

## Artículo original

# Fusión intergénica de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora guilliermondii*

Karelen Araujo<sup>a,\*</sup>, María Berradre<sup>b</sup>, Johandry Rivera<sup>c</sup>, Ana Cáceres<sup>d</sup>, Gisela Páez<sup>a</sup>, Cateryna Aiello<sup>a</sup>, Delia Pérez<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Tecnología de Alimentos y Fermentaciones Industriales. Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería.

<sup>b</sup>Laboratorio de Alimentos. Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias. <sup>c</sup>Laboratorio de Genética y Biología Molecular. Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias. <sup>d</sup>Laboratorio de Desarrollo de Métodos. Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias. La Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Recibido 1 de julio de 2016; aceptado 14 de noviembre de 2016

**Resumen:** La fusión de protoplastos ha facilitado la obtención de nuevas cepas de levaduras con propiedades biotecnológicas muy interesantes. El principal objetivo de esta investigación fue obtener una levadura híbrida intergénica con potencialidades enológicas características de dos géneros diferentes. Para ello se fusionaron protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* autóctona de la región zuliana con *Hanseniaspora guilliermondii* CECT 11102 de origen comercial. *Saccharomyces* es una levadura que produce altas concentraciones de etanol pero el perfil aromático es sencillo y común. *Hanseniaspora* no resiste las concentraciones de etanol, pero puede generar aromas agradables e intensos. La identificación de las levaduras antes y después de la fusión de protoplastos se realizó con la técnica PCR-RFLP del gen 5.8S rADN y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2 del ADN extraído, sometiendo los productos amplificados a un análisis de restricción con las enzimas *HinfI*, *HaeIII*, *CfoI* y *DdeI*. El polietilenglicol fue usado para inducir la fusión de protoplastos. La cepa híbrida presentó características de ambas levaduras parentales debido a que resistió altas concentraciones de etanol como *S. cerevisiae* y fue capaz de metabolizar el salicín como *H. guilliermondii*. El análisis molecular PCR-RFLP de la levadura híbrida mostró un patrón de bandas diferente al de las levaduras parentales.

**Palabras clave:** fusión de protoplastos, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*.

## Intergenic fusion of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* protoplasts

**Abstract:** Protoplast fusion has facilitated the development of new yeast strains with very interesting biotechnological properties. The main objective of this research was to obtain hybrid yeast with potentialities of two different genera, that could be used in the wine manufacture. *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts from the Zulian region were fused with *Hanseniaspora guilliermondii* CECT 11102 of commercial origin. *Saccharomyces* is a yeast that produces high levels of ethanol but the aromatic profile is simple and common. *Hanseniaspora* does not withstand ethanol concentrations, but it can generate pleasant and intense aromas. Identification of yeast before and after the fusion of protoplasts was performed using the PCR-RFLP technique of the 5.8S rDNA gene and the adjacent ITS1 and ITS2 intergenic regions of the extracted DNA, subjecting the amplified products to a restriction with the enzymes *HinfI*, *HaeIII*, *CfoI* and *DdeI*. Polyethylene glycol was used to induce fusion of protoplasts. The hybrid strain showed characteristics of both parental yeasts because it resisted high concentrations of ethanol as *S. cerevisiae* and was able to metabolize the salicin as *H. guilliermondii*. PCR-RFLP molecular analysis of hybrid yeast showed a different band pattern than those pertaining to parental yeasts.

**Keywords:** protoplast fusion, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*.

\* Correspondencia:

E-mail: karelen cristina araujo@gmail.com

### Introducción

Las levaduras vínicas pertenecen principalmente al género

*Saccharomyces* [1]. La especie predominante, *S. cerevisiae*, es seleccionada usualmente para la elaboración de vino debido a que fermenta casi en su totalidad los azúcares

del medio y produce altas concentraciones de etanol. Sin embargo, el perfil aromático es bastante sencillo y común, mientras que las levaduras de géneros no-*Saccharomyces* poseen características enológicas que pueden influenciar las propiedades sensoriales de los vinos, específicamente mejorando el perfil aromático. No obstante, estas cepas no fermentan eficientemente el mosto de la uva, son poco tolerantes al etanol, son sensibles al dióxido de azufre y producen concentraciones elevadas de ácido acético [2]. Por estas razones no son empleadas como cultivos iniciadores en las fermentaciones, pero pueden ser utilizadas exitosamente como una cepa parental en los procesos de mejoramiento de una levadura. Entre las levaduras de géneros no-*Saccharomyces*, que pueden realzar las propiedades aromáticas de los vinos, se encuentran *Candida*, *Kloeckera* y *Hanseniaspora* [3].

