

OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE LEVADURAS CON INTERÉS BIOTECNOLÓGICO

Bañuelos Vaquera Karla Lizeth (1), Adriana García Tapia (2), Angélica Hernández (2), Israel E. Padilla Guerrero (2), Torres Guzmán Juan Carlos (2)

1 [Licenciatura en Ingeniería Bioquímica, Universidad Autónoma de Coahuila] | [karlalizethbv@hotmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [adriana_gtoo@hotmail.com]

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

Resumen

Saccharomyces cerevisiae es el microorganismo empleado desde la antigüedad para la fermentación de bebidas alcohólicas tales como el Tequila, proviniendo exclusivamente de la destilación del mosto de las piñas o cabezas de *Agave tequilana Weber* var. Azul. Con el propósito de implementar un medio de cultivo para el óptimo crecimiento de *S. cerevisiae*, para la mejor producción de Tequila. En este trabajo se evaluó el crecimiento de la cepa LGMH01 de *S. cerevisiae*, en medios de cultivo empleando como fuente de Carbono distintas proporciones de jugo de Agave y melaza, para determinar en qué medio se produce la mayor cantidad de biomasa y su capacidad de fermentación en jugo de Agave. De manera adicional se amplificaron y clonaron los genes *Tup1* y *Cyc8*, para establecer su posible relación con la capacidad de la cepa LGMH01 de realizar fermentaciones de alta gravedad (con alto contenido de azúcar).

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is the microorganism employed since antiquity for the fermentation of alcoholic beverages such as Tequila, coming exclusively from the distillation of the must of the Agave heads from *Agave tequilana Weber* var. Blue. To implementing a culture medium for the optimal growth of *S. cerevisiae*, for the best production of Tequila. This study evaluated the growth of the LGMH01 strain of *S. cerevisiae*, in culture media using as a Carbon source, different proportions of Agave juice and molasses to determine in which medium the biggest amount of biomass is produces and its fermentation capacity in Agave juice. Additionally, the genes *Tup1* and *Cyc8* were amplified and cloned, to stablish its possible relation with the capacity of the LGMH01 strain to carry out high gravity fermentations (with high sugar content).

Palabras Clave

S. cerevisiae; tequila; biomasa; *Tup1*; *Cyc8*

INTRODUCCIÓN

Las levaduras son organismos eucariotas con gran diversidad respecto a su tamaño, forma y color. Son consideradas hongos unicelulares y generalmente sus células son ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Se reproducen por fisión binaria o gemación y algunas pueden ser dimórficas [1]. *Saccharomyces cerevisiae* es anaerobia facultativa, por lo que se obtiene un mayor rendimiento de biomasa en aerobiosis que en anaerobiosis. La producción de levadura requiere además de unas condiciones ambientales óptimas, de una variedad de nutrientes esenciales y vitaminas [2]. Para la fabricación industrial de levadura, las principales materias primas son el cultivo puro de levadura y la melaza de caña que constituye la principal fuente de carbono, debido a su alto contenido de azúcares fermentables (45 a 55% en peso seco) en forma de sacarosa, glucosa y fructosa

En cultivo típico muestra 5 fases de crecimiento cuando es cultivado en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase lag, la fase logarítmica, el cambio diáuxico, la fase postdiáuxica y la fase estacionaria. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo en el que se produce etanol [3].

La fermentación del Tequila es un proceso biológico en el cual los azúcares simples, glucosa y fructosa del jugo de Agave son transformados principalmente en etanol, biomasa y pequeñas cantidades de metabolitos productores de aromas, que son responsables de las cualidades sensoriales del producto. En una fermentación modelo, en condiciones óptimas, cerca del 95 % de los azúcares se convierten en alcohol y dióxido de carbono, 1 % en biomasa y el 4% en otros productos como el glicerol [5]. Este proceso es llevado a cabo por la levadura *S. cerevisiae*, con una duración que varía dependiendo de cada compañía Tequilera de entre 1 y 7 días a una temperatura de 25 a 35 °C y se concluye cuando se han agotado los azúcares.

