

Identificación de *Zygosaccharomyces bailii* por su capacidad osmófila en *Vitis vinífera* var. negra criolla del valle de Chorunga, Arequipa-Perú

Peralta, G.¹ • Durand, A.² • Heredia, W.^{3*}

Palabras clave: uva, levaduras, osmófilas, ADN, glucosa

Key words: grape, yeast, osmophiles, DNA, glucose

Introducción

Existen levaduras que pueden fermentar alto contenido de azúcar, y lo podemos encontrar en estado natural, tal es el caso de las uvas que se cultiva en el valle de Chorunga de la provincia de Arequipa, estas cepas se encuentran en *Vitis vinífera* var. negra criolla; al igual que otros frutos posee una diversidad de microorganismos esencialmente levaduras, de importancia industrial como es el caso de *Zygosaccharomyces bailii*, debido a su alta producción de ésteres, siendo un iniciador mixto en el proceso de fermentación en los vinos, que le confiere mejor cuerpo y sabor al

producto final, Existen estudios donde se indica que los ácidos débiles como el ácido sórbico, el acético, se utilizan en muchos alimentos de pH bajo para evitar que los hongos los echen a perder. La levadura de descomposición *Zygosaccharomyces bailii* es notoria por su extrema resistencia a los conservantes y su capacidad para crecer por encima de las concentraciones de conservantes legalmente permitidas.

En el presente trabajo se pudo aislar, realizar su identificación molecular y evaluar su capacidad fermentativa.

1 Departamento de Química. Facultad de Ciencias Naturales y Formales. Universidad Nacional de San Agustín- Av. Independencia s/n. Arequipa. Perú.

2 Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias. Facultad Ingeniería de Procesos. Laboratorio de Ingeniería de Alimentos. Universidad Nacional de San Agustín- Av. Independencia s/n. Arequipa. Perú

3 Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias. Facultad Ingeniería de Procesos. Laboratorio de Ingeniería de Alimentos. Universidad Nacional de San Agustín- Av. Independencia s/n. Arequipa. Perú.

* wheredia@unsa.edu.pe



Metodología

Aislamiento

Las muestras recolectadas (uva) fueron llevadas al laboratorio para ser estrujadas con la finalidad de extraer el mosto, a allí se evaluó los grados Brix, posteriormente se llevó a incubar a 22°C por 5 días con la finalidad que se multipliquen las levaduras.

Obtención de biomasa

Considerar las colonias características; suspender una colonia en 20 mL de DG18 líquido, incubar a 25°C por 24 horas, luego esta suspensión colocar en 500 mL de medio líquido, dejar incubar por 3 días.

La biomasa obtenida se centrifuga a 3500 rpm. Por 5 minutos en tubos Eppendorf® de 2 mL con la finalidad de obtener los *pellet*, congelar a -20°C, hasta en día de la extracción de ADN.

Aislamiento de ADN y amplificación del gen RNAr 18S

El ADN de las cepas nativas se realiza de la siguiente manera: con un asa de kholle tomar una colonia de la placa Petri, luego re suspender en 600 uL de buffer de lisis 1X en un Eppendorf®, incubar en hot block por 45 minutos a 65 °C, luego añadir 100 uL de microperlas y agitar a 3 000 rpm por 3 minutos, después agregar 300 uL de Fenol-Cloroformo, agitar y llevar a centrifugación con refrigeración por 10 minutos a máxima velocidad (24 000 rpm). El sobrenadante se recolecta y se coloca en un nuevo Eppendorf®, luego añadir 500 uL de isopropanol, centrifugar por 10 minutos a máxima velocidad, después eliminar el sobrenadante, luego añadir 600 uL de etanol absoluto, se lleva a centrifugación por 2 minutos y se descarta el sobrenadante; el *pellet* que contiene el ADN se resuspende con 100 uL de agua destilada estéril.

Posteriormente la amplificación del ADN se realiza mediante la técnica del PCR. Para realizar la PCR, a cada tubo de PCR se añade 2 µL de ADN de cada muestra, luego medir 2 µL de la solución de primers para la amplificación del gen del RNAr 18S (cada uno con una concentración final de 200 µM), y 30 µL de Platinum Blue PCR Supermix® High Fidelity. Los tubos, fueron colocados en un termociclador BioRad (MyCycler™ ThermalCyclerSystem WithGradientOption) y se programó de la siguiente manera: 95 °C por 5 minu-

tos, 25 ciclos de 94 °C por 70 segundos (desnaturalización), 55 °C por 70 segundos (hibridación) y 72 °C por 70 segundos (extensión). Finalmente 1 ciclo a 72 °C por 7 minutos. Luego de la amplificación las muestras serán mantenidas en el termociclador a 4°C (post incubación).

