

Influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y contenido de pared celular en una cepa floculante de *Kluyveromyces marxianus*

Influence of the Culture Conditions on the Growth and Cell Wall Content in a Flocculent Strain of Kluyveromyces Marxianus

Dr. C. Manuel Serrat-Díaz^I, Ph.D. Juan A. Vallejo-Vidal^{II}, Ph.D. José M. Ageitos-Martínez^{III}, MSc. Gabriel Llauradó-Mauri^I, MSc. Imilci Urdaneta-Laffita^{III}, Ph.D. Tomás G. Villa^{II}
mserrat@uo.edu.cu

^ICentro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba; ^{II}Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España; ^{III}Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

Recibido: 18 de mayo de 2016

Aprobado: 2 de octubre de 2016

Resumen

Los polisacáridos de paredes celulares de levadura poseen reconocidos efectos inmunomoduladores, prebióticos e hipocolesterolémicos. En este trabajo se evaluó la influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y contenido de la pared celular en una cepa floculante de la levadura *Kluyveromyces marxianus*. Se encontró que el contenido promedio de pared celular estuvo en el rango referido habitualmente (15-30 %); este fue afectado principalmente por la naturaleza de las fuentes de nitrógeno y carbono y la temperatura. Se observó una correlación negativa entre el contenido de pared celular y la concentración de biomasa, siendo esta última el factor principal en la producción de pared celular por la levadura. El contenido de carbohidratos totales en pared celular estuvo fuertemente influenciado por factores nutricionales y físicos del cultivo. Estos resultados sugieren que las condiciones de cultivo resultan de especial significación para el desarrollo de procesos productivos de preparados pared celular en levaduras.

Palabras clave: *Kluyveromyces marxianus*, levadura, pared celular, condiciones de cultivo.

Abstract

Polysaccharides from yeast cell wall show immunomodulatory, prebiotic and hypocholesterolemic effects. In this study, the influence of culture conditions on growth and content of the cell wall in a flocculent yeast strain of *Kluyveromyces marxianus* was evaluated. It was found that the average content of the cell wall ranged according to usually referred values (15-30%); this one was affected by nitrogen and carbon sources and temperature, mainly. A negative correlation between cell wall content and biomass concentration was observed; the latter constitutes the most important factor in cell wall production by the yeast. The total carbohydrates content in cell wall was hardly influenced by the nutritional and physic factors of the culture. These results suggest that the culture conditions are of special significance for the development of production processes of cell wall preparations in yeasts.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, yeast, cell wall, culture conditions.

Introducción

Las levaduras tienen actividades de fermentación diversas, por lo que han sido usadas desde la antigüedad para la producción de variadas clases de alimentos tales como cerveza, pan, vinos y derivados lácteos fermentados. Las levaduras desecadas (usualmente inactivadas por el calor) también han sido usadas como un suplemento nutricional pues las células de levaduras íntegras son ricas en vitaminas del grupo B, fibras dietéticas y proteínas. Entre las especies de levadura más conocidas y utilizadas se encuentran *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* y dos del género *Kluyveromyces*: *K. lactis* y *K. marxianus* [1, 2].

Sin embargo, las levaduras de la especie *Kluyveromyces marxianus* han ganado protagonismo en los últimos años en la industria biotecnológica, debido a las numerosas ventajas que presentan con respecto a la más tradicional *S. cerevisiae*. Entre estas ventajas pueden citarse sus mayores velocidades de crecimiento, termotolerancia, fenotipo *Crabtree* negativo y capacidad de crecer sobre una gama más amplia de fuentes de carbono [3, 4]. Además, comparte con *S. cerevisiae* su estatus reconocido de organismo seguro para el hombre (GRAS), aspecto este esencial para el uso de un microorganismo en la obtención de productos para consumo humano [5].

La cepa *K. marxianus* CCEBI 2011 (Colección de Cultivos Microbianos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Universidad de Oriente) ha sido muy estudiada en los últimos años, tanto desde el punto de vista fisiológico como de su potencial de aplicaciones [6-9]. Ejemplo de ello fue la obtención, mediante modificación genética *in vitro* de esta cepa, de clones con fenotipo floculante inducible por anoxia [10].

