

“Caracterización Molecular de Levaduras Industriales de *Saccharomyces cerevisiae*”

Héctor Jonathan Salazar Morales (1), Claudia Erika Morales Hernández (2), Juan Carlos Torres Guzmán (3)

¹ Bachillerato general, Escuela de Nivel Medio Superior de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: hsalazar759@gmail.com

² Colegio de Nivel Medio Superior de la Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: ce.moraleshernandez@ugto.mx

³ Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: torguz@ugto.mx

Resumen

El proyecto tiene como objetivo la obtención de la huella genética de cinco cepas comerciales de levaduras que se emplean en la elaboración de Tequila. La huella genética se realizó mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), para lo cual se extrajo el DNA genómico y se amplificaron las regiones intergénicas, regiones Interdelta y genes específicos. Los resultados del trabajaron mostraron que en todos los casos se trata de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y se obtuvo la huella genética de las 5 cepas comerciales.

Abstract

The principal objective of the present project is to obtain the DNA fingerprint of five strains isolated from commercial yeast employed in the Tequila elaboration. The DNA fingerprint was developed by PCR (Polymerase Chain Reaction), the first step was the genomic DNA extraction followed with the amplification of the intergenic regions, delta regions and amplification of specific genes. The results showed that in all of the five samples, the yeast identified was *Saccharomyces cerevisiae*, and the DNA fingerprint was obtained from each strain.

Palabras Clave

Huella genética, PCR, DNA, Oligonucleótidos, *Saccharomyces*.

INTRODUCCIÓN

El Tequila

El tequila es la bebida alcohólica destilada mas importante en México, y se define según la Norma Oficial Mexicana como una "Bebida alcohólica regional obtenida por destilación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído en las instalación de la fabrica de un productor autorizado, la cual debe estar ubicada en el territorio comprendido en la declaración; dicho material debe ser derivado de las cabezas de *Agave tequilana* Weber var. Azul, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptibles los mostos de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azucares hasta en una proporción no mayor de 49% de azucares reductores totales expresados en unidades de masa; en los términos establecidos por esta NOM y en la inteligencia que no están permitidas las mezclas en frio. El Tequila es un liquido que, de acuerdo a su clase, es incoloro o coloreado cuando es madurado o cuando es abocado sin madurarlo" (NOM-006-SCFI-2005-2006) [1]. La etapa más importante durante la elaboración del tequila es la fermentación, donde los azúcares presentes en el mosto (glucosa y fructosa) son convertidos en etanol y CO₂, además de otros compuestos que son producidos en cantidades menores pero que son muy importantes en las características organolépticas del producto final. Para la elaboración del tequila se emplean distintos tipos de levaduras, dependiendo de la compañía Tequilera, algunas de ellas emplean aislados comerciales, mientras que las mas tradicionales permiten que el mosto se fermente de manera espontánea, con lo que las eficiencias fermentativas tienden a ser muy bajas [2]. A pesar de la gran importancia que tiene la industria del Tequila para las finanzas del país, ya que una parte importante de la producción se exporta a diferentes países, incluido China, no existen suficientes estudios de caracterización molecular de cepas de levaduras que permitan diferenciar e

identificar las cepas de levaduras más eficientes en la conversión del azúcar a etanol.

Usando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se puede identificar y diferenciar entre distintas especies de levaduras mediante la búsqueda y amplificación de distintos elementos génicos [3].

Por lo que en este proyecto se realizó la tipificación molecular de cepas de levaduras que se emplean en la fabricación de tequila.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas

Se utilizaron distintas cepas comerciales, cada una para diferente aplicación fermentativa como tequila, vino y pan. Las levaduras utilizadas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Cepas utilizadas

Cepas utilizadas	Tipo de levadura
1. W-0992	Tequilera
2. YEG1	Panadera
3. Lallemand Degollado	Tequilera
4. Fermol Blanc	Vitivinicola
5. TeqSilver	Tequilera

Medios y condiciones de crecimiento para *S. cerevisiae*

Las levaduras fueron crecidas para su mantenimiento en medio YPD, el cual contiene por litro: 20 g de dextrosa (BIOXON), 20 g de peptona de caseína (BIOXON), 10 g de extracto de levadura (BIOXON) y 20 g de agar bacteriológico (BIOXON) en el caso del medio solido. La incubación se realizó por 48 horas a 28°C.

