

# ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DE LA COMPOSICION DE LA PARED CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* EN RESPUESTA A LAS CONDICIONES DE CULTIVO

B.R.AGUILAR, J.M.FRANÇIOS. Centro de Bioingeniería Gilbert Durand UMR-CNRS 5504, UDR-INRA, 31077 Toulouse, France. email: fran\_jm@insa-tlse.fr. Tel: (33) 5 61 55 94 54, fax: (33) 5 61 55 94 02

Palabras clave: Pared celular, *S. cerevisiae*, cromatografía Dionex

**Introducción.** La Pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* es una estructura que representa entre 20 y 30 % de la célula en peso seco (1). Se encuentra formada principalmente de  $\beta(1,3)$ ,  $\beta(1,6)$  glucanes, manoproteínas y quitina (polímero de N-acetil glucosamina), unidos entre ellos por enlaces covalente (2, 3). 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 (1,2). Conociendo algunos métodos rápidos y precisos para el análisis de los polisacáridos en la pared, nuestro objetivo es el de cuantificar la variación de los componentes en la pared celular, en función a diferentes condiciones de cultivo (batch, fed-bach, quimiostato) y parámetros cinéticos (fuente de carbono, pH, temperatura,  $pO_2$ , etc.). Así relacionar en forma global estas variaciones bioquímicas, con respecto a datos analíticos del transcriptoma de la levadura.

**Metodología.** La cepa *S. cerevisiae* CEN.PK 113 fue cultivada en medio sintético CF en matraz Erlenmeyer, variando la fuente de carbono (glucosa, manosa, maltosa, galactosa, etanol, sacarosa). Las células de la levadura fueron recolectadas durante la fase exponencial ( $DO_{600} \approx 1$ ). El método utilizado para el análisis de la pared (4) consiste en un rompimiento total de las células de levadura, una separación de la pared por centrifugación, una hidrólisis total con ácido sulfúrico 72% y una hidrólisis a 100 °C. Los monosacáridos liberados son separados y cuantificados por cromatografía de intercambio iónico unido a un detector amperométrico pulsado HPAEC-Dionex.

**Resultados y Discusión.** En términos de azúcares totales, la cantidad de pared celular varía entre 15 y 24 % de la masa seca de la célula según la fuente de carbono utilizada. Una proporción de 40 % en  $\beta$ -glucanos, 60 % en mananos y 3% de glucosamina, fueron obtenidos en los cultivos de *S. cerevisiae* en glucosa (Figura 1). Podemos remarcar que la cantidad de mananos es superior a la de los  $\beta$ -glucanos, siendo este resultado a la inversa cuando la levadura es cultivada en medio YPD (4).

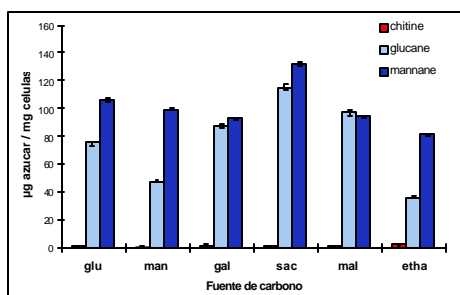


Fig.1 Azúcares en la pared celular. Análisis Dionex

Por otro lado se determinó la sensibilidad de la célula a la hidrólisis enzimática después de que esta fue cultivada a diferentes fuentes de carbono. La figura 2, ilustra la sensibilidad de las células cuando estas fueron tratadas con Zymolyasa 20T (preparación de enzima comercial, con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa, produciendo una lisis en las células). Podemos ver claramente que la disminución de la DO, producto de la lisis celular, tiene un comportamiento diferente bien marcado, que depende del origen de la célula, según la fuente de carbono utilizada en cada caso. Las células pobres en  $\beta$ -glucanos serán más resistentes a la lisis de esta enzima, con esto se confirman los resultados mostrados en la figura 1.

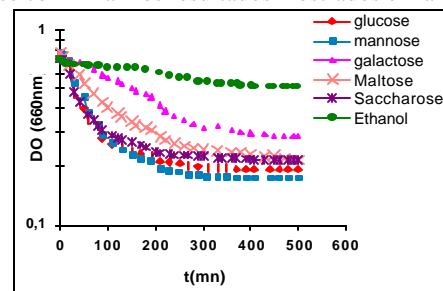


Fig.2. Análisis enzimático (Zymolyasa20T) de las células cultivadas en los diferentes substratos.

**Conclusión.** Hemos encontrado grandes variabilidades en los  $\beta$ -glucanos, mananos y la quitina en la pared celular, en función a las diferentes fuentes de carbono, variación de pH y condiciones de cultivo matraz Erlenmeyer y fermentador (datos no mostrados). Los resultados obtenidos indican, que la estructura de la pared celular es fuertemente afectada por las condiciones nutricionales y fisicoquímicas del medio y la morfología de *S. cerevisiae* puede cambiar según las condiciones del cultivo (1, 2).

**Agradecimientos.** Toda mi gratitud a CONACYT por su apoyo financiero, a Evelyne Groussac por su ayuda con de la técnica HPAEC-Dionex.

## Bibliografía.

- LIPKE P.N. and OVALLE R. (1998). Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *J. Bacteriol.* Vol. 180, (15), 3735-3740.
- FLEET G.H. (1991). Cell Wall. in " The Yeast ". Vol. 4 2ed. Yeast Organelles. ROSE A.H. and HARRISON J.S. (eds). Academic Press, London, 200-277.
- KLIS F.M., (1994). Cell Wall Assembly in Yeast. A review. *Yeast*. Vol. 10, 851-890.
- DALLIES N., FRANCOIS J. and 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.