

ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA CARACTERIZAR MOLECULARMENTE LEVADURAS NATIVAS DEL QUESO PAIPA COLOMBIANO

*Diana Lozano Alfaro y Alfredo López-Molinello**

Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería de Alimentos, Universidad de La Salle, CP110911, Bogotá D.C. Colombia.

E-mail: alopez@unisalle.edu.co.

RESUMEN

El queso Paipa es el único queso típico colombiano con proceso de maduración. La presencia de levaduras es importante porque metabolizan el lactato y desacidifican; sin embargo, algunas pueden afectar el aroma y sabor. Por esto la identificación molecular es fundamental. Se emplearon 17 cepas aisladas de los diferentes estados de producción y maduración. La extracción de ADN fue por adaptación del DNeasy Plant Kit. Se amplificó por PCR los segmentos de la región 26S del ADNr, específicamente del dominio D1/D2 con iniciadores NL1 y NL4, enfrentando condiciones como volúmenes de mezcla y variables de tiempo y temperatura y se comprobó por electroforesis en gel de agarosa. Los valores de ADN oscilaron entre 14,0 y 21,6 ng/μL. Se logró amplificar el segmento esperado entre 600 y 700 pb confirmando la pureza del ADN extraído y la estandarización de los protocolos usados, los cuales permitirán llegar a la caracterización molecular final.

Palabras clave: queso artesanal, estandarización, identificación, levaduras, biología molecular.

ABSTRACT

Technique standardization to characterize at the molecular level native yeasts of Paipa cheese produced in Colombia

Paipa cheese is the only traditional produced cheese in Colombia that involves a process of maturation. The presence of yeast is important because some of them help metabolize lactate and promote deacidification, but others can cause changes on the aroma and flavor. For this reason, a molecular identification is critical. We used 17 samples of strains isolated from different stages of production and maturation. DNA extraction was performed by adapting the DNeasy Plant Kit (QIAGEN). PCR amplification of the segments of the 26S ribosomal DNA region was done, specifically the D1/D2 domain of the yeast isolates, with the primers NL1 and NL4 in varying conditions of volumes, time and temperature they were checked by agarose gel electrophoresis. The values of DNA ranged between 14.0 and 21.6 ng/μL. Amplification of a fragment between 600 and 700 bp was achieved independently of the conditions, confirming the purity of extracted DNA and standardization of protocols used, which will lead to the final molecular characterization.

Keywords: artisanal cheese, standardization, identification, yeast, molecular biology.

INTRODUCCIÓN

El queso Paipa es el único queso típico producido en Colombia que involucra un proceso de maduración y su producción se realiza con leche cruda, siendo este uno de los principales problemas de contaminación, además de la carencia de prácticas higiénicas durante el proceso, lo cual podría convertirlo en un vehículo para producción de toxiinfecciones. Bajo estas condiciones se pueden producir problemas para la fabricación, distribución y comercialización del producto, de-

**Alfredo López-Molinello: Microbiólogo con énfasis en Alimentos (UNIPAMPLONA, 2001). Magister en Ciencias Microbiología (UNAL, 2006). Docente investigador del programa de Ingeniería de Alimentos UNISALLE. Principales líneas de trabajo en microbiología de alimentos lácteos, microbiología predictiva y biotecnología alimentaria.*

bido a que no cumple los límites microbiológicos establecidos por normativa, conduciendo a pérdidas económicas y con el tiempo posiblemente a la desaparición de este queso típico. La microbiota natural presente en la leche y en el queso tiene efectos directos en el sabor, aroma y textura a través del tiempo, así como en el proceso biotecnológico tradicional con el cual se elabora. La diversidad de los microorganismos en el proceso de fabricación y maduración en gran medida no ha sido caracterizada y su influencia positiva y negativa debido a este hecho aún no es específica. Se plantea como una posible solución a este problema aislar los microorganismos que intervienen en los procesos de fabricación y maduración del queso, pasteurizar la leche y adicionarlos posteriormente para obtener un producto con las mismas características organolépticas originales y una calidad microbiológica aceptable. Para esto es necesario realizar la identificación de la microbiota presente y posteriormente conocer el rol que desempeña en las características físicas, químicas y organolépticas del producto. Actualmente se han aislado y caracterizado bacterias lácticas (1), también se han aislado e identificado preliminarmente hongos filamentosos y levaduriformes (2-4). Sin embargo, para llegar a un nivel de especie y saber con más certeza sus funciones durante el proceso es necesario realizar la identificación molecular de todos ellos, por esta razón el objetivo del presente trabajo fue la estandarización de un protocolo que conlleve a dicha caracterización.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó con 17 cepas de levaduras, aisladas de la leche y de los diferentes tiempos de maduración del queso Paipa en los Departamentos de Boyacá y Cundinamarca, Colombia (2-4). Estas se sembraron por agotamiento en placas de Petri en agar CGA (clorofenicol-glucosa) y se incubaron por un periodo de 48 a 72 h a temperatura de 28 °C. Para la extracción del ADN genómico se aplicó el método para la extracción con el kit comercial "DNeasy Plant Mini Kit for miniprep purification of total cellular DNA from plant cells and tissues, or fungi" de la casa fabricante Qiagen. Este protocolo se basa en una lisis celular mediante enzimas y solución tampón de lisis, además de emplear membranas para la extracción y la purificación del ADN. El extracto se almacenó a -20 °C. Las secuencias de los iniciadores empleados para am-