Durante los últimos 40 años se han llevado a cabo modificaciones dirigidas al estudio del genoma de cepas vínicas mediante experimentos de mutagénesis y selección, hibridación, electroporación, tratamiento con sales de litio, citoducción o fusión de protoplastos [4,5]. Esta última se basa en el rompimiento de la pared celular para producir la fusión de las membranas de dos o más células, dando lugar a un híbrido somático. Esta técnica es versátil, económica y tiene un gran potencial para procesos de mejora de cepas debido a que puede ser utilizada para producir híbridos interespecíficos e intergénicos [6]. La fusión de protoplastos ha sido ampliamente utilizada porque induce la recombinación genética en una variedad de organismos procariontes y eucariotes. Los protoplastos son formados tratando los microorganismos con una enzima lítica que es capaz de romper la pared celular y como resultado de este tratamiento, el contenido celular queda encapsulado por la membrana celular. Los protoplastos son preservados en un medio hipertónico para mantener la estabilidad osmótica y sobrevivir [7].

En el Laboratorio de Alimentos de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia se dispone de la levadura autóctona *S. cerevisiae*, que junto con una levadura comercial como *H. guilliermondii* CECT 11102, podrían utilizarse como cultivos iniciadores en los procesos de fermentación de los vinos a los que posteriormente se les analizará el perfil aromático. Estas levaduras actuarían como cepas parentales en la técnica de fusión de protoplastos, para generar una nueva levadura capaz no solo de terminar la fermentación consumiendo la mayoría de los azúcares, sino también de formar etanol a concentraciones deseadas y generar un perfil de compuestos volátiles que mejoren la calidad organoléptica del vino y le aporten propiedades propias de la región zuliana.

En vista de la importancia y necesidad de tener a disposición una cepa con las características antes mencionadas, el objetivo de este trabajo fue realizar la fusión de protoplastos de la levadura autóctona *S. cerevisiae* SCMCVLUZ 2008 y *H. guilliermondii* CECT 11102.

## Materiales y métodos

**Caracterización e identificación de levaduras:** Las levaduras parentales, utilizadas en esta investigación para los ensayos de fusión intergénica, correspondieron a: *S. cerevisiae* SCMCVLUZ 2008, originaria de la región zuliana-Venezuela, y la levadura comercial *H. guilliermondii* CECT 11102. Ambas cepas, así como el híbrido fueron confirmadas hasta nivel taxonómico género-especie mediante análisis molecular por amplificación del gen ribosomal 5.8S junto con las regiones intergénicas adyacentes *ITS1* e *ITS2* y su restricción con endonucleasas, como se describe posteriormente [8,9]. A los fines de validar todos los análisis moleculares descritos en esta investigación se incluyó como cepa de referencia la *S. cerevisiae* ATCC 4921.

**Extracción del ADN de las levaduras:** El proceso de extracción del ADN se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Querol *et al.*, con modificaciones realizadas por Berradre y col [10,11]. Las células de las levaduras se cosecharon previamente en medio líquido YEPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa) con agitación continua a 28 °C durante 24 horas. Se colocó un volumen de 1,5 mL del medio con la levadura en un microtubo con tapa hermética, se centrifugó por 2 minutos a 12.000 rpm en una microcentrífuga (Gemmy Industrial Corp, KHT-420B) y se descartó el sobrenadante. Seguidamente se realizaron dos lavados con agua destilada ultrapura estéril centrifugando por 2 min a 12.000 rpm. El sedimento celular obtenido fue resuspendido con 500 µL de solución amortiguadora 1 (Sorbitol 0,9M; EDTA 0,1M; pH 7,5). Se agregaron 5 µL de enzima zimoliasa (ZymoResearch), se incubó a 37 °C durante una hora, se centrifugó durante 2 minutos a 12.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento nuevamente con 500 µL de la solución amortiguadora 2 (Tris 50 mM pH 7,4; EDTA 20 mM), se adicionaron 13 µL de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10%, se agitó y la solución se incubó en un baño seco a 65 °C por 5 min. Se agregaron 200 µL de acetato de potasio 5M, se resuspendió el sedimento, se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min. Se transfirió el sobrenadante a otro microtubo, se añadieron 700 µL de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 12.000 rpm por 5 min, el sobrenadante se descartó y los sedimentos se secaron al vacío. Finalmente, se resuspendió en 15 µL de la solución amortiguadora TE (10 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8).

