



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL**



**Tesis Presentada en Opción al Título Académico de Máster en Biotecnología
Mención Industrial**

Influencia del pH sobre el contenido y composición de la pared celular de la levadura *Kluyveromyces marxianus*

**Autora: Lic. Imilci Urdaneta Laffita.
Tutor: Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Díaz**

**2016
“Año 58 de la Revolución”.**



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL**



**Tesis Presentada en Opción al Título Académico de Máster en Biotecnología
Mención Industrial**

Influencia del pH sobre el contenido y composición de la pared celular de la levadura *Kluyveromyces marxianus*

**Autora: Lic. Imilci Urdaneta Laffita.
Tutor: Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Díaz**

**2016
“Año 58 de la Revolución”.**

Pensamiento
Pensamiento

PENSAMIENTO

Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la investigación desinteresada e incesante de la verdad”.

Karl Popper.

Dedicatoria
Dedicatoria

DEDICATORIA

A mis hijos.

A mis padres.

A mi esposo.

Agradecimientos
Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de un modo u otro han dado su apoyo para el desarrollo y culminación de esta tesis.

En especial agradecer a:

A mi tutor Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Díaz, por su confianza y trabajo tutorial definitorio durante la realización de esta tesis.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento de Farmacia, que me han ayudado de manera que ellos nunca sabrán, y a los cuales considero como parte de mi familia.

A los trabajadores del CEBI por su apoyo brindado todo este tiempo.

A los profesores: Yaumel de Física, Andrea de Biología y Roberto, Pacheco, Argenis, Biguín, Jordan de Química, por su contribución en la realización de esta investigación.

A los estudiantes: Marcia, Jose Alberto y Angel Daniel de las carreras de Física, Química e Ingeniería Química, respectivamente.

A Eugenito, por su ayuda desinteresada e incondicional en los servicios de imprenta.

A mi familia, ante todo a mis padres, por su preocupación y apoyo incondicional a lo largo de la realización de esta tesis. A mis hijos, que son el motor impulsor de mi vida. A mi esposo Alexis, por todo su amor, ayuda y paciencia. A mi hermano y cuñada por su cooperación.

A todo el colectivo de profesores de la maestría por sus enseñanzas.

A Dios.

Resumen
Resumen

RESUMEN

Recientes estudios avalan los efectos inmunomoduladores, prebióticos e hipocolesterolémicos de los polisacáridos derivados de paredes celulares de levadura. En este trabajo se evaluó la influencia del pH sobre el contenido y composición de la pared celular de la levadura *Kluyveromyces marxianus*. Se encontró que el contenido promedio de pared celular estuvo en el rango referido habitualmente (10-30%); el valor más bajo ($7,1 \pm 2,2$ %) correspondió al cultivo pH 5 tamponado con citrato de sodio. La composición de manoproteínas, quitina y carbohidratos totales de la pared celular se hace máxima a pH 5, en tanto el contenido de proteínas covalentemente enlazada a los polisacáridos de la pared es mayor a pH 3. Estos resultados sugieren que las condiciones de pH del cultivo, resultan de especial significación para el desarrollo de procesos productivos de preparados de pared celular con una actividad biológica particular.

Palabras clave: *Kluyveromyces marxianus*, pared celular de levadura, pH, manoproteínas, quitina.

Abstract
Abstract

ABSTRACT

Recent studies support the immunomodulatory, prebiotic and hypocholesterolemic effects of polysaccharides derived from yeast cell walls. In this study the influence of the pH on the content and composition of the cell wall in yeast *Kluyveromyces marxianus* was evaluated. It was found that the average specific mass of the cell wall ranged according to usually referred values (10-30%); the lowest value ($7,1 \pm 2,2$ %) corresponded to the culture at pH 5 buffered with sodium citrate. The cell wall composition in mannoproteins, chitin and total carbohydrates reached the maximum value at pH 5, meanwhile the content of covalently linked proteins is higher at pH 3. These results suggest that the pH of the culture medium is an issue of special significance for the development of production processes of cell wall preparations with a particular biological activity.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, yeast cell wall, pH, mannoproteins, chitin

Índice
Índice

ÍNDICE

	Contenido	Pág.
	INTRODUCCIÓN	1
I	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
I.1	Levaduras	4
I.2	Pared celular de levadura	4
I.2.1	Composición, estructura y función biológica	4
I.2.2	Variación de la composición de la pared celular	5
I.2.3	Influencia de las condiciones nutricionales del medio de cultivo y de los factores ambientales sobre la composición y morfología de la pared celular	6
I.2.4	Aplicaciones de productos derivados de pared celular de levadura	6
I.3	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	7
I.3.1	Clasificación científica y características generales	7
I.3.2	Potencial Biotecnológico	8
I.4	<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCEBI 2011	9
II	MATERIALES Y MÉTODOS	10
II.1	Cultivo de la levadura y colecta de la biomasa	10
II.1.1	Microorganismo	10
II.1.2	Medios de cultivos	10
II.1.3	Preparación de inóculos	11
II.1.4	Fermentación	11
II.1.5	Colecta de la biomasa	12
II.2	Determinación de la masa celular promedio y del contenido de pared celular	12
II.2.1	Determinación gravimétrica de la concentración de biomasa	12
II.2.2	Determinación de la concentración celular de la suspensión de levaduras	12
II.2.3	Cálculo de la masa celular promedio	13
II.2.4	Ruptura celular y preparación de paredes celulares de levadura	13
II.3	Análisis morfométrico de las células de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCEBI 2011 mediante Microscopía Holográfica Digital	14
II.3.1	Preparación de la muestras	14
II.3.2	Captura y reconstrucción de los hologramas	14
II.4	Caracterización de la composición de la pared celular	14
II.4.1	Análisis de los extractos en solución detergente de SDS+ - mercaptoetanol	15
II.4.1.1	Precipitación de proteínas con cloroformo/metanol	15
II.4.1.2	Precipitación de mananos y manoproteínas con el reactivo de Fehling	15
II.4.2	Hidrólisis ácida de la pared celular con ácido sulfúrico	16

II.4.2.1	Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético	17
II.4.3	Hidrólisis con NaOH/HCl para la determinación de quitina	17
II.5	Determinaciones analíticas	17
II.5.1	Determinación colorimétrica de quitina	18
II.6	Procesamiento de Datos	19
III	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
III.1	Influencia del pH sobre la masa y tamaño celular promedio y el contenido de pared celular de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCEBI 2011	20
III.1.1	Masa celular promedio y contenido de pared celular de la levadura	20
III.1.2	Tamaño celular promedio de la levadura	21
III.2	Variación de la composición de la pared celular de la levadura a diferentes valores del pH del medio de cultivo	23
III.2.1	Proteínas totales y manoproteínas	23
III.2.2	Caracterización de la composición en monosacáridos de pared celular de levadura y proteína enlazada a membrana	25
	CONCLUSIONES	27
	RECOMENDACIONES	28
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
	ANEXOS	

Introducción

Introducción

INTRODUCCIÓN

La pared celular de las levaduras y de otros hongos determina la forma celular e integridad del organismo durante el crecimiento y la división celular. Es una estructura rígida con gran plasticidad y representa el 10 a 30 % del peso seco de la célula, entre sus funciones se encuentran la de controlar la permeabilidad celular y proteger a la célula de los ataques enzimáticos y de los diferentes tipos de estrés ambiental como son los cambios osmóticos^{1; 2; 3; 4}. Los constituyentes estructurales mayoritarios de la pared celular son los polisacáridos (80 a 90 %), destacándose los β -glucanos, las manoproteínas y la quitina, esta última en un porcentaje menor⁴.

En las últimas décadas, el 1,3- β -D glucano, usualmente nombrado “ β -glucano” o “glucano” y β -D-manano (manano), han llamado la atención de muchos investigadores debido a que los productos obtenidos a partir de estos compuestos ofrecen numerosos beneficios para la salud en los humanos y en los animales, y en especial los del β -glucano⁵. Por ejemplo, en trabajos publicados sobre algunas alternativas de productos naturales derivados de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* empleados para la sustitución de los antibióticos como promotores de crecimiento en aves, se demostró que la presencia de componentes activos de pared celular de levadura como glucanos y mananos ofrecen grandes beneficios en la producción de las aves debido a sus efectos inmuno-estimulantes y como colonizadores de la mucosa intestinal, impidiendo así la adhesión de algunas bacterias entero patógenas^{6,7}.

Desde la década de los 80 varios estudios han señalado los efectos del β -glucano en la terapia del cáncer^{8, 9, 10}. En experimentos preclínicos de productos comerciales de β -glucanos de pared celular de *S. cerevisiae* en combinación con algunos anticuerpos monoclonales o vacunas para el cáncer, se observó una mejora en la supervivencia a largo plazo que superaba a la que se obtenía con el tratamiento exclusivo con anticuerpos monoclonales. Otro estudio demostró que la administración concomitante de β -glucanos con la ciclofosfamida potenciaba el efecto quimioterapéutico de este último. Además del efecto antitumoral, los β -glucanos tienen reportados actividades antiinflamatoria, antimicrobiana, antiviral, radioprotector, cicatrizante y como protector de la piel¹¹.

En otra investigación, pero dirigida a la comparación de actividad hipocolesterolémica de 81 levaduras, se encontró que la *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 exhibía un efecto hipocolesterolémico más potente que las otras levaduras estudiadas¹². Más tarde, estos mismos investigadores reportaron que los polisacáridos de la pared celular de esta levadura eran los principales componentes activos para dicha actividad¹³ y que las características estructurales que presentaban los mananos de pared celular estaban muy asociadas a esta elevada respuesta hipocolesterolémica¹⁴.

La *K. marxianus*, es una especie de levadura que representa un gran potencial para los procesos fermentativos industriales, se caracteriza por tener elevada capacidad de metabolizar un amplio rango de sustratos, habilidad de crecer a altas temperaturas y velocidad de crecimiento rápido con una alta capacidad de convertir azúcares en biomasa, convirtiéndose en un organismo de elección para la obtención de compuestos naturales con elevadas productividades^{15,16,17,18,19, 20, 21}. Es considerada generalmente como segura o GRAS (Generally Regarded As Safe), permitiendo la aplicación del microorganismo y sus derivados (aromas como el 2-feniletanol²², enzimas -galactosidasa²³ e inulinasa, etc.) en las industrias alimenticia, farmacéutica, cosmética y biotecnológica^{24, 25}.

En el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente, se llevan a cabo investigaciones biotecnológicas de reconocido impacto en la Región Oriental de Cuba, de las cuales se requieren estudios sobre la influencia de las condiciones medioambientales de los cultivos sobre el crecimiento y fisiología de diferentes microorganismos para su posterior aplicación. Entre estos se destaca el uso de la levadura *K marxianus* CCEBI 2011, la cual ha sido estudiada en los últimos años, tanto desde el punto de vista fisiológico como de su potencial de aplicaciones, ejemplo: en la producción de la enzima endopoligalacturonasa y de etanol, constituyendo una alternativa para la diversificación de la industria alimenticia y alcoholera en nuestro país^{26, 27}.

Es conocido de estudios realizados por otros autores^{15, 28, 29, 30, 31, 32, 33} que las condiciones de cultivo, tanto las nutricionales como las ambientales (pH, temperatura, presión osmótica) inciden en los parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento, así como, en la composición y masa específica de la pared celular³⁴. De estos parámetros, el pH resulta de particular interés por cuanto en los estudios referidos muestra una influencia destacada. Además, el control del pH es desde el punto de vista práctico y de la economía del bioproceso uno de los más atractivos. Sin embargo, debe señalarse que los estudios sobre la influencia de las condiciones de cultivo sobre la composición de pared celular en levaduras han sido escasos y no siempre han abarcado toda la dimensión del problema relacionado con maximizar la producción de pared celular en levaduras. Por otro lado, ninguno de estos estudios se ha realizado para la especie *K. marxianus*.

De todo lo antes señalado nos planteamos como **problema** de esta investigación el siguiente: ¿Cómo afecta el pH del medio de cultivo el contenido y la composición de la pared celular en la levadura *K. marxianus* CCEBI 2011?

Este problema nos permitió proponer la siguiente **hipótesis** de trabajo: Si se controla adecuadamente el valor de pH del medio de cultivo entonces será posible incrementar el contenido de pared celular en *K. marxianus* CCEBI 2011, al tiempo que se logra que esta mantenga una composición química balanceada en los componentes de mayor interés práctico.

Para dar respuesta a esta hipótesis se definieron los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

- **General:**

Evaluar la influencia del pH del medio de cultivo sobre el contenido y la composición de la pared celular de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011.

- **Específicos:**

1. Determinar la influencia del pH sobre la masa y el tamaño celular y el contenido de pared celular en la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011.
2. Caracterizar la composición de preparados de pared celular de levadura obtenidos a diferentes valores del pH del medio de cultivo.

Revisión Bibliográfica

Revisión Bibliográfica

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1. Levaduras.

Las levaduras son hongos unicelulares simples de los cuales existen unas 600 especies agrupadas en 60 géneros, suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas. Las dimensiones pueden oscilar de 1 a 9 μm de ancho y 2 a más de 20 μm de longitud según la especie, nutrición, edad y otros factores. Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza encontrándose en la superficie de las plantas, en el agua de los lagos y ríos y en el suelo que es su principal hábitat. Su presencia depende de la temperatura, el pH, la humedad y la disponibilidad de azúcares simples ^{35, 36}.

Resultan fáciles de cultivar, tanto en el laboratorio como a escala industrial, con un medio de cultivo que contenga azúcares, sales minerales y una pequeña cantidad de extracto de levaduras o peptona. Las células de levaduras incorporan a su estructura nutrientes del medio y desarrollan una masa fúngica cuya composición química aproximada es de 40 % de proteínas, 15 % de ácidos nucleicos, 25 % de polisacáridos, 15 % de lípidos y 5 % de compuestos hidrosolubles como nucleótidos, aminoácidos, azúcares, factores de crecimiento y enzimas, entre otras³⁶.

Las levaduras se componen de envueltas celulares (pared celular y membrana plasmática), citoplasma y núcleo. La pared celular y la membrana plasmática que contiene el citoplasma (protoplasma), están separadas por un espacio conocido como espacio periplásmico donde se localizan algunas enzimas vitales para la célula, destacando la invertasa capaz de desdoblar la sacarosa en glucosa y fructosa, u otras enzimas importantes para el crecimiento de las levaduras o su gemación, e incluso algunas - glucanasas que enológicamente tienen un gran interés por ser responsables de la autólisis de las paredes de las levaduras cuando se conservan los vinos sobre sus lías ^{4, 37}.

I.2. Pared celular de levadura.

I.2.1. Composición, estructura y función biológica.

La pared celular de las levaduras representa el 10 a 30 % del peso seco de la célula, siendo una envuelta de carácter rígido ligeramente elástica, tiene por misión asegurar la protección de los elementos que contiene la levadura, principalmente por regulación de la presión osmótica con el medio exterior, y también es un órgano dinámico multifuncional, donde se desarrollan una serie de fenómenos vitales para la propia célula, pues a través de ella se producen todos los intercambios de nutrientes, asimilación y salida de sustancias de desecho, así como otras funciones reproductoras, siendo sede de moléculas responsables de interacciones celulares como las de carácter floculante, "Killer". La pared celular confiere a la levadura su forma característica ^{4, 38}.

