

Actividad antioxidante de extractos de levaduras *Kluyveromyces marxianus* Antioxidant activity of *Kluyveromyces marxianus* yeast extracts

B. Vargas-Ochoa^a, C. R. Sosa-Aguirre^a, J. Campos-García^a, M. Arellano-Plaza^b, A. Saavedra-Molina^a
J. A. Mejía-Barajas^{c*}

^a Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B-3, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Michoacán, México.

^b Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Biotecnología Industrial, Av Normalistas 800, 44270 Guadalajara, Jalisco, México.

^c Universidad Tecnológica de Morelia. Av. Vicepresidente Pino Suárez, 750. Col. Ciudad Industrial, 58200 Morelia, Michoacán, México.

Resumen

Los antioxidantes son compuestos que contribuyen en la conservación de alimentos. Los extractos procedentes de levaduras del género *Saccharomyces* presentan propiedades antioxidantes. Sin embargo, recientemente las levaduras del género *Kluyveromyces* han sido reconocidas con propiedades similares e incluso superiores, por lo anterior, el objetivo de este estudio fue obtener extractos de cepas de levaduras *K. marxianus* (OFF1 y SLP1) y evaluar su actividad antioxidante *in vitro*, lo cual se llevó a cabo mediante el ensayo de extinción del radical 1,1-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), reducción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), reducción del ion férrico y anti-lipoperoxidación. Los resultados fueron comparados con los obtenidos de un extracto de una levadura *S. cerevisiae* (W303-A), la cual es un modelo biológico ampliamente utilizada en investigación, tomando como referencia la actividad de una solución de ácido ascórbico. El extracto clasificado como S:2 de la levadura *K. marxianus* SLP1, generó la mayor actividad antioxidante en las pruebas de reducción del radical DPPH, H₂O₂ e ión férrico, lo cual se relacionó con su concentración de glutatión reducido que fue de 40 µmol / g de extracto.

Palabras Clave: Levaduras no-*Saccharomyces*, *in vitro*, glutatión reducido.

Abstract

Antioxidants are compounds that contribute to food preservation. Extracts from yeasts of the genus *Saccharomyces* have antioxidant properties. However, recently yeasts of the genus *Kluyveromyces* have been recognized with similar and even superior properties, therefore, the objective of this study was to obtain extracts of *K. marxianus* yeast strains (OFF1 and SLP1) and evaluate their *in vitro* antioxidant activity, which was carried out using the 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) radical extinction assay, hydrogen peroxide reduction, ferric ion reduction and anti-lipoperoxidation. The results were compared with those obtained from an extract of a yeast *S. cerevisiae* (W303-A), which is a biological model widely used in research, taking as reference the activity of an ascorbic acid solution. The extract classified as S:2 of the yeast *K. marxianus* SLP1, generated the highest antioxidant activity in the DPPH, H₂O₂ and ferric ion radical reduction tests, which was related to its reduced glutathione concentration, which was 40 µmol / g of extract.

Keywords: Non-*Saccharomyces* yeasts, *in vitro*, reduced glutathione.

1. Introducción

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres, contribuyen en la degradación de los alimentos a través de la oxidación de sus componentes, lo que reduce sus cualidades nutricionales, químicas y físicas, tanto durante el

almacenamiento como en su comercialización. Las principales ERO y radicales libres son el anión superóxido (O₂⁻), hidroxilo (HO·), peroxi (ROO·), alcoxi (RO·), hidroperoxi (HOO·), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y ozono (O₃), y su presencia, así como efecto en alimentos ha sido reportada previamente (Wettasinghe and Shahidi, 2000; Eunok and Min, 2005). La

*Autor para la correspondencia: jorge.mejia@ut-morelia.edu.mx

Correo electrónico: belem2501@hotmail.com (Belem Vargas-Ochoa), csosa@biofermich.com (Carlos Rubén Sosa-Aguirre), jcgarcia@umich.mx (Jesús Campos-García), marellano@ciatej.mx (Melchor Arellano-Plaza), saavedra@umich.mx (Alfredo Saavedra-Molina), jorge.mejia@ut-morelia.edu.mx (Jorge Arturo Mejía-Barajas)

