 1997) o choques osmóticos (Hounsa *et al.*, 1998). También se ha estudiado la regulación de los genes que codifican el complejo trehalosa sintasa (Winderickx *et al.*, 1996). A pesar de los conocimientos bioquímicos disponibles sobre el metabolismo de *S. cerevisiae* y sobre la regulación de la síntesis intracelular de trehalosa, los estudios cuantitativos que incluyen la modelación matemática son

relativamente pocos (Voit, 2003; Aranda *et al.*, 2004; Aranda *et al.*, 2008; Hernández-Oropeza, 2010), aun cuando los modelos son indispensables para la transferencia de los conocimientos al proceso de producción.

MODELACIÓN METABÓLICA DE LA BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA EN *S.*

cerevisiae

Análisis de velocidades de reacción en la biosíntesis de trehalosa

$$\mathbf{As} + \mathbf{\Gamma X} + \mathbf{Bp} = (\mathbf{A\Gamma B}) \begin{pmatrix} \mathbf{s} \\ \mathbf{X} \\ \mathbf{p} \end{pmatrix} = \mathbf{T} \begin{pmatrix} \mathbf{s} \\ \mathbf{X} \\ \mathbf{p} \end{pmatrix} = 0 \quad (1)$$

siendo \mathbf{A} , $\mathbf{\Gamma}$ y \mathbf{B} las matrices de coeficientes estequiométricos correspondientes a los sustratos agrupados en el vector \mathbf{s} , a los productos incluidos en el vector \mathbf{p} y a los componentes de la biomasa del vector \mathbf{X} . Las matrices estequiométricas permiten

$$\mathbf{q} = \mathbf{T}^T \cdot \mathbf{r} \cdot x_t \quad (2)$$

donde x_t es la concentración final de biomasa en el intervalo de tiempo t .

En 1994, Nielsen & Villadsen demostraron que descomponiendo a \mathbf{q} de la ecuación (2) en un conjunto de velocidades medidas, \mathbf{q}_m , uno de velocidades calculadas, \mathbf{q}_c , y otro de velocidades internas no detectables en el medio de cultivo, \mathbf{q}_l , $\mathbf{q} = [\mathbf{q}_m \mathbf{q}_c \mathbf{q}_l]^T$ (siendo $\mathbf{q}_l = 0$, dada la condición de estado pseudo-estable), con la

La estequiometría general de la transformación microbiana es $s \rightarrow x + p$, donde s representa a los sustratos necesarios para la formación de los componentes de la biomasa estructurada x y de los metabolitos extracelulares p , se escribe en términos generales como (Nielsen & Villadsen, 1994):

definir una matriz \mathbf{T} denominada estequiométrica total.

A su vez, la matriz estequiométrica total relaciona a las velocidades volumétricas de reacción extracelulares \mathbf{q} con las velocidades de reacción intracelulares \mathbf{r} , mediante la ecuación:

correspondiente partición de \mathbf{r} en $\mathbf{r} = [\mathbf{r}_m \mathbf{r}_c]^T$, es posible hallar los valores de todas las velocidades desconocidas, tanto de las extracelulares \mathbf{q}_c , como de las velocidades de reacción involucradas en una ruta metabólica intracelular, \mathbf{r}_m y \mathbf{r}_c .

La partición de los vectores de velocidades \mathbf{q} y \mathbf{r} hace necesaria una descomposición de la matriz estequiométrica total observable, \mathbf{T}^T , de la manera siguiente:

$$\mathbf{q} = \mathbf{T}^T \cdot \mathbf{r} \cdot x_t \Rightarrow \begin{pmatrix} \mathbf{q}_m \\ \mathbf{q}_c \\ \mathbf{q}_l \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{T}_1 & \mathbf{T}_2 \\ \mathbf{T}_3 & \mathbf{T}_4 \\ \mathbf{T}_5 & \mathbf{T}_6 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \mathbf{r}_m x_t \\ \mathbf{r}_c x_t \end{pmatrix} \quad (3)$$

con la ecuación (3) se derivan las expresiones para hallar \mathbf{q}_c , \mathbf{r}_m y \mathbf{r}_c :