El Tequila es producido exclusivamente de la destilación del mosto de las piñas o cabezas de *Agave tequilana* Weber var. *Azul*. El proceso clásico de producción de Tequila se divide en cinco etapas: cocción del Agave, molienda de los Agaves cocidos, fermentación, destilación y, en algunos casos, el envejecimiento [4]. El polisacárido predominante en la planta de Agave es la inulina ($C_6H_{10}O_5$) \cdot H₂O, que está compuesta principalmente de cadenas moleculares de fructosa (85 a 92 %); esta fructosa es obtenida de la inulina mediante hidrólisis, en la mayoría de los casos por medios térmicos [3]. Esta es utilizada como sustrato por la levadura para producir el Tequila, donde cada molécula de fructosa o de glucosa se convierte en dos moléculas de etanol y dos de dióxido de carbono.

Cabe mencionar que el jugo de Agave tiene un bajo contenido de Nitrógeno, donde los aminoácidos son la fuente principal de Nitrógeno. En la industria del Tequila, la deficiencia de Nitrógeno es compensada por la adición de fuentes de Nitrógeno, tales como sulfato de amonio o fosfato de amonio. Sin embargo, el jugo de Agave podría ser no sólo deficiente en Nitrógeno, lo que requiere la administración de suplementos de factores de crecimiento de levadura (tales como vitaminas y aminoácidos) [7].

El objetivo del presente trabajo es evaluar el crecimiento de la cepa LGMH01 de *S. cerevisiae*, en medio de cultivo con distintas combinaciones de melaza y jugo de Agave como fuente de carbono, para determinar el medio de cultivo que produzca la mayor cantidad de biomasa. Posterior a esto se realizaron fermentaciones con diferentes condiciones de preinóculos para evaluar la capacidad fermentativa del medio seleccionado. Se determinaron los azúcares reductores directos y se realizaron conteos de células de *S. cerevisiae*; siendo, los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano, herramientas básicas que permiten predecir el desarrollo de la fermentación y evaluar los rendimientos y las productividades en los procesos. De manera adicional se pretende determinar si existen mutaciones en los genes *Tup1* y *Cyc8* que codifican para factores de transcripción de la cepa LGMH01, que pudiesen explicar su capacidad de crecimiento en altas

concentraciones de azúcar (fermentaciones de alta gravedad) por lo que se amplificaron los genes mediante PCR y se clonaron para su posterior secuenciación.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa utilizada en este estudio de *S. cerevisiae* (cepa LGMH01) es una cepa tequilera perteneciente al cepario del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato.

Se evaluó el crecimiento de esta levadura en medio de cultivo con melaza y distintas concentraciones de jugo de Agave; 0%, 5%, 10%, 15% y 50%, como fuente de carbono y los componentes que se muestran en la Tabla 1. Se utilizó medio YPD (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L de dextrosa) como control.

Tabla 1: Medio de cultivo.

Sustrato	Cantidad
Melaza	50 g/L (100%, 95%, 90%, 85% y 50%)
MgSO ₄	0.75 g/L
KH ₂ PO ₄	3.5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.5 g/L
Vitaminas	500 µL
Minerales	50 µL
Jugo de Agave	0%, 5%, 10%, 15% y 50%

Se inoculó cada uno de los medios y se incubó por 18 horas a 28°C y 180 rpm. Posterior a esto, se realizó un conteo celular mediante el uso de un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y/o mediante la densidad óptica a 600 nm, esto para determinar en qué relación melaza/ jugo de Agave se obtiene mayor número de células. El ensayo se realizó por triplicado.

