

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE LEVADURA PRODUCTORAS DE β -GLUCANOS Y ENSAYO PRELIMINAR DE SU EFECTO EN RATONES SOMETIDOS A ESTRÉS

Torres Osornio Alfonso de Jesús (1), De la Riva de la Riva Gustavo Alberto (2)

¹ [Licenciatura en biología, Instituto Tecnológico superior de Irapuato] | [poncho_opu@hotmail.com]

² [Laboratorio de Ecología Molecular y Bioprospección, Instituto Tecnológico superior de Irapuato, licenciatura en biología] | [gudelariva@itesi.edu.mx]

Resumen

Los probióticos son microorganismos que al administrarse en cantidades adecuadas confieren un efecto beneficioso al hospedador. Algunos de ellos producen sustancias de importancia. Entre estas sustancias se encuentran los β -glucanos estos poseen actividad antioxidante, hepatoprotectora e inmunoestimuladora a nivel celular tanto en invertebrados como vertebrados. El presente proyecto busca evaluar la capacidad de producción de β -glucanos en cepas de levaduras. Se aislaron 39 cepas nativas a partir de 9 frutos fermentados estas se caracterizaron fisiológica, bioquímica y molecularmente. Todas las cepas se analizaron por su capacidad de producción de β -glucanos y fueron incorporadas a la colección de cepas y tejidos ITCC de ITESI. Con una de estas cepas, *Saccharomyces cerevisiae* ITM-2014 se realizó un ensayo experimental con ratones sometidos a estrés por cambio de condiciones de vida. Las condiciones de estrés fueron inducidas durante 3 días y posteriormente se les restablecieron las condiciones normales de hábitat, en una locación diferente. Los animales que durante 15 días previos a la inducción del estrés recibieron como alimento estas levaduras recuperaron más rápidamente su peso en relación con el grupo control que recibió una dieta normal.

Abstract

The probiotics are microorganisms that when administered in adequate amounts confer a beneficial effect on the host. Some of them produce substances of importance. Among these substances are β -glucans which possess antioxidant, hepatoprotective and immunostimulatory activity at the cellular level in both invertebrates and vertebrates. The present project aims to evaluate the production capacity of β -glucans in yeast strains, 39 native strains were isolated from 9 fermented fruits, which were characterized physiologically, biochemically and molecularly. All strains were analyzed for their ability to produce β -glucans and were incorporated into ITESI's collection of ITCC strains and tissues. With one of these strains, *Saccharomyces cerevisiae* ITM-2014 an experimental trial was performed with mice under stress due to change in living conditions. Stress conditions were induced for 3 days and then normal habitat conditions were restored at a different location. Animals that for 15 days prior to stress induction received as feed these yeasts regained their weight more rapidly relative to the control group receiving a normal diet.

Palabras Clave

Microorganismos, Levaduras, Probióticos, β -glucanos

INTRODUCCIÓN

La palabra probiótico se refiere a “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico al hospedador. El empleo de los probióticos para ejercer un beneficio en determinadas enfermedades infecciosas se apoya en el papel de estos microorganismos como posibles moduladores de la microbiota intestinal y del sistema inmunológico [1]. Los probióticos poseen un amplio espectro de efectos inmunomoduladores ya que son capaces de actuar sobre la inmunidad innata y la adquirida o específica, pudiendo proteger al hospedador frente a infecciones [2].

Las levaduras son de particular interés debido a que son microorganismos extremadamente útiles y versátiles. Entre sus aspectos de interés se encuentra la producción de ciertos compuestos. Entre estos figuran los β -glucanos estos son homopolisacáridos lineales de glucosa unidos a través de enlaces β -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 4) que pueden presentar ramificaciones. En sentido general los efectos de los β -glucanos en la salud dependen de su fuente de origen [3]

Evidencias tanto in vitro como in vivo sugieren que los β -glucanos pueden ser usados como prebióticos debido a su capacidad de promover el crecimiento de microorganismos benéficos de la microbiota intestinal como los *Lactobacillus ssp.* y *Bifidobacterium ssp.* En mamíferos incluyendo al hombre [4]. Otra propiedad encontrada en estos, principalmente atribuida a los β -glucanos provenientes de hongos/levaduras, es la modulación del sistema inmune [5].

Los inmunoestimulantes se han definido como sustancias que potencian el sistema inmunitario y aumentan la resistencia frente a las enfermedades infecciosas. Se enmarca como compuestos químicos, los cuales existen como elementos estructurales principalmente de las bacterias, hongos miceliales y levaduras, que activan los leucocitos y por tanto confieren al animal mayor resistencia a las enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos [6].

