

Producción y caracterización de levaduras enriquecidas con Cr (III) como suplemento alimenticio

Production and characterization of Cr (III)-enriched yeast as a food supplements

Susana G. Delgado-Hernández¹, Luis F. Flores-León¹, Claudia P. Martínez-Martínez¹, Víctor A. Preciado-Guerrero¹, Patricia M. Villegas-Sánchez¹, Luis F. Mejía-Díaz¹, Kazimierz Wrobel-Zasada¹, Alma R. Corrales-Escobosa¹.

¹Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato
alma_rce@ugto.mx

Resumen

Los suplementos alimenticios son productos naturales a base de extractos de origen vegetal o animal, minerales o microorganismos, cuya función principal es aportar los nutrientes necesarios para cubrir alguna deficiencia nutricional en ciertos grupos vulnerables de la población. Dado que consumir concentraciones adecuadas de estos oligoelementos es crucial para el correcto funcionamiento del organismo, la demanda de suplementos alimenticios que contiene oligoelementos ha crecido en las recientes décadas. Durante varias décadas han realizado estudios muy intensos enfocados en la obtención de productos enriquecidos con Cr (III) de manera *in vivo*. El interés principal en estos estudios ha sido caracterizar las formas/especies del elemento y sus concentraciones, así como evaluar su actividad biológica y establecer las mejores condiciones de su producción (enriquecimiento *in vivo*). Es bien conocido que, dependiendo del microorganismo utilizado, existe diferencias en la captación, distribución y acumulación de Cr (III). El presente trabajo consistió en evaluar y caracterizar dos cepas de levaduras enriquecidas con Cr (III) cultivadas en medio rico (YPG) y medio mínimo (YNB). Las cepas de levadura utilizadas fueron: una cepa panadera *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa probiótica *Saccharomyces boulardii*. Los parámetros para evaluar fueron: efecto del medio de cultivo, el tipo de cepa y concentración de Cr en el crecimiento e incorporación de este a la biomasa. Así como la producción de proteínas totales y ácidos nucleicos en extractos celulares libres de células. Finalmente, se evaluó la distribución de cromo en fracción citosólica y pastilla.

Palabras clave: suplemento alimenticio, oligoelemento, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, Cr (III).

Introducción

Los “oligoelementos” o microelementos juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular en los distintos organismos vivos (Mehri, 2020). Su ausencia o exceso puede provocar alteraciones fisiológicas, ya que se encuentra implicados en la regulación de numerosas funciones celulares como la expresión de genes, como cofactores de enzimas o participando en el metabolismo de los ácidos nucleicos, lípidos, azúcares o proteínas, en las funciones antiinflamatorias, antioxidantes y otras funciones fisiológicas especiales (Cannas et al., 2020). La mayor parte de estos elementos se obtienen a partir de su consumo en los alimentos de la dieta diaria, pero cuando esto no es así, puede provocar que la salud humana e incluso animales sea comprometida debido a enfermedades causadas por alteraciones en el sistema, inmunitario, el sistema nervioso y sistema metabólico, por lo que para obtener la ingesta adecuada, se recurre al uso de suplementos alimenticios.

Los suplementos alimenticios se definen como productos naturales elaborados a base de minerales, hierba y/o extractos de ciertos organismos como levaduras, que contienen minerales, vitaminas o aminoácidos y generalmente se administran para incrementar, complementar o suplir la ingesta dietética total y evitar el desarrollo de enfermedades (Health, 2020). En E.U., el “Center for Food Safety and Applied Nutrition” (CFSAN), parte de la FDA, es la responsable de supervisar estos productos en Estados Unidos de Norte América; mientras tanto en México, la Secretaría de Salud es la responsable a través de la COFEPRIS. Cabe señalar que los suplementos dietéticos no necesitan contar con registro sanitario, pero el fabricante es responsable de someter un “aviso de funcionamiento” a estas instituciones, y deberá de cumplir con el contenido, etiquetado e inocuidad de su producto. Dentro de los suplementos dietéticos más usados, se encuentran los vitamínicos/ multi-minerales (MVMs), conteniendo algunas de las siguientes especies o

combinación de ellas: vitaminas A, C, D, E y K, conjunto de vitaminas B, así mismo especies de Ca, Fe, Zn, Co, Se, Cr, etc.

Algunos de los oligoelementos más estudiados y utilizados son el Fe, Zn, I, Co, Mo, Se, Co y Cr. Por ejemplo, el cromo funciona manteniendo el metabolismo normal de glucosa, lípidos y proteínas en el cuerpo (Landman, Bilo, Houweling, & Kleefstra, 2014), sugiriendo su participación para la mejora de pacientes diabéticos o con síndrome metabólico (Maret, 2019). La EFSA (European Food Safety Authority) establece las dosis adecuadas de Cr (III) en intervalos de 25-35 µg/día dependiendo de la edad, sexo y condición clínica (EFSA Panel on Dietetic Products, 2014). Es también relevante que se ha informado deficiente ingesta diaria de Cr (III) en algunas regiones del mundo o en condiciones específicas de salud (Maret, 2019).

Para los suplementos a base de oligoelementos, existen principalmente dos tipos de productos disponibles en el mercado: las formas inorgánicas y las orgánicas. Los oligoelementos en forma inorgánica son principalmente sales inorgánicas cuyos métodos de producción son simples, fácilmente escalables y económicos. Sin embargo, presentan la desventaja que son de difícil asimilación por el cuerpo humano, con poca o nula actividad biológica, e incluso suelen ser tóxicos y causar efectos adversos graves si no se usa adecuadamente. Por otra parte, las formas orgánicas de los oligoelementos suelen presentar mayor biodisponibilidad, asimilación y menos efectos adversos para el cuerpo humano. Estas especies químicas generalmente se obtiene por la transformación de las formas inorgánicas de los oligoelementos a especies químicas unidas a moléculas orgánicas, mediante diversos procesos fisiológicos y bioquímicos.

Por lo que una buena alternativa para la fabricación de suplementos alimenticios con formas biológicamente activas es el uso de microorganismos como las levaduras, los cuales son organismos fácilmente cultivables mediante procesos de fermentación. Las levaduras han sido consideradas como los microorganismos más utilizados por los seres humanos, ya que, atrajeron la atención debido a sus múltiples efectos para la salud y aplicaciones industriales (Tao et al., 2023). *Saccharomyces cerevisiae* es una especie de levadura reconocida por su importancia comercial, de los organismos mejor estudiados y de fácil manipulación genética, además de considerarse inocua e inclusive algunas cepas poseen actividad probiótica (Ansari et al., 2023). Por su alto valor nutricional, a menudo es utilizada como una fuente de proteínas alternativa debida a su que posee una composición de aminoácidos equilibrada, proteína fácilmente asimilable, metabolitos con actividades funcionales jugando un papel importante en el cuerpo humano. La biomasa de las levaduras de cerveza y otras levaduras no convencionales poseen un alto valor nutricional, ya que contienen proteínas altamente biodisponibles y varios aminoácidos esenciales, metabolitos con actividades funcionales e incluso puede ser una fuente de vitamina B, permitiendo que se pueda utilizar con suplementos proteicos y potenciadoras de energía (Rai, Pandey, & Sahoo, 2019). Por otro lado, la fermentación de levadura es un proceso simple que puede usar una variedad de sustratos y producir rápidamente biomasa, lo que lo convierte en un medio ideal para la producción de suplementos con oligoelementos (Sun et al., 2022). Las levaduras enriquecidas se obtienen generalmente mediante la adición de sales minerales de oligoelementos al medio de cultivo.

