

## Caracterización de levaduras por enzimoforesis

ISABEL GARCIA, CHEYLA ROMAY y CARLOS PASCUAL

Departamento de Microbiología Industrial, CENIC  
Ave. 25 y Calle 158, Cubanacán, Ciudad de La Habana

Recibido el 12 de septiembre de 1984

### RESUMEN

Se realiza la identificación de cinco especies de levaduras de uso industrial (*S. cerevisiae*, *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. seudotropicalis* y *K. fragilis*), mediante un método enzimoforético sencillo y rápido, basado en el estudio de las enzimas: alcohol deshidrogenasa, glucosa 6-P-deshidrogenasa, 6 P-glucónico deshidrogenasa, hexoquinasa, glutamato deshidrogenasa NAD y NADP dependientes.

La *C. utilis*, que es una levadura muy empleada en la industria, puede diferenciarse del resto de las especies estudiadas, mediante la migración electroforética de cada una de las enzimas estudiadas.

Todas las especies pueden ser diferenciadas mediante el patrón electroforético de la 6-fosfogluconico deshidrogenasa a excepción de la *K. fragilis* y *C. seudotropicalis*, las cuales sólo se diferencian por su forma de esporulación.

El método propuesto sirve, además, para detectar contaminaciones a causa de la presencia de otra especie en el mismo medio de cultivo.

### SUMMARY

The identification of five yeast strains of industrial use (*S. cerevisiae*, *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. seudotropicalis* and *K. fragilis*) was performed by a simple and rapid enzyme electrophoretic method for glucose 6 phosphate deshydrogenase, alcohol deshydrogenase, 6 phosphogluconate deshydrogenase, hexokinase, glutamate deshydrogenase NAD and NADP dependent.

*C. utilis*, a yeast strain widely employed in industry could be distinguished from the rest of the species by means of the electrophoretic mobility of each one of the enzyme tested.

All species could be differentiated from each other by means of the electrophoretic pattern of 6-phosphogluconate dehydrogenase except for *K. fragilis* and *C. seudotropicalis*, which are very closely related taxonomically and differs only in its sporulation behaviour.

The method we propose is useful to detect the presence of contaminations from other species in the same culture medium.

## INTRODUCCION

Uno de los problemas actuales de la sistemática microbiana lo constituye la clasificación o identificación inequívoca de las especies. Esto, tradicionalmente, se ha llevado a cabo mediante análisis o determinaciones de rasgos fenotípicos y taxonómicos.

Actualmente, existe una tendencia a utilizar métodos moleculares de clasificación genérica y se ha valorado el uso de patrones enzimáticos, como método con gran potencialidad para determinar relaciones y diversidad de especies en la naturaleza (Yamazaki *et al.*, 1983).

En general, existe la tendencia de que mediante estudios bioquímicos se puede establecer una taxonomía a nivel filogenético. Sin embargo, un análisis enzimológico riguroso solamente se ha llevado a cabo con un grupo pequeño de organismos heterotróficos, y existen muy pocos datos comparativos disponibles que permitan emplear la caracterización enzimática como método de clasificación genérica e identificación de especies microbianas.

La utilidad de análisis comparativos enzimológicos se muestra en los resultados obtenidos con organismos cuya posición taxonómica estuvo en duda (Byng *et al.*, 1982).

En este trabajo se realiza una comparación electroforética de seis enzimas, en cinco cepas de levaduras de interés industrial, con el objetivo de establecer patrones electroforéticos que sirvan para caracterizar y diferenciar estas especies.

## MATERIALES Y METODOS

### Microorganismos utilizados

*Saccharomyces cerevisiae*: cepa 196-2 (a his 6) (obtenida de M. Luzzati, París, Francia).

*Candida utilis*: cepa Y 900 (obtenida de P. S. Danson, NRC Canadá).

*Candida tropicalis*: (obtenida del cepario del ICIDCA).

*Candida seudotropicalis*: cepa C-23 (aislada en el CENIC).

*Kluyveromyces fragilis*: cepa 19-30 (obtenida del cepario del ICIDCA).

**Medios de cultivo.** Se utilizó medio mínimo sintético descrito por (Galzy y Slonimski; P.P., 1957), que contenía como fuente de carbono glucosa al 2%. Cuando se utilizó miel como fuente de carbono se empleó a una concentración que corresponde a 3% de azúcares reductores.

