



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

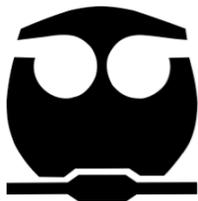
**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS  
CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*, AISLADAS  
DE LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL,  
PULQUE Y TEQUILA**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

**CECILIA COVA PÉREZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2010**



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: **MARICARMEN QUIRASCO BARUCH**  
Vocal: **FRANCISCO RUIZ TERÁN**  
Secretario: **GLORIA DÍAZ RUIZ**  
1er. Suplente: **SANDRA PAOLA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**  
2° Suplente: **ISMAEL BUSTOS JAIMES**

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 321 del Departamento de Biotecnología y Alimentos  
en el Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema: Dr. FRANCISCO RUIZ TERÁN \_\_\_\_\_

Sustentante: CECILIA COVA PÉREZ \_\_\_\_\_

*Dedicado a todas aquellas personas que contribuyeron a la  
realización de este trabajo.*

## *Agradecimientos...*

Mi más profundo agradecimiento a Dios, mi Señor, mi Guía, mi Proveedor y  
mi fin Último.

Gracias por todo y a todos los que por el simple hecho de estar en mi vida la han hecho  
mas bella y especial.

### *A mis padres...*

No hay personas en el mundo a las que les deba más, simplemente GRACIAS, por darme su apoyo, comprensión, consejos, amor y por contagiarme siempre de sus fortalezas.

### *A mis hermanos...*

Sin su apoyo ustedes, saben que no hubiera podido. Oswaldo gracias por ser el soporte; Argelia la mano mágica detrás de todo esto, Guille la personita que siempre te levanta el ánimo en momentos difíciles.

### *A mis amigos...*

Gracias por brindarme el precioso regalo de la amistad: Dianita Palma (amiga del alma), Rafa (mi papá postizo), Claudio, Edna, Selene, Bety, Laura, Norma y Sandra.

Quiero agradecer a mis todos mis compañeros del L-321.

### *A mis profesores*

Gracias a todos los profesores de la Facultad de Química, que tuvieron que ver con mi formación académica, especialmente al Dr. Francisco Ruiz por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto y al jurado revisor de esta tesis, por su tiempo, observaciones y sugerencias.

Un agradecimiento especial a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada durante la realización de mi tesis de licenciatura mediante el proyecto IN208908.

# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	v
<b>ÍNDICE DE TABLAS Y ESQUEMAS</b>	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	4
2.1 BEBIDAS ALCOHÓLICAS ELABORADAS A PARTIR DE <i>AGAVE</i>	4
2.2 EL GÉNERO <i>Saccharomyces</i>	7
2.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
2.3 MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS	9
2.3.1 Métodos para la identificación de levaduras a nivel de especie	10
2.3.2 Métodos para diferenciar levaduras a nivel de cepa	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	22
<b>4. OBJETIVO</b>	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	23
<b>5. HIPÓTESIS</b>	23
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	24
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	25
7.1 CEPAS DE ESTUDIO	25
7.2 RECONSTITUCIÓN DE CEPAS	25
7.3 EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS CEPAS AISLADAS DEL TEQUILA, MEZCAL Y PULQUE	26
7.4 CUANTIFICACIÓN DEL ADN: MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	27
7.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>S.cerevisiae</i>	27
7.6 TIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>S. cerevisiae</i>	29
7.6.1 Análisis de los fragmentos $\delta$	29
7.6.2 Electroforesis de gel de campo pulsado (PFGE)	30
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	33
8.1 CEPAS DE ESTUDIO	33
8.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS POR EL MÉTODO PCR-RFLP	34
8.2.1 PCR-RFLP de la región 5.8-ITS	34
8.2.2 PCR-RFLP del gen MET2	37
8.3 TIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
8.3.1 Análisis de los elementos $\delta$	39
8.3.2 Electroforesis de campo pulsado (PFGE)	42
<b>9. CONCLUSIONES</b>	55
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	56
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ADN ribosomal nuclear.	11
Figura 2. Diagramas esquemáticos de los equipos comúnmente utilizados para la electroforesis en campo pulsado.	20
Figura 3. Cámara de electroforesis de campo eléctrico homogéneo en contorno cerrado CHEF.	32
Figura 4. Amplificación de la región 5.8S-ITS de las cepas aisladas de las fermentaciones de: mezcal, pulque y tequila.	34
Figura 5. Perfil de restricción de las cepas aisladas de las fermentaciones de: mezcal, pulque y tequila, utilizando las enzimas: <i>CfoI</i> , <i>HaeIII</i> y <i>HinfI</i> .	35
Figura 6. Amplificación del gen MET2 de las cepas aisladas de las fermentaciones de: mezcal, pulque y tequila.	37
Figura 7. Perfil de restricción de las cepas aisladas de las fermentaciones de: mezcal, pulque y tequila, utilizando las enzimas: <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> .	38
Figura 8. Amplificación por PCR de los elementos $\delta$ de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas de las fermentaciones de: mezcal, pulque y tequila.	40
Figura 9. Electroforesis de campo pulsado del ADN cromosomal de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas de la fermentación del mezcal.	43
Figura 10. Electroforesis de campo pulsado del ADN cromosomal de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas de la fermentación del pulque.	43
Figura 11. Electroforesis de campo pulsado del ADN cromosomal de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas de la fermentación del tequila.	44
Figura 12. Perfil de separación de los cromosomas de <i>S. cerevisiae</i>	45
Figura 13. Patrón cromosomal de la región 1 (cromosomas XII y IV) de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas de las fermentaciones de mezcal, pulque y tequila.	46
Figura 14. Perfiles de separación cromosomal por PFGE de las cepas identificadas como <i>S. cerevisiae</i> pertenecientes al grupo “a”.	47
Figura 15. Perfiles de separación cromosomal por PFGE de las cepas identificadas como <i>S. cerevisiae</i> pertenecientes al grupo “b”.	47

## ÍNDICE DE TABLAS Y ESQUEMAS

Tabla 1. Características de las bebidas alcohólicas elaboradas a partir de <i>Agave</i> .	5
Tabla 2. Perfil de enzimas utilizado para la identificación de cepas pertenecientes al género <i>Saccharomyces sensu stricto</i> .	13
Tabla 3. Cepas de estudio aisladas de las fermentaciones de mezcal, pulque y tequila.	25
Tabla 4. Condiciones de amplificación para la región 5.8S-ITS y el gen MET2.	28
Tabla 5. Cepas de estudio aisladas de las fermentaciones de mezcal, pulque y tequila.	33
Tabla 6. Tamaño (en pb) del amplicón de la región 5.8S-ITS y de los fragmentos de restricción obtenidos con por las enzimas: <i>CofI</i> , <i>HaeIII</i> y <i>HinfI</i> .	35
Tabla 7. Tamaño (en pb) del amplicón del gen MET2 y de los fragmentos de restricción obtenidos por las enzimas: <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> .	38
Tabla 8. Tamaño (en pb) de los elementos $\delta$ de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas de las fermentaciones de mezcal, pulque y tequila.	41
Tabla 9. Comparación de los patrones cromosomales para las cepas de <i>S. cerevisiae</i> estudiadas.	51
Esquema 1. Métodos moleculares de identificación de levaduras.	10
Esquema 2. Estrategia experimental.	24
Esquema 3. Representación del polimorfismo de los cromosomas II, XIV, X y XI para las cepas del grupo “a”	49
Esquema 4. Representación del polimorfismo de los cromosomas II, XIV, X y XI para las cepas del grupo “b”.	49

## 1. INTRODUCCIÓN

El pulque, el mezcal y el tequila son bebidas alcohólicas tradicionales mexicanas producidas a partir del *Agave*. El pulque es producido por la fermentación de la sabia (aguamiel) del *Agave*; mientras que el mezcal y el tequila se obtienen a partir de la destilación del jugo fermentado de las “piñas” cocidas del agave (centro de la planta).

Las levaduras juegan un papel muy importante durante la fermentación del *Agave*; ya que éstas son las responsables de la producción de etanol y metabolitos secundarios que le dan las características sensoriales específicas a cada bebida. Durante esta etapa ocurre una rápida sucesión de varias especies de levaduras; esto es, mientras se incrementa la concentración de azúcares y de etanol las levaduras *no-Saccharomyces* poco resistentes a estas condiciones limitan su actividad metabólica y crecimiento; por lo contrario las levaduras más resistentes mantienen su actividad metabólica y su crecimiento, convirtiéndose en las especies dominantes que dirigen la fermentación. Se ha observado que la levadura predominante en los procesos de fermentación es *S. cerevisiae* (Fleet y col., 2008).

Las cepas de *S. cerevisiae* muestran una alta variabilidad a nivel fenotípico y genotípico. A nivel fenotípico esta variabilidad se expresa en las propiedades metabólicas que son especie-específicas. A nivel genotípico se manifiesta en la variación de la constitución del genoma; por ejemplo *i)* un alto polimorfismo cromosomal, tanto en número como en tamaño de los cromosomas (revelado por su cariotipo electroforético) y *ii)* la variabilidad en la secuencia de algunos de sus genes (Rainieri y col., 2003).

Esta variabilidad encontrada en las cepas de *S. cerevisiae* puede atribuirse a los diversos hábitats de donde se genera la microbiota inicial de cada proceso y/o a la adaptación a los procesos de fermentación. De esta manera, la levadura va desarrollando una serie de mecanismos que le permiten mantener o modificar el genotipo óptimo necesario para las condiciones de un proceso específico.

Por ejemplo Csoma y col., (2010) analizaron fermentaciones espontáneas de vino y encontraron que las cepas aisladas de una misma región geográfica y del mismo mosto fermentado mostraron mayor similitud en comparación con las cepas provenientes de otras regiones. En el caso de las fermentaciones de *Agave*, Flores y col. (2005) analizaron cepas aisladas de distintas regiones y procesos; los resultados que obtuvieron sugieren la existencia de una correlación entre la región y el proceso de fermentación, que induce adaptación específica y probablemente determina las diferencias fisiológicas y genéticas de las cepas.

La adaptación a ciertas condiciones de un proceso de fermentación se da de forma gradual, después de varias generaciones se presentan diversos cambios a nivel cromosomal, tales como los rearrreglos cromosomales y la aparición de aneuploidias; un ejemplo del rearrreglo cromosomal es la traslocación entre el cromosoma VIII y XII observada en las cepas de vino como resultado a la adaptación a altas concentraciones de dióxido de azufre utilizadas en estos procesos (Puig y col., 2000).

Aunque no se sabe cuánto tiempo tardan en aparecer las variaciones a nivel genético, parece difícil que este tipo de adaptaciones aparezcan en tiempos de fermentaciones cortos (24h); sin embargo Pataro y col. (2000) monitorearon y analizaron a las cepas de *S. cerevisiae* durante la etapa de propagación y fermentación del aguardiente, que tarda entre 18-24h; ellos encontraron polimorfismos en los cromosomas XV y XIV, sugiriendo que estos cambios pudieron ocurrir durante el proceso de fermentación.

Estos cambios a nivel cromosomal, que propician la adaptación a un proceso, se llevan a cabo en las levaduras que se quedan en los equipos y sobreviven al proceso de fermentación, por lo que estas cepas son más aptas para fermentar en las condiciones específicas de un proceso.

Es importante considerar que existe una diversidad de cepas, de las cuales es conveniente seleccionar aquellas que tengan las mejores cualidades fisiológicas y sensoriales para un

proceso específico. Esto con la finalidad de desarrollar cultivos iniciadores, los cuales permiten homogenizar las cualidades de las bebidas en cada lote.

Anteriormente los cultivos iniciadores comerciales estaban diseñados exclusivamente para las fermentaciones de vino, la tendencia actual se dirige a la creación de cultivos iniciadores específicos para cada proceso; a través de la selección de levaduras específicas según el proceso.

La utilización de las levaduras nativas para el desarrollo de cultivos iniciadores es de gran ayuda, pues éstas están mejor adaptadas al medio ambiente; por ejemplo para la elaboración de la cachaza (bebida fermentada de la caña de azúcar) se utilizaron las levaduras nativas para desarrollar un cultivo iniciador, observando mejoras en las cualidades sensoriales del producto final (Aparecida y col., 2008).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 BEBIDAS ALCOHÓLICAS ELABORADAS A PARTIR DE *AGAVE*

En México existe una extensa variedad de bebidas tradicionales producidas en distintas regiones, como lo son: bacanora, charanda, mezcal, mistela, tequila, pulque, sotol, tejuino, tepache, entre otras; esta diversidad de bebidas alcohólicas tienen una gran relevancia por su impacto social, cultural y económico en las diferentes comunidades donde se producen.

Desde tiempos prehispánicos, el agave ha sido considerado como una de las plantas más importantes y ampliamente utilizadas en México, pues debido a su gran valor biológico, ecológico y económico ha sustentado el establecimiento y desarrollo de distintas comunidades por mucho tiempo. (Lappe y col., 2008)

El género *Agave* (del griego *agauos*: admirable o noble) de la familia *Agaveace*, es una planta endémica de América, con la mayor cantidad de especies nativas en México donde se conocen comúnmente como *magüeyes*. Contienen una alta concentración de fructanos como sustancias de reserva y tienen sólo un evento reproductivo en su vida. En la actualidad diferentes especies de *Agave* son explotadas para la producción de bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas que tienen reconocimiento tanto nacional como internacional, algunas de estas bebidas son:

- No destiladas: Pulque, el cual se obtiene después de fermentar la savia natural del *Agave* comúnmente conocida como agua miel, que es un líquido amarillento de sabor dulce.
- Destiladas: Se obtienen a partir de la destilación de mostos fermentados preparados con azúcares provenientes de *Agave* de diferentes especies; estos mostos pueden ser o no enriquecidos con otros azúcares hasta en una proporción no mayor del 49% de azúcares reductores totales. El tequila y mezcal son los

representantes principales de este tipo de bebidas, la diferencia entre ellas es la especie de *Agave* del cual se obtienen; mientras que para la elaboración de tequila sólo se permite el uso de *Agave tequilana* Weber variedad azul, en el caso del mezcal se permiten distintas especies de *Agave*.

Otras bebidas destiladas de *Agave* de importancia regional son la raicilla y la bacanora.

El proceso de producción de las bebidas elaboradas a partir de *Agave* involucra una fermentación compleja, donde participan poblaciones mixtas de bacterias (lácticas y acéticas) y levaduras (*no-Saccharomyces* y *Saccharomyces*). Esta microbiota es la responsable de la producción de la mayoría de los compuestos químicos y volátiles que confieren las características sensoriales del producto final (Lappe y col., 2008). En la Tabla 1 se resumen las características de las principales bebidas alcohólicas elaboradas a partir de *Agave*

**Tabla 1.** Características de las bebidas alcohólicas elaboradas a partir de *Agave* (Lappe y col., 2008)

<b>A. Pulque</b>	
<b>Tipo de bebida</b>	No Destilada
<b>Especie de <i>Agave</i> / Estado de producción</b>	<i>A. atrovirens</i> Edo. México, Tlaxcala, Hidalgo, <i>A. mapisaga</i> Querétaro, Distrito Federal, Puebla, Morelos y <i>A. salmiana</i> San Luis Potosí
<b>Substrato</b>	Savia del <i>Agave</i> (aguamiel)
<b>Microbiota funcional</b>	<u>Fermentación espontánea:</u> Bacterias: <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. mesenteroides ssp.</i> , <i>Zymomonas mobilis ssp.</i> Levaduras: <i>no-Saccharomyces</i> ( <i>Candida spp.</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Pichia spp.</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> ) <i>Saccharomyces</i> ( <i>S. bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. paradoxus</i> )  <u>Fermentación industrializada.</u> El cultivo iniciador es una mezcla de: <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Z. mobilis ssp.</i> y <i>S. cerevisiae</i> . Además la mezcla puede contener o no especies de <i>Leuconostoc</i> .
<b>Productos de fermentación</b>	Etanol, ácidos orgánicos, dextranos, vitaminas, aminoácidos, ésteres, aldehídos

B. Mezcal		
<b>Tipo de bebida</b>	Destilada	
<b>Especie de Agave / Estado de producción</b>	<i>A. salmiana</i>	San Luis Potosí
	<i>A. cupreata</i>	Michoacán
	<i>A. inaeuidens</i>	
	<i>A. angustifolia</i>	
	<i>A. americana var. oaxacensis</i>	
	<i>A. karkwinskii</i>	Oaxaca
	<i>A. marmorata</i>	
	<i>A. potatorum</i>	
	<i>A. duranguensis</i>	Durango
	<i>A. fourcroydes</i>	Yucatán
<b>Substrato</b>	Mosto	
<b>Microbiota funcional</b>	Bacterias: <i>Lactobacillus pontis</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. farraginis</i> , <i>Weissella cibaria</i> , <i>W. paramesenteroides</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> . Levaduras: <i>no-Saccharomyces</i> ( <i>Candida spp.</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Hanseniaspora spp.</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia caribbica</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>T. delbrueckii</i> ) y <i>Saccharomyces</i> ( <i>S. cerevisiae</i> )	
<b>Productos de fermentación</b>	Etanol, ácidos orgánicos, ésteres, terpenos, aldehídos	
C. Tequila		
<b>Tipo de bebida</b>	Destilada	
<b>Especie de Agave / Estado de producción</b>		Jalisco y regiones de los estados de Nayarit
	<i>A. tequilana weber var. azul</i>	Michoacán
		Tamaulipas
		Guanajuato
<b>Substrato</b>	Mosto	
<b>Microbiota funcional</b>	<u>Fermentación espontánea:</u> Bacterias acidolácticas (LAB) Levaduras: <i>no-Saccharomyces</i> : ( <i>Candida spp.</i> , <i>C. magnolia</i> , <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>H. vineae</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>T. delbrueckii</i> ) y <i>Saccharomyces</i> ( <i>S. cerevisiae</i> )  <u>Fermentación industrializada:</u> El cultivo iniciador proviene de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	
<b>Productos de fermentación</b>	Etanol, ácidos orgánicos ésteres, terpenos, aldehídos, furano, cetonas, compuestos nitrogenados	

## 2.2 EL GÉNERO *Saccharomyces*

En 1938, Meyen propuso nombrar a las levaduras del pan y de la cerveza como *Saccharomyces*; el término proviene del griego sákchar σακχαρ-αρος (latín *saccharum*, azúcar) y mykes μυκης (hongo). Sin embargo fue Reess en 1870 quien define por primera vez el género, el cual pertenece a la subdivisión de los ascomicetos y a la familia *Saccharomycetaceae*. Este género ha sufrido muchos cambios taxonómicos a lo largo de los años, hasta ahora se aceptan 16 especies, las cuales están clasificadas en dos grandes grupos establecidos por Van der Walt en 1970 (Fernández-Espinar y col., 2000; Kurtzman y Robnett, 2003; Rainieri y col., 2003).