Extracción de DNA genómico

La extracción del DNA genómico de las cepas empleadas se realizó empleando el equipo TyssueLyser II (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Huella genética

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Applied Biosystems modelo 9700, y las mezclas de reacción consistieron de: 12.5 μ L de la polimerasa JumpStart™ Taq ReadyMix™, 1 μ L del cada oligonucleótido (1 μ g/ μ L), 1 μ L de DNA genómico (10 ng/ μ L) de cada cepa de levadura y 10 μ L de agua HPLC.

Los oligonucleótidos utilizados para las PCR se muestran en la Tabla 2.

Los amplicones fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%, usando SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) para la visualización del DNA, las imágenes se capturaron en el equipo Chemi-Doc (Bio-Rad).

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de amplificación

Reacción de amplificación	Oligonucleótidos
ITS	ITS 1, ITS 2
Regiones interdelta	Delta 1, Delta 2
Regiones interdelta	Delta 12, Delta 21
Regiones interdelta	Delta 2, Delta 12
Gen MET2	MET2 Fw, MET2 Rev
Especies específicas	SB1, SB2
Especies específicas	SC1, SC2
Especies específicas	YB1F, YB2R
Especies específicas	SPEOPT18SBAY-F2, SPEOPT18SBAY-R2
Tubulina	Btub3, Btub4r
Microsatélites	GTG5, M13-B

Cortes en el gen MET2 con las enzimas de restricción PstI y EcoRI

Se realizó la restricción del amplicón del gen MET2 con las enzimas de restricción EcoRI y PstI en un volumen de reacción final de 20 μ L, empleando las enzimas de la compañía New England Biolabs, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las restricciones se realizaron durante 2 horas a 37°C y se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 5 aislados comerciales de levaduras empleadas en la producción de tequila, 3 comercializadas como tequileras (W-0992), Lallemand, TeqSilver, una cepa panadera (YEG1) y una cepa empleada en la producción de vino (Fermol Blanc). Se les extrajo el DNA genómico y se procedió a la realización de su huella genética. En primer lugar se realizó la amplificación de las regiones intergénicas ITS. Como se puede observar en la Figura 1, se obtuvo un amplicón de 880 pb, específico para *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que en todos los caso la levadura presente en los aislados comerciales es *S. cerevisiae*.



Figura 1. Amplificación de regiones ITS. Carril 1 BY, carril 2 W-0992 1, carril 3 W-0992 2, carril 4 YEG1 1, carril 5 YEG1 2, carril 6 L. Degollado 1, carril 7 L. Degollado 2, carril 8 Fermol Blanc 1, carril 9 Fermol Blanc 2, carril 10 TeqSilver 1, carril 11 TeqSilver 2.

Posteriormente se realizó la amplificación de un fragmento del gen MET2. En la Figura 2 se muestra la amplificación del gen MET2 con un tamaño de 580 pb, este amplicón fue tratado con la enzima de restricción PstI para la cual no hay un

sitio de corte si se tratase de la levadura *S. cerevisiae*, y como se observa en la Figura 3, no hubo corte. Posteriormente se cortó el amplicón con *EcoRI* (Figura 4) obteniendo dos fragmentos, uno de 369 pb y el otro de 211 pb. El sitio de corte para esta enzima de restricción en el gen *MET2* es específico para *S. cerevisiae*.



Figura 2. Amplificación del gen *MET2*. Carril 1 BY, carril 2 W-0992 1, carril 3 W-0992 2, carril 4 YEG1 1, carril 5 YEG1 2, carril 6 L. Degollado 1, carril 7 L. Degollado 2, carril 8 Fermol Blanc 1, carril 9 Fermol Blanc 2, carril 10 TeqSilver 1, carril 11 TeqSilver 2.

