

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Saccharomyces Cerevisiae* EMPLEADAS EN LA PRODUCCIÓN DE VINO

Sánchez Arias Cindy Zuleyka (1), Torres Guzmán Juan Carlos (2)

1 [Licenciatura en Biología experimental] | [cindy.com.mx1@gmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [torguz@ugto.mx]

Resumen

El objetivo de este proyecto es la caracterización molecular de dos cepas de levaduras utilizadas comúnmente en la producción industrial de vino. La tipificación molecular se realizó mediante la técnica de PCR. Se amplificaron regiones ITS, interdelta y genes específicos como β -tubulina SB y SC. Los amplicones fueron separados mediante electroforesis horizontal de agarosa. Se obtuvo como resultado la huella genética dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

The objective of this Project was the isolation and molecular characterization of yeast used in the wine maker production. The molecular typification was realized through the PCR technique (polymerase Chain Reaction) after DNA extraction, ITS and Interdelta regions, and specific genes such as β -tubulin and SC were amplified. The amplicons were separated through horizontal electrophoresis on agarose, resulting in the genetic fingerprinting of two *Saccharomyces cerevisiae* strains.

Palabras clave

Levadura; PCR (polymerase chain reaction); tipificación; huella genética.
Saccharomyces cerevisiae.

INTRODUCCIÓN

Levaduras

Las levaduras son microorganismos unicelulares que son clasificados dentro del reino de los hongos y que viven con nosotros todo el tiempo en el ambiente.

Existe una gran diversidad de levaduras utilizadas por el hombre, esta diversidad se ve reflejada en la amplia variedad de productos que utilizan levaduras en alguno de sus procesos como el queso, el pan, la cerveza, el vino, etc.

Hoy en día, para la producción de vino se utilizan lotes de levaduras de un solo tipo, no solo para poder controlar mejor el proceso de fermentación, sino para poder obtener el tipo y las características de vino deseadas como aroma y textura uniformes en todas sus producciones [1].

Saccharomyces cerevisiae es la levadura mayoritariamente empleada para la producción de vino. Sin embargo, los distintos aislados de esta levadura proporcionan a los diferentes vinos, características de aroma y sabor únicas, por lo que es de suma importancia su identificación a nivel molecular.

Huella genética

El objetivo de este trabajo es la tipificación de dos cepas de levaduras empleadas en la industria de producción de vino. La caracterización se realizó mediante la técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), esta técnica se caracteriza por su rapidez, sensibilidad y reproducibilidad. Usando la técnica de PCR se puede identificar y diferenciar entre distintas cepas de la levadura *S. cerevisiae* mediante la amplificación de distintos elementos génicos:

- *Internal Transcribed Spacers (ITS)*

Son secuencias altamente variables de ADN ribosomal, las cuales pueden ser amplificadas con la técnica de PCR (polymerase chain reaction) para la identificación de géneros y especies de hongos [2] En las amplificaciones con *Saccharomyces*

cerevisiae se esperan fragmentos de tamaño de 880 pb; sin embargo, éstos pueden variar en su secuencia para ayudarnos a distinguir entre cepas.

- *Regiones interdelta (delta 1-2, deltas 2-12 y deltas 12-21)*

Las secuencias interdelta son elementos que flanquean los retrotransposones TY1 y TY2 en levaduras. Aproximadamente 300 elementos Deltas se han descrito en el genoma de la cepa de laboratorio S288C. El número y la localización de estos elementos poseen una cierta variabilidad intraespecífica que fue aprovechada para desarrollar iniciadores específicos ($\delta 1$, $\delta 2$, $\delta 12$, $\delta 21$) útiles para diferenciar entre cepas de *S. cerevisiae* [3][4].

- *Gen β -tubulina*

La β -tubulina es una proteína abundante en las células eucariotas y es el principal constituyente de los microtúbulos. Se ha reportado que el gen que codifica para la β -tubulina es un marcador ideal para el análisis a profundidad de las filogenias y para grupos de especies complejas [5].