**Amplificación de la región ribosomal del gen 5.8S y las regiones intergénicas adyacentes *ITS1* e *ITS2* del ADN extraído de cada una de las levaduras:** El ADN extraído fue sometido a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores *ITS1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGGCG-3') e *ITS4* (5'-TCCTCCGCTTATTGTTATGC-3') como lo describen Guillamón *et al.* [8] y Esteve-Zarzoso

*et al.* [9]. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Bioer Technology Co., Ltd., TC-24/H) bajo el siguiente esquema de síntesis: desnaturalización previa del ADN a 95 °C x 5 min, seguida de 40 ciclos de amplificación cuyo programa incluía desnaturalización (95 °C x 30 seg), hibridación (52 °C x 1 min) y extensión (72 °C x 1 min) y finalmente una extensión adicional a 72 °C x 7 min [8,9].

*Análisis de restricción con endonucleasas de los productos obtenidos por PCR:* Los productos obtenidos de la PCR fueron digeridos con las endonucleasas *HaeIII*, *Hinfi*, *CfoI* y *DdeI* (Boehringer Mannheim, Germany) siguiendo el método propuesto por Guillamón *et al.* [8] y Esteve-Zaroso *et al.* [9].

*Electroforesis en geles de agarosa:* La separación y visualización de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 1,5% p/v, mientras que los fragmentos generados de la digestión de los productos de PCR con las endonucleasas se llevaron a cabo en geles de agarosa al 3% p/v; sobre una cámara horizontal para electroforesis (Thermo Electron Corporation Midicell® Primo™, Modelo EC330, USA) sumergidos en buffer TBE (Tris 90 mM; Borate 90 mM; EDTA 2 mM) con bromuro de etidio 0,5 mg/mL (Sigma, St. Louis, MI, USA) a 25 mV con fuente de poder programable (Bio-Rad, Modelo Power-Pac Basic, USA) durante 1,5-2 h. Los geles fueron fotografiados sobre un transiluminador (UVP, M-20V) con una cámara digital (KODAK EasyShare, Modelo Z 650, China). En ambos casos, los tamaños de las bandas separadas se determinaron al ser comparadas con la migración obtenida por el marcador de peso molecular de 100 pb, que fue incluido en un pozo del gel de agarosa y corrido simultáneamente con las muestras a analizar [8,9].

*Marcadores fisiológicos para la diferenciación de las levaduras parentales e híbridas:* Con el propósito de diferenciar la cepa híbrida de las parentales se evaluó el perfil de asimilación de las fuentes de carbono glucosa 1% p/v (GLU), celobiosa 1% p/v (CEL) y salicín 1% p/v (SAL) para cada una de ellas [7]. El medio de cultivo base utilizado para tal fin estuvo compuesto por: 5 g de sulfato de amonio; 1 g de fosfato de potasio monobásico; 0,5 g de sulfato de magnesio anhidro y 15 g de agar-agar, para 1 L de medio [12-14]. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de las levaduras parentales y fusionadas para crecer en presencia de etanol sobre el medio YEPD líquido suplementado con diferentes concentraciones de etanol (EtOH: 0%, 5%, 7%, 10%, 14% v/v) [15]. Ambos ensayos fueron incubados a 28 °C y se evaluaron durante 7 días.

*Formación de protoplastos:* Se obtuvieron los protoplastos de las células en fase exponencial de las levaduras parentales, de acuerdo al procedimiento realizado por Abosereh *et al.* [7]. Se agregó 1 mL del cultivo crecido en medio YEPD durante la fase exponencial y se colocó en un microtubo. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 rpm

por 3 min, repitiendo este paso cinco veces. Las células se lavaron 3 veces con agua destilada y los sedimentos obtenidos se resuspendieron en una solución amortiguadora para formar protoplastos (0,6 M cloruro de potasio; 10 mM 2-mercaptoetanol; 50 mM solución amortiguadora fosfato 0,1M; pH=7,5). Luego se agregaron 5 µL de la enzima zimoliasa (ZymoResearch), se incubó a 37 °C por 1 hora con agitación eventual y se observó bajo el microscopio la formación de los protoplastos (células esféricas que explotan al ser expuestas a ambiente hipotónico). Los protoplastos obtenidos se cosecharon centrifugando a 6.000 rpm por 10 minutos y se lavaron al menos tres veces con la solución de lavado de protoplastos (solución amortiguadora fosfato 0,1 M; 0,8 M sorbitol; pH: 7,5). Finalmente, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los protoplastos en 1 mL de esta solución.

