

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Tipificación de cepas de *S. cerevisiae* aisladas de fermentaciones para la producción de mezcal y tequila, utilizando la amplificación por la PCR de los fragmentos  $\delta$ .**

**TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN CONTINUA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**LINA RAQUEL ALFÉREZ JIMÉNEZ**

**MÉXICO DF**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

## JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. María del Socorro Alpízar Ramos  
Vocal: Prof. Agustín Reyo Herrera  
Secretario: Prof. Beatriz de Guadalupe Serrano López  
1er sup.: Prof. Ruth Edith Martín Fuentes  
2do sup.: Prof. Zoila Nieto Villalobos

Sitio en donde se desarrolló el tema: Facultad de Química, Edificio "E" Lab.321. Ciudad Universitaria.

-----  
**Asesor:** María del Socorro Alpízar Ramos

-----  
**Sustentante:** Lina Raquel Alférez Jiménez

---

## **AGRADECIMIENTOS:**

Primeramente quiero agradecer a Dios por darme la vida y la oportunidad de haber recorrido lo poco que llevo de camino y por lo que me falta por recorrer.

A ti Madre linda y adorada que tantos esfuerzos y sacrificios has hecho por mí. Y porque siempre has estado a mi lado para apoyarme y no dejarme vencer en los momentos más difíciles.

A mi Padre que me ha apoyado en todo el transcurso de mi vida y mis estudios.

A mis hermanos Héctor Israel, David Aarón, Alberto Isaac, por el apoyo que me han dado como amigos y hermanos.

---

A mi Universidad Nacional Autónoma de México que tanto me dio y me seguirá dando por el resto de mi vida.

Y a mi Facultad de Química por darme los conocimientos que he adquirido y ahora desempeño en el área laboral.

---

## ÍNDICE

	Página
<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>8</b>
2.1    Métodos de tipificación	8
2.1.1    Campo Pulsado	8
2.1.2    Interdeltas (deltas)	8
2.1.3    Microsatélites	10
2.2    Tequila y Mezcal	11
2.2.1    Tequila	12
2.2.2    Mezcal	13
2.2.3    Diferencias entre el Tequila y el Mezcal	14
<b>3. Objetivos</b>	<b>18</b>
3.1    Objetivos Generales	18
3.1.1    Objetivos Particulares	18
<b>4. Hipótesis</b>	<b>19</b>
<b>5. Materiales y Métodos</b>	<b>20</b>
5.1    Obtención de Cepas	20
5.2    Cultivo, Purificación y Conservación de cepas	20
5.3    Extracción de DNA	21
5.4    Cuantificación de DNA	22



5.5	Amplificación de los fragmentos delta utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, a diferentes concentraciones: 20, 50 y 100ng de DNA.	22
<b>6 .</b>	<b>Resultados</b>	<b>24</b>
<b>7 .</b>	<b>Análisis de Resultados</b>	<b>28</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>30</b>
<b>9.</b>	<b>Referencias</b>	<b>32</b>

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Un alimento o bebida fermentada, es aquel en el que la matriz original ha sido modificada por la acción de uno o varios microorganismos en condiciones de baja concentración de oxígeno y que al final del proceso de elaboración, tiene características distintas a la materia prima original pero satisfactorias en cuanto a sabor y aroma debidas, en parte, a la acción de los microorganismos.

A través de las fermentaciones alimentarias ha sido posible preservar y enriquecer los alimentos así como acceder a una variedad de nuevas texturas y sabores (Wacher 1993).

Durante muchos años en México se han producido bebidas fermentadas, originadas por una microbiota que puede estar constituida por bacterias, hongos y levaduras, de forma natural o por un cultivo que se adicione, dependiendo el lugar y la región donde se produzca. Algunas de estas bebidas son: pulque, mezcal, cerveza, tequila, agua miel, vino entre muchas más.

En cada una de estas bebidas varía la concentración y el tipo de la microbiota.

Las bebidas que se utilizaron en este trabajo fueron tequila y mezcal, donde el estudio de interés fue *Saccharomyces cerevisiae*. Con la finalidad de determinar si las



---

cepas puras de *Saccharomyces cerevisiae* en tequila son iguales a las cepas que contiene el mezcal.