oxidación que generan los compuestos mencionados se reduce mediante la adición de antioxidantes, los cuales pueden ser sintéticos o naturales. Actualmente los antioxidantes sintéticos se usan ampliamente en diferentes industrias, destacando la industria de los alimentos. Sin embargo, existe una preocupación por su seguridad y toxicidad debido a una posible producción de compuestos cancerígenos durante su degradación (Singh and Singh, 2012). Lo anterior ha generado un mayor interés en la búsqueda de antioxidantes naturales que sean efectivos, económicos y seguros (Manzoor *et al.*, 2014). El glutatión (GSH) es un antioxidante natural compuesto de cisteína, glicina y glutamato, y puede representar hasta el 1% del peso seco celular (De Vero *et al.*, 2017). Debido a su capacidad antioxidante ha sido aplicado y comercializado en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia, mediante su producción y purificación de extractos de levaduras (Li *et al.*, 2004; Yiran *et al.*, 2020). Los extractos de levadura del género *S. cerevisiae* además de contener glutatión, presentan fenoles y aminoácidos (Vieira *et al.*, 2016), con propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Fakruddin *et al.*, 2017; Makky *et al.*, 2021; Złotek *et al.*, 2021). En el extracto de levadura *S. cerevisiae* residual de la producción de cerveza, se han identificado catequinas, ácido protocatecoico, ácido *p*-cumárico, así como ácido gálico, ferúlico y cinámico, compuestos que presentaron actividad antioxidante en las pruebas de poder reductor del ión férrico y eliminación del radical DPPH (Vieira *et al.*, 2016). Las levaduras *Kluyveromyces marxianus* han sido reconocidas con propiedades biotecnológicas similares a levaduras *S. cerevisiae* (Fonseca *et al.*, 2008; Lane and Morrissey, 2010; Gombert *et al.*, 2016; Homayouni-Rad *et al.*, 2020; Karim *et al.*, 2020). Revillion *et al.* (2003) generaron un extracto con una alta concentración de nucleótidos a partir de la cepa *K. marxianus* CBS 6556, sin embargo, su actividad antioxidante no fue evaluada. Galinari *et al.* (2017) purificaron mananos de la pared celular de la cepa *K. marxianus* CCT7735 y evaluaron su actividad antioxidante y antiproliferativa, concluyendo que esta cepa es una fuente natural y renovable de polisacáridos con propiedades farmacológicas. Mirzaei *et al.* (2018) reportaron que algunas proteínas de levaduras *K. marxianus* contienen péptidos con propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antihipertensivas, que pueden ser obtenidas mediante hidrólisis enzimática. Las levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con amplio potencial biotecnológico (Arellano-Plaza *et al.*, 2017; Sandoval-Núñez *et al.*, 2023), presentan un menor grado de estrés oxidativo celular (Mejía-Barajas *et al.*, 2017), por lo que el objetivo del presente estudio fue obtener los extractos de estas cepas de levaduras (OFF1 y SLP1) y evaluar su actividad antioxidante *in vitro*.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas de levaduras y condiciones de crecimiento

Las cepas utilizadas para producir los extractos fueron *K. marxianus* (OFF1 y SLP1), y *S. cerevisiae* (W303-A); obtenidas de la colección de cultivos del CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, México) (Gschaedler *et al.*, 2004). Las levaduras se cultivaron utilizando extracto de levadura, peptona y dextrosa (YPD 2% p / v), con agitación (180 rpm) a una temperatura de 28°C. Después de 24 h de crecimiento, los cultivos se

reinocularon al 10% (v / v) en medio YPD nuevo, y se mantuvieron en reposo hasta que se sometieron a autólisis.

2.2. Obtención de extractos

Para la obtención de los extractos evaluados se utilizaron tres métodos diferentes de lisis celular, como se describe a continuación:

1) Autólisis de levaduras sin ajuste de pH según el método de Tangüler and Hüseyin, (2008). Se mezcló un volumen del medio YPD previamente inoculado con la levadura, con dos volúmenes de agua destilada. La solución se incubó a temperatura ambiente durante 72 h y posteriormente se centrifugó a 2000×g durante 10 min en una centrifuga de sobre mesa refrigerada Sigma 3-16 KL. El sedimento se lavó dos veces con agua destilada, se centrifugó 2000×g durante 10 min, y el sobrenadante se recuperó y se secó a 110°C hasta peso constante utilizando el horno de secado por convección TE-H80DM. Para la evaluación de su actividad antioxidante el extracto se disolvió con agua desionizada.

2) Autólisis de levaduras con ajuste de pH. A partir de levaduras crecidas, se obtuvo el sedimento celular por centrifugación, el cual fue suspendido utilizando 4 mL de agua por cada 0.6 g de células de levadura. El pH de la suspensión se ajustó a 6.0 con NaOH (2 N) o HCl (2 N). La autólisis se llevó a cabo a 50°C en baño de agua por 24 h. Después las muestras se expusieron a 80°C durante 30 min en un horno (TE-H80DM) y se mantuvieron a temperatura ambiente. Finalmente, las suspensiones se centrifugaron a 2000×g durante 10 min a 4°C. Los sedimentos se descartaron mientras que el sobrenadante se secó a 110°C utilizando el horno previamente descrito (Tangüler and Hüseyin, 2008).

3) La plasmólisis de las levaduras se llevó a cabo utilizando un agente plasmolítico (Takaloo *et al.*, 2022), para lo cual los gránulos de levadura fueron suspendidos en agua a una concentración del 18% (p / v), y agregado 1.5 mL de acetato de etilo. La solución se ajustó a un pH de 5.5 usando NaOH (2 N) o HCl (2 N). La autólisis se realizó a 48°C, con agitación a 300 rpm por 24 h. La suspensión se centrifugó a 2000×g durante 10 min, descartando el sedimento. El sobrenadante se secó a 110°C en un horno TE-H80DM (Jacob *et al.*, 2019a).