1. *Saccharomyces sensu stricto*. En este grupo se incluyen principalmente especies asociadas a la industria de la fermentación:

*S. bayanus*: es capaz de fermentar a bajas temperaturas por lo que se encuentra principalmente en procesos de elaboración del vino y de la sidra

*S. cerevisiae*: fermentación de vino, cerveza, cereza, pan, queso, bebidas y alimentos fermentados autóctonos, entre otros.

*S. pastorianus* (sinónimo de *S. carlsbergensis*): asociada principalmente a la fermentación de la cerveza.

*S. paradoxus*: La única de este grupo que se aísla típicamente de hábitats naturales (insectos, árboles, exudados, etc.)

2. *Saccharomyces sensu lato*: Este grupo comprende a las especies que son más distantes de *S. cerevisiae* las cuales son: *S. barnettii*, *S. castelli*, *S. dairenensis*, *S. exiguus*, *S. spencerorum*, *S. transvaalensis* y *S. unisporus*.

La diferenciación entre las especies del grupo *Saccharomyces sensu stricto* es una tarea difícil, pues constituyen un grupo de especies estrechamente relacionadas y en algunos casos no muestran una clara separación. Los grados de homologías existentes entre las

especies pertenecientes a este grupo son: para *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* de 46-59% y para *S. bayanus* y *S. pastorianus* del 70%. (Rainieri y col., 2003).

### **Características fisiológicas del género**

*Saccharomyces* se caracteriza por tener células vegetativas, redondas, ovaladas o cilíndricas. Las células vegetativas son no filamentosas, predominantemente diploides o poliploides y su reproducción es por gemación multilateral. Esporula formando ascas generalmente con cuatro ascosporas en su interior.

La característica principal de *Saccharomyces* es su capacidad vigorosa de fermentar D-glucosa, D-fructosa y D-manosa. La mayoría de las cepas pueden utilizar D-galactosa tanto aeróbica como anaeróbicamente, pero no lactosa. Tampoco pueden utilizar pentosas o polisacáridos como fuente de carbono. Ninguna especie del género puede utilizar nitrato como fuente de carbono, ni puede hidrolizar la urea presente en el medio (Barnett, 2004).

#### **2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae***

Dentro del género de *Saccharomyces*, la especie *cerevisiae* (latín *cerevisia*: cerveza), constituye la levadura y el eucariote más estudiado. En 1897, los hermanos Hans y Edward Buncher propusieron a *S. cerevisiae* como el primer modelo de estudio de la fermentación alcohólica y a partir de entonces diferentes bioquímicos han realizado trabajos encaminados a la descripción del metabolismo del carbono. Tal es el caso de Embden y Meyerhof quienes describieron la vía metabólica de la glucosa (Gonzalez y Valenzuela, 2010).

### **Características moleculares**

*Saccharomyces cerevisiae* tiene un genoma pequeño (~12 000Kb), el cual facilita su análisis genético y molecular, su secuencia completa se dió a conocer en 1996 gracias a un gran esfuerzo de diversos laboratorios encabezado por André Goffeau.

Una levadura haploide contiene 16 cromosomas variando de tamaño entre 200 y 2200Kb. Además los cromosomas contienen elementos móviles, retrotransposones que varían en

número y posición en las diferentes cepas de *S. cerevisiae*. El cromosoma mayor (XII) es el más variable porque contiene ADN ribosómico de 1.2 - 2.2Mb de tamaño y codifica para los ARNs ribosomales, los cuales constituyen una unidad funcional que se repite en *tándem* 120 veces en el cromosoma (Gonzalez y Valenzuela, 2010; Venema y Tollervey, 1999).

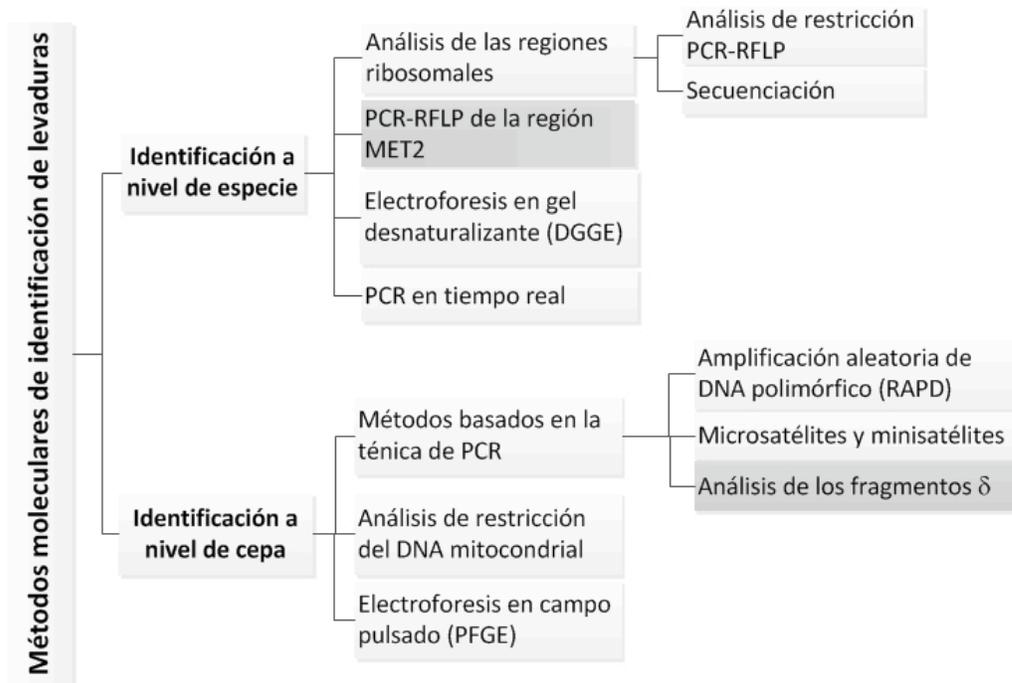
El genoma de *S. cerevisiae* contiene más de 6000 marcos de lectura abiertos (ORF) de ~1.5Kb de tamaño, muchos de ellos se desconoce su función biológica. El 72% de la secuencia corresponde a secuencias codificantes, por lo que el genoma es mucho más compacto comparado con el de otras células eucariotas, esto hace a *S. cerevisiae* el modelo ideal para analizar la función y expresión de productos génicos de otras eucariotas superiores, producir proteínas recombinantes y clonar fragmentos de ADN que no pueden introducirse en vectores convencionales (Gonzalez y Valenzuela, 2010; Sherman, 1997).

### **2.3 MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS.**

Tradicionalmente para la identificación y clasificación de las levaduras se han utilizado métodos basados en sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. 1) pruebas morfológicas tal como es el aspecto de la colonia, la morfología del estado sexual y asexual, presencia de homo y heterotalismo, entre otras; 2) pruebas fisiológicas y bioquímicas; algunos ejemplos de éstas son: asimilación y fermentación de diversas fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, termotolerancia, análisis total de proteínas, análisis de los patrones de isoenzimas y cromatografía de ácidos grasos de cadena larga de la pared celular.

Las características morfológicas y fisiológicas pueden variar dependiendo de las condiciones de cultivo, por lo que los resultados obtenidos tienen un cierto grado de incertidumbre. Además la reproducibilidad de estas técnicas es cuestionable pues en muchos casos dependen del estado fisiológico de la levadura (Fernández-Espinar y col., 2006; Orberá, 2004).

Una alternativa al uso de los métodos tradicionales de identificación son las técnicas moleculares, éstas permiten analizar el genoma independientemente del estado fisiológico de la levadura, dejando en segundo plano el análisis de rasgos fenotípicos. En el esquema 1 se presentan algunos de los métodos moleculares más utilizados para el análisis de levaduras involucrados en la producción de bebidas y alimentos.

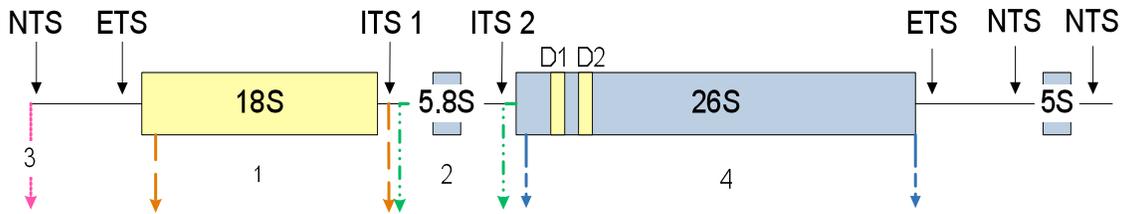


**Esquema 1.** Métodos moleculares de identificación de levaduras. Las zonas sombreadas indican los métodos específicos para levaduras del género *Saccharomyces sensu stricto* (Fernández-Espinar y col., 2006).

### 2.3.1 Métodos para la identificación de levaduras a nivel de especie

#### Análisis de las regiones ribosomales

Los genes ribosomales de las levaduras (5S, 5.8S, 18S y 26S) están agrupados en *tándem* formando unidades transcripcionales que se repiten de 100 a 200 veces en el genoma. En cada unidad transcripcional se encuentran regiones espaciadoras: a) espaciadores internos transcritos (ITS1, ITS2); b) espaciadores externos transcritos (ETS) y c) espaciadores no-transcritos (NTS) los cuales separan a las unidades codificantes (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura del ADN ribosomal nuclear (Fernández-Espinar y col., (2006).

En el caso de *S. cerevisiae* estas unidades de transcripción miden 9.1Kb y sus repeticiones en tándem se encuentran en el brazo derecho del cromosoma XII (Venema y Tollervey, 1999).

Los genes ribosomales 5.8S, 18S y 26S, así como las regiones ITS y NTS han sido ampliamente utilizadas en estudios de identificación y filogenia de levaduras; debido a la presencia de secuencias conservadas y de su evolución concertada (Fernández-Espinar y col., 2006).

A continuación se describen algunos de los métodos basados en estas regiones ribosomales.

### **Secuenciación de regiones ribosomales**

Las regiones comúnmente utilizadas son: el gen 18S y los dominios D1 y D2 del gen 26S (indicados en amarillo en la Figura 1).

El método consiste en determinar y comparar las secuencias de estas regiones con la secuencia de especies conocidas utilizando bases de datos (WU-BLAST). La disponibilidad de las secuencias de los dominios D1/D2 en bases de datos, hacen de estos una muy buena opción para la identificación de levaduras; se ha reportado que cuando el porcentaje de homología de estas secuencias es mayor o similar al 99% permite la asignación de especie a levaduras desconocidas (Kurtzman y Robnett, 1998). Sin embargo para diferenciar entre las especies del género de *Saccharomyces sensu stricto* es necesario utilizar técnicas de mayor resolución.

## **Análisis de restricción de regiones ribosomales**

### **Polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP)**

La determinación del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción consiste en la diferenciación de los organismos por el análisis de patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma cuando éste es cortado por enzimas de restricción. La similitud de los patrones generados permite establecer correlaciones entre especies y cepas; así como la existencia de patrones únicos permite la identificación.

Una variante de esta técnica conocida como PCR-RFLP, ha sido utilizada ampliamente en estudios de identificación y filogenia de levaduras de interés industrial; para ello se amplifican fragmentos específicos de DNA por PCR que luego son tratados con enzimas de restricción para obtener los patrones específicos que permiten la identificación (Orberá y col., 2004; Fernández-Espinar y col., 2006). Algunas de las regiones ribosomales que se amplifican (indicadas con líneas punteadas en la Figura 1) son:

1. **18S-ITS1**: utilizando las enzimas *AluI*, *HaeIII*, *MspI*, y *RsaI* se pueden identificar hasta 128 especies de levaduras. (Dlauchy y col., 1999)
2. **ITS1-5.8S-ITS2**: Esteve-Zarzoso y col. (1999), proponen el uso de las enzimas *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* para identificar 191 especies de levaduras.
3. **NTS, NTS-18-S, y NTS-ITS**: El análisis por PCR-RFLP de estas regiones permite identificar a las especies del género de *Saccharomyces sensu stricto* (Fernández-Espinar y col., 2006).
4. **Gen 26S**: Baleiras Couto y col., (2005), proponen el análisis de restricción de este gen como un método rápido para la identificación de levaduras *no-Saccharomyces* involucradas en la fermentación de bebidas alcohólicas.

En particular, el análisis de restricción de la región ITS-5.8S permite identificar a distintas especies de levaduras; debido a que la región 5.8S es conservada y muestra una

baja variabilidad intraespecífica además de ser codificadora; mientras que los ITS son regiones hipervariables y no codificadoras. Por tanto las secuencias más conservadas (5.8S) son útiles para la clasificación de altos niveles taxonómicos (por ejemplo género), mientras que las regiones hipervariables (ITS) son utilizadas a nivel de especie y sub-especies (ver Figura 1).

El uso de las enzimas *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* genera un patrón especie-específico útil para identificar un gran número de levaduras; sin embargo en especies que son muy cercanas las diferencias no son muy notables, tal es el caso del grupo de levaduras *Saccharomyces sensu stricto* al cual pertenece *S. cerevisiae* (Esteve-Zarzoso y col., 1999; Orberá, 2004).

### **Análisis de restricción del gen MET2**

El análisis de restricción del gen MET2 (codifica para la enzima homoserina acetil-transferasa) es un método de identificación para levaduras del género *Saccharomyces sensu stricto*; específicamente se enfoca en diferenciar a las cepas de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* involucradas en las fermentaciones de vino; ya que debido a su cercanía genética es difícil diferenciar entre ellas (Masneuf y col., 1996).

La identificación se basa en la amplificación por PCR del gen MET2; el cual está presente en el género de *Saccharomyces* y presenta un grado de polimorfismo, que permite la diferenciación entre las especies de *Saccharomyces sensu stricto* (Antunovics y col., 2005; Fernandez-Espinar y col., 2003; Masneuf y col., 1996). Después de amplificar el gen MET2 se hace un análisis con enzimas de restricción para revelar el polimorfismo antes mencionado. La diferenciación de las cepas se logra a partir del siguiente esquema:

**Tabla 2.** Perfil de enzimas utilizado para la identificación de cepas pertenecientes al género *Saccharomyces sensu stricto*.

Especie	<i>EcoRI</i>	<i>PstI</i>
<i>S. cerevisiae</i>	Corta	No corta
<i>S. bayanus</i>	No corta	Corta
<i>S. paradoxus</i>	No corta	No corta

También se pueden utilizar las enzimas *NcoI* y *MaeIII*, las cuales al igual que *EcoRI* no tienen sitio de corte para el gen MET2 en *S. bayanus*, pero sí en *S. cerevisiae* (Masneuf y col., 1996).

### **PCR-Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)**

La técnica de PCR-DGGE permite separar fragmentos de ADN de doble cadena del mismo tamaño con secuencias diferentes. Primero, el fragmento de ADN de interés se amplifica por PCR; después los fragmentos de ADN se separan por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida con concentraciones crecientes de agentes desnaturalizantes como la urea y la formamida. La diferencia en la movilidad electroforética de los fragmentos de ADN depende del punto de desnaturalización, el cual está en función de la longitud de la cadena de ADN así como de la composición de nucleótidos de la secuencia, este punto generalmente aumenta cuando la secuencia tiene altos contenidos de guanina y citosina (Muyzer y col., 1993).

