

00567/

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTOS DE LA TREALOSA Y EL «TWEEN 80» SOBRE
LAS LEVADURAS DE PANIFICACIÓN

Saccharomyces cerevisiae

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIA DE ALIMENTOS
(QUÍMICA DE ALIMENTOS)

Presenta

MARIA EMILIA ROBAYO ROMERO

México, D.F.

2002

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: MARIA EMILIA

ROBAYO ROMERO

FECHA: 14 NOV 2002

FIRMA: [Firma]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Maria del Carmen Wachter Rodarte

Vocal: Dr. Gustavo Gutiérrez Lopez

Secretario: Dra. Carmen Durán de Bazúa

Suplente: Dra. Amelia Farrés Gonzalez-Saravia

Suplente: Dr. Francisco Ruiz Terán

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Antonio Peña Díaz

ASESOR TECNICO:

Dr. Gustavo Gutiérrez Lopez

SUSTENTANTE:

Biol. Maria Emilia Robayo Romero

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Gustavo Gutiérrez por su tiempo, dedicación y amabilidad.

A la Dra. Amelia Farrés Gonzalez-Saravia por su apoyo incondicional.

Al Dr. Antonio Peña Díaz por su paciencia y amabilidad.

A la Dra. Bizerka Svekaro por su valiosa amistad.

Al Sr. David Morales Zapatero y a los de la biblioteca por su gentileza infinita.

A la Dra. Giselle Rosas Solares por linda amistad.

Al Dr. Edgar Oliver Villegas por su compromiso amable.

Al Dr. José Sampedro G. por su amistad.

Al Ing. Christian Cabane por su apoyo computacional y mas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

A mi papa Víctor Julio por su amor y apoyo infinitos donde estés.

A mi mama Luz y a mis hermanos Camilo, German y Enrique.

A mi amiga Alina.

A mi Christian.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

1.	RESUMEN / ABSTRACT	5
2.	NOMENCLATURA	7
2.1.	ÍNDICE DE NOMENCLATURA	7
2.2.	ÍNDICE DE FIGURAS	8
2.3.	ÍNDICE DE CUADROS	9
3.	INTRODUCCIÓN	10
4.	OBJETIVOS	11
5.	ANTECEDENTES	12
5.1.	IMPORTANCIA ECONÓMICA	12
5.2.	IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS DE PANIFICACIÓN	13
5.3.	BIOLOGÍA DE LAS LEVADURAS DEL GÉNERO <i>Saccharomyces</i>	13
5.4.	ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LAS LEVADURAS DEL GÉNERO <i>Saccharomyces</i>	14
5.5.	CARACTERÍSTICAS DE LAS LEVADURAS SECAS ACTIVAS	14
5.6.	OBTENCIÓN INDUSTRIAL Y SECADO DE LAS LEVADURAS PARA PANIFICACIÓN	15
5.7.	SECADO DE LAS LEVADURAS PARA PANIFICACIÓN	15
5.8.	DAÑOS POR DESHIDRATACIÓN	17
5.9.	LA TREALOSA Y LA DESHIDRATACIÓN	19
5.10.	LOS ÁCIDOS GRASOS Y LA TOLERANCIA AL CALOR	22
5.11.	CARACTERÍSTICAS DE LOS AGENTES TENSOACTIVOS	25
6.	MATERIALES Y MÉTODO	28
6.1.	MATERIALES	28
6.1.1.	<i>Pasta de levadura</i>	28
6.1.2.	<i>Trealosa, sacarosa, mono-oleato de sorbitán («Tween 80»)</i>	28
6.2.	TRATAMIENTO DE PRESECADO	28
6.2.1.	<i>Mezclado y extrusión</i>	28
6.2.2.	<i>Secado</i>	29
6.3.	TRATAMIENTO DE POST-SECADO	31
6.3.1.	<i>Rehidratación</i>	31
6.3.2.	<i>Determinación de la salida de nucleótidos</i>	31
6.3.3.	<i>Capacidad fermentativa de las levaduras rehidratadas</i>	31
6.3.4.	<i>Prueba de viabilidad</i>	31
6.3.5.	<i>Tratamiento de envejecimiento</i>	32
6.3.6.	<i>Anisotropía medida por luz fluorescente polarizada</i>	32
6.3.7.	<i>Aislamiento y purificación de membranas plasmáticas</i>	32
6.4.	FOTOGRAFÍAS DE LEVADURAS EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO	32
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.1.	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SECADO DE LA PASTA	34
7.2.	EFECTOS DE LOS ADITIVOS SOBRE LAS FUNCIONES CELULARES	38
7.3.	EFECTOS SOBRE LA MEMBRANA	49
7.3.1.	<i>Efecto de los detergentes</i>	49
7.3.2.	<i>Efecto de los disacáridos</i>	49
7.4.	EFECTO SOBRE LAS ENZIMAS	50
7.5.	EFECTO DE LOS ADITIVOS SOBRE LA PARED CELULAR	56
7.6.	EFECTOS SOBRE EL SECADO	58
7.6.1.	<i>Efectos sobre el secado</i>	58
7.6.2.	<i>Efectos de los aditivos en los parámetros de secado</i>	59
8.	CONCLUSIONES	60
9.	PERSPECTIVAS	61
10.	BIBLIOGRAFÍA	62

1. RESUMEN / ABSTRACT

Se estudió el efecto de los protectores de membrana tales como la trealosa y el mono oleato de sorbitán o «Tween 80» adicionados a la pasta de levadura antes de su secado. El establecimiento de las condiciones de secado más adecuadas se realizó con base en los datos de la literatura, encontrándose un proceso a 50°C por 30 minutos seguido de un tratamiento a 40°C por 30 minutos que arrojó mejores resultados en términos de la conservación de las funciones celulares post-rehidratación evaluadas. Una vez establecidas estas condiciones, se procedió a deshidratar en presencia de agentes protectores de membrana. El efecto de la trealosa y del «Tween 80» adicionados a la pasta secada en las condiciones mencionadas se evaluó mediante las funciones celulares post-rehidratación como son: La capacidad fermentativa, la viabilidad y salida de nucleótidos. Los resultados obtenidos demuestran que la capacidad fermentativa se incrementó un 25% y la salida de nucleótidos se redujo un 16% con la mezcla trealosa al 0.50 y 0.65% y «Tween 80» al 2%. La mezcla «Tween 80» al 1% y trealosa al 0.75% registró un aumento del 20% en la capacidad fermentativa e incrementos en la fluidez de la porción hidrofóbica de las membranas tratadas en los experimentos de anisotropía obtenidos mediante luz fluorescente polarizada. Un aumento del 15% en la capacidad fermentativa y una reducción del 10% en la salida de nucleótidos se encontraron con «Tween 80» al 1% y sacarosa al 0.75%. La presencia de la trealosa y del «Tween 80» al 1% modifica la velocidad de secado de las pastas, haciendo más rápida la salida del agua.

The effect of the addition of membrane protectors such as threalose and Tween 80 prior to drying of yeasts, was studied. Operating conditions of drying were chosen from literature reports. 50 oC for 30 minutes followed by 40oC during 30 minutes proved to be the best combination of drying conditions in terms of the conservation of cellular functions after rehydration of the cells. The cellular functions evaluated were fermentative capacity, viability and loss of nucleotides. Fermentative capacity increased 25% and loss of nucleotides decreased 16 % with the addition of 0.5% of threalose and 0.65% of a Tween 80 2% solution solution. On the other hand, the combination: Tween 80 2% solution added at 1% level and 0.75% threalose produced a 20% increase in fermentative capacity. Anisotropy experiments showed an increment in the hydrophobic region membrane fluidity for samples treated with 0.75% threalose and 1% Tween 80. 15% increase in fermentative capacity, and a reduction of 10% in the loss of nucleotides were found when using 1% Tween 80 and 0.75% sucrose. Presence of threalose and Tween 80 increased drying rates.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. NOMENCLATURA

2.1. INDICE DE NOMENCLATURA

ADH	Alcohol deshidrogenasa
AOAC	Official methods of analysis of AOAC internacional, 1995 16 ^a ed. Association of Official Analytical Chemists International EEUUA. P32-1.
BHL	Balance lipo-hidrofílico (HLB)
CMC	Concentración micelar crítica
DFH	Difenil hexatrieno (DFH)
DPFC	Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)
EMP	Ruta de Embden-Meyerhof-Parnas
FFQ	Fosfofructoquinasa (PFK)
H11	Fase hexagonal invertida
IpN	Intensidad perpendicular
Ipp	Intensidad paralela
La	Estado de cristal líquido
Lβ	Estado de gel
MES-TEA	4-ácido morfolino etano surfónico.
NAD⁺	Nicotín adenin dinucleótido
SLF	Secador de lecho fluidificado
t	Tiempo (s)
Tilacoides	Cloroplasto, orgánulo citoplasmático, que se encuentra en las células vegetales y en las de las algas, donde se lleva a cabo la fotosíntesis (proceso que permite la transformación de energía luminosa en energía química).
TLL	Medio de crecimiento bacteriano con: 2% tristona 1% extracto de levadura y 2% de lactosa (TYL)
Tm	Temperatura de transición
Tween 80	Mono oleato de sorbitán
X	Porcentaje de humedad en base seca (kg de agua/kg de sólido seco en tiempo t)
Xi	Porcentaje inicial de base seca (kg de agua/kg de sólido seco en tiempo to)
Y	Humedad absoluta del aire a la temperatura de bulbo seco (Kg de agua/kg aire seco)
Yw	Humedad absoluta del aire a la temperatura de bulbo húmedo (Kg de agua/Kg aire húmedo)
λ	Número de onda (nanómetros)

2.2. INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Obtención industrial de las levaduras secas activas	16
Figura 2	Diferentes configuraciones de bicapas lipídicas hidratadas	18
Figura 3	Efectos de la trealosa en las T_m de bicapas	20
Figura 4	Mecanismo propuesto por el cual la trealosa estabiliza a los liposomas	21
Figura 5	Retención de un soluto en vesículas liofilizadas en presencia de varios azúcares	22
Figura 6	Tolerancia térmica intrínseca medida como viabilidad en células	24
Figura 7	Interacción entre un agente tensoactivo y una membrana	26
Figura 8	Esquema del trabajo experimental	30
Figura 9	Efectos del secado sobre la capacidad de capacidad fermentativa	35
Figura 10	Efectos del secado sobre la viabilidad	36
Figura 11	Efectos del secado sobre la salida de nucleótidos	37
Figura 12	Capacidad fermentativa («Tween 80» al 1% y trealosa al 0.75%)	39
Figura 13	Capacidad fermentativa («Tween 80» al 2% y trealosa del 0.5 al 0.75%)	40
Figura 14	Salida de macromoléculas («Tween 80» al 1% y trealosa al 0.75%)	47
Figura 15	Salida de macromoléculas («Tween 80» al 2% y trealosa del 0.5 al 0.75%)	47
Figura 16	Capacidad fermentativa («Tween 80» al 1% y sacarosa al 0.75%)	48
Figura 17	Salida de macromoléculas («Tween 80» al 1% y sacarosa al 0.75%)	48
Figura 18	Polarización de fluorescencia del difenil hexatrieno, DFH (DPH)	51
Figura 19	Polarización del DFH (DPH) en membranas de levadura con «Tween 80» al 2% y trealosa	52
Figura 20	Polarización del difenil hexatrieno DFH (DPH) en la membrana aislada	55
Figura 21	Fotografía en el microscopio electrónico de barrido de levaduras “control”	56
Figura 22	Fotografía de barrido de levaduras “tratadas” con trealosa y «Tween 80»	57
Figura 23	Curvas de secado	59

2.3. INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.	Exportaciones mexicanas de levaduras y productos de panificación.	12
CUADRO 2.	Composición de los medios de rehidratación	17
CUADRO 3.	Composición de los fosfolípidos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
CUADRO 4.	Condiciones ensayadas para secar la pasta de levadura.	29
CUADRO 5.	Estructura de los aditivos usados	33
CUADRO 6.	Características del detergente usado	33
CUADRO 7.	Condiciones ensayadas para secar la pasta de levadura	34

3. INTRODUCCIÓN

El uso de la levadura data de los tiempos bíblicos para la producción del pan y del vino. *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura tradicionalmente usada en la fabricación de los productos mencionados.

Las levaduras se presentan comercialmente bajo dos formas: fresca y seca. La levadura seca activa se destaca por una capacidad fermentativa prolongada aunque inferior referida en peso seco a la capacidad fermentativa de la levadura fresca. Se sabe que las levaduras de panificación se deterioran durante el secado y se ha señalado que durante el mismo se modifica la integridad de la membrana (Ceriutti et al., 2000; Crowe et al., 1998; Zikmanis et al., 1980)

En la industria es de amplio uso la adición de sustancias que disminuyan los efectos indeseables del secado (Crowe et al., 1990; Diniz-Mendes et al., 1999; Lodato et al., 1999; Sun y Leopold, 1997).

La trealosa que se sintetiza por *Saccharomyces cerevisiae* bajo ciertas condiciones de cultivo (Atffield, et al., 1994; Krallish et al., 1997; Singer y Lindquist, 1998), se ha destacado como estabilizador de las membranas. Su efecto parece radicar en la conservación del estado de bicapa a temperaturas extremas a las que normalmente existirían en otro tipo de configuraciones (Argüelles, 2000; Crowe et al., 1987a, 1998; Cuber et al., 1997; Hinch y Crowe, 1998; Lodato et al., 1999)

El mono oleato de sorbitán conocido comercialmente como «Tween 80» y otros detergentes adicionados a un medio de cultivo confieren resistencia a los daños causados por deshidratación, aumentando la viabilidad y preservando la actividad metabólica (Prasad y Rose, 1986; Sujatha y Mishra, 1997; Swan y Watson, 1999; Yon et al., 1998).

Este trabajo se diseñó con la intención de conocer la respuesta fisiológica de las levaduras de panificación secadas en presencia de estos dos aditivos y a la vez determinar otros parámetros de importancia biotecnológica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar los efectos de la trealosa y el «Tween 80» adicionados antes del secado sobre las funciones celulares de *Saccharomyces cerevisiae*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Establecer las condiciones de secado de la pasta cercanas a las industriales sin la utilización de aditivos.
- Determinar las concentraciones adecuadas de las sustancias protectoras adicionadas a la pasta de levadura y evaluar sus efectos en las funciones celulares: capacidad fermentativa, la salida de nucleótidos y la viabilidad.
- Examinar la fluidez membranal después de la adición de los agentes estabilizadores.
- Observar efectos de los aditivos en las cinéticas de secado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. ANTECEDENTES

GENERALIDADES

5.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA

El consumo mundial de productos de panificación, pastelería, galletería, bocadillos etc. Tiene un crecimiento continuo. México, con sus principales plantas de levaduras SAFMEX S.A. de Toluca, LA FLORIDA S.A. y LA AZTECA S.A. en el Distrito Federal, se ha consolidado como un importante exportador de levaduras y de productos terminados en este ramo (CUADRO 1). En el año 2000, el monto de las exportaciones mexicanas de levaduras alcanzó volúmenes superiores a las 10 millones de toneladas con un valor de 21.091 millones de dólares. Así mismo, las exportaciones de los productos de panificación fueron superiores a las 27 toneladas con un valor cercano a los 50 millones de dólares (Bancomext, 2000).

CUADRO 1. Exportaciones mexicanas de levaduras y productos de panificación durante el periodo 1998-2000 (adaptado de datos de Bancomext, 2000)

Exportaciones de levaduras	1998	1999	2000
Toneladas	11.457	9.097	10.218
Millones de dólares	22.356	18.464	21.091

Exportaciones de productos de panificación	1999	2000	2001
Toneladas	21.006	27.022	35.205
Millones de dólares	29.926	49.942	60.352

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2. IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS DE PANIFICACIÓN

La función de las levaduras en la fabricación del pan es múltiple:

- Incrementar el volumen de la masa por la generación de gas durante la capacidad fermentativa de los carbohidratos disponibles en la harina de trigo.
- Desarrollar estructura en la masa por la expansión del gas.
- Proporcionar un sabor característico del producto.
- Aumentar el valor nutritivo.

Además del azúcar adicionado a la harina, la levadura contribuye con cerca del 2% de su peso seco en forma de carbohidratos disponibles para la capacidad fermentativa. En la masa, la levadura dispone de azúcares que provienen de dos fuentes; la primera, que es una pequeña cantidad de azúcares libres presentes en la harina misma (1 a 2% según el tipo de harina y son: Glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa) y la segunda y mayor fuente de carbohidratos proviene de la maltosa producida por la hidrólisis del almidón. La levadura debe ser capaz de fermentar rápidamente la maltosa, lo cual ocurre durante el periodo final (antes de llevar la masa al horno) y esto influye de gran manera en el volumen total del pan (Burrows, 1970; Zobel, 1996).

5.3. BIOLOGÍA DE LAS LEVADURAS DEL GÉNERO *Saccharomyces*

Las levaduras constituyen un grupo de hongos microscópicos eucarióticos unicelulares que producen ascas solitarias y que conforman una gran parte del orden Endomycetales. Las células de las levaduras que pertenecen al género *Saccharomyces* son ovoides y están constituidas por el citoplasma, el material nuclear, la membrana plasmática y una pared celular (Salas-Mellado y Chang, 1999; Zobel, 1996).

La pared celular es una fuerte estructura diseñada para proveer una protección física y actuar como barrera osmótica. Los análisis de microscopio electrónico han evidenciado la existencia de una capa interna y de una capa externa. La fuerza mecánica de la pared reside en la capa interna que está constituida por β 1,3-glucano y quitina y representa cerca de 50-60% del peso total. La capa externa contiene mano-proteínas glicosiladas de alto peso molecular y está involucrada dentro de los eventos de reconocimiento de célula a célula. También limita la accesibilidad de enzimas extrañas a la parte interna de la pared y a la membrana plasmática. Las proteínas de superficie con sus cadenas de carbohidratos que contienen múltiples puentes fosfodiéster son responsables de las propiedades hidrofílicas de la pared y pueden estar involucradas en la retención de agua y la protección a la sequía (Klis, 1994; Klis et al., 2002).

El tamaño de las células oscila según la especie, entre 2.5 y 10.5 μm de ancho y 4.5 a 21 μm de largo. *Saccharomyces* se reproduce sexual y asexualmente. La reproducción asexual implica la división de la célula, en la mayoría de los casos en dos células inicialmente desiguales por gemación. El ciclo sexual típico de las levaduras implica la fusión de las células iguales o desiguales uninucleadas, seguida casi inmediatamente de la fusión nuclear. La célula resultante se llama cigoto, el cual crece y se transforma en un asca. El núcleo diploide se transforma por meiosis y los cuatro núcleos haploides resultantes pueden madurar directamente en ascosporas, o primero dividirse mitóticamente de tal manera que se producen ocho Ascosporas en cada asca (Salas-Mellado y Chang, 1999; Zobel, 1996).

5.4. ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LAS LEVADURAS DEL GÉNERO *Saccharomyces*

Las levaduras crecen utilizando una gran variedad de carbohidratos incorporados en solución a través de la membrana celular (Beker y Rapoport, 1987; Pravé y Sittig, 1987; Langejan, 1971; Zobel, 1996). La mayoría de ellas metabolizan: glucosa, D-fructosa, D-sacarosa, maltosa y galactosa. El metabolismo de los carbohidratos debe satisfacer los requerimientos de energía en forma de ATP, poder reductor como NADH e intermedios. En ausencia de oxígeno la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) constituye el 95% del metabolismo glicolítico de *Saccharomyces cerevisiae* (Burrows, 1966; François et al, 1997; Zobel, 1996).

El desempeño de la levadura en la masa del pan depende de un conjunto de enzimas, entre las cuales están principalmente la invertasa, que transforma el azúcar de caña en levulosa y dextrosa; la maltasa, que transforma la maltosa en dextrosa; la simaza que transforma el azúcar simple en dióxido de carbono y etanol y la proteasa, que actúa sobre las proteínas extrayendo los grupos nitrogenados que la levadura necesita (Burrows, 1966; Lillie y Pringle, 1980).

5.5. CARACTERÍSTICAS DE LAS LEVADURAS SECAS ACTIVAS

El uso de las levaduras secas se desarrolló inicialmente para surtir lugares distantes donde no existían condiciones adecuadas para la conservación de las levaduras frescas.

Las levaduras secas activas poseen una humedad final entre el 5 y el 7% (condición necesaria para su estabilidad durante el almacenamiento). El producto se obtiene en forma de partículas cilíndricas de color crema de 0.15 a 1.5 mm que presentan una superficie porosa. Se caracterizan por ser estables, uniformes, por presentar una facilidad de transporte y por necesitar condiciones de almacenamiento mínimas. Se requiere que su hidratación sea rápida y que no forme grumos. La disminución de su poder fermentativo no debe ser mayor de 5 a 10% durante su vida de anaquel (Beker y Rapoport, 1987; Salas-Mellado y Chang, 1999).

