



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

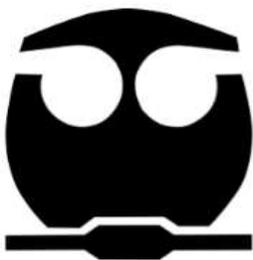
**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y  
EVALUACIÓN DE TOLERANCIAS A  
DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS DE  
CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*, AISLADAS  
DE MOSTOS DE MEZCAL PROCEDENTES  
DE DIFERENTES REGIONES DE OAXACA**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

**HASIBI ZAVALA NACUL**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



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: OLGA DEL CARMEN VELAZQUEZ MADRAZO  
Vocal: MARTHA GILES GOMEZ  
Secretario: FRANCISCO RUIZ TERAN  
1er. Suplente: NORMA ANGELICA CAMACHO DE LA ROSA  
2° Suplente: LAURA CARMONA SALAZAR

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: HASIBI ZAVALA NACUL \_\_\_\_\_

*Dedicado a todas aquellas persona que contribuyeron a la realización de este trabajo. Sin su apoyo no hubiera sido posible.*

### *Agradecimientos...*

Todos los días encuentro motivos para ser feliz y agradecerle a la vida las oportunidades que me ha brindado. He sido tan afortunada de tenerlos a mi lado y disfrutar de su compañía.

Aquel día decidí cambiar tantas cosas...

Aquel día aprendí que los sueños son solamente para hacerse realidad.

Desde aquel día ya no duermo para descansar... ahora simplemente duermo para soñar....Walt Disney.

### *A mis padres...*

Les agradezco ser mi luz, mi guía y mi fuerza motriz. Son mi razón de querer ser mejor cada día y de levantarme sin importar las caídas. Son el mejor ejemplo de triunfo que alguien pude desear y estoy orgullosa de ser su hija. También les agradezco su infinito amor y aunque tenemos momentos que no son tan color rosa siempre encontramos la manera de funcionar. A mi madre quiero agradecerle ser una mujer exitosa que no tiene barreras y que solo la detiene su propia voluntad, una madre que marca mi determinación y carácter. A mi padre le agradezco ser un luchador incansable, un soñador impasible y dedicado que se deja guiar por la fuerza del corazón, un padre cariñoso y dedicado.

### *A mis abuelos...*

Les agradezco el ser mi corazón y darme todo su cariño, dedicarme su valioso tiempo y hacerme crecer como persona con sus consejos, sus vivencias y su inconmensurable amor. Blanca y Toño, Rogelio y Bertha no hay día que no agradezca a la vida por tener la dicha de verlos, gracias por los besos, los abrazos, las ricas comidas y las sabias lecciones.

### *A mis tíos...*

Les agradezco compartir conmigo su amor y sus sabios consejos, así como celebrar mis éxitos y ayudarme en los tropiezos. Gracias por brindarme un lugar en sus corazones. Con especial dedicación a Wardy que donde quiera que esté siempre será una luz en mi

vida y a Gabriel por ser un apoyo incondicional y brindarme siempre su tiempo y atención.

### *A mi familia de sangre y de elección..*

No hay palabras que puedan expresar lo mucho que agradezco su simple compañía, ser mis cómplices y mis mejores aliados. Las risas, los llantos, las buenas ideas y las no tan brillantes, son mis mejores compañeros en este viaje que llamo vida y sin duda me han enseñado a ser mejor persona. Gracias por cada uno de los momentos y disfrutar conmigo el placer de no hacer nada o de conquistar al mundo.

A mis primas, Sagjiy, que es mi persona, no hay otra frase que lo explique mejor y Daniela, que son más hermanas que otra cosa, al werito por las risas y los buenos ratos, a los Zavala y los Nacul por hacer de cada reunión toda una celebración.

A mi segunda hermana Azu, eres la mejor parte de mi vida, el Dean de mi Sammy, mi aliento, ánimo y apoyo, la persona para reír y llorar, para hacer todo y hacer nada. Eres una amiga increíble, mi guía, mi paz y mi salud mental.