**Crecimiento celular.** Las células fueron crecidas con agitación a 30°C durante 15-16 horas, se recolectaron en la fase exponencial del crecimiento correspondiente a una densidad óptica aproximada de 0,7. Las células se lavaron tres veces con agua bidestilada mediante centrifugación a 3 000 x g. Las lecturas de densidad óptica se realizaron en un espectrocolorímetro spekol Carl Zeiss a 420 nm.

**Preparación del extracto celular.** Los extractos celulares se obtuvieron después de romper las células en un agitador de tubo (tipo vortex), empleándose 100 mg de células (peso húmedo) con 1 g de perlas de vidrio (0,6 mm de diámetro) en 0,5 ml del mismo tampón que se empleó para las determinaciones enzimáticas y electroforesis. Se agitó durante 1 minuto y se introdujo inmediatamente en un baño de hielo durante 1 minuto. Esta operación se repitió cuatro veces. El extracto se centrifugó a 10 000 x g durante 20 minutos y se utilizó el sobrenadante (Gancedo, 1982).

**Electroforesis.** Las electroforesis se llevaron a cabo en tiras de gel de acetato de celulosa (de 5,7 x 14 cm-Chemetron) llamadas comercialmente "Cellogel". Se utilizó como tampón Tris 0,075 M-EDTA 0,04 M-ac. acético 0,075 M, pH 8,5. La corrida se llevó a cabo durante 1 hora a 190 volts y 3 miliamperes por tira (Ratazzi, 1967).

La cantidad de extracto utilizado para la corrida electroforética fue de 10  $\mu$ l para todas las condiciones correspondientes a una cantidad de proteína de 0,085 mg, a excepción de la alcohol deshidrogenasa para la *S. cerevisiae*, en que se utilizó 0,021 mg.

El revelado de las enzimas se realizó, acoplando la reducción del NAD o NADP producto de la actividad enzimática a un sistema de indicadores óxido-reductores, integrado por metasulfato de fenazina (PMS) y bromuro de tetrazolio (MTT). Al aceptar los electrones, el tetrazolio forma un precipitado azul en la zona donde se encuentra la enzima. Para todos los revelados se utilizaron 2 mg de PMS y 2 mg de MTT por cada 10 ml de mezcla de reacción. Las concentraciones finales de los demás componentes se expresan a continuación:

6-fosfogluconico deshidrogenasa (6PGD) (E.C.1.1.1.44). Tampón glicilglicina pH:7,6 50 mM; Mg Cl<sub>2</sub> 10 mM; NADP 0,3 mM; 6P-gluconico 1,5 mM.

Alcohol deshidrogenasa (ADH) (E.C.1.1.1.1). Tampón pirofosfato pH:8,0 17 mM; NAD 0,5 mM; etanol 100 mM.

Hexoquinasa (HK) (E.C.2.7.1.1). Tampón imidazol pH: 7,0 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; KCl 100 mM; EDTA 1 mM; NADP 0,25 mM; ATP 1 mM; G6PD 0,5  $\mu$ /ml, glucosa 0,5 mM; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (E.C.1.1.1.49). Tampón glicilglicina pH:7,0 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; NADP 0,3 mM; glucosa 6P 1 mM.

Glutamato deshidrogenasa (GD-NADP). Tampón fosfato pH:7,8 100 mM; NADP 0,2 mM; L-glutámico 10 mM.

Glutamato deshidrogenasa (GD-NAD). Tampón fosfato pH:7,1 100 mM, NAD 0,2 mM; L-glutámico 10 mM.

La mezcla de reacción se preparó en el momento del revelado, protegiéndose contra la luz. Las tiras se sumergieron en la mezcla de reacción a 37°C durante 1-2 minutos hasta que aparecieron las manchas, y posteriormente, las tiras se lavaron con agua.

**Determinaciones enzimáticas.** Las actividades enzimáticas se determinaron en los extractos celulares, de acuerdo con los métodos reportados por (Pontremoli y Grazy, 1966) para la GP6D, (Kuby y Naltman, 1966) para la G6PD (Bañuelos y Gancedo, 1978) para la HK (Wisensfeld *et al.*, 1975) para la ADH.

La mezcla de reacción para la determinación de la actividad de estas enzimas corresponde a las descritas en el revelado de las electroforesis, pero en este caso sin la presencia de los indicadores óxido-reductores.

Todas las mediciones de actividad enzimática fueron realizadas a 340 nm, en un volumen final de 1 ml, comenzando la reacción con la adición del sustrato.

