

CARACTERIZACION DE UNA LEVADURA AISLADA DE TUBA DEL ESTADO DE GUERRERO

Sandra Hernández Hernández¹, Ma. Elena Moreno Godínez², Gerardo Huerta Beristain¹.

¹Laboratorio de Investigación en Biotecnología, ²Laboratorio de Investigación en Toxicología y Salud Ambiental. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, Gro., 39000, sandyhdez29@gmail.com; hbgerardo@gmail.com

Palabras clave: Fermentación, Levadura, identificación

Introducción. La palma de *Cocos nucifera* L. es típica de regiones tropicales, representa un recurso clave con alto valor económico (Alvarado-Segura *et al.*, 2012). Uno de los productos obtenidos de la palma es la Tuba, bebida fermentada de manera espontánea, donde se ha reportado el desarrollo de fermentaciones alcohólica, láctica y acética. (Santiago-Urbina *et al.*, 2014). Sin embargo, la información acerca de las levaduras que participan en la fermentación de la bebida no es conocida (Barbosa *et al.*, 2018). En la actualidad, una de las técnicas moleculares basadas en el análisis de restricción del gen rRNA 5.8S y los espaciadores de transcritos internos (ITS1 e ITS2); secuenciación del dominio D1/D2 del gen 26S rRNA de aislados, estas regiones permiten identificar de manera eficaz especies de hongos y levaduras, debido a que es una de las técnicas más empleada por ser rápida, sensible y específica, lo que ha permitido obtener información sobre la población de levaduras existente en alimentos elaborados artesanalmente. (Stringini *et al.*, 2009; Cortés *et al.*, 2014).

En base a lo anterior en el presente trabajo se realizó la caracterización de una cepa de levadura aislada de la tuba mediante análisis de restricción del gen rRNA ITS1-5.8S-ITS2 para identificar la especie de levadura.

Metodología. Se aislaron diferentes cepas de levaduras (por diluciones seriadas en agua peptonada estéril al 0.1% p/v) a partir de la savia de *cocos nucifera* L. fermentada y colectada en una parcela en Acapulco, Guerrero. El medio de aislamiento de levaduras fue agar nutritivo Wallerstein Laboratories (WL, Difco), con cloranfenicol al 0.01% p/v (Cocolin *et al.* 2000; Verdugo Valdez *et al.* 2011) a 30°C y de 3-5 días. La purificación de una cepa de levadura se realizó en medio YPD, y esta se denominó M2. El ADN genómico se extrajo mediante un kit comercial. La identificación molecular de M2 se realizó por PCR según las condiciones descritas por Esteve-Zaroso *et al.*, 1999 usando los oligonucleótidos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') y el ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del rRNA ITS1-5.8S-ITS2 con las enzimas de restricción *Hae* III, *Hinf* I y *Hha* I. El tamaño de los fragmentos fue determinado por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% usando un marcador de 50 pb.

Resultados. En la **Figura 1A** se muestran diferentes cepas de levaduras aisladas en el medio selectivo WL, seguida de la **Figura 1B** donde se muestra la cepa de levadura purificada denominada M2. El fragmento de PCR obtenido de la cepa M2, correspondiente a la región ITS1-5.8S-ITS2 fue de 500 pb **Figura 1C**. Este tamaño de fragmento ha sido reportado por Santiago-Urbina, *et al.*, en 2014 para especies de levaduras aislados en la taberna (bebida fermentada) reportando un rango de 390-850 pb para este fragmento entre las diferentes especies de levaduras aisladas. Los resultados de los RFLP del fragmento ITS1-5.8S-

ITS2 con las enzimas *Hae* III, *Hinf* I y *Hha* I arrojaron fragmentos de diferentes tamaños **Figura 1C** mostrados en la **Tabla 1**, para la identificación de la especie de la levadura, los fragmentos de los RFLP fueron comparados en la base de datos en <https://yeast-id.org/>, una base de datos de perfiles ITS RFLPs de levaduras, en el cual se obtuvo como resultado un 75% de similitud con *Pichia orientalis*.

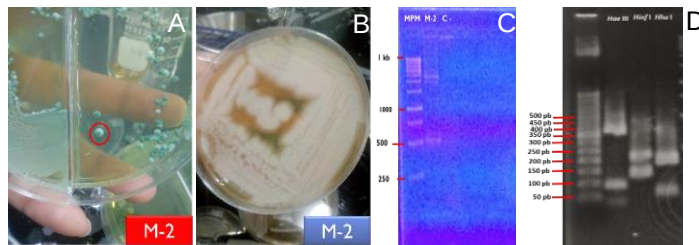


Fig. 1. Aislamiento e identificación de cepa de levadura. 1A) Cepas de levaduras en medio WL. 1B) Cepa de levadura M2 en medio YPD. 1C) PCR de la levadura aislada. 1D) RFLP de cepa M2.

Tabla 1. Patrones de restricción de la región ITS-5.8S de la cepa M2

Cepa	Región	Fragmentos de restricción (pb)		
		<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Hha</i> I
Cepa M-2 (Datos propios)	500 pb	25+100+375	120+130+250	75+200+225
Cepa	Región	Fragmentos de restricción (pb)		
		<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Cfo</i> I
<i>Pichia orientalis</i> (Datos obtenidos de https://yeast-id.org/)	510 pb	38+90+382	137+154+219	6+52+69+179+204

Conclusiones. La levadura aislada de la savia de *Cocos nucifera* L. tiene 75% de similitud con *Pichia orientalis*. Este resultado plantea la necesidad de conocer la diversidad de levaduras presentes durante las etapas de fermentación y su funcionalidad de estas levaduras.

Bibliografía.

- Alvarado-Segura A *et al.* (2012) *Nordic J. B.* 30:613–622.
- Barbosa F *et al.* (2018) *Braz J Microbiol.* 359:1-8.
- Cocolin L *et al.* (2000) *FEMS.* 189:81-87.
- Esteve-Zaroso B *et al.* (1999) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:329-337.
- Santiago-Urbina J, y Ruiz-Terán F (2014) *Int. J Food Res J.* 21(4):1261-1269.
- Verdugo A, *et al.* (2011) *Anton Leeuw.* 100:497-506.
- Stringini M (2009) *Food Microbiol.* 26:415–420.
- Cortés L (2014) *Revista Iberoamericana de Ciencias* 1(7):45-58.

