

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS POLÍSACARIDOS DE LA PARED CELULAR DE LAS LEVADURAS

EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF THE YEAST CELL WALL POLYSACCHARIDES

Elba M. Alcázar V¹., Javier P. Arrizon G.¹, Anne C. Gschaedler M.¹, y Eugenia C. Lugo C.¹

montse iq_5@hotmail.com / jparrizon@ciatej.mx / agschaedler@ciatej.mx / elugo@ciatej.mx

Recibido: julio 02, 2016 / Aceptado: septiembre 27, 2016 / Publicado: octubre 10, 2016

Resumen. Los polisacáridos de la pared celular de las levaduras, se dividen en: 1,3 β -glucanos, 1,6 β -glucanos, manoproteínas y quitina. Estos componentes representan una fuente potencial de aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica. Por lo tanto, para su extracción existen diferentes protocolos, en donde para lograr la separación de los componentes de la pared se basan en su solubilidad en soluciones alcalinas y/o en ácidos inorgánicos, que posteriormente son hidrolizados y usualmente cuantificado por técnicas espectrofotométricas con reactivos de fenol-ácido sulfúrico y/o con el reactivo de antrona. Algunas metodologías sólo extraen los componentes celulares en una fracción total, limitando su cuantificación y análisis para el desarrollo de nuevas aplicaciones en las industrias alimentaria y farmacéutica, mientras que otros métodos dividen a la pared celular en sus tres componentes. No obstante, para su cuantificación y análisis utilizan metodologías extensas y complicadas. El objetivo del presente trabajo fue proponer una metodología de extracción de la pared celular de dos cepas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*) a través de una extracción alcalina, dividiendo en tres fracciones los componentes de la pared celular para su posterior cuantificación a partir de cromatografía de líquidos. Se encontró que las cepas de levadura empleadas presentan diferencias estadísticas significativas en la concentración de 1,3 β -glucanos, y que los rendimientos obtenidos en la extracción de la pared celular de ambas cepas de levadura son similares a los reportados en estudios previos. Por lo tanto, podemos concluir que la extracción de la pared celular empleando esta metodología es confiable.

Palabras claves. β -glucanos, manoproteínas, quitina, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*

Abstract. The yeast cell wall polysaccharides, are divided into: 1,3 β -glucans, 1,6 β -glucans, mannoproteins and chitin. These components represent a potential source of applications in the food and drug industry. There are different extraction protocols, which used the solubility of the cell wall components in alkaline and/or inorganic acid solutions. Then, the carbohydrate content in the cell wall is quantified by a phenol-sulfuric acid reaction and/or by anthrone reagent. However, most of these extractions only obtained a total fraction of the cell wall components. The aim of this work was to propose a method for the extraction of the cell wall of two yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*) through an alkaline solution and dividing into three fractions the components of the cell wall, for later quantification with liquid chromatography. It was found that the yeast strain showed statistically differences in the concentration of 1,3 β -glucans. Moreover, the yields obtained in the extraction of the cell wall of both yeast strains are similar to those reported in previous studies. Therefore, we can conclude that the extraction of the cell wall using this methodology is reliable.

Keywords. β -glucans, mannoproteins, chitin, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*

Introducción

En la actualidad, el impacto de las levaduras en la producción de alimentos y bebidas se extiende más allá de las nociones originales de los procesos fermentativos por *Saccharomyces cerevisiae*. Muchos ingredientes

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Av. Normalistas 800, Guadalajara, 44270, Jalisco, México – www.ciatej.mx

valiosos, como el extracto de levadura se utiliza ampliamente en la industria alimenticia, debido a que con él se obtienen sabores como el ahumado, salado, sabor a queso, caldo de pollo o carne [1]. También algunos coadyuvantes son ahora derivados de las levaduras [2], por ejemplo, en la producción de alimentos para animales se utilizan los polisacáridos de la pared celular de las levaduras como coadyuvantes [3]. Además, de las levaduras se pueden obtener enzimas y/o pigmentos, o se pueden emplear como probióticos [4, 5].