Electroforesis y purificación de productos de PCR

El producto de la PCR se separa en un gel de agarosa al 1,5% y la banda del gel correspondiente al gen RNAr 18S se corta para su purificación utilizando el kit QIAquick PCR Purification Kit donde se utiliza columnas de QIAGEN® y se sigue las instrucciones de la compañía.

Secuenciación de productos de PCR y Filogenia molecular

A 20 uL de DNA purificado se le añade 1 uL de Primer para secuenciar (el gen RNAr 18S para levaduras) los tubos se etiquetan y se envían al DNA Sequencing Functional Biosciences, Inc®. Las secuencias del gen RNAr 18S de las cepas nativas, que fueron obtenidas por secuenciación, fueron analizadas individualmente y comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank utilizando el algoritmo BLAST (blast) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), y luego se construye árboles filogenéticos para determinar las distancias genéticas, porcentaje de similitud con otras especies.

Capacidad osmótica de las levaduras

Se suspendió 200 µL de *pellet* en 1 mL de DG18 líquido, sin glucosa. Seguidamente, se prepararon soluciones de glucosa al 10, 20, 30, 40 y 50°Bx estériles y filtradas; se colocaron 5 mL de cada solución en tubos con tapa rosca, se inoculó 95 µL a 12 tubos

Determinación de azúcares reductores (Miller, 1959)

La determinación de azúcares reductores se realizó por el método del DNS (Miller, 1959), el cual se basa en el ácido 3,5 dinitrosalicílico en medio alcalino reacciona con el grupo reductor de la glucosa, formando un compuesto de color marrón cuya intensidad es proporcional a la cantidad de azúcares presentes.

REACTIVOS

Solución DNS: Disolver 11 g. de hidróxido de sodio, 10 g. de DNS, 2 g de fenol y 0,5 g. de bisulfito de sodio y llevar a un litro; conservar en frasco oscuro en refrigeración.

Sal de Rochelle: Preparan una solución al 40% (p/v) de tartrato de sodio y potasio. Guardar en frasco oscuro en refrigeración.

Solución estándar de glucosa o fructosa: Preparar 6 soluciones entre 2 y 20 mM de glucosa o fructosa, haciendo las diluciones con agua bidestilada esteril.

PREPARACIÓN

Tomar 0.5 mL de solución de glucosa o fructosa, adicionar 3mL. de la solución de DNS; calentar a ebullición por 5 minutos, luego adicionar 1mL de solución de sal de rochelle y agregar luego 15 mL. de agua destilada, mezclar bien y se lee para obtener el O.D. a 550 nm. Para construir la curva estándar, se determinó por duplicado a absorbancia de cada solución (de 2-20 mM de glucosa o fructosa) sometida al tratamiento descrito anteriormente. Los resultados presentados a continuación se sometieron a regresión lineal.

ANÁLISIS DE LA MUESTRA

La muestra a analizar en caso fuera necesario se deberá diluir a una concentración tal que se permita obtener una lectura de D.O a 550 nm que se encuen-

tre dentro de la curva estándar. Los resultados serán expresados como porcentaje de azúcares reductores expresados en glucosa o fructosa

Resultados y discusión

Aislamiento, caracterización macroscópica y microscópica

El aislamiento de las levaduras osmófilas se realizó mediante la observación de sus características macroscópica de las colonias (forma, color, borde, textura, elevación, consistencia y tamaño). Las colonias de *Zygosaccharomyces bailii* mostraron forma redonda, bordes enteros, superficie lisa, cremosa, elevación convexa, consistencia cremosa y tamaño de 2.5 mm, en cuanto a su color *Z. bailii* mostro un color naranja intenso. A nivel microscopio fueron pequeñas en comparación a la citadas en bibliografía (Figura 1).

Zygosaccharomyces bailii.

La secuencia microbiana de la cepa mostro un 99% de similaridad con *Zygosaccharomyces bailii strain ATCC 42476 18S ribosomal RNA gene*. Se muestra una escala de 0,0007 que sugeriría una variación genética del 0,02% en relación a la longitud de las ramas observadas entre el microorganismo de interés y los otros diferentes microorganismos mostrados en el dendrograma (Figura 2).