*Fusión de protoplastos:* Los protoplastos obtenidos de las levaduras parentales se mezclaron con la solución amortiguadora de fusión (cloruro de calcio 10 mM; 35% polietilenglicol PM 4000). Se agregaron 500 µL de cada levadura más 1 mL de la solución anterior en un microtubo de 2 mL. Se incubaron a 30 °C por 30 min. Se centrifugó a 6.000 rpm por 5 minutos. Seguidamente, se preparó el medio de regeneración (3% agar; 2% peptona; 2% glucosa; 1% extracto de levadura; 1,2 µg/mL nicotinamida; 0,1 µg/mL tiamina; 0,1 µg/mL riboflavina; 0,2 µg/mL adenina). Éste se mantuvo en baño de María a 45 °C. Los cultivos se dispusieron en placas de Petri y luego se agregó el medio de regeneración; se incubaron a 28 °C por 72 horas [7].

*Selección de los híbridos estables producto de la fusión de los protoplastos y estabilidad genómica:* La estrategia adoptada para seleccionar los híbridos resultantes de la fusión de los protoplastos fue mediante presión selectiva. Para ello, las colonias crecidas en el medio de regeneración se seleccionaron una a una para su propagación en medio base de asimilación de fuentes de carbono (sin agar-agar) suplementado con etanol al 10% v/v y con salicín como única fuente de carbono, lo cual permitió inhibir el crecimiento de las cepas parentales presentes *S. cerevisiae* (EtOH<sup>Pos(+)</sup>-SAL<sup>Neg(-)</sup>) y *H. guilliermondii* (EtOH<sup>Neg(-)</sup>-SAL<sup>Pos(+)</sup>) y favorecer el crecimiento de la levadura híbrida (EtOH<sup>Pos(+)</sup>-SAL<sup>Pos(+)</sup>). Los caldos con crecimiento evidente se repicaron a nuevos medios y se reincubaron a 28 °C durante 72 horas adicionales. Finalmente, las cepas que mantuvieron su estabilidad fisiológica, resultantes de la fusión de los protoplastos, se repicaron sobre agar YEPD y se incubaron a 28 °C durante 72 horas para ser conservadas a 4 °C [15], hasta ser sometidas a los análisis moleculares (PCR-RFLP), tal como se describió inicialmente con las cepas parentales; todo esto con el propósito de evidenciar que la levadura híbrida estable mostraba un carácter genético particular.

## Resultados y discusión

*Caracterización de levaduras parentales con la técnica*

**PCR-RFLP del gen 5.8S ITS del ADN ribosomal:** La figura 1 muestra los patrones de bandas observados luego de ser sometidas a electroforesis en gel de agarosa, las cuales representan los fragmentos de restricción originados por las enzimas *HinfI*, *HaeIII* y *CfoI* para las levaduras *S. cerevisiae* y *H. guilliermondii*. La enzima *DdeI* se requirió para la diferenciación de *H. guilliermondii* de la levadura *H. uvarum*, como lo señala Esteve-Zarzoso *et al.* [9].

Las variaciones en las secuencias de nucleótidos, entre las dos especies de estudio, hacen que difiera la distancia de los sitios de clivaje para cada enzima de restricción, y por lo tanto, es razonable obtener fragmentos de distintos tamaños.

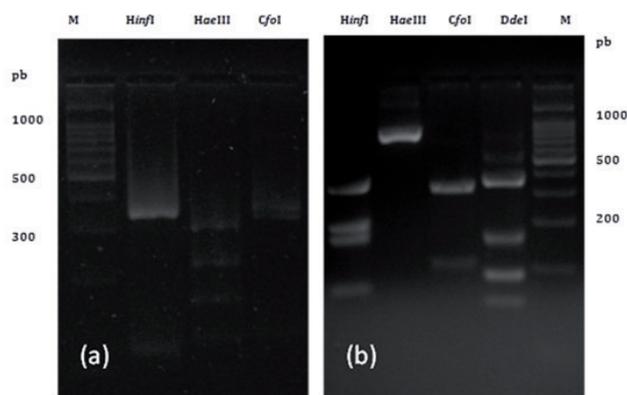


Figura 1. Separación de los fragmentos de restricción con las enzimas *HaeIII*, *HinfI*, *CfoI* y *DdeI*. (a) *S. cerevisiae* SCMCVLUZ 2008. (b) *H. guilliermondii* CECT 11102. M: marcador de 100 pb.