Los efectos beneficiosos de las levaduras sobre la salud humana son objeto de numerosas investigaciones en la actualidad. Por ejemplo, en un estudio donde se comparó de la actividad hipocolesterolémica de 81 levaduras, se encontró que la *K. marxianus* YIT 8292 exhibía la actividad hipocolesterolémica más potente [11] y, un año más tarde, se reportó que los polisacáridos de la pared celular eran los principales componentes activos de esta levadura [5]. Entre los componentes bioactivos destacan los (1,3)- β -D- glucanos y α -D-mananos, componentes mayoritarios de la pared celular del microorganismo [12]. Por otro lado, también ha sido referido el efecto estimulante sobre el sistema inmune de estos polisacáridos, especialmente de los (1,3)- β -D-glucanos,

así como de sus actividades antiinflamatoria, antimicrobiana, antiviral, antitumoral, radioprotectora y cicatrizante [12, 13].

Con vista a lograr una explotación biotecnológica integral de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, en particular de su estirpe floculante, resultaría de gran interés el aprovechamiento de los polisacáridos estructurales derivados de su pared celular. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar cómo se relacionan las afectaciones en el crecimiento como consecuencia de las variaciones en las condiciones de cultivo (nutricionales, físico-químicas) con el contenido y composición polisacáridica de la pared celular en esta cepa de levadura. Este ha sido un aspecto muy poco estudiado en levaduras. Sin embargo, el control sobre el contenido y la composición de la pared celular sería relevante ante la perspectiva del interés comercial creciente en la producción de β -glucanos y mananos para fines agroalimentarios, farmacéuticos y cosméticos [14].

Materiales y métodos

Microorganismo. Se utilizó la cepa *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 Flo 5.4 [10] depositada en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (Universidad de Oriente, Santiago de Cuba).

Obtención de la biomasa de levadura. En todos los casos el medio de cultivo consistió en el medio sintético completamente definido para levaduras [15]. Se empleó glucosa a 20 g/L como fuente de carbono, excepto en los casos donde se evaluó otra fuente carbonada (sacarosa y lactosa) o en los cultivos en microaerobiosis, donde la concentración fue de 100 g/L. Como fuente de nitrógeno se usó sulfato de amonio a 5 g/L, disminuyendo la concentración de la misma a 2 g/L y 0,5 g/L en los experimentos donde se estudió el efecto de la limitación por nitrógeno; cuando la variable fue la naturaleza de la fuente de nitrógeno se sustituyó la sal de amonio por peptona a 5 g/L. Los medios se esterilizaron a 121 °C durante 20 min.

Los cultivos se propagaron en agitación a 200 rpm y temperatura de 30 °C, con la excepción de los cultivos en microaerobiosis, que se mantuvieron sin agitar y aquellos donde se evaluó la influencia de la temperatura, donde también se incubó a 40 °C. El pH inicial se ajustó siempre a 5,4, excepto en la variante donde se estudió el efecto de esta variable, en cuyo caso también se evaluó el pH inicial de 3,5.

Los cultivos aerobios se llevaron a cabo en matraces de 100 mL, conteniendo 25 mL de medio, en tanto los cultivos microaerobios se realizaron en matraces de 500 mL,

conteniendo 250 mL de medio. Todos los cultivos son inoculados a razón del 2 % (v/v) con un cultivo fresco de la levadura en medio YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L y glucosa 20 g/L). Los cultivos agitados se incubaron durante 14 horas y los estáticos por espacio de 48 horas, correspondiendo en ambos casos a cultivos en fase exponencial tardía. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para la colecta de la biomasa, los tres cultivos réplica correspondientes a cada variable experimental en estudio, se unieron y se centrifugaron (9000 rpm, 10 min, 4 °C). El sobrenadante se utilizó para la determinación del pH final de los cultivos. La biomasa se lavó dos veces con agua destilada, se resuspendió en 10 mL de agua destilada y se tomaron tres alícuotas de 1 mL para la determinación de la concentración celular (base seca) gravimétricamente. La suspensión celular restante se centrifugó, se escurrió bien y se guardó a -20 °C hasta su utilización en la obtención de las paredes celulares.