La pared celular está compuesta fundamentalmente, por dos capas de polisacáridos, una capa interna transparente y amorfa constituida principalmente de α -1,3 y α -1,6-glucanos, y una capa externa donde se encuentran ubicadas las manoproteínas ancladas a la capa interna de α -glucanos o bien la atraviesan completamente. Por otro lado, la capa interna parece estar constituida de varios espacios, formados por la quitina unida a α -glucanos. No existe separación neta entre las dos capas de polisacáridos (Anexos, Figura 1A). La pared celular contiene, además, proteínas, lípidos y numerosas enzimas, generalmente hidrolasas, responsables de un gran número de fenómenos estando asociadas a la pared o situadas en el espacio periplásmico ⁴.

- **Glucanos**: Polímeros de glucosa que representan aproximadamente del 30 al 60 % del peso seco de la pared, pueden ser divididos en dos subtipos según las uniones predominantes entre las unidades de monosacáridos: Los α -1,3-Glucanos, son los más abundantes y están compuesto principalmente de moléculas lineales de aproximadamente 1500 unidades de glucosa en su extensión, representando el 85 % del total de los α -Glucanos de la pared celular; y los α -1,6-Glucanos, que son de cadenas más cortas y menos abundantes de hasta 150 unidades de glucosa en su extensión para un 15 % de los α -Glucanos^{1,39}. El α -1,3 glucano de aspecto fibroso, se encuentra siempre asociado a la quitina, y tiene la misión de mantener la forma y rigidez de la célula. Otro α -1,3 glucano, similar al anterior de tipo amorfo y unido a las manoproteínas, asegura la elasticidad de la pared celular y el grado de porosidad que permite la entrada y salida selectiva de determinadas moléculas de la levadura, el α -1,6 glucano sirve de unión entre los diferentes elementos de la pared. Además, es un lugar de receptor del "factor Killer" ⁴.

- **Manoproteínas**: Polímeros de manosa que representan del 20 al 50 % del peso seco de la pared, son moléculas de alto peso molecular, desde 20.000 a 450.000 Dalton, conteniendo aproximadamente un 90 % de manosa y el 10 % restante de péptidos. Estructuralmente se encuentran unidas a los glucanos amorfos, pudiendo ser separados de estos por hidrólisis enzimática con α -glucanasas, poseyendo unas propiedades interesantes para la obtención de los vinos ^{4, 37}. Su función biológica para las levaduras consiste en proporcionar estructura y rigidez a la célula, además de constituir un mecanismo de adaptación frente a condiciones adversas

- **Quitina**: Polímero de N-acetilglucosamina que representa un porcentaje menor de 1 a 3 % de la pared celular, se encuentra asociada a los glucanos amorfos a los que les comunica rigidez, y también se localiza en mayor concentración en los cráteres o cicatrices externas de gemación de las levaduras, donde asegura un perfecto cierre de la pared celular ^{4, 39, 40}

I.2.2. Variación de la composición de la pared celular.

La composición cuantitativa de la pared celular de levaduras no siempre es la misma, sino que varía entre las diferentes especies y está fuertemente

influenciada por las condiciones fisiológicas, las condiciones de cultivo, la edad de las células y las modificaciones genéticas^{2, 4, 6, 39, 34, 37, 41}. Así, la proporción de glucano de la pared celular aumenta con la riqueza en azúcares del mosto, como también con la edad de las levaduras, siendo del mismo modo más rica en quitina y más pobre en manoproteínas. Por otro lado, y como es lógico, dado su fracción proteica, la síntesis de manoproteínas se halla ligada a la disponibilidad de nitrógeno en el medio de crecimiento³⁷.

I.2.3. Influencia de las condiciones nutricionales del medio de cultivo y de los factores ambientales sobre la composición y morfología de la pared celular.

La estructura de la pared celular es fuertemente afectada por las condiciones nutricionales y fisicoquímicas del medio y la morfología puede cambiar según las condiciones del medio.

En un estudio realizado por Aguilar, *et al.*, sobre la variabilidad de la composición de la pared celular de *S. cerevisiae* en respuesta a las condiciones de cultivo, demostraron que el porcentaje de pared celular en peso seco variaba en un 13% cuando se empleaba en el cultivo etanol como fuente de carbono, y hasta un 25% en el cultivo realizado con sacarosa, por lo que se concluyó que la fuente de carbono del medio afectaba la composición de polisacáridos contenidos en la pared de la levadura, obteniéndose mayor cantidad de glucanos (115 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ peso seco) y mananos (131 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ peso seco) en las células cultivadas con sacarosa. Respecto a la influencia del pH, se observó que las levaduras cultivadas a pH 5 presentaron un 19% de pared celular en peso seco, mientras que a pH 6 el porcentaje fue menor (14%), así mismo, el contenido de quitina fue mayor a pH 6 (5,4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de célula) en comparación al obtenido a pH 5³⁴. En un estudio precedente estos autores encontraron, además, que la masa seca y los polisacáridos de pared celular podrían variar en más del 50% con la limitación de nitrógeno, la temperatura, la aireación y el modo de cultivo de la célula (Erlenmeyer y fermentador)³⁹.

Otra investigación relacionada con el efecto de las condiciones de cultivos de *K. marxianus* sobre su autólisis, mostró una significativa influencia del pH en la morfología de la levadura después de las 16 h de cultivo a pH 4,5 y a las 15 h sin control del pH (Anexos, Figura 2A (a-b)). En ambos casos, la pared celular tuvo una apariencia alisada, sin embargo, la correspondiente a las 15 h (pH sin controlar) se caracterizó por tener forma cilíndrica, a diferencia a la del pH 4,5 que mostró un tamaño más pequeño, en forma de elipse y un defecto obvio en las yemas recién formadas²⁸.

I.2.4. Aplicaciones de productos derivados de pared celular de levadura.

Una de las finalidades de conocer la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de levaduras es, precisamente, la de obtener cepas con pared celular más débil y así poder extraer los metabolitos del interior de la célula y aprovechar el contenido de glucanos, mananos y quitina para ser usados en la

industrias de los alimentos, farmacéutica, cosmética y biotecnológica como agentes emulsificantes, texturizantes, sustitutos de grasas, suplementos nutritivos e inmunoestimulantes y como fuente de fibra dietética³⁴. En el caso particular de la quitina, esta es empleada en la industria farmacéutica para la elaboración de tabletas antiácidas⁴².

Los oligosacáridos de glucanos y mananos de la pared celular de las levaduras, poseen un alto valor nutritivo como aditivos en la alimentación animal donde juegan un papel muy activo en el incremento de la respuesta inmunológica, y como colonizadores de la mucosa intestinal, impidiendo así la adhesión de algunas bacterias patógenas en el tracto digestivo, además, tienen la propiedad de absorber las micotoxinas. La *S cerevisiae* ha sido una de las especies de levadura más empleada con este fin⁵⁻⁷.

Es válido señalar que en Cuba, Sánchez en 1997, diseñó un método para la obtención del α -D-(1,3) glucano a partir de cepas de *S cerevisiae* mediante la hidrólisis básica de las paredes de esta levadura para la producción de dicho compuesto como producto con acción farmacológica (adyuvante e inmunoestimulante)⁴³. Asimismo, Iglesias *et al.*, con este mismo proceso de hidrólisis básica, realizaron un estudio para la obtención del complejo fosfo-manano-proteína como producto inmunoestimulante para uso veterinario^{36, 44}.

Los productos comerciales de β -glucanos derivados de pared celular de levaduras son utilizados actualmente como productos alternativos naturales que tienen la propiedad de mantener los niveles de colesterol en sangre normales⁴⁵, de favorecer o potenciar la respuesta farmacológica de agentes quimioterapéuticos empleados en el tratamiento del cáncer cuando son administrados en conjunto¹¹, y ayudar en la prevención de las infecciones⁴⁶, la rinitis alérgica⁴⁷ y la artritis⁴⁸. Los β -glucanos tienen reportados, además, efecto antiviral, radioprotector, cicatrizante y protector de la piel¹¹.

En general, los hidratos de carbono de la pared celular, son fundamentales en el reconocimiento inmunológico, mientras que las proteínas tienen un papel clave en la adhesión a las superficies y a células, así como en la actividad enzimática. Sin embargo, se sabe que las proteínas de la pared celular, asociadas o secretadas, tales como las proteasas aspárticas son reconocidas por las células inmunes. Así mismo, existen proteínas de la pared celular, como es el caso de Als3, que son objetivos de vacunas dada su relevancia como antígeno⁴⁹.

I.3. *Kluyveromyces marxianus*.

I.3.1. Clasificación científica y características generales.

Filo: *Ascomycota*

Subfilo: *Saccharomycotina*

Clase: *Saccharomycetes*

Orden: *Saccharomycetales*

Familia: *Saccharomycetaceae*

Género: *Kluyveromyces*

Especie: *K. marxianus*

Nombre binomial: *Kluyveromyces marxianus*

Sinonimia: *Kluyveromyces fragilis*; *Kluyveromyces cicerisporus*; *Candida pseudotropicalis*; *Candida kefy*⁵⁰.

La *K. marxianus* es un microorganismo unicelular, nucleado, sin motilidad, homotático, perteneciente a la subclase de los hemiascomicetos, se reproduce por gemación multilateral, liberándose las esporas al llegar a su madurez, sus esporas son esféricas. Es una levadura respirofermentativa (aerobia-facultativa), por lo que puede obtener energía tanto por el ciclo del ácido tricarbóxico (fosforilación oxidativa) como por fermentación etanólica⁵¹. Es considerada generalmente como segura o GRAS (Generally Regarded As Safe) permitiendo la aplicación del microorganismo y sus derivados en las industrias alimenticia, farmacéutica y biotecnológica^{22, 23}.

La *K. marxianus* es una de las levaduras que más abunda en los productos lácteos, producen la β -galactosidasa y son potentes fermentadoras de la lactosa. Contiene la coenzima Q-6 e interviene en la fermentación del kumis, es decir, de la bebida láctea. Asimismo, se utiliza para obtener células de levadura a partir del suero lácteo⁵².

I.3.2. Potencial Biotecnológico.

La *K. marxianus*, es una especie de levadura que se caracteriza por su destacada capacidad de metabolizar un amplio rango de sustratos como son glucosa, lactosa, rafinosa, xilosa, arabinosa e inulina; tiene la ventaja de crecer en un amplio intervalo de temperaturas (4 °C a 52 °C), de tener fenotipo *Crabtree* negativo y elevada velocidad de crecimiento específico superior a otros microorganismos eucariotas: características estas que la hacen aplicable en los diferentes procesos fermentativos industriales^{16-20, 53 54; 55; 56}.

La gran mayoría de los estudios publicados sobre las aplicaciones de la *K. marxianus* han demostrado que esta levadura es muy versátil y que puede ser explotada económicamente por su amplio rango de aplicabilidad, por ejemplo: en la producción de etanol, representando uno de los campos de utilización más explotados de esta levadura^{15, 18, 57, 58, 59, 60}, siendo empleada actualmente en la producción de tequila a nivel industrial^{22, 61, 62, 63}; de productos proteicos y vitamínicos (folato)^{64, 65} con efectos probióticos en la prevención de anemia megalobástica y reducción del riesgo a enfermedades cardiovasculares, cáncer y Alzheimer's⁶⁶; de enzimas tales como poligalacturonasa^{26, 27}, glucanasa⁶⁷, α -glucosidasa^{68, 69}, inulinasa^{70, 71}, lactasa⁷², pectinasa⁷³; así como, compuestos para la mejora de aromas⁷⁴ y sabores⁷⁵, que resultan de gran utilidad como coadyuvantes de productos de las industrias alimenticia y farmacéutica. Es válido destacar que la alta productividad alcanzada en los cultivos de esta levadura la hace muy efectiva en el control de residuales de suero contaminantes^{76, 77, 78} y en

la biorremediación⁷⁹. Por otra parte, se destacan sus usos alternativos como prebiótico⁸⁰.

Nuevas y prometedoras aplicaciones de la *K. marxianus* están relacionadas con la obtención de productos derivados de los polisacáridos (glucanos y mananos, principalmente) de pared celular para ser usados en la terapéutica como agentes hipocolesterolémico, siendo esta una de las actividades biológicas más importante reportada para este microorganismo¹²⁻¹⁴.

I.3.3. *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011.

La *K. marxianus* CCEBI 2011 es una de las cepas de levaduras que forma parte de la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CCEBI) perteneciente a la Universidad de Oriente de Santiago de Cuba (Anexos, Figuras 3A y 4A). Investigadores de este centro²⁶, lograron obtener una alta productividad de la enzima poligalacturonasa (PG) a partir de esta levadura aislada del procesamiento de las aguas residuales del café húmedo, y un año después, lograron producir la enzima PG conjuntamente con el etanol cuando se empleó la *K. marxianus* CCEBI 2011 en el proceso de fermentación de azúcares²⁷. Estas investigaciones han demostrado la factibilidad técnica de coproducir enzima y etanol a escala industrial a partir de esta levadura, lo cual podría ser valorado como una alternativa para el uso potencial de la PG en la producción de alimentos en nuestro país.

En la obtención del alcohol, una de las alternativas exploradas está relacionada con la búsqueda de levaduras termotolerantes y etanol-resistentes, que sean capaces de superar las limitaciones que se presentan con las cepas tradicionalmente usadas de la especie *S. cerevisiae*. En el año 2010, Rodríguez, *et al.* realizaron un estudio con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas de fermentación para la producción concomitante de endopoligalacturonasa y etanol a partir de melazas de caña con la levadura termotolerante y pectinolítica *K. marxianus* CCEBI 2011, mediante el uso de la Metodología Superficie de Respuesta. Los resultados avalaron las potencialidades de esta levadura para ser utilizada en la industria alcoholera, como una atractiva alternativa a la convencional *S. cerevisiae*, debido a su elevada producción de alcohol a temperaturas de 35 a 40 °C y a sus posibilidades de integrarse en una industria alcoholera diversificada^{81, 82}.

Otra investigación relacionada con los métodos de conservación para la *K. marxianus* CCEBI 2011 fue realizada recientemente por Camacho, *et al.*, demostrando que para el mantenimiento de la viabilidad, pureza y estabilidad de esta especie de levadura resultaron efectivos los métodos: transferencia periódica y agua destilada estéril (método de Castellani). Estos métodos de conservación garantizaban además, las potencialidades biotecnológicas de este microorganismo por más de 10 años⁸³.

Materiales y Métodos

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en los laboratorios del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) y de los Departamentos de Farmacia, Física y Química, pertenecientes a la Facultad Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Oriente.

II.1. Cultivo de la levadura y colecta de la biomasa.

II.1.1. Microorganismo.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, perteneciente a la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial.

II.1.2. Medios de cultivo.

- **Medio líquido YPD:** Extracto de levadura (UNI-CHEM) 10 g·L⁻¹, Peptona bacteriológica (BioCen) 20 g·L⁻¹ y Glucosa 20 g·L⁻¹ (UNI-CHEM). Este medio fue utilizado para la reactivación de la levadura.