La tabla 1 presenta los tamaños en pares de base (pb) de los productos de la PCR y de los fragmentos de restricción observados en el gel de electroforesis para las cepas parentales y el híbrido de éstas (Figuras 1 y 2). Los tamaños de los fragmentos obtenidos en los parentales son comparables a los reportados por Esteve-Zarzoso *et al.* y Berradre y col. [9,11], a pesar de haberse obtenido variaciones en algunos fragmentos obtenidos, de ~10 pb, en las levaduras estudiadas. Segura *et al.*, realizaron una revisión de los fragmentos de restricción de casi 200 especies de levaduras diferentes y éstos presentaron variaciones promedios en las bandas de 14 pb. Además, realizaron el análisis por PCR-RFLP del gen 5.8S del ADN ribosomal de 104 cepas de *S. cerevisiae*, considerando el promedio de todas las desviaciones estándar de los fragmentos generados

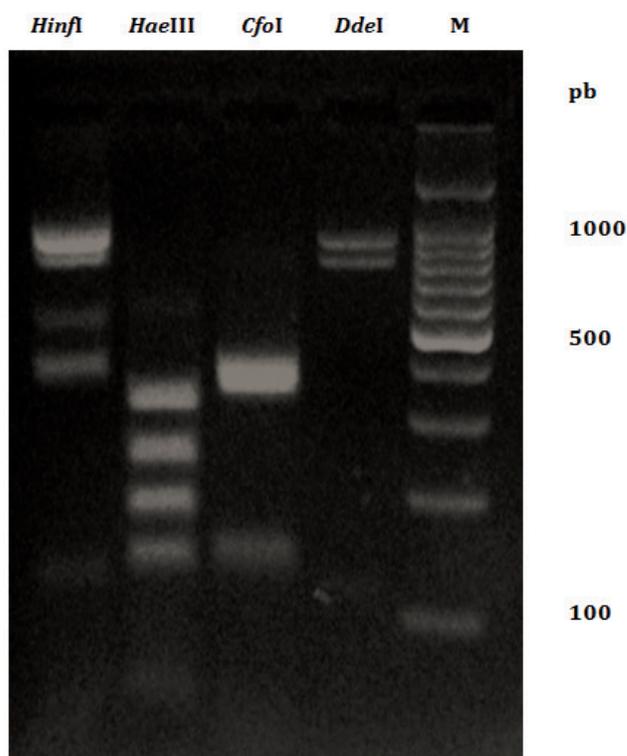


Figura 2. Separación de los fragmentos de restricción con las enzimas *HaeIII*, *HinfI*, *CfoI* y *DdeI* de la levadura producto de la fusión de protoplastos (Híbrida). M: marcador de 100 pb.

por las tres enzimas de restricción, encontrando un valor promedio de 10 pb [16].

**Marcadores fisiológicos para la diferenciación de las levaduras parentales e híbridas:** Las levaduras, *S. cerevisiae* autóctona de la región zuliana (SCMCVLUZ 2008) y la comercial *H. guilliermondii* (CECT 11102), fueron sometidas a análisis de caracterización fenotípica, basados en la capacidad para crecer en presencia de etanol y la asimilación de fuentes de carbono, que permitieran diseñar una estrategia para seleccionar su híbrido correspondiente tras fusionar sus protoplastos, ya que en el último paso de este proceso, es imperioso tener un medio que proporcione las condiciones apropiadas para el crecimiento de la nueva levadura y no de las cepas parentales. De hecho, el mayor inconveniente de ésta técnica está en reconocer el producto de la fusión, ya que en el cultivo donde se obtiene la nueva levadura podrían existir también células parentales.

Tabla 1. Longitud en pares de base (pb) de la región amplificada del gen 5.8S-ITS por PCR y fragmentos obtenidos después de la digestión con enzimas de restricción de las levaduras parentales y la levadura híbrida.

Especie	PA	Fragmentos de restricción			
		<i>HinfI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>CfoI</i>	<i>DdeI</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	355+145	310+230+180+140	375+355	NA
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	750	350+200+180	760	320+315+105	370+180+95+80
Híbrida	800	1000+950+600+450	380+250+200+150	380+300+150	950+900

PA: Producto PCR amplificado; NA: No aplica.