Los rendimientos de los extractos fueron obtenidos de la determinación del peso seco del extracto por cada 100 mL de medio de cultivo inoculado. Los extractos obtenidos por los tres métodos descritos fueron evaluados a una concentración de 10 mg / mL, de acuerdo con lo reportado por Lakshmi *et al.* (2004). Como control positivo se utilizó el ácido ascórbico a una concentración de 0.03% p / v, como fue reportado por Szydłowska-Czerniak *et al.* (2012).

2.3. Ensayo de extinción del radical 1,1-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

La reducción de radicales libres, se evaluó de acuerdo con el método de Lee *et al.* (2004). Se mezclaron 100 µL de extracto de cada cepa (10 mg / mL) con 1 mL de agua destilada y 1 mL de solución de DPPH (0.2 mM en etanol). La solución se mezcló y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. El blanco se preparó utilizando agua destilada y esterilizada previamente. La absorbancia de la solución resultante se midió a 517 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis (Lambda 18,

Perkin Elmer). El porcentaje de eliminación del radical de DPPH se calculó usando la Ecuación 1:

$$\text{Reducción del radical(\%)} = \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del control}} \times 100 \quad (1)$$

2.4. Reducción de peróxido de hidrógeno

La capacidad de reducción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se determinó como lo reportó Kesavan *et al.* (2014). Se disolvieron 100 µL de extracto de levadura (10 mg / mL) en 3.4 mL de una solución de fosfato 0.1 M (pH 7.4) y se mezclaron con 600 µL de H₂O₂ 43 mM. La absorbancia de la mezcla de reacción se determinó a 230 nm. El porcentaje de capacidad de reducción de H₂O₂ se calculó con la Ecuación 2:

$$\text{Reducción de H}_2\text{O}_2 (\%) = (1 - (\text{absorbancia de muestra} / \text{absorbancia control})) \times 100 \quad (2)$$

2.5. Poder reductor del ion férrico

La actividad reductora de las muestras se determinó siguiendo el método de Matthew and Abraham, (2006). Se mezcló un volumen de 0.1 mL de extracto de levadura con 0.9 mL de agua, 2.5 mL de una solución de fosfato (0.2 M, pH 6.6) y 2.5 mL de ferrocianuro de potasio (1% p / v). La solución se incubó a 50°C durante 20 min y se añadieron 1.5 mL de ácido tricloroacético al 10% (v / v). La mezcla se centrifugó a 3000×g a 4°C durante 10 min. La capa superior (2.5 mL) se mezcló durante 10 min con 2.5 mL de cloruro férrico al 0.1% (p / v). La absorbancia de la mezcla se midió a 700 nm.

2.6. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

La actividad de los extractos de levadura contra la oxidación de lípidos se midió mediante el análisis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Badmus *et al.*, 2010). Se mezclaron 0.5 mL de homogeneizado de yema de huevo al 10% (p / v) con 100 µL de extracto de levadura (10 mg / mL). Se completó a un volumen de 1 mL con agua destilada, y se agregaron 5 µL de sulfato ferroso (0.07 M). La mezcla fue incubada por 30 min. Posteriormente, se adicionaron 1.5 mL de ácido acético al 20% (v / v), 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.8% (p / v) en dodecil sulfato de sodio al 1.1% (v / v), por último, se agregaron 0.5 mL de ácido tricloroacético (20% v / v). La solución se mezcló y se calentó a 95°C durante 60 min. Después de enfriar se centrifugó a 2000×g durante 5 min a 15°C. La absorbancia del sobrenadante se determinó a 532 nm. El porcentaje del índice antioxidante (IA %) se calculó de acuerdo con la Ecuación 3:

$$\text{IA\%} = ((1 - \text{AT}) / \text{AC}) \times 100 \quad (3)$$

Donde A_T es el valor de absorbancia de la muestra y A_C es el valor de la absorbancia del control completamente oxidado.

2.7. Determinación de glutatión reducido (GSH)

La cantidad de glutatión reducido (GSH) se evaluó según lo reportado por Saeed *et al.* (2012). Se añadieron 100 µL de extracto de levadura (10 mg / mL) a 2.5 mL de una solución de fosfato 0.1 M (pH 8) y 1 mL de ácido 5,5'-ditiobis-2-

nitrobenzoico (DTNB) 0.1 mM. La absorbancia se determinó a 412 nm.

2.8. Análisis estadístico

Los resultados que se presentan a continuación en figuras y tablas se analizaron con el software estadístico Statistic 7.0. Los resultados se expresaron como el promedio ± el error estándar (EE). En cada experimento se realizó el análisis factorial de varianza (ANOVA) y se utilizó la prueba de comparación de medias múltiples de Tukey con un intervalo de confianza del 99% y nivel de significancia <0.01.

3. Resultados y discusión

Debido a que el extracto de levaduras *S. cerevisiae* se utiliza como aditivo antioxidante en alimentos procesados (Jacob *et al.*, 2019b), y a que recientemente se ha reconocido a las levaduras *K. marxianus* con propiedades biotecnológicas similares (Homayouni-Rad *et al.*, 2020), en este trabajo se evaluó la actividad antioxidante de extractos de dos cepas *K. marxianus* (OFF1 y SLP1) obtenidos por tres métodos de lisis celular. Los resultados fueron comparados con los obtenidos utilizando un extracto de la levadura modelo *S. cerevisiae* (W303-A).