Los patrones obtenidos proveen un perfil de la diversidad de poblaciones microbianas; además la intensidad de cada banda probablemente representa la abundancia relativa de una especie en particular dentro de una población (Muyzer y col., 1993).

Cuando se utiliza como agente desnaturalizante un gradiente lineal de temperatura, la técnica se denomina: electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).

### **PCR-Tiempo real**

Esta técnica es una variación de la técnica de PCR convencional, la cual permite amplificar y cuantificar simultáneamente el ADN amplificado. La técnica se basa en la detección y cuantificación de un marcador fluorescente, el cual incrementa su señal proporcionalmente a la cantidad de ADN amplificado. Una de las ventajas de esta técnica es la sensibilidad y alta especificidad; además de que no necesitar alguna otra técnica para cuantificar por tanto reduce el tiempo de análisis.

Por el contrario, una desventaja es la obtención de falsos positivos por contaminación cruzada, es por ello que se pone especial énfasis en el diseño de los cebadores así como en la temperatura de alineación; ya que de ello depende la especificidad de la técnica (Palacios y col.; Fernández-Espinar y col., 2006).

### **2.3.2 Métodos para diferenciar levaduras a nivel de cepa**

#### **Métodos basados en la técnica de PCR**

Con el propósito de diferenciar a las levaduras a nivel de cepa, se han desarrollado diversas técnicas, algunas de las cuales son una variante de la reacción básica de PCR que permiten detectar polimorfismos sin utilizar enzimas de restricción; de éstas técnicas las más utilizadas son:

#### **RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico)**

La amplificación aleatoria de ADN polimórfico es un método que fue introducido por Williams y col., (1990), quienes propusieron la detección de polimorfismos amplificando al azar secuencias de ADN utilizando cebadores de pocos oligonucleótidos (~10pb) que tienen una secuencia arbitraria.

Debido a la baja temperatura de alineación, que se utiliza para la reacción de PCR (35-39°), el cebador se une a sitios inespecíficos y aleatorios en diferentes lugares del genoma, lo cual permite la amplificación de fragmentos polimórficos del ADN. Como resultado se obtienen productos de diferentes pesos moleculares que forman un perfil característico para cada cepa; estos resultados pueden ser visualizados por electroforesis en geles de agarosa.

Las principales ventajas del método RAPD son: 1) no se necesita información previa de la secuencia para el diseño de los cebadores y 2) permite analizar el genoma completo, debido a ello se detecta mayor polimorfismo comparado con otros métodos que sólo analizan una región. Sin embargo la reproducibilidad de esta técnica es su principal

inconveniente; se deben realizar varias repeticiones para cada muestra utilizando diferentes extracciones de ADN y sólo las bandas que sean comunes a todas las repeticiones son las que se toman en cuenta (Fernández-Espinar 2006; Giraffa y Neviani, 2001).

### **Microsatélites y minisatélites**

Esta técnica se basa en la amplificación de secuencias cortas y repetitivas que se distribuyen a lo largo del genoma; estas secuencias se conocen como: microsatélites (menos de 10pb) o minisatélites (10-100pb) dependiendo de su tamaño. La gran variabilidad que muestran estas secuencias las hace un blanco ideal para la identificación de levaduras a nivel de cepa. Algunas de las secuencias más utilizadas son: (GTC)<sub>5</sub>, (GAGA)<sub>4</sub>, Fago ADN M13, entre otras.

En este método la temperatura de alineamiento es de 55°C, la cual es mayor a la utilizada por el método RAPD (35-39°), por lo que los cebadores se unen a zonas más específicas en el genoma, de ahí que esta técnica sea más reproducible (Orberá, 2004).

### **Análisis de los elementos $\delta$ .**

Los secuencias  $\delta$  son elementos que miden ~0.3Kb y se encuentran a un costado de los retrotransposones TY1, concentrados en las regiones adyacentes a los ARN de transferencia. En el genoma de las levaduras existen varias copias de los elementos  $\delta$ , ya sea como parte de los retrotransposones o como elementos aislados; además el número y localización de estos elementos presentan una variabilidad intraespecífica (Fernández-Espinar y col., 2006). Este hecho fue aprovechado por Ness y col., (1993) quienes diseñaron cebadores específicos ( $\delta$ 1 y  $\delta$ 2) para amplificar estas secuencias, la metodología que desarrollaron demostró ser útil para diferenciar entre cepas de *S. cerevisiae*.

Más tarde, Legras y Karst (2003) encontraron 305 elementos  $\delta$  en la secuencia de la cepa de *S. cerevisiae* S288C utilizando el programa BLAST (herramienta de búsqueda de alineamientos locales), a partir de estos resultados diseñaron un nuevo par de cebadores

( $\delta_{12}$  y  $\delta_{21}$ ), los cuales son más específicos, y revelaron un mayor número de polimorfismos. Ellos proponen 11 elementos  $\delta$  como suficientes para diferenciar correctamente 53 cepas comerciales de *S. cerevisiae*. También probaron el par de cebadores  $\delta_2$ ,  $\delta_{21}$  el cual revela ligeramente un menor polimorfismo que el par  $\delta_{12}$ ,  $\delta_{21}$ , pero mayor que el par  $\delta_1$  y  $\delta_2$  propuesto inicialmente.

Una de las desventajas de esta técnica es la dependencia de la cantidad de ADN utilizada para la reacción de PCR; Fernández- Espinar y col., (2001) utilizaron diferentes concentraciones de ADN (60, 250 y 2500 ng) y observaron que en cada concentración se obtenían diferente número de bandas; por lo anterior es necesario estandarizar la concentración de ADN a utilizar, en consecuencia hace difícil la comparación de resultados entre laboratorios. Otra desventaja es la baja temperatura de alineación utilizada, la cual produce la aparición de bandas fantasma. No obstante Ciani y col., (2004) proponen utilizar temperaturas de alineación mayores ( $55^{\circ}\text{C}$ ), las cuales evitan la aparición de bandas fantasma pero se distinguen menor número de bandas.

### **Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)**

El AFLP se basa en la amplificación selectiva de los fragmentos de la digestión del ADN genómico mediante la reacción de PCR. Primero, el ADN se corta con dos enzimas de restricción, una de corte muy frecuente y otra de corte poco frecuente. Después a los fragmentos se les unen cebadores (18-20pb), llamados “adaptadores”, los cuales tienen extremos compatibles con las enzimas de restricción. Finalmente los fragmentos-adaptadores se amplifican a través de la reacción de PCR (Vos y col., 1995).

Dependiendo de la complementariedad del cebador con el sitio de restricción se puede disminuir o aumentar el número de bandas amplificadas. Dado que se generan numerosos fragmentos en una sola reacción, se utilizan geles de poliacrilamida de tipo desnaturizante para poder resolverlos adecuadamente. De esta manera con esta técnica se obtienen perfiles muy específicos que permiten la diferenciación a nivel de cepa sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad (Vos y col., 1995); ahora bien con

frecuencia se requiere de análisis por computadora por la complejidad de los patrones obtenidos, además los resultados son difíciles de interpretar, por consiguiente es una técnica muy sofisticada que requiere de gran inversión de tiempo y dinero (Fernández-Espinar y col., 2006).

### **Análisis de restricción del ADN mitocondrial**

Las levaduras presentan gran variabilidad en el tamaño del ADN mitocondrial (mtADN); por ejemplo, en el caso de *S. cerevisiae* su ADN mitocondrial es una pequeña molécula (60 y 80Kb) que revela un alto grado de polimorfismo mediante el uso de enzimas de restricción. Querol y col., (1992) desarrollaron una técnica para *S. cerevisiae* que permite el análisis del ADN mitocondrial sin la necesidad de aislarlo, ni purificarlo previamente; esta técnica se basa en las diferencias en el contenido de guanina (G) y citosina (C) del ADN nuclear (40%) y del ADN mitocondrial (20%).

La presencia de mayor cantidad de regiones ricas de G-C (guanina / citosina) en el ADN nuclear produce numerosos pequeños fragmentos de ADN al ser expuestos a enzimas de restricción específicas para estas regiones (G-C). En contraste, la menor cantidad de regiones de G-C en el ADN mitocondrial genera fragmentos de mayor tamaño.

En conclusión al someter el ADN total a una digestión con enzimas específicas para las regiones G-C, genera una sobredigestión en el ADN nuclear que produce pequeños fragmentos indistinguibles en un gel de agarosa; por el contrario los fragmentos generados a partir del ADN mitocondrial forman un perfil específico para cada cepa (Orberá, 2004).

En el caso concreto de *S. cerevisiae* las enzimas de restricción más apropiadas para diferenciar a nivel de cepa son *HinfI* y *HaeIII* (Guillamón y col., 1994). La utilización del análisis de restricción no queda restringida a *Saccharomyces*, ya que también ha sido utilizada para la caracterización de otras especies de levaduras como: *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera/Brettanomyces*, *Kluyveromyces* y *Zygosaccharomyces* (Orberá, 2004).

### **Electroforesis de campo pulsado (PFGE)**

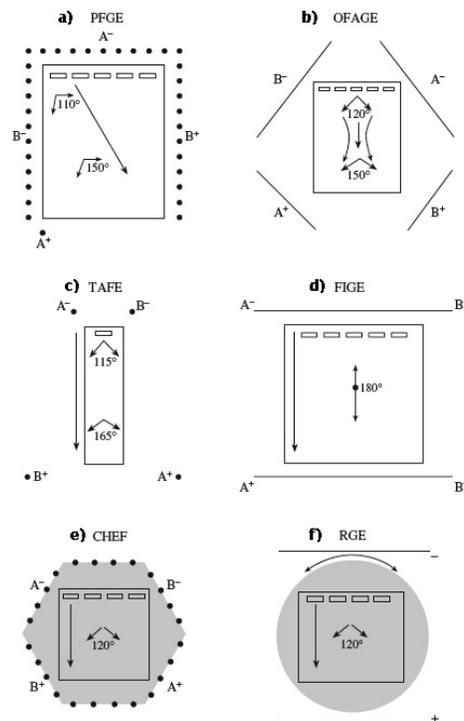
La electroforesis de campo pulsado es una técnica que hace posible la separación de grandes moléculas de ADN en geles de agarosa, utilizando alternadamente dos campos eléctricos. La resolución de la técnica abarca tamaños de ADN desde 10kb hasta 10Mb, permitiendo el análisis de cromosomas completo de bacterias y de levaduras, como es el caso de *S. cerevisiae* cuyos cromosomas tienen tamaños entre 200-2200Kb.

Con el propósito de separar los cromosomas de *S.cerevisiae*, Schuartz y Cantor en 1984 introdujeron esta técnica; el primer paso consiste en aislar el ADN cromosomal intacto, para ello las células se embeben en bloques de agarosa de bajo punto de fusión y se colocan en pequeños moldes, el resultado son insertos que contienen a las células de las levaduras completas. Las levaduras embebidas se someten a una lisis y desproteinización *in situ* lo que permite obtener finalmente el ADN inmovilizado en la matriz de agarosa (Herschelb y col., 2007).

La alternancia de dos campos eléctricos permite la separación de los cromosomas, esta separación ocurre de la siguiente manera: al aplicarse un campo eléctrico las moléculas de ADN son elongadas y comienzan a migrar a través del gel en la dirección de este campo eléctrico, a continuación este campo se suprime y se aplica un segundo campo eléctrico, el cual forma un ángulo con el primero; entonces las moléculas de ADN se reorientan y empiezan a migrar en dirección del segundo campo. El ángulo formado por los dos campos, también llamado ángulo de reorientación puede variar entre 110°-180° dependiendo del equipo utilizado.

La migración de las moléculas de ADN es proporcional a su tamaño, de esta manera las moléculas más grandes tardan más tiempo en reorientarse y se quedan por detrás de las más pequeñas. La resolución de las bandas cromosomales está definida por diferentes parámetros tales como: los intervalos de variación de la fuerza del campo eléctrico (pulsos), la concentración de agarosa, la temperatura y el ángulo entre los campos eléctricos (Nassonova, 2008).

Existen diversos sistemas de electroforesis en gel de campo pulsado, que varían dependiendo de: 1) la forma geométrica que dibujan los electrodos y 2) la homogeneidad y el método de reorientación de los campos eléctricos (ver Figura 2). Las principales diferencias entre los sistemas son: la capacidad de obtener líneas rectas, velocidad de separación, resolución dentro de un rango específico de tamaños y tamaño de la porción del gel que provee una separación útil.



**Figura 2.** Diagramas esquemáticos de los equipos comúnmente utilizados para la electroforesis en campo pulsado. a) Electroforesis de gradiente en gel de campo pulsante (PFGE). b) Electroforesis en gel de campo alternado ortogonal (OFAGE). c) Electroforesis de campo alternado transversal (TAFE). d) Electroforesis en gel de campo invertido (FIGE). e) Electroforesis de campo eléctrico homogéneo en contorno cerrado (CHEF). f) Electroforesis en gel rotante (RGE).

**Flechas pequeñas:** indican los vectores de los campos eléctricos alternados, el ángulo de reorientación se indica al interior de cada diagrama. **Flechas grandes:** indican la dirección de la migración neta. Los símbolos  $A^+B^+A^-B^-$ : Indican la posición de los pares de electrodos de los campos alternos. • Indican los electrodos en los sistemas PFGE, TAFE y CHEF — Indican los electrodos en los sistemas: OFAGE, FIGE y RGE. (Nassonova y col., 2008).

El sistema CHEF es el más utilizado de entre todos los sistemas de electroforesis en campo pulsado; ya que asegura la separación de ADN más eficiente en un amplio rango de tamaños. Además se ha demostrado que puede separar por lo menos 15 de los 16 cromosomas de *S. cerevisiae* (Nassonova y col., 2008).

Una de las aplicaciones más importantes del PFGE es la cariotipificación de eucariotes que tienen un genoma de tamaño pequeño, como *S. cerevisiae*. El cariotipo permite conocer el número de cromosomas así como estimar su tamaño, además también es posible seguir la dinámica del genoma, en particular de los rearrreglos cromosomales y su polimorfismo resultante, el cual es muy común en muchos eucariotes unicelulares (Nassonova y col., 2008). Esta técnica ha sido empleada para el estudio de poblaciones de *S. cerevisiae* involucradas en la fermentación de bebidas alcohólicas (Antunovics y col., 2005; Pataro y col., 2000; Puig y col., 2000) y el polimorfismo que revela es resultado de la adición o eliminación de largos fragmentos de ADN en cromosomas homólogos durante la evolución del genoma de las levaduras (Longo y Vézinhét, 1993; Pérez-Ortín y col., 2002).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La levadura predominante en las fermentaciones alcohólicas es *Saccharomyces cerevisiae*, quien aporta la mayoría de las características sensoriales del producto terminado (Fleet y col., 2008). Es por ello que la determinación de las diferencias moleculares entre las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* servirán como un primer acercamiento para determinar específicamente cuál de ellas pudiera optimizar el proceso de fermentación.

El resultado de esta investigación servirá como base para posteriores pruebas fisiológicas que determinen las condiciones de la fermentación dirigida y así obtener una bebida con características sensoriales específicas.

## **4. OBJETIVO**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer las diferencias a nivel molecular mediante la tipificación de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas a partir de la fermentación de mezcal, pulque y tequila.