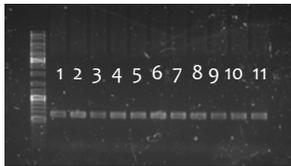


Figura 3. Corte del gen *MET2* con *PstI*. Carril 1 BY, carril 2 W-0992 1, carril 3 W-0992 2, carril 4 YEG1 1, carril 5 YEG1 2, carril 6 L. Degollado 1, carril 7 L. Degollado 2, carril 8 Fermol Blanc 1, carril 9 Fermol Blanc 2, carril 10 TeqSilver 1, carril 11 TeqSilver 2.

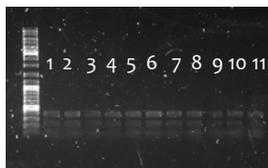


Figura 4. Corte del gen *MET2* con *EcoRI*. Carril 1 BY, carril 2 W-0992 1, carril 3 W-0992 2, carril 4 YEG1 1, carril 5 YEG1 2, carril 6 L. Degollado 1, carril 7 L. Degollado 2, carril 8 Fermol Blanc 1, carril 9 Fermol Blanc 2, carril 10 TeqSilver 1, carril 11 TeqSilver 2.

Las regiones Delta, utilizando los oligonucleótidos Delta 1 y Delta 2, dieron como resultado de 1 a 3 amplicones con tamaños entre 300 pb y 500 pb, fragmentos fueran de este rango son amplificaciones inespecíficas (Figura 5). Las combinaciones de los oligonucleótidos Delta 12-

Delta 21 (Figura 6) y Delta 2-Delta12 (Figura7) muestran un patrón específico para cada una de las 5 cepas.

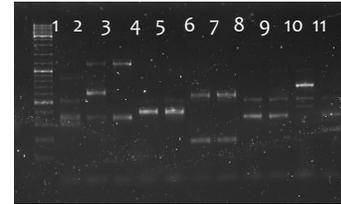


Figura 5. Amplificación de las regiones Delta 1 y Delta 2. Carril 1 BY, carril 2 W-0992 1, carril 3 W-0992 2, carril 4 YEG1 1, carril 5 YEG1 2, carril 6 L. Degollado 1, carril 7 L. Degollado 2, carril 8 Fermol Blanc 1, carril 9 Fermol Blanc 2, carril 10 TeqSilver 1, carril 11 TeqSilver 2.



Figura 6. Amplificación de las regiones Delta 2 y Delta 12. Carril 1 BY, carril 2 W-0992 1, carril 3 W-0992 2, carril 4 YEG1 1, carril 5 YEG1 2, carril 6 L. Degollado 1, carril 7 L. Degollado 2, carril 8 Fermol Blanc 1, carril 9 Fermol Blanc 2, carril 10 TeqSilver 1, carril 11 TeqSilver 2.



Figura 7. Amplificación de las regiones Delta 12 y Delta 21. Carril 1 BY, carril 2 W-0992 1, carril 3 W-0992 2, carril 4 YEG1 1, carril 5 YEG1 2, carril 6 L. Degollado 1, carril 7 L. Degollado 2, carril 8 Fermol Blanc 1, carril 9 Fermol Blanc 2, carril 10 TeqSilver 1, carril 11 TeqSilver 2.

La amplificación de microsatélites mostró un patrón similar entre las 5 cepas, con fragmentos de 1000 pb y 630 pb características (Fig. 8).

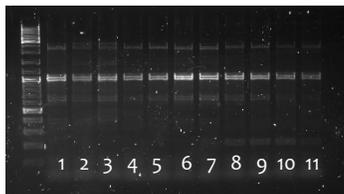


Figura 8. Amplificación de microsatélites. Carril 1 BY, carril 2 W-0992 1, carril 3 W-0992 2, carril 4 YEG1 1, carril 5 YEG1 2, carril 6 L. Degollado 1, carril 7 L. Degollado 2, carril 8 Fermol Blanc 1, carril 9 Fermol Blanc 2, carril 10 TeqSilver 1, carril 11 TeqSilver 2.