Lo anteriormente mencionado se realizó con cepas puras de tequila y mezcal a los diferentes tiempos de fermentación, para extraer el DNA geonómico y después hacer la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fragmentos delta.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), permite la amplificación selectiva de una región específica de DNA, mimetizando el fenómeno *in vivo* de replicación de DNA. Para la reacción se necesitan los siguientes componentes: una cadena sencilla de DNA como blanco, iniciadores (secuencia de oligonucleótidos complementaria a los extremos de la secuencia definida de DNA a amplificar), desoxinucleótidos trifosfato, una enzima DNA polimerasa termoestable [6].

El punto de inicio de la síntesis de DNA se puede especificar adicionando un iniciador específico que se alinee, mediante el apareamiento de todas sus bases, a la secuencia blanco en ese punto. Así la primera característica importante de la PCR es que la DNA polimerasa puede ser dirigida para sintetizar una región específica de DNA [7].

Para una reacción de PCR específica, los iniciadores elegidos son aquellos que flanquean la región que va a ser amplificada. Así las nuevas cadenas de DNA

---

sintetizadas, que comprenden al iniciador, se extienden hacia la posición de éste, localizado en la cadena complementaria.

El resultado neto de una reacción de PCR, es que al fin de un número determinado de ciclos ( $n$ ), la reacción contiene teóricamente un máximo de  $2 \times n$  moléculas de DNA de doble cadena que son copias de la secuencia de DNA presente entre los iniciadores. Así la segunda característica importante de la PCR es la amplificación exponencial de grandes cantidades de la región específica de DNA [7].

Al calentamiento para separación del DNA de doble cadena, al alineamiento específico de los iniciadores a la cadena sencilla de DNA blanco y a la extensión de las nuevas cadenas de DNA, se les denomina como un ciclo de PCR, y los pasos se denominan: desnaturalización, alineamiento y extensión, respectivamente. Cada uno de estos pasos requiere de condiciones de temperatura y tiempo específico.

---

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Métodos de tipificación

En los últimos años las metodologías de tipificación basadas en el polimorfismo del DNA han tenido grandes avances, lo cual ha permitido discriminar entre cepas de levaduras, particularmente aquellas que son utilizadas en la industria de bebidas. Esto ha tenido como consecuencia, una mejor selección de las cepas utilizadas en la producción de vinos, cervezas, etcétera. [1]

#### 2.1.1 Campo Pulsado

La separación de cromosomas, por ejemplo, utilizando la metodología de electroforesis en campo pulsado, permite revelar la variabilidad en la constitución cromosomal de cepas de levadura. Esto lo hace un método útil para la caracterización de cepas, por lo cual es de gran utilidad en cepas de uso en la industria alimenticia.

#### 2.1.2 Interdeltas (deltas)

Por otro lado tenemos el uso del protocolo PCR basado en amplificación de región interdelta, la cual fue inicialmente propuesta en 1993. Elementos delta del flanco LTR, transposón TY1 y TY2 son encontrados en levaduras [5]. El genoma de *S. cerevisiae* contiene secuencias repetidas de DNA entre las cuales las secuencias  $\delta$  están asociadas

---

con el transposón Ty1. El número y la localización de estos elementos en el genoma de *S. cerevisiae* tienen una variabilidad intra específica que sirve como una huella que permite diferenciar a cepas de *S.cerevisiae* [1].

Pero pueden también ser encontrados y separados de estos retrotransposones y ser llamados sólo **elementos delta**.

Cerca de 300 elementos delta, semejantes descritos en el genoma S288C, son buenos candidatos blancos para la identificación polimórfica.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por otra parte, permite amplificar estas secuencias  $\delta$  repetidas, con la ayuda de cebadores específicos, lo cual nos deja obtener, en electroforesis de gel de agarosa, un perfil de estas secuencias con un gran poder discriminativo para el análisis de cepas de interés comercial. La tipificación, utilizando la metodología de la PCR-fragmentos delta, tiene un poder de discriminación parecido al campo pulsado. El poder discriminativo de la PCR basado en interdeltas de cepas de *S.cerevisiae* depende del par de cebadores que se use.

El método de interdeltas es utilizado con frecuencia para análisis de rutina de cepas puras de levaduras.

---

### 2.1.3 Microsatélites

Por otro lado los microsatélites o secuencias simples repetitivas (SSR-Simple Sequence Repeat) son secuencias pequeñas de 1 a 4 nucleótidos que se repiten en bloque. En los genomas de los organismos eucarióticos; estas secuencias simples son más frecuentes, bien distribuidas y presentan loci genéticos altamente polimórficos [2].