$$\mathbf{r}_m \cdot \mathbf{x}_t = \mathbf{A}_1 \cdot \mathbf{q}_m \quad (4)$$

matriz estequiométrica total \mathbf{T}^T , bajo el supuesto de que se cumplen las condiciones de observabilidad del sistema reacciones

$$\mathbf{A}_1 = \mathbf{T}_7^{-1} \quad (7)$$

$$\mathbf{A}_2 = -\mathbf{T}_6^{-1} \mathbf{T}_5 \mathbf{T}_7^{-1} \quad (8)$$

$$\mathbf{A}_3 = (\mathbf{T}_3 - \mathbf{T}_4 \mathbf{T}_6^{-1} \mathbf{T}_5) \mathbf{T}_7^{-1} \quad (9)$$

donde:

$$\mathbf{T}_7 = \mathbf{T}_1 - \mathbf{T}_2 \mathbf{T}_6^{-1} \mathbf{T}_5 \quad (10)$$

La condición de observabilidad se establece en la ecuación (10) indicando que la partición \mathbf{T}_6 de la matriz \mathbf{T}^T se pueda invertir. Para esto se requiere que el rango de \mathbf{T}_6 sea igual a los grados de libertad del sistema, dado por la resta del número de reacciones intracelulares y el número de metabolitos considerados en estado pseudo-estacionario.

La utilidad de las ecuaciones (4) y (5) reside en que permiten calcular las velocidades de reacción intracelulares de una red metabólica a partir de ciertas velocidades volumétricas medidas en cultivo(s) experimental(es). Por ejemplo, en la Fig. 6, las reacciones 14 y 15 representan, respectivamente, la síntesis y la hidrólisis de trehalosa, y la acumulación del dímero se explica por un desbalance entre las velocidades correspondientes a ambas reacciones. A nivel del control metabólico, las condiciones de limitación por sustrato

$$\mathbf{r}_c \cdot \mathbf{x}_t = \mathbf{A}_2 \cdot \mathbf{q}_m \quad (5)$$

$$\mathbf{q}_c = \mathbf{A}_3 \cdot \mathbf{q}_m \quad (6)$$

donde \mathbf{A}_1 , \mathbf{A}_2 y \mathbf{A}_3 se calculan a partir de la

metabólicas-reacciones extracelulares (Nielsen & Villadsen, 1994).

nitrogenado o por sustrato carbonado, generan modificaciones en la carga energética citoplásmica y en la concentración intracelular de AMPc, lo que inicia procesos de inhibición/activación de las enzimas trehalosa sintasa y trehalasa (Aranda *et al.*, 2004), produciendo cambios en las respectivas velocidades de reacción que finalmente se traducen en la acumulación del dímero.

Modelo metabólico de la biosíntesis de trehalosa en S. cerevisiae

Los eventos bioquímicos presentes en la acumulación de trehalosa implican al metabolismo energético de la levadura, y para evaluar su importancia es necesario asociarles a mediciones de consumo de sustratos y producción de compuestos finales de reacción. El conjunto de reacciones bioquímicas involucradas en la biosíntesis de un metabolito como la trehalosa puede ser

analizado en términos de las velocidades de reacción, esto es, de la estimación numérica de conversión de sustratos a productos, o a intermediarios, por unidad de tiempo, en cada reacción de una ruta bioquímica especificada (Nielsen & Villadsen, 1994; Stephanopoulos *et al.*, 1998). Así, mediante la estimación de velocidades de reacción en el metabolismo energético de la levadura, es posible, en principio, determinar el flujo de carbono dirigido a la síntesis de la trehalosa en el citoplasma.

En 2010, Hernández-Oropeza propuso un modelo metabólico donde se consideraron las rutas bioquímicas relacionadas con el metabolismo energético y la biosíntesis de trehalosa en una cepa comercial de levadura

para panificación, con el fin de incorporar un análisis estequiométrico y de las velocidades de reacción para la descripción matemática y cuantitativa de la acumulación de este metabolito en la levadura. Este modelo contempla una ruta metabólica para la acumulación de trehalosa en *S. cerevisiae* formada por 47 reacciones intracelulares de las cuales 10 corresponden a la glucólisis, 5 al metabolismo de la trehalosa, 9 a la vía de las pentosas fosfato, 9 a la producción de etanol, 13 al ciclo de Krebs, y 1 a la fosforilación oxidativa. Una representación más detallada de las reacciones intracelulares incluidas en el modelo se presenta en la Fig. 6.