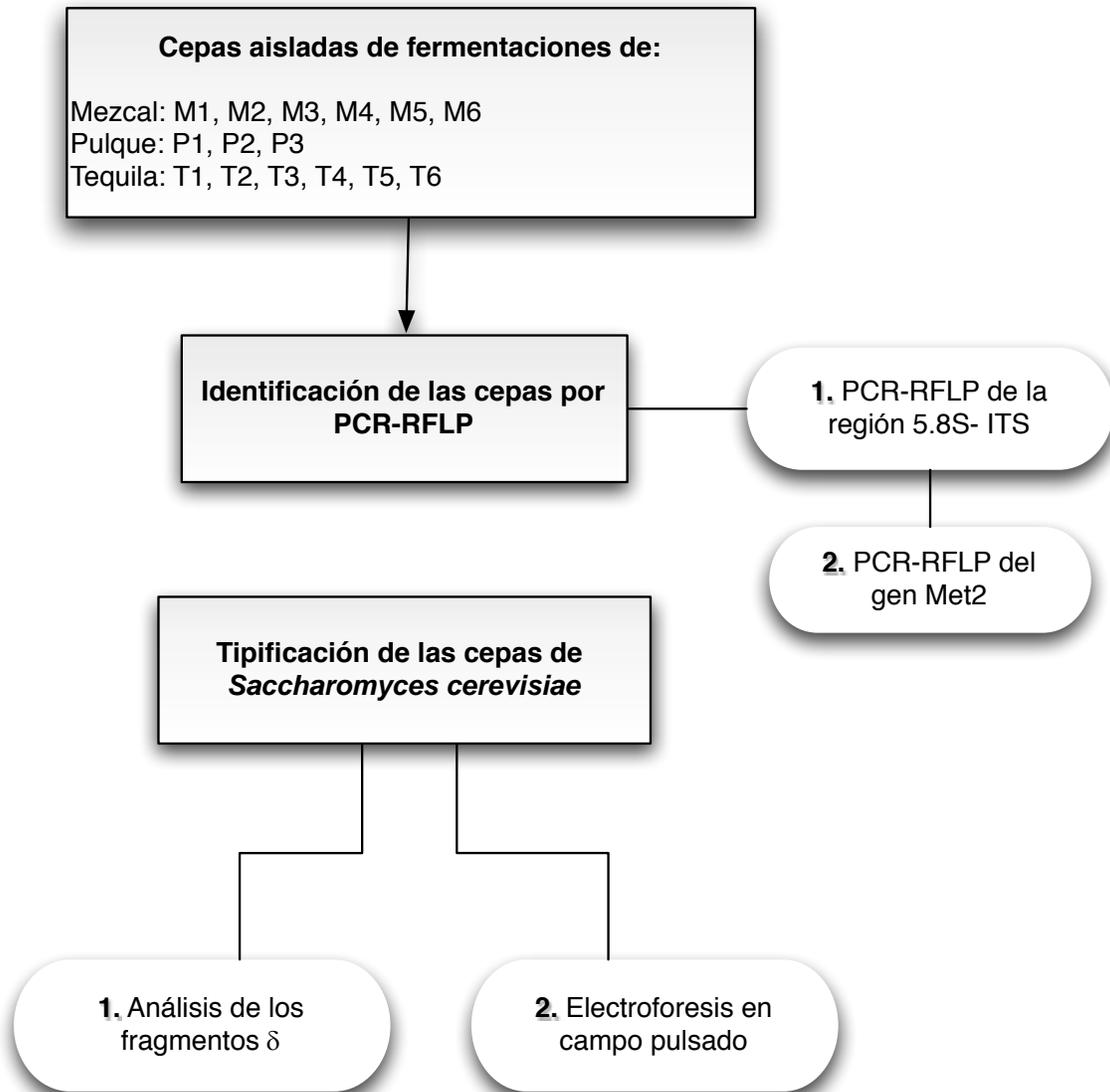
### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar que las cepas de estudio pertenecen a la especie de *S. cerevisiae* a través del método PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS y del gen MET2.
- Establecer las diferencias moleculares entre las cepas de *S. cerevisiae* por medio de la tipificación, utilizando los métodos: 1) análisis de los fragmentos  $\delta$  y 2) electroforesis en gel de campo pulsado

## **5. HIPÓTESIS**

Si el hábitat y el proceso de fermentación específico selecciona a las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*; entonces las cepas del mismo proceso tenderán a ser genéticamente semejantes. Mientras que serán genéticamente diferentes al ser comparadas con otras cepas aisladas de un proceso y hábitat diferente.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Esquema 2. Estrategia experimental.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 CEPAS DE ESTUDIO

Se utilizaron 14 cepas aisladas de diferentes tiempos de fermentación de mezcal, pulque y tequila, además de una cepa de identidad conocida, que fue utilizada como control positivo.

**Tabla 3.** Cepas de estudio aisladas de las fermentaciones de mezcal, pulque y tequila.

	Fuente	Cepa	Toma de muestra	Lugar de origen
FERMENTACIÓN ARTESANAL	Mezcal	M2, M4, M5	24h	Sola de Vega Oaxaca
		M1	72h	
		M3, M6	120h (final fermentación)	
	Pulque	P1	Cultivo iniciador (agua miel)	Santa Mónica Hidalgo
		P2, P3	Etapa de fermentación	
	FERMENTACIÓN INDUSTRIAL	Tequila	T1	Etapa de propagación
T3				
T4			Etapa de fermentación	
T5				
T2			Fermentación tequila 100%	
T6*	Cultivo iniciador	Empresa Tequilera 2		

\*Cepa de identidad conocida (*Saccharomyces cerevisiae*) que se utilizó como control positivo durante la etapa de identificación.

### 7.2 RECONSTITUCIÓN DE CEPAS

Las cepas aisladas se encontraban almacenadas en ultracongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  en tubos eppendorf en medio líquido YPD (1% extracto de levadura, 2% de peptona, 2% glucosa Sigma) con 20% de glicerol (Sigma).

A partir de estas cepas conservadas se tomaron pequeñas muestras, las cuales fueron inoculadas en medio líquido YPD e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24h con la finalidad de

activarlas. Con el propósito de enriquecer los cultivos anteriores estos se resembraron en tubos inclinados con medio sólido de agar PDA (agar papa dextrosa Sigma) con 0.14% de ácido tartárico.

### **7.3 EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS CEPAS AISLADAS DEL TEQUILA, MEZCAL Y PULQUE**

Para la extracción del ADN fue necesario resembrar las muestras en un medio líquido; para lo cual se tomó una muestra de cada cepa del cultivo en PDA incubándola en 10mL de medio líquido YPD a temperatura ambiente, en un agitador orbital Lab-Line a 180rpm durante 18h.

Las células fueron cosechadas por centrifugación (Beckman) a 13 000 rpm durante 20 minutos a 4°C, posteriormente fueron lavadas agregando 0.5mL de agua destilada y centrifugadas a 10 000 rpm por 5min. Para romper pared y membrana se agregó al pellet 0.2mL de buffer de lisis (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris pH 8 10mM, EDTA 1mM Sigma), buffer TE (Tris-HCl pH 8.0. EDTA 1mM Sigma) y 0.3g de perlas de vidrio de 425-600µm (Sigma). Para la extracción del ADN se añadieron 0.2mL de PCI (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico Sigma), posteriormente la mezcla se llevó a un *disruptor* de células (Disruptor Genie SI-D236) durante 90s. Después se centrifugó durante 5 minutos a 10 000rpm en una microcentrífuga (Eppendorf), se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo eppendorf al cual se le añadieron 0.5mL de etanol frío al 100% mezclando por inversión. Se centrifugó nuevamente (2 minutos 10 000 rpm) y se resuspendió el ADN en 400µL de TE.

Finalmente para purificar el ADN se agregaron 30µg de RNAasa (Sigma) y se incubó durante 10 minutos a 37°C, transcurrido este tiempo se agregaron 400µL de acetato de sodio 3M y 1mL de etanol frío al 70%, mezclando por inversión. Se centrifugó durante 2 minutos a 10 000rpm y el pellet se secó durante toda la noche. El ADN se resuspendió en 50µL de buffer TE (Hoffman y Winston, 1987).

Una vez extraído el ADN se procedió a verificar su calidad en un gel de agarosa al 1% por medio de electroforesis (Pharmacia Biotech GNA 100) durante 30 minutos a 100V,

utilizando buffer TBE 0.5X. Posteriormente el gel se tiñó en un baño de bromuro de etidio (0.5µg/mL), los resultados se visualizaron en un fotodocumentador (Fluor S Multi Imager, Bio-Rad) y las imágenes fueron capturadas utilizando el programa Quantity One 1-D análisis 4.6.3 (Bio-Rad); según la presencia, integridad y calidad del ADN extraído se procedía a cuantificar y posteriormente a realizar la técnica de PCR.

#### **7.4 CUANTIFICACIÓN DEL ADN: MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO**

Para determinar la pureza y la concentración del ADN se cuantificó la absorbancia a dos longitudes de onda: 260 y 280nm. La relación de las absorbancias [A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>] permite estimar el grado de pureza del ADN; en el caso de preparaciones puras de ADN la razón de esta relación debe ser entre 1.8 y 2.0.

Un cociente menor de 1.8 indica contaminación con proteínas en cuyo caso es recomendable volver a precipitar el ADN; por el contrario un cociente mayor a 2.0 indica que la muestra podría estar contaminada con cloroformo y en este caso se debe re-precipitar nuevamente con etanol (Gallagher, 1998).

Para determinar la concentración del ADN se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS GBC-Cintral con una celda de microvolumen (150µL) con 1cm de trayecto óptico. La concentración de ADN se calculó a partir de la ecuación de Lambert-Beer:  $(A_{260}) = \epsilon C \lambda$ ; despejando la concentración tenemos:  $C = (A_{260}) / \epsilon$   
donde: A<sub>260</sub> es la Absorbancia a 260 nm.

$\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar = 1/50 = 0.02  
C la concentración [ADN µg/mL]  
 $\lambda$  espesor de la celda = 1

#### **7.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *S. cerevisiae***

Para identificar a las cepas se utilizó el método de PCR-RFLP de las siguientes regiones:

- ITS1-5.8S-ITS2 (Esteve-Zarzoso y col., 1999)
- El gen MET 2 (Maseneuf y col., 1996)

## PCR-RFLP

Para la reacción de PCR se empleó un termociclador Gene Thermal (Perkin Elmer) utilizando los siguientes reactivos:

1) cebadores [0.5µM] (Invitrogen);

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'),

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTAGATATGC-3'),

MET2<sub>fw</sub> (5'-CGGCTCAGACGAAAACGCTCCAAGAGCTGG-3')

MET2<sub>rev</sub> (5'-CGGCTCAGAGACCACGATATGCACCAGGCAG-3'),

2) ADN templado [~50ng/µL], 3) dNTPs [10µM] (Invitrogen), 4) Taq polimerasa recombinante [1U] (Invitrogen), 5) Buffer [1X] para PCR (Invitrogen) 5) MgCl<sub>2</sub> [1,5mM] (Invitrogen). El volumen final de la reacción fue de 50µL.

El programa de temperaturas utilizado para cada par de cebador se describe a continuación:

**Tabla 4.** Condiciones de amplificación para la región 5.8S-ITS y el gen MET2.

Cebadores	Programa de temperaturas
ITS 1 ITS 4	Desnaturalización inicial de 5min a 95°C y después 35 ciclos de: 1min de desnaturalización a 95°C, 2 min de alineamiento a 52°C y 2 min de extensión a 72°C, seguidas por una extensión final de 10 min a 72°C
MET2 fw MET2 rev	40 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94°C, 2 minutos de alineamiento a 50°C y 3 minutos de extensión a 72°C, seguido de una extensión final de 10 min a 72°C

El producto de amplificación se separó por electroforesis (Pharmacia Biotech GNA 100) en gel de agarosa al 1% con buffer TBE 0.5X a 100V durante 30 minutos, utilizando un marcador de peso molecular de 1Kb (Trackit ADN ladder Invitrogen). Los resultados se visualizaron en un fotodocumentador (Fluor S Multi Imager, Bio-Rad) y las imágenes fueron capturadas y analizadas utilizando el programa Quantity One 1-D análisis 4.6.3 de Bio-Rad.

Para el análisis de restricción se tomaron alícuotas de 10µL del producto de PCR, a las cuales se agregaron 2.5µL de buffer de restricción y 1U de la enzima de restricción, el volumen final de reacción se ajustó en 25µL; la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 3h. Las enzimas de restricción utilizadas para la región 5.8S-ITS fueron *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* (Roche) y para el gen MET2 las enzimas *EcoRI* (Roche) y *PstI* (Invitrogen).

Los fragmentos resultantes se separaron por electroforesis (Pharmacia Biotech GNA 100) a 80V durante 60 minutos en gel de agarosa al 1.8%, utilizando un buffer de corrida TBE 0.5X y un marcador de 1Kb de peso molecular (Trackit ADN ladder Invitrogen). Como revelador se utilizó bromuro de etidio, los fragmentos de restricción se visualizaron en un fotodocumentador (Fluor S Multi Imager, Bio-Rad), las imágenes fueron capturadas y analizadas utilizando el programa Quantity One 1-D análisis 4.6.3 de Bio-Rad.

## **7.6 TIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *S. cerevisiae***

La tipificación se realizó utilizando los métodos de análisis de los fragmentos  $\delta$  y la electroforesis en gel de campo pulsado.

### **7.6.1 Análisis de los fragmentos $\delta$**

Las regiones interdelta fueron amplificadas de acuerdo a Legras y Karst (2003) utilizando: 1) los cebadores  $\delta_{12}$  5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3' y  $\delta_{21}$  5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3' 2) ADN templado [ $\sim$ 50ng/ $\mu$ L], 3) dNTPs [10µM] (Invitrogen), 4) Taq polimerasa recombinante [1U] (Invitrogen), 5) Buffer [1X] para PCR (Invitrogen) 6) MgCl<sub>2</sub> [1,5mM] (Invitrogen). El volumen final de la reacción fue de 25µL.

Las condiciones para la reacción de PCR empleadas fueron: desnaturalización inicial de 4 minutos a 95°C y 35 ciclos de: 30s de desnaturalización a 95°C, 30s de alineación a 46°C y 90s de extensión a 72°C, seguidos por una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis a 80V durante 60 minutos en geles de agarosa al 3%, empleando buffer de corrida TBE 0.5X, utilizando un marcador de peso molecular de 1Kb (Trackit ADN ladder Invitogen). Se utilizó como revelador bromuro de etidio y transiluminador de UV para visualizar los productos de PCR.

## 7.6.2 Electroforesis de gel de campo pulsado (PFGE)

### Tapones de agarosa

Para la preparación de los tapones de agarosa, se utilizó el *kit* CHEF Genomic ADN Plug (Bio-Rad). Los tapones de agarosa se prepararon en moldes de 100 $\mu$ L siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

De cada muestra se tomó una colonia del medio sólido PDA y se inoculó en 50mL de medio líquido YPD. Las muestras se incubaron en agitación orbital (Lab-line) a temperatura ambiente hasta alcanzar una densidad óptica ( $OD_{600}$ ) igual o mayor a 1; la densidad óptica de los cultivos se cuantificó utilizando un espectrofotómetro UV/VIS GBC-Cintral. Una vez alcanzada dicha densidad, las células se cosecharon centrifugando a 13 000rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 10mL de EDTA 50mM pH 8 frío.

La concentración de células se determinó adicionando 10 $\mu$ L de células en 990 $\mu$ L de agua. La suspensión de células se colocó en una cámara de Neubauer y se contaron en el microscopio en el objetivo 40X.

Dependiendo de la concentración de cada cultivo, se tomaron los microlitros necesarios para tener  $\sim 6 \times 10^7$  por cada 100 $\mu$ L de tapón de agarosa; posteriormente las células se centrifugaron a 10 000rpm en una microcentrífuga (Eppendorf) durante 3 minutos a 4°C, estas células se resuspendieron en 37 $\mu$ L de buffer de suspensión (Tris 10mM pH 7.2, NaCl 20mM, EDTA 50mM). Posteriormente se agregó agarosa de bajo punto de fusión al 2% a una concentración final de 0.75% (63 $\mu$ L) a 50°C. Para evitar la solidificación de la agarosa los tubos eppendorf se mantuvieron en un baño a 50°C mientras se adicionaron los reactivos.

Inmediatamente después de agregar la agarosa se adicionó liticasa para tener una concentración final de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  por cada tapón. Esta mezcla se transfirió a los moldes para los tapones y se mantuvo a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos

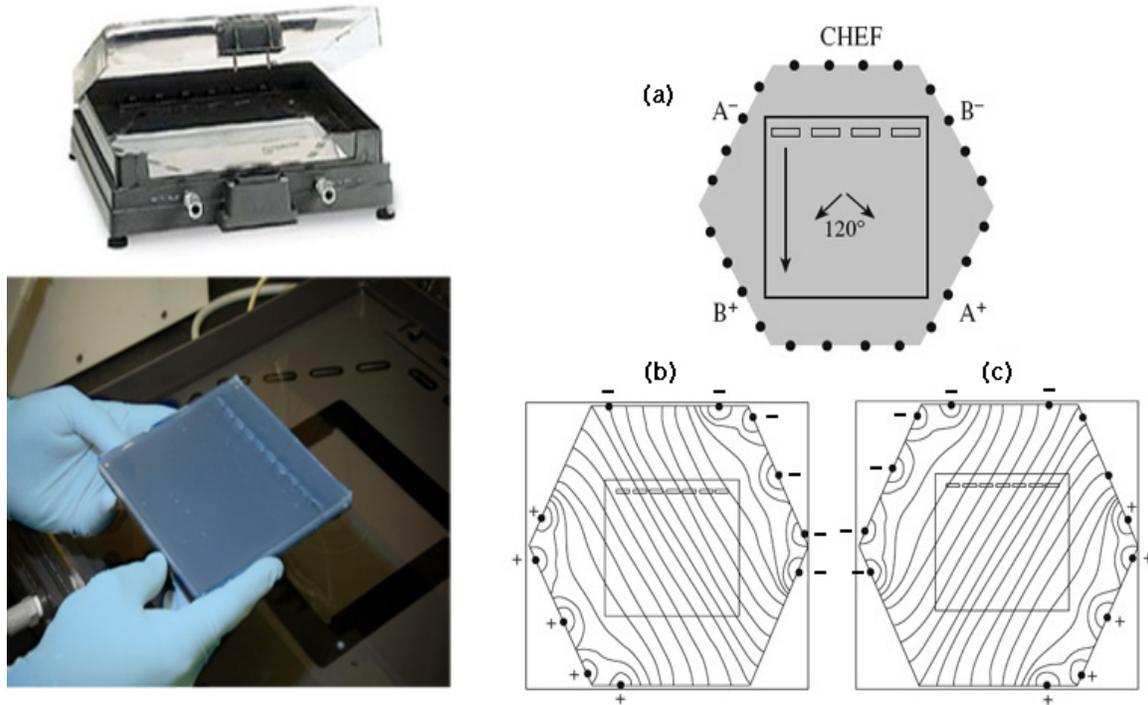
Después de gelificarse la agarosa, los tapones se desmoldaron y se colocaron en un tubo eppendorf; a cada tapón se le añadieron  $250\mu\text{L}$  de buffer de liticasa (Tris  $10\text{mM}$  pH 7.2, EDTA  $50\text{mM}$  y liticasa a una concentración final de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). A continuación se incubaron durante 2h a  $50^{\circ}\text{C}$ . Al término los tapones se lavaron y se adicionaron  $250\mu\text{L}$  de buffer de proteinasa K (EDTA  $100\text{mM}$  pH, Desoxicolato de sodio 2%, Lauril-sarcosina de sodio 1%) y proteinasa K para tener una concentración final  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Esto se incubó toda la noche a  $50^{\circ}\text{C}$ .

