



IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS NATIVAS AISLADAS DE LA PRODUCCIÓN DE MEZCAL POR ANÁLISIS DE RFLP's DEL GEN 18S

María Angélica Martell Nevárez¹, Jesús Bernardo Páez Lerma¹, Javier López Miranda¹, Nicolás Oscar Soto Cruz¹, Raúl Rodríguez Herrera², Olga Miriam Rutiaga Quiñones^{1*}

¹Departamento de Ings. Química y Bioquímica. ITD. Blvd. Felipe Pescador 1830 Ote. C.P. 34080. Durango, Dgo., Méx. Tel. (618) 8184813. ²Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. FCQ-UAC. Blvd. V. Carranza s/n. Col. República. Ote. Saltillo, Coah., Méx. *omrutiaga@yahoo.com

Palabras clave: diversidad microbiana, PCR-RFLP, gen 18S

Introducción. La fermentación alcohólica espontánea es un proceso complejo que se caracteriza por la presencia de un gran número de diferentes géneros y especies de levaduras (1). La presencia y el número de especies puede variar de acuerdo a las condiciones climáticas, variedad de materia prima, prácticas de proceso, etc. (2). Existen diferentes metodologías para la identificación de microorganismos basadas en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), que son útiles para diferenciar entre especies. El gen 18S permite discriminar entre especies de levaduras (3).

El objetivo del presente estudio fue identificar por PCR-RFLP del gen 18S las levaduras predominantes en la fermentación natural del mezcal duranguense.

Metodología. Se aislaron siete cepas de dos regiones productoras de mezcal: Nombre de Dios y El Mezquital, Durango. Se llevó a cabo una extracción de ADN. Se amplificó el gen 18S empleando los oligonucleótidos NP3 (CCG TTG GTG AAC CAG CGG AGG GAT C) y NP10 (TCC GCT TAT TGA TAT GCT TAA G). Al producto de amplificación se le realizó una gestión con las endonucleasas: *EcoRI*, *BamHI*, *HpaI*, *MspI*, *XhoI* y *HindIII*. Posteriormente se llevó a cabo la secuenciación del gen 18S. Las secuencias estas fueron comparadas con los bancos de genes especializados.

Resultados y discusión. La Fig. 1 muestra los fragmentos obtenidos por la digestión de las endonucleasas, y se observan fragmentos de corte únicos, en la mayoría de las cepas, excepto para las cepas 1, 3 y 6.

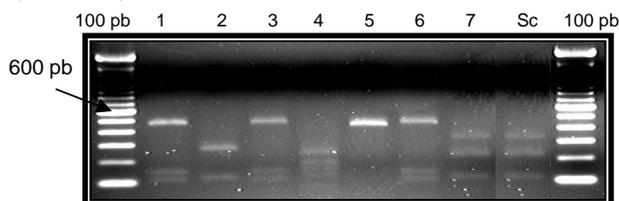


Fig 1. Fragmentos del gen 18 S ADNr de 7 cepas de levaduras generados por la digestión con las endonucleasas *EcoRI*, *HindIII*, *HpaI* y *MspI*. Carril 1 y 10 Marcador Molecular 100 pb DNA Ladder. Carril 2 – 9 cepas de levaduras.

El Cuadro 1, muestra la identificación obtenida por secuenciación, en Nombre de Dios existe una mayor diversidad microbiana que El Mezquital, sin embargo aún cuando la diversidad es mayor, no se encontraron levaduras del género *S. cerevisiae*, que ha sido reportada como microorganismo predominante en las fermentaciones de mezcal (4).

Cuadro 1. Identificación de las cepas por PCR – secuenciación y % de identidad.

Región	Cepa	Identificación por secuenciación	% de identidad
Nombre de Dios.	1	<i>K. marxianus</i>	97
	2	<i>C. lusitaniae</i>	99
	4	<i>S. castellii</i>	92
	5	<i>S. unisporus</i>	89
El Mezquital	6	<i>K. marxianus</i>	97
	7	<i>S. cerevisiae</i>	99
Control	Sc	<i>S. cerevisiae</i>	99

Conclusiones. Existe diferencia en la diversidad microbiana entre las regiones productoras. En Nombre de Dios no se encontró *S. cerevisiae*. En la mayoría de los casos se logró la identificación a nivel de género y especie con un porcentaje de identidad superior al 95%.

Bibliografía.

- (1) Heard G.M., Fleet G.H. (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J Applied Bacteriol* 65, 23–28.
- (2) Querol A., Jiménez M., Huerta T. (1990). A study on microbiological and oenological parameters during fermentation of must from poor and normal grapes harvest in the region of Alicante (Spain). *J Food Science* 55, 1603–1606.
- (3) Capace A., Salzano G., Romano P. (2003). Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *J Food Microbiol* 84, 33–39.
- (4) Lappe-Oliveras P., Moreno-Terrazas R., Arrizón-Gaviñón J., Herrera-Suárez T., García-Mendoza A. and Gschaedler-Mathis A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Res* 8. 1037-1052.