5.6. OBTENCIÓN INDUSTRIAL Y SECADO DE LAS LEVADURAS PARA PANIFICACIÓN

Las levaduras secas activas se obtienen a través de un proceso por lotes. En la Figura 1 se aprecian las diferentes operaciones que intervienen: La siembra inicial del inóculo (I) se realiza en el laboratorio en condiciones de asepsia completa para iniciar el proceso con un cultivo puro. Varias propagaciones posteriores en biorreactores de mayor capacidad (B1 a B4) se realizan en condiciones de aeración controlada (A1) y con todos los nutrientes presentes. La "crema" (S1) se obtiene por centrifugación y lavado, se almacena en un tanque a bajas temperaturas para su posterior siembra en el bioreactor de mayor volumen (B5) del cual se obtendrá la biomasa total. La etapa posterior implica el control preciso de la velocidad de alimentación de las melazas (M), de la temperatura, del pH y de la aeración para la obtención de la "pasta" de levadura (S2). Esta pasta se deshidrata en un secador de tambor rotatorio (D) y, posteriormente, se pasa a un extrusor (EX) para dar lugar a partículas que se secan en un secador tipo "lecho fluidificado" (SLF). Por último, se empacan (EM) al vacío (Burrows, 1970; Zobel, 1996).

Se han realizado diversas investigaciones en el campo de la biología molecular con el fin de mejorar la velocidad de crecimiento, la resistencia al secado, al frío, entre otras características de las levaduras de panificación (Argüelles, 2000; Singer y Lindquist, 1998).

El proceso de deshidratación provoca alteraciones funcionales y estructurales en la célula. En las membranas tales daños se caracterizan por una pérdida de la permeabilidad, por transiciones de fase, fusión y salida de contenido citoplásmico y en proteínas por modificaciones estructurales y pérdida de la actividad enzimática (Crowe et al., 1985, 1987a, 1987b, 1987c, 1998; Crowe y Crowe, 1988; Diniz-Mendes et al., 1999; Lodato et al., 1999; Quintilio et al., 2000; Swan y Watson, 1999).

5.7. SECADO DE LAS LEVADURAS PARA PANIFICACIÓN

El secado de las levaduras implica su estabilización durante su vida de anaquel, así como la conservación de su capacidad fermentativa y de su viabilidad (Beker y Rapoport, 1987; Plourde-Owobi et al., 2000; Zobel, 1996).

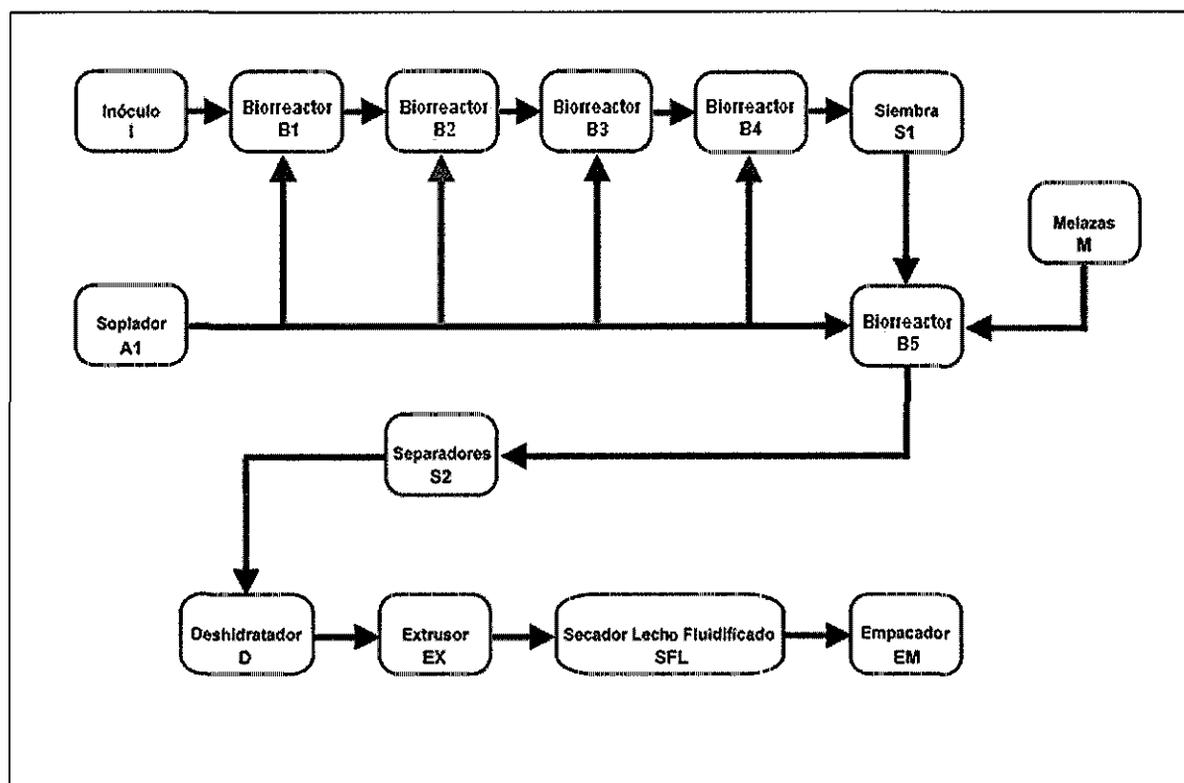
La calidad de un producto deshidratado depende, en gran parte, de la operación de secado. En particular, en los microorganismos, la preservación de las membranas y de las proteínas es importante en el mantenimiento de sus propiedades funcionales (Argüelles, 2000; Beker y Rapoport, 1987; Burrows, 1970; Cerrutti et al., 2000; Crowe et al., 1987a, 1998).

La estabilización de biomateriales por la incorporación de sustancias antes del secado es un procedimiento bastante aplicado en la industria (Jones, 1995a; Zobel, 1996).

La deshidratación de cualquier sólido consiste en una transferencia simultánea de energía (en forma de calor) del entorno y de masa (humedad) desde el sólido. El agua se remueve del sólido usando aire caliente en movimiento; este aire cumple así una doble función, actúa como el medio de transferencia de calor y como agente transportador de la humedad una vez evaporada (Belter et al., 1988; Mujumdar, 1987).

Dado que en la superficie se produce evaporación, en el sólido los gradientes de actividad de agua y de temperatura provocan el desplazamiento del agua desde el interior hasta la superficie (Geankoplis, 1988; Mujumdar, 1987).

Figura 1. Obtención industrial de las levaduras secas activas.
(Adaptado de Fleischmann Colombiana Inc 1992)



5.8. DANOS POR DESHIDRATACION

Uno de los primeros trabajos en indicar los daños causados por el secado en las membranas de las levaduras secas fue el de Herrera et al. (1956). En el CUADRO 2 se señalan las diferencias cuantitativas en la salida de compuestos celulares durante la rehidratación. Se observa la mayor salida del 40% aproximadamente en las levaduras rehidratadas a una temperatura baja de 4.5°C. Herrera y sus colaboradores propusieron que las membranas de las levaduras secas presentarían discontinuidades por donde se sale el contenido celular. Trabajos más recientes han confirmado el deterioro de los fosfolípidos membranales de la levadura de panificación durante el secado (Dickson et al., 1997; Lodato et al., 1999; Swan y Watson, 1999).

El papel de las membranas plasmáticas como una de las estructuras “blanco” en células expuestas a altas temperaturas ha sido extensamente estudiado. En particular, se ha enfocado la función de los lípidos membranales y la fluidez en la tolerancia térmica de diferentes microorganismos (Bhattacharya y Saubhick, 2000; Sujatha y Mishra, 1997; Yon et al., 1998).

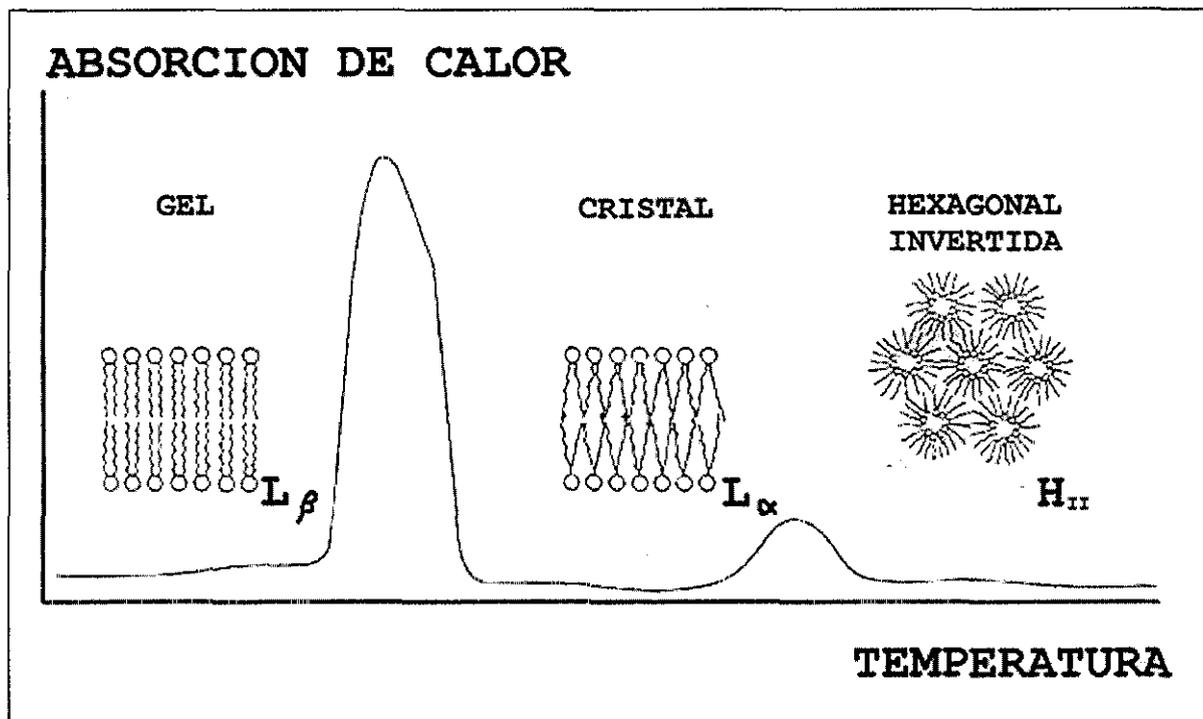
CUADRO 2. Composición de los medios de rehidratación de dos lotes de levaduras rehidratadas a diferentes temperaturas (Adaptado de Herrera et al., 1956)

ANÁLISIS	MUESTRA X		MUESTRA Y	
T de rehidratación en °C	4.5	43.0	4.5	43.0
Contenido total de compuestos intracelulares hallados en el medio de rehidratación (mg/g de levadura)	253.7	62.2	235.5	96.1

Normalmente, los fosfolípidos de cualquier membrana se mantienen en una configuración de bicapa por interacciones tanto hidrofóbicas como hidrofílicas. En ausencia de agua y por efecto de la temperatura tales interacciones son minimizadas y ocurren separaciones y transiciones de fase importantes, dando lugar a estructuras lipídicas diferentes a las de bicapa, siendo la más conocida la fase hexagonal II. Se ha encontrado que la trealosa impide tales alteraciones en la integridad de la membrana (Argüelles, 2000; Crowe et al., 1984a, 1985, 1998; Singer y Lindquist, 1998; Swan y Watson, 1997).

En la Figura 2 se aprecian las diferentes configuraciones que pueden presentar las bicapas lipídicas y que mediante experimentos de microcalorimetría se pueden detectar los flujos de calor asociados a ellas. La fase gel que se caracteriza por presentar sus cadenas hidrofóbicas completamente extendidas y empaçadas ordenadamente y cuya movilidad es restringida. En la fase cristal líquido, la movilidad de las cadenas hidrofóbicas es superior, mientras que su longitud es reducida. La fase hexagonal invertida, que consiste en arreglos hexagonales de cilindros lipídicos que presentan en su interior las cabezas polares mientras que las colas hidrofóbicas se extienden radialmente (Hazel y Williams, 1990).

Figura 2. Diferentes configuraciones de bicapas lipídicas hidratadas (Adaptado de Crowe y Crowe, 1988)



Se conocen también alteraciones en el funcionamiento de las enzimas de las levaduras secas. Es conocida la pérdida de la conformación nativa y la agregación de proteínas desnaturalizadas expuestas a temperaturas extremas (Anchordoquy et al., 2001; Crowe et al., 1998; Fagundas-Felix et al., 1999; Sampedro et al., 1998, 2001; Singer y Lindquist, 1998; Sola-Penna, 1997, Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1998;)

Las levaduras como organismos anhidrobióticos pueden resistir una deshidratación casi total presentando entre sus características bioquímicas una gran acumulación de trealosa principalmente (Argüelles, 2000; Cardona et al., 1997; Crowe et al., 1997, 1998, 2001; Gadd et al., 1987; Singer y Lindquist, 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.9. LA TREALOSA Y LA DESHIDRATACION

Se ha demostrado que la trealosa intracelular a concentraciones superiores al 15% en peso seco, ejerce un efecto protector en levaduras sometidas a condiciones extremas como son la deshidratación, congelación y calor. Los mecanismos moleculares que relacionan la concentración interna de trealosa con la resistencia celular a tales condiciones no se han aclarado (Cerruti et al., 2000; Crowe et al., 1987b, Crowe y Crowe, 1998; Diniz-Mendes et al., 2000; Lewis et al., 1994, 1996; Lodato et al., 1999).

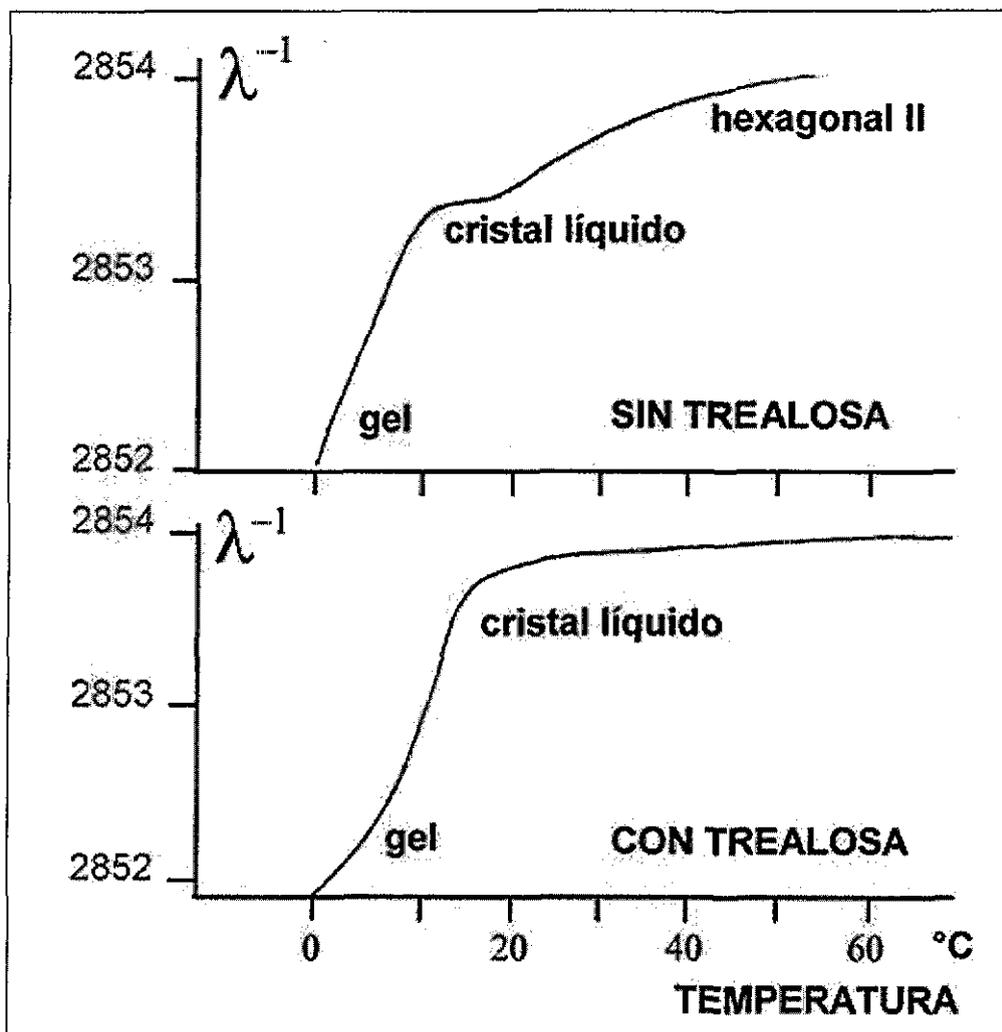
Las propiedades físicas únicas de la trealosa tales como una altísima hidrofilicidad, una estabilidad química, la formación de cristales no higroscópicos, la ausencia de formación de puentes internos de hidrógeno y una elevada temperatura de transición al estado vítreo (CUADRO 5, p. 29) pueden explicar su eficacia como protector de biomateriales (Argüelles, 2000; Crowe et al., 1997, 1998; Plourde-Owobi et al., 2000; Wendell y Davidson, 1998).

El mecanismo por el cual la trealosa ejerce su efecto protector radica en el establecimiento de puentes de hidrógeno entre sus grupos OH⁻ y los OH⁻ de las cabezas polares. El empaquetamiento de los lípidos queda así asegurado y las porciones hidrofóbicas se mantienen en contacto. La conservación de un estado de bicapa y de la fase de cristal líquido se logra con la trealosa. En la Figura 3 se aprecia que una bicapa deshidratada en presencia de trealosa se mantiene en la fase de cristal líquido aún a temperaturas entre 50 y 60 °C en las que se presenta normalmente la fase hexagonal II (Argüelles, 2000; Crowe et al., 1984b, 1987a, 1997, Crowe et al., 1998; Hinch y Crowe, 1998; Leslie et al., 1994; Sales et al., 2000; Sano et al., 1999; Singer y Lindquist, 1998).

En la Figura 4 se puede apreciar la explicación física de la acción protectora de la trealosa que se ha denominado “reemplazamiento del agua” (Argüelles, 2000; Crowe et al., 1990; 1998; 2001; Rapoport et al., 1997). Según esta hipótesis, la trealosa reemplaza las moléculas de agua unidas a la superficie de la membrana de tal forma que las propiedades físicas de los lípidos deshidratados permanecen similares a las de los lípidos hidratados. De esta forma, la trealosa afectaría fuertemente el comportamiento térmico de los lípidos “anhidrobióticos”. Crowe y sus colaboradores (1987a) han demostrado que vesículas de dipalmitoilfosfatidilcolina, DPFC (DPPC) mezcladas con trealosa muestran fuertes disminuciones en la temperatura de fusión al ser liofilizadas con cantidades crecientes de trealosa. De acuerdo con la hipótesis del “reemplazamiento del agua”, el comportamiento de las vesículas deshidratadas sería similar al de las hidratadas (Cerruti et al., 1999; Crowe et al., 1998, 2001; Singer y Lindquist, 1998; Swan y Watson, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

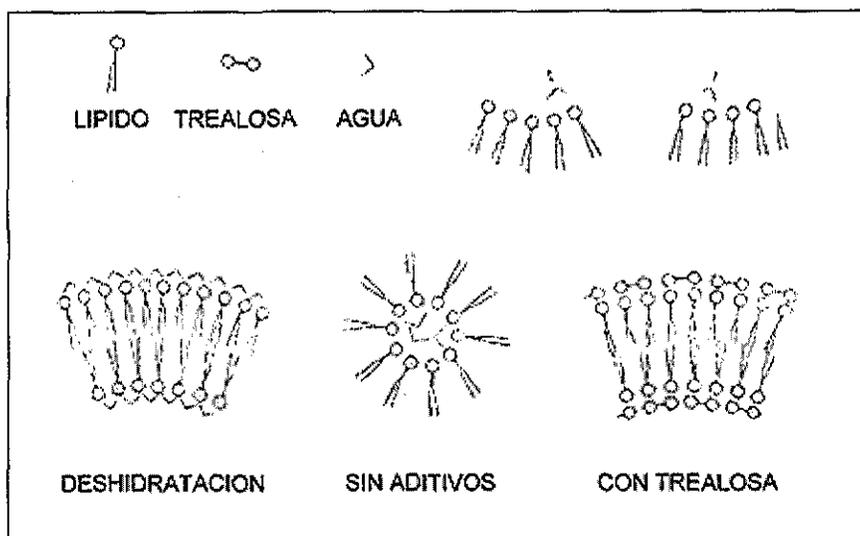
Figura 3. Efectos de la trealosa en las Tm de bicapas
(Adaptado de Crowe et al., 1987c)



Respecto a las levaduras de panificación, son varios los trabajos que han reportado la importancia de trealosa adicionada externamente. La presencia de la trealosa en las dos caras de la membrana plasmática confiere una mayor protección durante el secado (Cerrutti et al., 2000; Crowe et al., 1985, 1987a, 1990; De Araujo et al., 1996; Diniz-Mendes et al., 1999;).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Mecanismo propuesto por el cual la trealosa estabiliza a los liposomas (Adaptado de Crowe et al., 1985; 1987b)

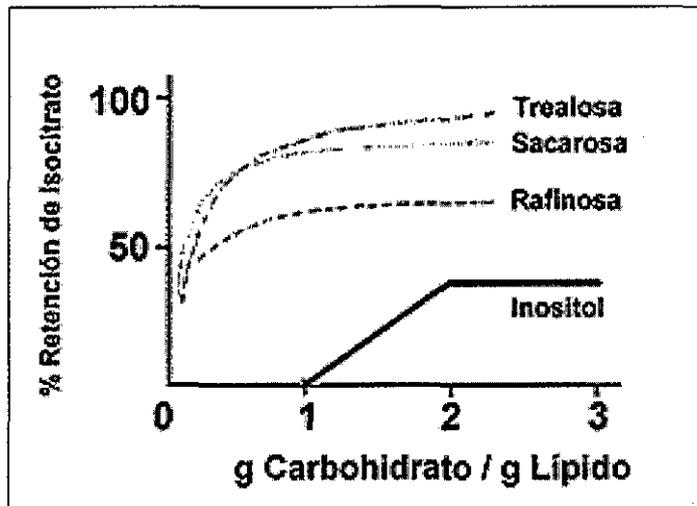


Se han ensayado otros azúcares en la preservación de las membranas; entre ellos la sacarosa ha mostrado, después de la trealosa, un buen efecto protector al disminuir la fusión de liposomas y la pérdida de su contenido (Argüelles, 2000; Crowe et al., 1984a y 1985; Lodato et al., 1999; Quintilio et al., 2000; Sun y Davidson, 1998).

