

Evaluación de la presencia de los genes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* y *FLO11* en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Evaluation of the presence of genes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* and *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae* strains

Carolina Ramírez-Soto*‡, María Alejandra García-Orozco*, Luisa M. Múnica-Porras*, Lina M. López-de Ávila†

RESUMEN

La capacidad floculante en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* es una característica importante para la industria del etanol ya que la unión célula-célula permite la fácil separación de la biomasa del producto de fermentación, reduciendo el tiempo y los costos operacionales. La capacidad que tiene *S. cerevisiae* para adherirse a células y superficies abióticas es conferida por un grupo específico de proteínas de la pared celular, denominadas adhesinas y codificadas por la familia de genes *FLO*. La expresión de dichos genes está relacionada con la respuesta a algunas condiciones de estrés que son comunes tanto a ambientes naturales como a fermentaciones industriales. Este estudio evaluó la presencia de los genes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* y *FLO11* en cepas de *S. cerevisiae*, aisladas de ambientes naturales, y a su vez, evidenció la importancia de la identificación de los genes *FLO* en cepas nativas para un control adecuado de la floculación en fermentaciones industriales.

PALABRAS CLAVES

Saccharomyces cerevisiae, bioprospección, identificación bioquímica, genes *FLO*, PCR, floculación.

ABSTRACT

Since cell-cell attachment enables biomass separation from the fermentation product, flocculant ability of *Saccharomyces cerevisiae* strains is a relevant characteristic for the ethanol industry, as it reduces operating times and costs. The capacity of *S. cerevisiae* to adhere to cells and abiotic surfaces is conferred by a specific group of cell wall proteins called adhesions, which are encoded by *FLO* gene family. The expression of these genes is associated to the response to some stress conditions that are common to both natural environments and industrial fermentations. This study evaluates the presence of genes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* and *FLO11* in *S. cerevisiae* strains, isolated from natural environments, and in turn, it demonstrates the importance of the identification of *FLO* genes in native

strains for adequate control of flocculation in industrial fermentations.

KEYWORDS

Saccharomyces cerevisiae, bioprospecting, biochemical identification, *FLO* genes, PCR, flocculation.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras son microorganismos que tienen la capacidad de transformar una gran cantidad de carbohidratos en diferentes compuestos como etanol y otros compuestos de alto valor agregado.¹⁻⁶ *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura usada industrialmente en la producción de una amplia variedad de alimentos y bebidas fermentadas, así como para la producción

*Estudiante de Microbiología Industrial y Ambiental, Universidad de Antioquia, A.A. 1226, Medellín, Colombia. †Doente de la Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, A.A. 1226, Medellín, Colombia. ‡Contacto: carito.ramis11@gmail.com | Recepción: 06-24-2013. Aceptación: 01-31-2014.

de etanol como biocombustible.^{1,3} Guimarães *et al.*,⁷ reportaron que la utilización de cepas nativas de *S. cerevisiae*, que estén adaptadas a ambientes naturales con condiciones similares a las de una industria de producción de alcohol, es decir el uso de cepas que estén fisiológicamente adaptadas a condiciones extremas (como alta cantidad de azúcares, estrés oxidativo, altas concentraciones de etanol y, al final de los procesos, y limitación de nutrientes, entre otros),⁷ de las cuales algunas son comúnmente encontradas en fermentaciones industriales, es una estrategia importante para mantener la calidad y asegurar la reproducibilidad de las características de productos fermentados industrialmente como el vino y la cerveza. Es por estas razones que la búsqueda y obtención de cepas nativas de *S. cerevisiae*, que, por sus características especiales, funcionen adecuadamente ante los rigurosos ambientes industriales, se convierte en una opción bastante promisoría para su uso con propósitos de aplicabilidad en la industria.

Además de producir altos rendimientos de etanol y de tolerar un amplio espectro de inhibidores y temperaturas variables,^{1,3,10} *S. cerevisiae* tiene la capacidad de desarrollar mecanismos que pueden desencadenar variaciones fenotípicas en respuesta a las condiciones fisicoquímicas del medio donde se desarrollen.¹¹

Uno de estos mecanismos, estudiado por su importancia industrial, es la floculación: un proceso natural, asexual, calcio-dependiente y reversible donde las levaduras se adhieren formando flóculos consistentes de miles de células. Luego de su formación, estos flóculos se sedimentan rápidamente, separándose del medio en el que están inmersos.¹²⁻¹⁸ Por estas características, la floculación célula-célula es un mecanismo importante que facilita la recuperación de biomasa de forma más rentable y eficaz que la aplicada para levaduras no floculantes, que implica no sólo una alta inversión de capital en equipos, sino también un gran consumo de energía. Cuando las células de *S. cerevisiae* floculan dentro de un proceso fermentativo, los flóculos pueden ser retenidos e inmovilizados fácilmente dentro de los reactores, lo que lleva a una producción de etanol más eficiente y económicamente competitiva cuando se usan cepas floculantes.¹⁶

También se ha reportado que las células dentro de los flóculos muestran un incremento en su tasa de supervivencia debido a la naturaleza protectora de la estructura del flóculo,²⁰ que es importante

cuando el objetivo es reutilizar las levaduras en fermentaciones subsecuentes.¹²

Una floculación fuerte y completa es una propiedad bastante deseable para cualquier cepa de *S. cerevisiae* usada a nivel industrial. Sin embargo, muchas de estas cepas industriales no poseen estas características, y no floculan o presentan una floculación prematura y descontrolada que puede causar una fermentación lenta y la generación de características indeseables en el producto final, como olores y sabores desagradables.¹⁸

