

Aislamiento de Levaduras Killer en Alimentos

R. Gamboa-Martínez¹, A.A. Sánchez-González¹, M.P. Sangorrín², M. Elizondo-Zertuche³, R. Treviño-Rangel³, G.M. González³ y E.R. Robledo-Leal¹.

1 Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Nuevo León. **2** Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de Levaduras, Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas, Universidad Nacional del Comahue, Facultad de Ingeniería, Neuquén, Argentina. **3** Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. regina.gamboam@gmail.com y aleixa.zg@gmail.com

RESUMEN:

Las levaduras killer, se caracterizan por secretar una toxina proteica, llamada "toxina killer" que es letal para cepas sensibles de su misma especie o especies de diferentes géneros, pero siendo ellas mismas inmunes a sus propias toxinas. Estas pueden ser utilizadas como biocontrol en la poscosecha de alimentos. Se tomaron muestras de tepache y queso fresco del cual se aislaron 7 y 8 levaduras en el medio YEPD (Extracto de levadura, peptona, dextrosa y agar bacteriológico) se incubaron a 25°C por 48h. Se realizó el ensayo Killer para dichas levaduras en placas con agar YEPD-MB (Extracto de levadura, peptona, dextrosa, agar bacteriológico con azul de metileno), realizando 8 divisiones en la placa cada levadura susceptible del panel se inoculó a manera de césped (ATCC26609, Ca023, VG028, Derma5, RG001 y WG002) para posteriormente agregar en cada división una levadura aislada y la levadura control LALVIN (Killer) y se incubaron a 25°C por 48 horas. Obteniendo 6 levaduras con el fenotipo Killer para el tepache y 7 levaduras en el queso fresco, la conservación de las cepas se llevó a cabo en tubos falcón con una solución de glicerol 20% y agua destilada 80%. Posteriormente permanecen en congelación a 4° C. **Palabras clave:** Alimentos, Biocontrol, Levaduras Killer, Queso fresco y Tepache.

ABSTRACT:

Killer yeasts are characterized by secreting a toxin protein, called "killer toxin" that is lethal to sensitive strains of the same species of different genus, but being themselves immune to their own toxins. Tepache and fresh cheese samples were collected from which 16 and 8 yeast were isolated in YEPD medium (yeast extract, peptone, dextrose and bacteriological agar) which were incubated at 25°C for 48 hours. The Killer assay for these yeasts was performed on petri dishes with YEPD-MB agar (yeast extract, peptone, dextrose, bacteriological agar with methylene blue), making 8 divisions on the petri dish, each susceptible yeast from the panel was inoculated as a lawn (ATCC26609, Ca023, VG028, Derma5, RG001 and WG002) adding after this an isolated yeast and LALVIN control (Killer) yeast in each division and allowed to incubated at 25°C for 48 hours. Six yeasts were obtained with the Killer phenotype for the tepache and 7 yeasts in the fresh cheese; the preservation of the strains was carried out in falcon tubes with a solution of 20% glycerol and 80% distilled water. Afterwards they remain in freezing at 4° C.

Keywords: Biocontrol, Food, Fresh Cheese, Killer Yeast and Tepache.

