

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EMPLEADAS EN LA PRODUCCIÓN DE TEQUILA

Ramírez López Nallely Jacqueline (1), Dr. Torres Guzmán Juan Carlos (2)

1 [Licenciatura en Ingeniería Química, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [najara_an@hotmail.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 es el aislamiento e identificación molecular de levaduras empleadas en la producción de Tequila. La tipificación molecular se realizó mediante la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), realizando con anterioridad la extracción de DNA de la levadura a identificar. Se amplificaron regiones interdelta, microsatélites y genes específicos como MET2, Tubulina y SC. Los amplicones fueron separados mediante electroforesis horizontal de agarosa. Se obtuvo como resultado la huella genética de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

The aim of this project is the isolation and molecular identification of yeasts used in tequila production. The molecular typification was realized through the PCR technique (polymerase Chain Reaction) after DNA extraction. Interdelta regions, Microsatélites and specific genes MET2, Tubulin and SC were amplified. The amplicons were separated though horizontal electrophoresis on agarose, resulting in the genetic fingerprinting of the *Saccharomyces cerevisiae* strain.

Palabras Clave

Aislamiento; PCR (Polymerase Chain Reaction – Reacción en cadena de la Polimerasa); Amplificación; Tipificación; Huella genética, *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras

Introducción

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). Este es un proceso realizado primordialmente por levaduras, que descarboxilan el piruvato obtenido de la glucólisis para formar acetaldehído, el cual es reducido a etanol por la acción del NADH₂. El género *Saccharomyces* es el principal responsable de la fermentación alcohólica. Sin embargo, existen distintas especies y cepas dentro de *Saccharomyces* que pueden influir en las características aromáticas del producto. Por lo que es de primordial importancia su tipificación.

Durante las últimas décadas las técnicas de biología molecular han permitido la caracterización y diferenciación de las poblaciones de levaduras disponibles comercialmente. Es por ello que en el presente proyecto se pretende la tipificación molecular de cepas de levaduras de uso industrial empleadas en la producción de Tequila. La caracterización se realizó mediante la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). La técnica de PCR 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 [1]:

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, entre ellos *Saccharomyces cerevisiae* [1].

Regiones interdelta (δ_1 , δ_2 , δ_{12} , δ_{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 cebadores específicos (δ_1 , δ_2 , δ_{12} , δ_{21}) útiles para diferenciar entre cepas de *S. cerevisiae* [2].

Microsatélites

Microsatélites son secuencias cortas repetidas usualmente menores de 10 pb, que se repiten en tándem un elevado número de veces. Su frecuencia y tipo de repetición varía en los genomas de distintas especies, incluyendo levaduras. Se trata de secuencias altamente variables. La variación se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus, por ello es que son empleados como herramienta para la identificación entre las distintas cepas de *S. cerevisiae* [1].

Gen *MET2*

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 un sitio de corte para la enzima *Pst*I el cual no existe en *S. cerevisiae*, pero en esta especie existe un sitio de corte para *Eco*RI [3].

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 de la β -tubulina es un marcador ideal para el análisis a profundidad de las filogenias y para grupos de especies complejas [4].

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas utilizadas para este trabajo se muestran 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.

Tabla 1: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|-----------|-------------------------------------|--|
| 1. BY4741 | MAT his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 | Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato. |
| 2. LGZ1 | Levadura Granular de Zinc | Levapan S.A. |
| 3. LGZ2 | Levadura Granular de Zinc | Levapan S.A. |

Tabla 2: Secuencia de los oligonucleótidos utilizadas para las reacciones de amplificación

| Oligonucleótidos | Secuencia |
|---------------------------------|--|
| Delta 1 | CAA AAT CAC CTA TAT CT |
| Delta 2 | GTG GAT TTT TAT TCC AAC |
| Delta 12 | TCA ACA ATG GAA TCC CAA C |
| Delta 21 | CAT CTT AAC ACC GTA TAT GA |
| Microsatélite GTG5 | GTG GTG GTG GTG GTG |
| Microsatélite M13-BACTERIOPHAGE | GAG GGT GGC GGT TCT |
| MET2 FORWARD | CGG CTC TAG ACG AAA ACG CTC CAA GAG CTG G |
| MET2 REVERSE | CGG CTC TAG AGA CCA CGA TAT GCA CCA GGC AG |
| Tubulina (btub3) | TGG GCY AAG GGT YAY TAY AC |
| Tubulina (btub4r) | GCC TCA GTR AAY TCC ATY TCR TCC AT |
| SC1 | AAC GGT GAG AGA TTT CTG TGC |
| SC2 | AGC TTG CAG TAT TCC CAC AG |

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 el 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.

Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR se enlistan en la Tabla 2.