La floculación es un fenómeno complejo y para lograr entenderlo y controlarlo a nivel industrial, es necesario comprender los mecanismos genéticos que subyacen a este proceso. En *S. cerevisiae*, la floculación es mediada por proteínas de pared celular tipo lectinas conocidas como adhesinas, floculinas o zimolectinas.^{16,21-25} Estas proteínas están adheridas en la parte externa de la pared de las células floculantes de *S. cerevisiae* y, selectivamente, se unen a residuos de manosa presentes en las paredes celulares de células adyacentes. Los iones de calcio en el medio de cultivo son necesarios para activar las floculinas. Dado que los residuos de manosa están siempre presentes en la pared de células floculantes y no floculantes, el factor crítico para la floculación es claramente la presencia o ausencia de las lectinas.^{18,19,23,26} Los genes que codifican estas proteínas se denominan genes *FLO*. Análisis estructurales y funcionales de la secuencia genómica de la cepa de laboratorio *S. cerevisiae* S288C revelaron que esta cepa tiene la familia de genes *FLO*. Algunos de dichos genes son dominantes, subteloméricos y responsables del fenotipo de floculación: *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* y *FLO10*,^{28,29} y otro gen no subtelomérico confiere adherencia a superficies sólidas y se encuentra relacionado con crecimiento invasivo: *FLO11* (*MUC1*).^{14-16,22} En ambientes naturales la expresión de *FLO11* permite la formación de biopelículas y filamentación.^{11,17,21,30}

Algunos reportes de industrias cerveceras indican que las cepas que presentan propiedades floculantes perfectas durante un proceso fermentativo, pueden cambiar y evolucionar hacia una floculación prematura o tardía, o incluso pierden la capacidad de flocular por completo. Muchos estudios describen la presencia de eventos de recombinación intragénica muy frecuentes en la región central de la secuencia genómica de los genes *FLO*.^{17,31-33} Dicha recombinación puede dar lugar a la pérdida o ganancia de unidades repetidas en tándem en la secuencia de estos genes. El aumento de repeticio-

nes en tándem del gen *FLO1* resulta en una floculación más fuerte³² y la variación en el número de estas repeticiones puede generar un cambio en el fenotipo floculante.³⁴ Debido a que los genes *FLO* están bajo control epigenético, su expresión puede silenciarse de modo reversible,^{11,12,35} lo que representa otro nivel de complejidad en el control de la floculación en *S. cerevisiae*.³¹

En este trabajo se evalúa la presencia de los genes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* y *FLO11* en cepas nativas de *S. cerevisiae*, para ser usadas con fines industriales como recurso genético en la construcción de levaduras con capacidad floculante.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMOS

La cepa de *S. cerevisiae* S288C, usada en este estudio como cepa de referencia, fue donada por el profesor Kevin Verstrepen (*VTB laboratory for Systems Biology & Laboratory for Genetics and Genomics, Centre for Microbial and Plant Genetics, Catholic University of Leuven, Bélgica*). Se usó también en este estudio la cepa *S. cerevisiae* *Ethanol Red*[®] de la empresa Fermentis (ER), una cepa de *S. cerevisiae* de la empresa Levapan[®] (LV) y una cepa industrial de *S. cerevisiae* utilizada para la producción de etanol (FLA).

MEDIOS DE CULTIVO

Las levaduras se incubaron en caldo YPD (glucosa 1%, peptona 2%, extracto de levadura 1%) o agar YPD (glucosa 1%, peptona 2%, extracto de levadura 1%, agar 1,7%). Los medios se suplementaron con cloranfenicol al 0,017% (YPD+C). Se utilizó agar YPX (xilosa 1%, peptona 2%, extracto de levadura 1%, agar 1,7%) para realizar un tamizaje inicial de cepas no fermentadoras de xilosa.

BIOPROSECCIÓN DE LEVADURAS

Para la obtención de las cepas de *S. cerevisiae*, se realizó un proceso de bioprospección, a partir de diversas fuentes en las cuales dicha levadura puede encontrarse como alterante o como microbiota natural. En este estudio, se escogieron las siguientes fuentes para la bioprospección: jugo natural de piña y de mora, cerveza artesanal, fermento de piña, uvas Isabella y *Red Glove* (La Unión, Valle del Cauca, Colombia). Para el tratamiento de los jugos de piña y mora, se tomó

una alícuota de 5 mL de la muestra y se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁶; se sembraron en agar YPD+C las diluciones 10⁻², 10⁻⁴ y 10⁻⁶. La siembra de las muestras de cerveza y fermento de piña se hizo de forma directa. Se pesaron 5 g de uvas y se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁶, sembrando en agar YPD+C las diluciones 10⁻², 10⁻⁴ y 10⁻⁶. Todo lo anterior se realizó por duplicado. Todos los cultivos se incubaron a 37°C por 48 h. Las colonias que presentaron diferencias en su morfología macroscópica se realslaron en agar YPD+C. Las levaduras se criopreservaron en glicerol al 30%, y se sometieron a repiques sucesivos cada dos semanas.

IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Con el fin de seleccionar las cepas no fermentadoras de xilosa, característico de *S. cerevisiae*, las cepas crecidas en agar YPD+C se sembraron en agar YPX y se incubaron a 37°C por 48 h para realizar un tamizaje inicial de utilización de xilosa como fuente de carbono. Se seleccionaron algunas cepas que presentaron crecimiento disgónico en xilosa y se sometieron a identificación con el kit comercial API 20 C AUX de bioMérieux SA. El tiempo de incubación fue de 40-42 h, a una temperatura de 30°C y los resultados se registraron en el software APIWeb.

EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN de las cepas de *S. cerevisiae* (12 cepas nativas, LV, ER, FLA y S288C) se utilizó el protocolo reportado por Linda Hoskins/Hahn Lab (*Yeast Genomic DNA Prep*. 1997).