En los trabajos de Revillion *et al.* (2003), Galinari *et al.* (2017), y Mirzaei *et al.* (2018), se evaluaron propiedades de extractos de cepas *Kluyveromyces*, sin analizar su actividad antioxidante, por lo que éste es el primer trabajo en el cual se determinó la actividad antioxidante de extractos de levaduras *K. marxianus* obtenidos por autólisis y plasmólisis.

Debido a que las condiciones mediante las cuales se obtienen los extractos pueden influir en su composición final y propiedades (Złotek *et al.*, 2021), los extractos fueron obtenidos mediante tres métodos (autólisis sin y con ajuste de pH, y plasmólisis). En la tabla 1 se observa como los rendimientos de los extractos variaron considerablemente según el método utilizado, resultados que coincidieron con los reportados por Takaloo *et al.* (2020), en donde compararon tres métodos de lisis de levadura usando autólisis, plasmólisis e hidrólisis enzimática.

Tabla 1. Rendimiento de extractos de levadura (mg / 100 mL de medio de cultivo).

Extracto de levadura	Método de obtención de extracto		
	1 ^a	2 ^b	3 ^b
W	1379.53±44.36	67.03±8.57	52.26±26.76
O	1315.70±107.60	136.83±24.82	78.90±5.84
S	1124.50±162.10	102.10±1.73	38.83±5.78

Extractos de levadura *S. cerevisiae* W303-A (W), *K. marxianus* OFF1 (O) y *K. marxianus* SLP1 (S). Método de autólisis sin ajuste de pH (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). El análisis realizado por método de obtención de extracto fue ANOVA, se utilizó la prueba de comparación de medias múltiples de Tukey con un intervalo de confianza del 99% (p <0.01). Se graficó el promedio ± EE para cada extracto obtenido.

En el presente trabajo el método de obtención de extractos con el rendimiento superior, calculado como se describe en material y métodos, fue la autólisis sin ajuste de pH (tabla 1), resultado que se debió probablemente al mayor tiempo en el cual las levaduras estuvieron suspendidas en agua, contribuyendo a la liberación de sus componentes celulares. El

proceso mediante el cual se logra obtener el mayor rendimiento es importante, ya que esto puede generar un menor costo de producción de los extractos.

Debido a que la oxidación de un alimento puede ocurrir por múltiples mecanismos, se considera que la evaluación de la actividad antioxidante de un compuesto o mezcla de estos, requiere el uso de diferentes pruebas en donde se consideren distintos mecanismos de oxidación (Magalhaes *et al.*, 2008). La extinción del radical DPPH es uno de los métodos más utilizados para determinar la capacidad antioxidante de un compuesto (Molyneux, 2004). El extracto S:2 de la levadura *K. marxianus* SLP1, presentó la mayor actividad reductora de este radical (Figura 1), lo que podría estar relacionado con sus componentes, ya que se ha reportado que compuestos como glutatión, ácido ascórbico, tocoferoles, flavonoides, taninos y aminas aromáticas, reducen el radical del DPPH debido a su capacidad para donar hidrógeno (Kumaran and Karunakaran, 2007).

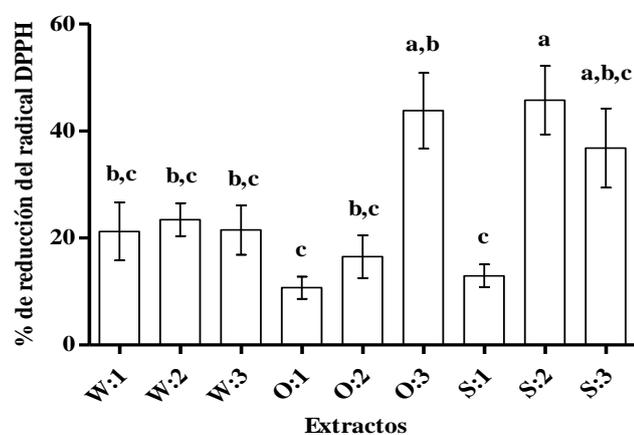


Figura 1. Reducción del radical DPPH. Extractos de levadura *S. cerevisiae* W303-A (W), *K. marxianus* OFF1 (O) y *K. marxianus* SLP1 (S). Procedimientos de autólisis sin ajuste de pH (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). El análisis realizado fue ANOVA, se utilizó la prueba de comparación de medias múltiples de Tukey con un intervalo de confianza del 99% ($p < 0.01$). Se graficó el promedio \pm EE. Como 100% se tomó la reducción generada por una solución de ácido ascórbico al 0.03% p / v.