En la Figura 5 se muestran las diferentes capacidades de retención del isocitrato en vesículas de dipalmitoilfosfatidilcolina, DPFC (DPPC) secadas en presencia de trealosa, sacarosa, rafinosa e inositol. Después de la trealosa, la mayor retención de isocitrato se observó en las vesículas secadas con sacarosa. Una menor retención se obtuvo con la rafinosa y el inositol respectivamente. No se ha aclarado aún el mecanismo por el cual la trealosa es más efectiva que la sacarosa y los demás azúcares. Se han comparado el número de grupos OH⁻ ecuatoriales disponibles y la estructura cristalina de algunos carbohidratos, sin encontrar correlación con su efectividad. Un punto de vista alternativo ha sido propuesto recientemente basado en la formación de cristales en estado seco por disacáridos como la sacarosa y la trealosa. La evidencia indica que la trealosa posee la más alta temperatura de transición a cristal (Argüelles, 2000; Crowe et al., 1985, 1987a, Crowe y Crowe, 1988; Fujii et al., 1996; Krallish et al., 1997; Quintilio et al., 2000; Sola-Penna et al., 1997, 1998)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Retención de un soluto en vesículas liofilizadas en presencia de varios azúcares (Crowe et al., 1987a)



Trabajos recientes en levaduras indican que la trealosa preserva las proteínas expuestas a altas temperaturas manteniendo su conformación nativa y evitando la agregación de las ya desnaturalizadas. (Argüelles, 2000; Crowe et al., 1998; Sampedro et al., 1998, 2001; Singer y Lindquist., 1998).

Otra respuesta de los microorganismos expuestos a temperaturas extremas del medio consiste en la modificación de sus lípidos membranales. Experimentos efectuados con este propósito han demostrado que las células de *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* incorporan a sus membranas, lípidos suplementados al medio, como respuesta al choque (Alexandre et al., 1998; Sujatha y Mishra, 1997; Yatvin, 1977; Yon et al., 1998).

5.10. LOS ÁCIDOS GRASOS Y LA TOLERANCIA AL CALOR

La temperatura influye sobre la fisiología de los organismos en dos formas: Determina la velocidad de las reacciones químicas y modula el equilibrio entre la formación y la ruptura de las interacciones no covalentes que estabilizan las estructuras biológicas. Dados los numerosos procesos asociados a membrana que son vitales para el funcionamiento celular, las fluctuaciones de temperatura presentan un reto profundo para el mantenimiento de la fisiología activa (Hazel y Williams, 1990; Sujatha y Mishra, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

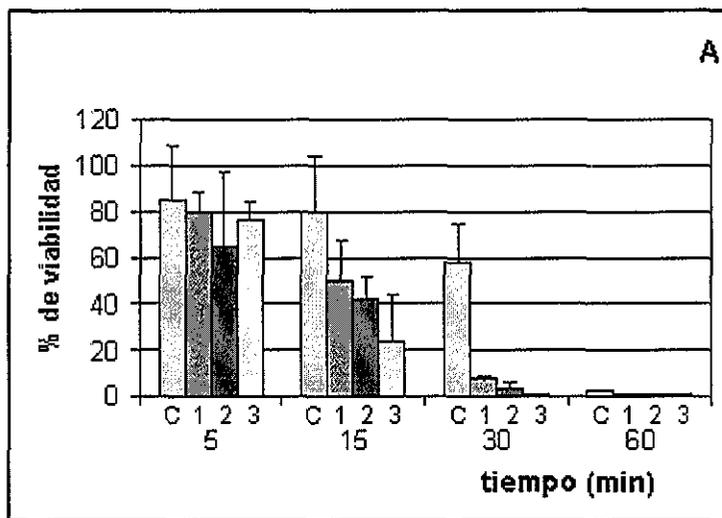
Los fosfolípidos son muy sensibles a los cambios en el medio ambiente como temperatura, presión, actividad de agua y dado su carácter polimórfico desarrollan un comportamiento de fase complejo con diferentes propiedades físicas. La organización de la membrana es drásticamente alterada por las transiciones de estado de los fosfolípidos (Hazel y Williams, 1990; Swan y Watson, 1997, 1998).

Los estudios preliminares sobre la incorporación de ácidos grasos a células fueron realizados por Sinensky et al., (1974). Se denomina "Adaptación Homeoviscosa" al mecanismo por medio del cual las células pueden modificar su fluidez membranal para mantener un óptimo funcionamiento celular. La introducción de un doble enlace *cis* en la cadena acílica tiene un efecto pronunciado, tanto en la forma molecular como las propiedades físicas de un fosfolípido. A causa de la restricción en la rotación del enlace C=C, se introduce un ángulo 30° en la cadena acílica. Consecuentemente, los ácidos grasos insaturados adoptan una conformación más expandida ocupando áreas mayores en la película monomolecular, produciendo un empaquetamiento menos compacto y conllevando un punto de fusión inferior a los de sus homólogos saturados. La sustitución de un ácido graso saturado por un ácido graso insaturado aumenta así el volumen total de la cadena de hidrocarburos, además de incrementar la magnitud del parámetro de empaquetamiento (Fujii et al., 1996; Hazel y Williams, 1990).

En microorganismos por lo general, las altas temperaturas del medio ambiente producen un incremento en el grado de saturación de las membranas (Hazel y Williams, 1990; Swan y Watson, 1997, 1998).

Los trabajos de Overath et al (1970) con *E. coli* mostraron que las células enriquecidas con ácido oleico (C_{18:1}) fueron capaces de crecer a temperaturas superiores a 45°C. Experimentos posteriores con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* autótrofa deficiente en su función enzimática de transformar los dobles enlaces en enlaces simples (KD115) también indicaron que las células enriquecidas con el ácido oleico eran más termorresistentes que células suplementadas con ácidos linoleico (C_{18:2}) y linolénico (C_{18:3}) (Figura 6).

Figura 6. Tolerancia térmica intrínseca medida como viabilidad en células *Saccharomyces cerevisiae* crecidas en medio suplementado con ácidos grasos poliinsaturados (Overath et al., 1970)



El porcentaje de viabilidad de células crecidas a 25°C y que posteriormente fueron expuestas a una temperatura de 45°C durante 60 minutos, fue un indicador de la tolerancia térmica intrínseca. Control (cepa S288C silvestre): C; KD115 suplementada con ácido oleico: 1, KD115 suplementada con ácido linoleico: 2 y KD115 suplementadas con ácido linolénico: 3.

La mayor tolerancia térmica intrínseca se observó durante todo el experimento en las levaduras control (C). Las levaduras KD115 enriquecidas con ácido oleico mostraron una viabilidad levemente inferior (80%) respecto a la del control (84%) en los primeros cinco minutos. Sin embargo, con el tiempo la tolerancia térmica disminuyó fuertemente en las células suplementadas (a los quince minutos la viabilidad de KD115 suplementada con ácido oleico fue de 50%, KD115 con ácido linoléico 42% y KD115 con ácido linolénico 23%).

CUADRO 3. Composición de los fosfolípidos de *Saccharomyces cerevisiae* crecida en medios suplementados con ácidos grasos (Adaptado de Lewis et al., 1994)

Cepa	Ácidos grasos suplementados	Composición del ácido graso (% del total)						
		C _{16:0}	C _{18:0}	C _{14:1}	C _{16:1}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
S288 C	----	21±1	2±0.5	1±0	53±2	16±2	-	-
KD1 15	Ácido oleico	28±1	2±0.5	4±1	23±1.5	30±3	1±0	-
KD1 15	Ácido linoleico	30±2	3±0	-	4±2	5±2	54±6	-
KD1 15	Ácido linolénico	30±2	4±1	-	2±0	2±1	-	58±1.5

En el CUADRO 3 se observa la composición lipídica membranal de la cepa nativa S288C, donde se encuentran los principales lípidos sintetizados por *Saccharomyces cerevisiae* entre ellos C_{16:0} (21%) C_{16:1} (53%); C_{18:1} (16%) y C_{18:0}. Las cepas KD115 crecidas en medio enriquecidos con ácido oleico, linoleico y linolénico produjeron cambios dramáticos en sus composiciones lipídicas de membrana. Los ácidos grasos poliinsaturados no son sintetizados por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y se observó que la tolerancia al choque disminuía con una mayor insaturación membranal (Dickson et al., 1997; Hazel y Williams, 1990; Steels et al., 1994; Swan y Watson, 1997, 1998; Yon et al., 1998).

5.11. CARACTERÍSTICAS DE LOS AGENTES TENSOACTIVOS

En la industria de las levaduras, los llamados “detergentes” se usan como agentes tensoactivos y modifican las características de hidratación de estructuras que presentan en su superficie un alto valor de energía libre (Gould, 1996; Jones, 1999; Zobel, 1996). Uno de los agentes tenso activos más empleados en la industria es el mono-oleato de sorbitán, conocido comercialmente como «Tween 80».

La clasificación de los agentes tensoactivos o “surfactantes” (por las palabras en inglés surface active agents), se ha establecido con base en la carga y naturaleza de la porción hidrofílica (cabeza polar) y la flexibilidad y naturaleza química de la porción hidrofóbica. En soluciones acuosas las moléculas del agente tensoactivo se encuentran en forma de monómeros o micelas. Las micelas son agregadas compactos monodispersos que se forman en el agua donde la parte apolar se encuentra en el centro y la porción polar en la superficie. En bajas concentraciones de este agente sólo existen monómeros, dímeros o trímeros, mientras que en altas concentraciones se presentan varias formas de equilibrio (Bhattacharya y Saubhik, 2000; Jones, 1999).

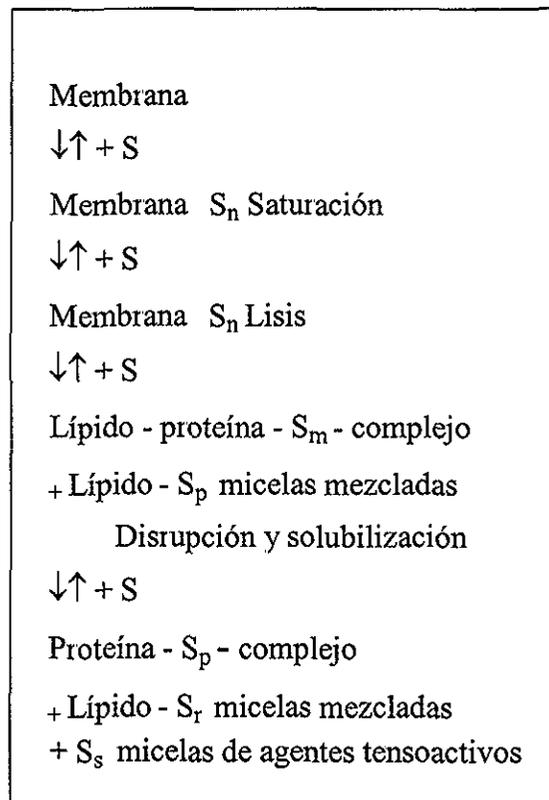
El número de balance hidrófilo-lipófilo conocido con sus siglas en inglés como (HLB) es una característica general de los agentes no iónicos y también es una expresión directa del carácter hidrofílico de un agente tensoactivo. Un alto BLH indica un mayor grado hidrofílico del compuesto y viceversa (Gould, 1996; Jones, 1999).

En general, la cantidad de detergente a usar para un efecto dado, depende de la concentración micelar crítica (CMC), del tamaño de la micela, de la temperatura, de la naturaleza de la membrana y del tipo de agente (Jones, 1999; Zobel 1996).

La adsorción del agente tensoactivo y su grado de reversibilidad dependen fuertemente de la polaridad y carga de la superficie, la carga de los iones, el pH y la fuerza iónica, el grado de hidratación de la superficie, etc. (Dickson et al., 1997; Sujatha y Mishra, 1997; Yon et al., 1998).

La concentración micelar crítica (CMC) es un parámetro útil para describir la formación de micelas. La CMC se reduce al aumentar el tamaño de la micela o por una reducción en tamaño y polaridad de las cabezas polares. El detergente en exceso induce complejos solubles proteína-detergente, micelas de lípidos y detergente mezclados (Dickson et al., 1997; Jones, 1999) (Figura 7).

Figura 7. Interacción entre un agente tensoactivo y una membrana
(Adaptado de Gould, 1996)



La adsorción de un agente tensoactivo provoca cambios en la fluidez por el incremento en el grado de saturación del lípido, modifica la interacción inter-celular (Bhattacharya y Saubhick, 2000; Gould, 1996; Sujata y Mishra, 1997) al repercutir sus efectos sobre la permeabilidad (Yon et al., 1998).

La fluidez de la membrana es un término muy útil para describir el movimiento de sus diferentes constituyentes lipídicos (difusión lateral y rotacional). Específicamente se relaciona con el grado de orden o desorden de las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos (Bhattacharya y Saubhick, 2000; Crowe y Crowe, 1988; Dickson et al., 1997; Gross y Watson, 1996; Hazel, 1995; Suutari et al., 1990; Yon et al., 1998):

Tanto la temperatura como los carbohidratos y, recientemente, los agentes tensoactivos han sido los factores más explorados en este campo. El aporte de este trabajo radica en emplear la mezcla de dos agentes protectores (carbohidrato-detergente) para la preservación de la funcionalidad de las levaduras secas para panificación, durante el secado y la rehidratación y correlacionar sus efectos.

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1. MATERIALES

6.1.1. PASTA DE LEVADURA

La planta industrial Safmex S.A. de Toluca donó la pasta de levadura. Las ventajas de usar esta pasta consistieron en su facilidad de obtención en cantidades de 500 gramos a 1 kilogramo, necesarias para cada experimento de secado y la disponibilidad de un material producido en condiciones controladas. Dos veces al mes, se solicitaba la pasta de levadura (fresca) y a su llegada se almacenaba en el refrigerador, por un tiempo que no excedió en ningún caso 48 horas. Posteriormente, se realizaba la adición de compuestos a la pasta, su extrusión, cortado (cilindros de 3mm de largo, 1mm de diámetro) y secado. Después del secado, se procedía al empacado de las levaduras en ampollitas de vidrio selladas con llama. Finalmente, las ampollitas de levaduras se llevaban a un laboratorio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, donde posteriormente se efectuaron las pruebas bioquímicas. Estas pruebas bioquímicas de cada lote de levaduras con sus concentraciones respectivas de aditivos se realizaron por duplicado repitiéndose 3 veces por lote.

6.1.2. TREALOSA, SACAROSA, MONO-OLEATO DE SORBITÁN («TWEEN 80»)

Los diversos aditivos adicionados a la pasta se presentan en los CUADROS 5 y 6. Algunas de las características de los agentes tensoactivos están enunciadas en el CUADRO 6. La trealosa, la sacarosa y el «Tween 80» son de la marca SIGMA, calidad analítica.

6.2. TRATAMIENTO DE PRESECCADO

6.2.1. MEZCLADO Y EXTRUSIÓN

Con el fin de obtener una distribución homogénea de los aditivos y la pasta, se realizó un mezclado manual de lotes de 500 gramos en un recipiente de acero inoxidable durante 5 minutos. A la pasta de levadura se le agregaron los siguientes aditivos: El detergente en concentraciones de 0.5 a 2% respecto al peso de la pasta (Lis et al, 1990) y el carbohidrato en las concentraciones siguientes: 0.5 a 0.75% respecto al peso de la pasta de levadura (Crowe et al., 1987,a,b,c; Cuber et al., 1997; Gadd et al., 1987; 1985; Murray y Liang, 1999, 2000;). Posteriormente, las pastas con aditivos y control se extrudieron en un equipo manual cuya boquilla presentaba orificios de 1 mm y se cortaron con una espátula para obtener partículas de las dimensiones ya señaladas.

6.2.2. SECADO

El inicio de este proyecto estuvo dirigido a encontrar las condiciones de secado más adecuadas para la deshidratación de la pasta de levadura con el fin de obtener una funcionalidad celular post-secado comparable a la de las levaduras secadas industrialmente. Las condiciones de secado propuestas se presentan en el CUADRO 4 y se seleccionaron para obtener una levadura con una humedad final entre 5 y 7% de acuerdo a lo mencionado en la sección 5.5 y a lo reportado por la literatura (Beker y Rapoport, 1990; Burrows, 1970; Saravacos y Charm, 1962a, 1962b).

CUADRO 4. Condiciones ensayadas para secar la pasta de levadura

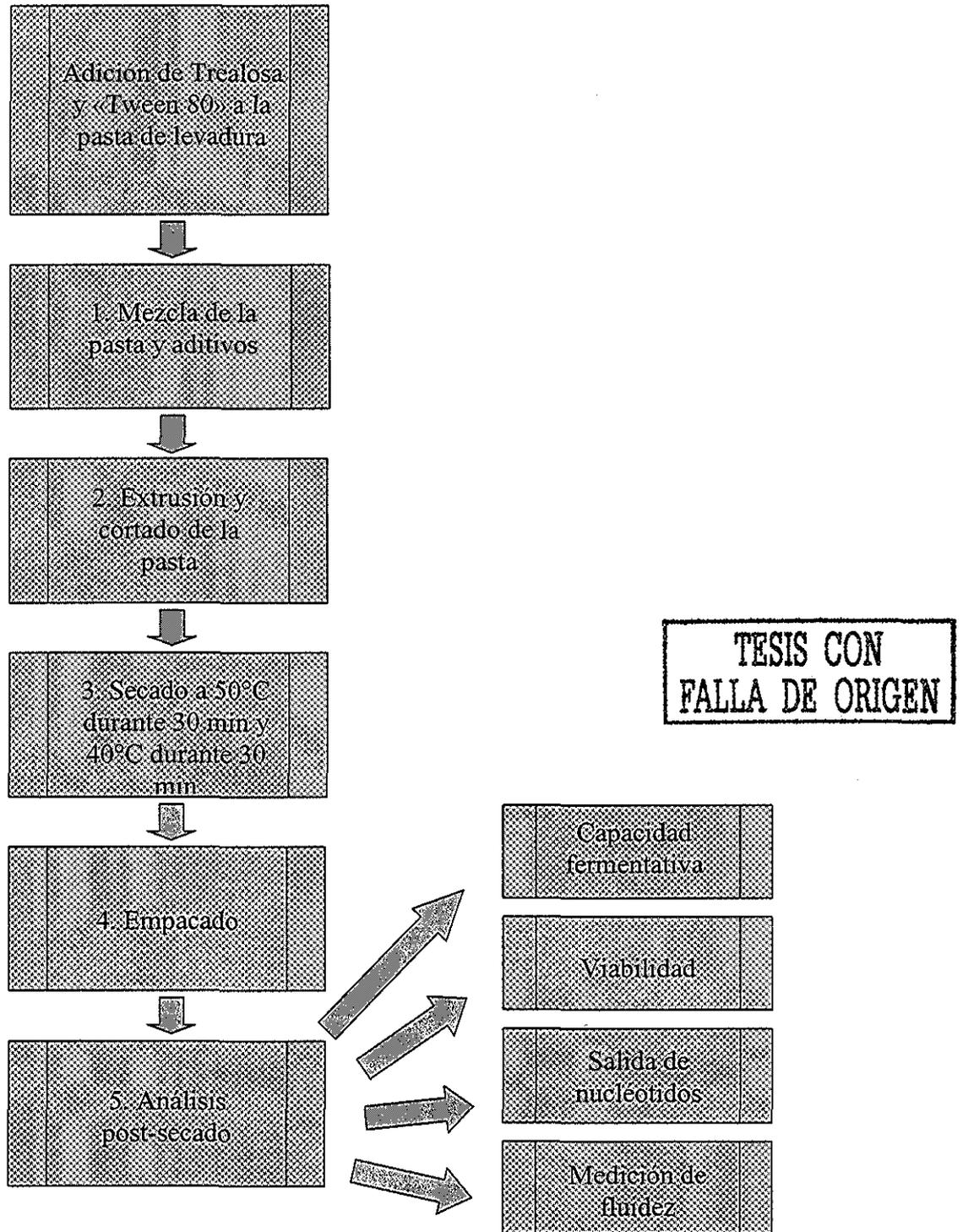
Lote núm.	Condiciones de secado
C=1 Levaduras Safmex	30 min, a 70°C
	30 min, a 45°C
	Condiciones de secado industrial
4	60 min, a 50°C
3	30 min, a 60°C
	30 min, a 40°C
2	30 min, a 50°C
	20 min, a 40°C
5	30 min, a 50°C
	30 min, a 40°C

Las principales características del secador de lecho fluidificado utilizado han sido descritas previamente en Vásquez, L (1985). El secado ocurre por el contacto de las partículas de levadura con la corriente de aire caliente. La temperatura del aire de secado (temperatura de bulbo seco) se determinó con un termoanemómetro digital. La velocidad del aire fue seleccionada de tal manera de lograr una fluidificación adecuada sin riesgo de colapsar el lecho o de arrastrar las partículas. Se estableció el contenido de humedad de las muestras al inicio del experimento por medio de estufa (Método de la AOAC 32. 1. 02, 1995). Las cinéticas de secado se calcularon a partir de las diferencias de peso desde el inicio del secado y conociendo la humedad inicial de las muestras.