Las proteínas se determinaron por el método de Biuret (Layné, 1957), utilizando albúmina sérica bovina como patrón de referencia.

---

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la caracterización electroforética en las cinco especies estudiadas a través de las enzimas, 6PGD, ADH, HK y G6PD, se muestran en las figuras 1A, 1B, 1C y 1D.

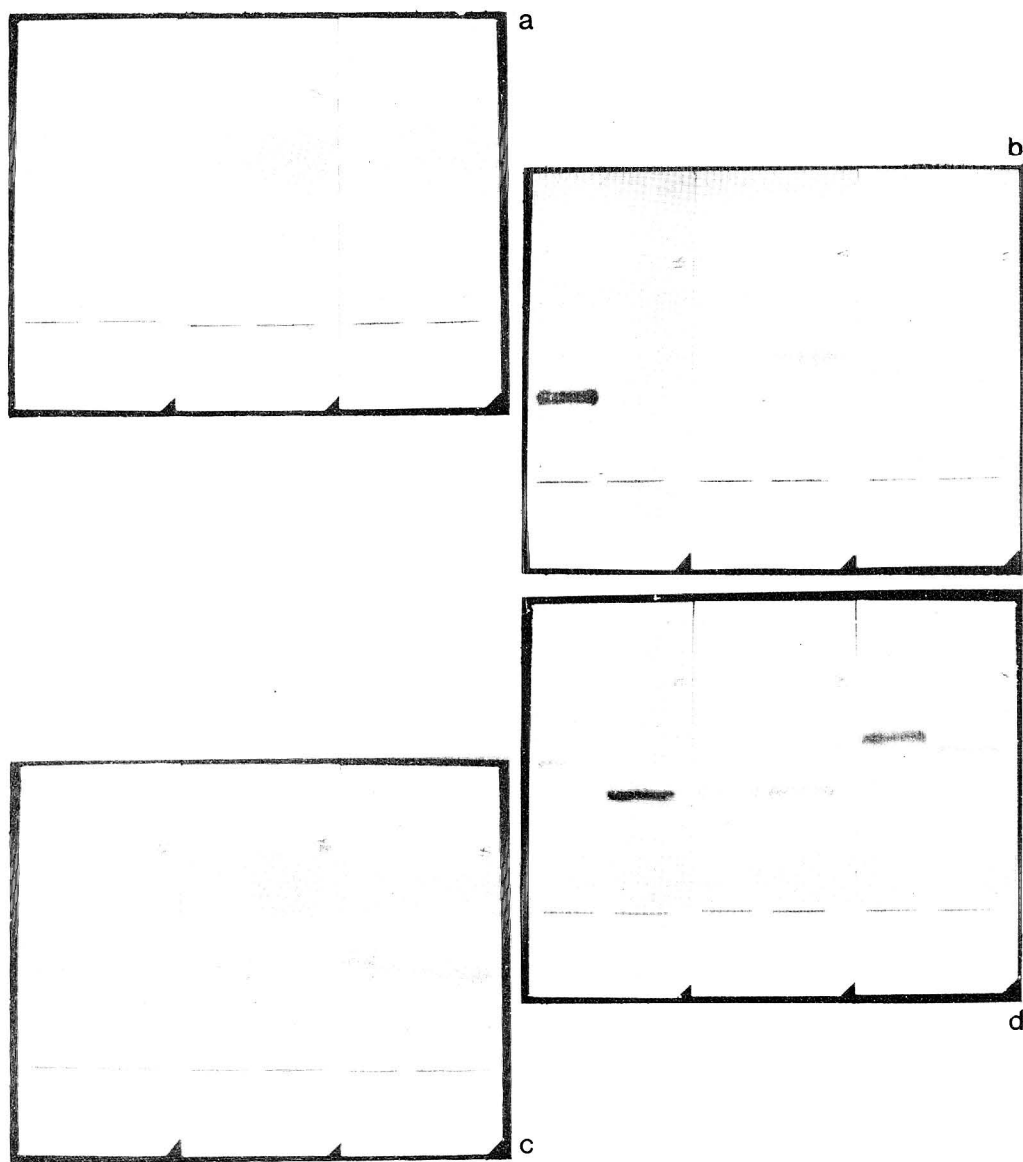


FIG. 1. Caracterización electroforética en gel de acetato de celulosa. La migración se produce de cátodo (extremo inferior de la figura) a ánodo (extremo superior). Los trazos oscuros en la posición inferior corresponden a la zona de aplicación de la muestra. Se aplicó  $10 \mu\text{l}$  del extracto enzimático en cada caso, correspondiente a  $0,085 \text{ mg}$  de proteína, excepto para la ADH de *S. cerevisiae* donde se aplicó  $0,021 \text{ mg}$ .