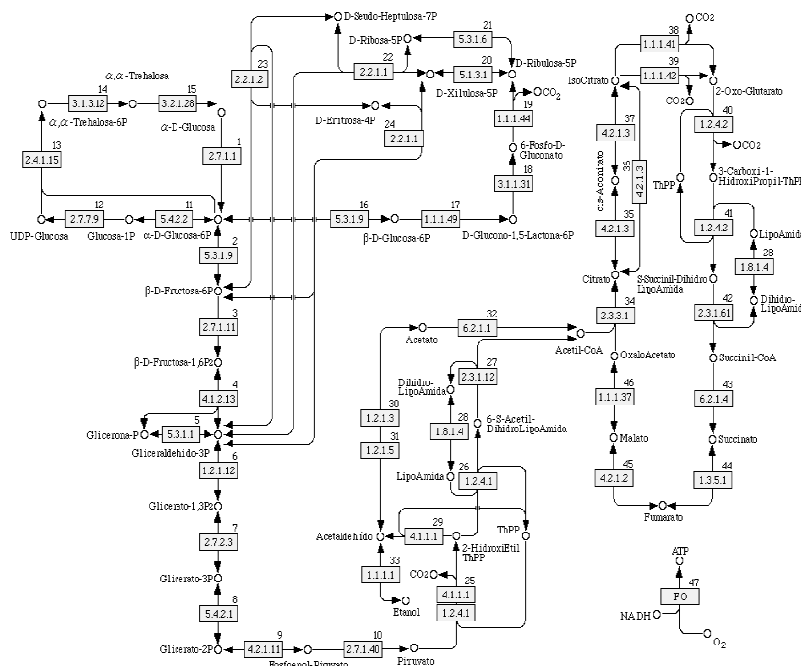


Fig. 6. Ruta metabólica para la acumulación de trehalosa en *S. cerevisiae* (Kanehisa & Goto, 2000). Los marcadores circulares representan el compuesto, los números encerrados en rectángulos corresponden a la clave IUPAC-EC de la enzima que cataliza la reacción y el número fuera del rectángulo es el número de la reacción en el modelo metabólico (Hernández-Oropeza, 2010).

Además de las reacciones intracelulares, el modelo considera la asimilación de la glucosa, la formación de la biomasa, la excreción del etanol y la producción de dióxido de carbono. Se incluyen un total de 53 compuestos, de los cuales 47 intermediarios se asumieron en estado pseudo-estable y los 6 restantes: glucosa, biomasa, etanol, bióxido de carbono, oxígeno

y trehalosa, se tomaron como sustratos o productos requeridos.

La red metabólica básica considerada en la Fig. 6 fue simplificada como se muestra en la Fig. 7 para reducir la propagación de error en las operaciones matriciales implicadas en el modelo y para facilitar su implementación eventual en procesos de producción de levadura.