En el presente proyecto se planteó evaluar la capacidad de producción de β -glucanos en cepas de colección y cepas nativas y realizar un ensayo preliminar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas nativas de levaduras fueron aisladas de diferentes frutas (guayaba, naranja, mango, papaya, manzana, limón, pepino y plátano) recibidas por encargo de diferentes partes de México, se obtuvo una macerada integral se incubaron a 30°C durante 5 días, se realizaron diluciones seriadas de cada fermentado (hasta 10⁵) y se sembraron en medio selectivo Martins Rose Agar (MRA) usando indistintamente glucosa o xilosa como fuente de carbono suplementado con estreptomycin a 30mg/l. Una vez sembrada la placa se creció durante 48 horas y se realizó la descripción de cada una de las colonias de los diferentes aislados, Se realizaron extracciones de DNA llevándose el método de Hoffman, C.S y Winston, F., 1987 [7]. Para posteriormente realizar PCR con un marcador molecular ITS. La técnica utilizada para la amplificación por PCR fue adaptada de la descrita por Esteve-Zarzoso y colaboradores 1999 [8]. Para el análisis de restricción de las regiones ITS-5.8S se siguió la metodología de Granchi y col.,1999 para ver polimorfismo [9]. Posteriormente se realizó la determinación de β -glucanos la metodología fue establecida según las recomendaciones orientadas por la European Association for Specialty Yeast Products, pero utilizando el reactivo Rojo Congo al 0.08% de concentración final. Los cuatro aislados de levaduras que ofrecieron mayores niveles de producción de β -glucanos se seleccionaron para realizar un experimento de cinética durante 24 horas en medio YPD (glucosa al 2%) o YPX (xilosa al 2%) respectivamente. A las levaduras con mayor producción de β -glucanos se les secuenciaron los amplicones para verificar su identidad por taxonomía molecular.

Los ensayos en ratones BalC se hicieron en 5 ratones, 5 de los cuales se les suministró dieta normal y 5 a los que se les suministró dieta enriquecida con la levadura seleccionada diez días antes de inducir el estrés por variación en sus condiciones de vida: cambio de sitio, privación de comida, agua y alteración de la acústica. A otros 10 se les suministró una dieta normal (5) y suplementada (5) pero no fueron sometidos a stress. Las condiciones de estrés fueron inducidas durante 3 días y posteriormente se les restablecieron las condiciones normales de hábitat, en una locación diferente. Diariamente se les pesó

hasta 10 días después del restablecimiento de las condiciones normales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 39 cepas (Tabla 1) diferentes según la morfología, coloración, velocidad de crecimiento y pH del medio al finalizar la fermentación, se obtuvieron 15 cepas crecidas en xilosa y 24 en glucosa. Las cepas se individualizaron e integraron a un stock de trabajo y al banco de cepas ITCC-Y en glicerol al 25%.

Se realizaron tres análisis de restricción con los amplicones generados por cada aislado por PCR con las enzimas Hha1, Hae III y Hinf I observándose 36 grupos de polimorfismo en base a las enzimas utilizadas. Esto con la finalidad de demostrar la existencia de polimorfismo y ver si era posible identificar las cepas tomando como referencia el trabajo realizado previamente por Granchi y col., (1999) [9]. Los polimorfismos detectados respaldan la diversidad que existe entre las diferentes cepas aisladas, pero no coinciden con los reportados previamente y que eran la base referencial para usar este procedimiento para hacer una clasificación. Otros autores han planteado métodos moleculares alternativos, Heras-Vázquez y col. (2003) [10], identificó aislados de levaduras en frutos y jugos de naranja por RFLP y secuenciación del gen 5.8S rRNA y de los ITS. En nuestra opinión los resultados de Granchi (1999), [9] son incompletos y no pudimos relacionar el polimorfismo con un tipo específico de levadura. En nuestro caso secuenciaremos los amplicones generados con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.

Para el cálculo de la producción de β -glucanos se realizó la curva de calibración para medir la concentración de β -glucanos se realizó según la metodología descrita en base a diluciones seriadas de una solución glucosa-manosa (1:1) (Imagen 1) con 25 mg de cada uno de los monosacáridos usando el colorante Rojo Congo a una concentración final de 0,08% y medido en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 523 nm. (D.O₅₂₃ nm). La notación usada para expresar la concentración está en base a la cantidad de β -glucanos determinada en 1 ml de la extracción final, que tiene un volumen total de 10 ml y que equivaldría a una cantidad en biomasa de 25 mg de

peso húmedo. Los 10 ml de preparación final se generan a partir de 250 mg de biomasa.

La concentración de β -glucanos se realizó usando la ecuación que describe la recta de tendencia derivada de la curva de calibración de la estándar glucosa/manosa (Imagen 1) así como la

Tabla 1. Obtención de cepas a partir fermentados frutales.