Un tema de investigación actual es la búsqueda de suplementos que contengan la forma de Cr (III) más adecuada para asegurar una buena biodisponibilidad y utilización en el control de metabolismo de carbohidratos y lípidos, evitando al mismo tiempo excesiva acumulación de Cr que provoca los efectos adversos (Maret, 2019). En el caso particular de Cr, existen en el mercado una gran variedad de suplementos dietéticos con Cr. Pero su función y biodisponibilidad se ve afectada por la concentración en la presentación, así como de las formas biodisponibles, bioactivas y estables del elemento. Las formas comerciales disponibles son las sales inorgánicas como el CrCl_3 pero su disponibilidad es muy baja (aprox. 1 %) y la reactividad de ion libre en el ambiente celular causa efectos adversos (Balk, Tatsioni, Lichtenstein, Lau, & Pittas, 2007). Específicamente, Cr (III) puede sustituir Fe (III) en su unión en transferrina y también puede formar aductos con otras biomoléculas afectando su estructura y funcionalidad. Por otro lado, se prefiere a las formas orgánicas como picolinato de cromo o levadura (*S. cerevisiae*) enriquecida con Cr (III). Este último contiene más especies de Cr- orgánico, aunque la identidad química de la especie de Cr (III) en este producto no ha sido elucidada de manera contundente, se ha adoptado el término cromo orgánico o "factor de tolerancia a glucosa" (GTF, por sus siglas en inglés), en el que el Cr (III) es coordinado con glicina, cisteína, ácido glutámico y ácido nicotínico (Dinakarandian et al., 2004; Vincent, 2000).

Durante varias décadas se realizaron estudios muy intensos enfocados en la obtención de productos enriquecidos con Cr (III) de manera *in vivo* (*additives & Food*, 2012). El interés principal en estos estudios ha sido caracterizar las formas/especies del elemento y sus concentraciones, así como evaluar su actividad biológica y establecer las mejores condiciones de su producción (enriquecimiento *in vivo*), observándose que, dependiendo del microorganismo utilizado, existe diferencias en la captación, distribución y acumulación de

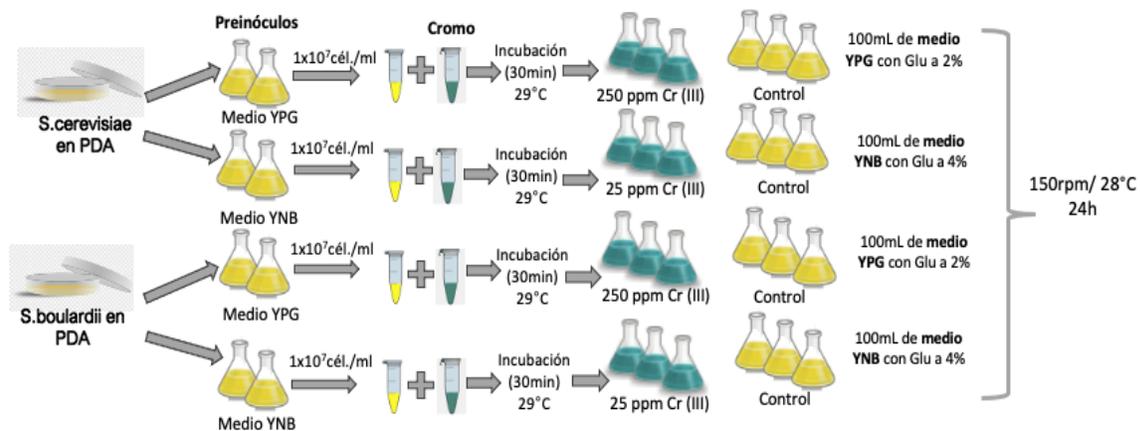
Cr (III) (Kaszycki et al., 2004). Estas diferencias pueden ser debidas a la especie de Cr (III) utilizada, la composición de la pared celular o las condiciones de cultivo (fase de crecimiento, pH, temperatura, composición del medio de cultivo). Adicionalmente, se sabe que la captación de Cr (III) en levaduras es un proceso bifásico; en la primera etapa ocurre rápida biosorción de especies de Cr (III) sobre la superficie de pared celular y después, la penetración hacia interior de las células ocurre mediante transporte activo. Existen pocos estudios dirigidos hacia la elucidación del impacto de Cr (III) en organismos de levaduras probióticas por lo que es importante evaluar el crecimiento, viabilidad celular, contenido de proteínas totales, de ácidos nucleicos, entre otros parámetros típicos.

Para avanzar en el conocimiento sobre los efectos de Cr (III) en microorganismos de relevancia en alimentación/suplementación en humanos, el objetivo de este trabajo fue caracterizar de manera fisiológica y bioquímica dos diferentes cepas de levaduras cultivadas en medio rico (YPG) y mínimo (YNB) y enriquecidas con Cr (III). Los parámetros para evaluar fueron: efecto del medio de cultivo, el tipo de cepa y concentración de Cr en el crecimiento e incorporación de este a la biomasa. la concentración de proteínas totales y ácidos nucleicos en extractos celulares libres de células Finalmente, se evaluó la distribución de cromo en fracción citosólica y pastilla.

Desarrollo experimental

Obtención de levaduras enriquecidas con Cr (III)

Inicialmente, se cultivó de manera individual las cepas de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* en cajas de Petri con medio PDA (agar papa dextrosa). Posteriormente, para la obtención de un preinóculo, cada cepa se cultivó en dos matraces de 250 mL con 100 mL de medio YPG (compuesto por: 1.0 % (m/v) de extracto de levadura, 2.0 % (m/v) de pectona y 2.0 % (m/v) de glucosa) o medio YNB (Base de nitrógeno de levadura, de Sigma-Aldrich No. de catalogo Y0626 y con 4 % (m/v) de glucosa). Los matraces fueron incubados toda la noche a 28 °C Posteriormente, las células fueron cosechadas mediante centrifugación a 3500 rpm y lavadas 3 veces con agua milli-Q estéril. Una vez obtenidas las células lavadas, y con la finalidad de llevar a cabo una rápida absorción de Cr a las células de levadura se llevó a cabo una preincubación de Cr-levadura. Para ello, se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL una concentración de 1×10^9 células y se agregó dependiendo del experimento, 0.1 mL y 1.0 mL de Cr (III) de una solución que contenía $25,000 \text{ mg L}^{-1}$ al experimento con el medio YNB y YPG, respectivamente. El cromo utilizado fue en forma de sal de CrCl_3 . Los tubos con células y Cr (III) fueron incubados 30 min a 28 °C. Transcurrido el tiempo de incubación en presencia de cromo, el contenido de los tubos fue transferido a los matraces de 250 mL con 100 mL medio correspondientes. Los matraces fueron incubados por 24 h a 150 rpm. A la par se realizaron los cultivos controles (sin cromo) para cada cepas y medio. Este procedimiento se ejemplifica en el Esquema 1. Al finalizar el tiempo de incubación, se tomó la D.O a 600 nm y la biomasa fue lavada 2 veces con agua destilada para eliminar el exceso de Cr. La biomasa fue congelada y liofilizada para determinar el crecimiento y realizar los demás experimentos.



