

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Diffs, S.S., A. Apperson, M.R. Schmidt, M.H. Sauer. 1980. Carbohydrate Transf. in Bacteria. Microbiological Reviews. 44 (3): 385-418.
- 2.- Dimier, R.J. y W.C. Shastler. 1952. Anal. Chem. 24:1411
- 3.- Harold, F.M. 1972. Conservation and Transformation of Energy by Bacterial Membranes. Bacteriological Reviews. 36 (2): 172-230.
- 4.- Parada, J.L., M.V. Ortega y G. Garrillo. 1973. Biochemical and Genetic Characteristics of the *Salmonella typhimurium* Arch. Microbiol. pp 1-12.
- 5.- Stanier, R.Y., E.A. Adelberg y J.L. Ingraham. 1986. Microbiología. Ediciones Reppis, S.A. versión española de la 4ª edición en inglés. pp: 279-284.

PRACTICA No. 7 preparar un extracto alcohólico de levaduras, al cual se le remueven las proteínas y los ácidos nucleicos mediante tratamiento con sales de metales pesados y calor, la cristalización de trehalosa a partir de levaduras es cristalizable. Los cristales obtenidos se les ensayará su capacidad reductora y se identificarán los monómeros constituyentes.

INTRODUCCION

MATERIA: La examinación microscópica de los microorganismos ha revelado que éstos depositan en citoplasma sustancias que pueden considerarse como materiales de reserva. Tales depósitos se acumulan cuando en el medio está presente la fuente de carbono pero el crecimiento se halla impedido ya sea por la carencia de un nutriente o por la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento; bajo estas condiciones, los organismos manifiestan su capacidad de acumular la fuente de carbono en forma de polímeros osmoticamente inertes e insolubles en agua, que cumplen un papel como sustancias de reserva.

Cuando la fuente de carbono escasea, pero el nutriente faltante es aportado al medio de crecimiento, el microorganismo metaboliza las sustancias de reserva para obtener la energía que apoye su crecimiento o bien las emplea para fabricar esporas; en ambos casos logra prolongar su viabilidad en ausencia de fuentes externas de energía.

Las inclusiones de reserva formadas por un microorganismo dependen de las actividades metabólicas del propio organismo, su estado funcional así como del tipo de medio. Entre las inclusiones de reserva que han sido detectadas en las bacterias podemos citar a los gránulos de glicógeno, gotas de lípidos, gotas de azufre, gránulos metacrómicos y gránulos de cianoficina. Por otra parte, las levaduras y los hongos acumulan depósitos de glicógeno, trehalosa, grasas neutras y polifosfatos.

OBJETIVO

El propósito fundamental de esta práctica es aislar la trehalosa a partir de levaduras y caracterizarla parcialmente.

FUNDAMENTO

1.- En la trehalosa (1-0-(α -D-glucopiranosil)- α -D-glucopiranososa) es un disacárido homogéneo, no reductor, descubierto en el cornezuelo del arroz a principios del siglo pasado. Ha sido aislado a partir de plantas superiores, hemolinfa de insectos, capullos de escarabajos parásitos del género *Larinus*, y también ocurre en hongos como *Amanita muscaria*.

Este disacárido de reserva fue aislado por Koch y Koch en 1925 a partir de levaduras, y más tarde por Stewart y colaboradores, a partir de la misma fuente. Estructuralmente este disacárido consiste de dos unidades de α -D-glucosa unidas mediante un enlace glucosídico α 1-1 y posee un poder rotatorio $[\alpha]_D^{20} = +178^\circ$.

AISLAMIENTO DE TREHALOSA A PARTIR DE LEVADURAS

INTRODUCCION

La examinación microscópica de los microorganismos ha revelado que éstos depositan en citoplasmas sustancias que pueden considerarse como materiales de reserva. Tales depósitos se acumulan cuando en el medio está presente la fuente de carbono pero el crecimiento se halla impedido ya sea por la carencia de un nutriente o por la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento; bajo estas condiciones, los organismos manifiestan su capacidad de acumular la fuente de carbono en forma de polímeros - automáticamente inertes e insolubles en agua, que cumplen un papel como sustancias de reserva.

Cuando la fuente de carbono escasea, pero el nutriente faltante es aportado al medio de crecimiento, el microorganismo metaboliza las sustancias de reserva para obtener la energía que apoya su crecimiento o bien las emplea para fabricar esporas; en ambos casos logra prolongar su vitalidad en ausencia de fuentes externas de energía.