Este tipo de secuencias varía entre animales y vegetales. Por ejemplo, en mamíferos las secuencias más comunes son (GT) $n$  y (CA) $n$ , donde “ $n$ ” representa el número de veces que se repite la secuencia; en plantas, las secuencias más comunes son (AA) $n$  y (AT) $n$ .

Los microsatélites pueden ser amplificados individualmente vía PCR, utilizando un par de “primers” especialmente diseñados (de 20-30 bases), complementarios a las secuencias únicas que limitan (flanquean) los microsatélites. Los segmentos amplificados son separados por electroforesis en un gel de agarosa y visualizados, después de la tinción con bromuro de etidio, en una pantalla con luz ultravioleta [2].

Las bases moleculares de polimorfismo radican en la diferencia del número de unidades repetitivas en los diferentes loci de microsatélites. Cada segmento, de tamaño diferente representa un alelo diferente de un locus.

---

Las ventajas que ofrecen los microsatélites vía PCR son:

1. Su alto polimorfismo.
2. Son codominantes, lo que permite diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos
3. Disponibilidad de una buena colección de diferentes microsatélites, algunos de los cuales ocurren en alto número de copias.
4. Están ligeramente dispersos a través del genoma
5. La técnica puede ser automatizada.

Por estas características, los microsatélites son ideales para el mapeo genético y mapeo físico de genomas, para la identificación y discriminación de genotipos y para estudios de genética de poblaciones.

## 2.2 Tequila y Mezcal

El Agave es una planta que tiene su origen en México (Granados Sánchez 1993) y que se ha utilizado desde los primeros pobladores para obtener una variedad de productos básicos, entre los que destacan algunas bebidas de bajo contenido alcohólico que posteriormente dieron origen a destilados como el tequila y el mezcal.

---

### 2.2.1 Tequila

Existen diferentes versiones acerca del origen de la palabra Tequila:

“Tecuilas” o Ticuilas”, nombre que recibía una tribu indígena, cuyos integrantes elaboraban rudimentariamente el “Tequila”.

Una segunda versión menciona que la palabra “Tequila”, proviene del vocablo náhuatl “tequiltilam”, que significa “lugar donde son abundantes los tributos”.

El origen de la bebida tiene un relato mágico, el cual narra que un rayo cayó sobre unos agaves, los cuales con la descarga dejaron al descubierto el corazón del maguey, que éste luego ardió y generó un líquido cristalino de buen sabor, proceso que fue recreado por los indígenas.

En 1750 se fabrica de manera industrial por primera vez el Tequila en Amatitlán Jalisco.

El tequila hace referencia a una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, dentro de las instalaciones de la fábrica, derivado de la molienda de las cabezas maduras de *Agave Tequilana Weber var azul*, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras cultivadas o no, siendo susceptible a ser enriquecido por otros azúcares hasta en un 49%. Tales carbohidratos pueden ser: azúcar de caña o

---

sacarosa, piloncillo, melazas de caña, jarabe de maíz e inulina; esta última no es directamente fermentable, pero se transforma en fructosa y glucosa por hidrólisis ácida durante la cocción.

En teoría cualquier tipo de azúcar fermentable por las levaduras puede emplearse para la formulación del mosto.

Cuando se trata de un tequila 100% agave, la única fuente de carbohidratos (CHO's) es la inulina.

### 2.2.2 Mezcal

El mezcal es un licor que se obtiene de la destilación de jugos fermentados de diferentes clases de Agave; su origen es mixto pues la bebida fermentada es obtenida a partir de agaves cocidos que se preparaban desde la llegada de los españoles, quienes introdujeron la destilación.

La palabra mezcal viene del náhuatl metl e ixcalli, que significan “agave cocido al horno”; se tiene conocimiento (Luna 1957; Blomberg 2000, Clavijero 1978) de que el corazón del Agave cocido era utilizado en tiempos prehispánicos para preparar una bebida de bajo contenido alcohólico y también como golosina, sin embargo no es hasta que los españoles introducen la destilación que el mezcal se produce como tal, por ello se dice que el origen del mezcal es mixto.



---

Aunque el mezcal se produce en diferentes estados del país, el estado de Oaxaca es el lugar en donde se concentra la mayor cantidad de productores. A pesar de la importancia que tiene la industria mezcalera en el país el método de elaboración sigue siendo rudimentario; el proceso de fermentación no se controla y los microorganismos que participan en la fermentación no han sido precisamente identificados. Hasta el momento no se han encontrado reportes en la bibliografía acerca de la cuantificación de compuestos genéricos en el mosto, ni de la influencia de los mismos en la calidad de la bebida, por otro lado tampoco existen referencias en relación con la caracterización de las levaduras presentes en las plantas de agave, en las melazas o en los mostos de los que se obtiene el mezcal.