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos de las características fisiológicas evaluadas. Los valores encontrados en cuanto a la resistencia al etanol son consistentes con los reportados por otros autores [17,18]. Estos revelan que la levadura *S. cerevisiae* es capaz de tolerar hasta un 14% de etanol, mientras que la levadura *H. guilliermondii* solo resiste hasta un 7%.

Tabla 2. Diferencias fenotípicas entre las levaduras parentales y su híbrido obtenido por fusión de protoplastos.

Especie	Concentración de etanol (% v/v)					Fuente de carbono asimilable		
	0	5	7	10	14	GLU	CEL	SAL
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>H. guilliermondii</i>	+	+	+	-	-	+	-	+
Híbrida	+	+	+	+	+	+	-	+

(+): crecimiento; (-): no hubo crecimiento; GLU: glucosa; CEL: celobiosa; SAL: salicín.

Existe evidencia significativa de que la composición lipídica de las levaduras contribuye en la tolerancia al alcohol, sin embargo, los mecanismos por los cuales los lípidos de la membrana modulan su fluidez no se han dilucidado completamente hasta el presente. Dentro de las biomoléculas presentes en la membrana se encuentran los fosfolípidos, los esteroides y los ácidos grasos insaturados [19]. Estudios recientes llevados a cabo por Henderson *et al.* [20] indicaron que la presencia del fosfolípido fosfatidilcolina en la membrana plasmática de *S. cerevisiae* incrementa su rigidez y por lo tanto disminuye los efectos perturbadores del etanol. Generalmente, las especies del género *Hanseniaspora* y otras no-*Saccharomyces* no son tolerantes al etanol a concentraciones superiores al 7%, y esto explica la aparición de la fase de muerte a mitad del proceso en una fermentación espontánea [21].

En tal sentido, la concentración de 10% v/v etanol se consideró como uno de los aditamentos requeridos en el medio de selección diseñado para favorecer el crecimiento del híbrido producto de la fusión de los protoplastos de *S. cerevisiae* y *H. guilliermondii* y que, a su vez, inhibiera el crecimiento de uno de los parentales (*H. guilliermondii*).

Otra característica fisiológica era estratégicamente necesaria para no permitir el crecimiento de la otra cepa parental (*S. cerevisiae*) en el medio selectivo, por lo que se optó por evaluar la capacidad de las cepas para asimilar alguna fuente de carbono en un medio donde no hubiese fuentes alternas de los mismos, con la finalidad de observar que *H. guilliermondii* asimilara alguna fuente de carbono de manera exclusiva.

Los ensayos de asimilación de fuente única de carbono fueron conducidos en paralelo con ensayos que incluyeran la glucosa, debido a que la glucosa es el carbohidrato asimilado por excelencia por todas las levaduras conocidas; de hecho, lo metabolizan de forma oxidativa y fermentativa y lo pueden llegar a utilizar para formar biomasa celular o

como sustancia de reserva en forma de glucógeno y grasa [22]. Por ello, en los ensayos de asimilación de fuentes de carbono se incluyó la glucosa, para validar los resultados de viabilidad celular de las cepas cuando fueran expuestas a celobiosa y salicín como única fuente de carbono en el medio de crecimiento.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de asimilación de carbono. No hubo evidencias de que las cepas *S. cerevisiae* y *H. guilliermondii* estudiadas asimilaran la celobiosa como única fuente de carbono, al no observarse el halo de crecimiento sobre este azúcar, por tal razón se descartó su uso como marcador fenotípico para la selección del híbrido obtenido por fusión de protoplastos. En el ensayo con salicín se observó la formación del halo de crecimiento solamente para el cultivo de *H. guilliermondii*, por lo tanto, este azúcar se escogió como fuente de carbono adecuada para seleccionar la cepa resultante tras el proceso de la fusión de los protoplastos.

**Formación de protoplastos:** Las cepas parentales, *S. cerevisiae* autóctona SCMCVLUZ 2008 y *H. guilliermondii* CECT 11102, se trataron por separado con la enzima zimoliasa para degradar la pared celular y convertir las células en protoplastos. Antes de realizar el proceso de fusión se verificó la formación de los protoplastos, observándose en el microscopio óptico la pérdida de su carácter natural ovoide hacia una forma redondeada con notoria reducción de su tamaño, los cuales quedaban en evidencia tras su distorsión; finalmente, se apreció su estallido celular al aumentar la presión osmótica del medio agregando agua, dada la ausencia de la pared celular [23].