Esquema 1. Protocolo para la obtención de levaduras de enriquecidas con Cromo (III).

Determinación de Cromo total por MP-AES

Se peso aproximadamente 50 mg de biomasa liofilizada de cada una de las muestras en tubos de vidrio para digestión acida y se agregó 1 mL de HNO₃ concentrado ultrapuro. Los tubos fueron calentados a 80°C durante 20 minutos, posteriormente la temperatura se elevó a 120°C y se mantuvo por 3 horas. Cumplido el tiempo las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y posteriormente fue adicionado 1 mL de H₂O₂ y las muestras fueron calentadas nuevamente a 120°C por 30 minutos. Posteriormente, la muestra se transfirió a un tubo y se llevó a un volumen de 2 mL con agua Mili-Q. Las muestras fueron centrifugadas, diluidas y analizadas por la técnica analítica de emisión atómica con plasma sostenido por microondas (MP-AES). Las longitudes de onda monitoreadas para Cr fue 425.433 y 427.480 nm (Gonzalez Ibarra, Yanez Barrientos, Wrobel, Corrales Escobosa, & Wrobel, 2022). La cuantificación se llevó a cabo mediante el método calibración externa, utilizando seis niveles de concentración (0, 0.03, 0.05, 0.10, 0.33, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹), obteniendo un R² de 0.9999 y ecuación de Y=11605c - 120.32 para la longitud de onda de 427.480 nm

Determinación de proteínas (método de Bradford y BCA)

Obtención de extracto libre de células

Para llevar a cabo la determinación de proteínas, se obtuvo un extracto libre de células mediante la hidrólisis con NH₄OH de la siguiente manera: en un tubo Eppendorf se pesó 20 mg de biomasa de cada muestra y se añadió 1 mL de NH₄OH 0.1 N y se agitó con ayuda de un vortex (Zetic, Stehlik-Tomas, Grba, Lutlisky, & Kozlek, 2001). El homogenado se dejó en calentamiento a 60 °C durante 1 hora. Finalmente, se centrifugó a 12 000 por 20 minutos para separar la pastilla del sobrenadante.

Método de Bradford

El análisis de Bradford consiste en añadir el colorante azul de Coomassie G-250 a la disolución proteica. El colorante azul Coomassie se une con los aminoácidos básicos (histidina, arginina y lisina) y aromáticos (triptofano, tirosina y fenilalanina), causando de este modo un cambio en la absorbancia del colorante azul de Coomassie G-250 durante la determinación de proteínas (Ernst & Zor, 2010). Antes de comenzar con el procedimiento, se preparó el reactivo Bradford a una concentración 5X. Para ello, se pesó 100 mg de azul de Coomassie brillante G-250 y disolver con 25 ml de metanol puro y 50 ml del H₃PO₄ al 85% y se aforó a 200 mL. Previamente de iniciar las reacciones fue necesario diluir el reactivo 5 veces para tener una concentración final de 0.01% (m/v) azul de Coomassie brillante G-250, 5.0 % (v/v) metanol y 8.5% (v/v) H₃PO₄. Una vez terminado el reactivo, se pasó a un recipiente para protegerse contra la luz.

Las determinaciones se realizaron en microplaca de 96 pocillos, Cada muestra se analizó por triplicado y a cada pocillo se agregó lo siguiente:

- Blanco: 10 µL de agua + 240 µL de reactivo Bradford.
- Curva de calibración: 10 µL de albumina se suero bovino (0.25, 0.5, 0.75, 1.00 mg mL⁻¹) + 240 µL de reactivo Bradford.
- Muestras: 10 µL de muestra + 240 µL de reactivo Bradford.

Finalmente, se analizó la microplaca en UV-Vis a longitudes de onda de 430 nm, 595 nm y 630 nm en el espectrofotómetro Multiskan Sky (Thermo Scientific™)

Método de Ácido Bicinconínico (BCA)

Se utilizó el Kit comercial QuantiPro™ BSA (QPBCA-1KT, de Sigma-Aldrich) que está basado en el ácido bicinconínico (BCA) para la detección y cuantificación colorimétrica de proteínas totales. Este método combina la reducción del Cu²⁺ a Cu⁺ en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección selectiva del catión Cu⁺ utilizando el BCA. El producto de la reacción presenta un color púrpura formado por el complejo de BCA con un ion Cu⁺. El complejo hidrosoluble absorbe a 562 nm de manera lineal con el incremento de proteína en un rango de 0.5 a 30 µg mL⁻¹.

Se inició con la preparación de los reactivos correspondientes y consiste en mezclar 7.5 mL de reactivo QA, que contiene sodio carbonato, tartrato de sodio y bicarbonato de sodio en NaOH 0.2 M, pH 11.25, 7.5 mL de reactivo QB, que es una solución de ácido bicinconínico al 4 % (m/v) a pH 8.5, y 0.31 mL de reactivo QC, que consiste en solución de sulfato de cobre (II) pentahidratado 4 % (m/v), se mezclaron hasta obtener un color verde claro.

Posteriormente se preparó el estándar de la proteína de albumina de suero bovino (BSA) a una concentración de 0.5 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para ello, se tomó 30 μL de BSA 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se llevó a 1 mL con H_2O . Una vez que se encontraban listos los reactivos, se prosiguió a diluir 50 veces cada una de las muestras para continuar con el llenado de la microplaca, esta prueba se realizó por duplicado y por cada pocillo se añadió lo siguiente:

- Blanco: 150 μL de agua + 150 μL de reactivo BCA.
- Curva de calibración: 150 μL de estándar de proteína BSA (0.5, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) + 150 μL de reactivo BCA.
- Muestras: 50 μL muestra diluida + 100 μL de agua + 150 de reactivo BCA.

Finalmente, se incubó la placa durante 1h a 37 °C y finalmente se analizó en UV-Vis a una longitud de onda de 562 nm en el espectrofotómetro Multiskan Sky (Thermo Scientific™).

Determinación de ácidos nucleicos (purinas)

Para la determinación del contenido de purinas se utilizó un método espectrofotométrico. Este método se basa en la ecuación de Lambert-Beer y utiliza el hecho de que las bases nitrogenadas en los nucleótidos tienen un máximo de absorción de aproximadamente 260 nm. Dado que el coeficiente de extinción promedio para el ADN de doble cadena es 0.020 $\mu\text{g mL}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Esto significa que 1.0 Abs a 260 nm corresponde a una concentración de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ADN de doble cadena. Por lo tanto, la cantidad de ADN se puede calcular utilizando la fórmula: Concentración de ADN ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = Abs₂₆₀ x 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para esta determinación, se utilizó el extracto libre de células preparado y descrito anteriormente en el subapartado de Determinación de proteínas. En general en protocolo consistió en que cada uno de los espacios correspondientes a un pocillo de la microplaca (Thermo Scientific $\mu\text{Drop Plate}$) se colocaron 2 μL de cada muestra y/o como blanco (que consistió en NH_4OH 0.1 N) y se procedió la adquisición del espectro en un rango de 230 a 300 nm y las absorbancias de 230, 260, 280 y 320 nm. Debido a la trayectoria de la luz óptica de la $\mu\text{Drop Plate}$ (0.5 mm), se debe tener en cuenta un factor de multiplicación de 20 en los cálculos de concentración, por lo que la concentración de ADN ($\mu\text{g/mL}^{-1}$) = Abs₂₆₀ x 50 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ x (10 mm/0.5 mm) = Abs₂₆₀ x 50 x 20.