### 2.2.3 Diferencias entre el Tequila y el Mezcal

El Mezcal se diferencia del Tequila en el proceso de elaboración, que en el caso de este último se encuentra más modernizado y adaptado a normas de calidad internacionales. La principal diferencia entre ambos es la materia prima con la cual se elabora, pues el tequila, por norma, sólo puede obtenerse del *A. tequilana weber* (agave azul), mientras que el mezcal puede prepararse con diferentes especies de agave, entre las que se encuentran: el *A. salmiana otto* (maguey verde), *A. weberi cela* (maguey de mezcal), *A. espérrima jácobi* (maguey de cerro), *A. potatorum zucc* (Tobalá) y el *A. angustifolia haw* o maguey espadín.



Figura 1. y 2 Planta *A. tequilana weber* (agave azul) y las piñas ya sin hojas.

El proceso de fermentación del mezcal es abierto y espontáneo a diferencia de la elaboración del tequila, en donde se utilizan inóculos (*Saccharomyces cerevisiae*). La adición del inóculo es clave, ya que a partir de éste depende en buena medida el rendimiento del proceso y la calidad del producto.

En la industria se pueden tener diferentes fuentes de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*:

- Cepas puras de colección
- Cepas puras de la destilería o cultivos mixtos
- Levaduras de panificación con características de alta leudación.
- Levaduras secas preparadas para vino, cerveza y whisky.

---

Compuestos químicos que están presentes específicamente:

Tequila: 4,9-decadien, 2 amino, Nbutil

Mezcal: 5-metil-2-furancarboxialdehído

El ácido acético y 2-feniletil éster, son compuestos que están presentes en el mezcal pero no en el tequila.

El tequila tiene “denominación de origen”, la cual corresponde al estado de Jalisco; con 124 municipios por ejemplo Tlajomulco, Zapopan, Atoyac, Tequila, entre muchas otras.

En el estado de Guanajuato lo producen 7 municipios; en el estado de Michoacán 30, en tanto que el estado de Tamaulipas 11 y 8 municipios para el estado de Nayarit.

El mezcal también tiene “denominación de origen”; en el estado de Oaxaca existe una región denominada “Región del Mezcal”, la cual comprende los municipios de: Solá de Vega, Miahuatlán, Yautepec, Tlacolula, entre otros. Guerrero, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí, son otros estados de la República Mexicana que también tienen “denominación de origen”.

---

De acuerdo a las especificaciones de la NOM del Tequila y Mezcal:

	Tequila		Mezcal	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Contenido alcohólico (20°C)	35	55	36	55
Extracto seco g/l	0.0	5	0.2	10
Alcoholes superiores mg/100mL	20	500	100	400
Metanol mg/100mL	30	300	100	300

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

- Determinar por medio de la amplificación de los fragmentos delta, si hay diferencia entre cepas puras de *Saccharomyces cerevisiae* precedentes de fermentaciones de tequila y mezcal.

#### 3.1.1 Objetivos Particulares

- Determinar con que concentración de DNA (20ng, 50ng y 100ng) se obtienen las mejores amplificaciones, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, de los fragmentos delta de *S.cerevisiae*.
- Determinar qué par de primers ( $\delta 1$ - $\delta 2$ ), ( $\delta 12$ - $\delta 21$ ) o ( $\delta 2$ - $\delta 12$ ) da mejor resultado en la reacción en cadena de la polimerasa.

---

#### 4. HIPÓTESIS

Si se encuentran diferencias en los patrones de los fragmentos deltas amplificados por la PCR a partir de cepas puras de *S.cerevisiae*, entonces hay diferencias entre las cepas que fermentan de manera natural los mostos para producir tequila y mezcal

---

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Obtención de Cepas

Las cepas de tequila que se utilizaron fueron aisladas y caracterizadas a los diferentes tiempos de fermentación de un proceso industrial.

Las cepas de mezcal fueron aisladas y caracterizadas de mostos de agave *Potatorum* a los diferentes tiempos de fermentación en el monitoreo de la producción del mezcal.