La obtención de protoplastos depende en gran medida del tipo y concentración de las enzimas utilizadas, entre las que se destacan la zimoliasa, liticosa,  $\beta$ -glucoronidasa y otras provenientes del hongo *Trichoderma* [24]. Los resultados obtenidos en este estudio con la zimoliasa son comparables a los reportados con otras enzimas como liticosa o Novozym™ [7,23]. La zimoliasa demostró ser eficiente en la formación de protoplastos, pues presenta una alta actividad enzimática atribuida a su composición, ya que es una mezcla de enzimas líticas, tales como beta-1,6-glucanasa, beta-1,3-glucanasa, proteasas y manosas. Contrario a la enzima purificada liticosa, la zimoliasa contiene cuatro enzimas diferentes que atacan los diferentes polímeros de la pared celular, la cual está compuesta principalmente por manoproteínas,  $\beta$ -glucano, N-acetilglucosamina y quitina [25].

**Fusión de protoplastos:** De acuerdo con lo reportado por Abosereh *et al.* [7], la adición de polietilenglicol a la suspensión de los protoplastos de las levaduras en estudio favoreció un aglutinamiento intenso que permitió la formación de agregados celulares. Esto se debió al poder del polímero para disminuir el campo electrostático entre las membranas lipídicas de las levaduras desprovistas de su pared celular, y además a la remoción de agua de tales protoplastos ocasionando su contracción, lo cual

hace posible que el polietilenglicol actúe como puente entre las membranas a través de los enlaces de hidrógeno. Adicionalmente, los iones calcio del medio utilizado promueven la fusión de ambas membranas, ya que éste las perturba generando áreas inestables hasta tal punto que fuerza su contacto.

Los resultados hallados en la caracterización fenotípica se utilizaron para preparar el medio específico que permitió aislar exclusivamente las células resultantes de la fusión, y de esta manera se evitó el crecimiento de células parentales. Dicho medio básicamente resultó ser el mismo descrito para los ensayos de asimilación de fuentes carbonadas, el cual se suplementó con 10% v/v de etanol y salicín como única fuente de carbono.

El crecimiento de las células aisladas sobre el medio de selección antes señalado evidenció que éstas correspondieron a una nueva levadura resultante de la fusión de protoplastos, capaz de asimilar el salicín como fuente de carbono en presencia de etanol al 10% v/v. La estabilidad genética de la nueva levadura fue evidente tras su crecimiento durante varias generaciones sobre el medio selectivo diseñado y su crecimiento final en medio YEPD, como lo sugirieron Dziuba y Chmielewska [15].

Aun cuando Pérez *et al.* [26] señalaron que el crecimiento de la nueva levadura, producto de la fusión en un medio adecuado, garantiza el éxito de la hibridación, se realizó la caracterización genética de dicha cepa, para verificar que se formó un nuevo individuo. Se siguió el procedimiento empleado para la identificación de las levaduras parentales [8-10]. En la figura 2 se observa la separación de los fragmentos de restricción para las enzimas *HinfI*, *HaeIII*, *CfoI* y *DdeI*. Los tamaños en pares de base para cada una de ellas se indican en la tabla 1. Los valores encontrados con *HinfI* y *DdeI* son completamente diferentes a los observados, tanto para *S. cerevisiae* como para *H. guilliermondii*. Sin embargo, los fragmentos de restricción de la levadura producto de la fusión con la enzima *HaeIII* y *CfoI* se asemejan a los obtenidos para *S. cerevisiae* y *H. guilliermondii*, respectivamente. Estos resultados indican que gracias a la fusión de protoplastos se obtuvo una levadura híbrida con características genéticas propias.

## Conclusiones

La combinación de la enzima zimoliasa y el polímero polietilenglicol permitieron la formación y fusión de protoplastos, respectivamente, a partir de levaduras de linajes genéticos distintos (*S. cerevisiae* y *H. guilliermondii*). La levadura híbrida resultante posee caracteres fisiológicos tales como: tolerancia para crecer en presencia de altas concentraciones de etanol y capacidad para asimilar el salicín como única fuente de carbono; dichos caracteres son mutuamente excluyentes de las cepas parentales estudiadas. El híbrido mostró un carácter genético distinto a los parentales tras su análisis molecular mediante PCR-RFLP de la región 5.8S del ADN ribosomal y los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2.