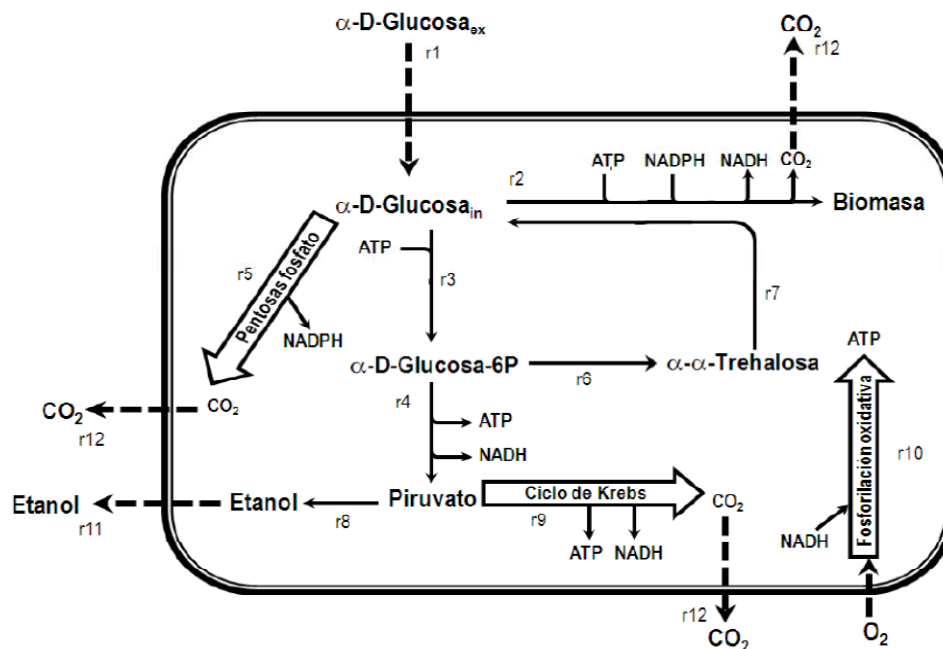


Fig. 7. Rutas bioquímicas simplificadas para el modelo metabólico de la síntesis de trehalosa en *S. cerevisiae*. Las reacciones consideradas se representan como r_i , $i = 1, \dots, 12$. (Hernández-Oropeza, 2010).

Las velocidades de reacción intracelulares fueron calculadas a partir de las velocidades volumétricas de consumo de glucosa y de producción de biomasa, etanol y bióxido de carbono, obtenidas en cultivos por

lote alimentado (Aranda *et al.*, 2004), según las ecuaciones (4), (5) y (6), utilizando las matrices A_1 , A_2 y A_3 de la Fig. 8 que corresponden al modelo metabólico asociado a la ruta metabólica simplificada.

$$\begin{aligned}
 \Lambda_1 &= \\
 &\begin{matrix} -1.0000 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1.0526 & 0 & 0 \\ 0 & -15.5372 & -9.5751 & 28.3529 \\ 0 & -0.2466 & 1.0000 & 1.0000 \end{matrix} \\
 \\
 \Lambda_2 &= \\
 &\begin{matrix} 0 & 0.1965 & 0 & 0 \\ 0 & -15.2906 & -10.5751 & 27.3529 \\ 1.0000 & -14.2881 & -9.5751 & 28.3529 \\ 0 & -0.0000 & 1.4925 & 0 \\ 0 & -0.2466 & -0.4925 & 1.0000 \\ 0 & 0.0325 & -0.3275 & 0.6650 \\ 0 & -0.0000 & -0.0000 & 1.0000 \\ 0 & 0.0000 & 1.0000 & -0.0000 \end{matrix} \\
 \\
 \Lambda_3 &= \\
 &\begin{matrix} 0 & -0.0325 & 0.3275 & -0.6650 \\ -1.0000 & -1.0025 & -1.0000 & -1.0000 \end{matrix}
 \end{aligned}$$

Fig. 8. Matrices asociadas al modelo metabólico para estimación de trehalosa intracelular [ver ecuaciones (4) a (10)] (Hernández-Oropeza, 2010).

La Fig. 9, muestra los valores de las velocidades de reacción obtenidas por el modelo metabólico. Cabe mencionar que todas las velocidades de reacción se normalizaron con respecto a la velocidad de formación de glucosa intracelular que resulta de la suma de las velocidades de reacción de asimilación de glucosa (r_1) y de hidrólisis de trehalosa (r_7).