- **Cuñas de agar YPDA:** Para el mantenimiento de la levadura se empleó un medio sólido obtenido por la adición de agar bacteriológico 20 g·L⁻¹ (UNI-CHEM) al medio líquido YPD.

- **Medio Mineral:** En los cultivos de adaptación (propagación) y como medio de fermentación en el biorreactor se utilizó el medio mineral básico para levaduras (YNB o Yeast Nitrogen Base) diseñado por Verduyn *et al.*⁸⁴, modificado por Hahn-Hägerdal *et al.*⁸⁵, cuya composición es la siguiente:

Componentes Principales: Glucosa 20 g·L⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 5 g·L⁻¹; KH₂PO₄ 3 g·L⁻¹; MgSO₄·7 H₂O 0,5 g·L⁻¹.

Vitaminas: Biotina 0,05 mg·L⁻¹; Ácido D-pantoténico 1 mg·L⁻¹; Ácido nicotínico 1 mg·L⁻¹; Myo-inositol 25 mg·L⁻¹; Tiamina 1 mg·L⁻¹; Piridoxina 1 mg·L⁻¹; Ácido -aminobenzoico 0,2 mg·L⁻¹.

Elementos Traza: H₃BO₃ 1 mg·L⁻¹; CuSO₄·5H₂O 0,3 mg·L⁻¹; KI 0,1 mg·L⁻¹; Na₂MoO₄·2H₂O 0,4 mg·L⁻¹; ZnSO₄·7H₂O 4,5 mg·L⁻¹; FeSO₄·7H₂O 3 mg·L⁻¹; MnCl₂·2H₂O 1 mg·L⁻¹; EDTA 15 mg·L⁻¹; CaCl₂ 4,5 mg·L⁻¹; CoCl₂·6H₂O 0,3 mg L⁻¹

Las vitaminas y elementos traza se incorporaron al medio a partir de soluciones stocks preparadas a 200X y 500X, respectivamente; estas se conservaron en refrigeración (4 °C) en frascos de color ámbar. La solución de vitaminas se esterilizó por filtración con un filtro bacteriológico (SMH, China) de 0,2 µm de

tamaño de poro y 2,5 cm² superficie de filtrado y se adicionó después de esterilizado el medio para evitar la descomposición de sus componentes termolábiles.

El medio se tamponó, cuando fue necesario, mediante la adición de ácido cítrico para una concentración de 0,075 mol·L⁻¹, ajustándose el pH con NaOH 6 mol·L⁻¹ al valor deseado. Previo a su esterilización, se añadió el antiespumante (GLANAPON DG 158®, Austria; antiespumante industrial específico para fermentaciones de levaduras) a razón de 250 µL·L⁻¹ de una emulsión del mismo en agua destilada en proporción 1:3 (v/v).

Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 1 atm durante 15 min.

II.1.3. Preparación de inóculos.

De la cepa conservada a 4 °C en cuñas con medio YPDA se inocularon frascos erlenmeyers de 100 mL con 25 mL de medio YPD. Los frascos se incubaron a temperatura ambiente en una zaranda orbital (Retomed, Cuba) a 250 rpm durante 10-12 h. Luego se sembraron los frascos de inoculación de 250 mL, conteniendo 40 mL del medio mineral, a razón de 2% (v/v) y se incubó durante 8-10 h bajo iguales condiciones. Estos cultivos se utilizaron para inocular el biorreactor donde se desarrolló la fermentación para la obtención de la biomasa de levadura.

II.1.4. Fermentación.

Se realizó en un biorreactor artesanal de 1,2 L de volumen efectivo, provisto de un sistema de entrada de aire estéril, agitación mecánica, control de temperatura (baño externo), dispositivos para la salida de gases, así como para la adición de antiespumante y entrada del incóculo. El biorreactor usado cuenta, además, con un sistema para la toma aséptica de muestras del cultivo⁸⁶ Las condiciones de operación del proceso fermentativo fueron las siguientes: volumen de trabajo: 1.2 L, velocidad de agitación: 850 rpm, flujo de aire: 0,67 min·L⁻¹, temperatura: 35 °C.

En esta investigación se utilizaron cuatro condiciones de pH inicial en el medio de cultivo: pH 3, pH 5 y pH 6,5 fijos (tamponados con buffer citrato de sodio 0,075 mol·L⁻¹), y un pH 5 libre, es decir, sin tamponar.

Cuando la concentración residual de glucosa fue ≤ 1 g·L⁻¹ se interrumpieron las fermentaciones y se procedió a la colecta de la biomasa. El consumo de glucosa se monitoreó cualitativamente en tiempo real mediante el método colorimétrico de determinación de azúcares reductores del ácido 3,5-dinitrosalicílico⁸⁷, tomando como referencia patrones de coloración de concentraciones conocidas de glucosa (10 g·L⁻¹, 5 g·L⁻¹, 1 g·L⁻¹ y 0,2 g·L⁻¹).

II.1.5. Colecta de la biomasa.

El cultivo del biorreactor se llevó a tubos de centrífuga de 50 mL y se centrifugaron a 6 000 rpm durante 5 minutos (Heal Force, China). El sobrenadante se utilizó para la determinación del pH final de los cultivos, el cual se efectuó en un pH-metro digital Consort C561 (Bélgica). El pellet correspondiente a la biomasa se lavó con 5 mL de agua destilada para eliminar los residuos del medio de cultivo y luego se conservó a -20 °C hasta su utilización en la determinación de la concentración celular base seca por gravimetría, obtención de las paredes celulares de levadura y el análisis morfométrico de las células por Microscopía Holográfica Digital.

II.2. Determinación de la masa celular promedio y del contenido de pared celular.

Cada uno de los pellets celulares provenientes de los cultivos a las diferentes condiciones de pH fueron resuspendidos en aproximadamente igual volumen de agua destilada estéril enfriada a 4 °C. Previamente, los pellets se pesaron en balanza analítica y se tomó la masa celular húmeda en gramos como igual al volumen ocupado por esta en mililitros, asumiendo que la densidad de la biomasa es de aproximadamente 1 mg/mL. A las suspensiones celulares así preparadas se les realizó entonces la determinación gravimétrica del contenido de biomasa (base seca) y la determinación de la concentración celular mediante conteo al microscopio. Una vez tomadas las muestras para estas determinaciones, las suspensiones celulares se guardaron en congelación (-20 °C) para su posterior empleo en la preparación de las paredes celulares y en las determinaciones morfométricas mediante Microscopía Holográfica Digital.

II.2.1. Determinación gravimétrica de la concentración de biomasa.

Se tomaron (por triplicado) alícuotas de 500 µL para cada suspensión celular (correspondientes a las distintas variantes de pH en estudio) y se llevaron a tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidad, previamente tarados en balanza analítica (Sartorius, Alemania). Las suspensiones se centrifugaron a 9 000 rpm durante 5 min y una vez obtenidos los pellets de biomasa celular húmeda se procedió al secado de los mismos a 105 °C durante 12 horas en estufa (MIN, Hungría) hasta obtener peso constante. La concentración celular base seca fue expresada en mg. mL⁻¹.

II.2.2. Determinación de la concentración celular de la suspensión de levaduras.

De la misma suspensión celular utilizada para la determinación de la concentración de biomasa base seca, se tomaron alícuotas de 50 µL para el conteo el celular de levaduras al microscopio. El recuento se realizó en cámara Fuchs-Rosenthal (Bad-Blankenburg, Alemania)⁸⁸, mediante el empleo de un microscopio óptico (Novel, China) con aumento óptimo para el recuento de 400X.

La concentración celular se calculó según la siguiente expresión:

$$c_i \quad \text{ó} \quad n \quad c_i \quad \left(\frac{\text{cél}}{\text{m}} \right) = \frac{c_i \cdot p \cdot d \cdot \text{cél}_i}{p \cdot c \cdot \text{í}c} \cdot 10^4 \cdot D \quad \text{ó} \quad n \quad (\text{Ec. 1})$$

II.2.3 Cálculo de la masa celular promedio.

La masa celular promedio se calculó dividiendo la concentración de biomasa base seca (expresada en mg.mL⁻¹) entre la concentración celular (expresada en células.mL⁻¹).

II.2.4 Ruptura celular y preparación de paredes celulares de levadura.

En primera instancia se estandarizó el protocolo de ruptura celular en vortex (Heidolph, Reax Top, Alemania) con perlas de vidrio (0,50-0,75 mm Ø, B. Braun Biotech), de forma tal que se lograra un índice de ruptura superior al 95 %, el cual se comprobó mediante la observación al microscopio óptico (400X) del *debris* celular.

Para la ruptura y preparación de las paredes celulares se partió de una suspensión celular conteniendo 500 mg de biomasa (base seca) y se siguió el protocolo descrito por De Groot y col.⁸⁹ con algunas modificaciones. La ruptura se realizó por triplicado para las muestras pH 3, pH 5 y pH 6,5, y por duplicado para pH 5 libre. La ruptura se consiguió con 9 ciclos de 5 min de agitación en vortex y 5 min de reposo en hielo. Como medio de ruptura se utilizó el tampón Tris-HCl (MERCK) 10 mM, pH 8. En la preparación de las paredes celulares se contempló una extracción, previa a la ruptura celular, con una solución detergente conteniendo SDS (UNI-CHEM) al 2 % (m/v) y β -mercaptoetanol (SIGMA) 100 mM; la extracción se realizó a 100 °C durante 10 min. Posterior a la ruptura celular se realizaron otras tres extracciones repetidas de igual forma. Como resultado de estas extracciones se separan la mayoría de las proteínas contenidas en las células, incluidas las no unidas covalentemente a la pared celular⁹⁰, más restos de membrana (lípidos). El primer y segundo extractos de cada muestra se unieron y guardaron en congelación para luego ser utilizados en la determinación de proteínas totales y manoproteínas.

Las paredes celulares obtenidas fueron lavadas siete veces con agua destilada para la eliminación de los residuos de la solución detergente y finalmente resuspendidas en 1 mL de agua destilada y llevadas cuantitativamente a viales Eppendorf previamente tarados. Se centrifugó entonces a 8 000 rpm, 5 min y el pellet húmedo de paredes celulares se lavó con etanol absoluto (UNI-CHEM) 3 veces y luego con acetona (UNI-CHEM) 2 veces. Finalmente, los viales conteniendo los pellets de pared celular se llevaron a una estufa (AISET, YLD 6000) a 45 °C hasta peso constante. Una vez pesados los viales en balanza analítica, los mismos se sellaron con Parafilm (USA) y se conservaron en un lugar

fresco hasta su uso posterior en las determinaciones analíticas de los componentes de pared celular.

El contenido de pared celular se expresó como el porcentaje que representa la masa seca de paredes celulares con respecto a la masa seca celular de partida, usada en la preparación de paredes celulares.

II.3. Análisis morfométrico de las células de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 mediante Microscopía Holográfica Digital.

II.3.1. Preparación de las muestras.

Se tomó una alícuota de 250 μL de cada suspensión de levadura (correspondientes a las diferentes condiciones de pH estudiadas) y se completó a 1 mL con agua destilada estéril, filtrada a través de un filtro bacteriológico de 0,2 μm (SMH, China). La suspensión celular se centrifugó (9000 rpm, 5 min) para sedimentar la biomasa. El *pellet* se lavó cinco veces con agua destilada estéril y finalmente se resuspendió con 1 mL de agua destilada estéril. Luego se realizó una dilución 1:100 y se procedió a la captura de los hologramas preparando, previamente, una extensión de la suspensión celular en una lámina portaobjetos.

II.3.2. Captura y reconstrucción de los hologramas.

Los hologramas se capturaron en un microscopio holográfico digital fabricado por el Grupo de Investigación de Holografía Digital del Departamento de Física, perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente. Su estructura básica consiste de un interferómetro de Mach-Zhender, en el que se ha incorporado en uno de sus brazos un microscopio óptico convencional; como fuente luminosa se usó un láser de He-Ne con una longitud de onda de 632 nm y una potencia de 150 mW. Las imágenes se tomaron con una lente objetiva de 40X. Para la reconstrucción de los hologramas se utilizó una escala micrométrica Mitutoyo (Japón) de 0,01 mm (Anexos, Figura 5A) con la finalidad de calibrar la instalación. A partir de la imagen de intensidad reconstruida (Anexos, Figura 6A), el proceso de calibración se realiza mediante la corrida de la opción "Axis calibration" del software Holodig®; después del cálculo esta calibración queda fija y guardada en el programa para ser usada en la obtención de la imagen 2D o 3D de las muestras microscópicas, con la opción de expresar sus dimensiones en el sistema métrico. Esto permite calcular las dimensiones y características morfológicas de la muestra.

II.4. Caracterización de la composición de la pared celular.

Para la caracterización de la composición de la pared celular se tuvieron en cuenta dos aspectos: (1) el análisis de los extractos conteniendo las proteínas celulares totales, incluyendo las manoproteínas no enlazadas covalentemente a la pared celular y (2) la determinación del contenido de quitina y carbohidratos totales en

pared celular luego de someter las paredes a hidrólisis ácido/básica y ácida, respectivamente.

II.4.1. Análisis de los extractos en solución detergente de SDS+ -mercaptoetanol.

II.4.1.1. Precipitación de proteínas con cloroformo/metanol.

Para la precipitación de las proteínas totales (Método de Von Der Haar)⁹¹ contenidas en los extractos de la solución detergente (SDS- -mercaptoetanol) se situaron 5 mL de extracto en un tubo Corning de 50 mL, se añadieron 4 volúmenes (20 mL) de metanol (UNI-CHEM) y se agitó en vortex durante aproximadamente 1 min. Se añadió 1 volumen (5 mL) de cloroformo (BDH, Chemicals Ltd) y se agitó en vortex brevemente. Entonces se añadieron 3 volúmenes de agua destilada (20 mL) y se agitó en vortex aproximadamente 1 min. Se centrifugó a 15 000×g durante 5 min y se eliminó cuidadosamente la fase superior acuosa, cuidando no arrastrar el sólido precipitado que se encuentra en la interfase líquida, el cual contiene las proteínas.

Se añadieron 4 volúmenes (20 mL) de metanol y se agitó en vortex aproximadamente 1 min. Se centrifugó a 15 000×g por 5 min y se separó el sobrenadante cuidando de no arrastrar el pellet. Se escurrió cuidadosamente el tubo que contiene el pellet sobre papel de filtro y se dejó secar unos minutos al aire.

Finalmente, los pellets se disolvieron completamente con NaOH 1 mol/L (2 mL) y se completó a un volumen final de 5 mL con agua destilada. Inmediatamente se procedió a la precipitación de las manoproteínas y mananos con el reactivo de Fehling y a la cuantificación de las proteínas totales por el método de Lowry.

II.4.1.2. Precipitación de mananos y manoproteínas con el reactivo de Fehling

La precipitación de mananos y manoproteínas con el reactivo de Fehling se realizó según describen Belem y Lee⁹². El reactivo de Fehling es preparado en el momento de usarse, adicionando un volumen del reactivo B a un volumen del reactivo A. Dichos reactivos, se prepararon previamente del siguiente modo:

Reactivo A: Tartrato de sodio y potasio (BDH Chemicals Ltd.) 17,3 % (m/v) en KOH (UNI-CHEM) 12,5 % (m/v). Guardar en frasco plástico y a temperatura ambiente.