Resultados y discusión

En comparación con las preparaciones de oligoelementos que se sintetizan mediante un método químico, los microelementos de la levadura presentan actividades biológicas más altas y se pueden absorber fácilmente en el cuerpo. La selección y concentración de sales inorgánicas de oligoelementos, la cantidad de inóculo inicial, el medio de cultivo y tipo de cepa posiblemente impacte en el enriquecimiento de las levaduras. Por ejemplo, el cromo trivalente muestra una toxicidad bastante baja en varios estados de valencia del cromo, por ello, la selección de sales de Cr (III) como sustrato para enriquecimiento podría reducir ella carga de desintoxicación de *S. cerevisiae* y tener un menor efecto en el estado fisiológico de las levaduras.

La finalidad de este trabajo es evaluar el efecto del medio de cultivo y del Cr (III) en el crecimiento e incorporación de Cr a la biomasa en diferentes cepas de levaduras. Para ello, se utilizaron dos medios de cultivos: medio mínimo YNB y rico YPG con 25 y 250 mg L^{-1} de Cr (III), respectivamente. Así como dos cepas de *Saccharomyces*, la levadura panadera *S. cerevisiae* y la cepa probiótica *S. boulardii*. Por lo tanto, se obtuvieron 8 condiciones experimentales, como se representa en el esquema 1. Cabe señalar que cada condición se realizó por triplicado (replicas biológicas).

En la figura 1, se presentan los resultados de crecimiento obtenidos por densidad óptica a 600 nm después de 24 h de cultivo. En medio YPG, para *S. cerevisiae* no se observó diferencia en el crecimiento en presencia de 250 mg L^{-1} de Cr (III), con respecto al control, mientras que para *S. boulardii* hay una disminución a de aproximadamente del 30 % crecimiento en el medio con Cr con respecto al control. Por otra parte, la presencia de 25 mg L^{-1} de Cr (III) en el medio YNB, provoca una disminución en el crecimiento entre un 20 y 50 %, para *S. cerevisiae* y *S. boulardii*, respectivamente. Cabe señalar que en todos los casos hubo crecimiento, ya que se partió de una densidad óptica inicial de aproximadamente 0.1.

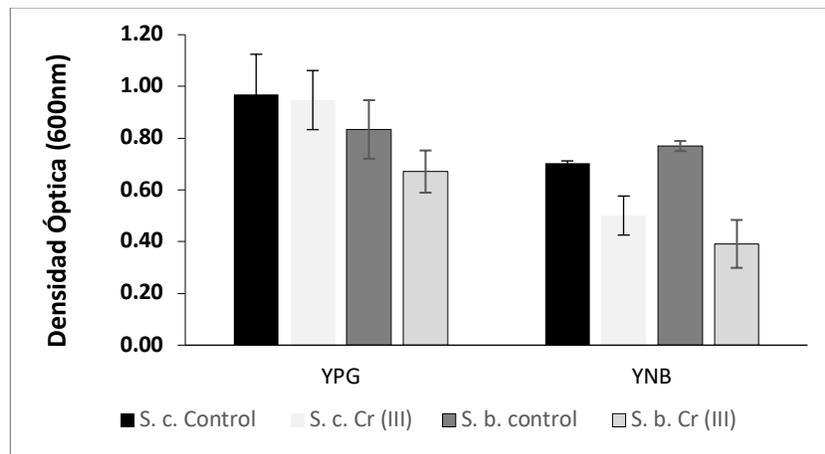


Figura 1. Comparación del crecimiento de las levaduras obtenido por densidad óptica a 600 nm. Los datos se obtuvieron después de 24 h de cultivo en medio YPG sin (control) enriquecido con 250 mg L⁻¹ de Cr (III) y medio YNB sin (control) enriquecido 25 mg L⁻¹ de Cr (III) para *S. cerevisiae* (*S. c.*) y *S. boulardii* (*S. b.*)

En la figura 2, se muestran los valores de la biomasa total obtenida por peso seco después de 24 h de cultivo. De la misma manera que en los datos presentados de crecimiento por D.O a 600 nm, se realizó un comparativo, correspondiente a cada control y muestras enriquecidas con Cr (III) y cultivadas en medio YPG y YNB de cada cepa, observándose tendencias similares a los estos resultados obtenidos. Para *S. cerevisiae* en el medio YPG se presentó un ligero aumento en la cantidad de biomasa (276 ± 47 mg) en presencia de 250 mg L⁻¹ Cr (III) en comparación con la muestra control (231 ± 32 mg). Mientras que para *S. boulardii*, se observó una disminución en la biomasa (205 ± 7 mg) en presencia de Cr (III) en comparación con su control (246 ± 30 mg). Por otra parte, la biomasa obtenida en el medio YNB fue menor que la recuperada en medio YPG para ambas cepas. Así mismo, la adición de 25 mg L⁻¹ Cr (III) al medio YNB, provoca una disminución de biomasa para ambas cepas. Siendo un efecto más marcado en *S. boulardii* con una disminución de aproximadamente del 40 % de biomasa para la muestra con Cr (III) (114.6 ± 20 mg) con respecto al control (193 ± 4 mg). Mientras que en *S. cerevisiae*, la disminución de biomasa va de 160 ± 33 mg (control) a 119 ± 16 mg en presencia de Cr, lo que provoca una disminución de aproximadamente 25 %.

De acuerdo con los resultados tanto de la densidad óptica y peso seco (biomasa total) se puede concluir que hubo una mayor producción de biomasa para ambas cepas en medio YPG y el Cr (III) no tiene efecto en el crecimiento para *S. cerevisiae* en este medio. Por otra parte, la cepa de *S. boulardii* se ve afectada por la presencia de Cr (III) en tanto en medio YPG como en YNB.

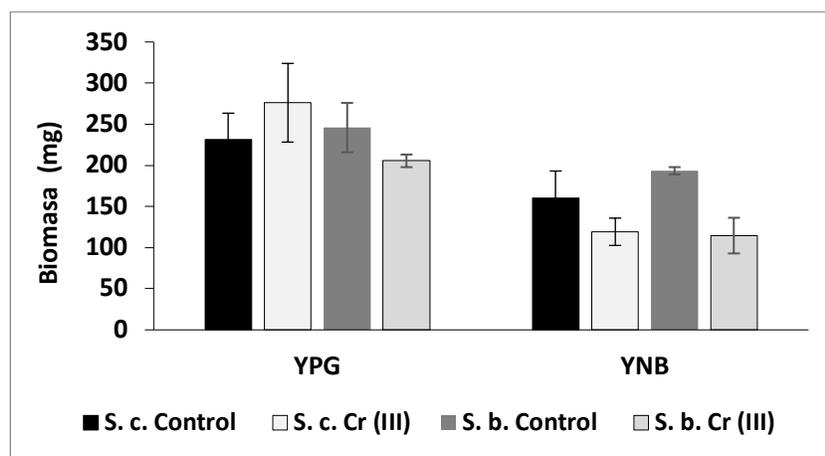


Figura 2. Comparación del crecimiento obtenido por peso seco de la biomasa total de las levaduras. Las muestras de biomasa fueron obtenidas después de 24 h de cultivo en medio YPG sin Cr (control) y enriquecidas con 250 mg L⁻¹ de Cr (III) y en medio YNB sin Cr (control) y enriquecidas con 25 mg L⁻¹ de Cr (III) para *S. cerevisiae* (*S. c.*) y *S. boulardii* (*S. b.*). Las muestras fueron congeladas y posteriormente liofilizadas