Aislado	Origen	pH Final	Fuente de Carbono
1	mango	4	Xilosa
2	mango	4	Xilosa
3	mango	4	Glucosa
4	mango	4	Glucosa
5	mango	4	Glucosa
6	mango	4	Glucosa
7	guayaba	5	Glucosa
8	guayaba	5	Glucosa
9	guayaba	5	Xilosa
10	guayaba	5	Xilosa
11	guayaba	5	Xilosa
12	naranja	3	Glucosa
13	naranja	3	Glucosa
14	naranja	3	Glucosa
15	naranja	3	Glucosa
16	manzana	3	Xilosa
17	manzana	3	Xilosa
18	manzana	3	Xilosa
19	manzana	3	Xilosa
20	manzana	3	Glucosa
21	manzana	3	Glucosa
22	manzana	3	Glucosa
23	plátano	5	Xilosa
24	plátano	5	Xilosa
25	plátano	5	Glucosa
26	plátano	5	Glucosa
27	papaya	8	Xilosa
28	papaya	8	Xilosa
29	pepino	9	Glucosa
30	pepino	9	Glucosa
31	pepino	9	Glucosa
32	pepino	9	Glucosa
33	limón	7	Glucosa

34	limón	7	Glucosa
35	limón	7	Glucosa
36	limón	7	Glucosa
37	limón	7	Glucosa
38	limón	7	Xilosa
39	limón	7	Xilosa

concentración de β -glucanos (Imagen 1). Las mejores productoras se seleccionaron y clasificaron como *Saccharomyces. cereviciae* ITM2014 y *D. hansenii*.

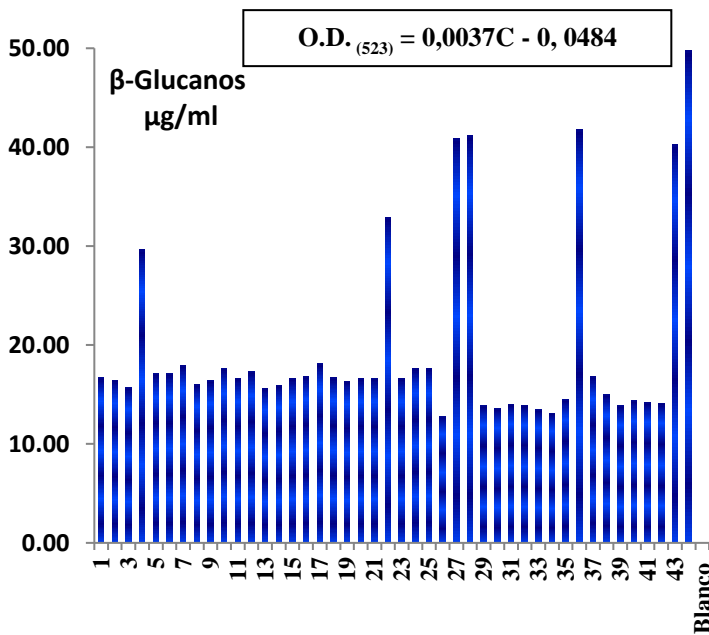


Imagen 1. Determinación de β -glucanos totales de una biomasa de 25 mg ($\mu\text{g}/25$ mg peso húmedo) de peso húmedo de cada aislado equivalente a 1 ml de la preparación final de β -glucanos. El estándar se hizo en base a una solución glucosa-manosa (1:1) a D.O. (523 nm), se estableció la línea de tendencia y fórmula que la describe

Los ensayos en ratones se hicieron en las condiciones descritas y la evolución de su peso fue monitoreada durante 17 días después del restablecimiento de las condiciones normales. Con respecto al grupo. El grupo que recibió un suplemento alimenticio en base a levadura seca rica en β -glucanos sufrió una disminución de peso menor y recuperó más rápidamente los niveles de peso de grupo control (Imagen 2). La levadura seca es rica en manoso-oligosacáridos (MOS) pues al

igual que los β -glucanos son componentes de la membrana y tienen un efecto protector contra el estrés oxidativo y las lesiones hepáticas provocadas por él así como potenciador del sistema inmunológico. Sin embargo, no determinamos la cantidad de MOS presente en el suplemento de levadura seca.

La aplicación de una dieta rica en β -glucanos a ratones BalC puede ser una forma efectiva de paliar el efecto del estrés oxidativo. Estos compuestos están en la pared celular de las levaduras junto con otros compuestos de interés como los oligosacáridos de manosa (MOS) que también han demostrado tener capacidad antioxidante, hepatoprotectora e inmuno-estimulante por lo que son de mucho interés para desarrollar formas de combatir la llamada fiebre de embarque y el estrés ocasionado durante diferentes etapas de manejo de los animales de interés económico. Este estudio ha sido complementado con pruebas bioquímicas y fisiológicas como la medición de la actividad enzimática de proteínas de una función hepática y el sistema anti-oxidativo, así como por medición de la respuesta del sistema inmunológico de los animales tratados.

