

Tipificación Molecular de Cepas Industriales de *Saccharomyces cerevisiae*

Fuentes Villanueva Karla ⁽¹⁾, Torres Guzmán Juan Carlos ⁽²⁾

1 [Lic. en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [k.fuentesvillanueva@gmail.com]

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

Resumen

El objetivo del proyecto fue la tipificación molecular de cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae*, esta tipificación se ha usado como herramienta para la diferenciación entre distintas especies como *S. cerevisiae* y *S. bayanus*. La tipificación se realizó mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), se amplificaron regiones intergénicas, regiones interdelta, genes específicos y se separaron los cromosomas de la levadura. Los amplicones fueron separados mediante electroforesis horizontal en agarosa y los cromosomas por electroforesis de campo pulsado. Así mismo se realizaron cinéticas de fermentación en jugo de *Agave tequilana Weber var. Azul* empleando las distintas cepas de levaduras, se tomaron muestras a diferentes tiempos y se cuantificó el crecimiento celular, consumo de azúcares y la producción de etanol. Se obtuvieron como resultados la tipificación molecular de ocho cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, así como la selección de la levadura con mejor capacidad fermentativa.

Abstract

The aim of this project was the molecular typification of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*; this typification has been used as tool for the differentiation between species such as *S. cerevisiae* and *S. bayanus*. The typification was realized through the PCR technique (Polymerase Chain Reaction), amplifying intergenic regions, Interdelta regions, specific genes and separating the chromosomes. The amplicons were separated through horizontal electrophoresis on agarose and the chromosomes were separated by pulsed-field gel electrophoresis. Also Fermentation kinetics were realized in *Agave tequilana Weber blue* variety juice using different yeast, getting samples at different times and determining the cellular growth, the consumption of sugars and the ethanol production. We obtained as results the molecular typification from eight strains of *Saccharomyces cerevisiae*, and the selection of the yeast with the best fermentative capacity.

Palabras Clave

Saccharomyces cerevisiae; PCR (Polymerase Chain Reaction – Reacción en Cadena de la Polimerasa); Fermentación alcohólica.

INTRODUCCIÓN

Tipificación molecular

- Técnicas moleculares

El objetivo de este trabajo fue la tipificación molecular de distintas cepas industriales de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, esta tipificación se usa como herramienta para la diferenciación entre distintas especies de *Saccharomyces* como *S. cerevisiae* y *S. bayanus*.

Tradicionalmente la tipificación de levaduras se basaba en las diferencias morfológicas y sus propiedades fisiológicas, pero estas características suelen ser influenciadas por condiciones ambientales, generando resultados imprecisos. Actualmente las técnicas de Biología Molecular son una alternativa para la tipificación de levadura y una importante herramienta en problemas industriales.

Usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se puede identificar y diferenciar entre distintas cepas de la levadura *S. cerevisiae* mediante la búsqueda de distintos elementos génicos:

ITS (Internal Transcribed Spacers)

El análisis de algunas secuencias de genes ribosomales muestra productos de amplificación diferentes. Las regiones ITS del rDNA contienen secuencias no codificantes variables, las cuales son útiles para distinguir géneros y especies de hongos [1].

Regiones interdelta (Delta 1, Delta 2, Delta 12 y Delta 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 y por ello se han considerado buenos candidatos para la identificación de polimorfismos [2].

Gen MET2

En estudios recientes el uso de PCR/RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del gen *MET2* fue propuesto para diferenciar entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus*. Para ello es necesario utilizar enzimas de restricción ya que en *S. bayanus* existe sitio de corte para la enzima *PstI* el cual no existe en *S. cerevisiae*, pero en esta especie existe sitio de corte para *EcoRI* [3].

Especies específicas

Consta de un set de cuatro pares de oligonucleótidos los cuales poseen potencial para diferenciar entre especies de *Saccharomyces*. Este potencial se basa en variaciones en la secuencia de nucleótidos en regiones específicas del genoma de las levaduras [4], [5], [6].

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 β -tubulina es un marcador ideal para el análisis a profundidad de las filogenias y para grupos de especies complejas [7].

Microsatélites

Microsatélites son secuencias cortas repetidas usualmente menores de 10 pb que muestran un nivel alto de polimorfismo en un gran número de genomas eucariotes, incluyendo levaduras, es por ello que son empleados como herramienta para la identificación de cepas de *S. cerevisiae*.