plificar los segmentos de la región 26S del ADN_r, específicamente del dominio D1/D2 fueron: NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAC-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Se emplearon dos condiciones para el programa de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR sigla en inglés). Primero la propuesta (5): donde se realizó una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 60 s, anillamiento a 56 °C por 90 s y una extensión a 72 °C por 120 s, y una extensión final a 72 °C por 7 min y la segunda propuesta (6): con una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, anillamiento a 60 °C por 30 s y una extensión a 72 °C por 2 min, finalizando con una extensión final a 72 °C por 7 min. Para visualizar tanto el DNA cromosomal como los productos de PCR se utilizaron geles de agarosa ultrapura (Merk) al 1% en amortiguador TAE 0,5X (20 mM Tris-acetato pH 8,0; 0,5 mM EDTA). Como marcador se usó el marcador de peso molecular de tamaño de 100 pb hasta 3000 pb (Oxygen). La tinción se realizó durante 25 min en una solución de TAE 0,5X. Como reactivo visualizador del ADN se utilizó el colorante GelRed™ safe. Las bandas se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz UV de 320 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la extracción con el protocolo DNeasy Plant mini kit Qiagen se logró obtener ADN genómico en diversas concentraciones, además se verificó por cuantificación espectrofotométrica. Los valores oscilaron entre 14,0 y 21,6 ng/μL.

La extracción de ADN es una de las etapas cruciales de los procedimientos analíticos basados en PCR, ya que la detección depende de la calidad e integridad del ADN extraído (7). Son varios los factores que pueden afectar la integridad del ADN durante el proceso de extracción como pueden ser, variaciones del pH y temperatura, actividades enzimáticas, entre otros, que pueden desencadenar en una escisión de fragmentos del ADN. Por otro lado, los contaminantes procedentes del propio proceso de extracción pueden inhibir las reacciones de PCR (8). Por medio de la electroforesis se pudo evaluar la integridad del ADN extraído, cuanto mayor es la integridad, mayor es el tamaño de la banda que se observa y más definida se encuentra en el gel.

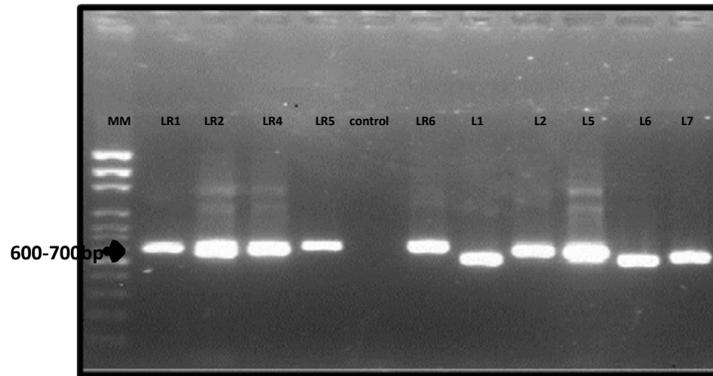


Figura 1. Análisis electroforético de los productos de PCR en 10 levaduras en condiciones propuestas (5). (MM: Marcador molecular de 100-30000 pb).