Preparación de paredes celulares. Primeramente se estandarizó el protocolo de ruptura celular en vortex con perlas de vidrio (0,45-0,55 mm Ø, B. Braun Biotech), de forma tal que se lograra un índice de ruptura superior al 99 %, el cual se comprobó de dos maneras distintas: mediante observación al microscopio del *debris* celular y mediante conteo de viables en medio YPDA (YPD al que se adicionó agar a 20 g/L). Para la ruptura y preparación de las paredes celulares se siguió el protocolo descrito por de Groot *et al.* [16] con ligeras modificaciones. La ruptura completa se consiguió con 10 ciclos de 3 min de agitación en vortex y 30 seg de reposo en hielo. Para la ruptura se utilizó tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8) conteniendo CaCl₂ 0,2 g/L.

En la preparación de las paredes celulares se contempló la extracción repetida (4 veces) a 100 °C durante 10 min con solución detergente (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8; SDS 2 %, Na-EDTA 100 mM, NaCl 150 mM y β-mercaptoethanol 0,8 % (v/v)). Estas extracciones se realizaron con el objetivo de separar toda la proteína no unida covalentemente a la pared celular y los restos de membrana (lípidos). Los preparados de pared celular se lavaron dos veces con etanol absoluto, luego tres veces con acetona y se liofilizaron para la determinación del peso en balanza analítica (Sartorius). Se conservaron en viales sellados a -20 °C.

Caracterización de la composición de la pared celular. Para el análisis del contenido de polisacáridos estructurales se efectuó la hidrólisis completa de los preparados de pared celular con ácido sulfúrico 72 % (m/m) a temperatura ambiente, seguida de hidrólisis en ácido sulfúrico 2 mol/L a 100 °C, por 4 h, según [17]. Se llevó un control

Influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y contenido de pared celular en una cepa floculante de *Kluyveromyces marxianus* de β -glucano (laminarina) y manano de levadura (ambos de Sigma) para el estimado del recobrado de monosacáridos.

A los hidrolizados se les determinó el contenido de carbohidratos totales por el método del fenol-sulfúrico [18] usando como patrón una mezcla de glucosa/manosa 6:4 [14]. Para comprobar la extensión de la hidrólisis se realizó la determinación colorimétrica del contenido de azúcares reductores totales [19] empleando el mismo patrón que para el ensayo de carbohidratos totales.

Resultados y discusión

Influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento de la levadura y la biosíntesis de la pared celular

La concentración de biomasa del clon floculante (inducible por anoxia) de la cepa de levadura *K. marxianus* CCEBI 2011 se afectó de manera significativa ante los cambios en los factores nutricionales y ambientales de cultivo (tabla 1).

TABLA 1. CRECIMIENTO DE LA LEVADURA, CONTENIDO^A Y PRODUCCIÓN^B DE PARED CELULAR

Condiciones	pH final del cultivo	Concentración de biomasa (mg/mL, base seca)	Contenido de Pared celular (%)	Producción de pared celular (mg/mL)
Glucosa ^c	2,2	3,22 ± 0,19	27,5 ± 0,63	0,89 ± 0,06
Sacarosa	2,2	2,97 ± 0,16	30,4 ± 0,76	0,90 ± 0,06
Lactosa	2,7	0,89 ± 0,11	18,4 ± 0,58	0,16 ± 0,02
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5 g/L	2,3	2,11 ± 0,14	27,6 ± 0,49	0,58 ± 0,05
(NH ₄) ₂ SO ₄ 2,0 g/L	2,2	2,59 ± 0,20	23,3 ± 0,40	0,60 ± 0,05
(NH ₄) ₂ SO ₄ 5,0 g/L	2,2	2,95 ± 0,19	26,7 ± 0,48	0,79 ± 0,06
Peptona 5,0 g/L	3,6	4,65 ± 0,22	12,3 ± 0,24	0,57 ± 0,03
30°C ^c	2,2	3,22 ± 0,19	27,5 ± 0,63	0,89 ± 0,06
40°C	2,4	2,51 ± 0,24	31,0 ± 0,77	0,78 ± 0,09
pH 3,5	2,2	3,81 ± 0,14	17,5 ± 0,30	0,67 ± 0,03
pH 5,4 ^c	2,2	3,22 ± 0,19	27,5 ± 0,63	0,89 ± 0,06
Aerobiosis ^c	2,2	3,22 ± 0,19	27,5 ± 0,63	0,89 ± 0,06
Microaerobiosis ^d	2,7	0,76 ± 0,18	26,1 ± 0,46	0,20 ± 0,05