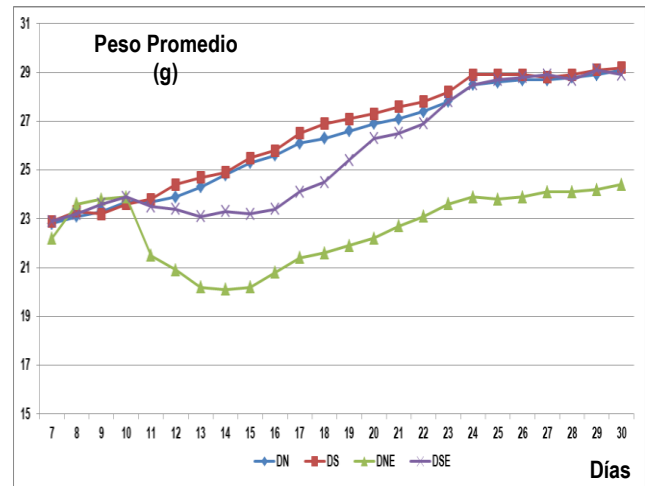


Imagen 2. Efecto de la administración de una dieta suplementada con levadura *S. cereviciae* ITM2014 seca rica en β -glucanos a ratones BalC de 6 semanas de vida. Los tratamientos corresponden a: DN-dieta normal no estresados, DS dieta suplementada no estresados, DNE- dieta normal sometidos a estrés y DSE-dieta suplementada sometidos a estrés. El estrés por cambio en condiciones de vida se indujo a los días 11, 12 y 13. Se observa mejor respuesta al estrés

inducido y mejor recuperación de peso en el grupo de ratones que recibió la dieta suplementada con levadura seca rica en β -glucanos

CONCLUSIONES

La aplicación de una dieta rica en β -glucanos a ratones BalC puede ser una forma efectiva de paliar el efecto del estrés oxidativo causado por cambios en las condiciones de vida en diferentes animales de interés económico y de compañía provocados por cambios de locación, cambio de etapa de manejo como el destete, largos traslado y la privación temporal de agua y alimento durante los mismos. En la producción animal este síndrome es conocido como fiebre de embarque.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación de la Academia de Biología del ITESI. El ensayo con los ratones BalC fue un tratamiento no letal de acuerdo a las normas éticas internacionales vigentes guntó con el apoyo de la Coordinación de Investigación y Desarrollo LABASA del grupo empresarial GRECA (La Piedad, Michoacán, México). Durante la realización del trabajo el autor principal fue beneficiario de becas del Programa Verano Estatal de Investigación del CONCYTEG, Guanajuato y del Proyecto del Cuerpo Académico de Biología CA5 de ITESI, financiado por el Tecnológico Nacional de México.

REFERENCIAS

- [1] Guarner, F., Marcos-Requena, T. (2010) Consensus statements from the Workshop "Probiotics and Health: Scientific Evidence". *Nutrición Hospitalaria* 25:700–704
- [2] G. Oliveira Fuster, González-Molero. (2007). Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. 2007, Unidad de Nutrición Clínica y Dietética. Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga. Instituto de Salud Carlos III. España Sitio web: <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v22s2/fisiologia4.pdf>.
- [3] Wood PJ, Weisz J, Blackwell B, (1994). Structural Studies of (1-3) (1-4)-beta-D-Glucans by ¹³C-nuclear magnetic-resonance spectroscopy and by rapid analysis of cellulose-like regions using high-

performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chem.*;71(3):301–7.

[4] Jaskari J, Kontula P, Siitonen A, Jousimies-Somer H, Mattila-Sandholm T, Poutanen K. (1998). Oat beta-glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for Bifidobacterium and Lactobacillus strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998;49(2): 175-81.

[5] Volman JJ, Ramakers JD, Plat J, (2008). Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiology Amp Behavior*; 94(2): 276-284

[6] Rodríguez F, Esteban M, Meseguer J, Bravo M, Gómez G, Rojas-Luna T, Jiménez G, Balcázar J., (2003). Estrategias de control de enfermedades en Acuicultura II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA (<http://www.civa2003.org>), 624-654

[7] Hoffman, C.S., and Winston, F.(1987) A ten-minute preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. *Gene* 57, 267-272.

[8] Esteve-Zaroso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 329-337.

[9] Granchi, L. Bosco M., Messini A. and Vincenzini M., (1999) Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rdna ITS region. *Journal of applied Microbiology* 949-956.

[10] Heras-Vazquez FJ, Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jimenez J. M, Rodriguez-Vicol F. (2003). Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research* 3, 3-9.