El método se realizó así: las levaduras fueron crecidas a 35°C en medio YPD por 16 a 18 h. Se centrifugó el cultivo a 7000 g por 10 min (Centrifuga Sigma 3K18); el botón de células se lavó con agua desionizada estéril y se centrifugó por 10 min a 7000 g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células en solución I (sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M, DTT 0,05 M pH 7,5), luego se adicionó liticasa (0,25 mg enzima/200 µL sorbitol 1 M) (>2000 unidades/mg proteína, Sigma-Aldrich[®]). Se incubó a 37°C con agitación ocasional por 20 min y se centrifugó a 1500 g por 5 min. El botón de células se resuspendió en solución II (Tris-HCL 50 mM y EDTA 50 mM pH 8,0) y se mezcló por pipeteo suave. Posteriormente, se adicionó SDS al 10% y se incubó por 30 min. En el proceso de purificación de ácidos nucleicos, se adi-

cionó acetato de potasio 5 M y se incubó en hielo por 1 h. Los tubos se centrifugaron a 6000 g por 30 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se adicionó etanol absoluto frío y se centrifugó a 6000 g por 10 min, el botón de células se resuspendió en buffer Tris- EDTA pH 7,5. Seguidamente, se adicionó fenol: cloroformo 1:1, se mezcló por inversión del tubo y se centrifugó a 2000 g por 10 min. Para concentrar el DNA, se recuperó la fase acuosa, que se transfirió a un vial y se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto por cada volumen de fase acuosa. Se centrifugó a 2000 g por 10 min y finalmente, se lavó el botón de células con etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 2000 g por 5 min. Se permitió la evaporación completa del etanol y se resuspendió en buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8). Se almacenó el ADN a -20°C hasta su posterior uso.

La cantidad de ADN obtenido se estimó por espectrofotometría a 260 nm y la pureza se estimó mediante las relaciones 260/280 y 260/230, usando el equipo *NanoDrop 2000* (*ThermoScientific*).

DISEÑO DE CEBADORES

Todos los cebadores usados en la PCR de los genes *FLO* (Tabla 1), se diseñaron de acuerdo con las secuencias genómicas de la cepa de referencia de *S. cerevisiae* S288C reportadas en la base de datos *Saccharomyces Genome* del Departamento de Genética de la Universidad de Stanford (EEUU). La síntesis de los cebadores se solicitó a la compañía IDT (Coraville, Iowa, Estados Unidos).

AMPLIFICACIÓN DE GENES *FLO*

Con el fin de optimizar el parámetro de la temperatura de alineamiento de los cebadores y las concentraciones finales de los reactivos de la reacción se realizó una PCR en gradiente de temperatura con el ADN de la cepa control *S. cerevisiae* S288C

para la amplificación los genes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* y *FLO11*. Los ciclos de temperatura fueron los siguientes: 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 0,5 a 1 min, 50°C a 60°C por 30 a 45 seg, 72°C por 1 a 3 min y finalmente, 72°C por 7 a 12 min. El volumen final de cada reacción fue 25 µL y la concentración final de los reactivos fue: buffer PCR 1 X, MgCl₂ 1,5 a 3 mM, dNTP's 0,2 mM, cebadores forward y reverse 0,25 µM, Taq polimerasa 0,5 a 1 U y 100 ng de ADN. Teniendo estos parámetros establecidos y estandarizados, se realizó una PCR convencional para amplificar los genes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* y *FLO11* de las 15 cepas de *S. cerevisiae* (12 cepas nativas, la levadura de panificación LV y las dos cepas industriales: ER y FLA). Los productos de PCR se evidenciaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

RESULTADOS

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Del proceso de bioprospección se obtuvieron 38 cepas de levadura de diversas fuentes seleccionadas por su morfología macroscópica.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

A partir del filtro de crecimiento en YPX se seleccionaron 23 cepas de levaduras no fermentadoras de xilosa. Se realizó una revisión de la morfología microscópica de estas levaduras y se seleccionaron las 17 cepas que mostraron mayor similitud a la morfología microscópica de *S. cerevisiae*. Los resultados obtenidos de la identificación de estas cepas con el kit API 20 C Aux se muestran en la Tabla 2. De todo el proceso de bioprospección, se obtuvieron e identificaron 12 cepas de *S. cerevisiae*, que se usaron para determinar la presencia de los genes *FLO*.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de los genes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* y *FLO11* en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Gen	Cebador forward	Cebador reverse	Tamaño amplificado
<i>FLO1</i>	5'-ATGACAATGCCTCATCGCTATATG-3'	5'-TTAAATAATTGCCAGCAATAAGGAC-3'	4614 pb
<i>FLO5</i>	5'-ATGACAATTCGACACCACT-3'	5'-TTAAATAATTGCCAGCAATAAGGAC-3'	3228 pb
<i>FLO9</i>	5'-ATGTCTCTGGCACATTATTGTTAC-3'	5'-TTAAATAATTGCCAGCAATAAGGAC-3'	3969 pb
<i>FLO11</i>	5'-ACCACTGAAAGCTCTGTAGACCA-3'	5'-TCGCCAGTACCAGTTGAACAAGGA-3'	806 pb

Tabla 2. Identificación bioquímica de levaduras por medio del kit API 20 C Aux.

Fuentes	Número de cepas aisladas inicialmente	Identificación API 20 C AUX	Nombre de la cepa	% Aislamiento
		% Identificación / Especie		
Jugo de piña	5	99,5% / <i>Candida krusei</i>	N/A	0%
		44,5% / <i>Candida famata</i>	N/A	
Jugo de mora	3	99,9% / <i>Kloeckera</i> spp.	N/A	0%
Fermento de piña	5	98,7% / <i>S. cerevisiae</i> 1	GF9	60%
		98,7% / <i>S. cerevisiae</i> 1	GF10	
		97,9% / <i>S. cerevisiae</i> 1	GF13	
Uva Isabella	4	92% / <i>Candida pelliculosa</i>	N/A	25%
		97,9% / <i>S. cerevisiae</i> 1	GF16	
Uva Red Glove	3	97,9% / <i>S. cerevisiae</i> 1	GF18	66,6%
		97,9% / <i>S. cerevisiae</i> 1	GF20	
Kefir	2	N/A	N/A	0%
Levapan®	2	97,9% / <i>S. cerevisiae</i> 1	LV	50%
Cerveza negra	4	97,9% / <i>S. cerevisiae</i> 1	GF26	50%
		98,7% / <i>S. cerevisiae</i> 1	GF27	
Cerveza mestiza	10	88,7% / <i>S. cerevisiae</i> 2	GF29	40%
		97,9% / <i>S. cerevisiae</i> 1	GF30	
		97,9% / <i>S. cerevisiae</i> 1	GF32	
		97,9% / <i>S. cerevisiae</i> 1	GF33	
Total	38	17	13	34,2%

N/A: No Aplica identificación genética.