(Leyenda)

- Expresado como gramos de pared celular liofilizada por 100 gramos de masa celular seca.
- Expresado como miligramos de pared celular por mililitro de cultivo.
- Estos resultados corresponden a una misma variante experimental (fuente de carbono: glucosa 20 g/L, fuente de nitrógeno: sulfato de amonio 5 g/L; pH 5,4, aerobiosis, 30 °C).
- En esta variante la concentración inicial de sustrato fue 5 veces mayor que en las restantes variantes.
- Los valores son presentados como la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes para la concentración de biomasa y de tres muestras aleatorias para el análisis de la pared celular.

De este modo, se observó una disminución marcada en respuesta a la limitación de nitrógeno, alcanzándose concentraciones de biomasa un 30 % menor cuando la concentración de sulfato de amonio fue de 0,5 g/L. La naturaleza de las fuentes de nitrógeno y carbono también incidieron en la concentración final de biomasa, la cual se favoreció en presencia de la fuente de nitrógeno orgánico (peptona), ocurriendo lo contrario cuando la fuente de carbono fue lactosa, donde se observó una reducción de más del 70 %. El pH inicial del medio de cultivo y la temperatura también afectaron los rendimientos de biomasa, los cuales fueron superiores a pH 3,5 (con respecto a 5,4) y a la temperatura de 30 °C (con respecto a 40 °C). La oxigenación del cultivo fue un parámetro que afectó drásticamente la concentración final de biomasa, la cual llegó a ser, en condiciones de microaerobiosis, solo el 24 % de la alcanzada en condiciones de aerobiosis, aún cuando en este cultivo se partió de una concentración inicial de glucosa cinco veces mayor.

Las afectaciones antes descritas están relacionadas tanto con aspectos cinéticos como energéticos del crecimiento, predominando estos últimos. Por ejemplo, las menores concentraciones celulares en microaerobiosis y a 40 °C obedecen al menor rendimiento energético de la fermentación con respecto a la respiración y a los mayores gastos en mantenimiento celular, respectivamente. El crecimiento sobre la fuente de nitrógeno orgánico también implica un menor gasto energético para la célula con relación al uso del nitrógeno inorgánico [20]. La baja concentración de biomasa cuando la levadura creció sobre lactosa fue un hecho ya referido con anterioridad por Serrat [21] para la variante salvaje de *K. marxianus* CCEBI 2011. Esto podría estar ocasionado por limitaciones asociadas al transporte o a la hidrólisis de la lactosa en esta cepa, la cual fue aislada de residuales del beneficio húmedo del café y no asociada a ambientes lácteos [22].

El crecimiento de la levadura en medio mineral se caracterizó por una pronunciada disminución del pH. Hacia el final de la fase exponencial, en la mayoría de las variantes estudiadas, el pH estuvo alrededor de 2,2, siendo algo superior (2,7) en el cultivo donde se usó lactosa como fuente de carbono y en el que se desarrolló bajo limitación de oxígeno. Estos dos últimos casos se corresponden con los cultivos que presentaron menor crecimiento.

En la variante que empleó peptona como fuente de nitrógeno se presentó la menor variación del pH, lo cual concuerda con el reconocido efecto tampón de este componente [23]. La disminución del pH en cultivos de levadura en medio mineral, sin

control de pH, es usual en presencia de sales de amonio, debido a la liberación de iones hidronio que acompaña la asimilación del nitrógeno presente [23].