INTRODUCCIÓN

Las cepas de levaduras Killer fueron descubiertas por Bevan y Makower (1963), quienes demostraron que existen tres fenotipos: killer, neutro y sensible respecto al carácter killer. Las levaduras killer, se caracterizan por secretar una toxina proteica, llamada “toxina killer” que es letal para cepas sensibles de su misma especie o especies de diferentes géneros, pero siendo ellas mismas inmunes a sus propias toxinas. La toxina proteica secretada, se fija sobre receptores glucosídicos de la pared celular de la cepa killer-sensible interfiriendo en el gradiente electroquímico de la membrana citoplasmática, lo que implica la muerte celular. Las levaduras en la industria de alimentos son un grupo de microorganismos importantes y necesarios para procesos de alimentos como quesos, vino, cerveza y pan. Ya que estas son las responsables de los cambios organolépticos de una diversa cantidad de alimentos, en especial los alimentos con un pH ácido, A_w bajo, con conservadores o poco oxígeno, estas condiciones generan un ambiente con poca posibilidad de proliferación de bacterias. Actualmente hay una alta demanda por parte de consumidores agrícolas en el uso de microorganismos utilizados como una alternativa para el control biológico de la cosecha en lugar de fungicidas, insecticidas, entre otros. Las levaduras con la toxina Killer han logrado mostrar un gran potencial como inhibidores de hongos patógenos en poscosecha (Robledo-Leal, 2016). El presente trabajo tiene como objetivo crear una extensa colección de levaduras que presenten el fenotipo Killer aisladas de alimentos fermentados sin procesar como Tepache y Queso panela fresco para lograr expandir la investigación del efecto Killer en hongos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las levaduras empleadas en este proyecto fueron aisladas de tepache y queso fresco, y se tuvo un panel de levaduras susceptibles: LALVIN (como Killer), ATCC26609, Ca023, VG028, Derma5, RG001 y WG002 (como susceptibles), pertenecientes a la colección del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas UANL.

Procesado de las muestras

Para el tepache se tomó una muestra concentrada de 1 ml, se colocó en un tubo Eppendorf y se realizaron diluciones seriadas con solución salina estéril hasta 10^{-5} en tubos Eppendorf. Se vertió 0.1 ml de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en placas de agar YEPD (Extracto de levadura, peptona, dextrosa y agar bacteriológico) y se incubaron a 25°C por 48 h. El queso panela fresco se tomó una muestra de 3 g en un mortero con 3 ml de solución salina, se realizaron diluciones seriadas con solución salina estéril hasta 10^{-5} en tubos Eppendorf. Se vertió 0.1 ml de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en placas de agar YEPD (Extracto de levadura, peptona, dextrosa y agar bacteriológico) y se incubaron a 25°C por 48 horas.

Aislamiento

Se observó morfología macroscópica y microscópica de las colonias típicas de las levaduras que se presentaron en las placas. Se seleccionaron colonias blancas - amarillentas, convexas, brillantes y se observaron en 40X. Posteriormente las colonias se sembraron en YEPD (Extracto de levadura, peptona, dextrosa y agar bacteriológico) por estría de cuatro cuadrantes y se incubaron a 25°C por 48h.

Ensayo Killer

Para un panel de 7 levaduras aisladas de tepache o queso se asignaron 6 placas estériles con agar YEPD-MB (Extracto de levadura, peptona, dextrosa, agar bacteriológico con azul de metileno) fraccionadas cada una en 8 divisiones. Cada levadura susceptible del panel se inoculó a manera de césped (ATCC26609, Ca023, VG028, Derma5, RG001 y WG002) para posteriormente agregar en cada división una levadura aislada y la levadura control LALVIN (Killer) y se dejaron incubar a 25°C por 48 horas.

Conservación de las cepas

Realizar un cultivo abundante en agar YEPD (Extracto de levadura, peptona, dextrosa y agar bacteriológico) y utilizando hisopos se toma el inoculó y se coloca en los tubos falcón con una solución de glicerol 20 % y agua destilada 80%. Posteriormente permanecen en congelación a 4° C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que de las 16 levaduras aisladas del tepache y de las 8 levaduras aisladas del queso fresco, 6 y 7 respectivamente, presentaron el fenotipo Killer o toxinas Killer (Tabla I). Estas toxinas, de naturaleza proteica y con actividad demostrada contra un gran número de patógenos humanos, tanto de origen fúngico como bacteriano, son producidas por distintas especies de levaduras procedentes de los ambientes más diversos (2). Las levaduras killer pueden proveer un método alternativo para el control de levaduras no deseadas como el crecimiento de las levaduras indígenas durante la fermentación enológica (3). Actualmente existe una demanda por parte de los consumidores de productos agrícolas que provengan de un sistema de manejo agronómico donde la aplicación de químicos como fertilizantes, fungicidas e insecticidas sea poca o nula, por lo que ha incrementado la búsqueda de nuevos agentes de control. Las levaduras han mostrado tener un gran potencial como antagonistas a hongos patógenos en poscosecha. Sus principales mecanismos de control biológico se basan en la competencia de espacio y nutrientes, producción de enzimas hidrolíticas y toxinas Killer (4). Esta investigación sigue en desarrollo con el objetivo de demostrar la utilidad de las levaduras con el fenotipo killer como biocontrol en la poscosecha de frutas y verduras.