AMPLIFICACIÓN DE GENES *FLO*

La temperatura de alineamiento para los cebadores de cada gen *FLO* fue la siguiente (Figura 1): *FLO1* y *FLO5* a 50°C (carril 8), *FLO9* a 51,9°C (carril 6) y *FLO11* a 53,7°C (carril 5). La amplificación de cada gen *FLO* se realizó con los parámetros anteriormente establecidos. El gen *FLO1* estuvo presente en el 66,6% de las cepas evaluadas, presentándose predominantemente en cepas aisladas de ambientes naturales, el gen *FLO5* en el 86,6% (Figura 2) y el gen *FLO11* en el 60% de los aislamientos (Figura 4). En la Figura 2, se evidencia también que los productos de PCR no coinciden con el tamaño esperado de 4614 pb para el gen *FLO1*, y sólo dos de los productos coinciden con el tamaño esperado de 3228 pb para *FLO5*: LV y FLA (Tabla 3). Los productos de PCR para el

gen *FLO11* de las cepas aisladas de fuentes naturales (GF9, GF13, GF16, GF18 y GF20), de tres cervezas artesanales (GF26, GF29 y GF33) y de la cepa de producción industrial de etanol (ER), coinciden con el tamaño esperado de 806 pb (Figura 4). En la Figura 3, se evidencia la ausencia del gen *FLO9* en todas las cepas. En el lado izquierdo, se observa una prueba comparativa con la cepa control (S288C) y dos cepas tomadas al azar. De todas las cepas evaluadas, 6 tuvieron los genes *FLO1*, *FLO5* y *FLO11* (40%); 4 de estas 6 cepas fueron aisladas de fuentes naturales como el fermento natural de piña (GF9 y GF13) y uvas (GF16 y GF20), las otras dos cepas fueron aisladas de cerveza negra (GF26) y cerveza clara (GF29) artesanales. Según la identificación realizada con el kit API 20 C Aux, la cepa GF29 presenta un fenotipo diferente a

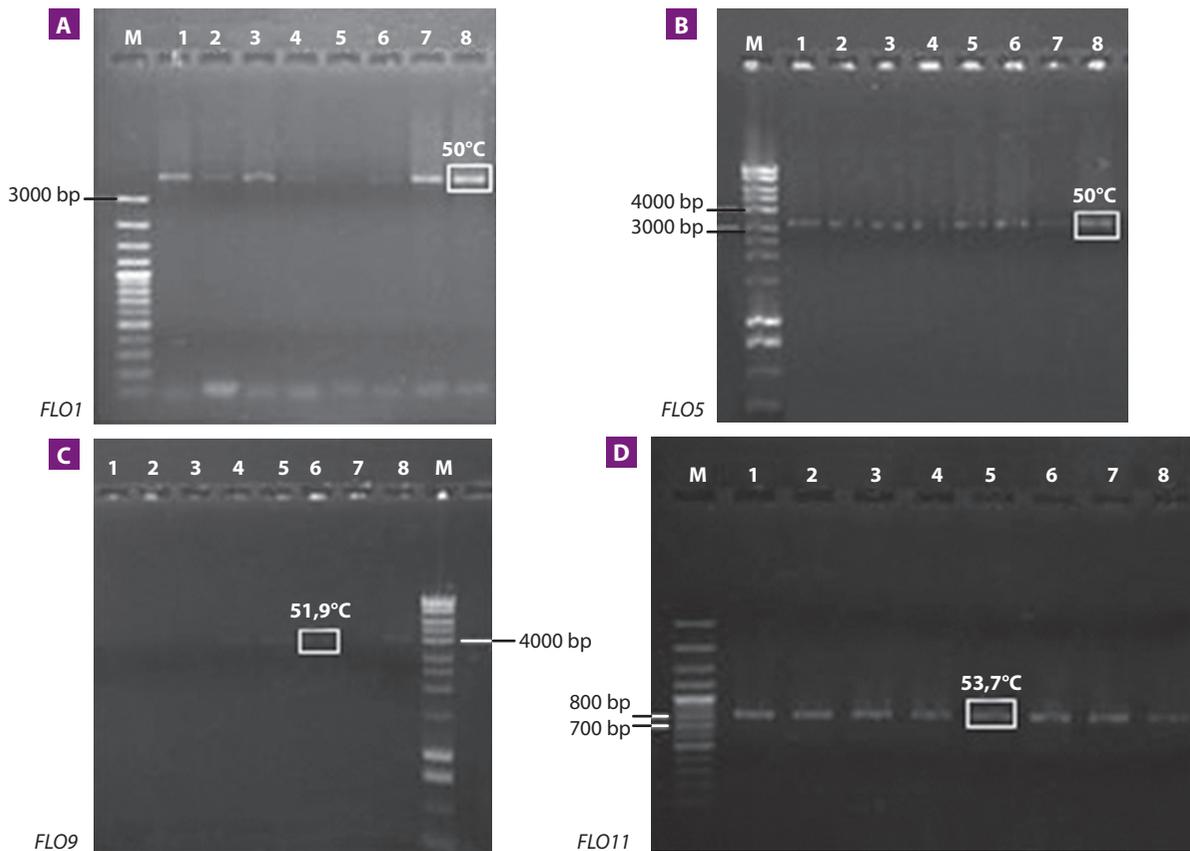


Figura 1. Electroforesis de los productos obtenidos por PCR en gradiente de temperatura de la cepa control S288C. **A.** Electroforesis de PCR en gradiente del gen *FLO1*. **B.** Electroforesis de PCR en gradiente del gen *FLO5*. **C.** Electroforesis de PCR en gradiente del gen *FLO9*. **D.** Electroforesis de PCR en gradiente del gen *FLO11*. Temperaturas para cada carril: **1.** 60°C **2.** 59,2°C **3.** 58°C **4.** 56,1°C **5.** 53,7°C **6.** 51,9°C **7.** 50,7°C **8.** 50°C.