La evaluación de las condiciones de secado más adecuadas se realizó mediante el análisis de las respuestas celulares a las siguientes pruebas bioquímicas: Capacidad fermentativa, salida de nucleótidos que absorben a 260 nm y la viabilidad. Los resultados de las levaduras secadas experimentalmente comparados con los resultados de las levaduras secadas industrialmente (control) en las pruebas bioquímicas indicarían una conservación

estructural y funcional de la membrana bajo las condiciones experimentales de secado. Las mismas pruebas, pero con las levaduras mezcladas con los aditivos y secadas en las condiciones experimentales, señalarían cuál mezcla de aditivos ejerció el mejor efecto protector sobre la integridad celular. En la Figura 8 se muestra un diagrama de todo el proceso.

Figura 8 Esquema del trabajo experimental



6.3. TRATAMIENTO DE POST-SECADO

Los resultados de las funciones celulares señaladas a continuación se realizaron por triplicado para cada lote de levaduras secadas y rehidratadas.

6.3.1. REHIDRATACIÓN

100 mg de partículas de levadura se colocan en un tubo de ensayo que se lleva por 5 minutos a un baño de agua a 40°C de temperatura. Al mismo tiempo, 5 mL de solución amortiguadora MES-TEA, 20mM, pH: 6.0 fueron vertidos en otro tubo de ensayo y colocados durante 5 minutos en el baño a la misma temperatura. Esta solución pasados los 5 minutos, es agregada al tubo de las levaduras y este último es agitado suavemente en un agitador para luego dejarlo en incubación por 5 minutos más y pasarlo posteriormente a un baño de hielo.

6.3.2. DETERMINACIÓN DE LA SALIDA DE NUCLEÓTIDOS

El sobrenadante de la rehidratación y de 100 mg de levaduras en 5 mL de solución amortiguadora de MES-TEA, 20mM, pH: 6.0 durante 5 minutos a 40°C se diluye en una proporción de 1:10 con agua y se lee en el espectrofotómetro a 260 nm para cuantificar los nucleótidos presentes en el agua de rehidratación, de acuerdo con la técnica descrita por Layne (1957).

6.3.3. CAPACIDAD FERMENTATIVA DE LAS LEVADURAS REHIDRATADAS

Se usan las levaduras rehidratadas y metabólicamente activas y se procede tomando el sobrenadante de la rehidratación para la determinación de etanol según Bonnichsen (1965). El etanol presente en la muestra se oxida en presencia de NAD^+ por la ADH hasta acetaldehído, el cual es atrapado por la semicarbazida para evitar que la reacción sea reversible.

6.3.4. PRUEBA DE VIABILIDAD

A las levaduras rehidratadas y centrifugadas se les realizó la prueba de tinción con azul de bromofenol descrita por Borst-Pauwels y Dobelmann (1972). El porcentaje de células vivas no teñidas observadas al microscopio sobre la cantidad total de células (teñidas y no teñidas) indica el índice de viabilidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.3.5. TRATAMIENTO DE ENVEJECIMIENTO

Con el fin de acelerar el decaimiento de su poder fermentativo, las levaduras secas son almacenadas a 37-38°C durante 2 semanas (Vallée y Read, 1989). Esta prueba se realizó para determinar si los efectos de los aditivos se mantenían a mediano plazo.

6.3.6. ANISOTROPÍA MEDIDA POR LUZ FLUORESCENTE POLARIZADA

La anisotropía del difenilhexatrieno DFH (DPH por sus siglas en inglés), medida mediante luz fluorescente polarizada es una medida de la fluidez (mayor o menor orden) en la porción hidrofóbica de la membrana. Los experimentos de anisotropía se efectuaron de acuerdo con la técnica descrita por Davenport et al. (1981) en un fluorómetro de marca SLM Instruments, Inc., EEUA.

Para realizar los experimentos de polarización se aislaron las membranas plasmáticas de las levaduras secas.

6.3.7. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS

Las membranas de la levadura fueron aisladas mediante gradientes de sacarosa según la técnica descrita por Serrano (1988).

La anisotropía se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Pottel et al. (1983) y se calculó con la ecuación de Perrin:

$$\text{Anisotropía fluorescente} = \frac{I_{pp} - I_{pN}}{I_{pp} + 2I_{pN}}$$

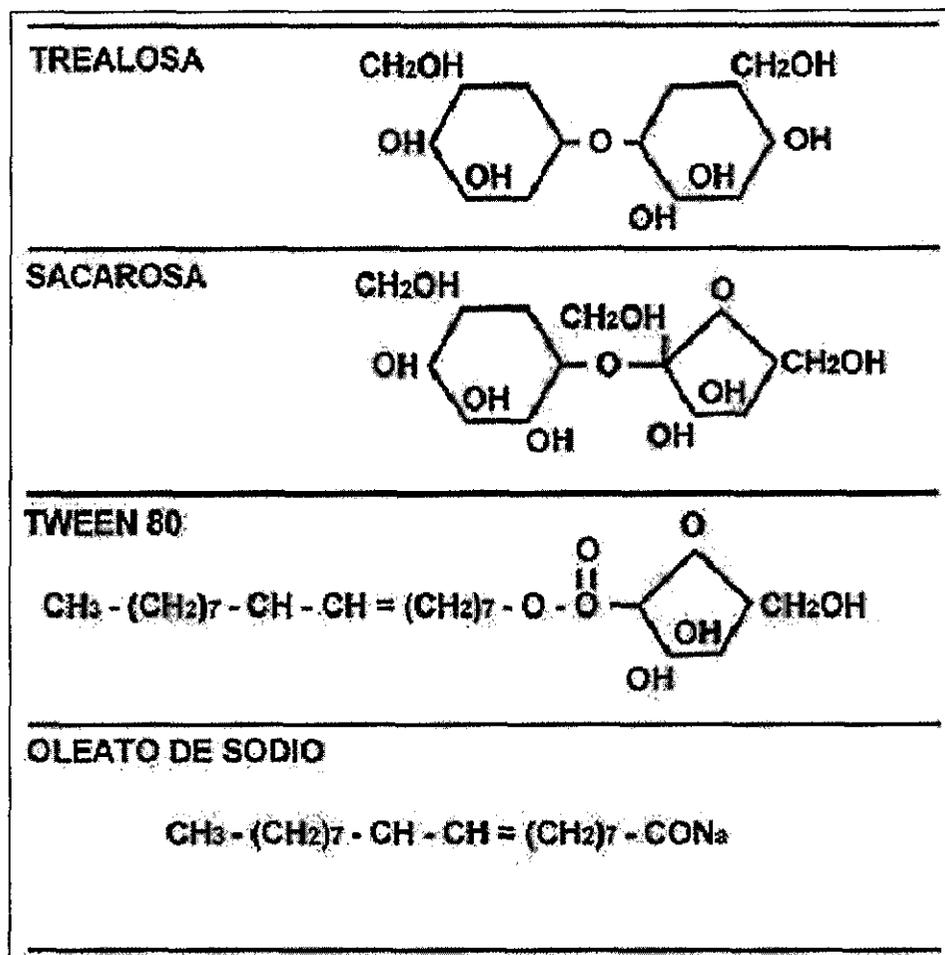
donde I_{pp} es la intensidad paralela e I_{pN} : es la intensidad perpendicular.

6.4. FOTOGRAFÍAS DE LEVADURAS EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

Las muestras de las levaduras control como de las levaduras tratadas fueron llevadas al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM donde se realizaron las fotografías al microscopio electrónico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUADRO 5. Estructura de los aditivos usados
(Sigma-Aldrich, 1997, 2002, 2003)



CUADRO 6. Características del detergente usado
(Sigma-Aldrich, 1997)

NOMBRE COMERCIAL	CMC (milimoles/L)	BLH (HBL)
Mono oleato de sorbitán («Tween 80»)	1.2	15.0

CMC: Concentración micelar crítica

BLH (HLB): Balance lipo-hidrofílico

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SECADO DE LA PASTA

Durante el secado, con la eliminación del agua la integridad celular se modifica y, particularmente, la configuración de la bicapa lipídica así como la estructura de las proteínas presentan daños en su estructura. En el Cuadro 7 se presentan las condiciones ensayadas para secar las partículas de levadura y sus humedades finales.

CUADRO 7. Condiciones ensayadas para secar la pasta de levadura

Lote núm.	Condiciones de secado	% Humedad final
C=1 Levaduras Safmex	30 min, a 70°C 30 min, a 45°C Condiciones de secado industrial	3.40
4	50 min, a 60°C	5.95
3	30 min, a 60°C 30 min, a 40°C	5.76
2	30 min, a 60°C 20 min, a 40°C	5.25
5	30 min, a 50°C 30 min, a 40°C	6.80

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

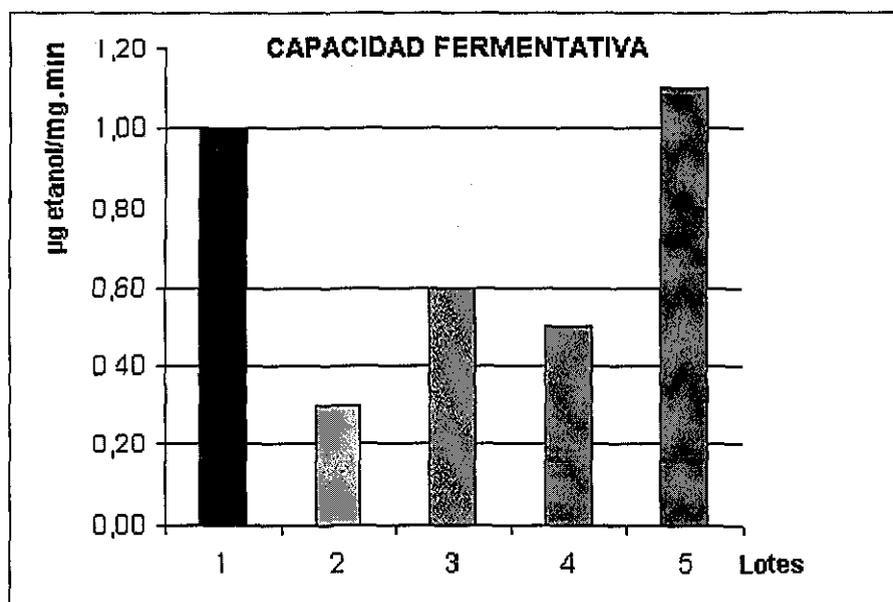
En el lote 4, se manejó una temperatura de 50°C durante todo el secado. Se pensó que al trabajar con una temperatura menos agresiva que la temperatura reportada (70°C) durante un menor tiempo de operación se podrían obtener unas levaduras de mejor calidad. Sin embargo los resultados de las funciones celulares no confirmaron esta hipótesis. Al parecer, 50°C es una temperatura alta hacia el final de secado.

En los lotes 3 y 2 se manejó una temperatura de 60°C, durante los primeros 30 minutos y una temperatura de 40°C en los 30 y 20 minutos finales respectivos hasta alcanzar la humedad final deseada. Con base en la literatura (Beker y Rapoport, 1987; Saravacos, 1962a, b) se exploró ese intervalo de temperaturas durante la primera etapa pero por los resultados obtenidos en las funciones celulares, se cree que esas condiciones de tiempo y temperatura no fueron las adecuadas. Posiblemente una exposición prolongada a esta temperatura en la primera etapa provocó daños en estructura celular.

En el lote 5 se trabajó con los mismos 50°C durante 30 minutos iniciales y una temperatura de 40°C durante 30 minutos finales. Los resultados del lote 5 obtenidos de las funciones celulares fueron los más altos y, por consiguiente, se concluyó que las condiciones de este lote eran las mejores para secar la pasta de levadura. Parece ser que, a la temperatura de 40°C, durante la etapa final, se producen menos efectos dañinos a nivel celular. Una hipótesis que puede derivarse de estos resultados es que, cuando se manejan temperaturas bajas se logra una mayor preservación estructural y funcional de las levaduras.

En la Figura 9 se muestran las distintas capacidades fermentativas de los lotes secados en las diferentes condiciones. La capacidad de fermentación más alta se observó en el lote 5 (1.1 µg de etanol/mg.min) siendo muy similar a la del control (1.0 µg de etanol/mg.min).

Figura 9. Efectos del secado sobre la capacidad de capacidad fermentativa (Valor absoluto del control C: 2.38 ug de etanol/mg.min)



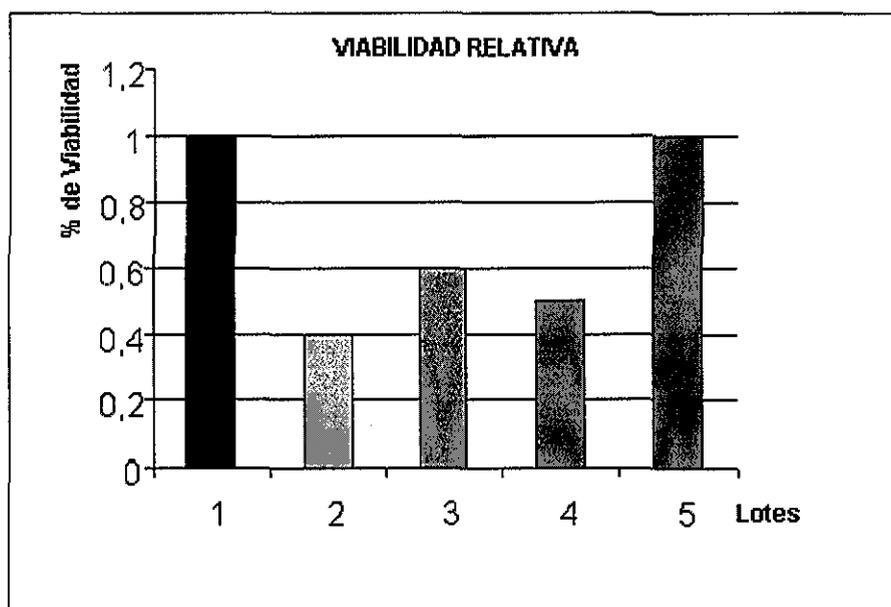
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La capacidad de fermentación del lote 3 (0.6 µg de etanol/mg.min) fue aproximadamente la mitad de las de los lotes 5 y control. El lote 4 presentó una capacidad fermentativa inferior (0.5 µg de etanol/mg.min) pero la capacidad fermentativa del lote 2 fue la más baja (0.4 µg de etanol/mg.min) de todos los lotes.

En el caso de las proteínas, se sabe que durante el secado su inactivación es causada por transiciones conformacionales inducidas por la temperatura. La proteína pierde mucha de su estructura secundaria y terciaria, exponiendo sus centros hidrofóbicos a interfaces potencialmente dañinas como agua-aire y se desnaturaliza (Anchordoquy et al., 2001; Lopez-Diez y Bone, 2000; Murray et al., 2000; Souillac et al., 2001). Posiblemente, bajo las condiciones del lote 5 se lograron una mayor conservación estructural de las proteínas y una menor salida de cofactores importantes para la actividad enzimática de la capacidad fermentativa.

En la Figura 10 se observan los porcentajes de viabilidad relativa de los diferentes lotes.

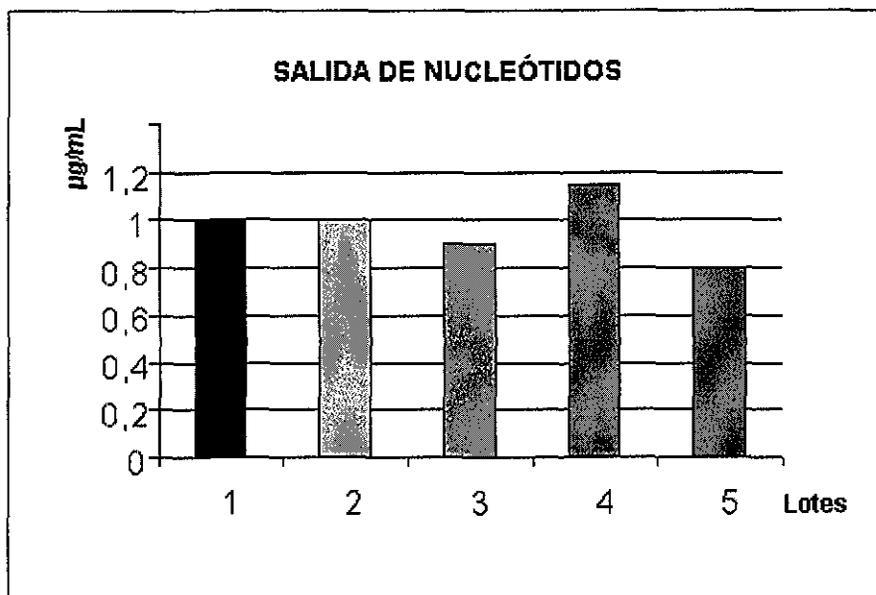
Figura 10. Efectos del secado sobre la viabilidad
(Valor absoluto del control C: 65% de células no teñidas)



La mayor viabilidad se obtuvo con el lote 5 y el control (1.0). La viabilidad del lote 3 fue de 0.6% levemente superior a la del lote 4 (0.5%) y la viabilidad del lote 2 fue la menor (0.4%). La tinción con azul de bromofenol señaló alteraciones en la permeabilidad membranal, pues las células dañadas no impidieron el ingreso del colorante al citoplasma. Estos resultados indican que la alta temperatura de secado incide negativamente en la viabilidad y que las condiciones del lote 5 son menos drásticas.

Al comparar las menores salidas de macromoléculas, en la Figura 11 se encuentra que la menor salida de contenido celular ($0.8 \mu\text{g}/\text{mL}$) la presenta el lote 5 seguida por la del lote 3 ($0.9 \mu\text{g}/\text{mL}$). El control y el lote 2 tuvieron el mismo valor ($1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$). El lote 4 presentó la mayor salida de nucleótidos ($1.18 \mu\text{g}/\text{mL}$). Las salidas de nucleótidos observadas en los lotes 2 y 4 corroboran la hipótesis del daño membranal.

Figura 11. Efectos del secado sobre la salida de nucleótidos
(C: $0.351 \mu\text{g}/\text{mL}$)



Durante el secado, con la remoción del agua, la configuración de bicapa lipídica es alterada causando cambios en la organización molecular más exactamente se producen cambios en el estado físico de los lípidos de membrana (Crowe et al., 1990, 1998, 2001; Singer y Lindquist, 1998). Es así que las moléculas de agua unidas por puentes de hidrógeno a las cabezas polares de los fosfolípidos desaparecen dando lugar a un incremento en el empaquetamiento de las cabezas y obligando a las cadenas hidrofóbicas a fusionarse, favoreciendo la probabilidad de las interacciones de van der Waals. Como resultado, los lípidos sufren una transición de fase de cristal líquido a fase de gel. Con la rehidratación, las membranas secas que se encuentran en fase gel sufren otra transición para pasar a fase de cristal líquido. Como las membranas pasan por estas transiciones de fase hay regiones con empaquetamiento defectuoso que conlleva a la porosidad de la membrana. Durante las separaciones de fase termotrópicas se ha demostrado que la permeabilidad de las membranas se altera exhibiendo una incapacidad para retener los solutos marcados (Crowe et al., 1987b; Dickson et al., 1997; Fujii et al., 1996; Hinch y Crowe, 1998; Leslie et al., 1994; Yoon et al., 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El lote 5 presentó los mejores resultados en las tres funciones de las levaduras. Con base en lo propuesto por Herrera et al. (1956) y Peña et al. (1987), parece ser que la membrana del lote 5 conservó una mayor integridad bajo esas condiciones de secado. Los resultados obtenidos con el lote 5 y con el control fueron muy similares en todas las funciones celulares, aunque la salida de nucleótidos del control fue superior a la del lote 5.