Fermentaciones

La fermentación alcohólica consiste en la transformación de azúcares (fructosa y glucosa) en etanol y dióxido de carbono, además de otros compuestos que son producidos en menores cantidades pero que son importantes en las características organolépticas del producto final (bebida alcohólica).

Éste es un proceso realizado por levaduras y algunas clases de bacterias. Estos microorganismos descarboxilan el piruvato obtenido de la glucólisis para formar acetaldehído el cual es reducido a etanol por la acción de NADH_2 [9].

El balance energético de la fermentación puede expresarse de la siguiente forma:

$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{ADP} + 2 \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{ATP} + 2 \text{H}_2\text{O}.$$

En este proyecto se realizó la tipificación molecular de ocho levaduras de la colección de uso industrial del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos (LGMH) y se identificó cuál de ellas es la que posee mejor capacidad fermentativa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas utilizadas para este trabajo se enlistan en la Tabla 1. Estas levaduras forman parte de la colección de levaduras del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato.

Todas las cepas fueron sembradas en medio YPD sólido e incubadas a 28 °C por 48 horas.

La extracción de DNA genómico de las cepas se realizó mediante técnicas convencionales empleando el Tissue Lyser II de Qiagen.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Applied Biosystems modelo 9700, y las mezclas de reacción consistieron de: 12.5 µL de la polimerasa JumpStart™ Taq ReadyMix™ (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100 mM KCl, 3mM MgCl₂, 0.002% gelatina, 0.4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, TTP), estabilizadores, 0.1 unidad/µL Taq DNA Polimerasa, JumpStart Taq anticuerpo. SIGMA), 1 µL del cada oligonucleótido (1 µg/µL), 1 µL de DNA genómico (10 ng/µL) de cada cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y 10 µL 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).

La extracción de los cromosomas se realizó con el kit de DNA Genómico CHEF (Bio-Rad) y los cromosomas se separaron por electroforesis de campo pulsado en un CHEF-DR III System (Bio-Rad).

Las fermentaciones se realizaron en jugo de *Agave tequilana weber* var. Azul a una concentración de 150 g/L de azúcares suplementado con una fuente de nitrógeno. Se incubaron a 33 °C sin agitación durante 48 horas, se tomaron muestras a las 0, 24, 36 y 48 horas. Se determinó el crecimiento celular mediante conteo en cámara de Neubauer, consumo de azúcares empleando el protocolo de DNS y producción de etanol mediante el analizador bioquímico 2300 STAT Plus™ de YSI.

Tabla 1: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa	Genotipo	Referencia
1. AR5	Cepa nativa aislada de mosto tequilero.	Dr. José de Jesús Ramírez Córdova. CIATEJ A.C.
2. LGMH01	Cepa mejorada proveniente de AR5, aisladas a partir de jugo de <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul.	Q. Iván Horacio Piña Torres. LGMH.
3. LGMH02	Cepa mejorada proveniente de AR5, aisladas a partir de jugo de <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul.	Q. Iván Horacio Piña Torres. LGMH.
4. A 1.4	Cepa nativa aislada de mosto tequilero.	LGMH.
5. A 3.6	Cepa nativa aislada de mosto tequilero.	LGMH.
6. A 4.12	Cepa nativa aislada de mosto tequilero.	LGMH.
7. Sz	Cepa nativa aislada de mosto tequilero.	LGMH.
8. YEG1	Cepa aislada de levadura comercial utilizada en panificación	NEVADA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La amplificación de ITS dieron como resultado un amplicón de 880 pb (Figura 1) que corresponde al tamaño esperado para el género y especie *Saccharomyces cerevisiae*.

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 2). Las combinaciones de los oligonucleótidos Delta 12-Delta 21 (Figura 3) y Delta 2-Delta12 (Figura 4) muestran un patrón específico para cada una de las 8 cepas.

En la Figura 5 se muestra la amplificación del gen MET2 con un tamaño de 580 pb, este amplicón fue tratado con la enzima de restricción *Pst*I para la cual no hay un sitio de corte si se tratase de la levadura *S. cerevisiae*, y como se observa en la Figura 6, no hubo corte. Posteriormente se cortó el amplicón con *Eco*RI (Figura 7) 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*.