Reactivo B: CuSO₄ · 5 H₂O (UNI-CHEM) al 3,5 % (m/v). A la solución debe añadirse H₂SO₄ (UNI-CHEM) concentrado a razón de 0,5 mL por litro de solución. Conservar a temperatura ambiente.

Procedimiento:

A 1 volumen del concentrado de proteínas y carbohidratos proveniente de la precipitación de proteínas con cloroformo/metanol se le adicionan 3 volúmenes del reactivo de Fehling (250 μ L del concentrado más 750 μ L del reactivo de Fehling). Se incubó durante toda la noche a 4 °C para garantizar la precipitación completa de las manoproteínas. Se centrifugó entonces en una centrífuga para viales (EDISON-NJ, USA) a 3000xg durante 10 min. El sobrenadante se retiró y se disolvió completamente el pellet mediante la adición gota a gota (porciones de 10 μ L) de HCl (BDH, Chemicals Ltd.) 3 mol/L, agitando suavemente en vortex tras cada adición. Las manoproteínas se precipitaron nuevamente con 3 volúmenes (750 μ L) de etanol 95 % conteniendo ácido acético al 1% (v/v), previamente enfriado a 4 °C (99 mL de etanol más 1 mL de ácido acético glacial (UNI-CHEM)). Los viales se incubaron toda la noche a 4 °C para garantizar la precipitación completa. Se centrifugó a 15 000xg durante 15 min y se lavó el sólido sedimentado con etanol al 95 % helado. Se retiró el sobrenadante y los tubos se dejaron escurrir bien. Finalmente, los pellets se disolvieron en 1 mL de agua destilada. A estas muestras, conteniendo los mananos y manoproteínas no enlazados covalentemente a pared, se les realizó la determinación de carbohidratos (método del fenol sulfúrico) y proteínas. La suma de los contenidos de carbohidratos y proteínas se tomó como el contenido de manoproteínas totales; las relaciones entre dichas cantidades particulares se utilizaron como elemento cuantitativo para caracterizar la composición de las manoproteínas.

II.4.2. Hidrólisis ácida de la pared celular con ácido sulfúrico

Para el análisis de la composición de polisacáridos estructurales (glucanos más mananos) y proteína enlazada covalentemente a pared se efectuó la hidrólisis completa de los polisacáridos con H₂SO₄ según Bachaus⁹³. Se llevó un control de -glucano (laminarina) y manano de levadura (ambos SIGMA) para el estimado del recobrado de monosacáridos. La hidrólisis se realizó en tubos de vidrio termorresistentes provistos de tapa de rosca (Hach).

Procedimiento:

Se pesaron 50 mg de pared celular de levadura y se llevaron a un tubo Hach seco. Se añadieron 1,25 mL de H₂SO₄ al 72% (m/m) y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se agitó suavemente, a intervalos, para mantener homogénea la mezcla de reacción. Luego se enfrió en un baño de hielo y se adicionó, gota a gota y agitando, 7,188 mL de agua destilada (de esta manera el H₂SO₄ queda a 2 M y el volumen final de muestra es de 8,32 mL). En este momento se extrajo una alícuota de 2 mL y se llevó a un tubo de centrífuga para posterior precipitación de proteínas con ácido tricloroacético 10 % (m/v), según se describe en II.4.2.1. El volumen restante contenido en el tubo de hidrólisis se incubó a 100 °C durante 4 horas. Se enfrió luego en baño de hielo y se neutralizó con NaOH 4 mol/L hasta pH 3. Se prosiguió la neutralización con NaOH 1 mol/L hasta pH 3,5 y finalmente hasta pH 6,4-6,6 con NaOH 0,1 mol/L. El hidrolizado se

trasvasó a un volumétrico de 25 mL y se enrasó con agua destilada. Se homogenizó bien y se llevó el hidrolizado a un tubo Corning plástico y se conservó en congelación (-20 °C) para la posterior determinación de carbohidratos totales (método del fenol sulfúrico) y análisis de azúcares (método de Somogyi-Nelson). Este último ensayo se realizó con la finalidad de evaluar la extensión de la hidrólisis.

II.4.2.1. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético.

A las alícuotas extraídas de los hidrolizados de paredes celulares, luego de la hidrólisis con H₂SO₄ 72% (m/v) se les adicionó igual volumen de ácido tricloroacético al 10 % (m/v). Se incubó por espacio de 2 horas a temperatura ambiente y se centrifugó a 10 000xg durante 10 min. El pellet se disolvió completamente en 250 µL de NaOH 1 mol/L más 750 µL de agua destilada (volumen final 1 mL). Estas muestras se usaron para la determinación del contenido de proteínas por el método de Lowry. Esta determinación corresponde a las proteínas enlazadas covalentemente a pared celular.

II.4.3 Hidrólisis con NaOH/HCl para la determinación de quitina.

La hidrólisis se realizó según la modificación descrita por Bachaus *et al.* del método desarrollado por Chen y Johnson^{93, 94}. Se llevó un control de quitina (SIGMA) para el estimado del recobrado de glucosamina.

Procedimiento:

Se pesaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidad 20 mg de paredes celulares. Luego se añadieron 500 µL de NaOH 1 mol/L y se incubó durante 10 min a 100 °C en baño maría (MIN, Hungría). Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 500 µL de HCl 1 mol/L para neutralizar la mezcla de hidrólisis. Se centrifugó a 15 000xg durante 20 min, se desechó el sobrenadante, se lavó el pellet con 1000 µL de agua destilada y se centrifugó nuevamente. El sólido sedimentado se arrastró cuantitativamente con 2-3 porciones de 1 mL de HCL 6 mol/L a un tubo de vidrio termorresistente provisto de tapa de teflón con cierre hermético (Hach). El volumen se completó a 5 mL con HCl 6 mol/L. Se incubó entonces a 100 °C durante 4 horas. Se enfrió a temperatura ambiente y se tomaron 2 alícuotas del hidrolizado, de 1 mL cada una, y se llevaron a viales plásticos de 1,5 mL (Eppendorf) y se evaporaron a sequedad a 45 - 50 °C bajo presión reducida. El sólido residual contenido en los viales se disolvió completamente en 1 mL de agua destilada para la determinación colorimétrica de quitina según el método de Elson y Morgan.

II.5 Determinaciones analíticas.

La determinación del contenido de proteínas totales en las distintas muestras (proteínas totales en los extractos en solución detergente precipitadas con cloroformo/metanol, manoproteínas precipitadas con el reactivo de Fehling y

proteínas unidas covalentemente a pared celular procedentes de la hidrólisis ácida de la pared celular) se realizó por el método de Lowry⁹⁵, empleando como patrón albúmina de suero bovino (BSA) (BDH Chemicals, Ltd., UK) en un rango de concentraciones que osciló desde los 0,1 a 0,6 mg.mL⁻¹ para la obtención de la curva de calibración (Anexos, Figura 7A). Las lecturas del porcentaje de transmitancia se realizaron a una longitud de onda de 680 nm.

Para la cuantificación de carbohidratos totales se utilizó el método fenol sulfúrico de Dubois⁹⁶, realizándose las lecturas del porcentaje de transmitancia a 490 nm. Para la estimación del contenido de carbohidratos en manoproteínas (muestras procedentes de la precipitación con el reactivo de Fehling) se usó como patrón manosa (SIGMA); en tanto para las muestras procedentes de la hidrólisis ácida de paredes celulares se usó como patrón glucosa (UNI-CHEM). En todos los casos las curvas de calibración estuvieron en el rango de 0,01 a 0,1 mg.mL⁻¹ (Anexos, Figuras 8A y 9A).

Todas las lecturas de los porcentajes de transmitancia fueron realizadas en un espectrofotómetro de registro analógico Especol MK 6/6 (Alemania).

II.5.1. Determinación colorimétrica de quitina.

El contenido de quitina se determinó colorimétricamente por el método de Elson-Morgan modificado según Chen y Johnson^{94, 97}, usando glucosamina-clorhidrato (SIGMA) como estándar. La curva de calibración del patrón se construyó en el rango de 0,01 a 0,1 mg/ mL. (Anexos, Figura 10A). Las mediciones espectrofotométricas se realizaron a una longitud de onda a 530 nm.

Reactivos:

Reactivo A: (Acetilacetona): Disolver 4 mL de acetilacetona (ANALAR, BDH) en 96 mL de Na₂CO₃ (UNI-CHEM) al 1,5 N. Guardar a 4 °C no más de 4 a 5 días.

Reactivo B: (Reactivo de Erlich): Disolver 1,6 g de p-dimetilaminobenzaldehído (SIGMA) en 30 mL de etanol (95 %). Adicionar 30 mL de HCl concentrado y mezclar bien. El reactivo es estable.

Procedimiento:

Se sitúan 800 µL de muestra más 200 µL de agua destilada en tubos de vidrio termorresistentes provistos de cierre hermético. En el caso del hidrolizado correspondiente al control quitina se le realizó previamente una dilución 1:50 (20 µL del hidrolizado quitina y 980 µL de agua destilada) y luego se utilizó 1 mL de esta dilución para realizar el ensayo. Para los patrones de glucosamina-clorhidrato también se empleó 1mL de cada uno de ellos en el ensayo.

A cada tubo conteniendo muestras o patrones se les añadió 1 mL del reactivo A y se incubó a 100 °C durante 20 min. Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y se añadió 1 mL del reactivo B. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces los tubos se agitaron enérgicamente en vortex durante aproximadamente 1 min hasta el cese del desprendimiento de burbujas de dióxido de carbono. Finalmente se efectúa la lectura del porcentaje de transmitancia a 530 nm en espectrofotómetro (Especol).

II.6. Procesamiento de datos.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con ayuda del paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XV v.15.2.14 (USA). El análisis de los datos contempló la determinación de estadígrafos como la media aritmética, la desviación estándar y coeficientes de variación en base al error absoluto. Cuando fue necesario se realizaron análisis de regresión lineal.

Resultados y Discusión

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Influencia del pH del medio de cultivo sobre la masa y tamaño celular promedio y el contenido de pared celular en la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011.

III.1.1. Masa celular promedio y contenido de pared celular de la levadura.

Los resultados de la masa celular promedio, obtenida dividiendo la concentración de biomasa base seca (expresada en mg.mL^{-1}) entre la concentración celular (expresada en células.mL^{-1}), así como el contenido de pared celular de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 a las diferentes condiciones de pH estudiadas se muestran en la tabla 1. Como se observa, la masa celular promedio en los medios tamponados disminuyó ligeramente a medida que aumentaba el pH y el menor valor ($1,75 \pm 0,47 \times 10^{-9} \text{ mg.cel}^{-1}$) se alcanzó en el cultivo no tamponado (pH 5 libre). De forma general, estos valores no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), lo que indica que estas condiciones de pH empleadas en esta investigación no afectaron el peso celular promedio de las células de levadura.

Los contenidos de pared celular fueron similares para las variantes estudiadas a pH 6,5 y 5 libre ($13,9 \pm 3,5\%$ y $13,6 \pm 2,4 \%$, respectivamente), aunque algo inferiores a la variante pH 3 donde se alcanzó el mayor porcentaje ($16,0 \pm 2,7 \%$). Estos valores se encuentran dentro del rango de contenido de pared celular usualmente informado para las levaduras, que oscila de un 10 a 30 %, límite este que puede variar entre las distintas especies de levaduras^{38, 93, 98}. Las leves disminuciones del contenido de pared celular encontradas a valores de pH 6,5 y 5 libre, no resultaron estadísticamente significativos, si se tiene en cuenta el rango de error en la estimación del parámetro para ambas muestras; sin embargo, esto no sucede así para la variante a pH 5 donde sí se aprecia una disminución marcada y significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje de pared celular ($7,1 \pm 2,2 \%$). Cuando el pH inicial del medio fue de 5, la levadura estuvo creciendo en el entorno de pH óptimo para levaduras²⁹, por lo que podría suponerse que las paredes celulares resultarían más delgadas producto a su elevada velocidad de crecimiento, en un medio de cultivo con condiciones favorables en comparación con las otras variantes de pH estudiadas. Ha sido establecido que la biosíntesis de la pared celular es un proceso metabólicamente “caro” para las células⁹⁹, de ahí que su contenido sea finamente controlado a nivel genético¹⁰⁰. Este valor inferior de contenido de pared celular del pH 5 se encuentra en correspondencia con el reportado en un artículo pionero en las investigaciones sobre paredes celulares de levadura, donde se informa que estas constituyen el 6,5 % de la masa celular cuando las células se encuentran en fase de crecimiento exponencial¹⁰¹.

Los cultivos tamponados (pH 3, pH 5 y pH 6,5) no mostraron variaciones significativas respecto al pH alcanzado al final del cultivo, lo que demuestra la efectividad del buffer empleado en el proceso de fermentación, en este caso, el

Tabla 1. Valores del pH final de los cultivos, masa celular promedio y contenido de pared celular de la levadura *K. marxianus* CCEBI 2011.

	Variante de pH de los cultivos			
	pH 3	pH 5	pH 6,5	pH 5 Libre
pH final del cultivo	2,97	4,6	5,9	2,2
Masa celular promedio ($\times 10^{-9}$ mg.cel⁻¹)	2,32 \pm 0,43	2,01 \pm 0,82	1,86 \pm 0,46	1,75 \pm 0,47
Pared celular (%)	16,0 \pm 2,7	7,1 \pm 2,2	13,9 \pm 3,5	13,6 \pm 2,4

buffer citrato de sodio 0,075 M con un rango efectivo de pH de 2,2 - 6,5¹⁰². En el medio de cultivo sin tamponar (pH 5 libre) el pH disminuyó hasta alcanzar un valor de 2,2 al final de la fermentación, lo cual era de esperar ya que el pH del medio extracelular decrece proporcionalmente con el crecimiento microbiano, debido a la influencia que tienen los subproductos formados por los diferentes mecanismos celulares, tales como los iones H⁺ y CO₂, donde este último puede reaccionar con el agua para formar más iones H⁺ acidificando el medio, lo que puede atentar además contra la homeostasis interna de la célula¹⁰³. Por otro lado, los cultivos de levadura en medio mineral, sin control de pH, la disminución del pH es usual en presencia de sales de amonio debido precisamente, a la liberación de iones H⁺ que acompaña la asimilación del nitrógeno presente. Este descenso continuo del pH del medio de cultivo somete a las células a un estado de estrés que usualmente provoca un engrosamiento de la pared celular, lo que podría explicar la diferencia observada con relación al cultivo tamponado a pH 5. Además, el cultivo sin tamponar (pH 5 libre) fue el que presentó menor velocidad de crecimiento¹⁰⁴ y, como se conoce, cuando las células disminuyen su velocidad de crecimiento y arriban a la fase estacionaria se produce siempre un engrosamiento de la pared celular¹⁰⁰.

III.1.2. Tamaño celular promedio de la levadura.