En la actualidad, el microorganismo más utilizado industrialmente en el desarrollo de estos productos es *S. cerevisiae*. Debido a que fue uno de los primeros organismos en ser modificados genéticamente para producir aditivos alimenticios [6]. Sin embargo, *Kluyveromyces marxianus* es una levadura que últimamente ha despertado interés industrial por sus aplicaciones biotecnológicas, como lo es su producción de enzimas, ser termotolerante, exhibe altas velocidades de crecimiento, y es una levadura que puede ser utilizada como una nueva plataforma para producir aromas y sabores, Además tiene la cualidad de ser una levadura respiratoria, lo que puede ayudar a la producción de etanol como subproducto [7]. Por lo tanto, *S. cerevisiae* y *K. marxianus* son levaduras que tienen un gran potencial aplicable a la industria.

Recientemente, algunos estudios se han enfocado, en analizar la composición de la pared celular de las levaduras, principalmente de *S. cerevisiae*, para su empleo en el procesamiento de alimentos como agentes espesantes, sustitutos de grasas o como fuente de fibra [3]. Además, se ha estudiado su uso para la estimulación del sistema inmune, así como también la disminución del colesterol, su actividad anti-tumor y su potencial uso en la industria cosmética [8].

La pared celular es una estructura sólida, en la actualidad sólo se conoce que *S. cerevisiae* presenta un grosor de 120 nm y está conformada por dos capas distintas que rodean a la célula. La capa externa es de 34 ± 3 nm de espesor, mientras que su capa interna se estima que es de 86 ± 14 nm de espesor [9]. Sin embargo, se sabe que en las levaduras la pared celular está conformada principalmente por 1,3 β -glucanos, 1,6 β -glucanos, mananos (manoproteínas) y quitina. Los 1,3 β -glucanos son los mayores componentes y forman el soporte fibroso de la pared celular, que es visible en microscopia electrónica de barrido, existe un número similar de 1,6 β -glucanos unidos a los 1,3 β -glucanos (Tabla 1). La fuerza mecánica de la pared se debe principalmente a la capa interna, que consiste en 1,3 β -glucanos y quitina y representan cerca del 50-60% del peso seco de la pared. El complejo 1,3 β -glucanos/quitina es el mayor constituyente de la parte interna de la pared, y los 1,6 β -glucanos enlazan los componentes del interior y el exterior de la pared celular. La parte externa contiene principalmente manoproteínas que están densamente empacadas y limitan la permeabilidad de los solutos [10, 11].

Tabla 1. Macromoléculas de la pared celular en *Saccharomyces cerevisiae* [10]

Macromoléculas	% peso seco	Lugar de síntesis
1,3 β -glucanos	50-55	Membrana plasmática
Mananos (manoproteínas)	35-40	Retículo endoplásmico-Aparato de Golgi-Membrana plasmática
1,6 β -glucanos	5-10	Posiblemente inicie en el Aparato de Golgi y termina en la Membrana plasmática
Quitina	1-2	Membrana plasmática

Para la extracción de la pared celular se han desarrollado diferentes metodologías. La mayoría de los protocolos emplean diferenciación de los componentes celulares, basados en su solubilidad en soluciones alcalinas y/o en ácidos inorgánicos, y en donde el contenido de los carbohidratos en la pared celular es usualmente determinado por los reactivos de fenol-ácido sulfúrico y/o por el reactivo de antrona [12, 13]. Francois (2006) empleó el ácido sulfúrico para la extracción de la pared celular de *S. cerevisiae*, obteniendo en una sola fracción los componentes de la pared celular, para posteriormente cuantificar los β -glucanos empleando el reactivo de fenol-ácido sulfúrico y la cromatografía de líquidos para cuantificar la quitina [13]. Sin embargo, Schiavone y col. (2014), reportan que las extracciones ácidas no permiten la distinción entre los 1, 3 β -glucanos y 1-6 β -glucanos de la pared celular además de que la hidrólisis no es eficiente para la cuantificación de la quitina, por lo que la hidrólisis enzimática para la cuantificación de los polisacáridos de la pared celular es una técnica confiable, ya que es específica para cada polisacárido de la pared celular [14]. Finalmente, Nguyen y col. (1998) realizaron la extracción y el fraccionamiento de la pared celular de varias cepas de levadura, entre ellas *S. cerevisiae* y *K. marxianus*, empleando un homogenizador para extraer la pared celular, además de soluciones alcalinas para dividir los componentes de la pared celular en tres fracciones, y finalmente los polisacáridos fueron derivatizados para ser analizados por cromatografía de gases [8].