En correspondencia con el carácter dinámico de la biosíntesis de la pared celular [14] es de esperar que las variaciones antes señaladas en los rendimientos de biomasa, como consecuencia de diferentes condiciones nutricionales y físico-químicas, se relacionen con posibles afectaciones sobre la masa específica y composición de esta estructura celular.

Como puede observarse en la tabla 1, los contenidos promedio de pared celular estuvieron dentro del rango informado usualmente para levaduras (15-30 %) [24], siendo influenciados principalmente por la naturaleza de las fuentes de nitrógeno y carbono y por la temperatura. Se observó un valor por debajo de estos promedios en presencia de la fuente orgánica de nitrógeno (12,3 %); en tanto, los valores más altos correspondieron a los cultivos donde se usó sacarosa como fuente de carbono (30,4 %) y en los sometidos a estrés térmico (40 °C), donde el contenido de pared celular llegó al 31 %.

Para los cultivos aerobios, excluyendo del análisis al cultivo con lactosa, se observó una correlación negativa fuerte ($R = -0,82$) entre la concentración celular al final de la fase exponencial y el contenido de pared celular en *K. marxianus* (figura 1).

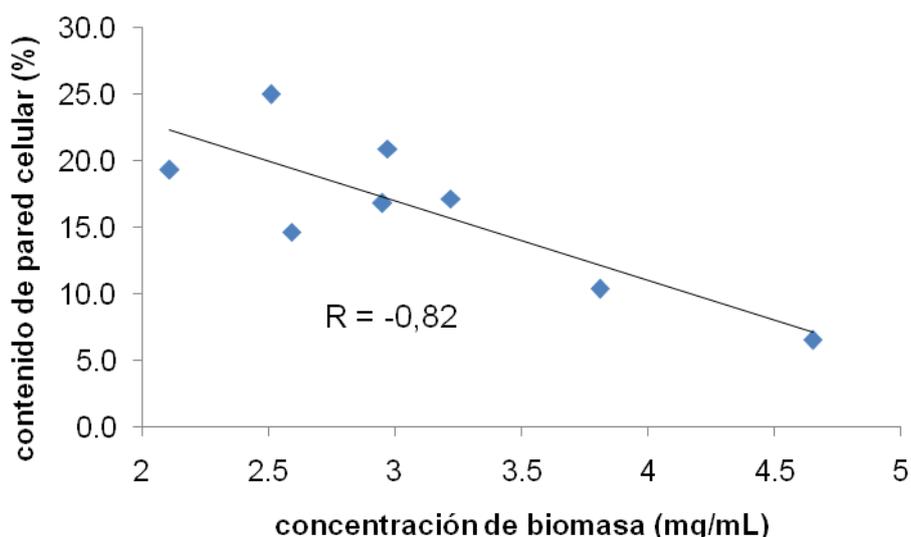


Fig. 1. Correlación entre el contenido de pared celular y la concentración de biomasa

Backhaus *et al.* (2010) [17], en su estudio sobre la composición de la pared celular de *K. lactis* bajo diferentes condiciones de cultivo, encontraron que cuando la levadura crece

sobre etanol el espesor de la pared es aproximadamente un 64 % mayor que el observado cuando crece sobre glucosa; en tanto, se conoce que el rendimiento de biomasa en *K. marxianus* CCEBI 2011 crecido sobre etanol es un 36 % del alcanzado sobre glucosa [21].

Integrando estos resultados, se puede afirmar que existe correspondencia con la correlación encontrada en el presente estudio. La disminución del rendimiento de crecimiento está asociada a un mayor gasto energético en el proceso de síntesis de la nueva biomasa o en el mantenimiento celular, lo cual podría desencadenar mecanismos de protección en la célula que impliquen el engrosamiento de la pared celular. Hasta donde se conoce, este es el primer informe de la existencia de correlación entre el rendimiento de biomasa y el contenido de pared celular.