Incorporación de cromo total en la biomasa de levadura

Actualmente, la levadura enriquecida con cromo se produce principalmente fermentando las levaduras en presencia de cloruro de cromo (additives & Food, 2012). En la figura 3, se presentan los datos de la incorporación de cromo total en la biomasa de las levaduras analizado en MP-AES. Para *S. cerevisiae*, se observó una mayor incorporación de cromo en medio YNB con $391 \pm 34 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ de biomasa, mientras que el medio YPG presentó $272 \pm 76 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ de biomasa. En la cepa de *S. boulardii*, se obtuvo la mayor cantidad de Cr incorporado a la biomasa en cultivos del medio YPG ($447 \pm 104 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ de biomasa) observándose una disminución del Cr total incorporado cuando se cultivó en el medio YNB ($351 \pm 30 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ de biomasa). Cabe señalar que el medio rico YPG, se empleó mayor cantidad de Cr (III) inicial (250 mg mL^{-1}) con respecto al medio mínimo YNB la concentración Cr (III) fue de 25 mg mL^{-1} . Es decir, en el medio YPG se utilizó 10 veces más cantidad de Cr y la incorporación de este en ambos casos es similar. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, donde la composición química compleja tiende a disminuir la biodisponibilidad de Cr (III) (DWLb, Štupar, Bayer, & Raspor, 1999).

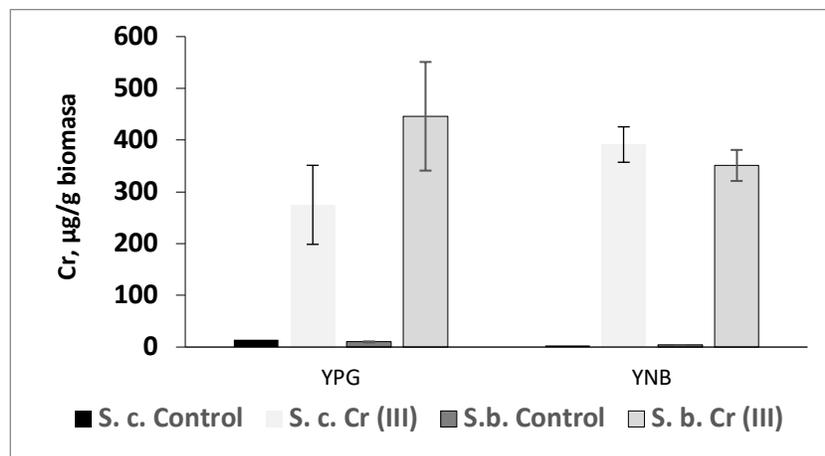


Figura 3. Determinación de la incorporación de cromo total a la biomasa obtenida del análisis por MP-AES después de la digestión ácida con HNO_3 . La biomasa se obtuvo después de 24 h de cultivo en medio YPG sin Cr (control) y enriquecidos con 250 mg L^{-1} de Cr (III) y medio YNB sin Cr (control) y enriquecidos con 25 mg L^{-1} de Cr (III) para *S. cerevisiae* (S.c) y *S. boulardii* (S. b).

Determinación de proteínas

La levadura *S. cerevisiae* es una fuente rica en proteínas y el contenido proteico de su biomasa puede llegar al 54% y se caracteriza por contener ocho aminoácidos esenciales, por lo que se espera que sea una importante fuente de proteínas en el futuro (Jack et al, 2022). Debido a su gran contenido de proteínas, estas pueden unir diferentes oligoelementos o bien altas concentraciones de estos pueden causar toxicidad y llegar a influir en la concentración de las proteínas y otros metabolitos celulares. Existen varios estudios que sugieren que la forma "activa" de cromo en la levadura es el factor de tolerancia a la glucosa (GTF, por sus siglas en inglés), que se forma por la coordinación de iones de cromo trivalente con aminoácidos (Vincent, 2000). Esta fracción se obtiene mediante extracción NH_4OH y diferentes pasos de purificación (Liu, Lv, & Uluko, 2013). En nuestro caso en particular, se generó un extracto libre de células mediante lisis con NH_4OH al 0.1 N. Para determinar el efecto del cromo en el contenido de proteína de la fracción soluble (extracto libre de células) en las 8 condiciones de cultivo (esquema 1) se llevó a cabo la determinación de proteína total por dos métodos: el método de Bradford y un método más sensible el BCA.

Método de Bradford

En la figura 4 se presentan los datos de la determinación de proteína por el método de Bradford. En esta figura se puede observar que para *S. cerevisiae* la presencia del Cr (III) en los medio de cultivo no causa un

cambio en la cantidad de proteínas: en medio YPG se obtuvo 4.7 ± 0.6 y 5.0 ± 0.3 mg de proteína/100 mg de biomasa, sin y con Cr (III), respectivamente; y para los cultivos en medio YNB, se obtuvo valores de 3.6 ± 0.4 y 4.2 ± 0.7 mg de proteína/100 mg de biomasa, sin y con Cr (III), respectivamente. El mismo efecto se observó en *S. boulardii* en medio YPG con 3.2 ± 0.2 y 3.3 ± 0.2 mg de proteína/100 mg de biomasa, sin y con Cr (III), respectivamente. Así mismo, se observó una menor cantidad de proteínas en la cepa de *S. boulardii* con respecto a la de *S. cerevisiae* en medio YPG. Por otra parte, hay un incremento en las concentraciones de proteínas en medio YNB en la cepa de *S. boulardii*, pero la con la presencia del Cr (III) en el medio de cultivo, causa una disminución en la cantidad de proteína (7.2 ± 1.4 a 5.5 ± 1.0 mg /100 mg de biomasa, sin y con Cr (III), respectivamente).

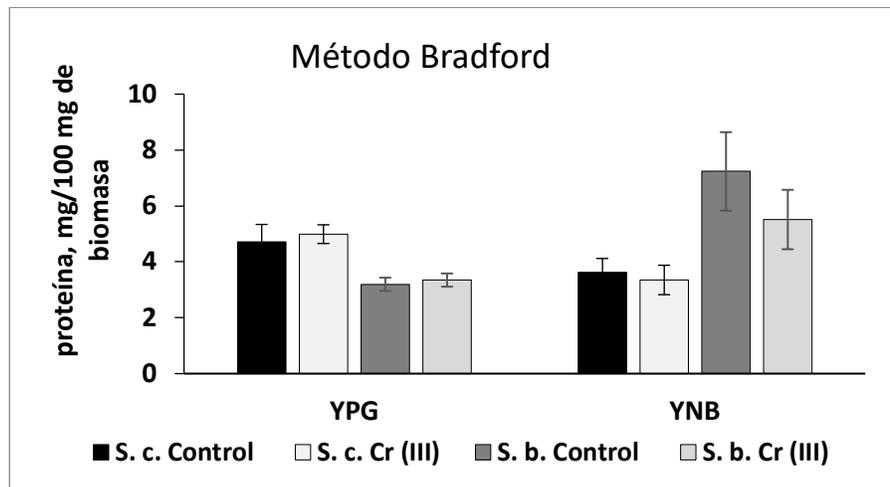


Figura 4. Determinación de proteínas obtenida por el método de Bradford. El extracto libre de células se obtuvo de la hidrólisis con NH_4OH de 20 mg de biomasa obtenida después de 24 h de cultivo en medio YPG sin Cr (control) y enriquecidos con 250 mg L^{-1} de Cr (III) y medio YNB sin Cr (control) y enriquecidos con 25 mg L^{-1} de Cr (III) para *S. cerevisiae* (*S. c.*) y *S. boulardii* (*S. b.*). La concentración se expresa en mg de proteína por cada 100 mg de biomasa.