Por lo tanto, el presente trabajo pretende establecer una metodología para la extracción y cuantificación de los componentes de la pared celular de *S. cerevisiae* y *K. marxianus*. Realizando una extracción con soluciones alcalinas, para posteriormente realizar una serie de hidrólisis enzimáticas y la cuantificación de los componentes de la pared por cromatografía de líquidos.

Materiales y Métodos

Microorganismos

Se emplearon dos cepas de levadura pertenecientes a la colección de microorganismos del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ AC), una *Saccharomyces cerevisiae* (AR5) y una *Kluyveromyces marxianus* (SLP1).

Condiciones de Crecimiento

Cada cepa de levadura (*S. cerevisiae* y *K. marxianus*) creció en matraces Erlenmeyer de 250 mL por 12 horas a 30°C con agitación (250 rpm), un pH inicial de 4.5, en 25 mL de medio YPD (20% de glucosa, 20% de bacto-peptona y 10% de extracto de levadura, p/v). Una vez transcurridas las 12 horas de crecimiento, la biomasa fue lavada dos veces con agua destilada (9000 x g, 4°C, 5 min).

Extracción de la pared celular

Para la extracción de la pared celular, el presente trabajo se basó en la metodología propuesta por Nguyen y col. (1998). Se suspendió la biomasa (levaduras) en un bufer de fosfatos 0.1 M a pH de 8.5, posteriormente fueron homogenizadas por 5 minutos a una velocidad de 21637 x g (Ultra-turrax T25 basic, S25N-10G). Una vez homogenizadas la solución paso 5 veces por un microfluidizador (Microfluidics M-110P, USA) bajo una presión de 137,895 KPa. Hasta que se obtuvo un tamaño de partícula de 53.41 nm.

La pared celular fue separada por centrifugación (Hermle Z383, Alemania) a 9000 x g por 15 minutos, posteriormente la pared fue lavada 5 veces con el bufer de fosfato 0.1 M a pH 8.5 y después fue lavada con agua destilada 4 veces. La temperatura se mantuvo todo el tiempo por debajo de los 5°C y la velocidad de los lavados fue de 9000 x g por 15 minutos. Posteriormente los componentes de la pared fueron extraídos bajo atmosfera de nitrógeno con una solución de 1 M de hidróxido de potasio (100 mL por cada gramo de pared seca) en un orbital a 10°C por 20 h a 200 rpm. La solución fue centrifugada 3 veces a 4°C a una velocidad de 9000 x g por 15 minutos, conservándose el sobrenadante y el residuo. El residuo se re-extrajo 2 veces más bajo atmosfera de nitrógeno con 1 M de hidróxido de potasio por 2 h a 10°C.

Finalmente, se combinaron los sobrenadantes, que se saturaron con sulfato de amonio y se filtraron a través de un papel de fibra de vidrio, posteriormente se refrigeraron las muestras ya filtradas toda la noche a 4°C. Se forma un precipitado blanco que es recuperado por centrifugación a 4°C y 9000 x g durante 30 minutos. El residuo de la pared, el precipitado y el sobrenadante fueron identificados como fracciones de glucanos álcali-insolubles/quitina, glucanos álcali-solubles y manoproteínas [8] (Figura 1).