El tamaño celular promedio de la levadura *K. marxianus* CCEBI 2011 bajo las distintas condiciones de pH utilizadas en el estudio, se determinó a través de la técnica de Microscopía Holográfica Digital, obteniéndose las dimensiones correspondientes al diámetro mayor y menor (largo y ancho, respectivamente) y el área celular, los cuales resultaron útiles para dilucidar aspectos de la morfología celular influenciadas por el pH del medio de cultivo.

Los resultados correspondientes a las dimensiones de las células de levadura se recogen en la tabla 2. Se encontró que el tamaño celular fue afectado de manera significativa ante las variaciones del pH en los cultivos, siendo la variante a pH 6,5 la que mostró mayor área ($479,9 \pm 173,0 \mu\text{m}^2$) seguida por la del pH 5 ($393,8 \pm 192,4 \mu\text{m}^2$). Las células cultivadas en el medio a pH 3 fueron las de menor tamaño, resultado este que se encuentra en correspondencia con el alto porcentaje de contenido de pared celular ($16,0 \pm 2,7\%$) obtenido para esta condición de pH, según se analizó en el epígrafe anterior. Se tiene que la disminución del tamaño (volumen) celular trae como consecuencia el incremento de la superficie celular total para igual cantidad de biomasa. Este resultado indica la conveniencia de emplear esta condición de pH en cualquier bioproceso dirigido a maximizar el rendimiento y la productividad volumétrica de componentes asociados a la pared celular (por ejemplo, -glucanos y mananos) o de enzimas “ancladas” a la superficie celular para garantizar su uso y éxito comercial.

El tamaño celular determinado a las diferentes condiciones de pH por el método holográfico se encuentra en correspondencia con un estudio previo realizado con esta cepa de levadura¹⁰⁴. En su investigación, se empleó un modelo matemático en el que se estimó la variación en el tamaño celular sobre la base de las

Tabla 2. Dimensiones promedio de la célula de *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 obtenidas por Microscopía Holográfica Digital.

	pH 3	pH 5	pH 6,5	pH 5L
Diámetro menor (μm)	9,7 \pm 2,2	18,7 \pm 4,7	22,0 \pm 4,3	15,3 \pm 2,6
Diámetro mayor (μm)	11,3 \pm 2,5	25,4 \pm 7,0	27,2 \pm 4,6	19,8 \pm 4,6
Área (μm^2)	86,9 \pm 39,4	393,8 \pm 192,4	479,9 \pm 173,0	242,6 \pm 104,1

diferencias entre las velocidades específicas de crecimiento determinadas a partir de medidas del incremento de la población celular y de la masa celular, simultáneamente¹⁰⁵. En dicho estudio resultaron las de mayor tamaño las células correspondientes a las muestras de cultivos tamponados a pH 6,5 y pH 5 respectivamente, y las de menor tamaño la variante a pH 3. En el caso del pH 5 sin tamponar las variaciones constantes de pH, y por tanto fisiológicas, no permitieron establecer un patrón de crecimiento estándar¹⁰⁴.

En la figura 1 se muestran las imágenes de contraste de fase obtenidas por Microscopía Holográfica Digital correspondientes a cada variante de pH de la suspensión celular de levadura. Para una mejor visualización del tamaño de la *K. marxianus* CCEBI 2011 en las condiciones de pH en estudio, se realizaron ilustraciones a escala de la morfología promedio a partir de los datos obtenidos de las dimensiones celulares (Figura 2). El tamaño celular de las levaduras está sujeto a mucha variabilidad debido a que las levaduras se reproducen formando yemas más pequeñas o células hijas obtenidas a partir de una madre más grande, por lo que cualquier población puede alcanzar un rango amplio de tamaños celulares; las dimensiones que se reportan en la literatura pueden oscilar de 1-9 μm de ancho y 2 μm a más de 20 μm de longitud, según la especie, nutrición, edad y otros factores^{35, 36}.

Los cambios en la morfología de los microorganismos, provocados por condiciones ambientales variables influyen en su fisiología, debido a que algunos flujos celulares dependen principalmente del volumen celular y otros del área superficial celular¹⁰⁶. Esta diferencia juega un papel importante en el entendimiento de por qué los organismos unicelulares resultan tan pequeños. Con el incremento del tamaño, la relación superficie/volumen decrece y por tanto, la velocidad de suministro de la energía libre de Gibbs así como del sustrato, resultando insuficientes para los procesos catabólicos/anabólicos que tienen lugar en el citoplasma¹⁰⁷. Por su parte, Turner *et al.*¹⁰⁸ plantean que el tamaño celular cambia dramáticamente como función de las condiciones extracelulares. Así, el programa de control de tamaño es modulado por condiciones nutricionales y velocidad de crecimiento, correspondiendo a un medio rico y mayor velocidad de crecimiento un mayor tamaño y viceversa. Se ha encontrado que las rutas TOR (*Target Of Rapamycin*) y PKA (*Protein Kinase A*) desempeñan el papel fundamental en el control del tamaño celular.

En otro estudio sobre análisis de poblaciones en una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰⁹ se informa que las células de mayor tamaño corresponden a la fase de crecimiento exponencial, o sea, al estado fisiológico correspondiente a la velocidad máxima de crecimiento. Todos estos informes se corresponden con el menor tamaño celular observado para los cultivos a pH 3, el cual no resultó ser el pH óptimo de crecimiento de la levadura.

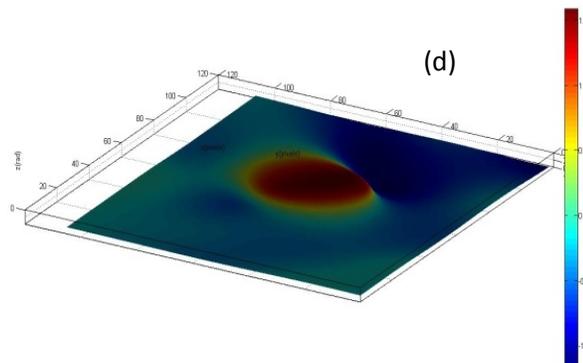
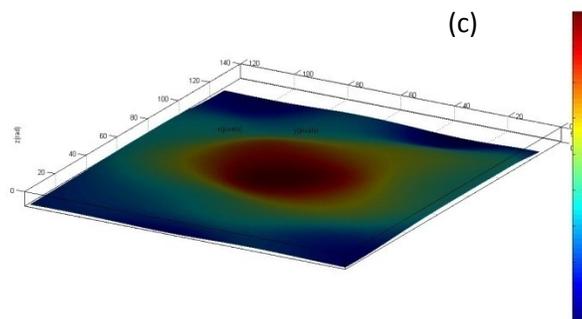
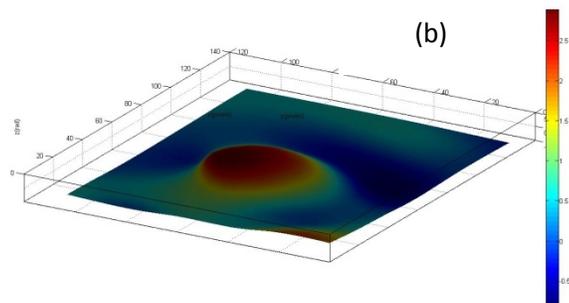
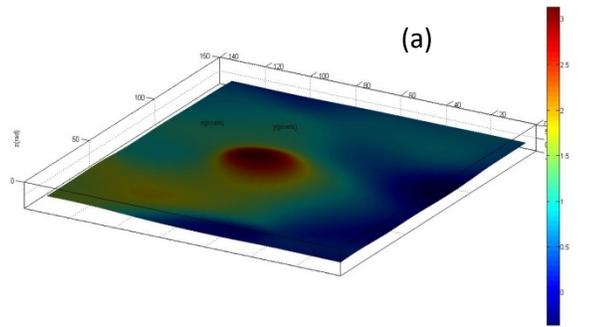


Figura 1. Imágenes de contraste de fase. (a): pH 3; (b): pH 5; (c): pH 6,5; (d): pH 5 libre.

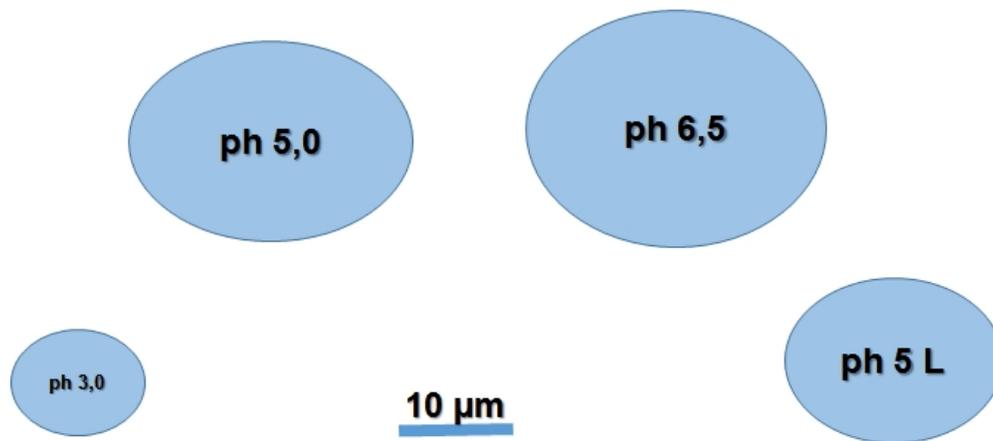


Figura 2. Representación a escala de la morfología celular aproximada de la levadura a las condiciones de pH estudiadas. En todos los casos se considera a las células como un elipsoide de revolución y para su representación se utilizan las mediciones realizadas por Microscopía Holográfica Digital.

III.2. Variación de la composición de la pared celular de la levadura a diferentes valores del pH del medio de cultivo.

III.2.1. Proteínas totales y manoproteínas.

En la Tabla 3 se presentan los resultados correspondientes al análisis del contenido y composición de las manoproteínas en los extractos detergentes en SDS. A estos extractos corresponden la casi totalidad de las proteínas celulares, incluyendo las manoproteínas no unidas covalentemente a los polisacáridos de la pared celular. Se conoce que, en las levaduras, las proteínas de pared celular extraíbles se encuentran unidas a la membrana plasmática, por medio de un anclaje de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), en una etapa intermedia de su biogénesis, antes de su anclaje a la pared vía un enlace covalente (1,6)-glicosídico¹¹⁰. Como puede observarse en la tabla, existen escasas diferencias en los contenidos de proteínas totales de los extractos para las diferentes condiciones de pH; sin embargo, no sucede así para las manoproteínas, cuyas concentraciones son significativamente ($p < 0,05$) superiores (el doble) a pH 5 y 5 sin tamponar, con respecto a las variantes a pHs controlados extremos (3 y 6,5). Igual comportamiento se observa cuando se considera el porcentaje que representan las manoproteínas con respecto a las proteínas celulares totales, llegando a representar más del 10% en las variantes a pH 5 y 5 sin tamponar.

No obstante, cuando se determinó qué porcentaje representan las manoproteínas extraíbles con relación a la masa seca celular (Tabla 3), se encontró que, a excepción de la variante a pH 5 (tamponado), las demás variantes presentaron similares contenidos de manoproteínas, de 17,2-18,4%. En cambio, la variante a pH 5 mostró un valor notablemente superior (25,5%). Al referir el contenido de manoproteínas extraíbles a la masa de pared celular se tuvo, para pH 5, un resultado marcadamente superior a las demás variantes (36,41%), el doble de lo encontrado en la variante a pH 5 libre (sin tamponar) y cinco veces mayor que en las variantes de pHs extremos estudiados.

El contenido de manoproteínas totales (extraíbles y no extraíbles) es alrededor del 40% (m/m) de la pared celular¹¹¹ por lo que el resultado obtenido para la variante a pH 5 sugiere que una mayor porcentaje de las manoproteínas no se encuentran enlazadas covalentemente a la pared celular. Esto concuerda con el hecho de que este es el pH óptimo para la levadura, debiendo existir un mayor nivel de síntesis proteica y, en consecuencia, un mayor porcentaje de las proteínas de pared celular ancladas a la membrana plasmática, en tránsito hacia la pared celular y, por ende, susceptibles de ser extraídas por detergentes¹¹⁰

Se ha informado que más de la mitad de las manoproteínas, predichas del análisis bioinformático de los ORFs de genomas de levaduras, tienen función desconocida, pero todo parece indicar que desempeñan funciones muy importantes para la célula¹¹², toda vez que forman la interfase con el mundo externo. Su diversidad estructural y funcional es muy grande y se cree que esta juega un rol importante

Tabla 3. Composición de proteínas totales y manoproteínas a diferentes condiciones de pH.

	Condiciones de pH			
	pH 3,0	pH 5,0	pH 6,5	pH 5,0 L
Proteínas totales (mg·mL ⁻¹) ^a	7,74	8,28	7,31	8,78
Proteína-MP (mg·mL ⁻¹)	0,25	0,42	0,08	0,37
Carbohidratos-MP (mg·mL ⁻¹)	0,25	0,42	0,36	0,72
MP (mg·mL ⁻¹) ^a	0,51	0,84	0,44	1,09
MP (%)^b	6,57	10,19	6,06	12,44
Relación carb/prot en MP^c	1,00	0,98	4,62	1,92
Contenido pared celular (%) ^d	16,0	7,1	13,9	13,6
Proteínas totales (%)^d	17,2	25,5	17,2	18,4
MP (%)^e	7,04	36,41	7,47	16,89

Leyenda:

- a) En el extracto detergente
- b) Como porcentaje de las proteínas totales en el extracto celular
- c) Relación másica
- d) Porcentaje con respecto a la masa seca celular
- e) Con respecto a la masa seca de pared celular

MP: manoproteína

en la adaptación de las células a las condiciones ambientales, en el modo de crecimiento y en la supervivencia¹⁰⁰.

Las manoproteínas, residentes en la capa más externa de la pared celular, le dan a esta estructura sus propiedades activas y desempeñan un importante papel en el control de la porosidad de la pared celular¹¹³. Entre otras funciones, las manoproteínas participan en la retención de agua, adhesión celular, virulencia, formación de biopelículas, astringencia, incorporación de hierro, hidrofobicidad y actividad enzimática^{114, 115}

Las manoproteínas extraíbles constituyen un producto biotecnológico de mucha importancia. Entre otras aplicaciones reconocidas, se encuentra su uso en las industrias de bebidas espumosas, de modo particular cervezas y cavas (vinos espumosos), donde se usan como agentes formadores y estabilizantes de la espuma, mejorando la calidad de estos demandados productos^{116, 117, 118 119}. Por otro lado, los mananos y manooligosacáridos derivados de pared celular de levaduras también son productos de gran interés. Los oligosacáridos de manano proveen una fuente rica en manosa para la unión de bacterias intestinales patógenas, previniendo así la colonización del tracto intestinal¹²⁰. Los manooligosacáridos también pueden actuar como prebióticos, sirviendo de nutrientes a bacteria benéficas como *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* en el colon¹²¹.