Finalmente los tapones se lavaron varias veces en buffer de lavado 1X (Tris  $20\text{mM}$  pH 8, EDTA  $50\text{mM}$ ) a temperatura ambiente con ligera agitación (cada lavado de 15 minutos), hasta lograr eliminar la turbiedad. Después del lavado los tapones se mantuvieron a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizados.

### **Electroforesis en campo pulsado**

Para separar los cromosomas se utilizó un equipo de electroforesis de campo eléctrico homogéneo en contorno cerrado (CHEF-DR III, Bio-Rad); en este sistema los electrodos se disponen en arreglo hexagonal que generan campos eléctricos homogéneos obteniéndose de esta forma líneas rectas.

El voltaje de la fuente de poder se divide entre los electrodos de tal forma que el gradiente de voltaje que se produce es constante a lo largo del gel (ver Figura 3), y el ángulo de reorientación es de  $120^{\circ}$ .



**Figura 3.** Cámara de electroforesis de campo eléctrico homogéneo en contorno cerrado CHEF. Los diagramas de la derecha representan la disposición de los electrodos en forma hexagonal. En (a) se muestra el ángulo formado por los campos eléctricos gracias al cual la migración final de las muestras es en línea recta (indicado por la flecha). Los diagramas (b) y (c) representan la aplicación de los campos eléctricos en el sistema CHEF. Las líneas muestran los campos eléctricos generados por los electrodos, en las dos direcciones alternativas de los vectores del campo eléctrico (Nassonova y col., 2008).

Los tapones se insertaron en un gel de agarosa ultrapura al 1% (Bio-Rad), también se insertó un estándar de los cromosomas de *S. cerevisiae* de la cepa YNN295 (Bio-Rad). Todas las muestras se fijaron con agarosa de bajo punto de fusión al 2%. El gel se colocó en la cámara de electroforesis con buffer de corrida TBE 0.5X a 14°C. Las condiciones de corrida empleadas fueron:

Tiempo de cambio(s) 60-120 Voltaje: 6Vcm

Tiempo de corrida: 24h Ángulo: 120°C

Finalmente el gel se reveló con bromuro de etidio, después de teñir el gel se lavó con agitación durante 1h con agua destilada. Los resultados se visualizaron en un fotodocumentador (Fluor S Multi Imager Bio Rad), con un tiempo de exposición a la cámara de 45s y el análisis de los datos se realizó con el software Quantity- One 1-D análisis 4.6.3 (Bio-Rad).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 CEPAS DE ESTUDIO

En estudios anteriores, realizados en el laboratorio L-321 del departamento de Alimentos y Biotecnología de la UNAM, se aislaron e identificaron por métodos bioquímicos (API 20 AUX) diferentes levaduras involucradas en las fermentaciones de mezcal, pulque y tequila. A partir de éstas se seleccionaron catorce cepas identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 5).

**Tabla 5.** Cepas de estudio aisladas de las fermentaciones de mezcal, pulque y tequila.

Tipo de Fermentación	Fuente	Cepas
Artesanal	Mezcal	M1, M2, M3, M4, M5, M6
	Pulque	P1, P2, P3
Industrial	Tequila	T1, T2, T3, T4, T5, *T6

\*Cepa de identidad conocida (*S. cerevisiae*) utilizada como control positivo durante la etapa de identificación.

Las condiciones de muestreo y origen de estas cepas se detallaron en Materiales y Métodos en la Tabla 3.

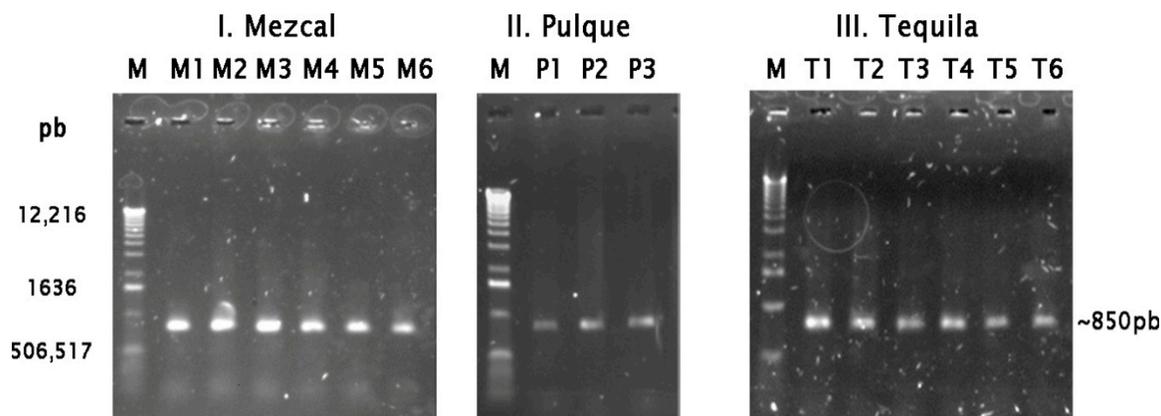
## 8.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS POR EL MÉTODO

### PCR-RFLP

#### 8.2.1 PCR-RFLP de la región 5.8-ITS

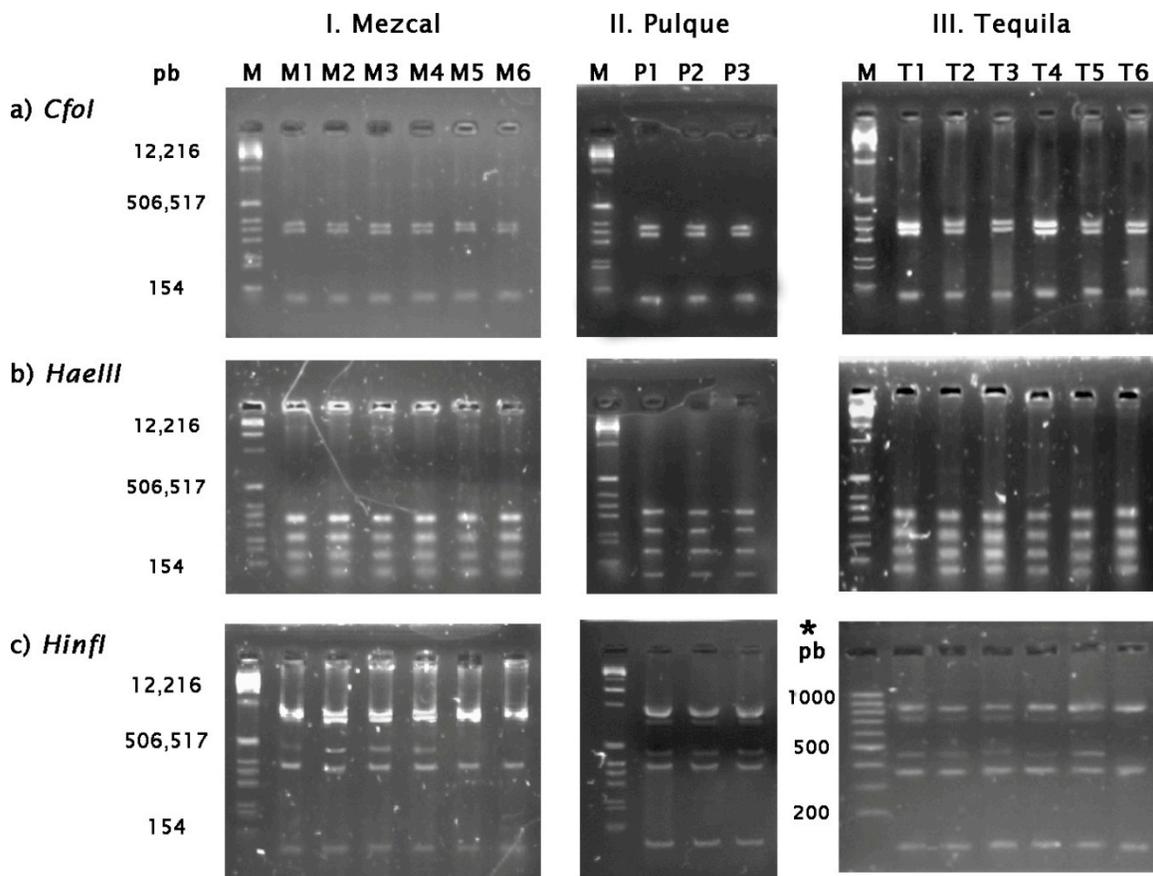
La identificación molecular de las cepas se llevó a cabo mediante el análisis por PCR-RFLP de la región comprendida por el ARNr 5.8S y los dos ITS adyacentes.

En la Figura 4 se observa que el tamaño del amplicón para esta región es de ~850pb, que corresponde con el reportado por Fernández-Espinar y col., (2000); quienes hacen una identificación detallada de las especies del género de *Saccharomyces* por este método.



**Figura 4.** Amplificación de la región 5.8S-ITS de las cepas aisladas de las fermentaciones de: mezcal (I), pulque (II) y tequila (III). M: marcador molecular 1Kb Invitrogen. Condiciones de electroforesis: gel de agarosa al 1%, 100V, 30min. T6: control positivo.

Para el análisis de restricción se utilizaron las enzimas *CfoI*, *HaeII* y *HinfI*, quienes generan un patrón especie-específico útil para identificar a un gran número de levaduras; sin embargo la cercanía genética del grupo de *Saccharomyces sensu stricto* dificulta la identificación precisa *S. cerevisiae*, pues las diferencias no son muy notables (Esteve-Zarzoso y col., 1999; Orberá, 2004). Por lo anterior, la identificación por PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS sirvió para ubicar a las cepas en el grupo de *S. sensu stricto*, los resultados del análisis de restricción se muestran en la Figura 5 y la Tabla 6.



**Figura 5.** Perfil de restricción de las cepas aisladas de las fermentaciones de: mezcal (I), pulque (II) y tequila (III), utilizando las enzimas: a) *CfoI* b) *HaeIII* M: marcador molecular 1Kb Invitrogen. y c) *HinfI* \*Marcador 100pb GIBCO. Condiciones de electroforesis: gel de agarosa al 1.8%, 80V, 60min. T6: control positivo.

**Tabla 6.** Tamaño (en pb) del amplicón de la región 5.8S-ITS y de los fragmentos de restricción obtenidos con por las enzimas: *CofI*, *HaeIII*, *HinfI* de una muestra representativa.

Procedencia de la muestra		5.8S-ITS	Fragmentos de restricción		
			<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
Mezcal	M(1-4)	859	366+340+139	329+233+179+133	376+121(749+463)
	M(5,6)	859	366+340+139	329+233+179+133	376+121
Pulque	P(1-3)	843	374+336+144	315+234+180+133	373+122(751+458)
Tequila	T(1-5)	846	367+335+143	316+224+176+130	361+124(738+464)
	T6	846	367+335+143	316+224+176+130	361+124

### ***CfoI***

La enzima de restricción *CfoI* generó tres fragmentos cuyos tamaños (~ 374 +336+144) son similares para todas las cepas de estudio; estos resultados corroboran que las cepas de estudio pertenecen al grupo de *Saccharomyces sensu stricto* (Fernández-Espinar y col., 2000).

### ***HinfI***

Para el caso de la enzima *HinfI* se observó una digestión incompleta, puesto que se observa el amplicón de ~850pb en todas las cepas; probablemente porque el tiempo de incubación con esta enzima fue insuficiente, se han encontrado reportes que indican hasta 10h para la digestión con esta enzima (Fernández, Ubeda, y col., 2000). En cuanto al perfil de restricción se observa un polimorfismo para esta región, dado que el número de fragmentos obtenidos no son iguales para todas las cepas estudiadas (ver Figura 5 (c)).

En el caso de las cepas M5, M6, y T6 sólo se observaron dos fragmentos (~ 376+121 pb). Este último patrón de restricción se asemeja a lo encontrado por Esteve-Zarzoso y col., (1999) quienes reportan dos fragmentos (365+150pb) para el grupo de *Saccharomyces sensu stricto*, pero Fernández-Espinar y col., (2000) reportan tres fragmentos (375+365+110pb) para el grupo de *S. sensu stricto*; cabe señalar que las bandas de 375 y 365pb son muy cercanas en peso molecular; por lo cual dependerá de las condiciones de corrida del gel para resolver dichas bandas. Esto puede explicar la discrepancia de resultados entre distintos grupos de trabajo.

En el caso de las cepas M(1-4), P(1-3) y T(1-5) se pueden distinguir además de los dos fragmentos característicos para *S. sensu stricto* (~ 376+121 pb), otros dos fragmentos (~749+463pb), los cuales aún no han sido reportados en la literatura; este polimorfismo que revela la enzima *HinfI* ha sido hallado en estudios anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo (Andrade, 2007).

### ***HaeIII***

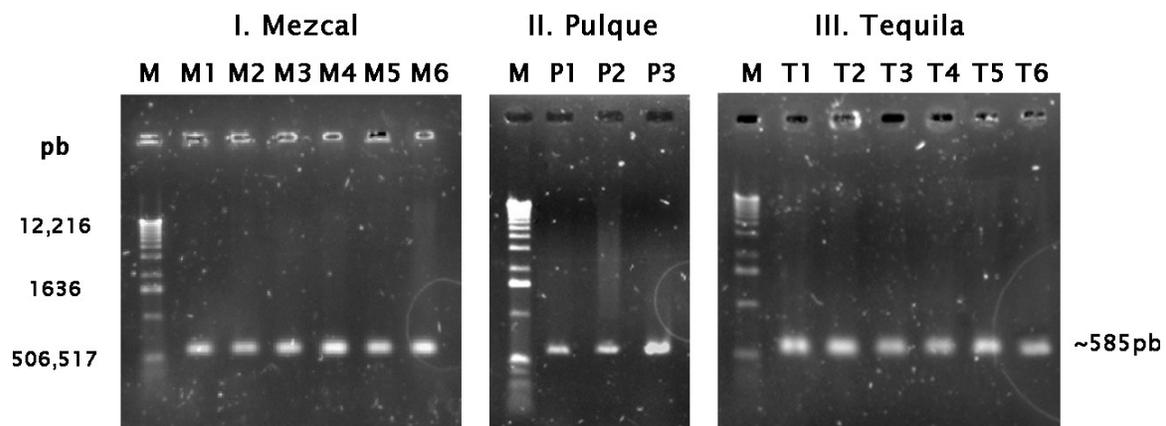
Por lo que se refiere a la enzima *HaeIII* se obtuvieron cuatro fragmentos de restricción (~329+233+179+133), estos resultados son importantes porque de acuerdo con la

literatura, los cortes producidos por la enzima *HaeIII* permiten dividir a las levaduras del grupo de *S. sensu stricto* en dos subgrupos: 1) *S. bayanus* / *S. pastorianus* y 2) *S. cerevisiae* / *S. paradoxus*; para el primer subgrupo la enzima genera tres fragmentos (495+230+125) y para el segundo cuatro fragmentos (325+230+170+125) (Fernández-Espinar, 2000). Por lo anterior nuestros resultados identifican a las cepas de estudio dentro del grupo de *Saccharomyces sensu stricto* y en el subgrupo de *S. paradoxus* / *S. cerevisiae*.