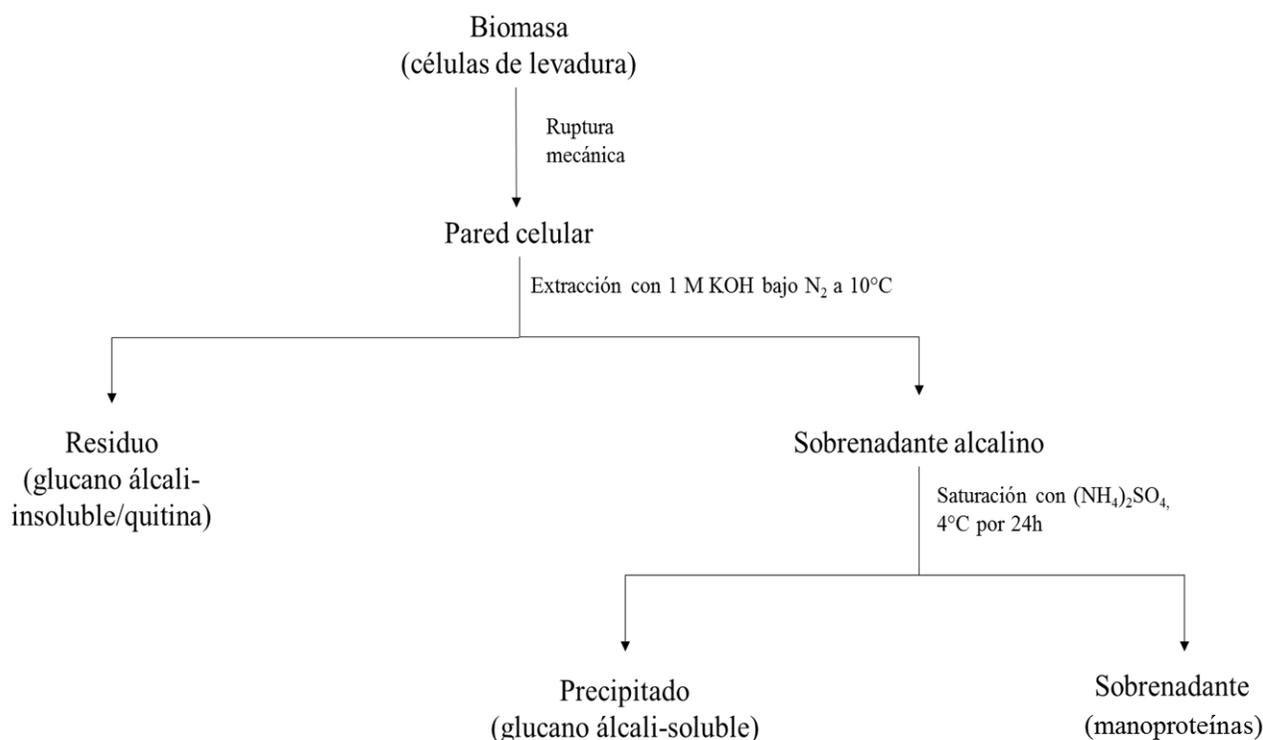


Figura 1. Diagrama para la extracción de los componentes de la pared celular [8].

Perfil de Carbohidratos

Las tres fracciones de la extracción alcalina fueron hidrolizadas enzimáticamente por 2.5 h a una temperatura de 37°C a una velocidad de 300 rpm (Thermomixer confort, Eppendorf, USA), empleando dos enzimas comerciales de Sigma-Aldrich ®: *Chitinase* de *Trichoderma viride* y una *Endo-1-3 (4)-β-Glucanasa*.

Posteriormente, las fracciones hidrolizadas fueron analizadas por cromatografía de líquidos (HPLC Agilent 1220 Infinity LC) los detectores que se utilizaron fueron de índice de refracción (RID) a 50°C y UV a 210 nm. La columna que se empleó fue la Biorad-Aminex ® HPX-87H (300 x 7.8 mm). El flujo de trabajo fue de

0.50 mL min⁻¹, la temperatura del horno fue de 50°C, el volumen de inyección de 40 µL. La fase móvil fue ácido sulfúrico 5mM [15]. Para la cuantificación de los componentes de la pared celular se realizaron curvas de calibración de glucosa, manosa y N-acetilglucosamina.

La extracción de la pared celular de ambas cepas de levadura se realizó por duplicado, para posteriormente realizar un análisis de varianza para conocer si existen diferencias estadísticas significativas entre el tipo de cepa de levadura y la concentración de los polímeros de la pared celular. Para ello se empleó el software STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.11 (StatPoint Technologies, EUA).

Resultados y Discusiones

En el presente trabajo, se realizó una extracción alcalina, debido a que se empleó el hidróxido de potasio, para separar los componentes de la pared celular. Por lo anterior, los polímeros de 1,3 β-glucanos y quitina son insolubles bajo estas circunstancias (glucanos-alcali-insolubles/quitina), mientras que los 1,6 β-glucanos (glucanos álcali-solubles) y las manoproteínas (mananos) son solubles [11].

