



RESISTENCIA DE LA PARED CELULAR DE LEVADURAS A LA LISIS ENZIMÁTICA

Blanca Rosa Aguilar Uscanga, Sergio Alejandro Reynoso Covarrubias, María Guadalupe Aguilar Uscanga y Josué Raymundo Solís Pacheco.

Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. Blvd. Marcelino García Barragán 1451. Col. Olímpica, 44420. Guadalajara, Jalisco. México. Tel/Fax: 01 33 39 42 59 45 .
Correo electrónico: agublanca@gmail.com.

Palabras clave: *Levaduras, pared celular, polisacáridos.*

Introducción. La pared celular de *S. cerevisiae*, es una estructura dinámica que varía en composición según la edad, condiciones de cultivo y estrés. Esta ha sido muy estudiada por ser un blanco perfecto para los antifúngicos (1). La pared celular está compuesta por tres grupos de polisacáridos: polímeros de manosa ligados covalentemente a péptidos (manoproteínas ~40%); de glucosa (β -glucanos ~60%) y los polímeros de N-acetilglucosamina (quitina ~2%) (2). Una prueba sencilla para estudiar la integridad de la estructura de la pared celular es la formación de esferoplastos que se miden mediante la disminución de la DO a través del tiempo y con ello se determina la resistencia de las células al rompimiento enzimático (3). El objetivo de este trabajo fue estudiar la resistencia a la lisis enzimática de cuatro cepas de levadura cultivadas en jugo de agave y caracterizar el contenido de β -glucanos, mannanos y quitina en su pared celular.

Metodología. De un cultivo con levadura (CT15, CT25, CT35 y L03), en jugo de agave a concentración de 30g/L, se recolectó 50 mL de muestra en fase exponencial y estacionaria. Las muestras fueron centrifugadas a 3500rpm/10min eliminando el sobrenadante y las células precipitadas se lavaron dos veces con agua destilada y al final con buffer Tris-HCL pH 7.5. La determinación de la resistencia de la célula a la lisis enzimática, se llevó a cabo mediante el método de spheroplast (3), el cual consiste en resuspender las células de levadura en 3 mL de buffer 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA a pH 7.5. A esta suspensión se le agregó 100 μ L de β -glucanasa a 5U e inmediatamente se tomaron lecturas de la DO a 600nm cada 5 a 10 minutos.

Resultados y discusión. Observamos que la cepa CT15 mostró mayor resistencia a la lisis enzimática en fase exponencial que las otras cepas, (fig.1 y 2). Encontrando una velocidad máxima de grado de lisis de $0.6168 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en fase estacionaria y $0.08547 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en fase exponencial. Relacionando la resistencia con el contenido de polisacáridos, la CT15 presenta en fase estacionaria un alto contenido en quitina (71.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y mas mananos que glucanos (104.8 y 99.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$), siendo probablemente la causa de la resistencia de la pared a la lisis por acción a la glucanasa. Por otro lado, la CT35 mostró menor resistencia a la lisis que las otras cepas,

con un máximo grado de lisis de $0.2344 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en fase exponencial y $0.523 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en la estacionaria. Este comportamiento depende en gran parte del contenido de β -glucanos, mananos y quitina que estructuran la pared celular (2).

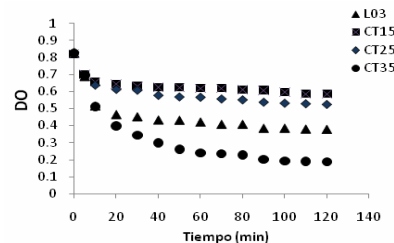


Fig. 1. Resistencia al rompimiento enzimático, levaduras en fase exponencial.

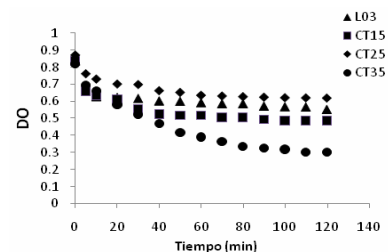


Fig. 2. Resistencia al rompimiento enzimático, levaduras en fase estacionaria.

Conclusiones. Se demuestra que la estructura de la pared celular varía de acuerdo a la fase de crecimiento. Constatamos que la CT15 muestra mayor resistencia a la lisis enzimática en fase exponencial que en estacionaria.

Agradecimiento. Agradecemos a PROMEP/103.5/07

Bibliografía.

- Lipke P.N., Ovalle R. (1998). Cell Wall Architecture in Yeasts: New Structure and New Challenges. *J. Bacteriol.* 180(15); 3735-3740.
- Aguilar U. B and François J.M. (2003). A Study of the Yeast Cell Wall Composition and Structure in Response to Growth Conditions and Mode of Cultivation. *J. Applied Microbiol.* 19(37): 268-274.
- Ovalle R., Lim S.T., Holder B., Jue C.K., Wood Moorre C. and Lipke P.N. (1998). A spheroplast rate assay for determination of cell wall integrity in yeast. *Yeast* 14 :1159-1166.