Las inclusiones de reserva formadas por un microorganismo dependen de las actividades metabólicas del propio organismo, su estado funcional - así como del tipo de medio. Entre las inclusiones de reserva que han sido detectadas en las bacterias podemos citar a los gránulos de glicógeno, gotas de lípidos, gotas de azufre, gránulos metacromáticos y gránulos de cianoficina. Por otra parte, las levaduras y los hongos acumulan depósitos de glicógeno, trehalosa, grasas neutras y polisacáridos.

OBJETIVO

El propósito fundamental de esta práctica es aislar la trehalosa a partir de levaduras y caracterizarla parcialmente.

FUNDAMENTO

La trehalosa (1-0-(α -D-glucopiranosil)- α -D-glucopiranos) es un disacárido homogéneo, no reductor, descubierto en el cornucopio del error a principios del siglo pasado. Ha sido aislado a partir de plantas superiores, hemelinta de insectos, capullos de escarabajos parásitos del género *Larinus*, y también ocurre en hongos como *Amantia muscaria*.

Este disacárido de reserva fue aislado por Koch y Koch en 1922 a partir de levaduras, y más tarde por Stewart y colaboradores, a partir de la misma fuente. Estructuralmente este disacárido consiste de dos unidades de α -D-glucosa unidas mediante un enlace glicosídico α 1- α 4 y posee un poder rotatorio $[\alpha]_D^{20} = +178^\circ$.

6.- Dejar El aislamiento de trehalosa consiste en preparar un extracto alcohólico de levaduras, al cual se le remueven las proteínas y los ácidos nucleicos mediante tratamiento con sales de metales pesados y calor, la cristalización se logrará adicionando etanol al 95% frío. A los cristales obtenidos se les ensayará su capacidad reductora y se identificarán los monómeros constituyentes.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Levadura de panadería
- 2 vasos de precipitados de 600 ml
- 2 vasos de precipitados de 250 ml
- 1 probeta de 100 ml
- 2 pipetas de 10 ml
- 2 pipetas de 5 ml
- 1 varilla de vidrio
- 1 matraz Kitasato
- 1 embudo Büchner
- 1 manguera ligera a través de un embudo Büchner procurando que el papel filtro recubierto de celite.
- 1 tapón monohoradado
- 1 frasco Gerber filtrado claro a un vaso de precipitados de 600 ml y ajustado a un volumen de 500 ml.
- 1 barra magnética HCl 0.1N.
- 1 base magnética
- 1 potenciómetro solución hasta un volumen de 10 ml. Para ello caliente la solución con una varilla de vidrio para evitar que se derrame el contenido del vaso.
- 1 mechero, tripiéd, tela de asbesto
- 400 ml de alcohol etílico al 95%
- 50 ml de HCl 0.1N
- 50 ml de fenoltaleína
- 200 ml de una solución saturada de $Ba(OH)_2$ frío y mezclar suavemente.
- 1 gramo de celite
- 1 gramo de carbón activado
- 90 ml de alcohol etílico al 70%
- 20 ml de $ZnSO_4$ al 20%
- 1 cuarto frío

MÉTODOS

- 1.- En un vaso de precipitados de 600 ml, colocar 32 gramos de levadura de panadería y adicionar 68 ml de agua destilada.
- 2.- Preparar una suspensión agitando con una varilla de vidrio.
- 3.- Añadir 250 ml de alcohol etílico al 95%.
- 4.- Depositar dentro de la suspensión una barra magnética.
- 5.- Colocar el vaso de precipitados sobre una base magnética y someter a agitación durante 30 minutos.

El aislamiento de trehalosa consiste en preparar un extracto alcohólico de levaduras, al cual se le remueven las proteínas y los ácidos nucleicos mediante tratamiento con sales de metales pesados y calor. La cristalización se logrará adicionando etanol al 95% frío. A los cristales obtenidos se les ensayará su capacidad reductora y se identificarán los monómeros constituyentes.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Levadura de panadería
- 2 vasos de precipitados de 600 ml
- 2 vasos de precipitados de 250 ml
- 1 probeta de 100 ml
- 2 pipetas de 10 ml
- 2 pipetas de 5 ml
- 1 varilla de vidrio
- 1 matraz Kitasato
- 1 embudo Büchner
- 1 manguera
- 1 papel filtro
- 1 tapón monohoradado
- 1 frasco Gerber
- 1 barra magnética
- 1 base magnética
- 1 potenciómetro
- 1 mechero, tripie, tela de asbesto
- 400 ml de alcohol etílico al 95%
- 50 ml de HCl 0.1N
- 50 ml de fenolftaleína
- 500 ml de una solución saturada de Ba(OH)₂
- 1 gramo de celite
- 1 gramo de carbón activado
- 90 ml de alcohol etílico al 70%
- 20 ml de ZnSO₄ al 20%
- 1 cuarto frío