En la amplificación de las secuencias especies específicas se utilizaron cuatro pares de oligonucleótidos: para el par SB1 y SB2 (Figura 8) 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 (Figura 10) específicos para *S. bayanus* no se obtuvo amplificación (amplicón de 329 pb en caso de haber amplificación). Obteniendo el mismo resultado para el par de oligonucleótidos SPEOPT18SBAY (Figura 11) los cuales son específicos para *S. bayanus* (amplicón de 799 pb en caso de haber amplificación).

Con el par de oligonucleótidos Btub3 y Btub4r se amplificó el gen β -tubulina de 900 pb (Figura 12).

La amplificación de microsatélites mostró un patrón similar entre las 8 cepas, con fragmentos de 1000 pb y 630 pb características (Figura 13).

En conjunto, estos amplicones comprueban la identidad de las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. Se obtuvieron los amplicones esperados para la identificación, siendo los ITS's del tamaño esperado para este género y especie, las amplificaciones con los pares de oligonucleótidos SC así como la amplificación del gen MET2 y su corte con *EcoRI* son específicas para *S. cerevisiae* y la ausencia de amplificación con los pares SB, SPEOPT18SBAY, YB y la amplificación del gen MET2 y su corte con *PstI* (todo lo anterior específico para *S. bayanus*), comprueba la identidad de las levaduras. Se obtuvieron patrones similares entre las 8 cepas de levaduras cuando se amplificaron las regiones interdelta 1 y 2 con 1-3 amplicones de 300-500 pb, así como con los microsatélites con amplicones de 1000 pb y 630 pb, y coinciden con los patrones electroforéticos reportados para *S. cerevisiae*. El gen de tubulina podría ser cortado con enzimas de restricción o secuenciado para observar las variaciones nucleotídicas entre especies.

En el gel obtenido de la extracción de cromosomas se pueden observar 13 fragmentos, correspondientes a los 16 cromosomas de *S. cerevisiae* (Figura 14). El protocolo para esta extracción sigue siendo modificado para encontrar

las condiciones óptimas para separar los cromosomas.

Las cepas LGMH01, A 3.6 y A 4.12 fueron las levaduras con mejor crecimiento en jugo de agave y mayor producción de etanol.

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

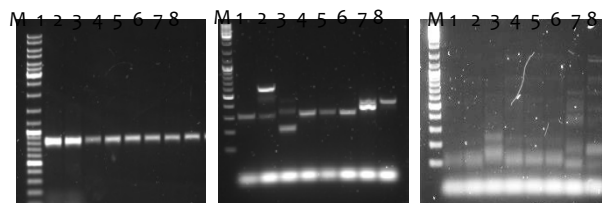


Figura 1. Amplificación de ITS (800 pb).
Figura 2. Amplificación Delta 1 y Delta 2 (1-3 bandas entre 300-500 pb).
Figura 3. Amplificación Delta 12 y Delta 21.

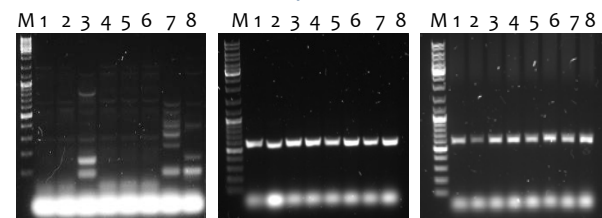


Figura 4. Amplificación Delta 2 y Delta 12.
Figura 5. Amplificación gen MET2 (580 pb).
Figura 6. Corte del gen MET2 con *PstI* (no hubo corte)

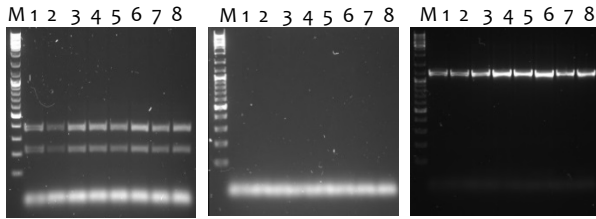


Figura 7. Corte del gen *MET2* con *EcoRI* (369 pb y 211 pb).

Figura 8. Amplificación de especies específicas SB1 y SB2 (no hubo amplificación).

Figura 9. Amplificación de especies específicas SC1 y SC2 (1170 pb).