Tabla 2 Composición de la pared celular

<i>Cepa de Levadura</i>	<i>1,3 β-glucanos</i> (mg g ⁻¹ pared)	<i>1,6 β-glucanos</i> (mg g ⁻¹ pared)	<i>Mananos</i> (mg g ⁻¹ pared)	<i>Quitina</i> (mg g ⁻¹ pared)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^a	290.55 ± 0.35	204.35 ± 0.92	14.25 ± 1.06	1.49 ± 0.33
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ^b	851.95 ± 0.07	206.35 ± 3.75	32.80 ± 0.42	3.59 ± 0.78

a. Total de pared celular extraída 510.65 mg de pared para *S. cerevisiae*, b. Total de pared celular extraída 1094.69 mg de pared *K. marxianus*

Se observa que tanto la concentración de 1,3 β-glucanos y manoproteínas fue mayor en la cepa de *K. marxianus* (Tabla 2), esta diferencia en la conformación de la pared celular de *K. marxianus* se puede deber a varios factores, por ejemplo la cepa de *K. marxianus* es una levadura Crabtree negativa lo que quiere decir que el mecanismo por el cual consume el azúcar es distinto al de *S. cerevisiae* que es una levadura Crabtree positiva [16], por lo que puede ser que la conformación de la pared celular de ambas levaduras sea diferente para poder realizar dichos mecanismos. Además, la pared celular es una estructura dinámica, que se modifica en función de las condiciones de crecimiento de cada microorganismo [17], lo que puede originar que la concentración de los polisacáridos de la pared celular varíe de una cepa a otra. También se puede deber a que la cepa de *K. marxianus* se ha caracterizado por ser una cepa productora de enzimas [7], esto puede generar también cambios en la conformación de su pared para poder excretar y producir estas enzimas. Finalmente, de acuerdo al análisis de varianza existen diferencias estadísticas significativas (valor-P < 0.05) en la concentración de 1,3 β-glucanos y mananos, de ambas cepas de levadura. Mientras que, en la concentración de 1,6 β-glucanos y quitina no existen diferencias estadísticas significativas.

Al comparar nuestro trabajo con el realizado por Francois (2006) donde el realiza una extracción ácida de la pared celular de *S. cerevisiae*, podemos observar que a diferencia del método propuesto por el autor, en donde sólo se obtiene la pared celular en una fracción total, en el presente trabajo se dividieron los componentes de la pared celular en tres fracciones diferentes de acuerdo a su solubilidad en una solución alcalina (Figura 1).

En el caso de los resultados reportados por Nguyen y col. (1998), podemos observar que los rendimientos obtenidos (Tabla 3) son similares. No obstante, se observa que el error se disminuye considerablemente al emplear la metodología propuesta en este estudio. Lo anterior se puede atribuir a la extracción de la pared celular empleando la microfluidización, ya que se obtuvo un tamaño de partícula más homogéneo, a diferencia de la extracción mecánica propuesta por Nguyen y col. Además, al realizar una hidrólisis enzimática y el empleo de la cromatografía de líquidos para la cuantificación de los carbohidratos de la pared celular, resulta ser una metodología más sencilla en lugar de manipular la muestra con una serie de reacciones químicas para posteriormente cuantificarla por cromatografía de gases [8].

Finalmente, se observa que la extracción por medios alcalinos ayuda a facilitar la hidrólisis enzimática de los componentes de la pared celular, en lugar de emplear ácidos orgánicos en donde los rendimientos de la enzima disminuyen considerablemente [14].

Tabla 3. Rendimientos (%) de los componentes celulares de varias especies de levadura

Cepa de levadura	1,3 β -glucano	1,6 β -glucano	Manoproteína	Quitina
<i>K. marxianus</i> R157*	40.6 \pm 5.4	10 \pm 4.2	34.1 \pm 4.1	4.06 \pm 0.35
<i>K. marxianus</i> 1586*	18.5 \pm 1.2	48 \pm 3.1	25.6 \pm 3.5	1.11 \pm 0.10
<i>K. marxianus</i> SLP1†	47.91 \pm 0.3	18.85 \pm 0.3	29.96 \pm 0.2	3.28 \pm 0.1
<i>S. cerevisiae</i> AR5†	29.16 \pm 0.2	40.02 \pm 1.0	27.90 \pm 0.1	2.92 \pm 0.1
<i>S. cerevisiae</i> 1117*	37.5 \pm 3.0	33.5 \pm 4.1	24.4 \pm 3.5	3.36 \pm 0.25
<i>S. cerevisiae</i> ‡	80.42 \pm 3.5*		13.38 \pm 3.2	6.2 \pm 0.55

*Rendimientos obtenidos por Nguyen y colaboradores 1998, † Rendimientos obtenidos en el presente trabajo en función de la biomasa seca (1.60 \pm 0.2 para AR5 y 3.06 \pm 0.1 para SLP1), ‡ Rendimientos obtenidos por Francois 2006, • el método de Francois 2006 no fracciona los componentes en 1,3 β -glucanos y 1, 6 β -glucanos sino que los cuantifica como β -glucanos