En cualquier proceso de obtención de productos de origen microbiano, la concentración final de estos con respecto al volumen del cultivo constituye un parámetro de crucial importancia para la economía del bioproceso, debido a su incidencia tanto en el aprovechamiento de las materias primas como en los gastos de recuperación [25]. En el caso de un producto intracelular, este parámetro es afectado simultáneamente por dos variables, la concentración de biomasa y el porcentaje en peso del producto de interés en la masa celular. En la tabla 1 pueden observarse las producciones de paredes celulares, expresadas como masa de pared por unidad de volumen de cultivo, alcanzadas bajo las diferentes condiciones estudiadas.

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de paredes celulares a las dos temperaturas ensayadas (30 y 40 °C), pero sí se ocurrieron importantes disminuciones al bajar el pH a 3,5, en el medio con peptona como fuente de nitrógeno, en los cultivos limitados de nitrógeno y de oxígeno y, de modo muy marcado, en el cultivo donde se utilizó lactosa como fuente de carbono. En la mayoría de los casos, el factor que más peso tuvo en estos resultados fue la disminución en la concentración de biomasa, a excepción de las variantes a pH 3,5 y en el cultivo con peptona, donde el factor más importante fue el contenido notablemente bajo de pared celular.

Influencia de las condiciones de cultivo sobre el contenido en polisacáridos de la pared celular

En esta investigación se realizó la determinación de los contenidos de carbohidratos y azúcares reductores totales por los métodos del fenol-sulfúrico y Nelson, respectivamente, a cada uno de los hidrolizados de pared celular. Se esperaba que ambos métodos rindieran resultados similares y, en caso de observarse una proporción

carbohidratos totales/azúcares reductores significativamente superior a la unidad, este resultado podría tomarse como indicativo de una hidrólisis ácida incompleta. Esto, a su vez, podría sugerir algún tipo de alteración estructural importante en la pared celular.

Como se puede apreciar en la tabla 2, en la casi totalidad de las muestras ensayadas se encontraron relaciones carbohidratos/azúcares reductores próximas a 1, dentro de los límites del error experimental.

TABLA 2. CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN LA PARED CELULAR DE *K. MARXIANUS* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO

Condiciones	Carbohidratos Totales (%) ^a	Carbohidratos/Reductores
Glucosa ^b	62,4 ± 1,82	1,21 ± 0,07
Sacarosa	68,8 ± 3,40	1,09 ± 0,11
Lactosa	44,9 ± 1,32	1,57 ± 0,09
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5 g/L	70,1 ± 3,96	1,23 ± 0,14
(NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g/L	63,0 ± 3,56	0,79 ± 0,09
(NH ₄) ₂ SO ₄ 5 g/L	63,0 ± 3,56	1,01 ± 0,11
Peptona 5 g/L	53,4 ± 1,34	1,00 ± 0,05
30°C ^b	62,4 ± 1,82	1,21 ± 0,07
40°C	80,7 ± 4,45	1,07 ± 0,12
pH 3,5	59,4 ± 2,56	1,07 ± 0,09
pH 5,0 ^b	62,4 ± 1,82	1,21 ± 0,07
Aerobiosis ^b	62,4 ± 1,82	1,21 ± 0,07
Microaerobiosis ^c	52,4 ± 2,70	0,98 ± 0,10

(Leyenda)

- a) Expresado como gramos de carbohidratos totales por 100 gramos de pared celular liofilizada.
- b) Estos resultados corresponden a una misma variante experimental (fuente de carbono: glucosa 20 g/L, fuente de nitrógeno: sulfato de amonio 5 g/L; pH 5,4, aerobiosis, 30 °C).
- c) En esta variante la concentración inicial de sustrato fue 5 veces mayor que en las restantes variantes.

Los valores son presentados como la media ± desviación estándar de tres muestras aleatorias para el análisis de la pared celular.

Una excepción fue la muestra correspondiente al cultivo crecido sobre lactosa como fuente de carbono, donde la relación fue de 1,572. Se considera que para este caso particular se deben valorar con cautela las demás determinaciones realizadas. Como ya se señaló con anterioridad, esta variante experimental mostró un valor de concentración de biomasa inusualmente bajo para un cultivo aerobio. Un aspecto que pudiera haber incidido en este resultado podría ser la existencia de un alto contenido de humedad en el

preparado de pared celular, pues esto afectaría la hidrólisis primaria con ácido sulfúrico concentrado [26].