Método de BCA

En la figura 5, se muestran los resultados de la determinación de proteínas por el método de BCA (ensayo del ácido bicinconínico). La levadura *S. cerevisiae* presentó igual cantidad de proteínas en el medio YPG control y el medio con la incorporación de Cr (III), con valores entre un rango de 9.4 -9.8 mg de proteína/100 mg de biomasa. En el medio mínimo, se observó la misma tendencia que en medio rico con un ligero aumento de proteínas de 9.9 a 10.2 mg de proteína/100 mg de biomasa, entre el medio YNB control y el medio con Cr (III). Curiosamente, en medio YNB la cepa de *S. boulardii*, presentó concentraciones similares a los obtenidos por *S. cerevisiae* en el mismo medio (9.6 a 11.1 mg/100 mg de biomasa). De la misma manera que en el método de Bradford, en la cepa de *S. boulardii* se obtuvo una disminución producción de proteínas en medio YNB en presencia de Cr (III) presentando 7.8 mg de proteína/100 mg, en comparación al medio control (14.8 mg/100 mg de biomasa).

De acuerdo con los resultados de estos experimentos podemos concluir que la mayor cantidad de proteína se obtiene en medio mínimo YNB por la cepa de *S. boulardii*, sin embargo, también es esta la única condición los niveles de proteínas se ven afectados por la presencia del Cr.

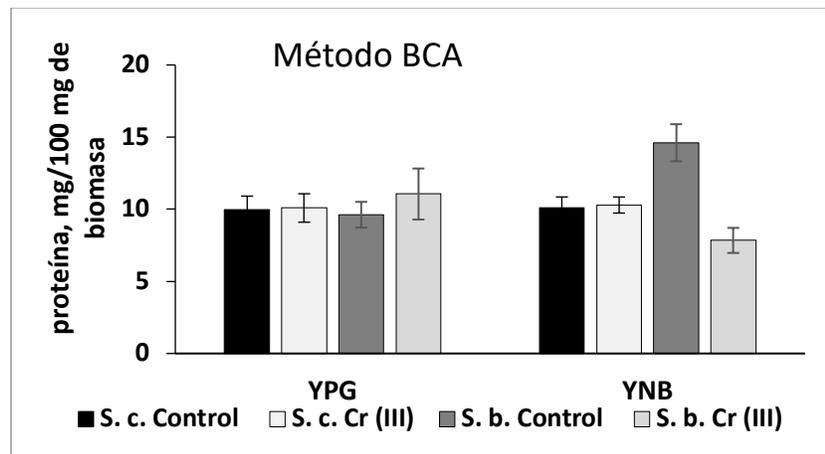


Figura 5. Determinación de proteínas por el método de BCA. El extracto libre de células se obtuvo de la hidrólisis con NH_4OH de 20 mg de biomasa obtenida después de 24 h de cultivo en medio YPG sin Cr (control) y enriquecidos con 250 mg L^{-1} de Cr (III) y medio YNB sin Cr (control) y enriquecidos con 25 mg L^{-1} de Cr (III) para *S. cerevisiae* (S. c) y *S. boulardii* (S. b). La concentración se expresa en mg de proteína por cada 100 mg de biomasa.

Determinación de Cr total en la fracción citosólica y pastilla después hidrólisis con NH_4OH

Como se mencionó anteriormente, la forma más fácilmente asimilable de Cr es el llamado Cr “orgánico” el cual se encuentra unido a aminoácidos, proteínas o algún metabolito (Liu et al., 2013). Por ello, se realizó el siguiente estudio con la finalidad de determinar en qué fracción de la biomasa se encuentra mayor concentración de Cr, analizando la pastilla y la fracción soluble o citosólica. Para ello, después de la hidrólisis con NH_4OH y calentamiento por 1 h a 60°C , se llevó a cabo una centrifugación a $20,000 \times g$ por 10 min para separar la fracción citosólica (fracción proteica y con metabolitos) y de membranas y paredes celulares (pastilla). El sobrenadante fue secado en un SpeeVac y la pastilla fue liofilizada. A ambas muestra se llevó a cabo la digestión con HNO_3 , se analizó el contenido de Cr por medio de MP-AES.

En la figura 6 se presentan los datos obtenidos del fraccionamiento celular. En donde se puede observar que en *S. cerevisiae* cultivada en medio YPG la fracción de la pastilla contiene $81 \mu\text{g Cr/g biomasa}$ y la mayor cantidad de cromo se encuentra en la fracción citosólica con $108 \mu\text{g Cr/g biomasa}$, la suma de ambas fracciones presenta un porcentaje de recuperación del 67.2 % con respecto al total de cromo inicial ($272 \mu\text{g Cr/g biomasa}$). Para el medio YNB se tiene la misma tendencia que en medio rico, con menor concentración de cromo en la pastilla con $131 \mu\text{g Cr/g biomasa}$, teniendo una mayor cantidad de cromo en la fracción citosólica con $168 \mu\text{g Cr/g biomasa}$, la suma de ambas fracciones presenta un porcentaje de recuperación total del 71.1 % respecto al cromo total ($391 \mu\text{g Cr/g biomasa}$).

En la cepa de *S. boulardii*, se puede observar en medio YPG, un aumento en la concentración de Cr en la pastilla con un valor de $278 \mu\text{g Cr/g biomasa}$, en comparación con la fracción citosólica de $178.9 \mu\text{g Cr/g biomasa}$; la suma de ambas fracciones presenta un porcentaje de recuperación de cromo entre de 107.2 %. Para el medio YNB se obtuvo menor concentración de Cr en la pastilla con $79.3 \mu\text{g Cr/g biomasa}$, y mayor concentración en la fracción citosólica de $145.9 \mu\text{g Cr/g biomasa}$, recuperando 64 % de Cr de la suma ambas fracciones, respecto al Cr total inicial ($345 \mu\text{g Cr/g biomasa}$).

De acuerdo con nuestros resultados del Cr total y fraccionamiento, el medio YNB podría utilizarse preferentemente para la producción de células enriquecidas con Cr (III), ya que al tener mayor concentración en la fracción citosólica siendo la más biodisponible y menor concentración de Cr inicial en el medio de cultivo.