En la amplificación de las secuencias especies específicas se utilizaron cuatro pares de oligonucleótidos: para el par SB1 y SB2 que permite identificar a la levadura *S. bayanus*, no se obtuvo amplificación (amplicón de pb 1170 en caso de haber amplificación). Al usar los oligonucleótidos SC1 y SC2 (Figura 9) específicos para identificar a *S. cerevisiae* se obtuvo un amplicón de 1170 pb.

Con el par de oligonucleótidos YB1F y YB2R específicos para *S. bayanus* no se obtuvo amplificación (amplicón de 329 pb en caso de haber amplificación).

Con el par de oligonucleótidos Btub3 y Btub4r se amplificó el gen β -tubulina de 900 pb. (Figura 10)



Figura 9. Amplificación específica SC1 y SC2. Carril 1 BY, carril 2 W-0992 1, carril 3 W-0992 2, carril 4 YEG1 1, carril 5 YEG1 2, carril 6 L. Degollado 1, carril 7 L. Degollado 2, carril 8 Fermol Blanc 1, carril 9 Fermol Blanc 2, carril 10 TeqSilver 1, carril 11 TeqSilver 2.

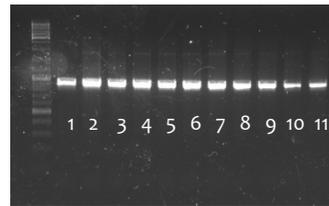


Figura 10. Amplificación del gen β tub. Carril 1 BY, carril 2 W-0992 1, carril 3 W-0992 2, carril 4 YEG1 1, carril 5 YEG1 2, carril 6 L. Degollado 1, carril 7 L. Degollado 2, carril 8 Fermol Blanc 1, carril 9 Fermol Blanc 2, carril 10 TeqSilver 1, carril 11 TeqSilver 2.

CONCLUSIONES

Se obtuvo la huella genética de las 5 cepas de levaduras comerciales, y se determinó que todas ellas como *Saccharomyces cerevisiae*.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Carlos Torres Guzmán, por recibirme con gusto y darme un lugar y las herramientas en su laboratorio de investigación, haberme dado la oportunidad de participar en este gran proyecto y darme seguimiento a lo largo de mi trabajo. A la Q.F.B. Adriana García Tapia, quien estuvo ayudándome a lo largo de mi verano en todo el trabajo, con mucha paciencia siendo mi guía e instructora para saber controlar aparatos, manejar las herramientas y tener los conocimientos para realizar mi proyecto. A la Dra. Claudia Erika Morales Hernández, madre y asesora de mi verano, que me inspira y me motiva en todos mis logros, a seguir en estos veranos y desde pequeño me inculco el amor por la ciencia. A los demás compañeros de laboratorio que me recibieron de buena manera y me apoyaron para acoplarme en el lugar de trabajo, dándome consejos y una vista de cómo es trabajar en un laboratorio.

El presente proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) proyectos: 388394 and 220780. Universidad de Guanajuato proyectos: 415/2014, 641/2015, 511/2015 y Apoyo Institucional para fortalecer la excelencia académica 2014, convenio 005/2014

REFERENCIAS

- [1] Recuperado de:
http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=2105899&fecha=06/01/2006
- [2] Padilla Ballesteros, María Fernanda (2011). Análisis del transcriptoma de la cepa AR5 de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación alcohólica en jugo de *Agave tequilana* Weber var. Azul. Tesis de Maestría. Universidad de Guanajuato. pp. 2-3.
- [3] Hoff, Justin Wallace (March 2012). Molecular Typing of Wine Yeasts: Evaluation of Typing Techniques and Establishment of a database. Stellenbosch University, pp. 1-87.