A los amigos de toda una vida, Itzel, Mariana Morales, Nacho (mi superhéroe favorito), Cesar y Carlos mi hermanito; los años pasan y nuestra amistad solo se fortalece, los he amado desde kínder y no creo que nada cambie eso por ustedes. Nacho no hay persona que más admire que tú con tu sonrisa perpetua y tus ganas de vivir!

A Alex, mejor compañero de vida no pude haber elegido, eres mi complemento perfecto y la pieza que le faltaba a mi vida. Gracias por llegar en el momento adecuado y poner mi corazón y mi ser, enloquecidos de tanto amor.

A la familia QA, pequeña, hermosa, chismosa, gritona, escandalosa, histérica, estresada y muy divertida. Lupis, Dianis, Bubu, Sharon, Mar, Stefy y la nueva agregada Yao, son lo mejor de la universidad no hay manera que yo haya sobrevivido sin ustedes por este etapa. Gracias por las horas de vida pasadas, por las risas y las formaciones delta, por ser apoyo y rezar, expender y agitar. A la familia qa extendida como Cami, Belen, Irma, Erick (feito), Bere, Pau, las reinas Regget.., etc etc. Por haber formado parte de toda esta loca experiencia.

A las demás familias especialmente IQ y QFB, Andreita, David, Maris, Pablito, Juanito, Maite, George y Andrés; son unos amigos espectaculares y estuvieron desde

el comienzo a mi lado. Andreita soy la más fan de tu risa y me encanta reírme contigo. Maris hiciste de los semestres cosidas los más divertidos.

A los chicos del lab 321, en especial Marco el káiser alemán y Jorge. Jorge sin tu paciencia, consejos, conocimientos y apoyo no había sido posible acabar la tesis, un millón de gracias por no desesperar y darme aliento cuando yo sentía que brincar del tercer piso era la opción, un gel el blanco al final del día no era tan malo! También a Mafer y Marlen por los buenos ratos.

### *A mis profesores...*

Gracias a todos los profesores de la Facultad de Química involucrados en mi formación académica, muchos de ustedes se convirtieron en mi modelo a seguir y el ejemplo de éxito profesional al que aspiro. Gracias por los consejos y las lecciones, el tiempo y la atención.

Al Dr. Francisco mejor conocido como Pancho, gracias por nunca perder la fe en que eventualmente yo tendría resultados, su positivismo y humor eran la mejor medicina ante los días negros. Gracias por todo el conocimiento, ideas y apoyo.

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	<b>2</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
2.1 Aspectos generales del mezcal .....	4
2.1.2 Etapas de la producción del mezcal .....	5
2.2 Aspectos generales de género <i>Saccharomyces</i> .....	7
2.2.1 Características de <i>Saccharomyces</i> .....	7
2.2.2 Constitución genética de levaduras.....	8
2.3. Métodos moleculares.....	9
2.3.1 Métodos basados en el análisis de regiones ribosomales .....	10
2.4 Adaptación a los ambientes fermentativos y respuestas a estrés de las levaduras .....	14
2.4.1 Respuesta general al estrés: protección cruzada.....	15
2.4.2 Estrés osmótico: sacarosa y glucosa .....	16
2.4.3 Estrés ácido .....	18
2.4.4 Estrés por calor.....	20
2.4.5 Estrés por etanol .....	22
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVO</b> .....	<b>25</b>
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos particulares .....	25
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>26</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
7.1 Reconstitución de cepas.....	27
7.2 Extracción de ADN de levaduras .....	28
7.3 Cuantificación utilizando un método espectrofotométrico del ADN de levaduras .....	28
7.4 Identificación de las cepas .....	29
7.5 Tolerancia a distintos tipos de estrés.....	30
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>32</b>
8.1 Cepas de estudio .....	32