Los amplicones fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2.5%, 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 estudio se emplearon dos levaduras de la compañía Levapan, S.A. y como control la cepa de laboratorio BY4741 de *S. cerevisiae*. Como primer paso para la realización de la huella genética se aisló el DNA genómica de las tres cepas. En la Figura 1 se puede observar la calidad DNA genómico obtenido. Para determinar si las muestras corresponden a *S. cerevisiae* se amplificó la región ITS, como se puede observar en la Figura 2, en los dos casos se obtiene un amplicon de un tamaño de 880 pb que corresponde al tamaño esperado para el género y especie *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo tanto, ambas muestras corresponden al mismo género y especie. Para determinar si se trata de la misma o diferente cepa se realizaron las siguientes reacciones de amplificación:

Regiones Interdelta

Utilizando los oligonucleótidos Delta 1 y Delta 2, en la cepa control BY4741 se observan amplicones en el rango entre 300 pb y 800 pb. En

las muestras LGZ1 y LGZ2 se muestran el mismo patrón de amplicones con tamaños entre 300 pb y 500 pb (Fig. 3). La combinación de los oligonucleótidos Delta 12-Delta 21, para la cepa control BY4741 dieron como resultado amplicones con tamaños entre 100 pb y 450 pb, las levaduras LGZ1 y LGZ2 muestran amplicones con tamaños entre 100 pb y 650 pb (Fig. 4). Las combinaciones de los oligonucleótidos Delta 2-Delta12 en la cepa control BY4741 se observan amplicones con tamaños entre 100 pb y 450 pb, en las levaduras LGZ1 y LGZ2 se observan amplicones con tamaños entre 100 pb y 650 pb (Fig. 5).

En la amplificación de Microsatélites en el caso de la cepa control BY4741 la amplificación se observa entre 400 pb y 2300 pb, mientras que en las cepas LGZ1 y LGZ2 se observan amplicones con tamaños entre 200 pb y 2300 pb (Fig. 6).

En la Fig. 7 se observa la amplificación de un fragmento del gen *MET2* con un tamaño de 600 pb. Este amplicon fue tratado con la enzima de restricción *Pst*I en la cual no existe un corte para la levadura *S. cerevisiae*, y si existe un sitio de reconocimiento para *S. bayanus*. Como se puede observar en la Figura 8, el fragmento no se digiere. Posteriormente el amplicon del gen *MET2* fue tratado con la enzima de restricción *Eco*RI en el cual, si existe un corte para la levadura *S. cerevisiae*, en tal corte se observan dos fragmentos de 200 pb y 400 pb (Fig. 9).

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

Al usar los oligonucleótidos SC1 y SC2 (Figura 11) específicos para identificar a *S. cerevisiae* se obtuvo un amplicon de 1170 pb.

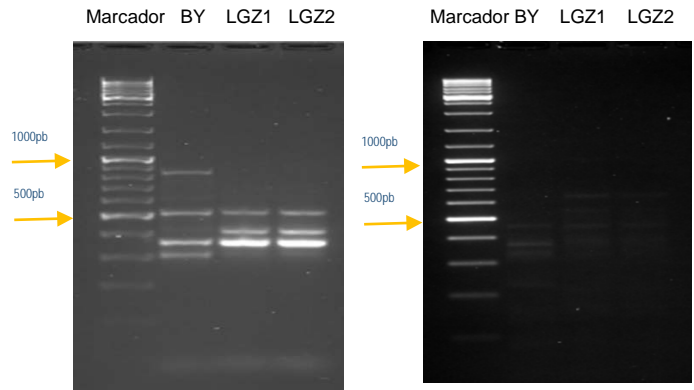


Figura 3: Amplificación a partir de DNA genómico con oligonucleótidos Delta 1 y 2.

Figura 4: Amplificación a partir de DNA genómico con oligonucleótidos Delta 12 y Delta 21.

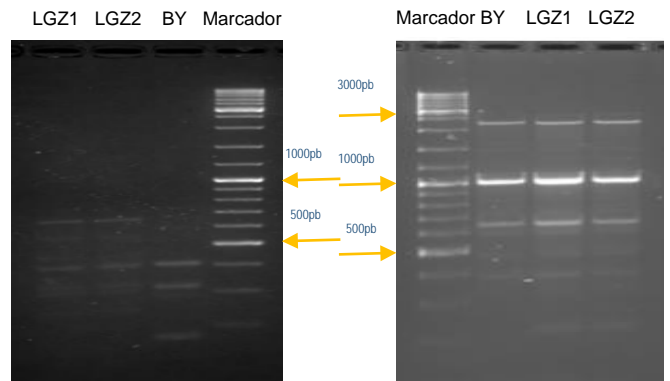


Figura 5: Amplificación a partir de DNA genómico con oligonucleótidos Delta 2 y Delta 12.

Figura 6: Amplificación a partir de DNA genómico con microsatélites.