Conclusiones

De acuerdo con los rendimientos obtenidos, se concluye que la metodología desarrollada en el presente estudio es confiable debido a que los rendimientos obtenidos se encuentran dentro de los rangos reportados en estudios previos. Además, la metodología propuesta permite extraer y cuantificar todos los polisacáridos de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* de forma independiente, a diferencia de otros trabajos que no distinguen entre los β -glucanos, debido a que al realizar la extracción de la pared celular empleando la microfluidización podemos obtener un tamaño de partícula más homogéneo, que facilita la hidrólisis de los polisacáridos de la pared celular. Se observó que la utilización de soluciones alcalinas facilita dicha hidrólisis, al dividir los polisacáridos de la pared celular de acuerdo a su solubilidad. Además, la hidrólisis enzimática tiene la ventaja de ser más específica que una hidrólisis ácida y evita que los

monosacáridos presentes en la pared celular se oxidan a furanos por cuestiones de temperatura y pH. Finalmente, los monosacáridos se pueden cuantificar de una forma rápida y sencilla empleando la cromatografía de líquidos en comparación con la derivatización que se necesitaría hacer para emplear la cromatografía de gases.

Agradecimientos

EMAV agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudio de doctorado recibida.

Referencias

1. Vieira E. F., Carvalho J., Pinto E., Cunha S., Almeida A. A., Ferreira I. M. P. L. V. O. (2016). Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer's spent yeast extract. *Journal of Food Composition and Analysis*, doi:10.1016/j.jfca.2016.07.006.
2. Fleet G. H. (2006). The commercial and community significance of yeast in food and beverage production. *The Yeast Handbook Volume 2*. Querol A and Fleet G. H. (eds). First Edition, 1-12. Springer, Germany.
3. Kwiatkowski S., Kwiatkowski S. E. (2012). Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) glucan polysaccharides-occurrence, separation and application in food, feed and health industries. *The complex world of polysaccharides*. Karunaratne D. N. (ed). First Edition, 47-70. In Tech, USA.
4. Echavarrin-Erasun C., Johnson E.A. (2004) Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum*. *FEMS Yeasts Research*. **4** (4-5): 511-519.
5. Czerucka D., Piche T., Rampal P. (2007) Review article: yeast as probiotics- *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. **26** 767-778.
6. Verstrepen K. J., Chambers P. J., Pretorius I. S. (2006). The development of superior yeast strains for the food and beverage industries: challenges, opportunities and potential benefits. *The Yeast Handbook Volume 2*. Querol A. and Fleet G. H. (eds). First Edition, 309-444. Springer, Germany.
7. Morrissey J. P., Etschmann M. M. W., Schrader J., de Billerbeck G. M. (2015) Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavor and fragrance molecules. *Yeast*. **32**: 3-16.
8. Nguyen T. H., Fleet G. H., Rogers P. L. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied Microbiology Biotechnology*. **50**: 206-212.
9. Francois J. M. (2016) Cell surface interference with plasma membrane and transport processes in yeast. *Yeast membrane transport*. Ramos J., Sychrova H., Kschischo M. (eds). 11-31. Springer, Switzerland.
10. Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Review*. **26**: 239-256.
11. Lipke P. N., Ovalle R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal Bacteriology*. **180** (15): 3735-3740.
12. Farkas V. (2003). Structure and biosynthesis of fungal cell walls: methodological approaches. *Folia Microbiology*. **48** (4): 469-478.
13. Francois J. M. (2006). A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls. *Nature Protocols* **1** (6): 2995-3000.
14. Schiavone M., Vax A., Formosa C., Martin-Yken H., Daque E., Francois J. M. (2014). A combined chemical and enzymatic method to determine quantitatively the polysaccharide components in the cell wall of yeast. *FEMS yeast Research* **14** (6): 933-947.
15. Gonzalez-Ramos D., Cebollero E., Gonzalez R. (2008). A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze. *Applied Environmental Microbiology*. **74** (17): 5533-5540.
16. Van Dijken J. P., Weusthuis R. A., Pronk J. T. (1993). Kinetics of growth and sugar consumption in yeast. *Antonie van Leeuwenhoek*. **63**: 343-352.
17. Cabib E., Arroyo J. (2013). How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nature*. **11**: 648-656.