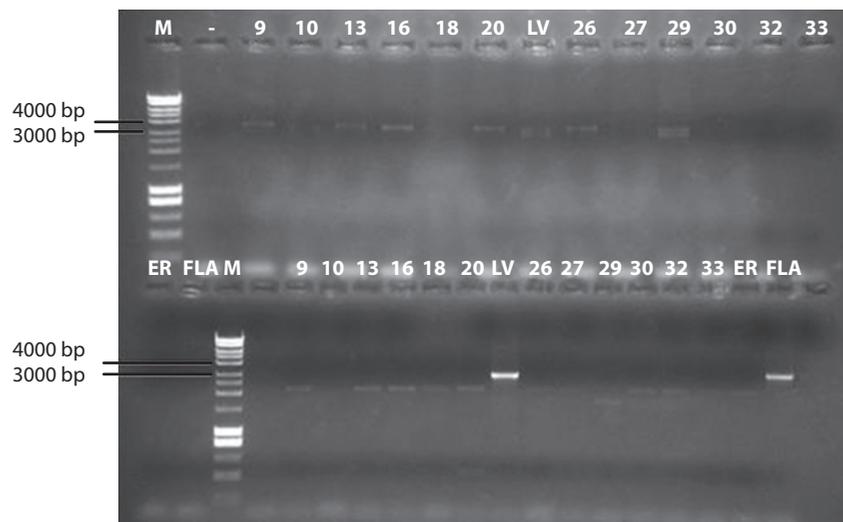


Figura 2. Electroforesis de PCR del gen *FLO1* (parte superior) y *FLO5* (parte inferior) con temperatura de alineamiento de 50°C. Los números corresponden a la denominación de las cepas (GF).

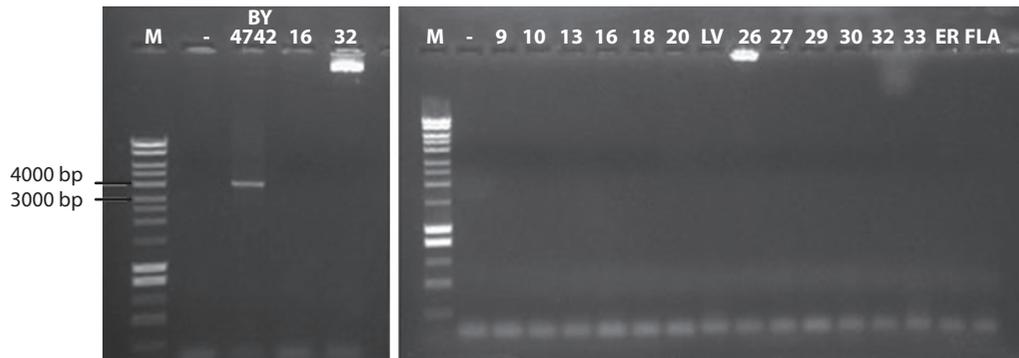


Figura 3. Electroforesis de PCR del gen *FLO9* con temperatura de alineamiento de 52°C. Los números corresponden a la denominación de las cepas (GF).

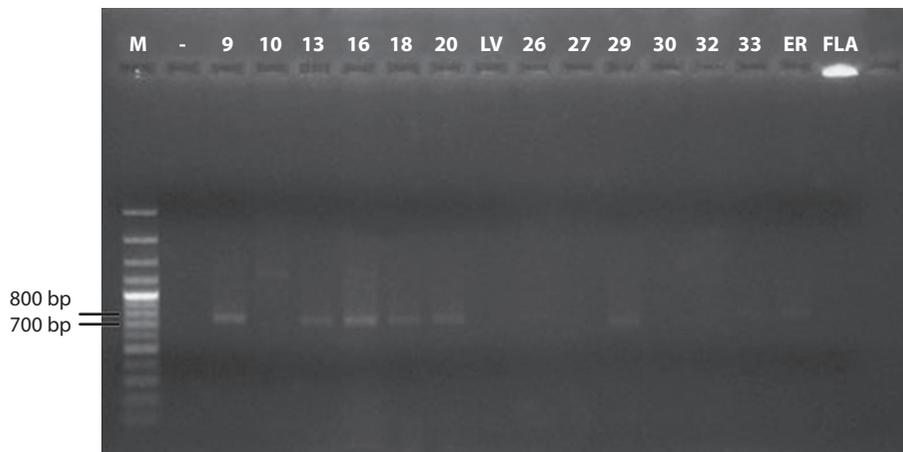


Figura 4. Electroforesis de PCR del gen *FLO11* con temperatura de alineamiento de 54°C. Los números corresponden a la denominación de las cepas (GF).

las demás, ya que tiene la capacidad de asimilar la melcitososa, un trisacárido. Sólo hubo una cepa, GF27, aislada de cerveza negra artesanal que no presentó ningún gen *FLO*. La cepa FLA, usada industrialmente en producción de etanol, sólo presentó el gen *FLO5*.

DISCUSIÓN

La obtención de cepas nativas de *S. cerevisiae* se puede realizar a partir de diversas fuentes, con el fin obtener cepas que presenten mejores atributos y aporten características deseables para la industria.^{5,36} Así mismo, esta levadura es relacionada a menudo con el deterioro de ciertos productos y, en general, se caracteriza por su óptimo crecimiento en medios que

contengan alta cantidad de azúcares.^{2,8,9} Por esto, se seleccionaron fuentes naturales e industriales para obtener cepas nativas de *S. cerevisiae*.