Con base en estos resultados se consideró que las condiciones: 30 minutos a 50°C y 30 minutos a 40°C y una velocidad del aire entre 3.6 y 4.2 m/s eran las más favorables para realizar las corridas de secado de la pasta de levadura. En los siguientes experimentos se podrían comparar las funciones celulares de las pastas secadas bajo las mismas condiciones pero en presencia y en ausencia de aditivos.

La aplicación de solutos que ayuden a conservar la integridad celular es una práctica corriente aunque los mecanismos de protección no se hayan aclarado todavía (Beker y Rapoport, 1987; Crowe, 1998, 2001; Jones, 1999).

7.2. EFECTOS DE LOS ADITIVOS SOBRE LAS FUNCIONES CELULARES

ADITIVOS MEZCLADOS A LA PASTA ANTES DEL SECADO

La siguiente etapa del proyecto implicó la adición de los agentes estabilizadores a la pasta de levadura. Los datos reportados de cada función celular corresponden al promedio de las repeticiones de cada lote y se refieren en valor relativo respecto al control.

EFECTO DEL «TWEEN 80» Y LA TREALOSA SOBRE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA

En la Figura 12 se muestran los datos de la capacidad fermentativa de las levaduras adicionadas con «Tween 80» al 1% y trealosa al 0.75%. Un valor de 3.024 µg de etanol/mg.min se obtuvo con esta concentración de aditivos en esta función celular respecto al control cuyo valor fue de 2.52 µg de etanol/mg.min o sea un incremento del 20%. Con estos primeros resultados se quisieron examinar varias concentraciones de trealosa y un aumento de la concentración del «Tween 80».

En la Figura 13 se observan los resultados de las capacidades fermentativas de las levaduras mezcladas con «Tween 80» al 2% y trealosa al 0.5, 0.65 y 0.75%. Al comparar las capacidades fermentativas de las levaduras en las tres concentraciones de trealosa respecto al control, se lograron incrementos entre el 10 y 20%. La concentración 0.65% de trealosa presentó la capacidad fermentativa más alta, 1.25 µg de etanol/mg.min. Se observó un resultado inferior, de 1.15 µg de etanol/mg.min, con la mezcla de trealosa al 0.5%.

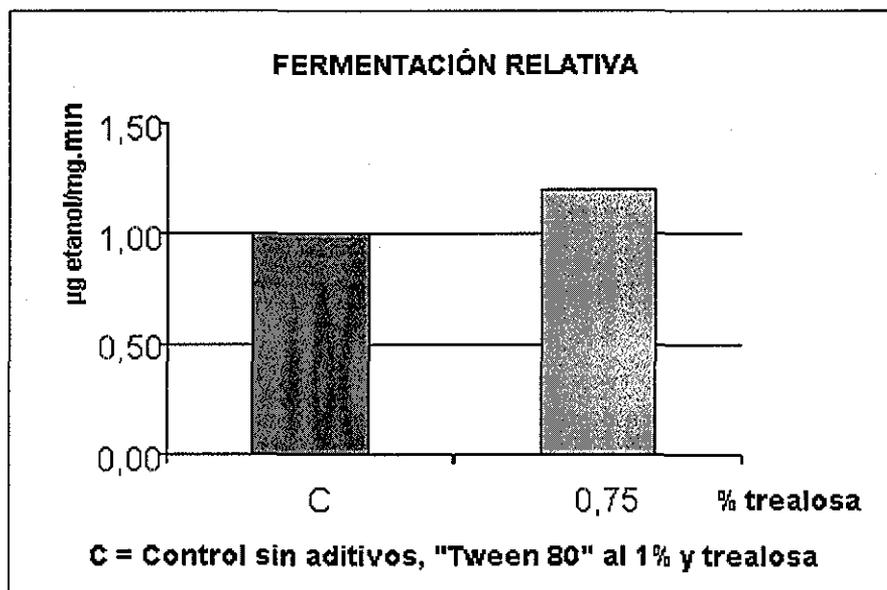
La mayor concentración de trealosa (0.75%) dio el menor resultado en esta función celular: 1.10 μg de etanol/mg min.

Se observó un efecto interesante respecto a las concentraciones de trealosa y de «Tween 80». La mayor concentración del disacárido (0.75%) fue efectiva en presencia de 1% de «Tween 80», mientras que a la concentración del 2% del detergente, las concentraciones 0.5 y 0.65% del azúcar fueron las que produjeron mejores resultados.

Por los resultados obtenidos se puede comentar que la trealosa agregada externamente y mezclada con una concentración de «Tween 80» superior o igual al 1% incidió positivamente sobre la capacidad fermentativa de las levaduras.

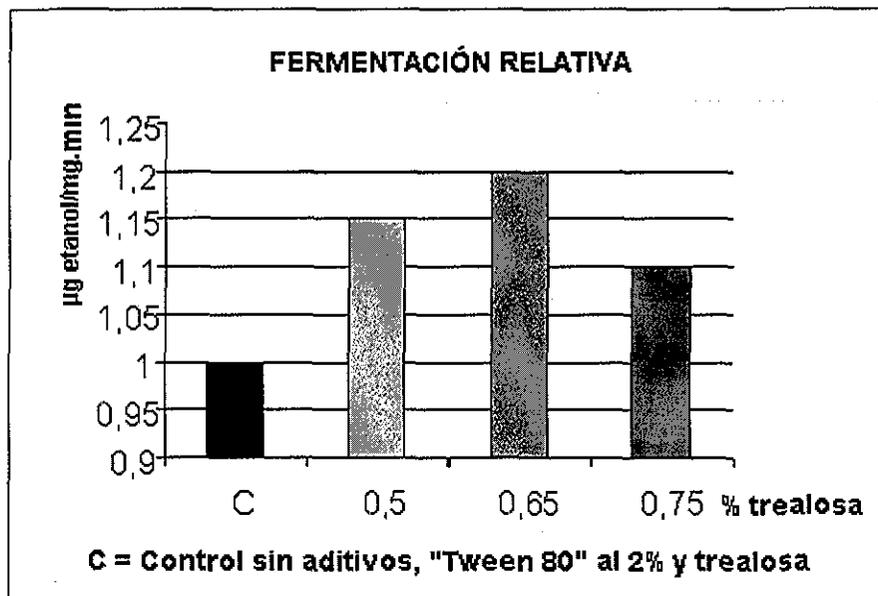
EFFECTOS DE LA ADICIÓN DEL «TWEEN 80» AL 1% Y LA TREALOSA AL 0.75%

Figura 12. Capacidad fermentativa («Tween 80» al 1% y trealosa al 0.75%)
(Valor absoluto del control C: 2.52 μg de etanol/mg min)



EFFECTOS DE LA ADICION DEL «TWEEN 80» AL 2% Y TREALOSA DEL 0.5 AL 0.75% SOBRE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA

Figura 13. Capacidad fermentativa («Tween 80» al 2% y trealosa del 0.5 al 0.75%)
(Valor absoluto del control C: 5.07 μg de etanol/mg min)
(Lote 5 : 1.2 μg de etanol/mg.min)



La mayor capacidad fermentativa obtenida parece sugerir que la trealosa adicionada ejerció su función estabilizadora principalmente sobre algunas proteínas presentes en el citosol. El mantenimiento de la estructura de las proteínas del citosol implica que la trealosa entre a la célula. Parece ser que cuando las membranas comienzan a entrar en la transición de fase, la membrana se vuelve porosa y el azúcar podría entrar a la célula. Esta hipótesis coincide con los resultados de Lodato et al. (1999), quienes observaron que la trealosa adicionada externamente antes de la deshidratación confirió protección a las células de *Saccharomyces cerevisiae*.

El grupo de Leslie (1995) también han investigado el efecto de los azúcares (sacarosa y trealosa) en la protección de enzimas citosólicas en *E coli* y en *Bacillus thuringensis* durante el congelamiento. Con base en datos de la literatura, se sabe que para mantener las estructuras tanto de las proteínas citosólicas como de la membrana, los azúcares deben tener acceso al interior del citoplasma. Los grupos de De Araujo (1991, 1996) y de Panek y Panek (1990) han presentado evidencias sobre un transportador constitutivo de trealosa presente en la membrana de las levaduras; el grupo de Han ha mostrado la existencia de una α -glucósido permeasa no-específica responsable de la asimilación de la trealosa del medio de cultivo (Han et al., 1995). Los resultados de este trabajo mostrarían que la capacidad fermentativa fue mejorada por la interacción de la trealosa con algunas enzimas de la glucólisis previniendo su desnaturalización.

El grupo de Crowe y Crowe (1988) fue de los primeros en señalar el efecto estabilizador de la trealosa sobre una enzima de la glucólisis. Los experimentos con fosfofructoquinasa, FFQ (PFK por sus siglas en inglés) mostraron que esta enzima tetramérica se disocia de forma irreversible en sus componentes durante el secado. Cuando la enzima fue secada y rehidratada progresivamente, los resultados señalaron que la enzima pierde toda su actividad cuando es parcialmente deshidratada. Sin embargo, cuando la enzima fue deshidratada en presencia de trealosa, la actividad fue completamente conservada aún a contenidos de humedad menores.

El efecto protector de la trealosa sobre la estructura proteica a bajas concentraciones ha sido reportado por varios autores. Gadd et al., (1987) habían señalado inicialmente una concentración de 120mM para la trealosa interna y de 500mM para la trealosa externa para células enteras. Los grupos de Crowe (1978), Sampedro (1998) y Sola-Penna (1997) han reportado diversas concentraciones inferiores para proteínas. El grupo de Murray (1999) ha puesto en evidencia la estabilización conformacional de la β -lactoglobulina deshidratada en presencia de 0.5% de trealosa. Se observó que el comportamiento de mayor actividad de superficie con esa concentración de trealosa (0.5%) fue muy similar al de la β -lactoglobulina nativa.

Se encuentra coincidencia también con los resultados de Simola et al, 2000 quienes han encontrado que en *Saccharomyces cerevisiae* la trealosa es requerida para la reparación de las proteínas desnaturalizadas por calor pero que no influye en el mantenimiento de las funciones de tráfico membranar. Ellos midieron la velocidad de endocitosis y exocitosis de una proteína de membrana encontrando que era igual antes y después del choque por calor y en ausencia o en presencia de trealosa. En estos experimentos se midió la actividad de la ATPasa membranar en las membranas aisladas para los experimentos de fluidez y se encontró que las membranas tratadas con el «Tween 80» y la trealosa presentaban mayor actividad (los datos no fueron reportados).

La hipótesis de la entrada de la trealosa y su efecto protector sobre la funcionalidad de ciertas enzimas se apoya en los datos de Peña et al., (1987; 1992) quienes habían postulado que la baja capacidad fermentativa de células prehidratadas se debía a la pérdida de cofactores fundamentales para la actividad enzimática en el medio durante la rehidratación (ATP, K^+). Los experimentos de rehidratación en un medio enriquecido con los cofactores y sustratos no señalaron incrementos importantes en las actividades enzimáticas. Peña et al. (1987; 1992) también señalaron la baja actividad de varias enzimas a las que se les adicionaron sus sustratos (datos no publicados).

Se cree que la capacidad para mantener en una conformación similar a la de las proteínas hidratadas puede explicarse, reemplazando el agua en los sitios que ésta deja libres al evaporarse. Se evita la formación de los puentes de hidrógeno intra e inter-proteínas durante el secado y la rehidratación, y a su vez, la exposición de sus sitios hidrofóbicos no se produce (Anchordoquy et al., 2001; Crowe et al., 1990, 1998, 2001; Plourde-Owobi et al., 2000). Sola-Penna y Meyer-Fernández (1998) han aportado más datos específicos sobre el por qué de la efectividad de la trealosa. Los experimentos realizados por su grupo han demostrado que la trealosa ocupa un volumen 2.5 veces mayor que el de otros azúcares, por

lo cual la trealosa podría sustituir más moléculas de agua en la solución, y así tener un “efecto de exclusión” más grande. Obuchi et al., (1996) han estudiado extensamente este tema y han encontrado que la respuesta al choque por calor que induce tolerancia a otros tipos de choque involucra un alto grado de estructuración del agua por ello la presencia de la trealosa conocida como el mejor agente estructurador de agua en microorganismos. Sin embargo, se cree que la trealosa no podría proteger a todas las proteínas aún a mayores concentraciones y que el efecto depende de la estructura de la proteína y de las interacciones entre trealosa, agua y proteína (Fagundas-Felix et al., 1999; Hinch y Crowe, 1998; Murray y Liang, 1999, 2000).

Con el fin de determinar si los efectos de los aditivos sobre la capacidad fermentativa se conservaban a largo plazo se midió la capacidad fermentativa en levaduras envejecidas (ver materiales y métodos) y se encontró que las levaduras tratadas con «Tween 80» al 1% conservaron un mayor poder fermentativo que las levaduras control y que las levaduras tratadas con «Tween 80» al 2% (datos no señalados).

La falta de correlación entre los incrementos en la capacidad fermentativa y la alta permeabilidad y la baja viabilidad no permiten concluir sobre el efecto de los aditivos; sin embargo, los resultados de este trabajo coinciden con los datos obtenidos por Fagundas-Felix et al., (1999), quienes aislando H^+ ATPasa de *Schizosaccharomyces pombe* encontraron que el efecto protector de la trealosa a bajas concentraciones era superior en la enzima “reconstituida” en liposomas que en su forma soluble, sugiriendo un efecto cooperativo entre los fosfolípidos y el azúcar.

Los resultados obtenidos con el «Tween 80» muestran que se incorporó a la membrana y, de acuerdo con los datos de Fagundas-Felix et al., (1999), podría pensarse que tuvo alguna interacción con la trealosa. Estos datos estarían apoyando los trabajos de Dickson et al., (1997) y Alexandre et al., (1998) quienes han postulado que los ácidos grasos como el oleico incorporados a la membrana de *Saccharomyces cerevisiae* podrían convertirse en señales de choque térmico e inducir la presencia y/o síntesis de trealosa. Los experimentos desarrollados por Swan y Watson (1999), se relacionan parcialmente con los datos obtenidos, pues ellos encontraron que células de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecidas con ácido oleico y que contienen una baja concentración de trealosa aumentaron su viabilidad, lo cual no se obtuvo en el presente trabajo.

También hay que tener en cuenta que las transiciones de fase de los lípidos pueden influenciar la función de las proteínas de un modo muy sutil. Sin embargo, se debe enfatizar que varios factores como son la trealosa intracelular, la trealosa externa, la alta interacción hidrofóbica de los fosfolípidos y la inducción de las proteínas chaperonas contra el calor podrían ser importantes en su conjunto para la respuesta al calor.

El grupo de Fagundas-Felix et al., (1999) demostró que la efectividad de la trealosa para proteger la H^+ ATPasa membranal depende del medio que rodea la enzima. La actividad de la enzima en forma solubilizada y en ausencia de protectores se pierde completamente

después de cincuenta segundos de incubación a altas temperaturas $t_{0.5} = 10$ s. Sin embargo, cuando la enzima se incubó en presencia de 1 M de trealosa cerca del ochenta por ciento de la actividad original se conservó después del mismo tiempo de incubación y el $T_{0.5}$ para la inactivación de la enzima aumentó a 60 s. Curiosamente, cuando la H^+ ATPasa fue reconstituida en liposomas de isolectina una fuerte protección de la enzima contra la inactivación térmica fue observada ($t_{0.5} = 50$ s). Al adicionar 1M de trealosa en el medio de preincubación de la enzima reconstituida, cerca del sesenta por ciento de la actividad se mantuvo después de cinco minutos a 51°C , indicando que la combinación de altas concentraciones de azúcar y lípidos es capaz de estabilizar en forma sinérgica la enzima, proporcionándole un alto grado de resistencia contra la desnaturalización física. En este mismo trabajo, se realizaron experimentos de reconstitución de la enzima en ausencia y en presencia de trealosa para determinar en cual lado de la membrana se produce su efecto estabilizador. Se observó el mismo grado de protección sobre la enzima con la trealosa adicionada externa o internamente.

Muchos resultados han demostrado que algunos carbohidratos y en particular la trealosa inhibe las separaciones de fase y reduce la temperatura de transición (T_m) de los lípidos secos, de tal forma que se encuentren en una fase de cristal líquido a temperatura ambiente. De esta forma, cuando estos lípidos son rehidratados no sufren la transición de gel a cristal líquido, lo que ocasiona los rearrreglos y la pérdida de contenido celular (Buitink et al., 2000; Crowe et al., 1998, 2001; Fagundas-Felix et al., 1999; Fujii et al., 1996; Leslie et al., 1994; Quintilio et al., 2000).

El secar en presencia de azúcares disminuye el T_m de las células secas debajo de la temperatura ambiente, de manera que cuando ocurre la deshidratación no se producen transiciones de fase. El estado de fase de una dispersión lipídica antes de la deshidratación y el contenido de trealosa influyen sobre la transición en la mezcla subsiguiente. La hidratación de lípidos en una solución de 1M de trealosa en agua con una subsiguiente deshidratación produjeron estructuras de bicapa y transiciones que fueron reproducibles. Los experimentos de microcalorimetría diferencial de barrido mostraron que existe una relación muy similar entre lípidos deshidratados en diferentes rearrreglos y entre los mismos lípidos y la trealosa. Se puede concluir que la interacción entre estos 2 compuestos es igualmente fuerte que la observada entre bicapas de solo DPPC (DPFC, por sus siglas en inglés) a bajos niveles de hidratación. La formación de una estructura intermedia no rectangular entre las cadenas acílicas depende de la temperatura y debe ser una manifestación del desorden en los lípidos dentro de la bicapa (Bathacharya y Saubhik, 2000; De Araujo y Panek, 1993; Jones, 1995, 1999; Sujatha y Mishra, 1996).

EFECTO DEL «TWEEN 80» Y LA TREALOSA SOBRE LA SALIDA DE NUCLEÓTIDOS Y LA VIABILIDAD

Contrario a las expectativas, no se observaron disminuciones significativas ni en la salida de nucleótidos (Figuras 14 y 15) ni en la viabilidad (datos no mostrados) con las mezclas de trealosa y el « Tween 80» al 1 y 2%.

Los datos parecen indicar que la trealosa no ejerció ningún efecto sobre la membrana o que la concentración de trealosa adicionada no fue suficiente para actuar sobre la membrana y así evitar la alta permeabilidad durante la rehidratación. Se ha reportado que al estar presente la trealosa en las dos caras de la membrana se evidencia su efecto protector (Crowe et al., 1987a, 1987b, Hinch e Crowe, 1998; Leslie et al, 1994; Lodato et al., 1999; Plourde-Owobi et al., 2000).

Durante el secado, las cabezas polares de los fosfolípidos sufren un mayor empaquetamiento por la remoción del agua unida. Así mismo, se produce un incremento de las interacciones de van der Waals entre las cadenas acílicas. Este incremento parecería inducir un nuevo ordenamiento en la bicapa con la separación de algunos de sus componentes (Hazel y Williams, 1990; Swan y Watson, 1997, 1998; Viera et al., 1993; Yon et al., 1998). Se pensó que la trealosa adicionada externamente ejercería su papel protector sobre los fosfolípidos.

Las concentraciones sugeridas para mejorar la viabilidad celular dependen de la fase de crecimiento de la célula, de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de la deshidratación (Beker y Rapoport, 1987; Cerrutti et al., 2000; Gadd et al., 1987; Singer y Lindquist, 1998).

Los tratamientos con trealosa exógena muestran en las curvas de viabilidad al inicio una disminución rápida seguida por un decaimiento lento y lineal. Sin embargo, tanto el grado de disminución inicial en la viabilidad como la velocidad posterior de decaimiento fueron reducidas al aumentar la concentración interna de trealosa. En la mayoría de los experimentos sólo se ha analizado la viabilidad a corto tiempo (1-3 días) y así es difícil distinguir cuando el incremento de la viabilidad reportado se dio por la protección provista durante el secado (efectos de los solutos compatibles) o por una verdadera protección de las células en el estado deshidratado (Beker y Rapoport, 1987; Cerrutti et al., 2000; Lodato et al., 1999; Plourde-Owobi et al., 2000).