La velocidad de acumulación de trehalosa resulta de la diferencia entre la velocidad de biosíntesis (r_6) y la de hidrólisis (r_7). Es evidente que el valor de esta diferencia es mayor en la fermentación donde se usó una concentración menor de glucosa en el medio de cultivo. Lo cual coincide con las evidencias experimentales sobre la

acumulación de trehalosa cuando la levadura crece bajo limitación de carbono (Panek, 1975; Ertugay *et al.*, 1997; Aranda *et al.*, 2002). Además, existe congruencia con los demás valores de las velocidades de reacción. Por ejemplo, en el caso del ciclo de Krebs (r_9) y de la fosforilación oxidativa (r_{10}), se aprecia que existe un aumento simultáneo en sus velocidades. Sin embargo, para el caso de la fermentación alcohólica (r_8), su velocidad aumenta cuando la fosforilación oxidativa disminuye. Por lo cual se evidenció que el estado fisiológico de la levadura depende en gran medida de la concentración de glucosa en el medio de cultivo, y de la cantidad de oxígeno disuelto en el medio

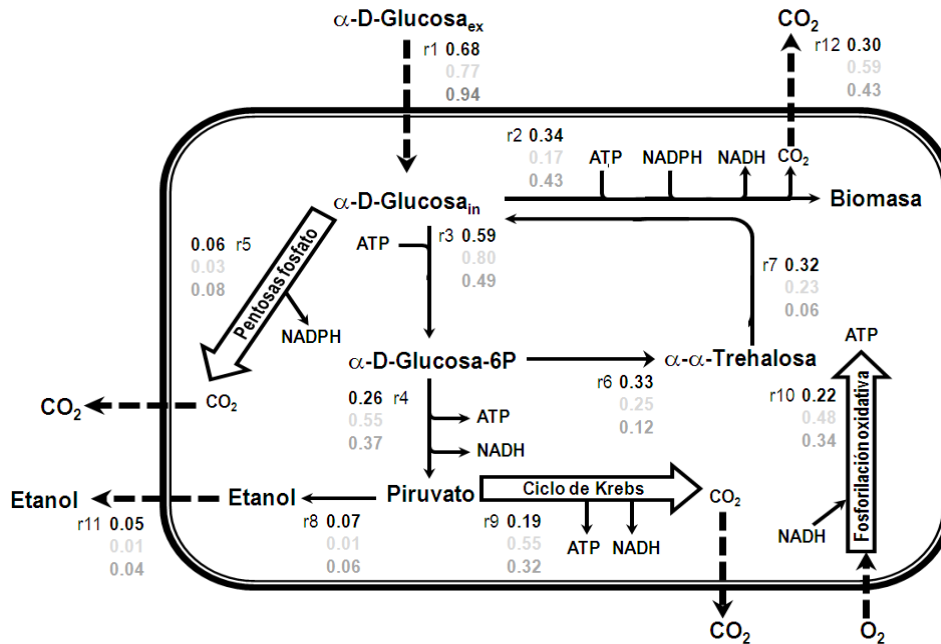


Fig. 9. Velocidades de reacción ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) de la ruta bioquímica simplificada para la acumulación de trehalosa en *S. cerevisiae*. Los valores en negro representan las velocidades de reacción cuando la concentración de glucosa usada fue de $43.2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, los valores en gris claro cuando la concentración de sustrato fue de $41.2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ y por último los valores en gris oscuro cuando la concentración de glucosa fue de $38.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Hernández-Oropeza, 2010).

líquido que se aporta al cultivo.

Conociendo las velocidades de reacción para la síntesis (r_6 , Fig. 9) y la hidrólisis (r_7 ,

Fig. 9) de trehalosa, es posible estimar, mediante el modelo metabólico, la cantidad acumulada en el citoplasma.

$$r_6 \cdot x = -10.2498 \cdot q_{\text{biomasa}} - 11.0386 \cdot q_{\text{etanol}} + 28.2941 \cdot q_{\text{CO}_2}$$

Síntesis de trehalosa

$$r_7 \cdot x = q_{\text{glucosa}} - 9.2498 \cdot q_{\text{biomasa}} - 10.0386 \cdot q_{\text{etanol}} + 29.2941 \cdot q_{\text{C}}$$

Hidrólisis de trehalosa

Obsérvese que q_{glucosa} , q_{biomasa} , q_{etanol} , y q_{CO_2} , son los componentes del vector q_m necesario para las estimaciones de r_6 y r_7 .