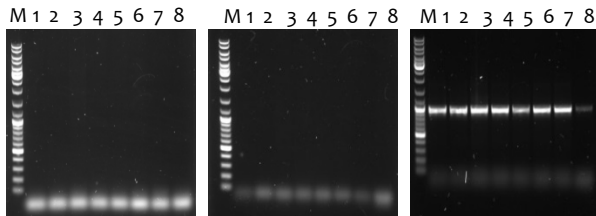


Figura 10. Amplificación con YB1F Y YB2R (no hubo amplificación).

Figura 11. Amplificación con SPEOPT18SBAY (no hubo amplificación).

Figura 12. Amplificación del gen β -tubulina (900 pb).

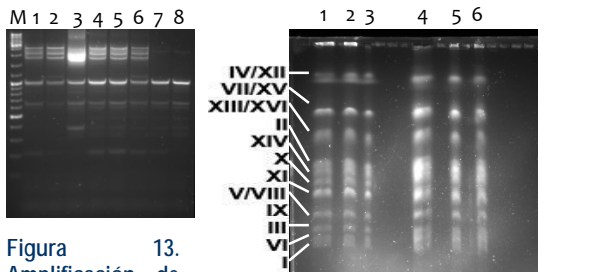


Figura 13. Amplificación de los microsatélites (600 pb y 100 pb).

Figura 14. Cromosomas de *S. cerevisiae*.

1-3:AR5, 4-6:LGMH01.

Figuras 1-13. Huella génica de distintas cepas de *S. cerevisiae*. M: Marcador de tamaño molecular, 1: AR5, 2: LGMH01, 3:LGMH02, 4: A 1.4, 5: A 3.6, 6: A 4.12, 7: Sz, 8: YEG1.

CONCLUSIONES

El objetivo planteado para este proyecto se cumplió ya que se tipificó molecularmente ocho levaduras de uso industrial de la colección del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos como *Saccharomyces cerevisiae*. Además se determinó que las cepas LGMH01, A 3.6 y A 4.12 presentan un mejor crecimiento en jugo de agave y una mayor producción de etanol.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al Dr. Juan Carlos Torres Guzmán, Dra. Gloria Angélica González Hernández y M. C. Naurú Idalia Vargas Maya por permitirme trabajar en el Laboratorio de Genética Molecular de Hongos y brindarme todo su apoyo y conocimientos.

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 excelencia académica 2014, convenio 005/2014.

REFERENCIAS

- [1] Arlorio, Marco; Coison, Jean Daniel; Martelli, Aldo (1999). Identification of *Saccharomyces cerevisiae* in bakery products by PCR amplification of the ITS region of ribosomal DNA. *Eur Food Res Technol* (209), 185-191.
- [2] Legras, Jean-Luc; Karst, Francis (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters* (221), 249-255.
- [3] Masneuf, Isabelle; Aigle, Michel; Dubourdiou, Denis (1996). Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. *FEMS Microbiology Letters* (138), 239-244.
- [4] 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.
- [5] Torriani, S; Zapparoli, G; Malacrinò, P; Suzzi, G; Dellaglio, F. (2004). Rapid identification and differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and their hybrids by multiplex PCR. *Letters in Applied Microbiology* (38), 239-244.
- [6] Chien-Hsun Huang, Fwu-Ling Lee, Chun-Ju Tai (2008). A novel specific DNA marker in *Saccharomyces bayanus* for species identification of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Microbiological Methods* (75), 531-534.
- [7] Chien-Hsun Huang, Fwu-Ling Lee, Chun-Ju Tai (2009). The β -tubulin gene as a molecular phylogenetic marker for classification and discrimination of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Antonie van Leeuwenhoek* (95), 135-142.
- [8] Ramirez-Castrillón, Mauricio; Camargo Mendes, Sandra Denise; Inostroza-Ponta, Mario (2014). (GTG)₅ MSP-PCR Fingerprinting as a Technique for Discrimination of Wine Associated Yeasts?. *PLOS ONE* (9), 1-8.
- [9] Vargas Maya, Naurú Idalia (2012). Obtención y caracterización de una cepa sobreexpresante del gen YLR177W de *Saccharomyces cerevisiae* y localización de los productos de los genes YNR034W-A, YGR146C y YLR177W. Universidad de Guanajuato, México.