La presencia de trealosa en células deshidratadas o membranas aisladas tiene una profunda influencia en la morfología y función de la membrana. Cuando una membrana biológica es deshidratada, el agua unida es la primera en ser eliminada dejando una solución acuosa concentrada de azúcar (Beker y Rapoport, 1987).

La creciente insaturación de los ácidos grasos en las membranas causa un incremento en la permeabilidad al agua. Los factores que contribuyen al aumento en el orden en la región de hidrocarburos disminuyen la permeabilidad al agua. Los sistemas en fase gel son particularmente impermeables. Sin embargo en sistemas exhibiendo separaciones de fase lateral o dominios gel-cristal líquido, la permeabilidad puede ser superior a la de los sistemas en fase de cristal líquido. Esta permeabilidad incrementada puede ser atribuida a defectos en el empaquetamiento en la interfase hidrofóbica del cristal líquido (Batthacharya y Saubhik, 2000; Crowe e Hinch, 1998; Fujii et al., 1996; Hottiger et al., 1987; Leslie et al., 1994).

Numerosos experimentos en células de levadura han mostrado que la composición de los lípidos de membrana es crucial para el funcionamiento celular y se ha asociado el grado de instauración de los lípidos con resistencia al shock por calor.

La incorporación de ácidos grasos a la membrana ante un choque por calor ha sido señalada en varios trabajos. Estos resultados son consistentes con los trabajos de Fujii et al., (1996) y Steels et al., (1994) quienes obtuvieron células de *Saccharomyces cerevisiae* más resistentes a altas temperaturas al estar enriquecidas sus membranas plasmáticas con el ácido graso mono insaturado de cadena larga.

Aunque no se conocen bien los mecanismos de acción de los detergentes, los resultados obtenidos indican que la naturaleza de la cabeza del detergente, así como la extensión y el grado de saturación de su cadena hidrofóbica, influyen en sus interacciones con el disacárido y posiblemente con las membranas.

Los datos obtenidos en el caso de la viabilidad no concuerdan con los trabajos donde se ha reportado un incremento en la tolerancia celular a altas temperaturas por la presencia de la trealosa (Cerruti et al., 2000; Crowe et al., 1987b; Lodato et al., 1999). Es posible que la concentración de la trealosa no fuera lo suficientemente alta para proteger la membrana plasmática ni un porcentaje considerable de proteínas para haber mejorado la viabilidad.

La prueba del azul de bromofenol es una medición indirecta de la permeabilidad de la membrana plasmática. Sin embargo, en el caso particular de las levaduras para la panificación el preservar su capacidad fermentativa es el objetivo principal y con las concentraciones de trealosa empleadas se logró.

La sacarosa, después de la trealosa, se ha caracterizado por proveer una protección importante a membranas y proteínas. Los experimentos preliminares realizados por Crowe et al. (1987a) en liposomas de músculo de langosta deshidratados en presencia de sacarosa indicaron un buen porcentaje (60%) de retención de un soluto marcado.

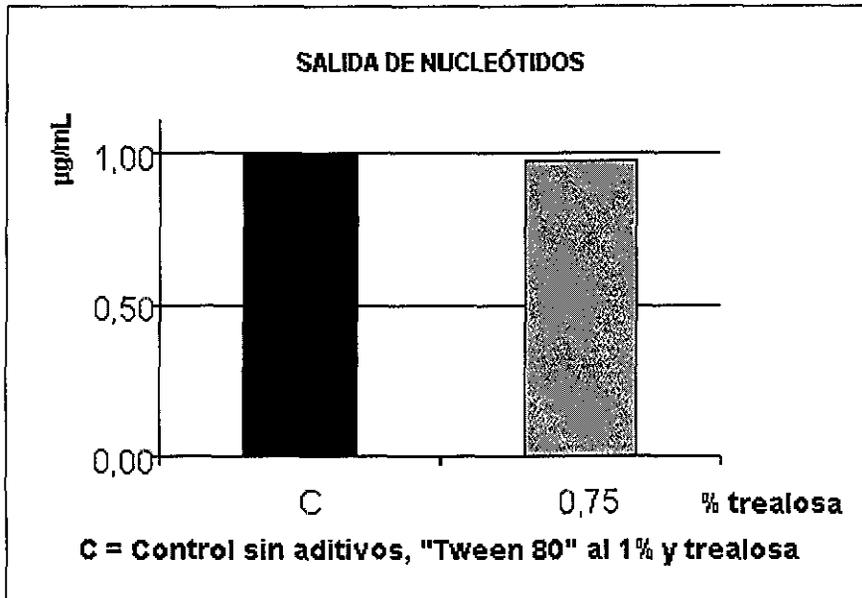
La mezcla «Tween 80» al 1% y sacarosa al 0.75% se ensayó en las mismas pruebas bioquímicas. Se encontró que la capacidad fermentativa presentó un incremento del 16% (Figura 16) y la salida de nucleótidos una reducción inferior al 10% con la combinación «Tween 80» al 1% y sacarosa al 0.75% (Figura 17).

Los datos de la capacidad fermentativa pueden implicar protección de las enzimas involucradas en esta ruta metabólica por la sacarosa (Crowe et al., 1984; 1988; 1990) y/o efectos sobre membrana que reducirían la salida de cofactores (Crowe et al., 1987a,b; Lis et al., 1990; Tsvetkov et al., 1989).

La composición lipídica y la fluidez han sido implicadas como factores determinantes en la sensibilidad térmica de la célula (Hincha y Crowe, 1998; Leslie et al., 1994; Swan y Watson, 1997,1998; Sano et al., 1999). Los datos en la capacidad fermentativa, viabilidad y salida de nucleótidos no permitían evidenciar el efecto de la trealosa sobre la membrana plasmática. Con el fin de determinar el estado de la bicapa se diseñaron varios experimentos de anisotropía de fluorescencia polarizada. Los datos también podrían señalar la incidencia de la trealosa o del «Tween 80» sobre la organización membranaral.

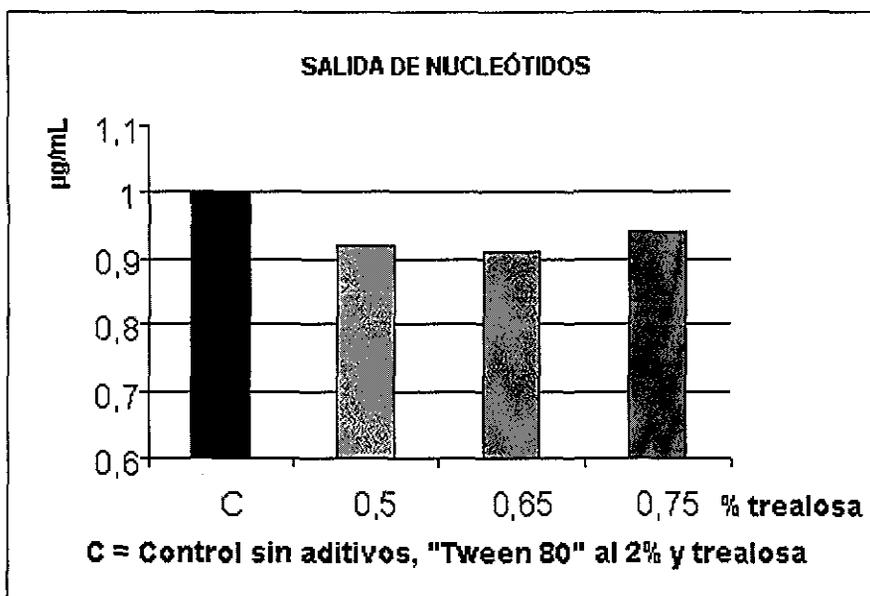
EFFECTOS DE LA ADICIÓN DEL «TWEEN 80» AL 1% Y LA TREALOSA AL 0.75%

Figura 14. Salida de nucleótidos («Tween 80» al 1% y trealosa al 0.75%)
(Valor absoluto del control C: 0.51 µg/mL)



EFFECTOS DE LA ADICION DEL «TWEEN 80» AL 2% Y LA TREALOSA DEL 0.5 AL 0.75%

Figura 15. Salida de nucleótidos («Tween 80» al 2% y trealosa del 0.5 al 0.75%)
(Valor absoluto del control C: 0.41 µg/mL)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 16. Capacidad fermentativa («Tween 80» al 1% y sacarosa al 0.75%)
(Valor absoluto del control C: 2.11 μg etanol/mg min)

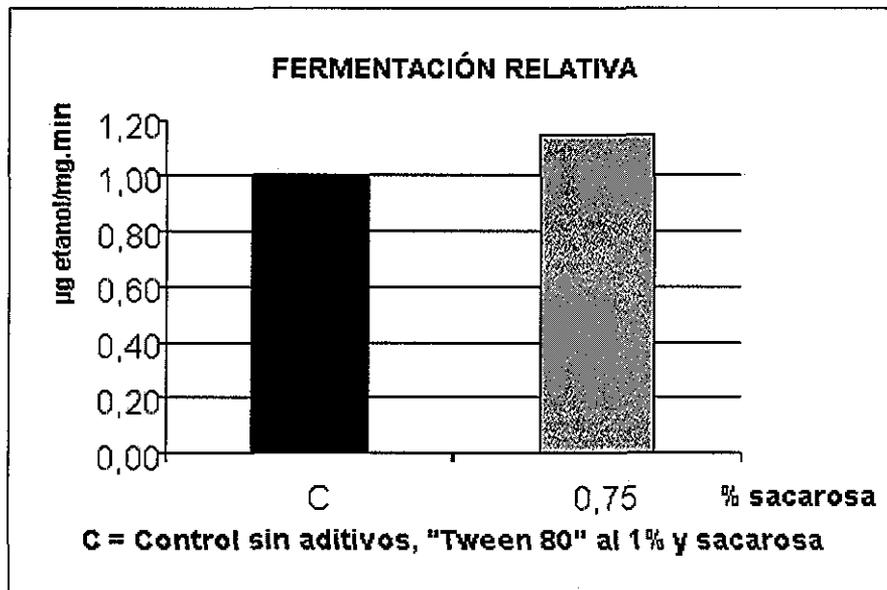
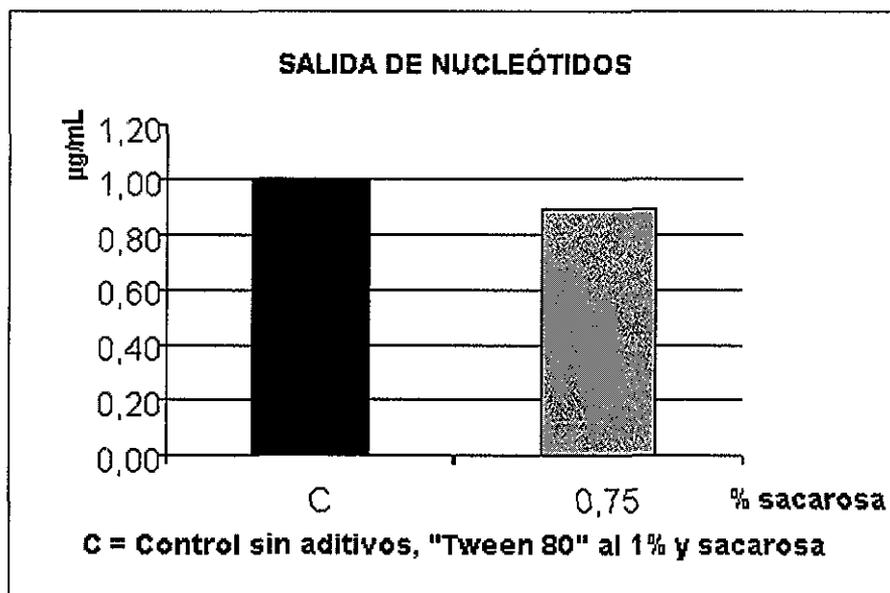


Figura 17. Salida de nucleótidos («Tween 80» al 1% y sacarosa al 0.75%)
(Valor absoluto del control C: 0.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.3. EFECTOS SOBRE LA MEMBRANA

7.3.1. EFECTO DE LOS DETERGENTES

Los experimentos en los que se analizó la anisotropía de la fluorescencia del DFH (DPH por sus siglas en inglés) revelaron que las membranas de las levaduras tratadas con «Tween 80» al 1 y 2% son menos rígidas que las membranas control. Parece producirse una interacción entre el detergente y la porción hidrofóbica de la membrana aumentando su fluidez. Se piensa que la doble ligadura del ácido graso es un factor determinante para alterar la fluidez (Crowe y Crowe, 1988; Hazel y Williams, 1990; Sujatha y Mishra, 1996; Yon et al., 1998).

No se conoce bien el estado de los detergentes sobre las membranas. En el medio, el detergente puede estar como monómero, dímero etc., o en forma de micelas. Al progresar la deshidratación, las micelas del detergente pueden pasar a fase de micelas “invertidas” (Jones, 1995, 1999). Los choques térmicos ocasionados durante el secado favorecerían la unión hidrofóbica entre las micelas “invertidas” y las discontinuidades de membrana (Vandenberg, Krul, 1991). Sin embargo, los experimentos de fluidez, mostraron que el «Tween 80» incorporado a la membrana hizo a ésta preservar su fluidez y, por consiguiente, las membranas tratadas eran menos rígidas (35%) que las membranas control.

Apoyados en los datos de Swan y Watson (1996) es posible pensar que parte de la trealosa se quedó por fuera de la célula y que debió tener algún tipo de interacción con las cabezas polares de los fosfolípidos, que incidió en la fluidez membranaral pero que no se tradujo en una disminución en la salida de nucleótidos ni en mejoras en la viabilidad.

Los experimentos de Hinch et al. (1987) e Hinch y Crowe (1998), realizados con liposomas preparados con mezclas de lípidos provenientes de la membrana de tilacoides mostraron que la trealosa adicionada fuera se unía específicamente a ciertos lípidos, ejerciendo su función protectora mientras que con otros lípidos la interacción era diferente, y se producía una pérdida importante del contenido liposomal.

7.3.2. EFECTO DE LOS DISACÁRIDOS

Los experimentos de anisotropía revelaron que, a concentraciones crecientes de trealosa y en presencia de «Tween 80» al 1%, las membranas son progresivamente menos rígidas (20%) que las “Control” (Figura 18). Los mismos experimentos, pero con «Tween 80» al 2%, indicaron que las membranas se hacían más rígidas con la mayor concentración de trealosa (Figura 19). Varios autores han asociado cambios en la fluidez con el efecto de la trealosa (Crowe y Crowe, 1998; Yoon et al., 1998). La sacarosa y la trealosa son los azúcares con mayor efecto protector sobre sistemas membranales durante la deshidratación (Argüelles, 2000; Crowe et al., 1987b; Wendell y Sun, 1998). En todas las funciones celulares los resultados fueron más altos con la trealosa que con la sacarosa. Parece ser que el efecto de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

trealosa reside en el contacto directo de las cabezas polares de los fosfolípidos, al conservar el estado de bicapa e impedir transiciones de fase durante la deshidratación (Crowe et al., 1987a; 1998; 2001; Leslie et al., 1994; Watson y Swan, 1997; 1998). Sin embargo, no existe un modelo satisfactorio para interpretar los cambios en la fluidez con las distintas concentraciones de detergente y trealosa.

7.4. EFECTO SOBRE LAS ENZIMAS

Se midió la actividad de la ATPasa membranal (Serrano, 1988) en las membranas aisladas en los experimentos de fluidez con el fin de determinar el estado general de la bicapa. Las enzimas de las membranas tratadas con «Tween 80» al 1% y trealosa siempre tuvieron mayor actividad que las membranas control (datos no señalados).

No se conoce bien los mecanismos por los cuales los azúcares y ciertos detergentes protegen las enzimas durante la deshidratación. Se ha propuesto que a medida que la deshidratación progresa, el agente protector penetraría a la capa de hidratación de la proteína y en ese momento habría una interacción directa y específica que impediría alteraciones en la estructura terciaria de la proteína (Anchodorquy et al., 2001; Crowe et al., 1987b; 1990; Lopez-Diez y Bone, 2000; Sampedro et al., 1998). Alternativamente, se cree que al actuar sobre la membrana, se está impidiendo la salida de cofactores importantes para la actividad enzimática (Peña et al., 1987).

Se sabe que el enrollamiento específico de todas las proteínas intrínsecas y de algunas periféricas está en parte estabilizado y determinado por el entorno lipídico. La dependencia de las propiedades funcionales de una proteína en la composición lipídica es la medida más directa y sensible para la observación de los cambios inducidos por los lípidos en la conformación de las proteínas y su especificidad (Crowe et al., 2001; Singer y Lindquist, 1998; Yon et al., 1998).

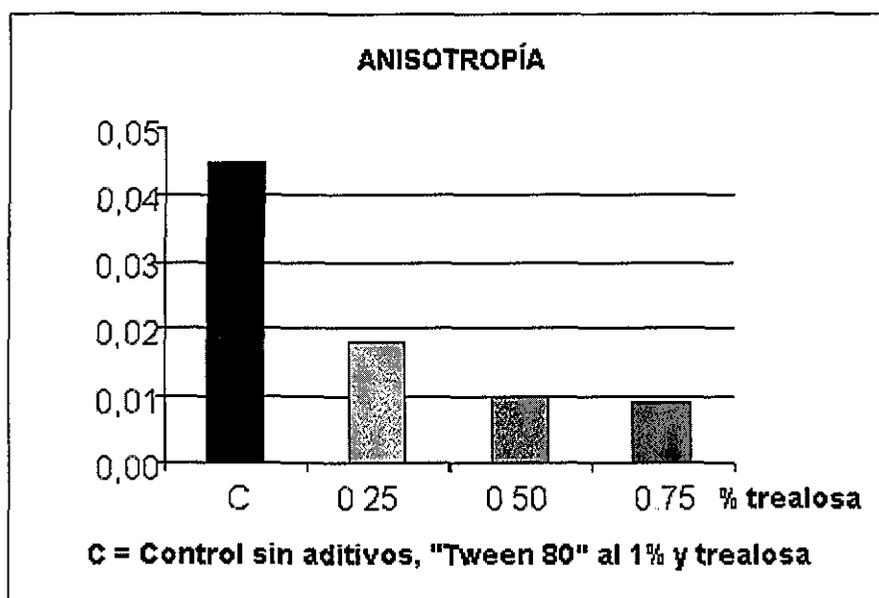
La constatación de los diferentes arreglos gel-cristal líquido que pueden tomar los componentes lipídicos individuales dentro de una membrana biológica han sugerido que estos pueden afectar la funcionalidad de la proteína, restringiendo su movilidad dentro de la bicapa o facilitando defectos de empaquetamiento lo que resultaría en cambios en la permeabilidad (Hincha y Crowe, 1998; Sola-Penna et al., 1997, Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1998; Swan y Watson, 1997, 1998).

Aunque no se ha aclarado la relación entre fluidez, resistencia al calor y composición lipídica parece ser que una mayor rigidez membranal luego de un tratamiento por calor (choque por calor) coincidiría con una baja viabilidad y una disminución en la insaturación de membrana (Bhattacharya y Saubhick, 2000; Fujii et al., 1996; Sujatha y Mishra, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEDIDA DE LA ANISOTROPÍA CON LUZ FLUORESCENTE POLARIZADA

Figura 18. Polarización de fluorescencia del difenil hexatrieno, DFH (DPH) en membranas aisladas de levadura con «Tween 80» al 1% y trealosa



La mayor fluidez se observó con la concentración (0.75%) de trealosa y «Tween 80» al 1% (Figura 18). Las membranas tratadas con esta mezcla fueron unos 35% menos rígidas que el control.

Los resultados en los experimentos de anisotropía sugieren que parte del ácido graso se incorporó a la membrana e influyó en su fluidez. La incorporación de ácidos grasos a la membrana fue primero descrito por Sinensky et al., (1970), quienes lo consideraron como un mecanismo adaptativo para mantener la fluidez óptima y así preservar un funcionamiento celular normal. En numerosos microorganismos se ha observado que regulan su composición lipídica como respuesta a una temperatura ambiental elevada (Hazel, 1995; Hazel y Williams, 1990; Swan y Watson, 1997, 1998).

Experimentos realizados con *E. coli* mostraron que las células enriquecidas con ácido oleico suplementado al medio de cultivo fueron más resistentes a altas temperaturas que sus contrapartes cultivadas con ácido linolénico (Piper, 1995). En levaduras *Saccharomyces cerevisiae* también se encontró que la tolerancia al choque térmico disminuía con una insaturación creciente de los ácidos grasos (Alexandre et al., 1998; Hazel y Williams, 1990; Swan y Watson, 1997, 1998).

Se ha postulado a la fluidez como un detector muy sensible a los cambios del medio ambiente y ello hace a la membrana el sitio ideal para la localización de los sensores de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

choque (Alexandre et al., 1998; Dickson et al., 1997; Swan y Watson, 1997, 1998).