Las 38 cepas de levadura obtenidas inicialmente en este estudio fueron sometidas a un filtro preliminar con el fin de descartar cepas fermentadoras de xilosa. Dicha selección se basó en el hecho de que *S. cerevisiae* es incapaz de usar la xilosa como fuente de carbono,³ exhibiendo un crecimiento disgónico en presencia de ésta, pues carece de las enzimas necesarias para metabolizarla.^{10,37}

Para la caracterización bioquímica de las cepas elegidas por el filtro de xilosa, se utilizó el kit API 20 C Aux. Este kit, basado en pruebas de asimilación de carbohidratos, es frecuentemente utilizado en la identificación de levaduras por su fácil manipulación, ra-

Tabla 3. Porcentaje de identificación de genes *FLO* en las cepas estudiadas.

Fuente	Cepa	<i>FLO1</i>	<i>FLO5</i>	<i>FLO9</i>	<i>FLO11</i>
Fermento de piña	GF9	+	+	-	+
	GF10	+	-	-	-
	GF13	+	+	-	+
Uva Isabella	GF16	+	+	-	+
Uva Red Glove	GF18	-	+	-	+
	GF20	+	+	-	+
Levapan®	LV	+	+	-	-
Cerveza negra	GF26	+	+	-	+
	GF27	-	-	-	-
Cerveza mestiza	GF29	+	+	-	+
	GF30	+	+	-	-
	GF32	+	+	-	-
	GF33	-	+	-	+
Cepa industrial	FLA	-	+	-	-
Ethanol Red®	ER	-	+	-	+
Porcentaje total de genes <i>FLO</i>		66,6%	86,6%	0%	60%

pidez en los resultados y bajo costo, comparado con otros métodos como los moleculares o los basados en sustratos cromogénicos.³⁸ Cuando el kit es usado junto con la determinación de morfología microscópica, los resultados arrojados tienen una exactitud de 95-98% y a menudo este kit ha sido considerado como la prueba estándar contra la cual se comparan otras metodologías.³⁹ En este estudio se evaluaron tres cepas de *S. cerevisiae* (Levapan, S288C y Ethanol RED) por medio del kit, y se obtuvieron porcentajes entre 97,9% a 99,9% de identidad de *S. cerevisiae*, lo que indica que el kit API 20 C Aux es un método adecuado para la identificación de cepas de levadura.

Posterior a la extracción y purificación del ADN de las cepas de *S. cerevisiae*, se procedió a la amplificación por PCR de los genes *FLO*. La floculación de *S. cerevisiae* está sometida al control genético de la familia de genes *FLO*, especialmente del gen *FLO1*, que ha sido el más estudiado de este grupo.^{40,41} Este gen dominante está situado en el brazo derecho del cromosoma I. El marco abierto de lectura de 4,6 kb de *FLO1* codifica una proteína estructural de 1537 aminoácidos

(Flo1p) rica en Serina y Treonina.^{17,18,28,41} Cuando dicha proteína está incorporada en la pared celular, su parte N-terminal tiene la capacidad de unirse selectivamente a azúcares de manosa presentes en la pared celular de otras levaduras.^{14,31}

En este estudio, el tamaño de los productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen *FLO1* y *FLO5* no coincide con el tamaño esperado de 4614 pb y 3228 pb respectivamente, y está entre 3000 y 4000 pb para *FLO1*, y cerca de 2000 pb para *FLO5*. La parte central del gen *FLO1*, así como la del gen *FLO5*, se caracteriza por la presencia de regiones con secuencias altamente repetidas. Estas repeticiones parecen ser altamente inestables por la alta frecuencia de recombinación que presentan,^{27,32} lo que genera la ganancia o pérdida de unidades repetitivas en tándem, llevando al aumento o la disminución en el tamaño del gen y a la modificación del grado de floculación.^{42,17,31} En poblaciones naturales, el gen *FLO1* presenta esta gran variabilidad en su secuencia y esto sugiere que este gen evoluciona continua y rápidamente en la naturaleza.²⁰ *FLO1* también se encuentra relacionado con cepas industriales de *S. cerevisiae* usadas en la producción de cerveza.¹⁸ En la Figura 2, se observa que los genes *FLO1* y *FLO5* se encontraron en cepas aisladas de productos fermentados naturalmente, uvas y cervezas artesanales; todas estas cepas afectadas por condiciones estresantes en su ambiente. Se sabe que el cambio en el número de repeticiones resulta en la sensibilidad a condiciones de estrés, y a su vez genera nuevos fenotipos de floculación.²⁰

Estudios previos²⁰ hacen presumir que las cepas industriales se encuentran sometidas a condiciones más estables y controladas que las cepas naturales, y esto hace que la variabilidad genética dentro de las repeticiones en tándem de los genes *FLO* sea menor. En la Figura 2, se puede observar que las bandas del gen *FLO5* de la cepa de levadura panadera (Levapan) y de la cepa industrial (FLA) son del tamaño esperado (3228 pb), lo que concuerda con lo anterior.

La Figura 3 evidencia la ausencia del gen *FLO9* en todas las cepas. Zhao *et al.*³³ y Van Mulders *et al.*³¹ reportaron que un mal diseño de los cebadores y de las condiciones de una PCR puede generar fallas en la amplificación de los genes *FLO*. En este estudio, las condiciones de la PCR y el diseño de los cebadores para la amplificación del *FLO9* fueron exitosos, lo que se comprueba con la presencia del gen *FLO9* en la

cepa BY4742 (Figura 3). Por otra parte, los mismos autores explican que la no amplificación de los genes puede deberse a mutaciones en los sitios de unión a los cebadores o a la ausencia del gen como tal.

Estudios previos que evalúan la presencia del gen *FLO9* en cepas industriales y nativas, discrepan ampliamente con respecto a los resultados obtenidos y no llegan a una conclusión definida en cuanto a cuál es la distribución del gen *FLO9* en levaduras.^{31,33} En el presente trabajo, la frecuencia de aparición del gen *FLO9* en las cepas evaluadas tanto industriales como nativas, fue de cero.