Fermentaciones

Con las células crecidas en los distintos medios se realizaron las fermentaciones como se describe a continuación: Se fermentó en 50mL de jugo de Agave con 4 g/L de nutrientes Corralejo (nutrientes adquiridos de la compañía Tequilera Corralejo S.A de C.V), se inoculó con 1x10⁸ células/mL y se incubó a 33°C. Se realizó una fermentación en la cual se evaluó a las 6 y 24 horas (por duplicado) y una segunda fermentación evaluada a las 2, 4, 6, 8 y 24 horas (por duplicado). Se cuantificaron azúcares reductores (540nm) mediante la técnica del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), y la cantidad de células de levadura por mililitro a las 24 horas realizando un conteo celular mediante el uso de un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

Clonación de los genes *Tup1* y *Cyc8*

Se realizó la extracción de DNA de la cepa LGMH01 por la técnica fenol-cloroformo. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X para corroborar la extracción, posteriormente se amplificó el gen *Tup1* y *Cyc8* mediante la técnica de PCR utilizando los oligos LEFT: GAACAACCTGGCTGAACACGT y RIGHT: ACAGGAAAAGGAGGGGAAGG, INTERN LEFT: TTGGAGAGTATGGGAGAGTGGCA, e INTERN RIGHT: CCTGTGGTTCAGCGTTCGTTATT, respectivamente. Las condiciones de PCR para *Tup1* fueron: 94°C – 5 min, 1 ciclo; 94°C – 1 min., 30 ciclos; 58°C – 1 min., 30 ciclos; 72°C – 3 min., 30 ciclos y 72°C – 10 min., 1 ciclo. Las condiciones para *Cyc8* fueron: 94°C – 5 min., 1 ciclo; 94°C – 30 seg., 30 ciclos; 55°C – 30 seg., 30 ciclos; 72°C – 3.5 min., 30 ciclos y 72°C – 10 min., 1 ciclo. El procedimiento se realizó de igual manera para ambos fragmentos:

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X del producto de la reacción de PCR y se purificó utilizando el kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (250) (QIAGEN) siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante. El producto del PCR se adeniló y se ligó al vector p-GEMT-Easy (1µL) con 2µl Y 5µL del producto adenilado. Se transformó cada fragmento en 5 µL de células competentes *E. coli* DH5α. por técnica de choque térmico y se realizó la extracción de DNA plasmídico de *E. coli* por columna y corte enzimático con la enzima de restricción *EcoRI* HF que se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X. El vector con la secuencia de interés se mandó secuenciar a la compañía ELIMBIO.

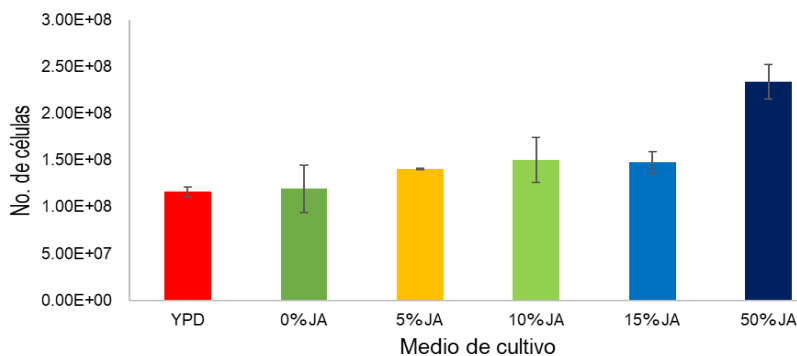
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biomasa

La cepa LGMH01 de *S. cerevisiae* es una levadura tequilera cuya característica más importante es que tiene una alta eficiencia de fermentación y es capaz de realizar fermentaciones de alta gravedad (con alto contenido de azúcar). Con la finalidad de optimizar un medio de cultivo donde se pueda obtener la mayor cantidad de biomasa, se realizaron crecimientos de la cepa en medio de cultivo en donde la fuente de carbono se varió con distintas proporciones de melaza y jugo de Agave, como control se empleó el medio rico YPD. En la Figura 1 se muestra el resumen de resultados, donde podemos ver que una proporción melaza-jugo de Agave 50:50 se obtiene la máxima concentración de células (2.34×10^8 cél/mL), no obstante, a una concentración de 10% de jugo de Agave se obtiene un promedio de 1.5×10^8 cél/mL. Siendo bastante aceptable y con menor costo que la proporción 50:50.