- *Amplificación de regiones especie-específicas Sc y Sb*

Se han diseñado oligonucleótidos específicos que amplifican regiones del genoma del género *Saccharomyces* que no están muy conservadas, por lo tanto, pueden utilizarse para distinguir entre especies. Solamente *S. cerevisiae* amplifica una secuencia de 1170 pb con el par de oligos Sc1- sc2 y solo *S. bayanus (Sb)* o *S. pastorianus (Sb)* amplifican bandas de amplifica una secuencia de 1170 pb con el par de oligos Sb1-Sb2 [6], por lo tanto, con estos oligonucleótidos se puede distinguir entre *S. bayanus*, *S. patorianus* u *S. cerevisiae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de levadura

Se utilizaron tres cepas de levadura, dos levaduras empleada para la producción de vino de la casa

comercial Red Star: Côte des Blancs, empleada para la producción de vinos, con características aromáticas frutales. Premier Rouge, empleada para la producción de vinos tintos. La cepa de laboratorio BY4741 (MAT his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0)

Para poder reproducir las células problema se pesaron 100 mg de levadura liofilizada y se realizaron diluciones seriadas en agua destilada estéril 1:10 con volumen final de 1ml por 5 veces, para sembrar en cajas con YPD sólido (1% extracto de levadura, 3% peptona, 2% dextrosa, 2% agar) durante 48 horas, a una temperatura de 28°C. De cada cepa, se observó la formación de colonias y al microscopio para la morfología celular. A partir de una colonia aislada se realizaron los cultivos posteriores.

Extracción de ADN

Las cepas se cultivaron en medio sólido YPD y fueron incubadas a 28°C por 48 horas. Para la extracción del DNA las cepas se crecieron en medio YPD líquido durante 18 h y la extracción de DNA genómico de las cepas se realizó mediante técnicas convencionales empleando el Tissue Lyser II de Qiagen.

La calidad del DNA se verificó mediante electroforesis horizontal.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Applied Biosystems modelo 9700. Las reacciones se realizaron en tubos de Eppendorf de PCR conteniendo: 1 µl de cada oligonucleótido (1 µg/µL), 1 µl del DNA genómico de cada cepa de *S. cerevisiae* (100 ng/µL), 9.5 µl de agua HPLC y 12.5 µl de la polimerasa JumpStart™ Taq ReadyMix™ SIGMA.

Geles de electroforesis: Los amplicones fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%, utilizando SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) para la identificación del DNA. Las imágenes fueron capturadas en el equipo Chemi-Doc (Bio-Rad).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se emplearon dos cepas de levaduras: Côte des Blancs (CdB) y Premier Rouge

(PR), empleadas a nivel industrial para la fabricación de vinos, y como control la cepa de laboratorio BY4741 de *S. cerevisiae*. Como un primer paso las cepas se crecieron en medio líquido y sólido para determinar la morfología colonias y celular. La Figura 1 muestra la morfología celular de las tres cepas, donde se observan células con características parecidas a *S. cerevisiae*.

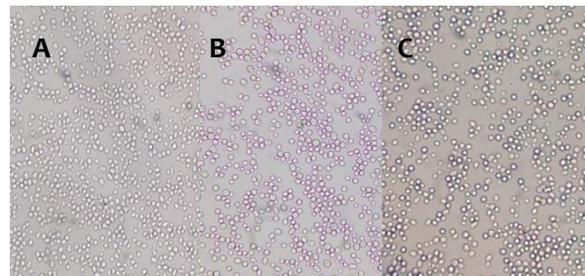


Figura 1. Morfología. Se observan las fotos de las observaciones al microscopio óptico a 40x de: A) *S. cerevisiae* BY4741, B) Côte des Blancs y c) Premier Rouge.

Amplificación de ITS

Para confirmar si las muestras corresponden a *S. cerevisiae* se amplificó la región ITS, como se puede observar en la Figura 2, en los dos casos (Côte des Blancs y Premier Rouge) se obtiene un amplicón de un tamaño de 880 pb que corresponde al tamaño esperado para el género y especie *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo tanto, ambas muestras sugieren que corresponden al mismo género y especie.