## Referencias

1. Boulton R, Singleton V, Bisson L, Kunkee R. Principles and practices of winemaking. 1st edition. New York: Chapman & Hall Eds; 1999.
2. Fleet GH, Heard GM. Yeast-growth during fermentation. In: GH Fleet, editor. Wine Microbiology and Biotechnology. New York: Taylor & Francis Inc.; 1993. 27-54 pp.
3. Raineri S, Pretorius I. Selection and improvement of wine yeasts. *Ann Microbiol.* 2000; 50:15-31.
4. Pretorius I. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 2000; 16:675-729.
5. Carrascosa A, Muñoz R, González R. Microbiología del vino. Primera edición. Madrid, España: AMV Ediciones; 2005.
6. Murlidhar R, Panda T. Fungal protoplast fusion - a revisit. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2000; 22:429-31.
7. Abosereh N, Soliman E, Haggran A. Effect of interspecific hybridization between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* on utilization of some carbohydrates. *Aust J Basic Appl Sci.* 2011; 5:114-20.
8. Guillamon J, Sabate J, Barrio E, Cano J, Querol A. Rapid identification of wine yeast species base on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol.* 1998; 169:387-92.
9. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49:329-37.
10. Querol A, Barrio E, Ramon D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst Appl Microbiol.* 1992; 15:439-46.
11. Berradre M, Aiello Mazzarri C, Mesa L, Arraiz N, Prieto C, Sulbaran B, Ojeda de Rodríguez G, Fernandez V, Martínez J, Esteve-Zarzoso B. Dinámica poblacional de levaduras durante la fermentación espontánea de uva blanca variedad malvasía. *Rev Fac Agron (LUZ).* 2012; 29:453-74.
12. Lodder J. The yeast: A taxonomic study. Holland: North Holland Publishing Co; 1978.
13. Kurtzman C, Fell J. The yeast: a taxonomic study. 4th Ed. Amsterdam: Elsevier; 1998.
14. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Loncaud A. Handbook of enology: The microbiology of wine and vinifications. 2nd Ed. England: Wiley & Sons; 2000.
15. Dziuba E, Chmielewska J. Fermentative activity of somatic hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae* or *Pachysolen tannophilus*. *Elec J Pol Agri Univ Biotechnol.* 2002; 5. Disponible en: <http://www.ejpau.media.pl/articles/volume5/issue1/biotechnology/art-01.pdf>. Consultado: enero 2016.
16. Segura L, Kirchmayr M, Flores E, Gschaedler A. PCR-

- RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. e-Gnosis. 2010; 8. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/730/73013006002/>. Consultado: enero 2016.
17. Aguilera F, Peinado R, Millan C, Ortega J. Relationship between ethanol tolerance, ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol.* 2006; 110:34-42.
  18. You K, Rosenfield C, Knipple D. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69:1499-503.
  19. Yang K, Woo J, Lee S, Park J. Improving ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by over expressing an ATP-binding cassette efflux pump. *Chem Eng Sci.* 2013; 103:74-8.
  20. Henderson C, Lozada-Contreras M, Jirank V, Longo M, Block D. Ethanol production and maximum cell growth are highly correlated with membrane lipid composition during fermentation as determined by lipidomic analysis of 22 *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79:91-104.
  21. Moreira N, Pin C, Mendes F, Couto J, Hogg I. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vilifications. *Food Control.* 2011; 22:662-7.
  22. Parés R, Juárez A. *Bioquímica de los microorganismos.* Madrid: Editorial Reverté; 2002.
  23. Choi S, Sung C, Jin Oh M, Jo Kim C. Intergeneric protoplast fusion in *Saccharomyces fibuligera* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng.* 1997; 84:158-61.
  24. Ahmed H. *Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization.* USA: CRC Press; 2004.
  25. Burden D. Zymolyase™ vs Lyticase & Glusulase. Amsbio. Disponible en: [http://www.amsbio.com/brochures/Zymolyase\\_Comparison.pdf](http://www.amsbio.com/brochures/Zymolyase_Comparison.pdf). Consultado 10 de julio de 2016.
  26. Pérez L, López C, Barrio E, Querol A. Evaluation of different genetic procedures for the generation of artificial hybrids in *Saccharomyces* genus for winemaking. *Int J Food Microbiol.* 2012; 156:102-11.