En una concentración de jugo de agave del 50%, se obtiene un incremento exponencial de células de *S. cerevisiae* de hasta 2.34×10^8 cél/mL. Debido a que existe un decremento de células en una concentración de jugo de agave del 15% (1.40×10^8 cél/mL), se presume que en una concentración del 10% de jugo de agave se obtiene el óptimo aumento biomasa, obteniendo en promedio 1.5×10^8 cél/mL.

Fig. 1: Número de células en función al Medio de cultivo.

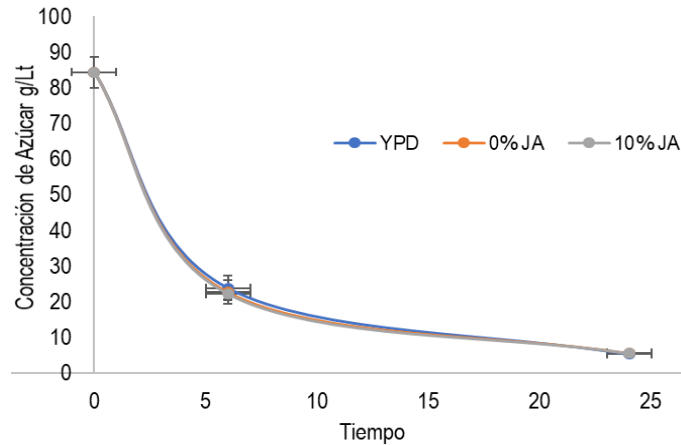


Con los resultados obtenidos se realizaron las fermentaciones en jugo de Agave, se obtuvieron las células en los medios con 0% de jugo de Agave, 10% de jugo de Agave y YPD.

Fermentación I

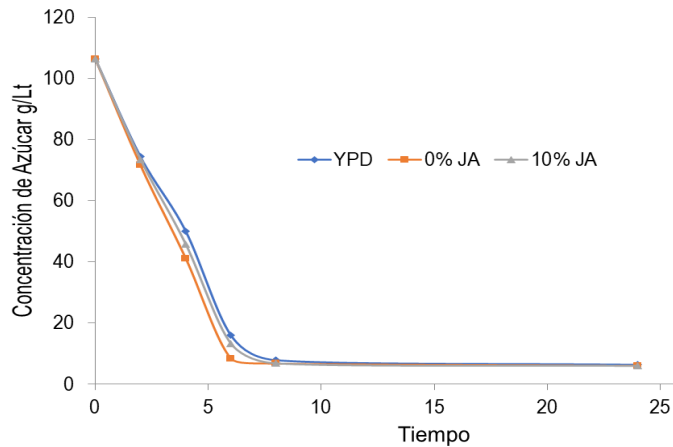
Se observa el resultado de la fermentación donde las células que provienen de los tres medios de crecimiento probados tienen el mismo comportamiento en las tres fermentaciones, con resultados de ARD sin diferencias significativas.

Fig. 2: Cinética del consumo de azúcar.



Fermentación II

Fig. 3: Cinética de consumo de azúcar a las 2, 4, 6, 8 y 24 horas.



En la fermentación II (Fig.3) a las 6 horas se observó un mayor consumo de azúcar en la fermentación del medio que contenía únicamente melaza (0% de jugo de agave), seguido del medio con 10% de jugo de agave. En un periodo de 8 horas se logró un consumo aproximado del 94% de los azúcares totales en las tres fermentaciones. No se observan diferencias significativas en los tres medios de cultivo.

Clonación de los genes *Tup1* y *Cyc8*

A partir de DNA genómico de la cepa LGMH01 se amplificaron los genes *Tup1* (Fig. 4) y *Cyc8* (Fig. 5), ambas ampliaciones se ligaron al vector pGEMT-Easy, en la Fig. 6 se observa la liberación del gen *Tup1* al cortar el plásmido con la enzima *EcoRI*, donde se aprecia una banda correspondiente al vector y la otra corresponde al gen *Tup1*, en el caso del gen *Cyc8*, se encuentra en proceso la comprobación. Ambos genes serán enviados a secuenciar para analizar su secuencia.