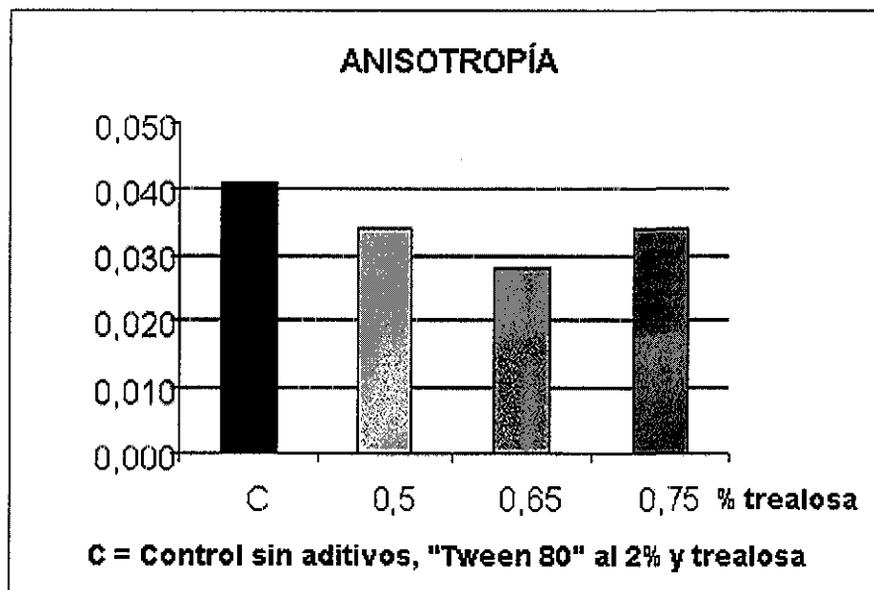
Las membranas requieren una matriz fluida en su bicapa para su funcionamiento; por ello, la modulación local de la fluidez y la formación de dominios cristalinos es un fenómeno general. El requerimiento de una matriz lipídica en estado de cristal líquido está más relacionado con la consecuente capacidad de los lípidos y de las proteínas para difundirse rápidamente en el plano de la membrana (Crowe et al., 2001; Sampedro et al., 1998)

En levaduras existe evidencia indirecta sobre la participación de la membrana celular en la detección del choque por calor. La composición lipídica de la membrana afecta las señales de choque. Al alterar el grado de saturación de los fosfolípidos de la membrana de un plásmido, se afecta el intervalo de temperatura al cual el plásmido es activado por calor (Dickson et al., 1997; Piper, 1995; Sales et al., 2000).

Respecto a la trealosa se cree que al quedarse fuera de la célula tuvo alguna interacción con las cabezas polares de los fosfolípidos, lo que incidió en la fluidez membranal. Esto estaría de acuerdo con varios trabajos que postularon la presencia de trealosa en las interacciones intra-bicapa como una condición suficiente para modificar los rearrreglos de las colas hidrofóbicas en función de la temperatura al interactuar "frenando" la fluidez membranal (Crowe et al., 1998, 2001; Hottiger et al., 1987; Sola-Penna et al., 1997, Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1998).

Con el fin de profundizar más sobre el efecto de los aditivos, se aumentó la concentración del «Tween 80» al 2% (Figura 19).

Figura 19. Polarización del DFH (DPH) en membranas de levadura con «Tween 80» al 2% y trealosa



Los mismos experimentos pero con membranas tratadas con «Tween 80» al 2% mostraron que las membranas más fluidas eran las membranas tratadas con la concentración 0.65% de trealosa (Figura 19).

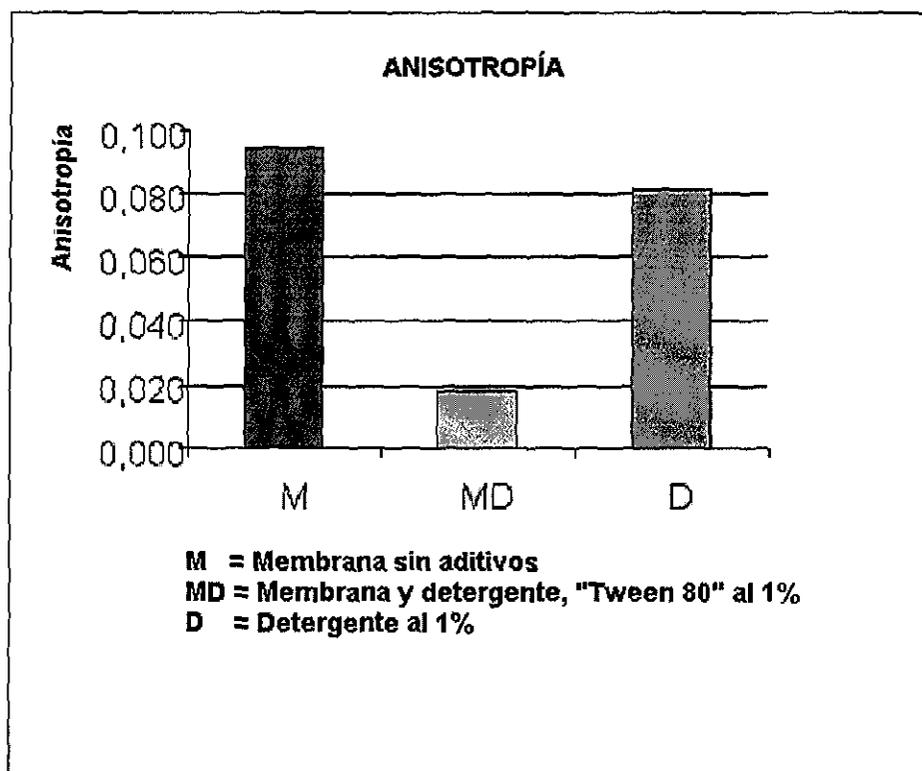
Al duplicar la concentración de detergente, se observaron membranas más rígidas comparadas con las membranas tratadas con el «Tween 80» al 1% y aún con las mismas concentraciones de trealosa. Aunque la tendencia se conserva, las diferencias entre las membranas tratadas fueron menores y se observó que la fluidez en las membranas tratadas con trealosa al 0.5% y 0.75% era casi idéntica. La diferencia entre la fluidez del control (las membranas sin aditivos) y las membranas tratadas fue menos significativa que en las membranas tratadas con 1% de «Tween 80».

Se cree que la levadura incorporó menos «Tween 80» al 2% a su membrana, debido a que a esta concentración el detergente se encuentra predominantemente en forma de micelas y no como monómeros.

Parece ser que la célula anexa a la membrana adquiere una cantidad muy definida de detergentes específicos según sus necesidades. Una mayor incorporación de detergente puede ser letal pues lleva a la desintegración o solubilización de la membrana (Dickson et al., 1997; Jones, 1995, 1999; Sujatha y Mishra, 1997).

Al obtener unas membranas menos fluidas con una mayor concentración de detergente, se realizaron los mismos experimentos con el solo detergente en las membranas (Figura 20).

Figura 20. Polarización del difenil hexatrieno DFH (DPH) en la membrana aislada



En la Figura 20, se observa que la anisotropía de la fluorescencia polarizada del DFH (DPH) fue menor en la membrana tratada con el detergente que con la membrana sola.

Al comparar los resultados de la anisotropía, se observa que no hay una diferencia considerable entre el valor de la anisotropía de la membrana sin aditivos y el valor del detergente solo. La membrana tratada con detergente mostró una fluidez casi tres veces inferior a la de la membrana sola. Al examinar los datos de la membrana tratada con «Tween 80» al 1% y trealosa al 0.75% (Figura 18), se observa que esta membrana presentó casi la tercera parte de la fluidez encontrada en las membranas tratadas con el «Tween 80» al 2% y la trealosa al 0.65% (Figura 19) y aproximadamente la mitad de la fluidez de la membrana tratada únicamente con detergente (Figura 20).

Se puede inferir que la trealosa a las concentraciones utilizadas tuvo un efecto sobre la fluidez. Todavía queda por determinar el mecanismo exacto de la influencia de la trealosa en el empaquetamiento de la bicapa y la función de la membrana.

Los trabajos en liposomas constituidos con galactolípidos de tilacoides de espinaca han mostrado que la interacción de la trealosa es específica con ciertos lípidos con los cuales realiza su función estabilizadora mientras que con otros lípidos la interacción se modifica y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

no se observa ningún efecto (Hincha y Crowe, 1998).

Estos datos estarían apoyando varios trabajos que postulan que los ácidos grasos como el oleico mono insaturado y de cadena larga incorporado a la membrana de *Saccharomyces cerevisiae* aumenta la resistencia celular a altas temperaturas y que podrían convertirse en señales de choque térmico e inducir la presencia de trealosa (Dickson et al., 1997; Fagundas-Felix et al., 1999; Swan y Watson, 1997, 1998).

7.5. EFECTO DE LOS ADITIVOS SOBRE LA PARED CELULAR

Las imágenes del microscopio electrónico de barrido muestran cambios en la pared celular de las levaduras tratadas con aditivos respecto a las levaduras control. En la Figura 22 las flechas muestran la superficie lisa de las levaduras control después del secado (aumento de 25000).

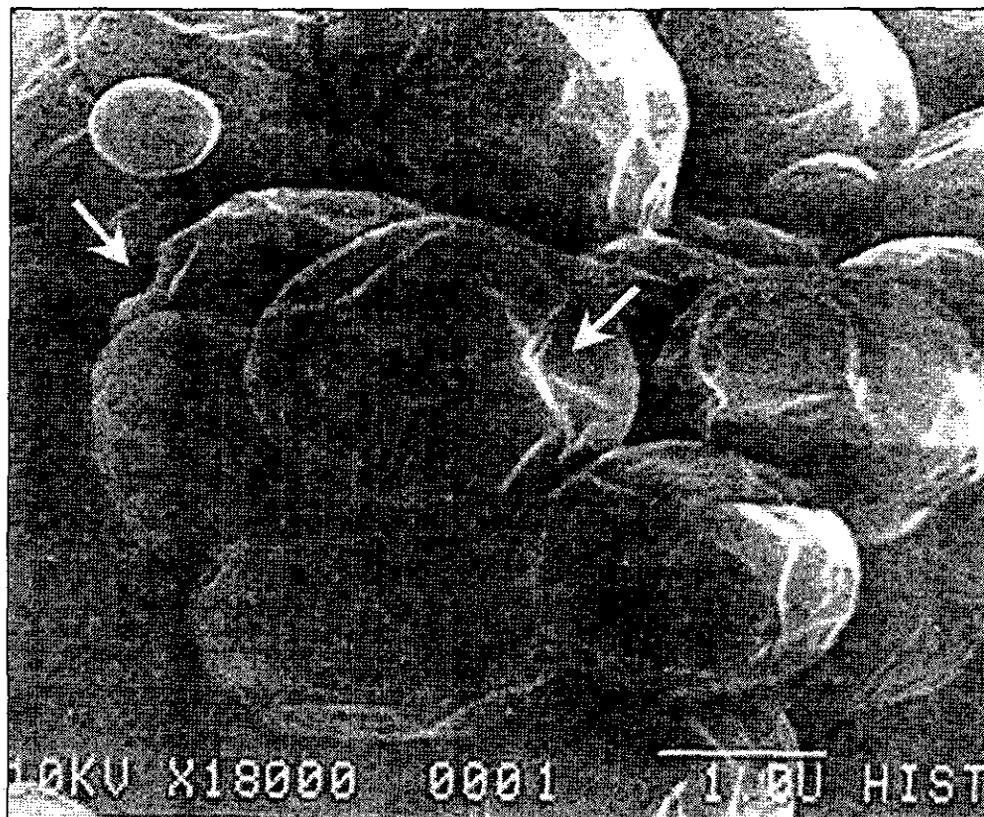
Figura 21. Fotografía en el microscopio electrónico de barrido de levaduras “control”



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se sabe muy poco sobre la regulación de las modificaciones de la pared celular y menos aún sobre cómo la célula responde cuando se enfrenta a varias situaciones de choque simultáneas (Klis et al., 2002).

Figura 22. Fotografía de barrido de levaduras “tratadas” con trealosa y «Tween 80»



La imagen del microscopio electrónico de barrido en la Figura 22 muestra cambios en la superficie externa de las levaduras tratadas con «Tween 80» y trealosa. Las flechas señalan los numerosos pliegues y hendiduras que aparecen en la pared de las levaduras (Aumento de 18000). Este resultado coincide con las observaciones de otros autores (Crowe y Clegg, 1978), quienes sostienen que los organismos anhidrobióticos viables presentan “arrugamientos” en toda la superficie.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.6. EFECTOS SOBRE EL SECADO

Los resultados positivos sobre las membranas celulares condujeron a explorar otros posibles efectos de los aditivos, en parámetros importantes como el secado de las pastas.

7.6.1. EFECTOS SOBRE EL SECADO

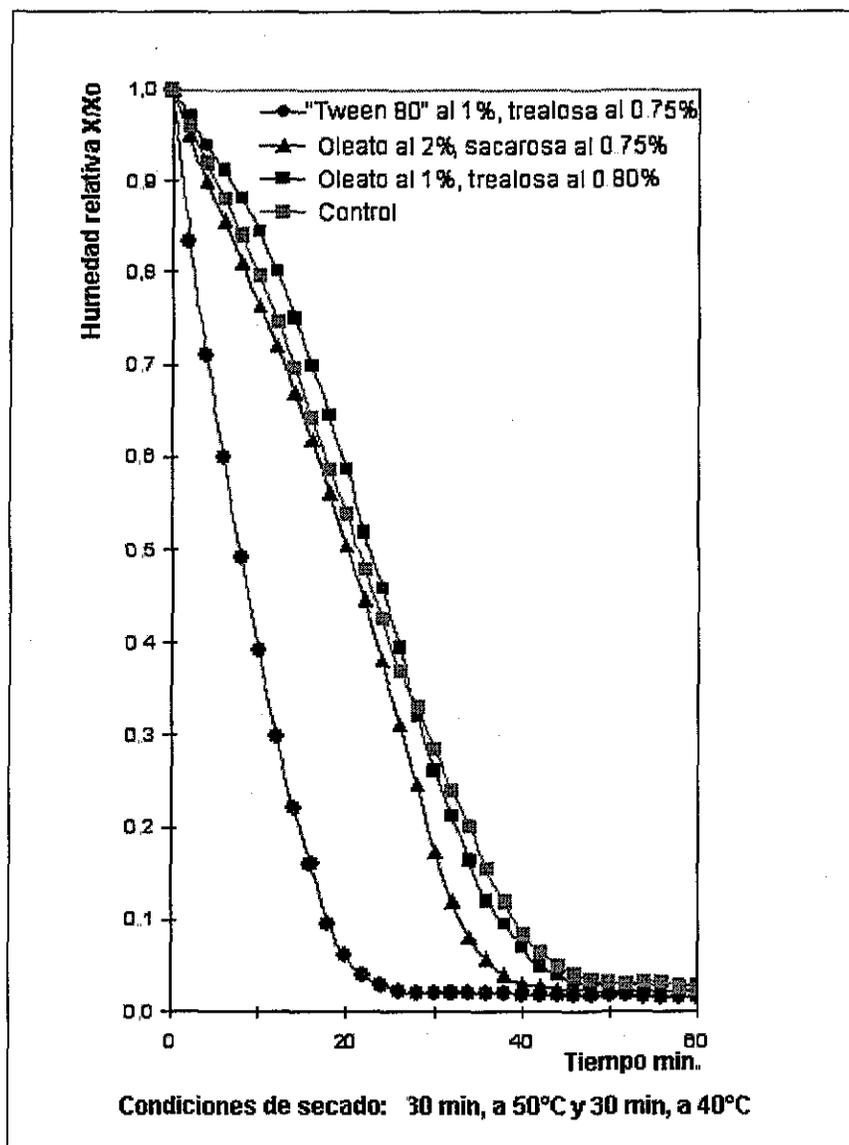
En la Figura 23 se muestran las cinéticas de secado, para las pastas de levadura tratadas con diferentes estabilizadores de membrana. Se observa que la pérdida de humedad normalizada es mayor con la adición del «Tween 80» al 1% y la trealosa al 0.75% con respecto al control y con respecto a las muestras adicionadas con otros agentes estabilizadores (oleato de Na⁺ al 2% y sacarosa al 0.75% y oleato de Na⁺ al 1% y trealosa al 80%). Este comportamiento puede ser debido a que el «Tween 80» posiblemente solubiliza parcialmente la membrana y favorece la salida de agua desde el interior de la célula hacia el medio de secado, lo cual facilita la pérdida de humedad. Así mismo, la trealosa probablemente sirve como sustituto del agua transportada, por lo que se podría sugerir que la trealosa presenta un efecto estabilizador de la funcionalidad de las células (Argüelles, 2000; Cerruti et al, 2000; Crowe et al., 1987, 1990, 1998, 2001). Por otro lado, las sustancias con capacidad de enlace iónico (como el oleato de Na⁺) al estar presentes como se muestra en la Figura 24 posiblemente pueden interactuar con el agua y reducir la velocidad de secado (Jones, 1995).

Adicionalmente, las cinéticas de secado de la Figura 24 señalan que las muestras tratadas con «Tween 80» al 1% y trealosa al 0.75% tienen un tiempo de tratamiento térmico (secado) menor para alcanzar la humedad cercana al equilibrio (alrededor de 25 minutos) comparado con las muestras adicionadas con otras sustancias y el control (alrededor de 45 minutos) para llegar a la humedad final de secado. Dichos resultados sugieren que el «Tween 80» y la trealosa, disminuyen los tiempos del proceso de secado y ayudan a mantener las funciones celulares de las levaduras. Esto puede ser relevante para mejorar la producción de levaduras a nivel industrial.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.6.2. EFECTOS DE LOS ADITIVOS EN LOS PARÁMETROS DE SECADO

Figura 23. Curvas de secado.



El análisis de las curvas de velocidad de secado señaló diferencias cuantitativas en las fases constantes y muy leves en las fases lentas (Figura 23).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. CONCLUSIONES

1. Las condiciones de secado propuestas: 50°C durante los primeros 30 minutos y 40°C durante los siguientes 30 minutos, fueron elegidas por mantener la capacidad fermentativa y viabilidad celular máximas y una salida reducida de nucleótidos.
2. La capacidad fermentativa presentó aumentos del 20 y 25%, respectivamente con la mezcla «Tween 80» al 1 y 2% y la trealosa al 0.5 - 0.75% , una reducción del 16% se obtuvo con la mezcla «Tween 80» al 2% y trealosa al 0.65%.
3. Se observó un incremento del 16% en la capacidad fermentativa y una reducción del 10% en la salida de nucleótidos con la mezcla «Tween 80» al 1% y la sacarosa al 0.75%.
4. El oleato de Na⁺ (detergente iónico) con porción hidrofóbica de igual extensión que el «Tween 80» no produjo resultados significativos en el secado.
5. La presencia de los aditivos («Tween 80» al 1% y trealosa) modifica la fluidez de las membranas haciéndolas menos rígidas.
6. El uso de la trealosa y el «Tween 80» (al 1 y/o 2%) influye en una mayor funcionalidad post-rehidratación de la levadura y se correlaciona con cambios tanto en las propiedades microscópicas de la membrana (anisotropía o fluidez) como en algunos parámetros de operaciones unitarias.
7. La presencia de la trealosa y el «Tween 80» al 1% modifica la velocidad de secado de las pastas, haciendo más rápida la salida del agua.

9. PERSPECTIVAS

A continuación, se plantean algunos puntos que será aconsejable profundizar en investigaciones futuras:

1. Los cambios termodinámicos producidos por los detergentes sobre la pasta, estudiando su difusión, su inserción en las membranas y su interacción con las proteínas.
2. Efectuar experimentos de calorimetría diferencial de barrido para verificar la existencia de cambios en las temperaturas de transición de estas membranas, debidos a la trealosa y los detergentes.
3. Correlacionar la presencia de los aditivos con la actividad de algunas enzimas propias de la glucólisis.
4. Repetir los pasos del proceso de obtención de las levaduras secas, desde la siembra hasta el secado de la pasta de levadura con el fin de reducir variaciones.
5. Efectuar pruebas piloto en una fábrica productora de levaduras para confirmar los incrementos obtenidos en el laboratorio y detectar otros efectos.
6. Estudiar las posibilidades de aplicación en otros sistemas biológicos de importancia comercial (alimentos y microorganismos como *Lactobacillus bulgaricus*).
7. Realizar más experimentos de secado para comprobar el efecto de los aditivos en las distintas etapas de este proceso.

10. BIBLIOGRAFÍA

Alexandre, H., Plourde, L., Charpentier, C. y François, J. (1998) Lack of correlation between trehalose accumulation, cell viability and intracellular acidification as induced by various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 144, 1103-1111.

Anchordoquy, T. J., Carpenter, J. F., Cecchinni, C. A., Crowe, J. H. y Crowe, L. M. (1990) Effects of protein perturbants on phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 356-361.