MÉTODOS

- 1.- En un vaso de precipitados de 600 ml, colocar 35 gramos de levadura de panadería y adicionar 80 ml de agua destilada.
- 2.- Preparar una suspensión agitando con una varilla de vidrio.
- 3.- Añadir 250 ml de alcohol etílico al 95%.
- 4.- Depositar dentro de la suspensión una barra magnética.
- 5.- Colocar el vaso de precipitados sobre una base magnética y someter a agitación durante 30 minutos.

- 6.-Dejar reposar durante 10 minutos. Filtrar a través de un embudo Büchner, procurando transferir primero el sobrenadante claro y después el sedimento. Ayudese con una varilla de vidrio.
- 7.-Guardar el filtrado. Lavar el residuo que quedó en el papel filtro, con tres porciones de 30 ml de alcohol etílico al 70%. Conservar los lavados.
- 8.-Combinar los lavados con el filtrado original en un vaso de precipitados de 600 ml.
- 9.-Añadir 20 ml de ZnSO₄ al 20%, 1 ml de Fenolftaleína al 1% y suficiente solución saturada de Ba(OH)₂, hasta que la suspensión tome un color rosa permanente.
- 10.-Luego adicionar 2 gramos de carbón activado y calentar la mezcla a 70°C durante 15 minutos, con agitación constante.
- 11.-Dejar en reposo durante 10 minutos sin retirarlo del fuego, y luego filtrar en caliente a través de un embudo Büchner procurando que el papel filtro esté recubierto de celite.
- 12.-Transferir el filtrado claro a un vaso de precipitados de 600 ml y ajustar el pH a 7 con HCl 0.1N.
- 13.-Concentrar la solución hasta un volumen de 10 ml. Para ello caliente al mechero agitando constantemente la solución con una varilla de vidrio para evitar que se derrame el contenido del vaso.
- 14.-Llevar el concentrado a un frasco Gerber y mantenerlo en baño de hielo.
- 15.-Adicionar lentamente 80 ml de etanol al 95% frío y mezclar suavemente.
- 16.-Dejar en refrigeración durante una semana para permitir la cristalización de la trehalosa.
- 17.-Recolectar los cristales, para ello primero elimine el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta Pasteur, y luego dejar evaporar el alcohol residual, a temperatura ambiente.
- 18.-Una vez secos los cristales proceder a su caracterización.

CARACTERIZACION

- 1.-Preparar una solución acuosa de los cristales y someterlos a las Pruebas de Molisch y de Fehling para determinar su naturaleza química y poder reductor.
- 2.-Prepare una solución acuosa de trehalosa al 0.5% e hidrolícelo con HCl 1N durante 20 minutos. Tanto la solución de trehalosa como el hidrolizado serán sometidos a cromatografía en papel usando como eluyente una mezcla de Butanol:Acético:Agua (4:1:5) y revelando con Anilina.

SOLUCION	DISTANCIA RECORRIDA (cm)
Trehalosa	
Patrón de Trehalosa	

Para establecer la identidad de los productos de hidrólisis de la trehalosa, emplee como patrón soluciones de glucosa y trehalosa.

3.- Haga una observación al microscópio de los cristales obtenidos.

RESULTADOS

1.-En la siguiente tabla anote los resultados obtenidos al realizar las pruebas cualitativas.

SOLUCION	PRUEBA DE MOLISCH	PRUEBA DE FEHLING
Trehalosa obtenida		
Hidrolizado de Trehalosa		
Trehalosa pura		
Agua destilada		

2.- Dibuje los cristales de trehalosa, y comente sobre sus características



3.-En la siguiente tabla anote las distancias recorridas por las manchas desarrolladas en su cromatograma.