La Tabla 1 muestra la comparación de datos experimentales para 3 cultivos diferentes con las estimaciones de trehalosa intracelular obtenidas por el modelo.

Importancia de un modelo descriptivo y predictivo para la biosíntesis de trehalosa

Por ser un compuesto citoplasmático, la cuantificación de la trehalosa requiere tomas de muestra y su análisis posterior. Así, el conocimiento del contenido citoplasmático de trehalosa es siempre ulterior al desarrollo del proceso de producción de biomasa, lo que

Tabla 1. Comparación de las concentraciones intracelulares de trehalosa en *S. cerevisiae* calculadas mediante el modelo metabólico y determinadas experimentalmente.

| Cultivo | Concentración | Concentración | Coeficiente de variación (%) |
|---------|--|--|------------------------------|
| | experimental de trehalosa (Aranda <i>et al.</i> , 2004) (g Trehalosa / g Biomasa) | estimada de trehalosa (Hernández-Oropeza, 2010) (g Trehalosa / g Biomasa) | |
| 1 | 0.0524 | 0.0515 | 1.82 |
| 2 | 0.0285 | 0.0276 | 3.38 |
| 3 | 0.0506 | 0.0558 | 1.69 |

Nótese que los resultados presentaron desviaciones menores al 3.8% respecto a los valores medidos. El modelo está disponible bajo requisición a los autores.

impide el ajuste en tiempo real de las variables de operación en el cultivo, para incrementar la cantidad de trehalosa en la biomasa. Por tanto, se requiere de alguna alternativa para la estimación de la trehalosa intracelular en tiempo real. Un modelo metabólico surge como una opción de predicción de la acumulación de trehalosa en *S. cerevisiae* en tiempo real, ya que además de estar basado en el metabolismo celular depende únicamente de velocidades volumétricas estimadas a partir de variables del proceso medibles en línea durante el proceso.

CONCLUSIONES

Diferentes evidencias experimentales establecen que la trehalosa contribuye a la estabilidad de estructuras proteicas del citoplasma, y que es también una sustancia de reserva celular que mejora la viabilidad y la vida de anaquel de la levadura. Así, resulta

importante comprender las condiciones bajo las cuales se intensifica la biosíntesis de trehalosa, para incorporarlas a protocolos de producción de levadura.

Un modelo cuantitativo y predictivo de la acumulación de la trehalosa en *S. cerevisiae* permitiría fundamentar diseños de producción de la levadura para mejorar su contenido intracelular de trehalosa, incrementando entonces su calidad como insumo en la industria panificadora. De acuerdo a los resultados del presente trabajo, la modelación metabólica se presenta como una alternativa suficientemente precisa para la describir cuantitativamente la acumulación de trehalosa en curso de un proceso de producción de levadura. Esta información permitiría realizar ajustes en las condiciones del cultivo para inducir altas concentraciones de trehalosa en la levadura producida.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento brindado por la Secretaría de Investigación y Posgrado, y por la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional, asociado al proyecto 20071195.