### 8.2.2 PCR-RFLP del gen MET2

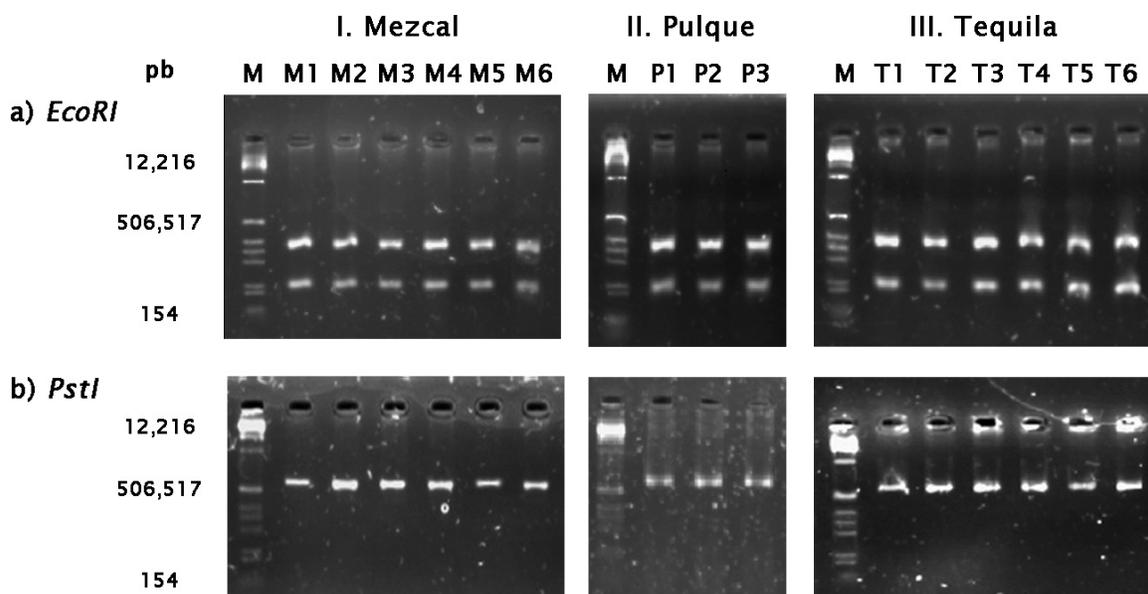
Para identificar a cuál de estas dos especies pertenecen las cepas de estudio fue necesaria una prueba molecular más específica. El método de PCR-RFLP para el gen MET2 nos permitió discriminar entre una especie y la otra (*S. paradoxus*/*S. cerevisiae*).

Los resultados de la amplificación del gen MET2 se muestran en la Figura 6 y los fragmentos de restricción por la enzima: a) *EcoRI* y b) *PstI* se muestran en la Figura 7 y la Tabla 7.



**Figura 6.** Amplificación del gen MET2 de las cepas aisladas de las fermentaciones de: mezcal (I), pulque (II) y tequila (III). M: marcador molecular 1Kb Invitrogen. Condiciones de electroforesis: gel de agarosa al 1%, 100V, 30min. T6: control positivo.

El tamaño del gen MET2 amplificado por PCR fue de ~585pb, el cual concuerda con el tamaño (580pb) reportado por Masneuf y col., (1996).



**Figura 7.** Perfil de restricción de las cepas aisladas de las fermentaciones de: mezcal (I), pulque (II) y tequila (III), utilizando las enzimas: a) *EcoRI* b) *PstI* M: marcador molecular 1Kb Invitrogen.. Condiciones de electroforesis: gel de agarosa al 1.8%, 80V, 60min. T6: control positivo.

**Tabla 7.** Tamaño (en pb) del amplicón del gen MET2 y de los fragmentos de restricción obtenidos por las enzimas: *EcoRI* y *PstI* de una muestra representativa.

Procedencia de las cepas	MET2	Fragmentos de restricción	
		<i>EcoRI</i>	<i>PstI</i>
Mezcal	599	370+340	574
Pulque	585	369+217	587
Tequila	585	374+213	594

En cuanto al análisis por PCR-RFLP la enzima *EcoRI* generó dos fragmentos de restricción (~369+217pb) y la enzima *PstI* no generó ningún fragmento (ver Figura 7b). Estos resultados nos indican que nuestras cepas de estudio pertenecen a la especie de *S. cerevisiae*; puesto que se ha reportado que para identificar a *S. cerevisiae* se obtienen dos fragmentos de restricción cuando se utiliza *EcoR* (369+219pb); y no se obtiene ningún fragmento de restricción cuando se utiliza *PstI*, ya que el gen MET2 de *S. cerevisiae* no tiene sitio de corte para la enzima *PstI*. En contraste, el gen MET2 de la especie *S. paradoxus* no tiene sitio de corte para ninguna de las dos enzimas utilizadas. (Antunovics y col., 2005; Masneuf y col. 1996).

En resumen por el método de PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS, se determinó que las cepas estudiadas pertenecen al grupo de *Saccharomyces cerevisiae* / *paradoxus* y por el método de PCR-RFLP del gen MET2 se identificaron a las cepas estudiadas como *S. cerevisiae* y no *S. paradoxus*.

### **8.3 TIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae***

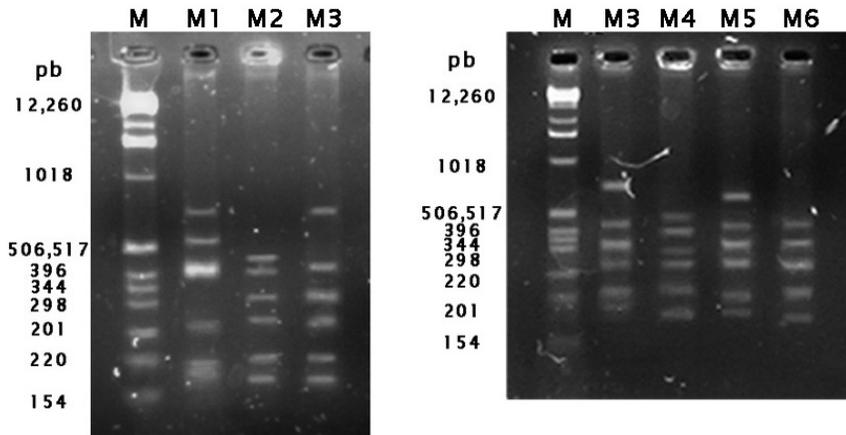
Una vez que las cepas fueron identificadas como *S. cerevisiae*, el siguiente paso fue determinar si existen diferencias entre las cepas de esta especie, utilizando dos métodos de tipificación: 1) el análisis de los fragmentos  $\delta$  y 2) la electroforesis de campo pulsado.

#### **8.3.1 Análisis de los elementos $\delta$**

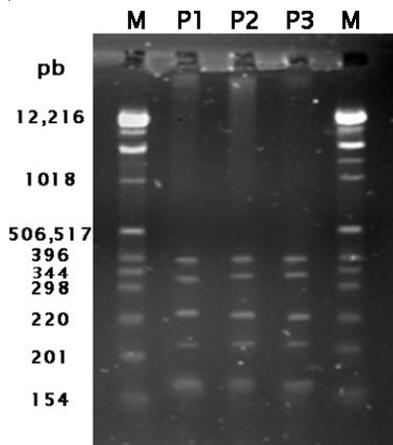
Como se mencionó en los antecedentes este método fue diseñado específicamente para la tipificación de *S. cerevisiae* a través de comparar los elementos  $\delta$ ; ya que se ha demostrado que existe una variabilidad intraespecífica en el número, tamaño y localización de estos elementos, lo cual permite la diferenciación entre cepas de *S. cerevisiae* (Fernández-Espinar y col., 2006).

Las Figuras 8 y la Tabla 8 muestran el perfil de los elementos  $\delta$  obtenidos por PCR utilizando los cebadores  $\delta 12$  y  $\delta 21$ , propuestos por Legras y Karst (2003).

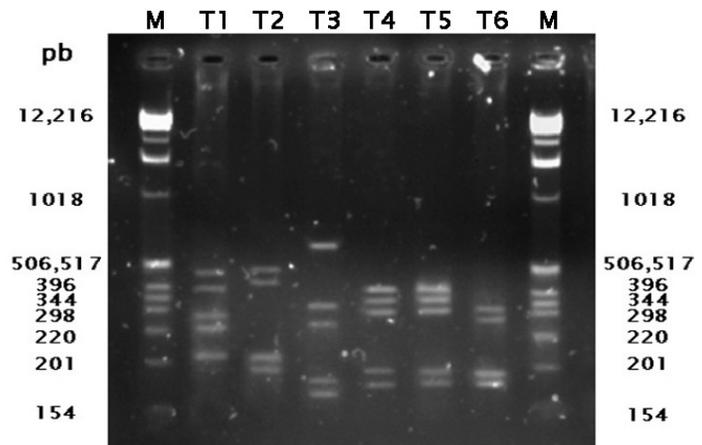
a) Mezcal



b) Pulque



c) Tequila



**Figura 8.** Amplificación por PCR de los elementos  $\delta$  de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de las fermentaciones de: a) mezcal b) pulque y c) tequila. M: marcador (1Kb Invitrogen). Condiciones de electroforesis: gel de agarosa al 3%, 80V, 60min.

**Tabla 8.** Tamaño (en pb) de los elementos  $\delta$  de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de las fermentaciones de mezcal, pulque y tequila.

Cepa	M1	M3	M5	T3	T2	M2	M4	T1	T4	T5	P1	P2	P3	M6	T6	
Nº	6	6	6	5	4	6	6	5	5	5	5	5	5	5	4	
Elementos $\delta$	735	735	733	623												
	553															
					485	471	476	467							443	
	423	435	433		422	418	402	394		402	408	388	389	389		
										344	355	320	327	327	325	311
		323	316	317		302	307	272		295	302					275
	242	242	249	250		257	246	229				232	227	222	245	
	194	201	202	182	205	203	197	205		194	194	206	206	195	205	190
180	173	183	168	194	175	177			178	180	170	167	165	178	178	

(M) Mezcal, (P): Pulque y (T): Tequila. Las columnas sombreadas indican las cepas cuyos perfiles son similares.

En la Tabla 8 se ordenaron las cepas de *S. cerevisiae* de acuerdo a sus semejanzas en los perfiles de los elementos  $\delta$ . Esta semejanza está basada en la concordancia en el número de elementos  $\delta$  y en los tamaños de estos elementos entre las cepas de *S. cerevisiae*. En general, se pueden distinguir cuatro patrones predominantes, los cuales se han marcado con diferentes tonos de sombreado.

- i) M3,M5
- ii) M2,M4
- iii) T4,T5
- iv) P1,P2,P3

De acuerdo a esta técnica si se presenta el mismo patron se considera que se trata de la misma cepa; o bien, no se pueden diferenciar a las cepas de *S. cerevisiae* por este método (Fernández-Espinar y col., 2006). Por lo tanto cada grupo antes mencionado representaría un mismo tipo de cepa de *S. cerevisiae* para este método. Por otra parte, se encontraron cepas que no siguieron los perfiles de los grupos anteriores, tales son: M1, M6, T1, T2, T3 y T6.

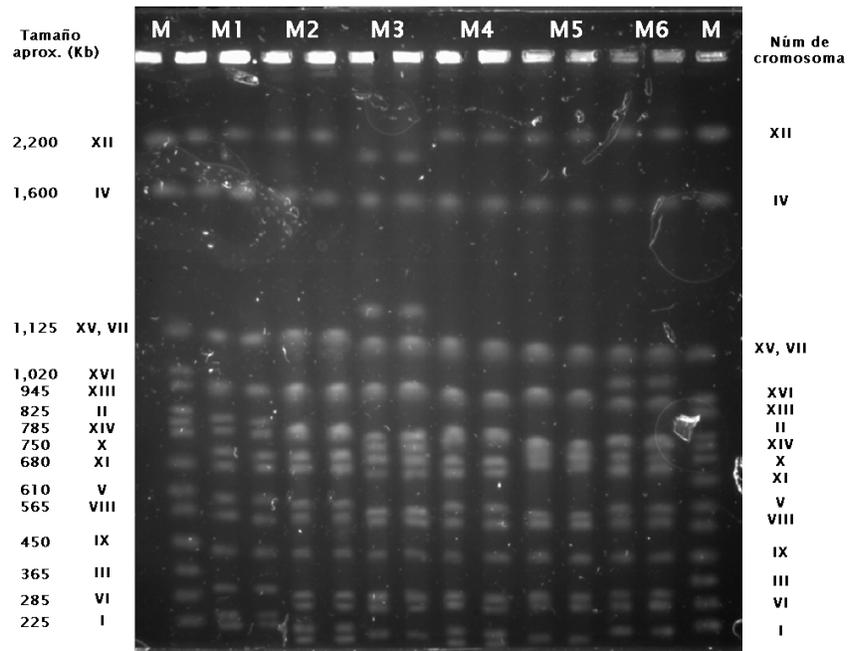
En la literatura se reportan diversas limitantes para este método. Como es el caso de (1) la aparición de bandas “fantasma” que es producida por la baja temperatura de alineación (Fernández-Espinar, 2006), dificultando la reproducibilidad entre laboratorios. (2) Otro inconveniente de esta técnica es que depende de la cantidad del ADN templado, tal como lo demuestra Fernández-Espinar y col., (2001) cuando se varía la cantidad de ADN el número de fragmentos obtenidos es diferente. (3) Además, este método demuestra un bajo poder discriminatorio para el caso de cepas nativas (cepas de mezcal y pulque en este caso), las cuales están estrechamente relacionadas a nivel genético (Schuller, 2004). Por todo lo anterior se recomienda confirmar estos resultados utilizando otras técnicas que ofrezcan un mejor poder discriminatorio, tal es el caso de la electroforesis de campo pulsado o el análisis de restricción del ADN mitocondrial.

### **8.3.2 Electroforesis de campo pulsado (PFGE)**

Para confirmar los resultados obtenidos anteriormente se eligió la técnica de PFGE, ya que ha demostrado ser una técnica altamente eficiente para diferenciar entre cepas de *S. cerevisiae*. El polimorfismo que revela esta técnica es el resultado de la adición o eliminación de fragmentos largos de ADN en cromosomas homólogos durante la evolución del genoma de la levadura (Fernández-Espinar, 2006; Longo y Vézinhel, 1993; Pérez-Ortín y col., 2002). De ahí que se observen diferentes patrones de separación de cromosomas pues la separación es por tamaño.

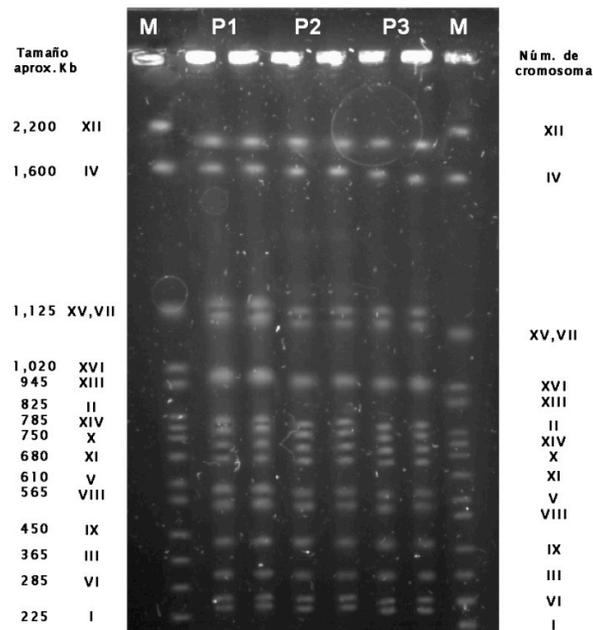
A continuación se presentan los patrones de cromosomas o cariotipos obtenidos para las cepas estudiadas.

a) Mezcal



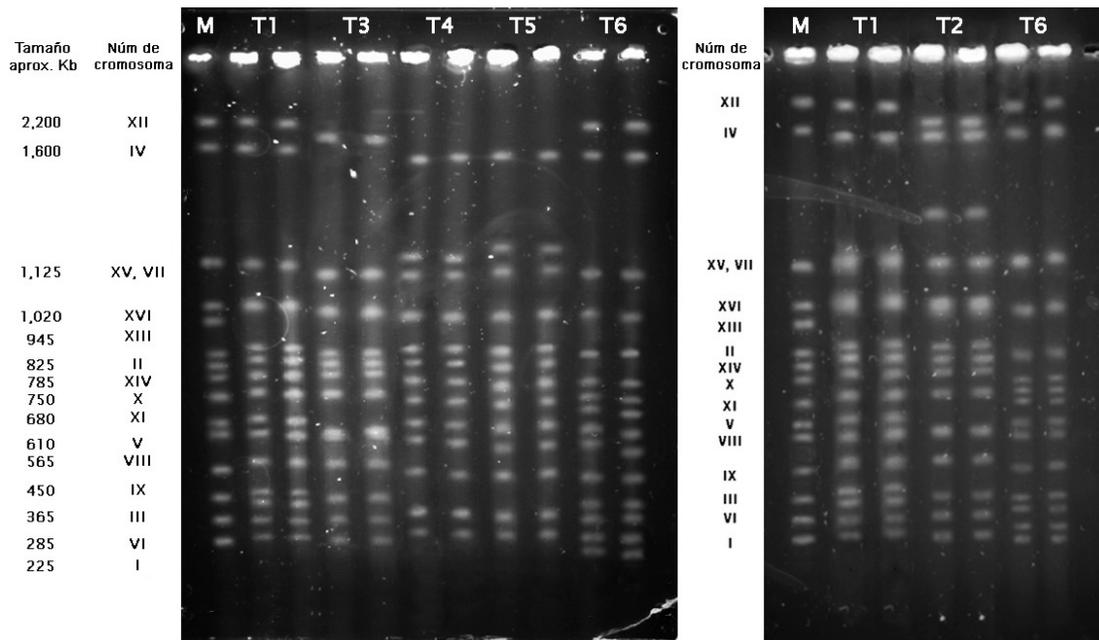
**Figura 9.** Electroforesis de campo pulsado del ADN cromosomal de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de la fermentación del mezcal. M: marcador *S. cerevisiae* YNN295 Bio-Rad. Cromosomas separados en gel de agarosa al 1% en TBE 0.5x recirculado a 14°C. Tiempo de corrida: 30h a 6V/cm con cambio de pulsos de 60 - 120s.

b) Pulque



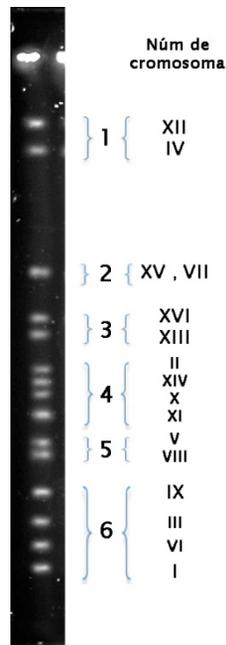
**Figura 10.** Electroforesis de campo pulsado del ADN cromosomal de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de la fermentación del pulque. M: marcador *S. cerevisiae* YNN295 Bio-Rad. Cromosomas separados en gel de agarosa al 1% en TBE 0.5x recirculado a 14°C. Tiempo de corrida: 30h a 6V/cm con cambio de pulsos de 60 - 120s

### C) Tequila



**Figura 11** Electroforesis de campo pulsado del ADN cromosomal de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de la fermentación del tequila. M: marcador *S. cerevisiae* YNN295 Bio-Rad. Cromosomas separados en gel de agarosa al 1% en TBE 0.5x recirculado a 14°C. Tiempo de corrida: 24h a 6V/cm con cambio de pulsos de 60 - 120s.