SOLUCION	DISTANCIA RECORRIDA (cm)
Trehalosa obtenida	
Trehalosa	
Hidrolizado de Trehalosa	
Patrón de Trehalosa	
Patrón de Glucosa	
Eluente	

6.-Dejar reposar durante 10 minutos. Filtrar a través de un embudo Büchner, procurando transferir primero el sobrenadante claro y después el sedimento. Lavase con una varilla de vidrio.

7.-Guardar el filtrado. Lavar el residuo que quedó en el papel filtro, con tres porciones de 30 ml de alcohol etílico al 70%. Conservar los lavados.

8.-Combinar los lavados con el filtrado original en un vaso de precipitados de 600 ml.

9.-Añadir 20 ml de Na_2SO_4 al 20%, 1 ml de Fenolftaleína al 1% y suficiente solución saturada de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, hasta que la suspensión tome un color rosa permanente.

10.-Luego adicionar 5 gramos de carbón activado y calentar la mezcla a 70°C durante 15 minutos, con agitación constante.

11.-Dejar en reposo durante 10 minutos sin retirarlo del fuego, y luego filtrar en caliente a través de un embudo Büchner procurando que el papel filtro esté recubierto de celite.

12.-Transferir el filtrado claro a un vaso de precipitados de 600 ml y ajustar el pH a 7 con HCl 0.1N.

13.-Concentrar la solución hasta un volumen de 10 ml. Para ello caliente al mechero agitando constantemente la solución con una varilla de vidrio para evitar que se derrame el contenido del vaso.

14.-Llevar el concentrado a un frasco Gerber y mantenerlo en baño de hielo.

15.-Adicionar lentamente 80 ml de etanol al 95% frío y mezclar suavemente.

16.-Dejar en refrigeración durante una semana para permitir la cristalización de la trehalosa.

17.-Recoger los cristales, para ello primero elimine el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta Pasteur, y luego dejar evaporar el alcohol residual, a temperatura ambiente.

18.-Una vez secos los cristales proceder a su caracterización.

CHARACTERIZACION

1.-Preparar una solución acuosa de los cristales y someterlos a las Pruebas de Molisch y de Fehling para determinar su naturaleza química y poder reducir.

2.-Preparar una solución acuosa de trehalosa al 0.5% e hidrolise con HCl 1N durante 20 minutos. Tanto la solución de trehalosa como el hidrolizado serán sometidos a cromatografía en papel usando como eluyente una mezcla de Butanol:Acético:Agua (4:1:5) y revelando con Anilina.

4.- Calcule los Rf's de cada una de las manchas que aparecieron en su cromatograma.

CALCULOS

5.-En la siguiente tabla anota los valores de Rf obtenidos.

SOLUCION	Rf
Trehalosa obtenida	
Hidrolizado de trehalosa	
Patrón de trehalosa	
Patrón de Glucosa	

6.-En la siguiente hoja anexe el cromatograma obtenido o bien una fotocopia del mismo.

Para establecer la identidad de los productos de hidrólisis de la trehalosa, emplee como patrón soluciones de glucosa y trehalosa.

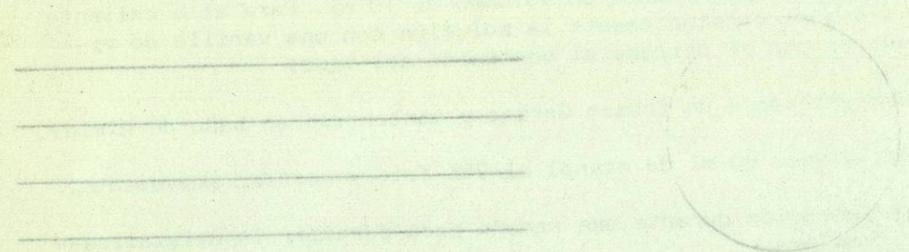
3.- Haga una observación al microscopio de los cristales obtenidos.

RESULTADOS

1.- En la siguiente tabla anote los resultados obtenidos al realizar las pruebas cualitativas.

SOLUCION	PRUEBA DE MOLISCH	PRUEBA DE FENILIN
Trehalosa obtenida		
Hidrolizado de Trehalosa		
Trehalosa pura		
Agua destilada		

2.- Dibuje los cristales de trehalosa, y comente sobre sus características



3.- En la siguiente tabla anote las distancias recorridas por las manchas desafiadas en su cromatograma.

SOLUCION	DISTANCIA RECORRIDA (cm)
Trehalosa	
Hidrolizado de Trehalosa	
Patrón de Trehalosa	
Patrón de Glucosa	
Eluente	