El gen *FLO11*, referido también como *MUC1*, codifica una proteína esencial en *S. cerevisiae* para el desarrollo pseudohifal, adhesión a superficies sólidas, crecimiento invasivo y formación de biopelículas, mas no para la floculación.^{21,43,17} Esta proteína permite a las células de levadura adaptarse a condiciones de estrés nutricional; en levaduras diploides, bajo depleción de nitrógeno, se da crecimiento pseudohifal, mientras que en células haploides, bajo depleción de glucosa, se da crecimiento invasivo.¹⁷

Las levaduras bajo condiciones naturales usualmente se organizan dentro de comunidades multicelulares que exhiben características específicas las cuales no emergen bajo condiciones de laboratorio. Ejemplos de esto pueden ser biopelículas complejas que se adhieren a diferentes superficies naturales.^{44,45} La expresión del gen *FLO11*, que ha sido ampliamente estudiada, es controlada por diversos factores ambientales¹⁵ y esto lleva a pensar que este gen está ampliamente distribuido en cepas nativas de *S. cerevisiae* que afrontan constantemente una gran cantidad de condiciones ambientales cambiantes.

En la Figura 4, se observa que el gen *FLO11* se encuentra presente en cepas aisladas de fuentes naturales, exceptuando la cepa GF29, que fue aislada de una cerveza artesanal. Esta cepa, según la identificación taxonómica realizada con el kit API 20 C Aux, es una levadura *S. cerevisiae* tipo 2, es decir tiene la capacidad de fermentar melecitosa. Algunos autores^{15,21,46,47} han reportado que la expresión de algunos de los genes requeridos para la respuesta del crecimiento filamentos, específicamente *FLO11*, es co-regulada con la expresión de genes requeridos para la utilización de polisacáridos, almidón y pectina. Más específicamente, se presume que la cascada de señalización que regula el crecimiento filamentos también regula dos genes

que codifican enzimas que le permiten a las células de levadura crecer en almidón como fuente de carbono y depolimerizar la pectina. La expresión de estos genes está regulada por la cascada MAP quinasa, sensible a nutrientes, y por la vía metabólica AMP cíclico/PKA en una manera similar a *FLO11*. Por lo tanto, la respuesta de crecimiento filamentos en levaduras parece estar co-regulada, al menos en cierta parte, con el metabolismo de polisacáridos. Es posible entonces presumir que la expresión del gen *FLO11* presente en la cepa GF29 (aislada de cerveza artesanal) está implicada en la capacidad de esta cepa de utilizar polisacáridos complejos como la melecitosa.

Los resultados de esta investigación proporcionan información sobre los genes dominantes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* y *FLO11* en cepas nativas e industriales de *S. cerevisiae*. Estudios de este tipo son de gran importancia, ya que al estar la familia de genes *FLO* transcripcionalmente silenciada en algunas cepas de *S. cerevisiae*, hacer estudios a nivel fenotípico sin saber la presencia de estos genes es infructuoso. Igualmente, la presencia de dichos genes en cepas industriales, puede suministrar un aporte valioso si se desea inducir floculación durante el proceso fermentativo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al profesor Kevin Verstrepen (*VIB laboratory for Systems Biology & Laboratory for Genetics and Genomics, Centre for Microbial and Plant Genetics, Catholic University of Leuven, Bélgica*) por proporcionar la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* S288C usada en este estudio como cepa control.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

- Grupo de Biotransformación, Universidad de Antioquia.
- Fondo para apoyar trabajos de grado en los programas de pregrado - CODI.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses para la publicación de este manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Arroyo-López FN, Querol A, Bautista-Gallego J, Garrido-Fernández A.** Role of yeasts in table olive production. *Int J Food Microbiol.* 2008; 128(2): 189-96.
2. **Chanprasartsuk OO, Prakitchaiwattana C, Sanguandeekul R, Fleet GH.** Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. *Bioresource Technol.* 2010; 101(19): 7500-9.
3. **Chu BCH, Lee H.** Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnol Adv.* 2007; 25(5): 425-41.
4. **Ferreira MM.** Estudio del proceso biotecnológico para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de jugo de naranjas. [Tesis]. Departamento de tecnología de alimentos. Universidad politécnica de Valencia. 2006.
5. **Liti G, Carter DM, Moses AM, Warringer J, Parts L, James SA, et al.** Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature.* 2009; 458(7236): 337-41.
6. **Vicente MA, Fietto LG, de Miranda Castro I, Gonçalves dos Santos AN, Coutrim MX, Brandão RL.** Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of cachaca the Brazilian sugarcane spirit. *Int J Food Microbiol.* 2006; 108(1): 51-9.
7. **Guimarães TM, Moriel DG, Machado IP, Picheth CM, Bonfim TM.** Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2006; 42(1): 119-26.
8. **Bermúdez-Aguirre D, Barbosa-Cánovas GV.** Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. *J Food Eng.* 2012; 108(3): 383-92.
9. **Truong-Meyer XM, Strehaiano P, Riba JP.** Thermal inactivation of two yeast strains heated in a strawberry product: Experimental data and kinetic model. *Chem Eng J.* 1997; 65(2): 99-104.
10. **Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, Sawayama S.** Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biot.* 2009; 84(1): 37-53.
11. **Halme A, Bumgarner S, Styles C, Fink GR.** Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell.* 2004; 116(3): 405-15.
12. **Bauer F, Govender P, Bester M.** Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Appl Microbiol Biot.* 2010; 88(1): 31-9.
13. **Bony M, Barre P, Blondin B.** Distribution of the flocculation protein, flof, at the cell surface during yeast growth: the availability of flof determines the flocculation level. *Yeast.* 1998; 14(1): 25-35.
14. **Goossens KV, Stassen C, Stals I, Donohue DS, Devreese B, De Greve H, Willaert RG.** The N-terminal domain of the Flo1 flocculation protein from *Saccharomyces cerevisiae* binds specifically to mannose carbohydrates. *Eukaryot Cell.* 2010; 10(1): 110-7.
15. **Govender P, Domingo JL, Bester MC, Pretorius IS, Bauer FF.** Controlled expression of the dominant flocculation genes *FLO1*, *FLO5*, and *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(19): 6041-52.
16. **He LY, Zhao XQ, Bai F-W.** Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with the *FLO1*-derivative gene isolated from the flocculating yeast SPSC01 for constitutive flocculation and fuel ethanol production. *Appl Energ.* 2012; 100(0): 33-40.
17. **Soares EV.** Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *J Appl Microbiol.* 2010; 110(1): 1-18.
18. **Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, Delvaux FR.** Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biot.* 2003; 61(3): 197-205.
19. **Machado MD, Santos MS, Gouveia C, Soares HM, Soares EV.** Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: the flocculation as a separation process. *Bioresource Technol.* 2008; 99(7): 2107-15.
20. **Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C, et al.** *FLO1* Is a Variable Green Beard Gene that Drives Biofilm-like Cooperation in Budding Yeast. *Cell.* 2008; 135(4): 726-37.
21. **Bayly JC, Douglas LM, Pretorius IS, Bauer FF, Dranginis AM.** Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2005; 5(12): 1151-6.
22. **Damas Buenrostro LC, Pereyra Alférez B.** Control genético de la floculación de *Saccharomyces cerevisiae* en proceso de fermentación industrial. *Ciencia UANL, Universidad Autónoma de Nuevo León.* 2009; 12(4): 417-29.
23. **Jin YL, Speers AR.** Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res Int.* 1998; 31(6-7): 421-40.
24. **Ngondi-Ekome J, Thiebault F, Strub JM, Van Dorselaer A, Bonaly R, Contino-Pepin C, et al.** Study on agglutinating factors from flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biochemistry.* 2003; 85(1-2):133-43.
25. **Zhao XQ, Bai FW.** Yeast flocculation: New story in fuel ethanol production. *Biotechnol Adv.* 2009; 27(6): 849-56.
26. **Kurác M, Brányik T.** The role of physicochemical interactions and *FLO* genes expression in the immobilization of industrially important yeasts by adhesion. *Colloid Surface B.* 2011; 84(2): 491-7.