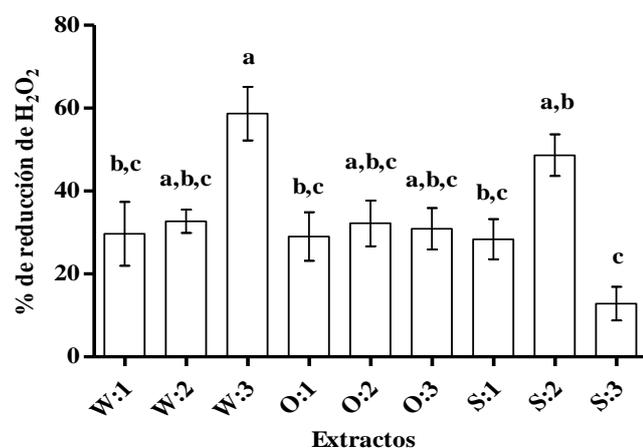


Figura 2. Reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Extractos de levadura *S. cerevisiae* W303-A (W), *K. marxianus* OFF1 (O) y *K. marxianus* SLP1 (S). Procedimientos de autólisis sin ajuste de pH (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). El análisis realizado fue ANOVA, se utilizó la prueba de comparación de medias múltiples de Tukey con un intervalo de confianza del 99% ($p < 0.01$). Se graficó el promedio \pm EE. Como 100% se tomó la reducción generada por una solución de ácido ascórbico al 0.03% p / v.

Como se observa en la Figura 2, la reducción de H_2O_2 presenta mayor relación con las cepa de levadura que con el método de producción del extracto, ya que las muestras W:3 y S:3, ambas obtenidas por plasmólisis, presentaron la mayor y menor actividad reductora de H_2O_2 , respectivamente. Tal diferencia en la actividad reductora de este compuesto podría atribuirse al glutatión reducido (GSH), ya que como se observa en la figura 5, el extracto W:3 fue uno de los que presentó mayor concentración de GSH.

En la prueba de reducción del ion férrico la presencia de determinados compuestos provoca la reducción del complejo ferrocianuro (Fe^{3+}) a la forma ferrosa (Fe^{2+}), generando una coloración azul de Prusia que es proporcional a la concentración de Fe^{2+} , y por lo tanto a la capacidad reductora del extracto (Hazem, 2011). En la Figura 3 se observa que el extracto S:2 obtenido de la levadura *K. marxianus* SLP1 mediante autólisis con ajuste de pH, presentó la mayor capacidad de reducción del ión férrico de acuerdo al método de Matthew and Abraham, (2006). El porcentaje de reducción fue del 80%, en comparación con el poder reductor de la solución de ácido ascórbico (0.03% p / v) utilizada como control positivo. Tal reducción generada por el extracto S:2 fue hasta 4 veces mayor que la actividad del extracto W:1, de la levadura *S. cerevisiae* W303-A.

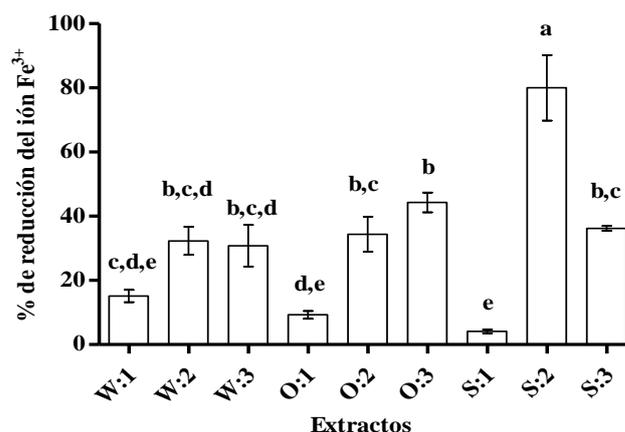


Figura 3. Reducción del ion férrico. Extractos de levadura *S. cerevisiae* W303-A (W), *K. marxianus* OFF1 (O) y *K. marxianus* SLP1 (S). Procedimientos de autólisis sin ajuste de pH (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). El análisis realizado fue ANOVA, se utilizó la prueba de comparación de medias múltiples de Tukey con un intervalo de confianza del 99% ($p < 0.01$). Se graficó el promedio \pm EE. Como 100% se tomó la reducción generada por una solución de ácido ascórbico al 0.03% p / v.

La reducción del ion férrico se ha asociado a una reacción con metales catalizadores de reacciones de oxidación o con la degradación de peróxidos (Mex-Álvarez *et al.*, 2013), ambos fenómenos podrían estar ocurriendo en la presencia del extracto S:2, ya que el efecto observado (Figura 3) coincidió con los resultados de las pruebas de reducción del radical DPPH y H_2O_2 (Figura 1 y 2, respectivamente).

El mayor grado de anti-lipoperoxidación generado por los extractos utilizados fue de 44%, en comparación con la solución de ácido ascórbico (Figura 4). Estadísticamente no se observó una diferencia significativa entre el grado de anti-lipoperoxidación generado por los diferentes extractos, con excepción del extracto O:2 que presentó una menor actividad, por lo que la mayor capacidad de reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} del

extracto S:2 (Figura 3), no corresponde a una mayor capacidad de anti-lipoperoxidación (Figura 4), así mismo, los extractos W:2 y S:2, que presentaron la mayor reducción de H_2O_2 (Figura 2), no mostraron una diferencia significativa en la inhibición de la lipoperoxidación con respecto al resto de los extractos evaluados (Figura 4), deduciendo que la reducción de compuestos (Figura 1 y 3) o de radicales libres (Figura 2), observado en los resultados anteriores, no fue suficiente para evitar la oxidación de lípidos, por lo que se sugiere evaluar el efecto anti-lipoperoxidante de los extractos obtenidos utilizando una mayor concentración que la empleada en este trabajo.