Con respecto a las manoproteínas y sus usos potenciales un elemento importante a considerar es su estructura, fundamentalmente en lo que concierne a la proporción entre la región conformada por carbohidratos, de naturaleza hidrofílica y la región peptídica o proteica, de naturaleza hidrófoba. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos para la caracterización estructural de las manoproteínas extraíbles para las diferentes variantes de pH estudiadas. Las variantes a pHs 3 y 5 muestran prácticamente idénticas proporciones de carbohidratos y proteínas; esta relación se incrementa a aproximadamente 2 en la variante a pH 5 inicial, sin controlar y, aún mucho mayor, en la variante a pH 6,5, donde esta relación llega a ser casi 5, lo que corresponde a alrededor del 80% de azúcares en la manoproteína. Esto último corresponde con lo comunicado por Rodríguez *et al.*¹¹⁶ y Aguilar-Uscanga y François, 2003³⁹. Otros autores, sin embargo, han referido la caracterización de manoproteínas con una relación carbohidratos/ proteína solo ligeramente mayor que 2¹²².

En este estudio, una probable causa de las bajas proporciones carbohidratos/proteínas en las manoproteínas pudiera estar relacionado con la hidrólisis de las cadenas de manosa durante la solubilización con NaOH de los precipitados proteicos, luego del tratamiento de los extractos en detergente con cloroformo/metanol. Esto pudo haber provocado la pérdida de pequeños manooligosacáridos que no fueron capaces de precipitar con el reactivo de Fehling.

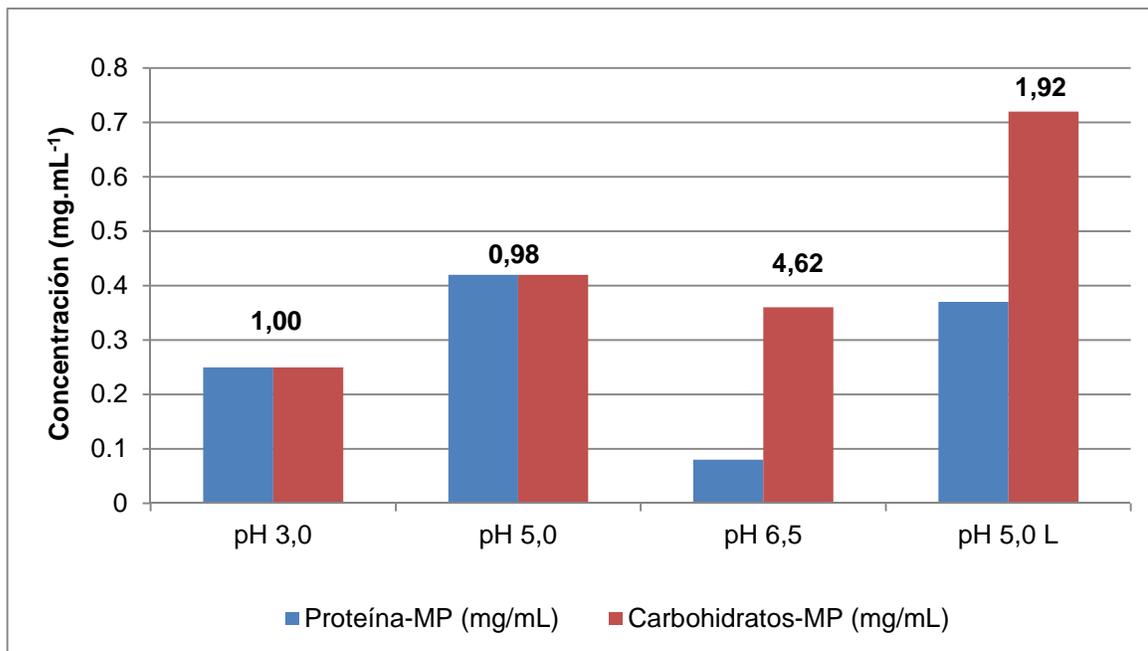


Figura 3. Relaciones carbohidratos/proteína en manoproteínas para cada condición de pH estudiada. MP: Manoproteínas.

En general, se pudo apreciar una marcada influencia del pH sobre el contenido y composición de las manoproteínas extraíbles de la pared celular de *K. marxianus* CCEBI 2011.

III.2.2. Caracterización de la composición en monosacáridos de pared celular de levadura y proteína enlazada a membrana.

La composición de la pared celular, puede variar significativamente de acuerdo a la edad de la célula, estrés y a las condiciones del medio de cultivo. El pH al cual se mantiene el medio de cultivo posee un efecto importante en la composición y estructura de la pared celular en levaduras y provee a las levaduras de una protección extra, que se traduce en una mayor concentración de componentes de la pared celular, para lidiar con las condiciones adversas presentes en el medio.

En la **Tabla 4** se muestran los resultados correspondientes a la caracterización de la composición de la pared celular para las diferentes condiciones de pH estudiadas.

El contenido de quitina estuvo, de forma general, entre el 1 y 3 % aproximadamente, resultando un mayor porcentaje para el pH 5 con un 3,24 % seguida por la obtenida a pH 6.5 (2,26 %), valores que están en correspondencia con lo reportado en la literatura consultada^{39, 93, 98,100,121}. Teniendo en cuenta que a pH 5 es donde la levadura presenta menor contenido de pared celular, es lógico suponer que se produzca un incremento en el contenido de quitina, por ser este uno de los principales componentes responsabilizados con el incremento de la fortaleza mecánica de la pared celular, al hacer menos solubles a los - glucanos¹⁰⁰

La presencia de proteína enlazada covalentemente a la pared celular aumentó significativamente ($p < 0,05$) en el cultivo tamponado a pH 3 respecto a las otras variantes de pH estudiadas, indicando que para esta condición de pH los cultivos que emplean medio mineral con sales de amonio como fuente de nitrógeno resultan en una elevada tasa de síntesis proteica.

Se ha informado que cuando las células de levadura son retadas por condiciones de estrés, como puede ser un pH muy bajo (variante a pH 3), se produce una respuesta transcripcional específica, que incluye la respuesta general a estrés, la ruta de integridad de la pared celular y la de la calcineurina. Las proteínas covalentemente unidas a la pared protegen a la célula de la pérdida de precursores para la síntesis de la propia pared celular. Por otro lado, muchas de estas proteínas contienen grupos fosfatos, contribuyendo a una mayor retención de agua en la pared¹⁰⁰. Existen, además, las llamadas proteínas Pir (de *Proteins containing Internal Repeats*). Estas proteínas, junto a la Cwp1 son incorporadas más eficientemente a pHs bajos a la pared celular¹²³. Todo esto concuerda con el significativamente alto contenido de proteína unida covalentemente a membrana encontrado en la variante a pH 3.

Tabla 4. Composición de los hidrolizados de pared celular de *K. marxianus* bajo diferentes condiciones de pH del cultivo.

Composición de pared celular	Condiciones			
	pH 3	pH 5	pH 6,5	pH 5L
Quitina (%)	0,90	3,24	2,26	1,25
Carbohidratos (%)	61,5	104,9	87,3	82,5
Proteína enlazada a pared celular (%)	2,01	0,30	0,10	0,14

Todos los porcentajes expresados con respecto a la masa de pared celular

Por último, en esta investigación se evaluó el contenido de carbohidratos totales en pared celular, cuyos resultados se exponen en la **Tabla 4**. Como puede observarse este parámetro fue afectado considerablemente por el pH del medio de cultivo. A pHs 6,5 y 5 libre, este parámetro estuvo entre 80-90%, lo que concuerda con lo que se conoce para levaduras en general¹²⁴. A pH 5 (óptimo) este valor fue significativamente superior (en el entorno del 100%), en tanto al pH más bajo (3,0) este valor fue también significativamente más bajo. En general, en la interpretación de estos resultados puede influir de manera muy fuerte el contenido de agua retenida por la fracción proteica enlazada a la pared celular. Como ya se vio anteriormente, a pH 3 se tuvo un contenido proteico entre 6 y 20 veces mayor que en las demás variantes. Esto debe aún ser corroborado mediante la determinación del contenido de agua residual en los preparados de pared celular.

Conclusiones
Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El pH del medio de cultivo influye significativamente en el tamaño celular de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, disminuyendo este notablemente a pH 3.
2. El pH del medio de cultivo afecta el contenido de pared celular en la levadura, siendo mínimo a pH 5 e incrementándose a valores de pH mayores o menores que este; el valor más alto ($16,0 \pm 2,7$ %) se obtuvo a pH 3.
3. La composición de la pared celular es fuertemente afectada con la variación del pH del cultivo. El contenido de manoproteínas, quitina y carbohidratos totales se hace máximo a pH 5, en tanto el contenido de proteínas covalentemente enlazada a pared es mayor a pH 3.

Recomendaciones

Recomendaciones

RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar la proporción manosa/glucosa en los hidrolizados de pared celular.
- ✓ Realizar fraccionamiento y caracterización de los polisacáridos de pared celular de la levadura *K. marxianus* CCEBI 2011.

Referencias Bibliográficas
Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Magnelli P., Cipollo J.F., Abeijon C.A. 2002. Refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and b-1,6-Glucan fine structure. **Analytical Biochemistry**. 301: 136–150.
- ² Pontón J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. **Rev. Iberoam. Micol.** 25: 78–82.
- ³ Perez P., Ribas J.C. 2004. Cell wall analysis. **Methods**. 33: 245–251.
- ⁴ Hidalgo T.J. 2010. Tratado de Enología. 2da ed. Ediciones Mundi-prensa. Tomo I. España. P: 557- **Disponible en:** <http://books.google.com/books?id=4nLPy0y80OIC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false> 14/01/2013.
- ⁵ Freimund S., *et al.* 2005. Optimised quantification method for yeast-derived 1, 3-b-d-glucan and a-d-mannan. **Eur. Food Res. Technol.** 220: 101–105.
- ⁶ Álvaro A. 2002. Efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae* en el alimento como promotor de crecimiento, sobre los parámetros productivos en el pollo de engorda. **[Tesis de Licenciatura]**. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- ⁷ Garibay T.L. 2007. Suplementación de Beta-glucanos purificados en las dietas para el pollo de engorda, sobre los parámetros productivos. **[Tesis de Licenciatura]**. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- ⁸ Morikawa K., *et al.* 1985. Induction of tumoricidal activity of polymorphonuclear leukocytes by a linear -1,3-D-glucan and other immunomodulators in murine cells. **Cancer Res.** 45: 1496–1501.
- ⁹ Hong F., *et al.* 2003. Glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. **Cancer Res.** 63: 9023–9031.
- ¹⁰ Gelderman K.A., *et al.* 2004. Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. **Trends Immunol.** 25: 158-154.
- ¹¹ Petravic T.V., *et al.* 2010. Biological effects of yeast -Glucans. **Agric. Conspec. Sci.** 75(4): 149–158.
- ¹² Yoshida Y., *et al.* 2004. Potent hypocholesterolemic activity of the yeast *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 in rats fed a high cholesterol diet. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 68: 1185–1192.

-
- ¹³ Yoshida Y., *et al.* 2005. Effects of the cell wall of *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 on the plasma cholesterol and fecal sterol excretion in rats fed on a highcholesterol diet. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 69: 714–723.
- ¹⁴ Yoshida Y., *et al.* 2009. Side-chain structure of cell surface polysaccharide, mannan, affects hypocholesterolemic activity of yeast. **J. Agric. Food Chem.** 57: 8003–8009.
- ¹⁵ Graciano F., *et al.* 2007. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **FEMS Yeast Research.** 7(3): 422–435.
- ¹⁶ Groeneveld P., Stouthamer A. Westerhoff H. 2009. Super life—how and why ‘cell selection’ leads to the fastest growing eukaryote. **FEBS Journal.** 276(1): 254–270.
- ¹⁷ Shaheen A., *et al.* 2009. Production of ethanol by indigenous wild and mutant strain of thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* under optimized fermentation conditions. **Pak. J. Anal. Environ. Chem.** 10(1-2): 25–33.
- ¹⁸ Varga-Erdei É. 2011. Improvement of *Kluyveromyces marxianus* yeast strains for bioethanol production. [Tesis Disertación Doctoral]. University of Debrecen.
- ¹⁹ Lertwattanasakul N., *et al.* 2011. Utilization capability of sucrose, raffinose and inulin and its less-sensitiveness to glucose repression in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. **AMB Express.** 1(1): 1–11.
- ²⁰ Signori L., *et al.* 2014. Effect of oxygenation and temperature on glucose-xylose fermentation in *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain. **Microbial Cell Factories.** 13:51.
- ²¹ Rodríguez G.O. 2008. Estudio de la coproducción de endopoligalacturonasa y etanol por *Kluyveromyces marxianus* a partir del jugo de la caña de azúcar. [Tesis Maestría]. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- ²² Heck B.L., *et al.* 2004. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research.** 4: 691–698.
- ²³ Gamarra G., Ballena J.C., Woolcott-Hurtado J. 2000. Optimización de las condiciones fermentativas para la producción y extracción de α -galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus*. **Rev. Per. Química e Ingeniería Química.** 3(1).
- ²⁴ Raimondi, *et al.* 2013. Thermal adaptability of *Kluyveromyces marxianus* in recombinant protein production. **Microbial Cell Factories.** 12(34): 1–7.

-
- ²⁵ Fonseca G., Carvalho N., Gombert A. 2013. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 97(11): 5055–5067.
- ²⁶ Serrat M. 2003. Producción, purificación y caracterización de la poligalacturonasa de una cepa de levadura aislada de residuales del beneficio húmedo del café. [Tesis Doctoral]. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- ²⁷ Serrat M., Bermudez R., Villa T. 2004. Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*: potential use of polygalacturonase in foodstuffs. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 117(1): 49–64.
- ²⁸ Amrane A., Prigent Y. 1998. Effect of culture conditions of *Kluyveromyces marxianus* on its autolysis, and process optimization. **Bioprocess Engineering** 18: 383–388.
- ²⁹ Hahn-Hägerdal B., *et al.* 2005. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. **Review Microbial Cell Factories**. 4(31): 1–16.
- ³⁰ Wilkins R.M., *et al.* 2008. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. **Process Biochemistry**. 43: 346–350.
- ³¹ Pinheiro R., Belo I. and Mota M. 2003. Growth and b-galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**. 37: 438–442.
- ³² Oliveira Q.O. 2012. Influência da fonte de carbono, pH e temperatura na atividade da enzima poligalacturonase de *Kluyveromyces marxianus* CCMB 322. **Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas**. 32(3): 499–504.
- ³³ Parrondo J., García L.A., Díaz M. 2009. Nutrient balance and metabolic analysis in *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 26(3): 445–456.
- ³⁴ Aguilar U.B., Solis P.J., François, J.M. 2005. Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **e-Gnosis**. 3(12): 1–8.
- ³⁵ Carlile M.J., *et al.* 2001. *The Fungi*. 2ª ed. Academic Press, San Diego. p 70.
- ³⁶ Rodríguez O., Pérez Q., Bocourt S. 2008. Componentes de la pared de las levaduras: Actividad probiótica. CD de monografías. Universidad “Camilo Cienfuegos”. Matanzas. **Disponible en:** <http://monografias.umcc.cu/monos/2008/Agronomia/m0817.pdf>.