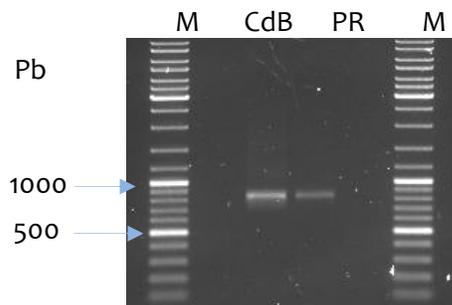


Figura 2. Amplificación de ITS. M, marcador de tamaño. CdB, región ITS de la cepa Côte des Blancs; PR, región ITS de la cepa Premier Rouge.

Amplificación del gen β -tubulina

Empleando los oligonucleótidos Btub3 y Btub4 se obtuvo un amplicón de aprox. 900pb en las tres muestras, las cuales concuerdan con el tamaño esperado para *S. cerevisiae* (figura 3)

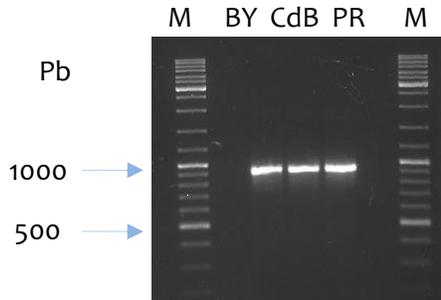


Figura 3. Amplificación de gen beta tubulina. M, marcador de tamaño. Gen β -tub de de la cepa *S. cerevisiae* BY4741 (BY), amplificación de la cepa Côte des Blancs (CdB); amplificación de la cepa Premier rouge (PR).

Amplificaciones de regiones especie-específicas (Sc y Sb)

Para diferenciar entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, se emplearon en las reacciones de amplificación los pares de oligonucleótidos Sc1 y Sc2, para *S. cerevisiae* y Sb1 y Sb2 para *S. bayanus*. Como podemos observar en la Figura 4, existe una amplificación de un tamaño aproximado de 1170pb con los oligonucleótidos Sc; mientras que no existe amplificación con los oligonucleótidos Sb. Por lo tanto, ambas cepas pertenecen a la especie *cerevisiae*.

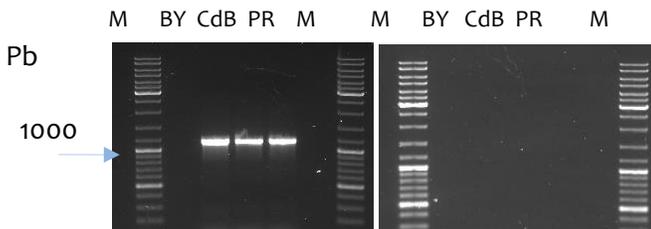


Figura 4. Amplificación de Sc (figura izquierda). M, marcador de tamaño. Amplificación de BY de la cepa *S. cerevisiae* BY4741, amplificación de la cepa Côte des Blancs (CdB) y Amplificación de Premier rouge (PR). Amplificación de SB (figura derecha).

Amplificación de regiones interdelta

Empleando los oligonucleótidos Delta 1 y Delta 2, se observan en la cepa control BY4741, tres bandas de amplificación de 300, 350 y 550pb aproximadamente. En la cepa CdB se observan tres bandas de tamaños de 300, 400 y 2000pb, mientras que en PR se observan claramente dos bandas de amplificación de 400 y 550pb (Figura 5). Empleando la combinación de oligonucleótidos 2 – 12, se observa en la cepa BY4741 tres bandas de amplificación de 150, 400 y 450pb, en la cepa CdB no se observa amplificación y en la cepa PR se observan dos bandas de 400 y 550pb (Figura 6). Con la combinación 12 – 21 se observa en la cepa control BY4741, dos bandas de amplificación de 250 y 600pb aproximadamente, en cepa CdB se observan tres bandas de tamaños de 300, 400 y 2000pb, mientras que en PR se observan bandas de tamaño de 200 y 500pb, mientras que en PR se observan bandas de tamaño de 200, 450 y 500pb (figura 7). Estos resultados nos confirman que las cepas CdB y PR son dos cepas diferentes de *S. cerevisiae*.