Las cepas nativas e industriales presentan una gran variabilidad en el tamaño de los cromosomas. Diversos autores (Bidenne y col., 1992; Nadal y col., 1996) señalan que el polimorfismo puede ser explicado parcialmente por los tamaños de variantes de cromosomas específicos. Bidenne y col (1992) han observado que esta diferencia puede alcanzar hasta un 45% del tamaño del cromosoma en cuestión; por tal motivo existe un grado de incertidumbre el asignar a cada banda un cromosoma determinado con respecto al marcador de peso molecular. Para facilitar el análisis se han definido arbitrariamente seis regiones de cromosomas, las cuales se muestran en la Figura 12.



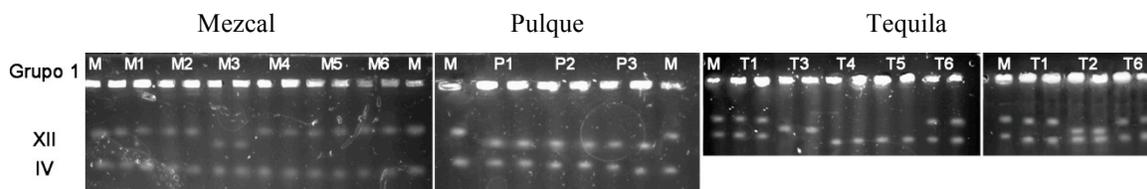
**Figura 12.** Perfil de separación de los cromosomas de *S. cerevisiae* (YNN295 Bio-Rad)

Los números romanos indican la posición de los diferentes cromosomas en la levadura. Para simplificar el análisis los cromosomas se agruparon arbitrariamente en seis regiones indicadas con números arábigos.

- *Análisis de los cromosomas de la región 1*

La región 1 comprende a los cromosomas XII y IV; en la Figura 13 se observan estas dos bandas para las cepas provenientes del mezcal, del pulque y algunas del tequila (T1, T2, T6); con la excepción de las cepas T3, T4 y T5 que sólo presenta una banda. Esta diferencia hallada en las cepas de tequila pudiera ser explicadas debido a que el tiempo de corrida (24h) fue insuficiente para resolver las dos bandas. Este comportamiento también se observa para los casos de las cepas M3, P1, P2 y P3; quienes presentaron una banda para un tiempo de corrida de 24h (ver Figura 15) y dos bandas para un tiempo de corrida de 30h (ver Figura 13).

Por lo anterior podemos inferir que para poder resolver las dos bandas es necesario utilizar un tiempo de corrida de 30h; sin embargo existe el riesgo de que las bandas de mayor movilidad electroforética queden fuera del gel para este tiempo de corrida. En nuestro caso particular las muestras T3, T4 y T5 sólo se pudieron correr a 24h.



**Figura 13.** Patrón cromosomal de la región 1 (cromosomas XII y IV) de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de las fermentaciones de mezcal, pulque y tequila. M: marcador *S. cerevisiae* YNN295 Bio-Rad. El tiempo de corrida para las cepas de mezcal y pulque fue de **30h** y para las cepas de tequila fue de **24h**.

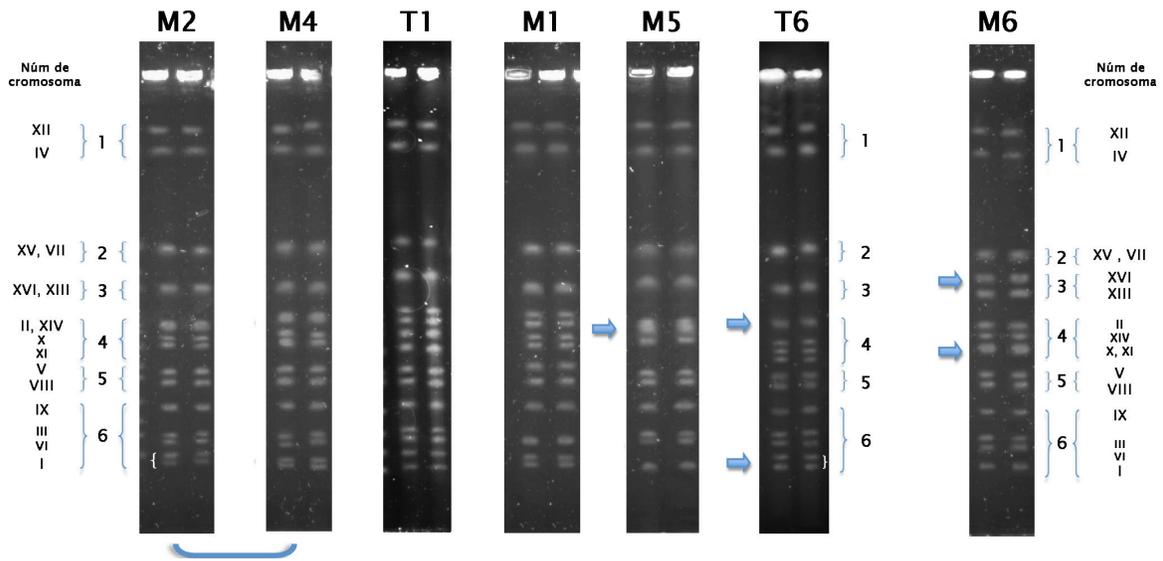
Por otra parte, se observó que la primer banda (cromosoma XII) presenta dos tamaños diferentes: las cepas M3, P1, P2, P3, T2, T3, T4 y T5 presentan un tamaño menor con respecto al tamaño de la misma banda para las cepas M1, M2, M4, M5, M6, T1 y T6. Lo que demuestra un variabilidad en el tamaño de la primer banda, que corresponde al cromosoma XII; estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura donde se menciona que el cromosoma XII presenta una hipervariabilidad (Carro y Piña, 2001; Nadal, 1996). En contraste, la segunda banda (cromosoma IV) mantiene su tamaño constante para todas las cepas de *S. cerevisiae*.

Las diferencias encontradas en el tamaño del cromosoma XII generaron dos grandes grupos de estudio. Cada grupo de estudio se continuará analizando de acuerdo a las regiones cromosómicas antes establecidas.

a) Grupo “a”: M1, M2, M4, M5, M6, T1 y T6 (Figura 14)

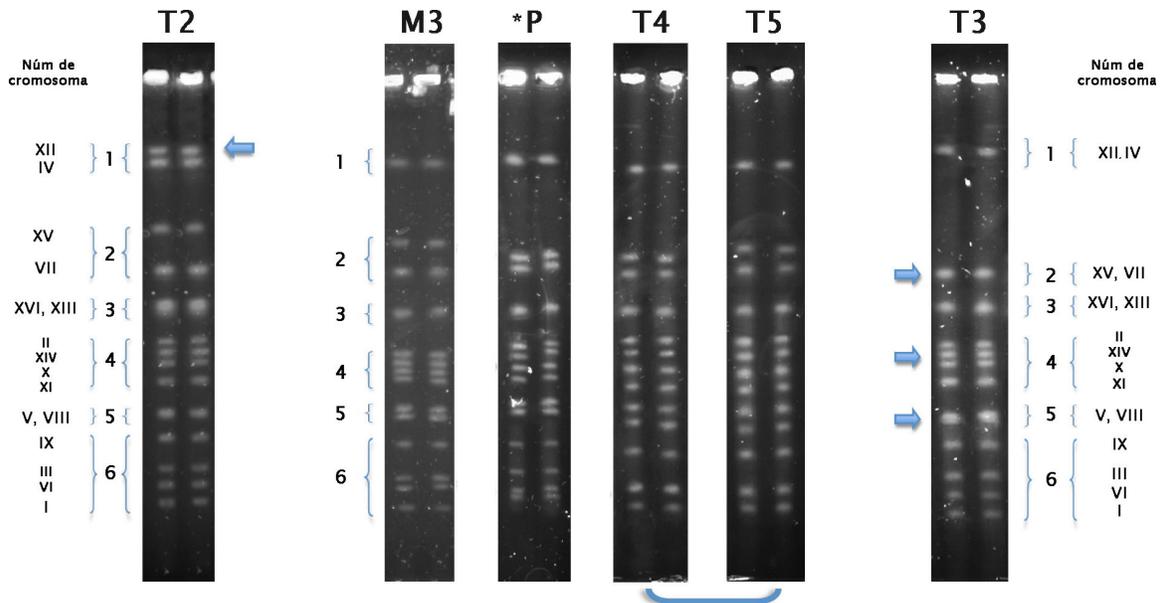
b) Grupo “b”: M3, P1, P2, P3, T2, T3, T4 y T5 (Figura 15)

### Grupo "a"



**Figura 14.** Perfiles de separación cromosomal por PFGE de las cepas identificadas como *S. cerevisiae* pertenecientes al grupo "a". Cromosomas separados en gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X recirculado a 14°C. Tiempo de corrida: 24h a 6V/cm con cambio de pulsos de 60 - 120s. →: diferencia, ⌊ : cepas con perfiles similares.

### Grupo "b"



**Figura 15.** Perfiles de separación cromosomal por PFGE de las cepas identificadas como *S. cerevisiae* pertenecientes al grupo "b". \*P representa a las tres cepas de pulque utilizadas, debido a que todas presentaron el mismo perfil. Cromosomas separados en gel de agarosa al 1% en TBE 0.5x recirculado a 14°C. Tiempo de corrida: 24h a 6V/cm con cambio de pulsos de 60 - 120s. →: diferencia, ⌊ : cepas con perfiles similares.

- *Análisis de los cromosomas de la región 2 (cromosomas XV y VII).*

Grupo a: M1, M2, M4, M5, M6, T1 y T6 (Figura 14)

Todas las cepas del grupo “a” presentaron una sola banda en esta región (ver Figura 14, región 2)

Grupo b: M3, P1, P2, P3, T2, T3, T4 y T5 (Figura 15)

En contraste con el patrón cromosomal del grupo “a”, la mayoría de las cepas de este grupo (M3, P1, P2, P3, T2, T4 y T5) presentaron dos bandas; excepto T3 quien presenta una sola banda. Cabe mencionar que el tamaño del cromosoma XV es variable, siendo más notorio para el caso de la cepa T2.

- *Análisis de los cromosomas de la región 3 (cromosomas XVI y XIII).*

Grupo a: M1, M2, M4, M5, M6, T1 y T6 (Figura 14)

En el patrón cromosomal de la cepa M6 se distinguen las dos bandas que representan a los cromosomas XVI y XIII; en cambio en el resto de los patrones de las cepas de este grupo sólo se distingue una banda.

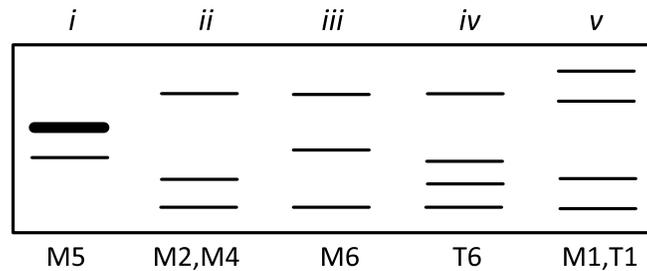
Grupo b: M3, P1, P2, P3, T2, T3, T4 y T5 (Figura 15)

A diferencia del patrón cromosomal del grupo “a” todas las cepas de este grupo presentaron una sola banda, lo cual señala que en estas cepas el tamaño del cromosoma XIII es semejante al cromosoma XVI; por lo que no se pueden resolver las dos bandas bajo estas condiciones electroforéticas.

- *Análisis de los cromosomas de la región 4 (II, XIV, X, XI).*

Grupo a: M1, M2, M4, M5, M6, T1, T6 (Figura 14)

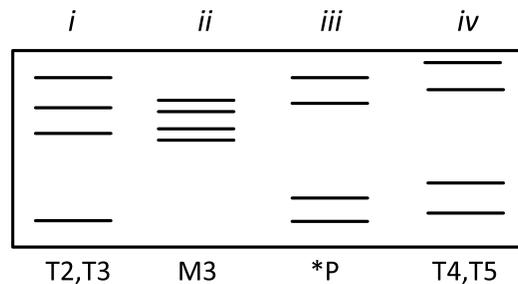
El número de bandas que se resuelven en los patrones de cada una de las cepas que conforman a este grupo fue diferente: las cepas M2, M4 y M6 mostraron tres bandas, la cepa M5 mostró dos bandas y las cepas M1, T1 y T6 mostraron cuatro bandas. Esto demuestra un polimorfismo en esta región tal como se muestra en el Esquema 3.



**Esquema 3.** Representación del polimorfismo de los cromosomas II, XIV, X y XI para las cepas del grupo “a”

Grupo b: M3, P1, P2, P3, T2, T3, T4 y T5 (Figura 15)

Todas las cepas del grupo “b” presentaron cuatro bandas, pero con diferente patrón cromosomal tal como se muestra en el siguiente Esquema 4.



**Esquema 4.** Representación del polimorfismo de los cromosomas II, XIV, X y XI para las cepas del grupo “b”. \*P designa a las cepas P1, P2 y P3.

- *Análisis de los cromosomas de la región 5 (V y VIII)*

Grupo a: M1, M2, M4, M5, M6 T1 y T6 (Figura 14)

En todas las cepas se observan las dos bandas que representan a los cromosomas que conforman este grupo.

Grupo b: M3, P1, P2, P3, T2, T3, T4 y T5 (Figura 15)

Las cepas T2 y T3 presentaron una sola banda; en cambio el resto de las cepas de este grupo presentaron dos bandas de acuerdo a los dos cromosomas para esta región (V y VIII). Así mismo se observó un polimorfismo en el tamaño de estos cromosomas (ver Figura 15, región 5)

- *Análisis de los cromosomas de la región 6 (IX, III, VI, I)*

Grupo a: M1, M2, M4, M5, M6, T1 y T6 (Figura 14)

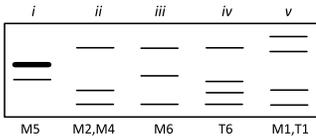
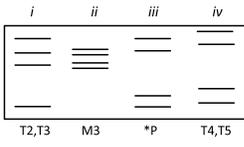
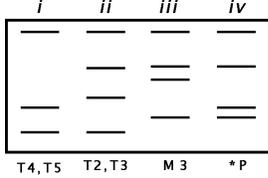
En las cepas M2, M4, T1, T6 se pueden distinguir cinco bandas y no cuatro, como se esperaría de acuerdo al número de cromosomas en esta región. Algunos autores han demostrado que con frecuencia los cromosomas I, VI y VII pueden presentar dos bandas que corresponden a un mismo cromosoma. (Pataro y col., 2000; Longo y Vezinhet, 1993). Dado que los cromosomas I y VI se encuentran en esta región la aparición de cinco bandas, puede deberse a que dos de las bandas pertenezcan a uno de estos dos cromosomas.

Grupo b: M3, P1, P2, P3, T2, T3, T4 y T5 (Figura 15)

En los patrones cromosomales de las cepas M3, P1, P2, P3, T2 y T3 se pueden observar cuatro bandas que corresponden a los cromosomas de esta región; por el contrario los patrones cromosomales de las cepas T4 y T5 sólo presentaron tres bandas.

En la Tabla 9 se resumen los resultados antes descritos.