-
- ³⁷ Navascués E. 2010. El papel de las manoproteínas: Elaboración de vinos de calidad. **Enología**. 21–23.
- ³⁸ Orlean P. 2012. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. **Genetics**. 192: 775–818.
- ³⁹ Aguilar-Uscanga B., François J.M. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Applied Microbiology**. 37: 268–274.
- ⁴⁰ Zinser E., Daum, G. 1995. Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. 11: 493–536.
- ⁴¹ Edith E.P. Tópicos de micología. **Disponible en:** http://www.biologia.edu.ar/micologia/04_micologia.htm:14-3-2016
- ⁴² Kasai T., *et al.* 2000. Application of acid-treated yeast cell wall (AYC) as a pharmaceutical additive I. AYC as a novel coating material. **Int. J. Pharm.** 204: 53–59.
- ⁴³ Sánchez L. 1997. Obtención, caracterización y producción a escala piloto de un polisacárido β -(1,3) glucano con actividad inmunomoduladora. **[Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias]**. CENSA. La Habana. pp. 103.
- ⁴⁴ Iglesias, R.D., González M.S., Azahares Z. 1995. Optimización del proceso de obtención del complejo fosfo-manoproteína. **Seminario Científico Internacional**. ICA. La Habana. Cuba. p: 32.
- ⁴⁵ Bresson J.L., *et al.* 2009. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta glucans and maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 754, 755, 757, 801, 1465, 2934) and maintenance or achievement of a normal body weight (ID 820, 823) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. **EFSA Journal**. 7(9): 1254.
- ⁴⁶ Vetvicka V., *et al.* 2002. Pilot study: Orally-administered yeast 1,3-glucan prophylactically protects against anthrax infection and cancer in mice. **Journal of the American Nutraceutical Association**. 5(2): 5–9.
- ⁴⁷ Kirmaz C., *et al.* 2005. Effects of glucan treatment on the Th1/Th2 balance in patients with allergic rhinitis: a double-blind placebo-controlled study. **European Cytokine Network**. 16(2): 128–134.

-
- ⁴⁸ Kogan, G., *et al.* 2005. Antioxidant properties of yeast (1-3)- β -D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis. **Carbohydrate Polymers**. 61(1): 18–28.
- ⁴⁹ Herrero de Dios C.M. 2013. OPY2, un nuevo elemento implicado en la señalización vía quinasas de tipo MAP en el hongo patógeno *Candida albicans*. [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid.
- ⁵⁰ Van der Walt. 1971. *Bothalia*. 10(3): 418.
- ⁵¹ Lane M., Morrissey J. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**. 24(1): 7–26.
- ⁵² Jay J.M. 1994. Microbiología moderna de los alimentos, 3ª ed. Acribia, S.A., Zaragoza, España. pp: 36-39. Kameswara Rao C. En: Fermentation biotechnology Foundation for Biotechnology Awareness and Education. Copyright 2003: 1-12. [www.fbae.org/channels/general_issues/fermentation_biotechnology .htm](http://www.fbae.org/channels/general_issues/fermentation_biotechnology.htm).
- ⁵³ Nadchanok R., *et al.* 2011. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 90: 1573–1586.
- ⁵⁴ Diniz R., *et al.* 2012. The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. **Antonie van Leeuwenhoek**. 101(3): 541–550.
- ⁵⁵ Dos Santos V., Bragança C., Passos F., Passos F. 2013. Kinetics of growth and ethanol formation from a mix of glucose/xylose substrate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. **Antonie van Leeuwenhoek**. 103(1):153–161.
- ⁵⁶ Wang R., *et al.* 2013. Improved xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperature through construction of a xylose isomerase pathway. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**. 40(8): 841–854.
- ⁵⁷ Oliva J.M., *et al.* 2006. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**. 41: 1223–1228.
- ⁵⁸ Ariyanti D., Hadiyanto H. 2013. Ethanol Production from whey by *Kluyveromyces marxianus* in batch germentation system: Kinetics parameters estimation. **Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis**. 7(3): 179–184.
- ⁵⁹ Zoppellari F., Bardi L. 2013. Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. **New Biotechnology**. 30(6): 607–613.

-
- ⁶⁰ Goshima T., *et al.* 2013. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 77(7): 1505–1510.
- ⁶¹ López-Álvarez A., *et al.* 2012. Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 113(5): 614–618.
- ⁶² Amaya-Delgado L., *et al.* 2013. Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. **World J. of Microbiology and Biotechnology**. 29(5): 875–881.
- ⁶³ Fernandez C., *et al.* 2014. Interactions between *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in tequila must type medium fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 1-7.
- ⁶⁴ Zalashko M.V., Zalashko L.S. 1999. Cultivos microbiológicos a base de suero lácteo(ruso), 1ª ed. Ciencia y Tecnología. Minsk, Rusia Blanca. 66: 75-77,156.
- ⁶⁵ Hjortmo S.B., Hellstrom A.M., Andlid T.A. 2008. Production of folates by yeasts in Tanzanian fermented togwa. **FEMS Yeast Res.** 8, 781–787.
- ⁶⁶ Moslehi-Jenabian S., Lindegaard P.L., Jespersen L. 2010. Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. **Nutrients**. 2: 449-473.
- ⁶⁷ Lopes M., *et al.* 2014. Production and characterization of α -glucanase secreted by the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 172(5): 2412–2424.
- ⁶⁸ Graciano F., *et al.* 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 79: 339–354.
- ⁶⁹ Yoshida, *et al.* 2009. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of b-glucosidase from *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777. **Acta Cryst.** 65: 1190–1192.
- ⁷⁰ Jain S.C., *et al.* 2012. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using Dahlia tuber extract. **Brazilian Journal of Microbiology**. 62–69.
- ⁷¹ Silva M., *et al.* 2013. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by inulinases from *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic medium. **Food Chemistry**. 138(1): 148–153.

-
- ⁷² Montiel X., *et al.* 2005. Optimización del proceso de extracción de la lactasa de *Kluyveromyces marxianus* ATTC 8554, para su aplicabilidad en la industria láctea. **Revista Científica**, FCV-LUZ. 15 (5): 476 – 482.
- ⁷³ Carmo J. 2013. Produção de etanol e pectinase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 utilizando resíduos do processamento do café (*Coffea arabica* L.). [PhD Tese]. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.
- ⁷⁴ Sieiro C., *et al.* 2014. Albarino wine aroma enhancement through the use of a recombinant polygalacturonase from *Kluyveromyces marxianus*. **Food Chemistry**. 145: 179–185.
- ⁷⁵ Crafac M., *et al.* 2013. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. 167(1): 103–116.
- ⁷⁶ Lukondeh T., Ashbolt N., Rogers P. 2003. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as a source of yeast autolysates. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**. 30: 52–56.
- ⁷⁷ Lukondeh T., Ashbolt N., Rogers P. 2003. Confirmation of an alkali-insoluble glucans from *Kluyveromyces marxianus* cultivated on a lactose-based medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 19: 349–355.
- ⁷⁸ Lukondeh T., Ashbolt N., Rogers P. 2003. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**. 30: 715–720.
- ⁷⁹ Pal R., Tewari S., Rai J. 2009. Metals sorption from aqueous solutions by *Kluyveromyces marxianus*: process optimization, equilibrium modeling and chemical characterization. **Biotechnology Journal**. 4(10): 1471–1478.
- ⁸⁰ Maccaferri S., *et al.* 2012. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. **Applied Environmental Microbiology**. 78(4): 956–964.
- ⁸¹ Rodríguez G.O., *et al.* 2011. Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de etanol de melaza de caña por *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**. 42(2): 97–102.
- ⁸² Serrat M., *et al.* 2011. Influence of nutritional and environmental factors on ethanol and endopolygalacturonase co-production by *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011. **International Microbiology**. 14: 41–49.

-
- ⁸³ Camacho P.M., *et al.* 2014. Evaluación de dos métodos de conservación para *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 en la Colección de Cultivos del CEBI. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**. 34: 91–96.
- ⁸⁴ Verduyn C., *et al.* 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeast: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**. 8: 501–517.
- ⁸⁵ Hahn-Hägerdal B., *et al.* 2005. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. **Microbial Cell Factories**. 4:31.
- ⁸⁶ Serrat M., Méndez A.A. 2015. Construcción y validación experimental de un biorreactor artesanal tipo tanque agitado para fermentaciones sumergidas a escala de laboratorio. **Tecnología Química**. 35(3): 317-333.
- ⁸⁷ Miller G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 31(3): 426–428.
- ⁸⁸ Madigan M. 2005. Brock Biology of Microorganisms. 11th. Ed. Prentice-Hall, New Jersey.
- ⁸⁹ Groot P.W., *et al.* 2004. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. **Eukaryot Cell**. 3: 955–965.
- ⁹⁰ Vitaly V., Kushnirov V.V. 2000. Rapid and reliable protein extraction from yeast. **Yeast**. 16: 857–860.
- ⁹¹ Von der Haar T. 2007. Optimized protein extraction for quantitative proteomics of yeasts. **PLoS ONE**. 2(10): e1078. doi:10.1371/journal.pone.0001078.
- ⁹² Belem M.A.F., Lee B. H. 1998. Production of nioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: An alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 38(7): 565–598.
- ⁹³ Backhaus K., *et al.* 2010. A systematic study of the cell wall composition of *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**. 27: 647–660.
- ⁹⁴ Chen G.C., Johnson B.R. 1983. Improved colorimetric determination of cell wall chitin in wood decay fungi. **Appl. Environ. Microbiol.** 46(1): 13–16.
- ⁹⁵ Lowry O.H., *et al.* 1951. Protein measurement with folin-phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265–275.
- ⁹⁶ Dubois M., *et al.* 1956 Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. 28: 350–356.

-
- ⁹⁷ Elson L.A., Morgan W.T.J. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine y chondrosamine. **Biochem. J.** 27: 1824–1828.
- ⁹⁸ Dallies N., François J., Paquet V. 1998. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.** 14: 1297–1306.
- ⁹⁹ Klis F.M., *et al.* 2009. Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. **FEMS Yeast Research.** 9: 1013–1028.
- ¹⁰⁰ Klis F.M., *et al.* 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.** 23: 185–202.
- ¹⁰¹ Griffin S.R., MacWilliam I.C. 1969. Variation of cell wall content in flocculent and non-flocculent yeast strains. **J. Inst. Brew.** 75: 355–358.
- ¹⁰² AppliChem©. 2008. Biological Buffers. USA.
- ¹⁰³ Abebe D., *et al.* 2004. Use of buffering to modify yeast growth rate. Undergraduate Projects.
- ¹⁰⁴ Méndez H.A. 2015. Construcción de un biorreactor artesanal tipo tanque agitado, validación experimental y evaluación del desempeño en el cultivo de *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011. [Tesis Maestría]. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- ¹⁰⁵ Panikov N.S. 1999. Kinetics, microbial growth. En: M. C. Flickinger y S. W. Drew (Editores). The Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. New York: Wiley-Interscience. 1147-1156.
- ¹⁰⁶ Clegg J., Jackson S., Fendl K. 1990. Effects of reduced cell volume and water content on glycolysis in L-929 cells. **Journal of Cell Physiology.** 142: 386–391.
- ¹⁰⁷ Koch A. 1996. What size should a bacterium be? A question of scale. **Annual Review in Microbiology.** 50: 317–348.
- ¹⁰⁸ Turner J.J., *et al.* 2012. Cell size control in yeast. **Current Biology.** 22: R350–R359.
- ¹⁰⁹ Portell X., *et al.* 2011. Population analysis of a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast in a batch culture by electric particle analysis, light diffraction and flow cytometry. **FEMS Yeast Research.** 11: 18–28.
- ¹¹⁰ Brul S., *et al.* 1997. The incorporation of mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous Ascomycetes. **Antonie van Leeuwenhoek.** 72: 229–237.

-
- ¹¹¹ Lipke P.N., Ovalle R. 1998. Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges **J. Bacteriol.** 180: 3735–3740.
- ¹¹² Protchenko O. *et al.* 2001. Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biological Chemistry.** 276: 49244–49250.
- ¹¹³ Brul S., *et al.* 1997. The incorporation of mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous Ascomycetes. **Antonie van Leeuwenhoek.** 72: 229–237.
- ¹¹⁴ De Groot P.W., Ram A.F. y Klis F.M. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **Fung. Gen. Biol.** 42: 652–675.
- ¹¹⁵ Cedieux B., *et al.* 2013. The mannoproteins Cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Infectious Diseases.** 207: 1339–1347.
- ¹¹⁶ Rodríguez A., *et al.* 2012. Influence of fining and tartaric acid stabilisation procedures on white wine mannoprotein content. **S. Afr. Enol. Vitic.** 33: 88–94.
- ¹¹⁷ Núñez Y.P., *et al.* 2006. Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines. **J. Agr. Food Chem.** 54: 7898–7903
- ¹¹⁸ Blasco L., *et al.* 2011. FPG1, a gene involved in foam formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.** 28: 437–451.
- ¹¹⁹ Blasco L., *et al.* 2011. Protein influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast. **International Microbiology.** 14: 61–71.
- ¹²⁰ Spring P., *et al.* 2000. Effect of sodium gluconate, mannan oligosaccharide and potassium diformate on performance of growing New Zelan White rabbits. **Egypt. Poult. Sci.** 33: 73–85.
- ¹²¹ Maru V., *et al.* 2015. Partial purification and characterization of mannan oligosaccharides from cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.** 4(12): 705–711.
- ¹²² Waters E.J., Pellerin P., Brillouet J.M. 1994. A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. **Carbohydr. Polym.** 23: 185–191.
- ¹²³ Kapteyn J.C., *et al.* 2001. Low external pH induces *HOG1*-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Mol. Microbiol.** 39: 469–479.
- ¹²⁴ Klis F.M., *et al.* 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews.** 26: 239–256.