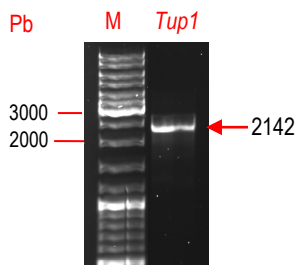


Fig. 4: Amplificación de *Tup1*. M, marcador. Pb, pares de bases.

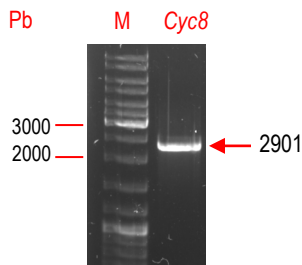


Fig. 5: Amplificación de *Cyc8*. M, marcador. Pb, pares de bases.

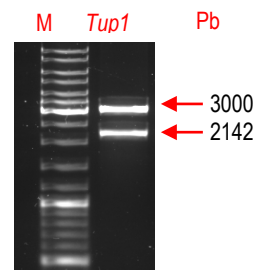


Fig. 6: Clonación *Tup1*. M, marcador. Pb, pares de bases.

CONCLUSIONES

Se logró un aumento significativo en el número de células utilizando un 10% de jugo de agave, pero al realizar la fermentación con este medio de preinóculo, resultó no tener una diferencia significativa en comparación a células crecidas únicamente en melaza o en medio YPD. Se realizó una segunda etapa de fermentación, ya que se quería conocer el tiempo de finalización de la fermentación. De esta manera se observó que aquellas levaduras crecidas únicamente en melaza tuvieron un mayor consumo de azúcar a las 6 horas, pero a las 8 horas las tres tuvieron el mismo comportamiento consumiendo el 93% de los azúcares totales. A las 24 horas se obtuvo un aproximado de 94% de azúcares consumidos, por lo que la fermentación se completó a las 8 horas. Aunque se logró un incremento en el número de células, al momento de fermentar, estas realizan el mismo trabajo. Esto quiere decir que es posible reducir costos empleando preinóculos con *S. cerevisiae* LGMH01 con melaza como fuente de carbono, esto sin perder su capacidad fermentativa. Se logró la amplificación de ambos genes *Tup1* y *Cyc8*, se clonó *Tup1* en el vector pGEMT-Easy, listo para su secuenciación, está en proceso la clonación del gen *Cyc8*.

REFERENCIAS

- [1] Suárez, C., Garrido, N. & Guevara, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 50 (1), 20-28.
- [2] Gomez, E. (2003). ASPECTOS BÁSICOS DE BIOTECNOLOGÍA. Instituto Tecnológico y de Estudios superiores de Occidente, A.
- [3] Horacio, I. (2013). GENERACIÓN DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* CON MAYOR EFICIENCIA FERMENTATIVA MEDIANTE EVOLUCIÓN DIRIGIDA (Tesis de licenciatura). Universidad de Guanajuato.
- [4] Segura, L., Taillandier, P., Brandam, C. & Gschaedler A. (2015). Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium, 60(1), pp. 284-291. doi: 10.1016/j.lwt.2014.08.005
- [5] Ramírez, C. (2004). Ciencia y Tecnología del Tequila, avances y perspectivas. Capítulo 4. CIATEJ.
- [6] Madigan, T., Martinko, J. & Parker, J. (1997). *Biology of Microorganisms* (18 ed.), Prentice Hall. U.S.A. (pp. 126-129 y 458).
- [7] Hernández, G., Valle, J., Herrera, E., Díaz, D., González, Y., Escalona, B. & Córdova, J. (2016). Improvement on the productivity of continuous tequila fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* of Agave tequilana juice with supplementation of yeast extract and aeration, 47(6), doi: 10.1186/s13568-016-0218-8.
- [8] Bautista, M., Gacrcía, L., Barboza, J. & Parra, L. (2001). EL Agave tequilana Weber Y LA PRODUCCIÓN DE TEQUILA, 11(2), pp. 26-34.