### 5.2 Cultivo, Purificación y Conservación de cepas.

Las cepas de tequila y mezcal fueran cultivadas y purificadas en cajas Petri con medio extracto de malta YM (agar, 2 % glucosa, 0.5% peptone, 0.5% extracto de levadura y 0.5% extracto de malta), e incubadas ~ a 30°C hasta obtener crecimiento. Posteriormente pasarlas a tubos de ensayo con rosca que también contenían medio YM sólido; a partir de estas cepas se realizó la extracción de DNA.

En el medio YM pueden crecer hongos, bacterias y levaduras.

La conservación de estas cepas se llevó a cabo cultivándolas en medio YM líquido por 24hrs a ~30°C; después de este tiempo se puso en tubos Ependorff 0.7mL del medio con crecimiento y 0.3mL de glicerol estéril al 100% y se guardaron a -20°C y -80°C.

---

### 5.3 Extracción de DNA

Se tomó una asada de cada una de las cepas puras de tequila y mezcal, las cuales se incubaron toda una noche durante aproximadamente 18hr en tubos de centrífuga que contenían 10mL de medio YM líquido (glucosa, peptona, extracto de levadura, extracto de malta). Después de ese tiempo se centrifugaron los tubos en el equipo Beckman J2-21M/E a 10,000 rpm durante 10min; el sobrenadante se desechó, el precipitado se lavó con agua destilada y se volvió a centrifugar; al precipitado sobrante se le adicionaron 2mL de agua destilada estéril para resuspenderlo, del cual se tomó 1mL y se colocó en tubos Ependorff que se centrifugaron en un equipo HERMLE Z160M a 10,000 rpm durante 10min; se desecho el sobrenadante y al precipitado se le adicionaron 500 $\mu$ L de buffer de lisis (1M Tris-HCl pH 8.5, 5M NaCl, 0.5M EDTA pH 8, 20% SDS, ddH<sub>2</sub>O), además de pequeñas perlas de vidrio con diámetro de 0.5mm. (Thomas, USA), para después agitarlo en el vortex por 3min e incubar por 1hr a 65°C; después de haber transcurrido ese tiempo se volvió a mezclar en el vortex por 1min y se centrifugó por 10min a máxima velocidad (14,000rpm); el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Ependorff donde se le adicionaron 700 $\mu$ L de solución fenol-cloroformo 25:24:1, se mezcló en el vortex y se centrifugó a 14,000rpm durante 10min; inmediatamente se retira el sobrenadante (**NOTA:** se obtienen 3 capas).

Se tomó la primera capa y se colocó en un tubo Ependorff nuevo, adicionando 1mL de etanol frío a una concentración del 96%, se agitó suavemente y se centrifugó durante 10min a 10,000rpm; se retiró el sobrenadante con micropipeta y se dejó secar el precipitado obtenido y después se resuspendió en 40 $\mu$ L de agua desionizada estéril y se pusieron en un baño de agua caliente.



---

#### 5.4 Cuantificación de DNA

Una vez obtenido el DNA de las cepas puras de tequila y mezcal, se procedió a cuantificarlo de la siguiente manera:

Para determinar la pureza y concentración del DNA, se tomaron 2 $\mu$ l de DNA y se le adicionaron 18 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O desionizada estéril; la muestra se colocó en una celda de cuarzo y se leyó a una longitud de onda de 260 y 280 en un espectrofotómetro ajustado previamente a cero con agua desionizada; los valores de absorbancia obtenidos a la longitud de onda de 260 se dividieron entre los valores obtenidos a 280. Los valores de la relación DO260/DO280, alrededor de 1.8, fueron considerados como de mayor pureza para hacer la reacción de PCR.

El DNA se cuantificó tomando en cuenta la relación de 1 absorbancia = 50ng.

#### 5.5 Amplificación de los fragmentos delta utilizando la reacción de la polimerasa en cadena, a diferentes concentraciones: 20, 50 y 100ng de DNA.

Para la mezcla de reacción de PCR se utilizó buffer Tris Borato EDTA 10x (Ácido Bórico, EDTA, Trizma), cloruro de magnesio (Mg<sub>2</sub>Cl 50mM), desoxinucleótidos trifosfato d'ntps 10nM, par de primers 25pmol/ $\mu$ l ( $\delta$ 1- $\delta$ 2,  $\delta$ 2- $\delta$ 12,  $\delta$ 12- $\delta$ 21), TAG 1.25U/ $\mu$ l, DNAng/ $\mu$ L y H<sub>2</sub>O.