Anchordoquy, T. J., Izutsu, K-I, Randolph, T. W. y Carpenter, J. F. (2001) Maintenance of Quaternary Structure in the Frozen State Stabilizes Lactate Dehydrogenase during Freeze-Drying. *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 1, 35-41.

Argüelles, J. C. (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeast: A comparative analysis. *Arch. Microbiol.* 174, 217-224.

Atfield, P. V., Kletsas, S. y Hazell, B. W. (1994) Concomitant appearance of intrinsic thermotolerance and storage of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* during early respiratory phase of batch-culture is CIF1-dependent. *Microbiology*. 140, 2625-2632.

Bancomext (2000) Balance anual del comercio exterior mexicano por sectores industriales (1998, 1999, 2000). Banco Mexicano de Comercio Exterior. México D F, México.

Bhattacharya, S. y Saubhik, H. (2000) Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage. *Biochem. Biophys. Acta.* 1467, 39-53.

Beker, M. J. y Rapoport, A. I. (1987) Conservation of Yeast by Dehydration. *Adv. Biochem. Biophys.* 35, 127-169.

Belter, P. A., Cussler, E. L. y Wei-Shou, Hu. (1988) Bioseparation processing down stream for biotechnology. John Wiley and Sons. N.Y. EEUUA. Pp. 50-69.

Bonnichsen, R. (1965). Ethanol. Determination with alcohol -- dehydrogenase and DPN. En *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer, H.U. (Ed). Academic Press, N.Y. EEUUA, 285-287.

Borst-Pauwels, G. W. P. H. y Dobelmann, J. (1972). Determination of the yeast cell pH. *Acta Bot. Neer.* 21, 149-154.

Buitink, J., van den Dries, J., Hoestra, F. A., Alberda, M. y Hemminga, M. A. (2000) High Critical Temperature above Tg May contribute to the Stability of Biological Systems. *Biophys. J.* 79, 1119-1128.

Burrows, S. (1970) Baker's Yeasts. En *The yeasts*. A. H. Rose y J. S. Harrison. (Ed) Academic Press. N. Y. EEUUA. Cap. VII. Pp. 349-413.

Cardona, S., Schebor, C., Buera, M-P., y Chirife, J. (1997) Thermal stability of invertase in reduced-moisture amorphous matrices in relation to glassy state and crystallization. *J. Food. Sci.* 62, 105-112.

Cerrutti, P., Segovia-de-Huerto, M., Galvagno, M., Schebor, C. y Buera, M-P. (2000) Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 575-580.

Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Crowe, L. M. y Anchordoquy, T. J. (1990). Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27, 219-231.

Crowe, J. H., Carpenter, J. F. y Crowe, L. M. (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 73-103.

Crowe, J. H. y Clegg, J. S. (1978) Ultrastructural and freeze fracture studies on anhydrobiotic nematodes. En *Dry Biological Systems*. Crowe, J. H. y Clegg, J. S.: Academic Press. N.Y. EEUUA. Pp. 23-50.

Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F. y Aurell Wistrom, C. (1987b) Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* 242, 1-10.

Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., Petreski, S. y Hoekstra, F. A. (1997) Anhydrobiosis: cellular adaptation to extreme dehydration. En *Handbook of physiology* Dantzler, W. H. (Ed) Vol II, 1445-1478. Oxford: Oxford Univ. Press. GB.

Crowe, J. H., Crowe, L. M. y Hoekstra, F. A. (1989) Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. Mini review. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21, 77-91.

Crowe, J. H., Crowe, L. M., Oliver, A. E., Tsvetkova, N., Wolkers, W. y Tablin, F. (2001) The trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilisation of Cells in the Dry State. *Cryobiology*. 43, 89-105.

Crowe, J. H., Whittam, M. A., Chapman, D. y Crowe, L. M. (1984b) Interaction of phospholipid monolayers with carbohydrates. *Biochem. Biophys. Acta*. 769, 151-159.

Crowe, J. H., Spargo, B. J. y Crowe, L. M. (1987a) Preservation of dry liposomes does not require retention of residual water. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 1537-1546.

Crowe, L. M. y Crowe, J. H. (1988) Effects of water and carbohydrates on membrane fluidity. En: *Advances in membrane fluidity*. Alan R. Liss. Inc. (Ed) Cap.3. Pp. 75-99, N.Y. EEUUA.

Crowe, L. M. y Crowe, J. H. (1988) Trehalose and dipalmitoylphosphatidylcholine revisited. *Biochim. Biophys. Acta* 946, 193-201.

Crowe, L. M., Crowe, J. H., Rudolph, A., Womersley, C. y Appel, L. (1985) Preservation of Freeze-Dried liposomes by Trehalose. *Arch. Biochem. Biophys.* 242, 240-247.

Crowe, J. H., McKensie, B. D. y Crowe, L. M. (1987c) Effects of free fatty acids and transition temperature on the stability of dry liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* 979, 7-10.

Crowe, L. M., Mouradian, R., Crowe, J. H., Jackson, S. A. y Womersley, C. (1984a) Effects of carbohydrates on membrane stability at low waters activities. *Biochem. Biophys. Acta*. 769, 141-150.

Cuber, R., Eleutherio, E. C. A., M. D., Pereira, M. D. y Panek, A. D. (1997) The role of the trehalose transporter during germination. *Biochem. Biophys. Acta*. 1330, 165-171.

Davenport, L., Knutson, J. R. y Brand, L. (1986) Anisotropy decay associated fluorescent spectra and analysis of rotational heterogeneity 2. 1,6 Diphenyl 1, 3, 5, hexatriene in lipid bilayers. *Biochemistry*. 25, 1811-1816.

De Araujo, P. S., Panek, A. C., Crowe, J. H., Panek, A. D. y Crowe, L. M. (1991) Trehalose transport in yeast cells. *Biochem Int.* 24,731-737.

De Araujo, P. S. (1996) The role of trehalose in cell stress. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 873-875.

De Araujo, P. S. y Panek, A. D. (1993) The interaction of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase with membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1148, 303-307.

Dickson, R. C., Elzbieta, E. N., Skrzypeck, M., Tillman, P., Wells, G. B. y Lester, R. L. (1997) Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*?. *J. Biol. Chem.* 272, 48, 30196-30200.

Diniz-Mendez, L. Bernardes, E. de De Araujo, P. S. Panek, A. D. y Paschoalin, V. M. F. (1999) Preservation of Frozen Yeast Cells by Trehalose. *Biotechnol and Bioengineering.* 65, 5, 573-578.

Fagundas-Felix, C., Cortes Moreira, C., Santos Oliveira, M., Sola Penna, M., Meyer-Fernandes, J. R. y Ferreira-Pereira, A. (1999) Protection against thermal denaturation by trehalose on the plasma membrane H⁺ ATPase from yeast. *Eur. J. Biochem.* 266, 660-664.

Fleischmann Colombiana Inc. Planta Industrial, Palmira, Valle, Colombia. Inc. (1992)

François, J., Blazquez, M. A., Arino, J. y Gancedo, C. (1997) Storage carbohydrates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. En Zimmermann, F. K., Entian, K. D. Yeast sugar metabolism. Technomics, Lancaster, PA, Pp: 285-311.

Fujii, S., Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, T. y Komatsu, Y. (1996) Characterization of a barotolerant mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of trehalose content and membrane fluidity. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 97-101.

Gadd, G. M., Chalmers, K. y Reed, R. H. (1987) The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 48, 249-254.

Geankoplis, C. J. (1988) Secado de materiales de proceso. En *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. Ceca (Ed). Méx, México. Cap. 9. Pp. 579-619.

Gould, G. W. (1996) Methods for preservation and extension of shelf life. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 51-64.

Gross, C., y Watson, K. (1996) Heat shock protein synthesis and trehalose accumulation are not required for induced thermotolerance in derepressed *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 766-772.

Han, E-Y., Cotty, F., Sottas, C., Jiang, H. y Michels, C. A. (1995) Characterization of AGT1 encoding a general ? glucoside transporter from *Saccharomyces cerevisiae* Mol. Microbiol. 17, 1093-1117.

Harrison, J. S y Trevelyan, W. E. (1963) Phospholipid breakdown in baker's yeast during drying. Nature. 200, 1189-1190.

Hazel, J. R. (1995) Termal Adaptation in Biological membranes: is Homeoviscous adaptation the Explanation? Annu. Rev. Physiol. 57, 19-42.

Hazel, J. R. y Williams, E. E. (1990) The Role of Alterations in Membrane Lipid Composition in Enabling Physiological Adaptation of Organisms To Their Physical Environment. Prog. Lipid Res. 29, 167-227.

Herrera, T., Peterson, W. H., Cooper, E. J. y Pepler, H. (1956). Loss of cell constituents on reconstitution of active yeast. Arch. Biochem. Biophys. 63, 131-143.

Hincha, D. K. (1989) Low concentrations of trehalose protect isolated thylakoids against mechanical freeze-thaw damage. Biochim. Biophys. Acta. 987, 231-234.

Hincha, D. K. y Crowe, J. H. (1998) Trehalose increases freeze-thaw damage in liposomes containing chloroplast glycolipids. Cryobiology 36, 245-249.

Hottiger, T., Boller, T. y Wiemken, A. (1987) Rapid changes of heat and dessication tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. FEBS. 220, 1, 113-115.

Jones, M. N., Chapman, D. (1995a) En Micelles, monolayers and biomembranes Wiley-Liss, (Ed) N.Y. EEUUA. Pp. 143-179.

Jones, M. N., (1996) En Surface activity of proteins: Chemical and Physicochemical modifications. Marcel Dekker, (Ed) N.Y. EEUUA. Pp: 237-284.

Jones, M. N. (1999) Surfactants in membrane solubilisation. Int. J. Pharmaceut. 177, 137-159.

Klis, F. M. (1994) Cell Wall Assembly in Yeast. Yeast, 10, 851-869.

Klis, F. M., Piertenella, M., Hellingwerf, K. y Brul, S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 26, 239-256.

Krallish, I., Jeppsson H., Rapoport A y Hahn-Hägerdal, B. (1997) Effect of xylitol and trehalose on dry resistance of yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 447-451.

Langejan, A. (1974) Dried bakers yeast. United Kingdom G. B. 1 230 205 (1971); United States U.S. Patent 3 843 800. Washington, D.C. EEUUA.

Layne, K. (1957) Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. En *Methods in Enzymology*. Colowick, S. y Kaplan, N. O., (Ed.) Academic Press, N.Y., Vol III. Pp. 447-454.

Leslie, S. B., Teter, S. H., Crowe, L. M. y Crowe, J. H. (1994) Trehalose lowers membrane transitions in dry yeast. *Biochem. Biophys. Acta.* 1192, 7-13.

Leslie, S. B., Israeli, E., Lightart, B., Crowe, J. H., y Crowe, L.M. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied. Environmental. Microbiol.* 61, 10, 3592-3597.

Lewis, J. G., Learmonth, R. P. y Watson, K. (1994) Cryoprotection of yeast by alcohols during rapid freezing. *Cryobiology.* 31, 193-198.

Lewis, J. G., Learmonth, R. P., Attfield, P.V. y Watson, K. (1996) Stress co-tolerance and trehalose content in baking stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind Microbio Biotechnol* 18, 1, 30-36.

Lillie, S. H. y Pringle, J. H. (1980) Reserve Carbohydrate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Responses to Nutrient Limitation. *J. Bacteriol.* Sept, 1384-1394.

Lis, L. J., Tamura-Lis, W. Lim, T. K. y Quinn, P. J. (1990). Phase structures and transitions in fully hydrated diacyltrehalose. *Biochem. Biophys. Acta.* 1021, 201-204.

Lodato, P., Segovia del Huergo M y Buera, M del P. (1999) Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. 52, 215-220.

Lopez-Diez, C. E. y Bone, S. (2000) An investigation of the water-binding properties of protein+ sugar systems. *Phys. Med. Biol.* 45, 3577-3588.

Mujumdar, A. S. (1987) Fluidized Bed Drying. En "Handbook of industrial drying" Marcel

Dekker, (Ed) N.Y.EEUUA. Cap. 6. Pp. 165-208.

Murray, B. y Liang, H-J. (1999) Enhancement of the foaming properties of protein dried in the presence of trehalose. *J. Agric. Food. Chem.* 47, 4984-4991.

Murray, B. y Liang, H-J. (2000) Evidence for conformational stabilization of B - lactoglobulin when dried with trehalose. *Langmuir*, 16, 6061-6063.

Obuchi, K., Kaul, S. C., Iwahashi, H., Ishimura, M. y Komatsu, Y. (1990) membrana fluidity estimated *in vivo* NMR corresponds to freezing thawing viability of yeast. *Cryo. Lett.* 11, 287-294.

Overath, P., Schairer, H. U. y Stoffel, W. (1970) Correlation of *in vivo* and *in vitro* phase transitions of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67, 606-612.

Panek, A. C., Mansure Vania, J. J., Paschoalin, M. F. y Panek, D. (1990) Regulation of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* mutants during temperature shifts. *Biochemie.* 72, 77-79.

Panek, A. D. y Panek, A. C. (1990) Metabolism and thermotolerance function of trehalose in *Saccharomyces*: A current perspective. *J. Biotechnol.* 14, 229-238.

Peña, A., Uribe, S., Clemente, S. M. (1987) Datos no publicados.

Peña, A., Uribe, S., Clemente, S. M. y Sánchez, N. (1992) Rehydration temperature is critical for metabolic competente and for mrmbrane integrity in active dry yeast (ADY). *Arch Microbiol* 158, 75-80.

Piper, W. P. (1995) The heat shock and etanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.* 134, 121-127.

Pottel, H., Vandermeer, W. y Herreman, W. (1983) Correlation between the order parameter and steady-state fluorescent anisotropy of 1,6-Dyphenyl1,3,5-hexatriene and an evaluation of membrana fluidity. *Biochim. Biophys. Acta.* 730, 181-186

Plourde-Owobi, Durner, S., Goma, G. y François, J. (2000) Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae* : phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability. *Inter. J. Food. Microbiol.* 55, 33-40.

Prasad, R. y Rose, A.H. (1986) Involvement of lipids in solute transport in yeasts. *Yeast*. 2, 205-220.

Pravé, P. y Sittig, W. (1987) Biological regulation and process control. En *Fundamentals of Biotechnology*. Springer-Verlag (Ed). Cap. 7, Pp. 238-242. Berlin. Germany.

Quintilio, W., Sato, R. A. Sant' Anna, O. A., Esteves, M. I., Sesso, A., de De Araujo, P. S. y Bueno-da-Costa, M. H. (2000) Large unilamellar vesicles as trealosa-stabilised vehicles for vaccines: Storage time and *in vivo* studies. *J. Cont. Rel.* 67, 409-413.

Rapoport, A., Khroustlayova, G. M. y Kuklina, E. N. (1997) Anhydrobiosis in yeast: Activation effect. *Braz J. Med Biol Res.* 30,1, 9-13.

Read, G. (1989) Comunicación personal. Cuernavaca, Mor., México.

Salas-Mellado, M. y Chang, Y. K. (1999) Efecto del congelamiento de la masa de pan sobre la estructura de las levaduras y el gluten. *Bol. Soc. Bioquim. Acta.* 33, 2, 194-206.

Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E. y Lindsey, G. (2000) The LEA-like proteins HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membrane against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochem. Biophys. Acta.* 1463, 267-278.

Sampedro, J. G., Guerra, G., Pardo, J. P. y Uribe, S. (1998) Trehalose-Mediated Protection of the Plasma Membrane H⁺ATPase from *Kluyveromyces lactis* during Freeze-Drying and Rehydration. *Cryobiology*, 37, 131-138.

Sano, F., Asawaka, N., Inoue, Y. y Sakurai, M. A. (1999) Dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cells to water stress. *Cryobiology* 39, 80-87.

Saravacos, G. D. y Charm, S. E. (1962a) A study of the mechanism of fruit and vegetable dehydration. *Food Technol.* 22, 5, 89-95.

Saravacos, G. D. y Charm, S. E. (1962b) Effect of surface active agents on the dehydration of fruit and vegetables. *Food Technol.* 16, 91-93.

Serrano, R. (1988) H⁺ ATPase from plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: Purification and reconstitution. En *Methods in Enzymology*. Vol 157. Sydney Fleisher (Ed) Academic Press, Inc. San Diego, California EEUA. Pp.157, 533-544.

Sigma-Aldrich Co. (2002-2003) En Reactivos y productos químicos. Mw. EEUUA. Pp. 2009 y 2061.

Simola, M., Hanninen, A-L., Stranius, S-M y Makarow, M. (2000) Trehalose is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum but not for maintenance of membrane traffic functions after severe heat stress. *Molecular Microbiology* 37, 1, 42-53.

Sinensky, M. (1970) Homeoviscous adaptation: A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Sci. U.S A* 71, 522-525.

Singer, M. A. y Lindquist, S. (1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The Yin and Yan of trehalose. *Trends in Biotechnol.* 16, 460-468.

Sola-Penna, M., Ferreira-Pereira, A., Lemos, A. y Meyer-Fernandes, J. R. (1997) Carbohydrate protection of enzyme structure and function against guanidium chloride treatment depends on the nature of the carbohydrate and enzyme. *Eur. J. Biochem.* 248, 24-29.

Sola-Penna, M. y Meyer-Fernandes, R. (1998) Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: Why trehalose is more effective than others sugars?. *Arch. Biochem. Biophysics.* 360, 1, 10-14.

Souillac, P. O., Constantino, H. R., Middaugh, C. R. y Rytting, J. H. (2001) Investigation of Protein/Carbohydrate Interactions in the Dried State. 1. Calorimetric Studies. *J. Pharmaceut. Chem.* 91, 1, 206-216.

Steels, E. L., Learmonth, R. P. y Watson, K. (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology.* 140, 569-576.

Sujatha, J. y Mishra, A. K. (1996) Determination of the partition coefficient of 1-naphtol, an excited state acid, in DMPC membrane. *J. of Photochem. Photobiol A: Chemistry*, 101, 1-2, Pp. 215-219

Sujatha, J. y Mishra, A. K. (1997) Effect of ionic and neutral surfactants on the properties of phospholipid vesicles: Investigation using fluorescent probes. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 104, 173-178.

Sun, W. Q. y Leopold, A. C. (1997) Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A, 327-333.

Suutari, M., Liukkonen, K., y Laakso, S. (1990) Temperature adaptation in yeasts: The role of fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1469-1474.

Swan, T. M. y Watson, K. (1997) Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Can J. Microbiol.* 43, 70-77.

Swan, T. M. y Watson, K. (1998) Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: Role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol. Letters.* 169, 191-197.

Swan, T. M. y Watson, K. (1999) Stress tolerance in a yeast lipid mutant: Membrane lipids influence tolerance to heat and ethanol independently of heat shock proteins and trehalose. *Can J. Microbiol.* 45, 472-479.

Tsvetkov, T. D., Tsonev, L. I., Tsvetkova, N. M., Koynova, R. D. y Tenchov, B. J. (1989) Effect of trehalose on the phase properties of hydrated and lyophilized dipalmitoylphosphatidylcholine Multilayers. *Cryobiology.* 26, 162-169.

Vallée, P. (1989) Comunicación personal. Cuernavaca, Mor., México.

Vandenberg, E. T. y Krul, V. J. (1991) The preservation of adsorption interferents to radiolabelled proteins by "Tween 20". *J. Biochim. Biophys. Meth.* 33, 269-292.

Vásquez, F. (1985) Construcción y operación de un tunel de secado experimental Tesis de licenciatura, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México.

Viera, L. I., Romanowski-Alonso, S., Borovyagin, M. R. y Disalvo, E. A. (1993) Properties of gel phase lipid-trehalose bilayers upon rehydration. *Biochem. Biophys. Acta.* 1145, 157-167.

Wendell, Q. S. y Davidson, P. (1998) Protein inactivation in amorphous sucrose and trehalose matrices: Effects of phase separation and crystallization. *Biochem. Biophys. Acta.* 1452, 235-244.

Yatvin, M. B. (1997) The influence of membrane lipid composition and procaine on hyperthermic death of cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 32, 513-521.

Yon, J. O., Nakamura, H., Ohta, A. y Takagi, M. (1998) Incorporation of extracellular phospholipids and their effect on the growth and lipid metabolism of the *Saccharomyces cerevisiae* chol/pss mutant. *Biochem. Biophys. Acta.* 1394, 23-32.

Yoon, H. P., Pope, J. M. y Wolfe, J. (1998) The effects of solutes on the freezing properties of and hydration forces in lipid lamellar phases. *Biophys. Acta.* 74, 1949-1965.

Zikmanis, P. B., Auzina, L. P., Auzane, S. I., y Beker, M. J. (1980) Relationships between the fatty acid composition and the viability of active dried yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15, 100-103.

Zobel, H. F. (1996) Industrial Propagation and Production of Yeast for the Baking Industry. en: Baked goods freshness technology, evaluation and inhibition. R. E. Hebeda. Marcel Dekker. (Ed) N. Y. EEUUA. Pp. 469- 478.