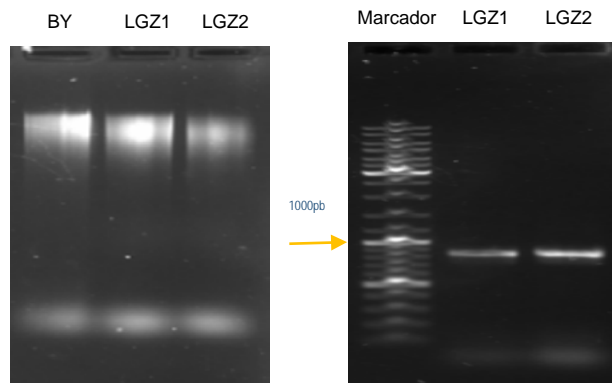


Figura 1: Calidad de DNA genómico de las tres cepas aisladas.

Figura 2: Amplificación de ITS a partir de DNA genómico (880 pb).

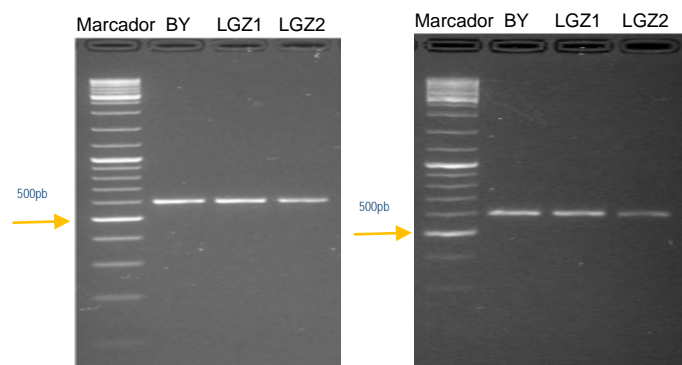


Figura 7: Amplificación gen *MET2* a partir de DNA genómico (600 pb).

Figura 8: Corte del gen *MET2* CON *Pst*I (No hubo corte).



Figura 9: Corte del gen MET2 con *EcoRI*.

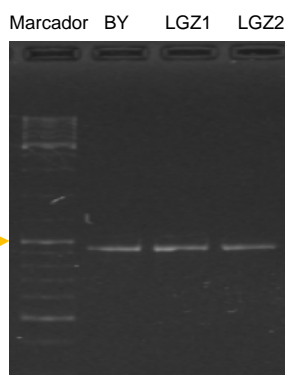


Figura 10: Amplificación del gen β -Tubulina a partir de DNA genómico (900 pb).

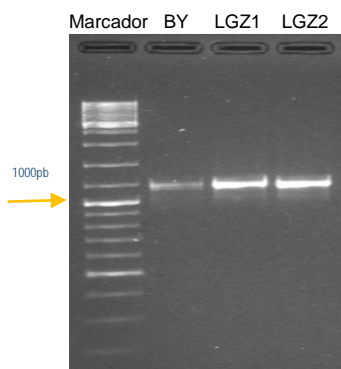


Figura 11: Amplificación a partir del DNA genómico con oligonucleótidos SC1 y SC2 (1170 pb).

CONCLUSIONES

Con los datos de amplificación de los ITS de un tamaño de 880 pb, la amplificación y la presencia de un sitio de corte para la enzima *EcoRI* en el amplicon del fragmento del gen MET2, la amplificación con los oligonucleótidos específicos SC1 y SC2, podemos concluir que las levaduras LGZ1 y LGZ2 corresponden a *Saccharomyces cerevisiae*. Con el análisis de la amplificación de las regiones interdelta y los microsatélites nos llevan a concluir que ambos aislados, LGZ1 y LGZ2, corresponden a la misma cepa de *S. cerevisiae*. La posterior secuenciación de los fragmentos de los ITS, el gen MET y el fragmento

del gen TUB, de la β -tubulina nos confirmará dicho resultado.

El objetivo del proyecto se cumplió ya que se logró la tipificación molecular de dos cepas empleadas en la producción de Tequila de la colección del laboratorio de Genética Molecular de Hongos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Juan Carlos Torres Guzmán por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto y de trabajar en el laboratorio de Genética Molecular de Hongos. A Adriana García Tapia por apoyarme a lo largo del proyecto igual que a todo el equipo del laboratorio de Genética Molecular de Hongos.

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, 2015.

REFERENCIAS

- [1] Wallace Hoff, Justin. (2012). Molecular Typing of Wine Yeasts: Evaluation of Typing Techniques and Establishment of a database. Tesis presentada para el grado de Maestro en Ciencias en la Universidad de Stellenbosch, Instituto de Biotecnología del vino, Facultad de AgroCiencias.
- [2] Arlorio, Marco; Coisson, 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.
- [3] Legras, Jean-Luc; Karst, Francis (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters* (221), 249-255.
- [4] 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.
- [5] 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.