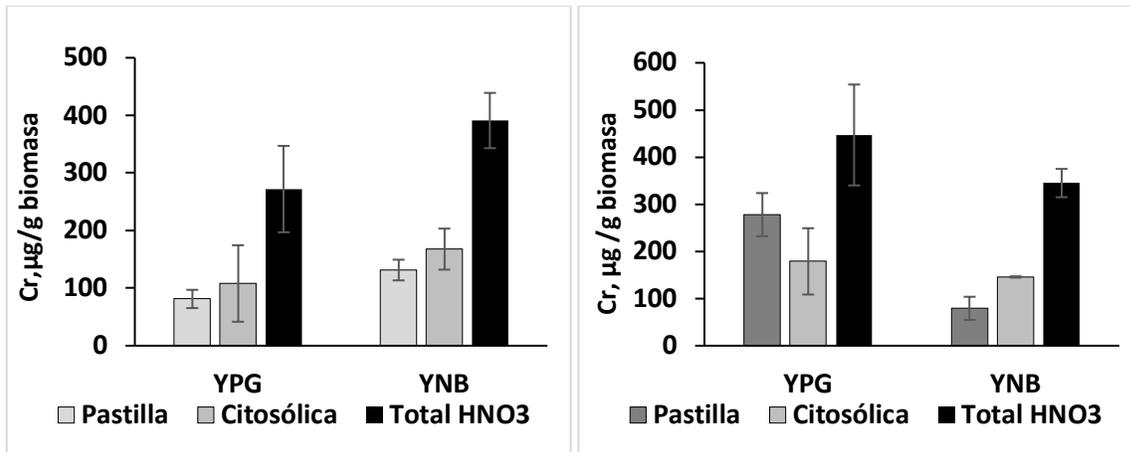


Figura 6. Cr total determinado por MP-AES en la pastilla y la fracción citosólica y su comparación con el Cr total incorporado en la biomasa de las levaduras. La biomasa fue obtenida después de 24 h de cultivo en medio YPG enriquecido con 250 mg L^{-1} de Cr (III) y medio YNB enriquecido con 25 mg L^{-1} de Cr (III) para *S. cerevisiae* (figura de la izquierda) y *S. boulardii* (figura de la derecha).

Determinación de ácidos nucleicos (AN)

Es importante evaluar la cantidad de ácidos nucleicos en los alimentos que consumimos debido a que altas concentraciones de purinas pueden actuar directamente sobre el metabolismo del ácido úrico. La ingesta humana de más de 2 g de AN/día puede aumentar los niveles de ácido úrico en sangre, lo que puede desencadenar hiperuricemia y aumentar el riesgo de cálculos renales o gota. Existen cuantiosos alimentos que pueden aumentar la concentración de purinas, entre ellos se encuentran el hígado, las sardinas o las levaduras, etc. Por otra parte, se ha descrito la interacción sinérgica de 5'-nucleótidos con aminoácidos (especialmente ácido glutámico) y péptidos en el extracto de levadura conduce a una mejora del sabor por lo que puede ser una interesante materia prima de ácidos nucleicos.

Durante la extracción de proteínas de levadura, algunas impurezas de AN se disuelven en la solución de proteínas, lo que puede limitar la aplicación de proteínas de levadura en la nutrición humana (Ansari et al., 2023). El límite superior permitido es 2 % AN sobre la base de peso seco (p/p) en condiciones de ingesta de proteínas de levadura solas (Bratosin et al., 2021). Sin embargo, comúnmente la concentración de AN en la biomasa de levadura es entre 5 - 8 %, superando los niveles recomendados (Tao et al., 2023).

En la figura 6, se presentan los resultados de la determinación de ácidos nucleicos por cada 100 mg de biomasa en extractos libres de células. Las concentraciones más altas se observan en medio YPG para *S. cerevisiae* independientemente de la presencia del Cr ($14.4 - 14.7 \text{ mg}$ de ácido nucleico por cada 100 mg de biomasa). Curiosamente, los valores más bajos se presentaron también en *S. cerevisiae*, pero en medio YNB (de $5.8 - 6.0 \text{ mg}$ de ácido nucleico por cada 100 mg de biomasa). Por otra parte, en *S. boulardii*, la presencia de 250 mg L^{-1} Cr (III) en el medio de YPG provoca un aumento en los niveles de ácidos nucleicos (de 8.7 a 11.3 mg de ácido nucleico por cada 100 mg de biomasa) con respecto al control. Mientras que en medio YNB 25 mg L^{-1} de Cr (III) provoca una disminución en las concentraciones (13.4 a 11.6 mg de ácido nucleico por cada 100 mg de biomasa).

En conclusión, podemos observar que los valores detectados de AN en todas las muestras superan los niveles recomendados (2 % AN), lo sugiere que se deben tomar algunas medidas para reducir el contenido de AN en las proteínas de levadura para garantizar la seguridad de la ingesta de proteínas. Actualmente, los métodos más utilizados para reducir el contenido de NA incluyen la hidrólisis alcalina, la precipitación ácida y el choque térmico ($60-90 \text{ }^\circ\text{C}$) (Jaeger, Arendt, Zannini y Sahin, 2020). Además, la eliminación de AN más simple y eficiente es la activación de nucleasas endógenas al prolongar el tiempo de incubación de la levadura hasta la última etapa de la fase estacionaria

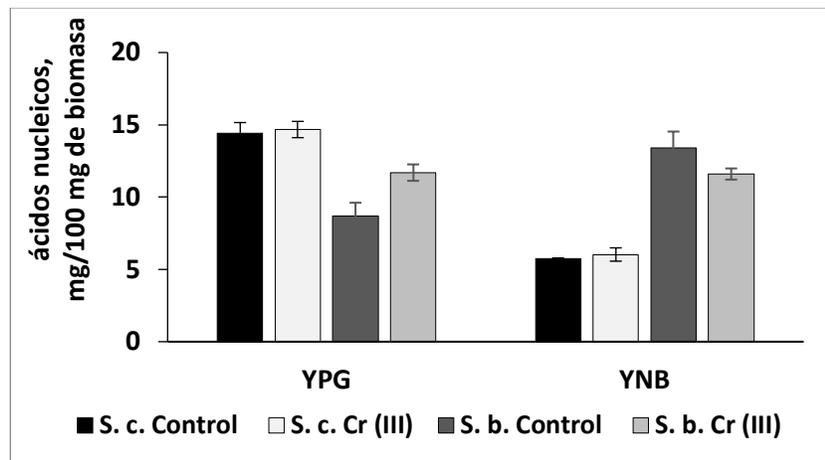


Figura 7. Concentración de ácidos nucleicos determinado espectrofotométricamente a 260 nm. El extracto libre de células se obtuvo de la hidrólisis con NH_4OH de 20 mg biomasa obtenida después de 24 h de cultivo en medio YPG sin Cr (control) y enriquecidas con 250 mg L^{-1} de Cr (III) y medio YNB sin Cr (control) y enriquecidas 25 mg L^{-1} de Cr (III) para *S. cerevisiae* (*S. c.*) y *S. boulardii* (*S. b.*). La concentración se expresa en mg de ácidos nucleicos por cada 100 mg de biomasa.

Conclusiones

En el presente trabajo se llevó a cabo la obtención y caracterización de levaduras enriquecidas con un oligoelemento metálico, el Cr (III). La caracterización consistió en la evaluación del efecto del Cr en dos diferentes medios de cultivo (YPG y YNB) y dos diferentes cepas (*S. cerevisiae* y *S. boulardii*). Para ambas cepas la mayor producción de biomasa se obtuvo en el medio rico YPG y se observó que el Cr (III) no tiene efecto significativo en el crecimiento para *S. cerevisiae* en este medio. Por otra parte, la cepa de *S. boulardii* se ve afectada por la presencia de Cr (III) en tanto en medio YPG como en YNB.