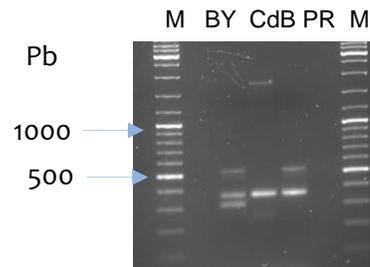


Figura 5. Amplificaciones a partir de ADN genómico con oligonucleótidos de deltas 1-2. marcador de tamaño (M). Amplificación de la cepa *S. cerevisiae* BY4741(BY), amplificación de la cepa Côte des Blancs (CdB); amplificación de la cepa Premier rouge (PR).

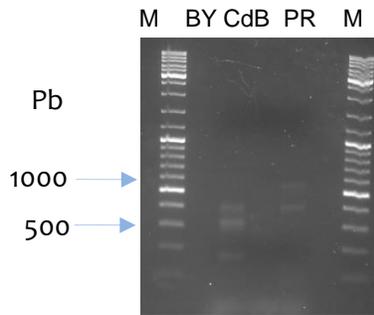


Figura 6. Amplificaciones a partir de ADN genómico con oligonucleótidos de deltas 2-12. M, marcador de tamaño. Amplificación de la cepa *S. cerevisiae* BY4741 (BY), Amplificación de la cepa Côte des Blancs (CdB); amplificación de la cepa Premier rouge (PR),

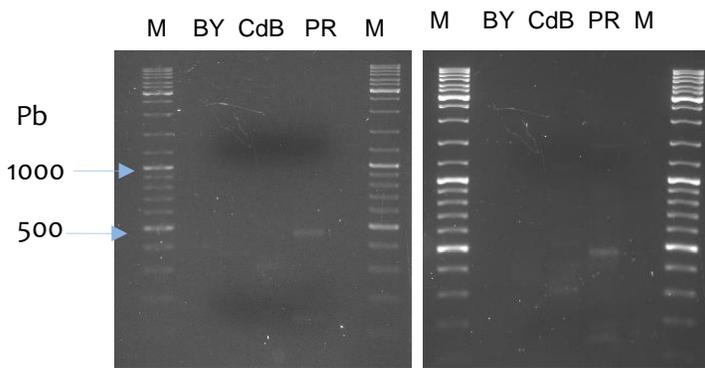


Figura 7. Amplificaciones a partir de ADN genómico con oligonucleótidos deltas 12-21. M, marcador de tamaño. Amplificación de la cepa *S. cerevisiae* BY4741 (BY), amplificación de la cepa Côte des Blancs (CdB); amplificación de la cepa Premier rouge (PR),

CONCLUSIONES

De acuerdo con el objetivo, se realizó el aislamiento y tipificación molecular de dos cepas de levaduras, Côte des Blancs y Premier Rouge, empleadas en la producción industrial de vino. Los resultados de la huella genética obtenida nos determinan que ambas cepas son *Sacharomyces* de la especie *cerevisiae* y son cepas diferentes. Es necesario continuar con la investigación para poder secuenciar los genes de la β -tubulina y los ITS para poder observar con detalle las variaciones entre estas cepas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres la oportunidad de estudiar mi carrera y agradezco también al doctor Juan Carlos Torres por la oportunidad de hacer esta investigación, así como a los integrantes del laboratorio de genética molecular de hongos que me ayudaron a realizar mis experimentos.

Se agradece a la Universidad de Guanajuato por el apoyo institucional para fortalecer la excelencia académica convenio 89/2016. De igual manera el apoyo financiero por parte de la Secretaría de Innovación Ciencia y Educación Superior (SICES) proyecto CFINN-000079.

REFERENCIAS

- [1] Swiegers JH *et al* (2007) Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast* 24: 561–574
- [2] Martin Kendall, Rygiewicz Paul (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC microbiology*. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1156903/>
- [3] Legras, Jean-Luc; Karst, Francis (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters* (221), 249-255.
- [4] Xufre Angela, Albergaria Helena.(2010) Use of interdelta polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains to monitor population evolution during wine fermentation. Recuperado el 17/07/2017 de: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10295-010-0837-z>
- [5] Ersä Eniax, Kerstin Voigt. (2003). Oligonucleotide primers of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. 21 de julio del 2017, de Organism, diversity and evolution Sitio web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1439609204700677>.
- [6] Josepa, Sabaté; Guillamon, José M; Cano, José (2000). PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *FEMS Microbiology Letters* (193), 255-259.