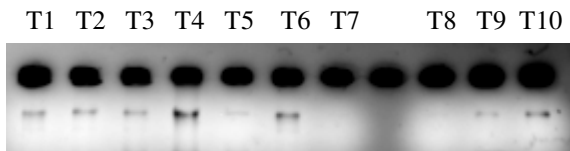
---

La mezcla se coloca en el equipo Biometra Tpersonal para iniciar con la desnaturalización a 95°C por 2 min., seguido de 35 ciclos usando el siguiente programa: 95°C por 30seg, 43.2°C por 1min 72°C por 1min seguido de la extensión a 72°C durante 10min. [1].

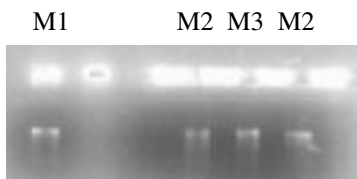
El producto de amplificación se separa por electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 30 V 240 min. y se revela con bromuro de etidio.

---

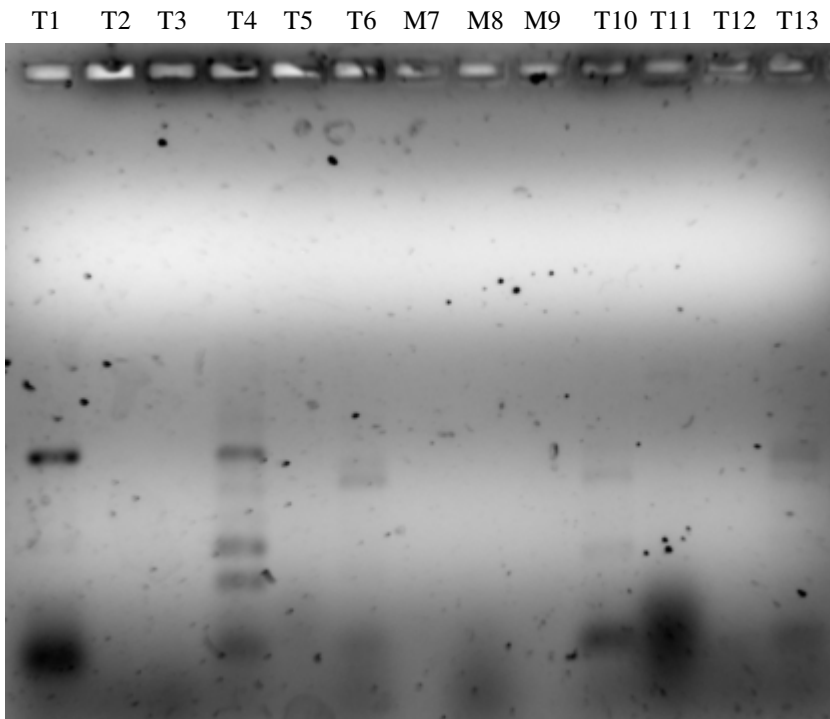
## 6. RESULTADOS



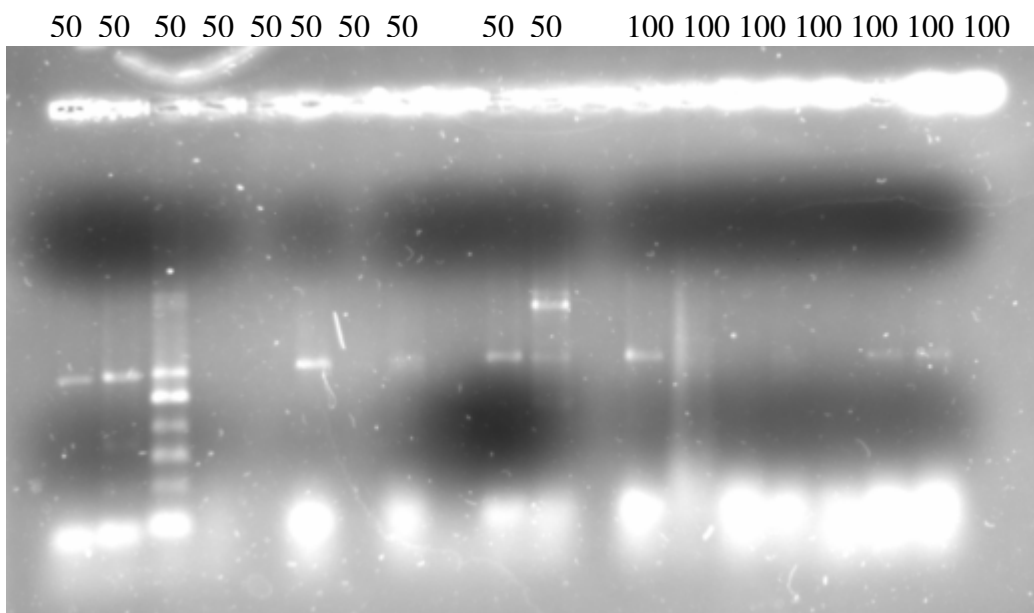
**Figura 1. Extracción de DNA genómico de cepas puras *S.cerevisiae* aisladas de un proceso industrial de tequila. Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 volts 40 min. Teñido con bromuro de etidio.**



