



## IDENTIFICACION DE LEVADURAS AISLADAS DE LA FERMETACIÓN ARTESANAL DE MEZCAL EN EL ESTADO DE OAXACA POR LA TÉCNICA DE RFLP

Luis Segura García, Manuel Kirchmayr, Patricia Lappe Oliveras, Rubén Moreno Terrazas y Anne Gschaedler Mathis.

Av. Normalistas 800 Colinas de la Normal, C.P. 44270, Guadalajara, Jal., Tel y Fax 33455200, agschaedler@ciatej.net.mx.

Palabras clave: RFLP, levaduras, mezcal.

**Introducción.** La técnica de RFLP para la identificación de levaduras se basa en el estudio del polimorfismos en la región 5.8S ribosomal. Guillamón y cols. (1998) fueron los primeros en utilizar esta técnica con fines taxonómicos. Esteve Zarzoso y cols. (1999) ampliaron la base de datos de los patrones de RFLP hasta 135; actualmente están registrados más de 200. Las enzimas más utilizadas en esta técnica son *Hha* I, *Hae* III, *Hinf* I. Recientemente se están empleando las enzimas *Rsa* I, *Dde* I, *Dra* I, *Nde* II, *Hpa* I, *Scr*FI, *Taq* I, con el fin realizar una identificación mas certera. Este trabajo tuvo como principal objetivo identificar las especies de levaduras presentes en la fermentación artesanal del mezcal en Oaxaca, ya que a la fecha sólo los géneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* han sido identificados en mezcal, y existe poca información acerca de la diversidad de levaduras presentes en la fermentación de esta bebida.

**Metodología.** En tres fábricas del estado de Oaxaca, que producen mezcal en forma artesanal, se obtuvieron muestras durante todo el proceso de fermentación. Todas las muestras de diluyeron y sembraron en medio WL; se aislaron y purificaron las diferentes colonias para realizar su identificación molecular. La extracción del ADN se hizo con el protocolo de Tapia-Tussel y cols. (2006) y la técnica de RFLP con las enzimas *Hha* I, *Hae* III, *Hinf* con la metodología de Esteve-Zarzoso y cols. (1999). Las fotografías de los geles se tomaron con el Gel Doc System (Bio-Rad) y se analizaron con el programa Quantity One (Bio-Rad).

**Resultados y discusión.** Se aislaron 182 cepas que presentaron 33 patrones diferentes. Se detectaron 19, 16 y 5 patrones diferentes en las fábricas D, M y C respectivamente. De ellos 12 fueron identificados a nivel de especie, 9 a nivel de género, y 12 cepas no pudieron identificarse con la técnica de RFLP (Cuadro 1). Se encontró una gran diversidad de levaduras lo que era de esperarse ya que, en todos los casos, el proceso fue artesanal y la fermentación fue espontánea y no controlada. La especie dominante fue *Saccharomyces cerevisiae*, pero las especies *Torulaspota delbrueckii* *Schizosaccharomyces pombe*, y *Zygosaccharomyces rouxii* estuvieron presentes a lo largo de la fermentación.

Cuadro 1. Levaduras identificadas en la fermentación de mezcal en 3 fábricas del estado de Oaxaca.

Géneros y especies de Levaduras	Fábricas de mezcal		
	M	D	C
<i>Brettanomyces sp.</i>	-	1	-
<i>Candida sp. 1</i>	-	1	-
<i>Candida sp. 2</i>	-	-	1
<i>Candida sp. 3</i>	1	-	-
<i>Candida sp. 4</i>	1	-	-
<i>Candida boidinii</i>	-	3	-
<i>Candida colliculosa</i>	-	3	-
<i>Candida intermedia</i>	4	1	-
<i>Candida parapsilosis</i>	1	-	-
<i>Citeromyces matritensis</i>	-	2	-
<i>Cryptococcus kuetzingii</i>	1	-	-
<i>Hanseniaspora sp.</i>	1	-	-
<i>Issatchenkia orientalis</i>	-	2	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	-	3	-
<i>Rhodotorula sp.</i>	3	-	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49	29	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	6	-	-
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	-	18	-
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	1	-	-
<i>Zygoascus sp.</i>	-	1	-
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	17	-	-

**Conclusiones.** La técnica de RFLP permitió la identificación a especie del 76.37% y a género de 6.59% del total de levaduras aisladas.

**Agradecimiento.** Proyecto SEP-CONACYT 24556.

### Bibliografía.

- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 329-337.
- Guillamón, J. M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J. and Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol.* 169: 387-392.
- Tapia-Tussell, R., Lappe, P., Ulloa, M., Quijano-Ramayo, A., Cáceres, M., Larqué-Saavedra, A. and Pérez-Brito, D. (2006). A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Mol Biotech* 33: 67-70.