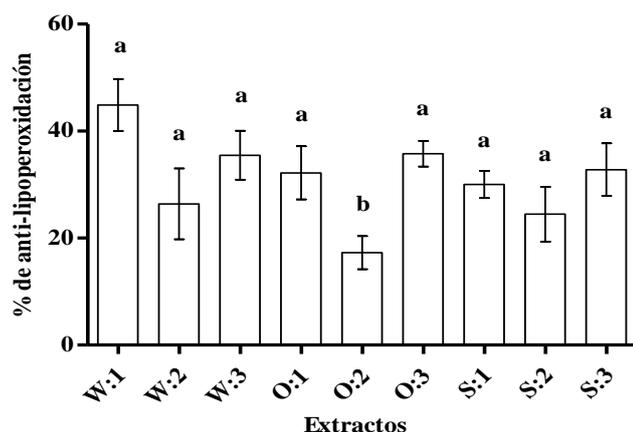


Figura 4. Capacidad de anti-lipoperoxidación. Extractos de levadura *S. cerevisiae* W303-A (W), *K. marxianus* OFF1 (O) y *K. marxianus* SLP1 (S). Método de autólisis sin ajuste de pH (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). El análisis realizado fue ANOVA, se utilizó la prueba de comparación de medias múltiples de Tukey con un intervalo de confianza del 99% ($p < 0.01$). Se graficó el promedio \pm EE. Como 100% se tomó la anti lipoperoxidación generada por una solución de ácido ascórbico al 0.03% p/v.

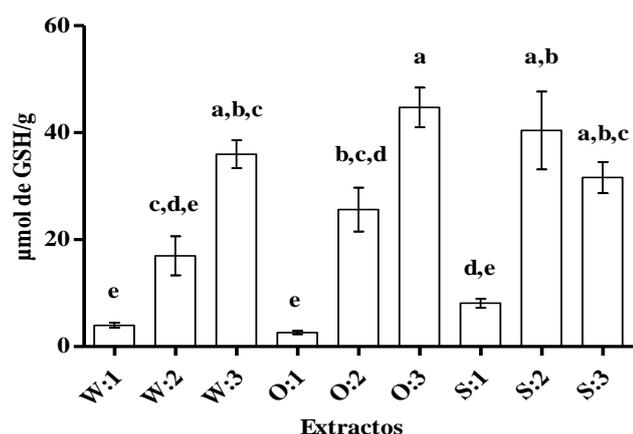


Figura 5. Determinación de glutatió reducido (GSH). Extractos de levadura *S. cerevisiae* W303-A (W), *K. marxianus* OFF1 (O) y *K. marxianus* SLP1 (S). Procedimientos de autólisis sin ajuste de pH (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). El análisis realizado fue ANOVA, se utilizó la prueba de comparación de medias múltiples de Tukey con un intervalo de confianza del 99% ($p < 0.01$). Se graficó el promedio \pm EE.

El GSH es un tripéptido intracelular que representa más del 95% de los tioles no proteicos (De Vero *et al.*, 2017), y su presencia en autolisados de levaduras *S. cerevisiae*, así como su actividad antioxidante, ya ha sido reportado previamente (Hazem, 2011; Yiran *et al.*, 2021), por lo que es considerado

uno de los principales antioxidantes en levaduras inactivadas (Bahut *et al.*, 2020). La Figura 5 muestra las cantidades de GSH detectado en los extractos generados con los tres métodos de lisis celular empleados. En general, los extractos obtenidos por autólisis sin ajuste de pH (1) mostraron la menor concentración de GSH. El extracto de la levadura *K. marxianus* OFF1 obtenido por plasmólisis (O:3) presentó el mayor contenido de GSH con 44 $\mu\text{mol/g}$. El segundo extracto con la mayor concentración de GSH fue el S:2, con 40 $\mu\text{mol/g}$. Observando para los extractos de las levaduras *K. marxianus*, un patrón similar entre la concentración de GSH y la capacidad de reducción del radical del DPPH, efecto que no corresponde para los extractos de la levadura *S. cerevisiae* (Figura 1 y 5).

Galinari *et al.* (2017) reportaron que mananos de la pared celular de una cepa *K. marxianus* presentaron actividad antioxidante. Sin embargo, debido a que en el presente trabajo, el tripéptido GSH clasificado como el principal antioxidante secundario en levaduras (Li *et al.*, 2004; Forman *et al.*, 2009), y que ha sido previamente identificado y purificado de extractos de cepas *S. cerevisiae* (Yiran *et al.*, 2021), presentó una relación directa entre su concentración (Figura 5) y la reducción del radical DPPH (Figura 1), de H_2O_2 (Figura 2) e ión férrico (Figura 3), se sugiere que este tripéptido podría estar actuando como el principal componente antioxidante del extracto S:2 de la levadura *K. marxianus* SLP1.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se concluyó que el extracto S:2 de la cepa *K. marxianus* SLP1, presentó mayor actividad antioxidante *in vitro* que el extracto de la cepa W303-A de la levadura modelo *S. cerevisiae*, por lo que se sugiere su evaluación como posible antioxidante alimentario.