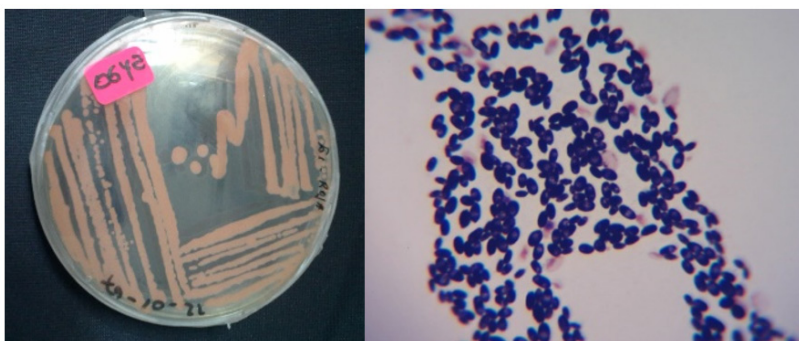


Figura 1. Observación en placa (A), a microscopio x 40 (B) de *Zygosaccharomyces bailii*.

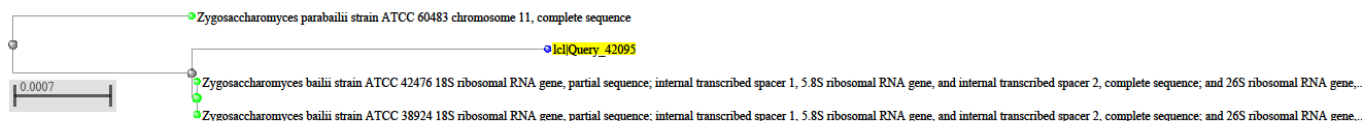


Figura 2. Dendrograma construido con el método de evolución mínima rápida usando el árbol filogenético en el programa BLAST, para inferir las relaciones de la secuencia de la cepa *Zygosaccharomyces bailii*. con los registros de GenBank.

Capacidad Osmótica

Para el caso de la cepa identificada, esta mostró una capacidad osmótica capaz de fermentar la glucosa a diferentes concentraciones, observando que la *Zygosaccharomyces bailii*, fermenta la glucosa hasta 50 % con una capacidad del 64 %, como se muestra en la Tabla 1 y Figura 3.

Se han propuesto diferentes clasificaciones de levaduras de acuerdo con la tolerancia a distintas concentraciones de azúcar. Por ejemplo, establecen las siguientes categorías: levaduras osmotolerantes, si crecen en 2 ó 40% (p/v) de glucosa; no osmotolerantes si crecen sólo en 2% (p/v) de glucosa; y osmófilas si crecen en 60% (p/v) de azúcar [8].

Las levaduras osmotolerantes, sin embargo, son capaces de sintetizar y retener glicerol, incluso algunas poseen bombas para la captación activa de glicerol del medio). Esta concentración intracelular de glicerol parece estar regulada por la $\frac{3}{4}$ externa mediante una ATPasa de membrana. (Deak y Beuchat, 1996).

Las levaduras del género *Zygosaccharomyces*, son importantes por su capacidad para crecer en medios con elevadas concentraciones de azúcar (de aquí que se les conozca con el calificativo de osmófilas), interviniendo en la alteración de la miel, jarabes, melaza y también en la fermentación de la salsa de soja y de algunos vinos *Z. nussbaumeri* es una especie que crece en la miel [2].

Tabla 1. Consumo de glucosa después de 48 horas por la *Zygosaccharomyces bailii*

Concentración glucosa (%)	Abs. inicial	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (A) final
0	0	0
10	0.375	0.1125
20	0.3157	0.1105
30	0.156	0.0780
40	0.166	0.0745
50	0.183	0.0660

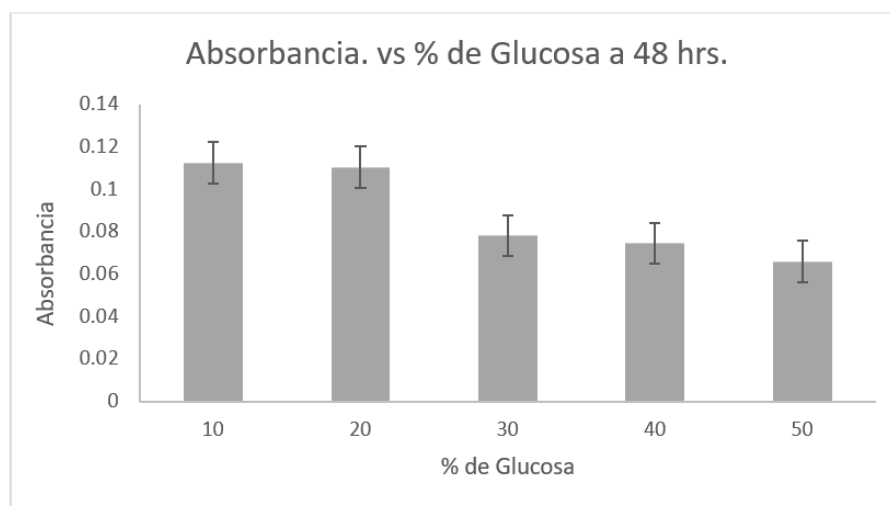


Figura 3. Evaluación del consumo de glucosa por *Zygosaccharomyces bailii* a las 48 h.