Las paredes celulares de levadura se componen mayoritariamente de polisacáridos estructurales (glucanos y mananos principalmente), los cuales pueden llegar a constituir hasta el 85 % de la masa seca de la pared celular. El 15 % restante son fundamentalmente proteínas enlazadas covalentemente a estos polisacáridos [27]. El contenido de carbohidratos totales en pared celular estuvo de modo general entre 60-70 %, algo por debajo a lo habitualmente referido para levaduras [27].

Entre las variantes estudiadas, el valor más alto (80,7 %) se observó cuando la levadura se cultivó a 40 °C (estrés térmico); este resultado concuerda con lo encontrado por Backhaus *et al.* [17] en su estudio con *K. lactis*. De igual modo, valores significativamente más bajos (45-52 %) se obtuvieron en los cultivos donde se empleó lactosa como fuente de carbono o peptona como fuente de nitrógeno, así como en aquellos efectuados en condiciones de microaerobiosis.

Un contenido relativo bajo de polisacáridos estructurales podría estar asociado a un incremento en el contenido de proteínas asociadas a la pared celular, principalmente de manoproteínas. En los cultivos a base de peptona como fuente de nitrógeno se logra el crecimiento más vigoroso, por lo que, como consecuencia, debe existir también una tasa de síntesis proteica más elevada, incluida la de aquellas proteínas y enzimas asociadas a la pared celular. Kruppa *et al.* (2011) [28] encontraron que el contenido de manoproteínas se incrementa en *Candida albicans* en medios a base de suero, o sea, ricos en fuente de nitrógeno orgánico. Este incremento en el contenido proteico podría explicar el bajo tenor de carbohidratos encontrado en pared celular cuando se usó la fuente de nitrógeno orgánico.

Por otro lado, la cepa objeto de esta investigación expresa la floclina Flo5 de *Saccharomyces cerevisiae* bajo el control del promotor homólogo del gen de la enzima endopoligalaturonasa [10]. La síntesis de esta enzima se induce en condiciones de hipoxia, constituyendo la principal proteína en el medio extracelular de *K. marxianus* cuando se cultiva bajo limitación de oxígeno [22]. Por tanto, debe esperarse que en los cultivos microaerobios se acumulen grandes cantidades de la proteína Flo5 en la pared celular de la levadura, contribuyendo a un incremento relativo del contenido proteico en esta estructura celular, con la consiguiente reducción, en proporción, del contenido de polisacáridos, como fue encontrado en este estudio.

En qué medida la presencia en el medio de azúcares distintos de glucosa pueda interferir en el ensamblaje de la malla de glucanos que conforma la pared celular de la levadura queda como una interrogante abierta para estudios posteriores.

Conclusiones

En este estudio ha sido caracterizada la relación existente entre el crecimiento de la levadura Kluyveromyces marxianus CCEBI 2011 Flo 5.4 y el contenido de la pared celular, como respuesta a las variaciones en las condiciones de cultivo, incluidos factores nutricionales y físico-químicos. Como un aspecto relevante de este estudio, puede señalarse el hecho práctico de haber obtenido determinadas regularidades que relacionan la producción de pared celular en K. marxianus con las condiciones de cultivo imperantes. Estos resultados sirven de base para posteriores estudios dirigidos a la optimización de los indicadores de eficiencia industrial (rendimiento, productividad) en la producción de componentes de pared celular en esta cepa de levadura, la cual ya posee un reconocido perfil de potenciales aplicaciones en la industria biotecnológica.

Agradecimientos

Los autores agradecemos al Programa de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (PCI-AECID) por el financiamiento a los proyectos A/024951/09 y A/030029/10, los cuales sirvieron de soporte a esta investigación.

Referencias bibliográficas

1. HALÁSZ, A., R. LÁSZTITY. *Use of Yeast Biomass in Food Production*. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., 1991.
2. QUEROL, A., G. FLEET (Editores) *Yeast in Food and Beverages*. Berlín, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
3. FONSECA, G., *et al.* "The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **79**, 339–354.
4. FOUKIS, A., *et al.* "Purification, kinetic characterization and properties of a novel thermo-tolerant extracellular protease from *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 with potential biotechnological interest". *Bioresource Technology*, 2012, **123**, 214–220.