REFERENCIAS

- Aranda JS & Salgado E (2002) Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y usos en el sector alimentario. *Tecnol. Alim.* 37(4): 7-15.
- Aranda JS, Salgado E & Taillandier P (2004) Trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells: experimental data and structured modeling. *Biochem. Eng. J.* 17(2): 129-140.
- Aranda JS, Cabrera AI & Chairez JI (2008) Predicción del contenido intracelular de trehalosa en el proceso de producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 7(1): 71-78.
- Attfield PV, Kletsas S & Hazell BW (1994) Concomitant appearance of intrinsic thermotolerance and storage of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* during early respiratory phase of batch-culture is CIF-
- Darlington WA (1964) Aerobic hydrocarbon fermentation: a practical evaluation. *Biotechnol. Bioeng.* 6(2): 241-242.
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, & Carroll D (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiol.* 13(4): 17-27.
- 1-dependant. *Microbiol.* 140(10):2625-2632.
- Barrera-Martínez I, González García RA, Salgado-Manjarrez E & Aranda-Barradas JS (2011) A simple metabolic flux balance analysis of biomass and bioethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch cultures, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16 (1):13-22.
- Bekatorou A, Psarianos C & Koutins AA (2006) Production of food grade yeasts. *Food Technol. Biotechnol.* 44(3): 407-415.
- Balls AK & Brown JB (1925) Studies in yeast metabolism I. *J. Biol. Chem.* 62(3): 789-821.
- Bell W, Sun W, Hohmann S, Wera S, Reinders A, De Virgilio C, Wiemken A & Thevelein JM (1998) Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J. Biol. Chem.* 273(50): 33311-33319.
- Cherry JM, Adler C, Ball C, Chervitz SA, Dwight SS, Hester ET, Jia Y, Juvik G, Roe TY, Schroeder M, Weng S & Botstein D (1998) SGD: *Saccharomyces* Genome Database. *Nucl. Acids Res.* 26:1 73-79.
- Crueger W & Crueger A (1993) Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Acribia, Zaragoza.
- Ertugay N, Hamamci H & Bayindirli A (1997) Fed-batch cultivation of baker's yeast: effect of nutrient depletion and heat stress on cell composition. *Folia Microbiol.* 42(3): 214-218.
- François J, Neves MJ, & Hers HG (1991) The control of trehalose biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a

Artículos

- catabolite inactivation and repression of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase. *Yeast* 7(6): 575-87.
- Gélinas P, Fiset G, Le Duy A & Goulet J (1989) Effect of growth conditions and trehalose content on cryotolerance of bakers' yeast in frozen dough. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(10): 2453-2459.
- Grba S, Oura E & Soumalainen H (1975) On the formation of glycogen and trehalose in baker's yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2(1): 29-37.
- Hernández-Oropeza JI (2010) Construcción de rutas bioquímicas simplificadas y análisis metabólico de la acumulación de trehalosa en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Biotecnológica. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. pp. 1-75
- Hottiger T, Schultz P & Weimkem, A (1987) Heat induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169(12): 5518-5522.
- Hounsa CG, Brandt EV, Thevelein J, Hohmann S & Prior BA (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiol.* 144(3): 671-680.
- Jørgensen H, Olsson L, Rønnow B & Palmqvist EA (2002) Fed-batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation: effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59(2-3): 310-317.
- Kanehisa M & Goto S (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acid Research.* 28: 27-30.
- Matthews CK, van Holde KE & Ahern KG (2002) Bioquímica. Addison Wesley, Madrid.
- Moat AG, Foster JW & Spector MP (2002) Microbial Physiology. Wiley, New York.
- Nielsen J & Villadsen J (1994) Bioreaction Engineering Principles. Plenum Press, New York.
- Parrou JL, Teste MA & Francois J (1997) Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiol.* 143(6): 1891-1900.
- Rosen K (1989) Preparation of yeast for industrial use production of beverages. *Biotechnology Applications in Beverages Production*. C. Cantarelli and G. Lanzarini (Ed.):169-187.
- Silljé HHW, Paalman JWG, ter Schure EG, Olsthoorn SQB, Boonstra J & Verrips CT (1999) Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181(2): 396-400.
- Singer MA & Lindquist S (1998) Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol. Cell* 1(5): 639-648.
- Sonnleitner B & Käppeli O (1986) Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a

Artículos

- hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.* 28(6): 927-937.
- Stephanopoulos GN, Nielsen J & Aristidou AA (1998) *Metabolic Engineering. Principles and Methodologies.* Academic Press, San Diego.
- Stryer L, Berg JM & Tymoczko JL (2002) *Bioquímica.* Reverté, New York.
- Thevelein JM (1984) Cyclic-AMP content and trehalase activation in vegetative cells and ascospores of yeast. *Arch. Microbiol.* 138(1): 47-64.
- Voit EO (2003) Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. *J. Theor. Biol.* 223(1):55-78.
- Wang HY, Cooney CL & Wang DC (1979) Computer control of baker's yeast. *Biotechnol. Bioeng.* 21(6): 975-995.
- Winderickx J, de Winde JH, Crauwels M, Hino A, Hohmann S, van Dijck P & Thevelein JM (1996) Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Mol. Gen. Genet.* 252(4):470-482.