Zygosaccharomyces bailii es una levadura conocida como uno de los microorganismos más agresivos para el deterioro de los alimentos, a menudo aislada como contaminante durante la fermentación del vino, así como de muchos alimentos ácidos, con alto contenido de azúcar y enlatados. La capacidad de deterioro depende de la tolerancia a los conservantes más comunes, como el sulfito, el dimetil dicarbonato, el ácido acético y el ácido sórbico, muchos estudios han revelado la resistencia de la levadura, que comprenden la desintoxicación de conservantes, la adaptación del pH citoplásmico y la modulación de la composición de la pared celular/membrana. Al mismo tiempo, Los rasgos descritos revelaron a *Z. bailii* como un nuevo potencial para los bioprocesos industriales.

Comprender las propiedades metabólicas y los mecanismos genéticos de *Z. bailii* es importante para sus aplicaciones industriales. Xu et al., (2017) estudiaron las características de fermentación de *Z. bailii* MT15 de la fermentación de licor con sabor a Maotai chino. *Z. bailii* MT15 produjo varios compuestos de sabor, incluidos 19 alcoholes, seis ácidos, tres ésteres, tres cetonas y dos aldehídos. Además, la producción de ácidos y aldehídos se incrementó en 110 y 41%, respectivamente, a 37°C y 30°C, lo que indica su ex-

celente productividad de sabor. *Z. bailii* MT15 es un diploide con un tamaño de genoma de 20.19 Mb. Su trabajo reveló la contribución potencial de *Z. bailii* a varios compuestos de sabor en la fermentación de alimentos, y produjo información sobre los mecanismos metabólicos de *Z. bailii* en la producción de sabor.

Se evaluó a *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 como co-iniciador en fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae*, encontrando así claramente el potencial de *Z. bailii* BCV 08 como iniciador mixto con *S. cerevisiae* para aumentar la complejidad aromática del vino [3].

Conclusión

Se identificó mediante la amplificación y secuenciación del gen 18S rADN. a las levaduras *Zygosaccharomyces bailii*. Es conocido el interés actual de las levaduras osmófilas en la conservación de diferentes alimentos como salsas, aderezos, jarabes, etc. tal es el caso de *Z. bailii*.

Zygosaccharomyces bailii, con respecto al consumo de sacarosa en la solución a 50°Brix; ésta característica hace que éstas levaduras puedan aprovecharse de manera más eficiente en la industria vitivinícola en el Perú.

Referencias

1. Broadway, P. R., Carroll, J. A., y Burdick, N. C. (2015). Live Yeast and Yeast Cell Wall Supplements Enhance Immune Function and Performance in Food-Producing Livestock: A Review. *Microorganisms*, 3, 417-427. Recuperado de: [10.3390/microorganisms3030417](https://doi.org/10.3390/microorganisms3030417).
2. Frazier, W. y Westhoft, D. (1993). *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España. Cuarta edición.
3. Garavaglia, J., Schneider, R. de C. de S., Camargo Mendes, SD, Welke, JE, Zini, CA, Caramão, EB, y Valente, P. (2015). Evaluación de *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 como co-iniciador en la fermentación del vino para mejorar la producción de ésteres etílicos. *Investigación microbiológica*, 173, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.02.002>
4. Kopecka, J., Matoulkova, D., Jelinkova, M., Felsberg, J., y Nemeč, M. (2013). Molecular characterization of brewing and wine yeast strains in the Czech Republic. In 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.v30.S1/issuetoc>.
5. Leveau, J.-Y. & Bouix, M. (2000). *Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial*.
6. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO- MINAGRI. 2017. Análisis Económico de la Producción Nacional. Uva Fresca (Boletín). DIRECCION GENERAL DE POLITICAS AGRARIAS (DGPA), Lima.
7. Ok, T. y Hashinaga, F. (1997). Identification of sugar-tolerant yeasts isolated from high-sugar fermented vegetable extracts. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. (43), pág. 39-47.
8. Windisch, S., Kowalski, S. y Zander, I. 1978. Nachweis von osmotoleranten Hefen in Mandeln (Detection of osmotolerant yeasts in almonds). *Zucker und Stsswarenwirtschaft*, 31 (5), 177 y 179-180.
9. Xu, Y., Zhi, Y., Wu, Q., Du, R., & Xu, Y. (2017). *Zygosaccharomyces bailii* is a potential producer of various flavor compounds in Chinese Maotai-flavor liquor fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02609>