27. **Van Mulders SE, Christianen E, Saerens SM, Daenen L, Verbelen PJ, Willaert R, et al.** Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 2009; 9(2): 178-90.
28. **Govender P, Bester M, Bauer FF.** *FLO* gene-dependent phenotypes in industrial wine yeast strains. *Appl Microbiol Biot*. 2010; 86(3): 931-45.
29. **Verstrepen KJ, Reynolds TB, Fink GR.** Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(7): 533-40.
30. **Nonklang S, Ano A, Abdel-Banat BM, Saito Y, Hoshida H, Akada R.** Construction of flocculent *Kluyveromyces marxianus* strains suitable for high-temperature ethanol fermentation. *Biosci Biotech Bioch*. 2009; 73(5): 1090-5.
31. **Van Mulders SE, Ghequire M, Daenen L, Verbelen PJ, Verstrepen KJ, Delvaux FR.** Flocculation gene variability in industrial brewer's yeast strains. *Appl Microbiol Biot*. 2010; 88(6): 1321-31.
32. **Verstrepen KJ, Jansen A, Lewitter F, Fink GR.** Intra-genic tandem repeats generate functional variability. *Nat Genet*. 2005; 37(9): 986-90.
33. **Zhao XQ, Li Q, He LY, Li F, Que WW, Bai FW.** Exploration of a natural reservoir of flocculating genes from various *Saccharomyces cerevisiae* strains and improved ethanol fermentation using stable genetically engineered flocculating yeast strains. *Process Biochem*. 2011; 47(11): 1612-9.
34. **Liu N, Wang D, Wang Z, He XP, Zhang B.** Genetic basis of flocculation phenotype conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 2007; 7(8): 1362-70.
35. **Octavio LM, Gedeon K, Maheshri N.** Epigenetic and conventional regulation is distributed among activators of *FLO11* allowing tuning of population-level heterogeneity in its expression. *PLoS Genetics*. 2009; 5(10): 1-13.
36. **Diezmann S, Dietrich FS.** *Saccharomyces cerevisiae*: population divergence and resistance to oxidative stress in clinical, domesticated and wild isolates. *PLoS One*. 2009; 4(4): 1-11.
37. **Toivari MH, Salusjarvi L, Ruohonen L, Penttila M.** Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microb*. 2004; 70(6): 3681-6.
38. **Willemsen M, Breynaert J, Lauwers S.** Comparison of Auxacolor with API 20 C Aux in yeast identification. *Clin Microbiol Infect*. 1997; 3(3): 369-75.
39. **Sand C, Rennie RP.** Comparison of three commercial systems for the identification of germ-tube Negative yeast species isolated from clinical specimens. *Diagn Micr Infect Dis*. 1999; 33: 223-9.
40. **Miki BL, Poon NH, James AP, Seligy VL.** Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1982; 150(2): 878-89.
41. **Gomes DG, Guimarães PM, Pereira FB, Teixeira JA, Domingues L.** Plasmid-mediate transfer of *FLO1* into industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 strain creates a strain useful for repeat-batch fermentations involving flocculation-sedimentation. *Bioresource technol*. 2012; 108:162-8.
42. **Rando OJ, Verstrepen KJ.** Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell*. 2007; 128(4): 655-68.
43. **Reynolds TB, Fink GR.** Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*. 2001; 291(5505): 878-81.
44. **St'ováček V, Vachova L, Kuthan M, Palkova Z.** General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal Genet Biol*. 2010; 47(12): 1012-22.
45. **Kuthan M, Devaux F, Janderova B, Slaninova I, Jacq C, Palkova Z.** Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol Microbiol*. 2003; 47(3): 745-54.
46. **Gagiano M, Bauer FF, Pretorius IS.** The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 2002; 2(4): 433-70.
47. **Verstrepen KJ, Klis FM.** Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol*. 2006; 60(1): 5-15.