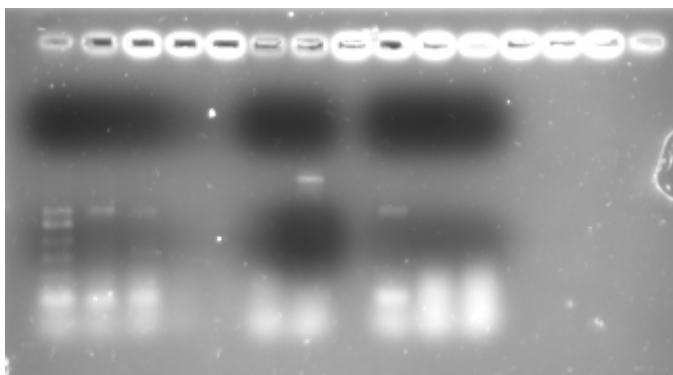
**Figura 2. Extracción de DNA genómico de cepas puras *S.cerevisiae* aisladas de mostos de agave potatorum mezcal. Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 volts 40 min. Teñido con bromuro de etidio.**



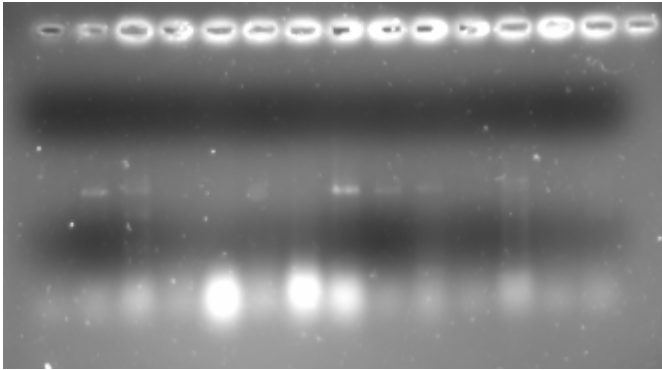
**Figura 3. Productos de PCR obtenidos después de la amplificación con el par de primer  $\delta 1$ - $\delta 2$ , con una concentración de 20 ng DNA de cepas puras *S.cerevisiae* de tequila y mezcal. Electroforesis en gel de agarosa a 30V 240min.**



**Figura 4.** Productos de PCR obtenidos después de la amplificación con el par de primer  $\delta 1$ - $\delta 2$ , con una concentración de 50 y 100 ng DNA de cepas puras *S.cerevisiae* de tequila y mezcal. Electroforesis en gel de agarosa a 30V 240min.



**Figura 5.** Producto PCR a una concentración de 50ng de DNA, par  $\delta 1$ - $\delta 2$ . Electroforesis en gel de agarosa al 2%, 30V 240min. Teñido con bromuro de etidio.



**Figura 6.** Producto de PCR a una concentración de 50ng de AND, par ( $\delta 12$ - $\delta 21$ ) Electroforesis en gel de agarosa al 2%, 30V 240min. Teñido con bromuro de etidio.

---

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En las figuras 1 y 2 se muestra la extracción de DNA de las cepas de Tequila y Mezcal respectivamente, las cuales nos indican que el DNA está libre de contaminación, por lo tanto está listo para utilizarse en la Reacción en Cadena de la Polimerasa. En algunos casos las bandas que muestran la presencia de DNA no se presentaron (7 y 8 Figura 1), pero aun así fueron utilizados en la mezcla de reacción para PCR y se obtuvieron resultados positivos.

Una vez que se tiene el DNA puro, se hicieron varias pruebas variando la concentración del mismo para ver con cuál se obtenía una amplificación que permitiera la distinción de los patrones de amplificación y no se viera afectada la reacción por un exceso del material genético.