8.2 PCR-RFLP de la región 5.8-ITS.....	33
8.2.1 Estandarización de la técnica de PCR-RFLP .....	34
8.3 TOLERANCIAS A DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS.....	42
8.3.2 Estrés osmótico: sacarosa y glucosa .....	43
8.3.3 Estrés ácido .....	45
8.3.4 Estrés por calor.....	46
8.3.5 Estrés por etanol .....	48
8.3.6 Selección de la mejor cepa.....	49
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>52</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y FIGURAS

Ilustración 1. Distritos de la región del mezcal en Oaxaca, México. (Granich <i>et al.</i> , 2009)..	5
Ilustración 2. Características generales del mezcal (Lappe <i>et. al.</i> , 2008).....	6
Ilustración 3. Estructura del DNA ribosomal nuclear (Fernández-Espinar <i>et al.</i> 2006) .....	10
Ilustración 4. Representación de un ciclo de la reacción de PCR (Andrade 2006).....	11
Ilustración 5. Estrategia experimental .....	26
Ilustración 6. Desarrollo de las cepas FF-07, FV-13 y PA-18 para las condiciones de 8, 10, 12 y 15% de etanol respectivamente .....	48
Figura 1. Amplificación de la región 5.8-ITS de 17 cepas aisladas de mezcal siguiendo la numeración de la tabla 5.....	37
Figura 2. Perfil de restricción de 17 cepas aisladas de las fermentaciones de mezcal siguiendo la numeración de la tabla 5 utilizando la <i>CfoI</i> . .....	37
Figura 3. Perfil de restricción de 17 cepas aisladas de las fermentaciones de mezcal siguiendo la numeración de la tabla 5 utilizando la <i>Hae II</i> . .....	38

Figura 4. Perfil de restricción de 17 cepas aisladas de las fermentaciones de mezcal siguiendo la numeración de la tabla 5. utilizando la *Hinf I*. ..... 38

Figura 5. Comparación de todas las cepas a las 5 condiciones de estrés establecidas.. ..... 49

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Municipios de la región mezcalera de Oaxaca donde se tomaron las muestras .... 27

Tabla 2. Condiciones de amplificación para la región 5.8S-ITS ..... 29

Tabla 3. Modificaciones realizadas al medio de cultivo base para cada condición de estrés..... 30

Tabla 4. Cepas de estudio previamente aisladas de las fermentaciones de mezcal..... 32

Tabla 5. Cepas del primer lote para realización de PCR-RFLP ..... 36

Tabla 6. Tamaño (en pb) del amplicón de la región 5.85-ITS y de los fragmentos de restricción obtenidos por las enzimas: *Cfo I*, *Hae III* y *Hinf I* de una muestra representativa ..... 39

Tabla 7. Clasificación de las cepas según su identificación correspondiente con los patrones obtenidos de PCR-RFLP de la región 5.8-ITS ..... 39

Tabla 8. Cepas seleccionadas para la evaluación de tolerancias a estrés y la región mezcalera de donde provienen. .... 42

Tabla 9. Tolerancia a diferentes concentraciones de glucosa y sacarosa; y condiciones de pH, temperatura y etanol como factor de estrés de las cepas seleccionadas aisladas del mezcal..... 43



## RESUMEN

El mezcal es una bebida tradicional mexicana que se consume a nivel nacional y su proceso de elaboración incluye la fermentación de azúcares que se encuentran en el *Agave*. Durante dicho proceso de fermentación las levaduras deben responder a cambios en su medio ambiente debido a fluctuaciones en el pH, la osmolaridad, la concentración de etanol y oxígeno disuelto; así como la disponibilidad de nutrientes y la temperatura. El desempeño en la fermentación de las levaduras depende de la capacidad de estas para adaptarse de manera eficiente y rápida a dichos cambios.