Bandas de tamaños moleculares pequeños y difuminadas en el gel indican, sin embargo, un alto grado de degradación en el ADN (9). A pesar de que el kit no era específico para levaduras se consiguió una extracción de ADN con una concentración que permitió la amplificación por PCR. Las levaduras son hongos unicelulares y tienen una estructura menos compleja que los hongos filamentosos, sin embargo tienen en común la pared celular compuesta de quitina; este kit se ha desarrollado y diseñado para el rompimiento de paredes y membranas con mayor resistencia y complejidad como las de hongos filamentosos y membranas celulíticas de las plantas, esta puede ser la causa de que al aplicarla en este tipo de microorganismos el kit sea igualmente efectivo. Una vez obtenido el ADN se realizaron los respectivos ensayos de PCR. Utilizando ambos protocolos (5,6) se lograron obtener amplificaciones con un tamaño de entre 600 pb y 700 pb, sin embargo las bandas se lograban visualizar mejor con 2,5 μ L y condiciones propuestas (5) como se observa en la Figura 1.

La amplificación se realizó en la región variable D1/D2 del extremo 5' del gen de la subunidad mayor del rRNA (LSU). El gen LSU mitocondrial es parte del complejo de genes del rDNA y está constituido por secuencias repetidas en tándem, dispuestas en grupos ribosomales en el genoma nuclear. Los genes ribosomales son altamente conservados, aunque actualmente se sabe que están compuestos de una mezcla de regiones conservadas y divergentes, éstas últimas han sido denominadas como "regiones divergentes -D" y tienen una orientación que va de 5' a 3' del rRNA maduro (11). Esta región ha sido secuenciada en la mayoría de ascomicetos y es común a todas las espe-

cies de levaduras, permitiendo un reconocimiento intraespecífico entre ellas, por ser una región altamente variable ayuda a una mejor identificación de las especies, que es el paso posterior para la caracterización final de estas levaduras. Además en el caso de especies fuertemente relacionadas, igualmente es recomendable el secuenciamiento de la región del espacio intergénico (ITS) (12). Por medio de la PCR se demuestra que el ADN tiene buena pureza, pues al probar con tres concentraciones diferentes hay amplificación y no hubo interferencia en la reacción, debiéndose posiblemente al empleo de RNAsa y como la casa fabricante asegura, debido a las filtraciones en las membranas por las columnas. Es importante destacar que la variabilidad presentada en las diferentes migraciones en el gel de agarosa (Figura 1) se debe a que posiblemente al tomar el segmento de ITS al presentarse diferentes géneros y especies, haya variabilidades entre ellas.

CONCLUSIONES

Este estudio presentó la estandarización de protocolos para identificación de las levaduras aisladas durante el proceso de obtención del queso Paipa producido en Boyacá y Cundinamarca, Colombia. El hecho de haber utilizado un kit diseñado para la extracción de ADN de plantas, no fue interferente para la obtención de material genético en levaduras. Durante el proceso se demostró que indiferentemente de las condiciones de tiempo, temperatura y cantidad de ciclos en las fases de desnaturalización y anillamiento aplicadas en la reacción en cadena de la polimerasa siguiendo los protocolos seleccionados se logró amplificar el segmento S26 en todas las muestras.

REFERENCIAS

1. Hernández, J.; Neira, E. Aislamiento, identificación, conservación y caracterización molecular de bacterias ácido lácticas presentes en el queso Paipa. XIX Congreso Latinoamericano de Microbiología. Quito, Ecuador, Octubre de 2008.
2. Carrero, B.; López-Molinello A. *Rev. Vitae* 19 (supl.1): 114-116, 2012.
3. López-Molinello A. *Revista ION* 24 (1):10-20, 2011.
4. López D., Jiménez, M., Lopez-Molinello A. *Alimentos Hoy* 19 (21): 85-108, 2010.
5. Cocolin, L.; Aggio, D.; Manzano, M.; Cantoni, C.; Comi, G. *Int. Dairy J.* 12(5): 407-411, 2002.
6. Senses-Ergul, S.; Agoston, R.; Belák, A.; Deák, T. *Int. J. Food Microbiol.* 108(1): 120-124, 2006.
7. García-Cañas, V.; Cifuentes, A.; González, R. *Crit. Rev. Food Sci.* 44(6):425-436, 2004.
8. Hughes, S.; Moody, A. Fleet, G. *J. Applied Bacteriology* 68 (3): 199- 211, 1990.
9. Maniatis, T.; Fritsch, E.; Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
10. Butinar, L.; Santos, S.; Spencer-Martins, I.; Oren, A.; Gunde-Cimerman, N. *Microbiol. Letters* 244: 229-234, 2005.
11. Sonnenberg, R.; Nolte A.W.; Tautz, D. *Frontiers in Zoology* 4(6), 2007. doi:10.1186/1742-9994-4-6
12. Hall, L.; Wohlfiel, S.; Roberts, G.D. *J. Clin. Microbiol.* 41(11): 5099-5102, 2003.