Agradecimientos

Se agradece al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), por proporcionar las cepas de levaduras utilizadas en este trabajo, así como a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario (CIDAM), y Universidad Tecnológica de Morelia (UTM), por la accesibilidad a sus instalaciones para la realización de las pruebas.

Referencias

- Arellano-Plaza, M., Noriega-Cisneros, R., Clemente-Guerrero, M., González-Hernández, J. C., Robles-Herrera, P. D., Manzo-Ávalos, S., Saavedra-Molina, A., Gschaedler-Mathis, A., (2017). Fermentative capacity of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* after oxidative stress. *Journal of The Institute of Brewing*, 123: 519-526. DOI: 10.1002/jib.451
- Badmus, J. A., Odunola, O. A., Obuotor, E. M., Oyedapo, O. O., (2010). Phytochemicals and *in vitro* antioxidant potentials of defatted methanolic extract of *Holarrhena floribunda* leaves. *African Journal of Biotechnology*, 9(3): 340-346.
- Bahut, F., Romanet, R., Sieczkowski, N., Schmitt-Kopplin, P., Nikolantonaki, M., Gougeon, R. D., (2020). Antioxidant activity from inactivated yeast: Expanding knowledge beyond the glutathione-related oxidative stability of wine. *Food Chemistry*, 325: 1-10. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126941
- De Vero, L., Bonciani, T., Verspohl, A., Mezzetti, F., Giudici, P., (2017). High-glutathione producing yeasts obtained by genetic improvement strategies:

- a focus on adaptive evolution approaches for novel wine strains. *AIMS Microbiology*. 23;3(2): 155-170. DOI: 10.3934/microbiol.2017.2.155.
- Eunok, C., Min, D. B., (2005). Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods. 70(9): 142-159. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb08329.x
- Fakruddin, M., Hossain, M. N. Ahmed, M. M., (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17: 64-75. DOI: 10.1186/s12906-017-1591-9
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A. K., (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79: 339–354. DOI: 10.1007/s00253-008-1458-6
- Forman, H. J., Zhang, H., Rinna, A., (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. 30:1–12. DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.006
- Galinari, E., Sabry, D. A., Sasaki, G. L., Macedo, G. R., Passosa, F. M., Mantovani, H. C., Rocha, H. A., (2017). Chemical structure, antiproliferative and antioxidant activities of a cell wall α -D-mannan from yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Carbohydrates Polymers*. 157: 1298-1305. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.11.015
- Gombert, A. K., Madeira, J. V., Cerdán, M. E., González-Siso, M. I., (2016). *Kluyveromyces marxianus* as a host for heterologous protein synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100:6193–6208. DOI: 10.1007/s00253-016-7645-y
- Gschaedler, A., Ramírez, J., Díaz, D., Herrera, E., Arrizón, J., Pinal, L., Arellano, M., 2004. Fermentación. En: *Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas*. CIATEJ, Guadalajara, Jalisco, México. 61-120.
- Hazem, M. M. (2011). Antioxidant and immunostimulating activities of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) autolysates. *World Applied Sciences Journal*. 15(8): 1110-1119.
- Homayouni-Rad, A., Azizi, A., Oroojzadeh, P. Pourjafar, H., (2020). *Kluyveromyces marxianus* as a Probiotic Yeast: A Mini-Review. *Current Nutrition y Food Science*. 1116-1163. DOI: 10.2174/1573401316666200217113230
- Jacob, F. F., Striegel, L., Rychlik, M., Hutzler, M. Methner, F. J., (2019a). Yeast extract production using spent yeast from beer manufacture: Influence of industrially applicable disruption methods on selected substance groups with biotechnological relevance. *European Food Research and Technology*. 245: 1169–1182. DOI: 10.1007/s00217-019-03237-9
- Jacob, F., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M. Frank-Jürgen, M., (2019b). The complexity of yeast extracts and its consequences on the utility in brewing: A review. *Brewing Science*. 72: 50-62. DOI: 10.23763/BrSc19-04jacob
- Karim, A., Gerliani, N., Aider, M., (2020). *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*. 333-341. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818
- Kesavan, K., Deepa, G., Shobana, G., Sridharan, G., (2014). Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antioxidant potential of *Euphorbia Heterophylla* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(8): 549-553. DOI: 10.1186/1472-6882-10-21
- Kumar, A., Karunakaran, R. J., (2007). *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*. 40(2): 344-352. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.09.011
- Lakshmi, B. J. C., Tilak, S., Hikari, T. P. A., Devasagayam, K., Janardhanan, K., (2004). Evaluation of Antioxidant Activity of Selected Indian Mushrooms. *Pharmaceutical Biology*. 42(3): 179-185. DOI: 10.1080/13880200490514023
- Lane, M. M., Morrissey, J. P., (2010). *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*. 24: 17–26. DOI: 10.1016/j.fbr.2010.01.001
- Lee, J. Y., Hwang, W. I., Lim, S., (2004). Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. *Journal of Ethnopharmacology*. 93: 409-415. DOI: 10.1016/j.jep.2004.04.017
- Li, Y., Wei, G., Chen, J., (2004). Glutathione: a review on biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 66: 233-242. DOI: 10.1007/s00253-004-1751-y
- Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*. 613: 1-19. DOI: 10.1016/j.aca.2008.02.047
- Makky, E. A., Matar, M., Mahmood, M. H., Ting, O. W., Qi, W. Z., (2021). Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ethyl Acetate Extract of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol Biotechnol*. 59(2):127-136. DOI: 10.17113/ftb.59.02.21.6658
- Manzoor, A., Sowriappan, J., Shabir, A., (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science Journal*. 98(1): 21-33. DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.03.020
- Matthew, S., Abraham, T. E., (2006). Studies on the antioxidant activities of *Cinnamon (Cinnamomum verum)* bark extracts, through various *in vitro* models. *Food Chemistry*. 94: 520-528. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.11.043
- Mejía-Barajas, J. A., Montoya-Pérez, R., Salgado-Garciglia, R., Aguilera-Aguirre, L., Costes-Rojo, C., Mejía-Zepeda, R., Arellano-Plaza, M., Saavedra-Molina, A., (2017). Oxidative stress and antioxidant response in a thermotolerant yeast. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48(2): 326–332. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.11.005
- Mex-Álvarez, R. M. J., Bolívar-Fernández, N. J., Garma-Quen, P. M., Tut-Heredia, J. A., Romero-Guillén, K. I., (2013). Actividad antioxidante de cinco variedades de maíz cultivadas en Campeche, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 12(6): 558–571.
- Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M. R. Aminlari, M. (2018). Production of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysates: Purification and molecular docking. *Journal of Food and Drug Analysis*. 26: 696–705. DOI: 10.1016/j.jfda.2017.07.008
- Molyneux, P., (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26(2): 211-219.
- Revillion, J. P. P., Brandelli, A., Ayub, M. A. Z. (2003). Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 46(1): 121-128.
- Saeed, N., Khan, M. R. Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12: 221-227. DOI:10.1186/1472-6882-12-221
- Sandoval-Nuñez, D., Romero-Gutiérrez, T., Gómez-Márquez, C., Gschaedler, A., Arellano-Plaza, M., Amaya-Delgado, L., (2023). Physiological and transcriptome analyses of *Kluyveromyces marxianus* reveal adaptive traits in stress response. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 107(4): 1421-1438. DOI: 10.1007/s00253-022-12354-7
- Singh, T., Singh, A. P., (2012). A review on natural products as wood protectant. *Wood Science and Technology*. 46: 851–870. DOI: 10.1007/s00226-011-0448-5
- Szydłowska-Czerniak, A., Tułodziecka, A., Szłyk, E., (2012). A silver nanoparticle-based method for determination of antioxidant capacity of rapeseed and its products. *Analyst*. 21(16): 3750-3759. DOI: 10.1039/C2AN35326A
- Takaloo, Z., Nikkhab, M., Nemati, R., Jalilian, N., Sajedi, R. H., (2020). Autolysis, plasmolysis and enzymatic hydrolysis of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): a comparative study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 68-75. DOI: 10.1007/s11274-020-02840-3
- Takaloo, Z., Nemati, R., Kazemi, M., Ghafari, H., Sajedi, R. H., (2022). Acceleration of Yeast Autolysis by Addition of Fatty Acids, Ethanol and Alkaline Protease. *Iran Journal of Biotechnology*. 1;20(3):54-65. DOI: 10.30498/ijb.2022.282895.3036.
- Tangüler, H., Hüseyin, E., (2008). Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperatura. *Food and Bioproducts Processing*. 86: 317-132. DOI: 10.1016/j.fbp.2007.10.015
- Vieira, E. F., Carvalho, J., Pinto, E., Cunha, S., Almeida, A. A., Ferreira, I., (2016). Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer's spent yeast extract. *Journal of Food Composition and Analysis*. 52: 44-51. DOI: 10.1016/j.jfca.2016.07.006
- Wettasinghe, M., Shahidi, F., (2000). Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chem.*, 70:17–26. DOI: 10.1016/S0308-8146(99)00269-1
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R. Turner, N. D., (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition*. 134(3):489-492. DOI: 10.1093/jn/134.3.489.
- Yiran, W., Tonghu, X., Zhigen, Z. Xianshe, F., (2021). Extraction and concentration of glutathione from yeast by membranes. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 100: 1-10. DOI: 10.1002/cjce.24084
- Złotek, U., Lewicki, S., Markiewicz, A., Szymanowska, U., Jakubczyk, A., (2021). Effects of Drying Methods on Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anticancer Potentials of Phenolic Acids in Lovage Elicited by Jasmonic Acid and Yeast Extract. *Antioxidants*. 10: 662-680. DOI: 10.3390/antiox10050662