El orden de las muestras de izquierda a derecha es el siguiente: *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *C. seudotropicalis*, *K. fragilis*, *C. utilis* y *S. cerevisiae*.

- 1A - 6P glucónico deshidrogenasa
- 1B - Alcohol deshidrogenasa
- 1C - Hexoquinasa
- 1D - Glucosa 6P deshidrogenasa

Analizando los diferentes corrimientos y el número de bandas de las enzimas en la electroforesis, incluyendo la caracterización de la GD (NAD) y GD (NADP) (resultados no mostrados) (tabla 1), se estableció una comparación entre las especies, pudiendo ser diferenciadas cada una de ellas. Además, el estudio electroforético revela que las especies *K. fragilis* y *C. seudotropicalis*, no son diferenciables entre sí, lo cual da un nuevo elemento a lo reportado en cuanto a que la *C. seudotropicalis* es la forma imperfecta de la *K. fragilis*, diferenciándose solamente en su forma de esporulación (Van der Walt J. P., 1971).

**Tabla 1**  
**RELACION DE LAS ENZIMAS QUE PUEDEN SER UTILIZADAS PARA LA DIFERENCIACION DE LAS CEPAS**

<i>Cepa</i>	<i>Enzimas que discriminan del resto de las cepas estudiadas</i>
<i>S. cerevisiae</i>	6PGD, G6PD, GD (NAD)
<i>C. tropicalis</i>	6PGD, HK
<i>C. utilis</i>	6PGD, G6PD, HK, ADH, GD (NAD y NADP)
<i>K. fragilis</i>	6PGD, ADH
<i>C. seudotropicalis</i>	6PGD, ADH

Teniendo en cuenta los valores de la actividad enzimática específica (tabla 2), es difícil establecer una caracterización, pues especies distintas con valores similares de actividad para una enzima presentan, como se puede inferir de los resultados, diferentes características físico-químicas.

**Tabla 2**  
**ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LAS CEPAS ESTUDIADAS, EXPRESADAS EN  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$  DE PROTEINA**

<i>Cepa</i>	<i>G6PD</i>	<i>6PGD</i>	<i>HK</i>	<i>ADH</i>
<i>S. cerevisiae</i>	0,183	0,197	0,268	1,215
<i>C. seudotropicalis</i>	0,162	0,20	0,284	0,078
<i>K. fragilis</i>	0,14	0,165	0,238	0,00
<i>C. utilis</i>	0,245	0,283	0,223	0,382
<i>C. tropicalis</i>	0,169	0,183	-	0,011

0: No se detecta actividad bajo las condiciones empleadas

-: No se realizó la determinación

Durante la fermentación a nivel del proceso industrial de producción de levaduras, pueden surgir, por diversos motivos, contaminaciones que eventualmente ocasionan un desplazamiento de la especie originalmente empleada, con el consiguiente detrimento de sus parámetros productivos (Enríquez, 1982).

De acuerdo con los intereses industriales, la *C. utilis* es una de las especies más empleadas, mientras que la *C. tropicalis* es una de las especies que más contaminaciones produce (Enríquez, 1984)\*.

A partir de los resultados obtenidos, se puede inferir que la *C. utilis* se diferencia del resto de las especies por cualquiera de las enzimas estudiadas.

La G6PD presenta en todas las especies estudiadas una sola banda electroforética, lo que facilita detectar contaminaciones por otras especies procedentes de una misma muestra, siempre y cuando existan diferencias en la migración electroforética entre ellas. En la figura 2 se observa la electroforesis realizada para esta enzima a una mezcla de extractos de *C. utilis* y *C. tropicalis*, crecidos en medio miel similar al que se emplea en la industria, donde se corrobora lo planteado anteriormente.