La amplificación de DNA, de acuerdo a lo reportado por Jean-Luc 2003.[5] se comenzó con una concentración de 20ng de DNA, como se muestra en la Figura 3., en la cual no fue posible obtener una resolución adecuada de los patrones, en un gel de agarosa al 2 %. Lo mismo ocurrió a una concentración de 100ng, Figura 4.

Una vez que ya se sabía la concentración adecuada de DNA, se determinó con qué par de primers se obtenían mayor número de patrones en la técnica de PCR; los pares de primer que se utilizaron fueron el par ( $\delta 1$ - $\delta 2$ ) a una concentración de 50ng de DNA, en un

---

gel de agarosa al 2 %, como se muestra en la figura 5; el otro par ( $\delta 12$ - $\delta 21$ ) a también 50ng de DNA como se muestra en la Figura 6.



---

## 8. CONCLUSIONES

- La concentración adecuada de DNA para la técnica de PCR-fragmentos delta, donde se obtuvo una mejor resolución de los patrones; fue de 50ng en un gel de agarosa al 2%, 30V 240 min.
- El par de primer ( $\delta 1$ - $\delta 2$ ) da mayor número de patrones diferentes que el par ( $\delta 12$ - $\delta 21$ ). Todo lo contrario a lo reportado por la literatura [5]. Por lo tanto se utilizó el par ( $\delta 1$ - $\delta 2$ ) para la Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- Al utilizar la técnica de la PCR-Fragmentos delta, a una concentración de 50ng de DNA con el par de primer ( $\delta 1$ - $\delta 2$ ), se pudieron encontrar diferencias entre los patrones de las cepas de tequila y mezcal.
- Sí se encontraron diferencias utilizando la técnica de la PCR-Fragmentos delta para la tipificación de cepas puras de tequila y mezcal. Con los resultados obtenidos y lo revisado en la literatura, podemos decir que los Fragmentos delta son específicos de cada cepa; nos permiten diferenciar cepas de un producto respecto a otro, aunque no al 100%; ya que con las mismas características hay muchas más cepas; por lo tanto, con ayuda de éstos podemos agrupar las cepas de diferentes productos por grupos: las de tequila, mezcal, vino y así sucesivamente.

- 
- La importancia de este trabajo radica en que una vez sabiendo que hay diferencias entre las cepas del genero *S.cerevisiae* del tequila y el mezcal, podemos ver qué diferencias tienen estas cepas a nivel metabólico, qué carbohidratos consumen más y cuál es la producción de alcohol.

---

## 9. REFERENCIAS

- [1] **Dorit Schuller, Eva Valero, Sylvie Dequin, Margarida Casal;** 2004. *Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains.*
- [2] **Jean-Luc Legras, Olivier Ruh, Didier Merdinoglu, Francis Karst;** 2004. *Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of Saccharomyces cerevisiae strains.*
- [3] **Sambrook, J. Fritsch, E.F., Maniatis, T.** *Molecular cloning. A laboratory manual* Second edition 1989. CSH. E.U.A.
- [4] **Kurtzman, C. P. & Robnett, C.J.** 1998 Identification of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences, *Antonie van Leeuwenhoek* **73**:331- 371.
- [5] **Jean-Luc Legras, Francis Karst;** 2003. Optimisation of interdelta analysis for Saccharomyces cerevisiae strain characterisation.
- [6] **Rolfs, A., Schuller, Y., Finckh, U., y Weber-Rolfs, I.** PCR: clinical diagnostics and research. 1992. Editorial Springer Verlag, Alemania.
- [7] **Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski., y Zoller, M.** Recombinant DNA 2da ed. 1992 Scientific American Books. New York, USA. Cap 6.
- [8] **M. Cedeño Cruz and J. Álvarez Jacobs.** Production of tequila from agave, 1999 pag. 1-9.
- [9] **SECRETARIA DE ECONOMIA,** NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal- Especificaciones.

---

[10] **SECRETARIA DE ECONOMIA**, NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones.

[11] **C.Viti, D.Forni, S.Ventura, A.Messini, R.Materassi, L.Giovannetti** (200) Characterisation and typing of *Saccharomyces* strains by DNA fingerprinting. *Dipartimento di biotecnologie Agrarie, Universita degli Studi di Firenze, and Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi-CNR, Piazzale delle Cascina 27, 50144 Firenze, Italy.*