**Tabla 9.** Comparación de los patrones cromosomales para las cepas de *S. cerevisiae* estudiadas.

Región/ cromosoma	Comparación del tamaño cromosomal	
1/XII, IV	IV: permanece constante XII: presenta polimorfismo y divide en dos grupos a las cepas	
	<b>Grupo A:</b> M1,M2,M4,M5,M6 T1,T6	<b>Grupo B:</b> M3, P1,P2,P3,T2,T3,T4 ,T5
	El tamaño del cromosoma XII de A > B	
2/XV, VII	Presentan una banda de tamaño constante	En M3, P1,P2,P3,T2,T3,T4 y T5 se resuelven dos bandas. En T2 el tamaño de la banda del cromosoma XV es mayor. En T3 sólo se resuelve una banda
3/XVI, XIII	En T1 M1,M2,M4,M5 y T6 se resuelve sólo una banda. El tamaño de la de T1 es mayor. En M6 se resuelven dos bandas	Se resuelve una banda de tamaño constante
4/IX, II,XIV,X,XI	Se resuelven dos, tres y cuatro bandas de acuerdo al siguiente esquema: 	Se resuelven cuatro bandas de acuerdo al siguiente esquema: 
5/V, VIII	Se resuelven dos bandas de tamaños constantes.	En M3, *P (P1,P2,P3),T4 y T5 se resuelven dos bandas con tamaños variable entre ellas. En T2 y T3 sólo se resuelve una banda.
6/IX,III,VI,I	Se resuelven cuatro y cinco bandas de acuerdo al siguiente esquema: 	Se resuelven tres y cuatro bandas de acuerdo al siguiente esquema: 
<b>Polimórfico</b>		<b>Constante</b>
Regiones con mayor polimorfismo: 1,4,6 Cepas con patrones cromosomales más polimórficos: T2, T3 y M6. Y en menor grado T1.		Cromosoma más constante: IX Cepas con patrones cromosomales semejantes: 1), M2, M4; 2) T4, T5; 3) P1,P2,P3

En resumen (Tabla 9) las regiones que presentan mayor polimorfismo en el tamaño de los cromosomas son: la región 1 (cromosomas XII y IV), la región 4 (cromosomas II, XIV, X y XI) y la región 6 (cromosomas IX, III, VI y I). Sin embargo en la región 6 se observó que la banda correspondiente al cromosoma IX permanece constante en su tamaño. Esta baja variabilidad en el tamaño del cromosoma IX también ha sido reportada por Pataro, y col., 2000.

De modo que, las cepas que presentaron mayor polimorfismo fueron T2, T3 y M6; y en menor grado T1.

Ahora bien las cepas que presentan perfiles cromosomales semejante son: 1) M2 y M4; 2) T4, T5; 3) P1, P2, P3.

#### 1) M2 y M4

Comparando los patrones cromosomales de las cepas M2 y M4 se determinó que son iguales; estos resultados coinciden con los obtenidos por el análisis de los fragmentos  $\delta$  (ver Figura 8 y Tabla 8 en la pag 43.). Por lo tanto las cepas M2 y M4 pudieran ser la misma cepa de *S. cerevisiae*.

#### 2) T4 y T5:

Así mismo las cepas T4 y T5 presentaron el mismo patrón cromosomal y de igual forma son coincidentes con el análisis de los fragmentos  $\delta$ .

#### 3) P1, P2 y P3

De igual manera las cepas P1, P2 y P3 muestran el mismo patrón cromosomal, lo cual indica que podrían ser la misma cepa de *S. cerevisiae*, estos resultados concuerdan con los hallados por el análisis de los fragmentos  $\delta$ .

De acuerdo con el análisis de los elementos  $\delta$  las cepas M3 y M5 son semejantes; no obstante estos resultados difieren con los obtenidos por medio del análisis de los patrones cromosomales donde se muestra que estas cepas difieren en las regiones 1 y 4. Como se ha dicho el PFGE es una prueba confirmatoria; por lo tanto las cepas M3 y M5 son diferente cepa de *S. cerevisiae*.

Las cepas de *S. cerevisiae* tienen una gran capacidad de reorganizar su genoma como respuesta de adaptación al medio ambiente, una de las posibles manifestaciones de este fenómeno es el alto nivel de polimorfismo en el tamaño de los cromosomas, que presentan las cepas de esta especie (Longo y Vézinhel, 1993). Tal como se observa en los resultados se encontraron diferentes tipos de cepas de *S. cerevisiae*.

Como se indicó al inicio de este apartado las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas provienen de tres distintos procesos de fermentación, tanto artesanal: mezcal y pulque, como industrial: tequila. Con los resultados obtenidos se puede observar una marcada tendencia de que existe mayor semejanza entre las cepas de un mismo proceso en comparación con las cepas provenientes de otros procesos.

Por ejemplo la mayoría de la cepa aisladas del mezcal (M1, M2, M4, M5, M6) pertenecen al grupo “a” según su semejanza en su perfil cromosomal obtenido por PFGE. Por otra parte, todas las cepas aisladas del pulque (P1, P2, P3) presentaron gran semejanza en sus perfiles de separación cromosomal. Finalmente la mayoría de las cepas de tequila (T2, T3, T4, T5) pertenecen al grupo “b” de acuerdo a la semejanza en el perfil cromosomal.

Por lo anterior se puede sugerir que existe una correlación entre el hábitat y el proceso que determinan la selección de las cepas de *S. cerevisiae*, siendo éstas probablemente las más aptas para cada proceso en específico.

Esta mejor adaptación de las cepas a un microambiente es muy importante para el desarrollo de cultivos iniciadores que permitan mejorar y homogenizar las características finales de una bebida en específico.

Evaluando los dos métodos de tipificación utilizados, se puede decir que: la técnica de electroforesis en campo pulsado requiere de más tiempo y es más cara en comparación con la de los fragmentos  $\delta$ ; de acuerdo a los resultados obtenidos se recomienda utilizar el método del análisis de los fragmentos  $\delta$  como un método rápido de análisis y en caso de encontrar perfiles iguales que determinen que una cepa es la misma, el uso de la electroforesis en campo pulsado confirmará si una cepa efectivamente es o no es la misma.

## 9. CONCLUSIONES

- Se identificaron como *Saccharomyces cerevisiae* a catorce levaduras provenientes de diferentes fuentes, tanto de fermentaciones artesanales: mezcal y pulque, como de una fermentación industrial: tequila; utilizando el método de PCR-RFLP enfocado en la región 5.8S-ITS y el gen MET2.
- Se tipificaron las cepas de *S. cerevisiae* mediante dos métodos: el análisis de los fragmentos  $\delta$  y la electroforesis en gel de campo pulsado; siendo este último método el que se utilizó como prueba confirmatoria para la tipificación de las cepas.
- Se tipificaron las cepas de *S. cerevisiae* y se determinó que existen diferencias notables entre los perfiles cromosomales de las cepas provenientes del mezcal (grupo “a”) en comparación con los perfiles cromosomales de las cepas de tequila y pulque (grupo “b”). Así mismo se determinó que las diferencias entre los perfiles cromosomales de las cepas de tequila comparadas con las cepas de pulque fueron menores.
- Por otro lado las cepas aisladas del mismo proceso tienden a presentar perfiles muy semejantes, incluso en algunos casos se observaron perfiles cromosomales idénticos, los cuales sugieren que se trata de la misma cepa de *S. cerevisiae* (Mezcal: M2 y M4; Pulque: P1, P2 y P3; Tequila: T4, T5).

En resumen, se observó que existe una mayor semejanza entre los perfiles cromosomales de las cepas aisladas de un mismo proceso; en cambio se observó que existen diferencias notables entre los perfiles cromosomales de las cepas provenientes de diferentes procesos.

## 10. PERSPECTIVAS

El estudio de las cepas de *S. cerevisiae* involucradas en la fermentación de bebidas de *Agave* tiene amplias perspectivas, ya que es un tema muy poco estudiado pues la mayoría de los estudios que existen al respecto se han hecho en fermentaciones de vino.

El objetivo a largo plazo es la selección de cepas de *S. cerevisiae* que puedan utilizarse como cultivo iniciador con el fin de obtener una mejor calidad y homogeneidad en cada uno de los procesos. Como un primer paso para lograr este objetivo se ha hecho la tipificación de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de las fermentaciones de *Agave* (mezcal, pulque y tequila).

- El paso inmediato a este trabajo es la caracterización de fisiológica de las cepas de *S. cerevisiae* en conjunto con un estudio de la dinámica poblacional y monitorear la sucesión de poblaciones de las cepas de *S. cerevisiae* dentro de la fermentación para determinar cual o cuales son las cepas predominantes.

Lo anterior permitirá saber cuál es el impacto de los diferentes tipos de *S. cerevisiae* en cada proceso para así seleccionar una o varias cepas que posean mayor cantidad de características deseables para cada proceso tales como: elevada producción de congenéricos, factor killer, tolerancia al etanol, al estrés osmótico y al estrés térmico, etc. Una vez seleccionadas las cepas para cada proceso se podrá hacer un inóculo mixto y posteriormente probarlo en cada uno de los diferentes procesos de fermentación.

- Aumentar el número de cepas de estudio lo que permitirá tener una variedad de opciones de las cuales elegir las cepas con mejores características.
- Además de la tipificación falta profundizar en cuanto a las diferencias moleculares encontradas, es decir, hacer estudios a nivel de expresión génica lo que permitirá saber si estas diferencias encontradas tienen algún impacto en el fenotipo y si éste es favorable o no para el proceso.

- Mejoramiento genético de las cepas, lo cual permitirá desarrollar cepas con características deseables (por ejemplo aumentar la producción de congénicos, producción de bacteriocinas, etc.) tal como se hace en el caso de las cepas vínicas (Fleet 2008).

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Andrade Meneses, O. "Identificación de levaduras por medio de PCR-RFLP de la región RNAr 5.8S-ITS aisladas durante la fermentación de mezcal de la región Sola de Vega Oaxaca." *Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México*, 2007: 45, 57-59.
2. Antunovics, Z., Irini, L., Sipiczki, M. "Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrized grape must." *Journal of Applied Microbiology*, **98** (2005): 971-979.
3. Aparecida O. V., Araújo, V. M., Gomes F. L., de Miranda, C. I., Schüller, D., Alves, H., Casal, M., de Oliveira, S. J., Dias, A. L., Alves, S. P., Lopes, B. R. "Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaca production." *Applied and Environmental Microbiology*, **74** (2008): 693-701.
4. Baleiras Couto, M.M., Reizinho, R.G., Duarte, F.L. "Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise *non-Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations." *International Journal of Food Microbiology*, **102** (2005): 49-56.
5. Barnett, J.A. "The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: A short review for non-taxonomists." *Yeast*, **8** (2004): 1-23.
6. Bidente, C., B. Blondin, Dequin S., and F. Vezinhet. "Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*." *Current Genetics*, **22** (1992): 1-7.
7. Carro, D., Piña, B. "Genetic analysis of the karyotype instability in natural wine yeast strains." *Yeast*, **18** (2001): 1457-1470
8. Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F., Martini, A. "Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation." *Antonie Van Leeuwenhoek*, **85** (2004): 159-64.
9. Csoma, H., Zakany, N., Capece, A., Romano, P., Sipiczki, M. "Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis." *International Journal of Food Microbiology*, **140** (2010): 239-248.
10. Dlačhy, D., Tornai-Lehoczki, J., Gárbor, P. "Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification." *Systematic and Applied Microbiology*, **22** (1999): 445-453.

11. Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. "Identification of yeasts by RFLP of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal." *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49** (1999): 329-337.
12. Fleet, G.H. "Wine yeast for the future. Minireview." *FEMS. Yeast Research*, **8** (2008): 979-995.
13. Flores, B. E., Alba, G. J., Arrizon, G. J., Romano, P., Capece, A., Gschedler, A. "The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts." *Letters in Applied Microbiology*, **41** (2005): 147-152.
14. Fernández, M., Ubeda, J.F., Briones, A.I.,. "Typing of *non-Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making." *International Journal of Microbiology*, **59** (2000): 29-36.
15. Fernández-Espinar M., Esteve-Zarzoso B., Querol A., Barrio E. "RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5,8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts." *Antonie Van Leeuwenhoek*, **78** (2000): 87-97.
16. Fernández-Espinar, M., López, V., Ramón, D., Bartra, E., Querol, A. "Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques." *International Journal of Food Microbiology*, **70** (2001): 1-10.
17. Fernández-Espinar, M., Martorrel, P., De Llanos, R., Querol, A. *Capítulo 3. Molecular Methods to Identify and characterize yeasts in food and beverages. Vol. 2, en The yeast handbook vol. 2 Yeast in food and beverages.*, por A. Querol and G. Fleet, 56-82. Germany: Springer-Verlag, 2006.
18. Fernandez-Espinar, M., Barrio, E., Querol, A. "Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex." *Yeast*, **20** (2003): 1213-1226.
19. Gallagher, S. *Molecular Biology Techniques. Detection of nucleic acids using absorption spectroscopy* en *Current Protocols in Protein Science* , Suplemento 13, Apéndice 4K.1. John Wiley & Sons, Inc, 1998.
20. Giraffa, G., Nevian, E.i. "DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems." *International Journal of Food Microbiology*, **67** (2001): 19-34.
21. Gonzalez, A., Valenzuela, V. "Eucariontes. *Saccharomyces cerevisiae*." en *Microbios en línea*, por R.E., Martínez, R.J. Martínez, Cap. 20 1-13. México: Asociación Mexicana de Microbiología A.C.; Citado 10/06/10. Disponible en línea: <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>

22. Guillamón, J.M., Barrio, E., Huerta, T., Querol, A. "Rapid Characterization of Four Species of the *Saccharomyces Sensu Stricto* Complex According to Mitochondrial DNA Patterns." *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44** (1994): 708-714.
23. Herschelb, J., Ananiev, G., Schwartz, D. "Pulsed-field gel electrophoresis." *Nature Protocols*, **2** (2007): 677 - 684.
24. Hoffman, C.S., Winston, F. "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*." *Gene*, **57** (1987): 267-282.
25. Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. "Phylogenetic relationships among yeasts of the *Saccharomyces complex* determined from multigene sequence analyses." *FEMS Yeast Research*, **3** (2003): 417-432.
26. Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. "Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences." *Antonie Van Leeuwenhoek*, **73** (1998): 331-71.
27. Lappe, P., Moreno, R., Arrizón, J., Herrera, T., García, a., Gschaedler, A. "Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages." *FEMS. Yeast Research*, **8** 2008: 1037-1052.
28. Legras, J., and F. Karst. "Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation." *FEMS Microbiology Letters*, **221** (2003): 249-255.
29. Longo, E., Vezinhet, F. "Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*." *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (1993): 322-326.
30. Masneuf, I., Aigle, M., Dubordieu, D. "Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology." *FEMS Microbiology Letters*, **16** (1996): 239-244.
31. Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (1993): 695-700.
32. Nadal, D., Colomer, B., Piña, B. "Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains." *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (1996): 1944-1950.

33. Nasonova, E.S. "Pulsed Field Gel Electrophoresis: Theory, instruments and application." *Cell and Tissue Biology*, **2** (2008): 557-565.
34. Ness, F., Lavallée, F., Dubordieu, D., Aigle, M., Dulau, L. "Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **62** (1993): 89-94.
35. Orberá, R. T. "Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico." *Revista Iberoamericana de Micología*, **21** (2004): 15-19.
36. Palacios, A., Carrillo, D., Iruzubieta, J., Boutou, S., Fleury, A., Labadie, D., Chatonnet, P. "Las eficaces Técnicas moleculares de identificación y cuantificación de las levaduras enológicas." *Publicaciones vino-enología. Laboratorios Excell*, (Citado Mayo 4 2010): Disponible en línea: [http://www.labexcell.com/dynsite/images/stories/publication/pcr\\_e\\_identificacion\\_de\\_levaduras\\_07.pdf](http://www.labexcell.com/dynsite/images/stories/publication/pcr_e_identificacion_de_levaduras_07.pdf).
37. Pataro, C., Guerra, J.B., Petrillo-Peixoto, M.L., Mendonca-Hagler, L.C., Linardi, V.R., Rosa, C.A. "Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil." *Journal of Applied Microbiology*, **89** (2000): 24-31.
38. Pérez-Ortín, J.E., Querol, A., Puig, S., Barrio, E. "Molecular characterization of a chromosomal rearrangement in the adaptative evolution of yeast strains." *Genome Research. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **12** (2002): 1533-1539.
39. Puig, S., Querol, A., Barrio, E., Pérez-Ortín, J.E. "Mitotic recombination and genetics changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation." *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (2000): 2057-2061.
40. Querol, A., Barrio, E., Ramon, D. "A comparative study of different methods of yeast strain characterization." *Systematic and Applied Microbiology*, **15** (1992): 439-446.
41. Rainieri, S., Zambonelli, C., Kaneko, Y. "*Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetics diversity and evolution." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **96** (2003): 1-9.
42. Schuller, D., Valero, E., Dequin, S., Casal, M. "Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains." *FEMS. Microbiology Letters*, **231** (2004): 19-26.
43. Sherman, F. *An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae, Yeast Genetics*. Vol. 6, en *The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*, por R.A. Meyers, 302-325. VCH Pub., 1997.

44. Venema, J., Tollervey, D. "Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Annual Review of Genetics*, **33** (1999): 261-311.
45. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Z, Marc. "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting." *Nucleic Acids Research*, **23** (1995): 4407-4414.
46. Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey S.V. "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucleic Acids Research*, **18** (1990): 6531-6535.