En cuanto a el enriquecimiento de Cr en las levaduras después de 24 h de incubación, se observó que *S. cerevisiae* capta entre 272 ± 76 y $391 \pm 34 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ de biomasa en medio YPG y YNB, respectivamente y *S. boulardii* capta entre 351 ± 30 y $447 \pm 104 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ de biomasa en los medio YPG y YNB, respectivamente. Cabe señalar que las desviaciones estándares ($n=3$ réplicas biológicas) de cada condición se traslapan. Por lo que no se puede definir una mejor condición de incorporación. Sin embargo, es importante señalar que en el medio YPG se utilizó 10 veces más cantidad de Cr (III) y la incorporación de este ion a la biomasa en ambos casos fue similar. Por lo que se concluye que el mejor medio para enriquecer las levaduras es medio YNB para ambas cepas de levadura.

Como parte de la caracterización también se evaluó el contenido proteico de un extracto libre de células bajo las condiciones de cultivo ya antes mencionadas (esquema 1). No se observó una diferencia significativa en el contenido de proteínas en medio YPG independiente de la cepa y la presencia o ausencia de Cr (III). Por otra parte, cuando se cultivó la cepa de *S. boulardii* en medio YNB, se observó un aumento del 50 % en el contenido de proteína con respecto al medio YPG y a la cepa de *S. cerevisiae*, sin embargo, la presencia de Cr (III) provoca una disminución del 47 % en la concentración de proteínas con respecto a su control.

Adicionalmente se realizó un estudio para determinar en qué fracción de la biomasa se encontraron las mayores concentraciones de Cr, se analizaron las fracciones que contenía las membranas y paredes celulares (pastilla) y citosólica. En general, se puede observar que el Cr se distribuye entre las dos fracciones. Sin embargo, en medio YNB, hay un ligero aumento en la fracción citosólica, para ambas cepas. Mientras que en medio YPG, mayor concentración de Cr se encuentra en la pastilla en la cepa de *S. boulardii*.

Finalmente, los valores más bajos de ácidos nucleicos se reportaron en *S. cerevisiae* en medio YNB (aproximadamente 5 mg de ácido nucleico por cada 100 mg de biomasa).

Tomando en cuenta todos los resultados (incorporación de Cr a biomasa y distribución en fracción citosólica, contenido de proteínas y ácidos nucleicos), se sugiere los cultivos en medio mínimo YNB enriquecidos con 25 mg L^{-1} de Cr (III) de la levadura panadera de *S. cerevisiae* es buena opción para llevar el enriquecimiento

de levaduras, a pesar del hecho que en estas condiciones se observó una disminución en la biomasa obtenida con respecto a las otras condiciones experimentales, se obtuvieron buenos valores en cuanto a la incorporación de Cr ($391 \pm 34 \text{ mg Cr g}^{-1}$ de biomasa) y el contenido de Cr en la fracción citosólica ($168 \pm 35 \text{ mg Cr g}^{-1}$ de biomasa). Adicionalmente, la presencia del Cr en el medio de cultivo no tiene efecto en los niveles de proteínas. Además de ser la condición con menor contenido de ácidos nucleicos.

Agradecimientos

Agradecimientos a la Dirección de Apoyo a la investigación y Posgrado de la Universidad de Guanajuato por las becas y financiamiento al proyecto (No. 137/2023) otorgadas.

Bibliografía/Referencias

- additives, E. P. o. F., & Food, N. S. a. t. (2012). Scientific Opinion on ChromoPrecise® cellular bound chromium yeast added for nutritional purposes as a source of chromium in food supplements and the bioavailability of chromium from this source. *EFSA Journal*, *10*(11), 2951.
- Ansari, F., Alian Samakkhah, S., Bahadori, A., Jafari, S. M., Ziaee, M., Khodayari, M. T., & Pourjafar, H. (2023). Health-promoting properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *63*(4), 457-485.
- Balk, E. M., Tatsioni, A., Lichtenstein, A. H., Lau, J., & Pittas, A. G. (2007). Effect of chromium supplementation on glucose metabolism and lipids: a systematic review of randomized controlled trials. *Diabetes care*, *30*(8), 2154-2163.
- Cannas, D., Loi, E., Serra, M., Firinu, D., Valera, P., & Zavattari, P. (2020). Relevance of essential trace elements in nutrition and drinking water for human health and autoimmune disease risk. *Nutrients*, *12*(7), 2074.
- Dinakarbandian, D., Morrissette, V., Chaudhary, S., Amini, K., Bennett, B., & Van Horn, J. D. (2004). An informatics search for the low-molecular weight chromium-binding peptide. *BMC chemical biology*, *4*(1), 1-7.
- DWLp, M., Štupar, J., Bayer, K., & Raspor, P. (1999). Effect of chromium (III) in batch mode on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals*.
- EFSA Panel on Dietetic Products, N. a. A. N. (2014). Scientific opinion on dietary reference values for chromium. *EFSA Journal*, *12*(10), 3845. doi:doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3845
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford protein assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(38), e1918.
- Gonzalez Ibarra, A. A., Yanez Barrientos, E., Wrobel, K., Corrales Escobosa, A. R., & Wrobel, K. (2022). Effect of copper and molybdenum in nutrient solution on Cu, Mo, Fe, Mg, Ca, Zn, Na, K status in sunflower. *Journal of Plant Nutrition*, 1-17.
- Health, N. I. o. (2020). Dietary Supplements: What you Need to Know. Retrieved from <https://ods.od.nih.gov/factsheets/WYNTK-Consumer/>
- Kaszycki, P., Fedorovych, D., Ksheminska, H., Babyak, L., Wójcik, D., & Koloczek, H. (2004). Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. *Microbiological Research*, *159*(1), 11-17.
- Landman, G. W., Bilo, H. J., Houweling, S. T., & Kleefstra, N. (2014). Chromium does not belong in the diabetes treatment arsenal: Current evidence and future perspectives. *World journal of diabetes*, *5*(2), 160.
- Liu, L., Lv, J.-p., & Uluko, H. (2013). Purification and characterization of chromium-binding substances from high-chromium yeast. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(6), 1279-1287.
- Maret, W. (2019). Chromium supplementation in human health, metabolic syndrome, and diabetes. In P. L. Carver (Ed.), *Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic* (Vol. 19, pp. 231-252). Zürich, Switzerland: De Gruyter.
- Mehri, A. (2020). Trace elements in human nutrition (II)—an update. *International journal of preventive medicine*, *11*.

- Rai, A. K., Pandey, A., & Sahoo, D. (2019). Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 129-137.
- Sun, J., Xu, S., Du, Y., Yu, K., Jiang, Y., Weng, H., & Yuan, W. (2022). Accumulation and Enrichment of Trace Elements by Yeast Cells and Their Applications: A Critical Review. *Microorganisms*, 10(9). doi:10.3390/microorganisms10091746
- Tao, Z., Yuan, H., Liu, M., Liu, Q., Zhang, S., Liu, H., . . . Wang, T. (2023). Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives. *J Microbiol Biotechnol*, 33(2), 151-166. doi:10.4014/jmb.2207.07057
- Vincent, J. B. (2000). Elucidating a biological role for chromium at a molecular level. *Acc Chem Res*, 33(7), 503-510. doi:10.1021/ar990073r
- Zetic, V. G., Stehlik-Tomas, V., Grba, S., Lutlisky, L., & Kozlek, D. (2001). Chromium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass. *Journal of Biosciences*, 26, 217-223.