Anexos
Anexos

ANEXOS

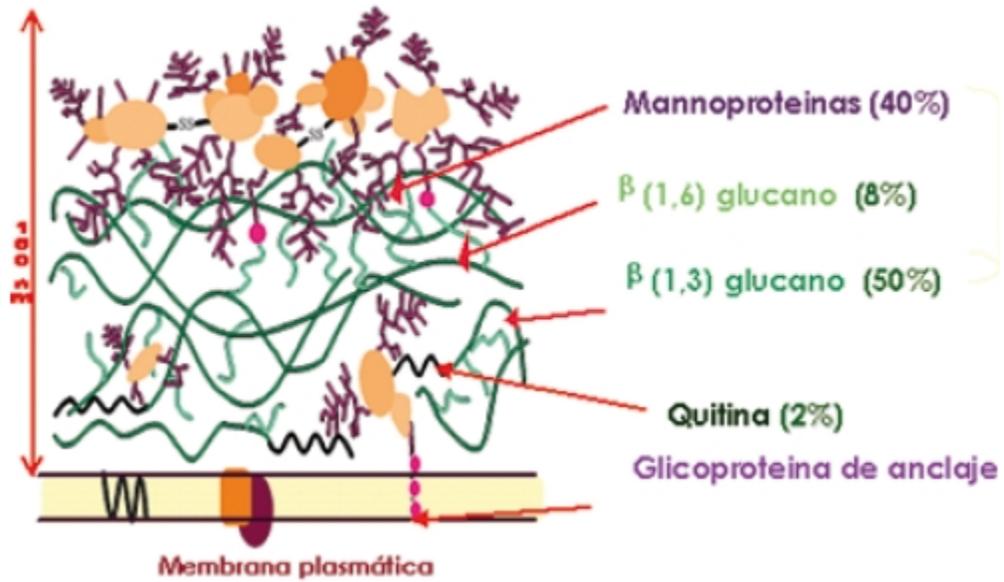
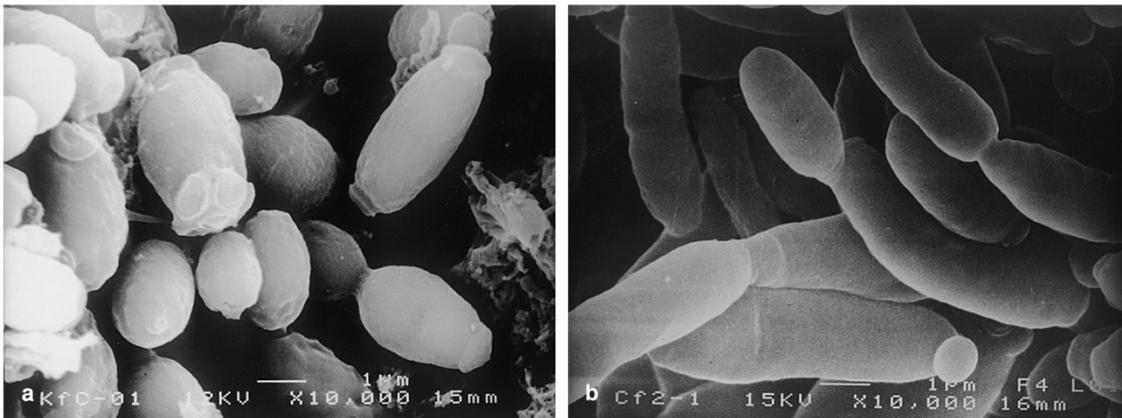


Figura 1A. Estructura de la pared celular de levaduras³⁷



Figuras 2A (a-b). *K. marxianus* al final del cultivo a pH4.5 (a), y sin control del pH (b)²⁸

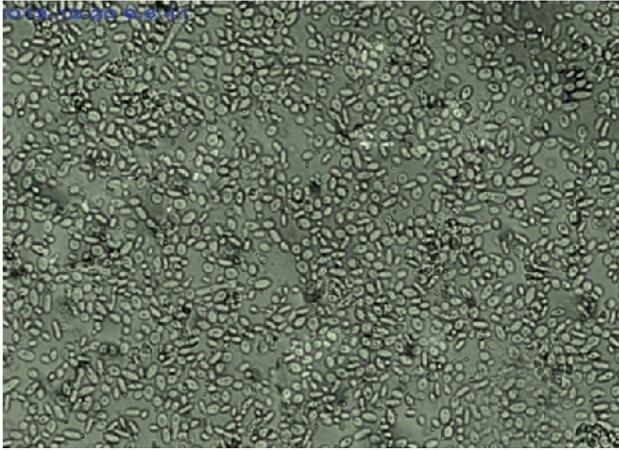


Figura 3A. *K. marxianus* CCEBI 2011. Células ovoides y cilíndricas con gemación unipolar (aumento 60X)⁸³.

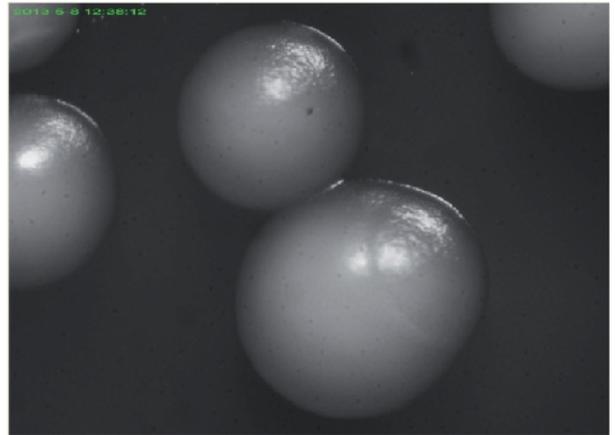


Figura 4A. *K. marxianus* CCEBI 2011. Colonias circulares de 2-3 mm de diámetro, blancas, opacas, lisas, abultadas y de borde entero (aumento 400X)⁸³.

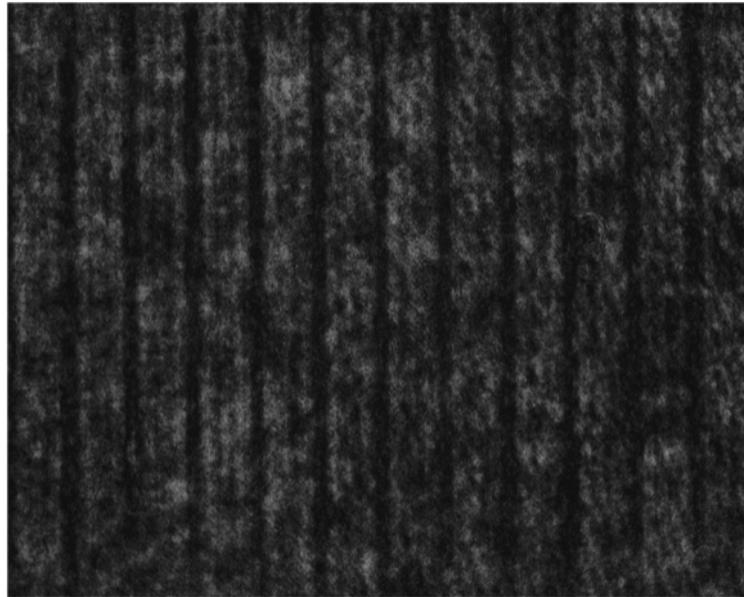
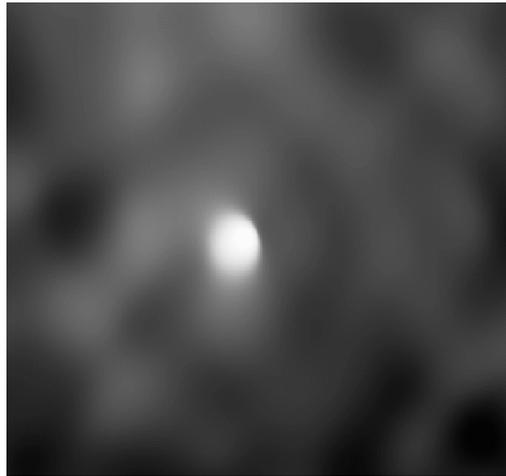
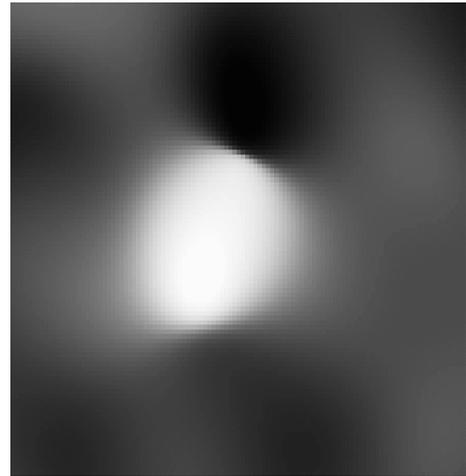


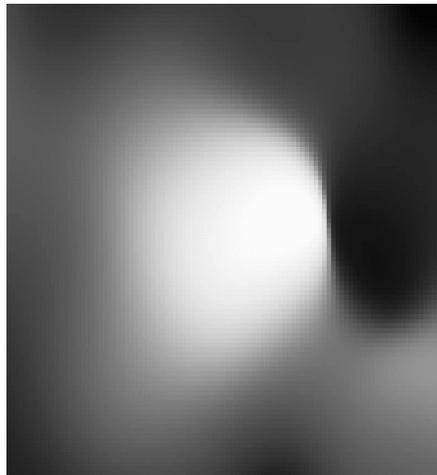
Figura 5A. Escala micrométrica Mitutoyo de 0.01 mm



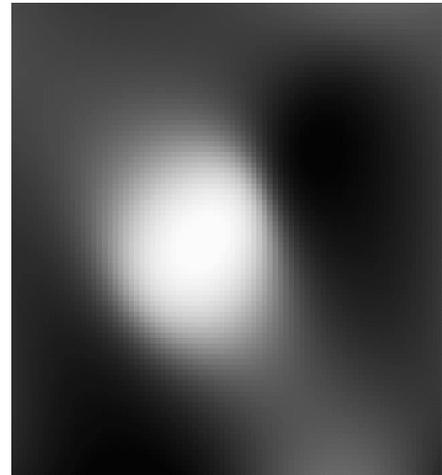
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 6A. Imágenes de intensidad reconstruidas de la levadura *K. marxianus* CCEBI 2011a las diferentes variantes de pH. (a): pH 3; (b): pH 5; (c): pH 6,5 y (d): pH 5 libre.

Curva de Calibración - Lowry

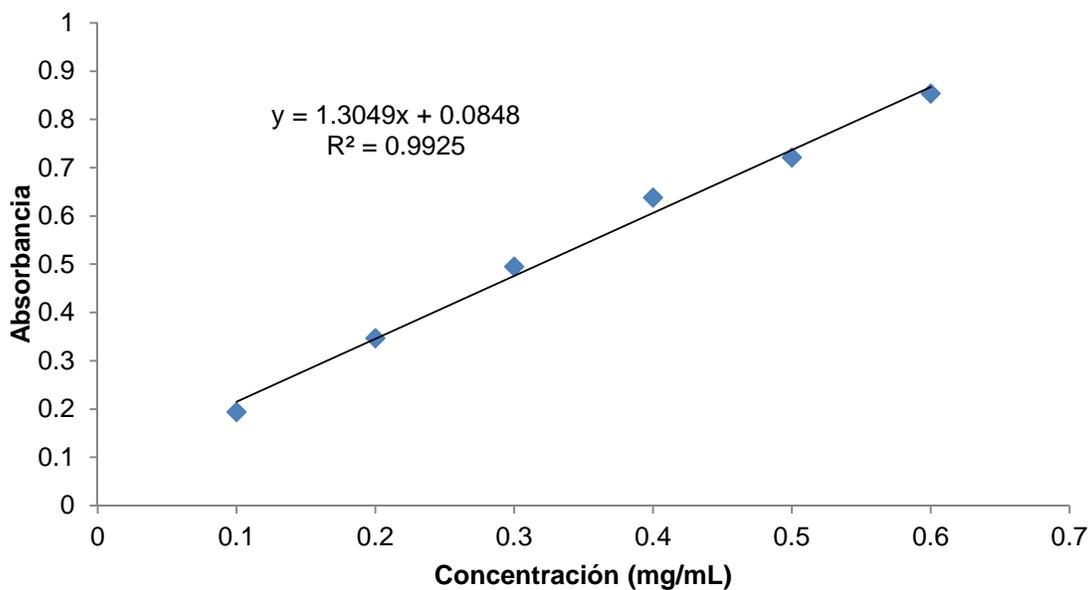


Figura 7A. Curva de calibración del método de Lowry para la determinación de proteína.

Curvas de calibración - Fenol Sulfúrico

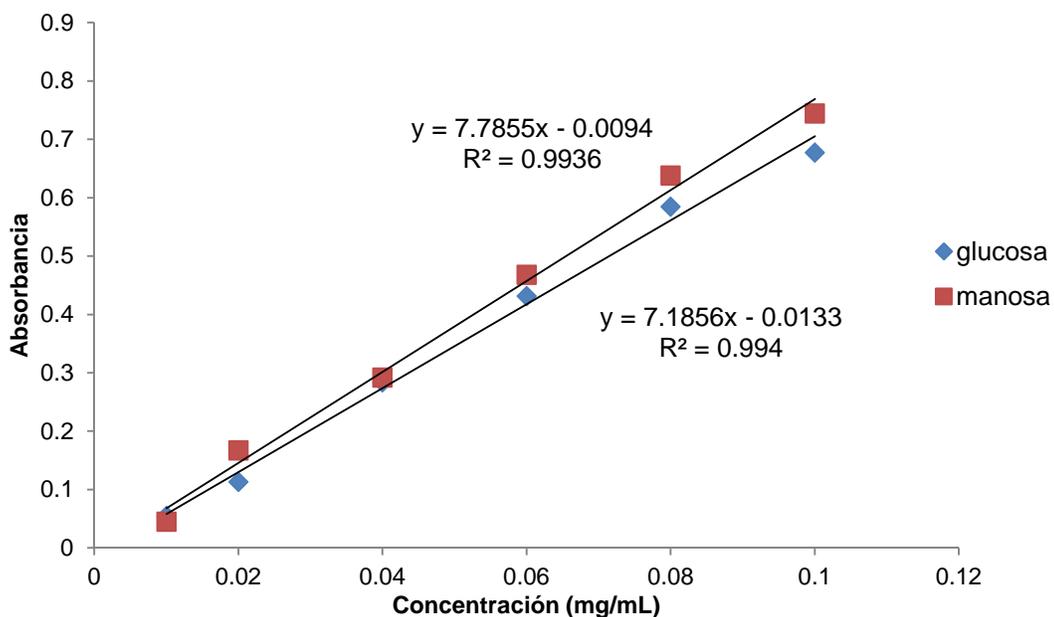


Figura 8A. Curvas de calibración del método del Fenol Sulfúrico para la determinación de carbohidratos.

Glucosamina-HCl por Elson-Morgan

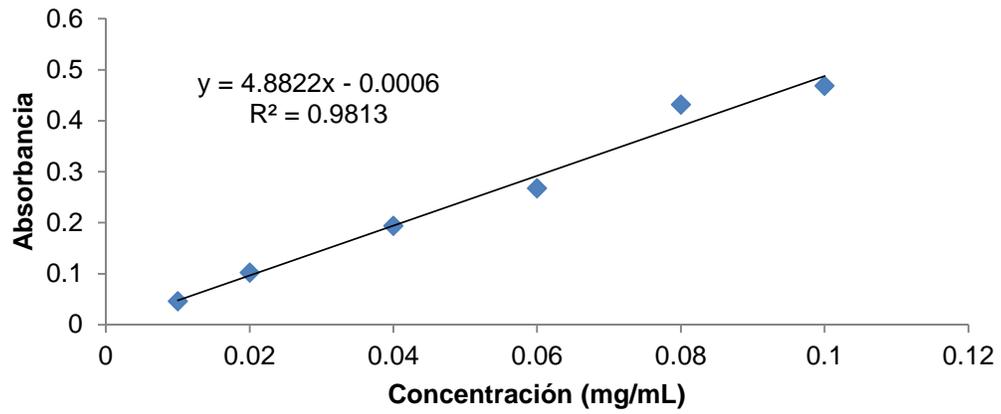


Figura 7A. Curva de calibración del método de Elson-Morgan para la determinación de glucosamina.