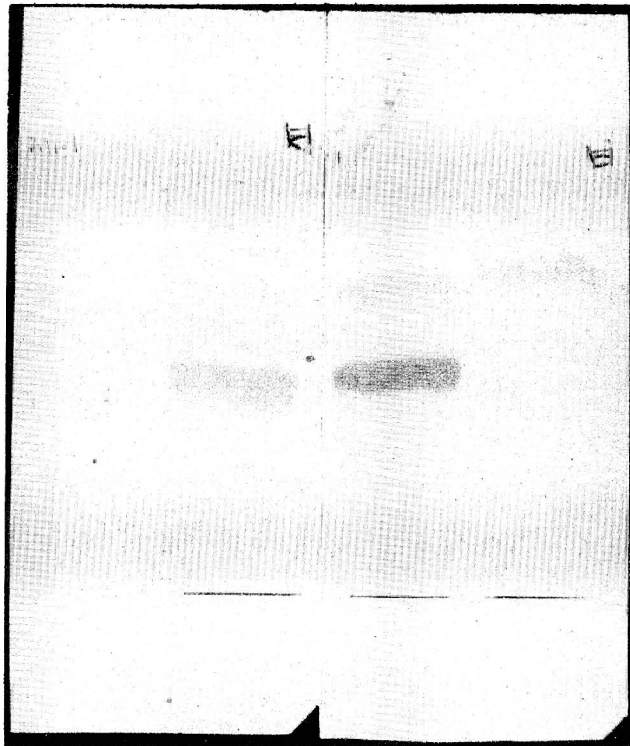


FIG. 2. Electroforesis realizada en tiras de gel de acetato de celulosa revelado para la enzima G6PD, utilizando una mezcla de extractos en iguales proporciones de *C. utilis* y *C. tropicalis*. La migración se produce de cátodo (extremo inferior de la figura) a ánodo (extremo superior). Los trazos oscuros en la posición inferior corresponden a la zona de aplicación de la muestra. Se aplicó 10  $\mu$ l correspondiente a 0,085 mg de proteínas en cada caso. A la derecha aparece la muestra correspondiente al extracto de *C. utilis*; al centro, la mezcla *C. utilis*-*C. tropicalis*, y a la izquierda, la muestra de *C. tropicalis*. Las células fueron crecidas en medio mínimo con miel.

\* Comunicación personal.

---

## REFERENCIAS

- BAÑUELOS, M. y C. GANCEDO (1978). *In situ study of the glycolitic pathway in S. cerevisiae*. Arch. Microbiol. **117**: 197-201.
- BYNG, G. S.; J. F. KANE y R. A. JENSEN (1982). *Diversity in the Routing and Regulation of Complex Biochemical Pathway as indicators of Microbial Relatedness*. C. R. C. Critical Reviews in Microbiology, 227-252.
- ENRIQUEZ, A. (1982). *Algunas consideraciones en la utilización de K. fragilis para la producción de proteínas*. Memoria VIII Seminario Científico CENIC, La Habana, 164.
- GANCEDO, C. y M. A. DELGADO (1984). *Isolation and characterization of a mutant from S. cerevisiae lacking fructose 1,6 bispfosfatase*. Eur. J. Biochem. **139**: 651-655.
- GALZY, P. y P. P. SLONISKY (1957). *Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique on sur le glucose comme seule source de carbone*. C. R. Acad. Sci. (París) **245**: 2423.
- KUBY, S. A. y E. A. NOLTMAN (1966). *Glucose 6 phosphate deshidrogenase (crystalline) from Beker's Yeast*. Colowich, S. P. and N. O. Kaplan (ed.). Methods in Enzymology **9**: 125 New York Academic Press.
- LAYNE, E. (1957). *Spectrophotometric methods and turbidimetric methods for measuring protein*. Colowich S. P. and O. Kaplan (ed.). Methods in Enzymology **3**: 450 Academic Press, New York.
- PONTREMOLI, A. y E. GRAZY (1966). *Phosphogluconate deshidrogenase crystalline*. Colowich S. P. and N. O. Kaplan (ed.). Methods in Enzymology **9**: 137 Academic Press, New York.
- RATAZZI, M. C. (1967). *Electrophoresis of glucose 6-phosphate deshidrogenase. A new technique*. Nature **213**: 79-82.
- VAN DER WALT, J. P. (1971). *Kluyveromyces Van der Waltemend*. Van der Walt Genus **8**. The Yeast Lodder, J. (ed.). 348, N.H.P.C. London.
- WISENFELD, M.; L. SCHIMPFESSEL y R. CROKAERT (1975). Biochem. Biophys. Acta **405**: 500-512.
- YAMAZAKY, M.; S. GOTO y K. KOMAGATA (1983). *An electrophoretic comparison of the enzymes of Saccharomyces yeast*. J. Gen Appl. Microbiol., **29**: 305-318.