Tabla I. Pruebas Killer a levaduras aisladas.

Levaduras Killer	Panel / Susceptibles						
	Ca023	VG028	ATCC	Derma 5	RG001	WG002	
WG001	--	--	--	--	--	--	Tepache
WG002	--	--	--	--	--	--	
WG003	--	--	--	--	--	--	
WG004	--	+	+	--	--	--	
WG005	+	+	+	+	--	--	
WG006	+	+	+	+	--	--	
WG007	--	+	--	--	--	--	
RG001	--	--	--	--	--	--	
RG002	--	--	--	--	--	--	
RG003	--	--	--	--	--	--	
RG004	--	--	--	--	--	--	
RG005	--	--	--	--	--	--	
RG006	--	--	--	--	--	--	
RG007	--	--	--	--	--	--	
RG008	--	--	+	--	+	--	
RG009	--	--	+	--	+	--	
AG001	+	--	+	+	--	--	Queso Fresco
AG002	+	--	+	+	--	--	
AG003	+	--	+	+	--	--	
AG004	+	--	+	+	--	--	
AG005	+	--	+	+	--	--	
AG006	+	--	+	+	--	--	
AG007	--	--	--	--	--	--	
AG008	+	--	+	+	--	--	

BIBLIOGRAFÍA

1. Bustamante Valdés, L., & Abaca Castillo, E. P. (2010). *Sistema Killer de levaduras* (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Tecnología Médica.).
2. Sangorrín, M. P., Lopes, C. A., Rivero, A., & Caballero, A. C.. (2007). Identificación rápida y sensibilidad a toxinas killer de levaduras aisladas de micosis no sistémicas. *Revista argentina de microbiología*, 39(4), 230-236. Recuperado en 06 de mayo de 2017, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412007000400011&lng=es&tlng=es.
3. Nally, M.C., Maturano, Y.P., Vázquez, F., & Toro, M.E.. (2005). Behaviour of a wild *Saccharomyces cerevisiae* killer yeast and its isogenic sensitive one with respect to different nitrogen sources in mixed cultures. *Revista argentina de microbiología*, 37(2), 73-77. Recuperado en 06 de mayo de 2017, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412005000200002&lng=es&tlng=en.
4. Hernández-Montiel, L. G., Larralde-Corona, C. P., Vero, S., López-Aburto, M. G., Ochoa, J. L., & Ascencio-Valle, F. (2010). Caracterización de levaduras *Debaryomyces hansenii* para el control biológico de la podredumbre azul del limón mexicano Characterization of yeast *Debaryomyces hansenii* for the biological control of blue mold decay of Mexican lemon. *CyTA- Journal of Food*, 8(1), 49-56.
5. Robledo-Leal, E., Elizondo-Zertuche, M., Treviño-Rangel, R., M. González, G., Hernández-Luna, C., Huerta-González, N. (2016). Aislamiento de levaduras killer a partir de hormigas del género *Atta* y su efecto sobre el hongo patógeno del tomate rojo *Geotrichum candidum*. Universidad Autónoma de Nuevo León (Mexico), Facultad de Ciencias Biológicas.