5. YOSHIDA, Y., *et al.* “Effects of the cell wall of *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 on the plasma cholesterol and fecal sterol excretion in rats fed on a high cholesterol diet”. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, **69**, 714–723.
6. SERRAT, M., *et al.* “Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater”. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2002, **97**, 193–208.
7. SERRAT, M., *et al.* “Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*: potential use of polygalacturonase in foodstuffs”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004, **117**, 49–64.
8. SERRAT, M., *et al.* “Influence of nutritional and environmental factors on ethanol and endopolygalacturonase co-production by *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011”. *International Microbiology*, 2011, **14**, 41-49.
9. SERRAT, M., A. A. MÉNDEZ. “Construcción y validación experimental de un biorreactor artesanal tipo tanque agitado para fermentaciones sumergidas a escala de laboratorio”. *Tecnología Química*, 2015, **35**, 317-333.
10. VALLEJO, J. A., *et al.* “A novel *Kluyveromyces marxianus* strain with an inducible flocculation phenotype”. *AMB Express*, 2012, **2**, 38, doi: 10.1186/2191-0855-2-38
11. YOSHIDA, Y., *et al.* “Potent hypocholesterolemic activity of the yeast *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 in rats fed a high cholesterol diet”. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2004; **68**, 1185–1192.
12. YOSHIDA, Y., *et al.* “Side-chain structure of cell surface polysaccharide, mannan, affects hypocholesterolemic activity of yeast”. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 8003–8009.
13. FREIMUND, S., *et al.* “Optimised quantification method for yeast-derived 1, 3- β -D-glucan and α -D-mannan”. *Eur. Food Res. Technol.*, 2005, **220**, 101–105.
14. AGUILAR-USCANGA, B., J. M. FRANÇOIS. “A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation”. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, **37**, 268–274.

15. VERDUYN, C., *et al.* “Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeast: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation”. *Yeast*, 1992, **8**, 501–517.
16. DE GROOT, P. W. *et al.* “Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesions”. *Eukaryot Cell*, 2004, **3**, 955–965.
17. BACKHAUS, K., *et al.* “A systematic study of the cell wall composition of *Kluyveromyces lactis*”. *Yeast*, 2010, **27**, 647–660.
18. DUBOIS, M., *et al.* “Colorimetric method for determination of sugars and related substances”. *Analytical Chemistry*, 1956, **28**, 350–356.
19. NELSON, N. “Colorimetric analysis of sugars”. En *Methods of Enzymology*. S. P. Colowick y N. O. Kaplan (Editores). New York: Academic Press, 1957, vol. 3, 85–86.
20. XIAO, J., J. M. van Briesen. “Expanded thermodynamic model for microbial true yield prediction”. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, **93**, 110-121.
21. SERRAT, M. *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, Cuba, 2003.
22. SERRAT, M. *et al.* “Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater”. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2002, **97**, 193-208.
23. HAHN-HÄGERDAL, B., *et al.* “Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use”. *Microbial Cell Factories*, 2005, **4**, 31, doi: 10.1186/1475-2859-4-31
24. LIPKE, P. N., R. OVALLE. “Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges”. *J. Bacteriol.*, 1998, **180**, 3735–3740.
25. NIELSEN, J. “Fermentation, monitoring, design and optimization”. En M. C. Flickinger y S. W. Drew (Editores). *The Encyclopedia of Bioprocess*

Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. New York: Wiley-Interscience, 1999, 1147-1156.

26. SLUITER, A. *et al.* *Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. Technical Report NREL/TP-510-42618. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2011, 15 pp.
27. LESAGE, G. Y., H. BUSSEY. "Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiol Mol Biol Rev.*, 2006, **70**, 317–343.
28. KRUPPA, M., *et al.* "*C. albicans* increases cell wall mannoprotein, but not mannan, in response to blood, serum and cultivation at physiological temperature". *Glycobiology*, 2011, **21**, 1173–1180.