En este trabajo se estudiarán 40 cepas de levaduras que previamente fueron aisladas de diferentes casas productoras de mezcal en el estado de Oaxaca, éstas ya se encontraban parcialmente tipificadas y sólo se trabajará con los grupos que se presume son representantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Para identificar a nivel especie se llevó a cabo el método PCR-RFLP de la región 5.8-ITS de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* presentes en los grupos seleccionados. De las 40 cepas utilizadas, 30 se identificaron como *Saccharomyces cerevisiae* y 7 como *Kluyveromyces marxianus*.

Posteriormente se seleccionó 6 cepas que representaban las diferentes casas productoras para evaluar su capacidad de crecer en condiciones de estrés como lo son el pH, concentraciones de glucosa o de sacarosa, temperatura y concentraciones de etanol. Se demostró que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas pueden tolerar y crecer en todas las concentraciones de glucosa y de sacarosa, así como en todos los valores de pH asignados. Finalmente se observó que la temperatura y el porcentaje de etanol son los dos factores que presentan mayor impacto celular, pero se encontró que las cepas seleccionadas fueron capaces de crecer a 45°C y a 12% de etanol.

# 1. INTRODUCCION

El mezcal es una bebida mexicana cuyo nombre tiene origen en el náhuatl y se deriva de la palabra “*mexcalli*” que significa maguey cocido. Éste se produce en diferentes estados de la Republica Mexicana como Oaxaca, Guerrero y Jalisco, anteriormente su consumo era principalmente nacional sin embargo año con año sus exportaciones aumentan; por lo cual el mezcal se ha convertido en un sector en crecimiento económico causando un impacto positivo en las regiones productoras (Salvatierra, 2003). Esta bebida tiene sus raíces en la época precolombina y desde entonces su producción y consumo se han mantenido como parte de la cultura de nuestro país. Sin embargo, a pesar de su larga historia es poco lo que se conoce sobre la misma; especialmente de su composición química y microbiológica. Por lo cual resulta muy interesante el estudio de la comunidad microbiana involucrada y el papel que desempeña la misma para dar las características finales deseadas de esta bebida.

El mezcal es una bebida destilada de mostos fermentados procedentes de piñas de maguey cocidas y maceradas; su proceso, que es por lo general artesanal, consta básicamente de 5 etapas: jimado, cocción, molienda, fermentación y destilación. Dentro de las cuales se destaca la fermentación, ya que ésta es sin duda una de las etapas más determinantes, donde ocurren una serie de cambios químicos y microbiológicos que dan como resultado el perfil organoléptico final del mezcal. En esta etapa intervienen, bacterias y levaduras, que producen etanol y otros compuestos químicos y volátiles como ácidos orgánicos, ésteres, terpenos y aldehídos que le brindan sabores y olores característicos (Granich *et al.*, 2009).

Dentro de toda la gama de microorganismo es *Saccharomyces cerevisiae* la levadura que tiene el papel primordial, ya que es la especie dominante dentro de la fermentación y la principal productora de etanol, factor que regula el desarrollo microbiano (Fleet, 2003; Lappe *et al.*, 2008). Debido a esto, la identificación y estudio de *S. cerevisiae* son fundamentales para tener una mejor comprensión de los eventos involucrados en la fabricación del mezcal; asimismo, es importante conocer el comportamiento y supervivencia de esta levadura ante diferentes condiciones adversas, ya que esto repercute también en el perfil organoléptico final de la bebida.

La identificación de levaduras se hacía tradicionalmente con base en sus características morfológicas y fisiológicas, estos procedimientos requerían de un gran número de ensayos, lo cual implicaba una gran inversión de tiempo y recursos; y por otro lado no siempre se aseguraba la correcta identificación. (Barnett *et al.*, 2000) Actualmente los métodos moleculares ofrecen una alternativa que permite caracterizar a los microorganismos a nivel de género y especie con menos trabajo y tiempo. Los métodos moleculares más utilizados se pueden dividir en dos sub-categorías, aquellos utilizados para la identificación a nivel especie y aquellos para la tipificación a nivel cepa. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es de los métodos más empleados y ha sido utilizada para amplificar aquellas regiones como el gen ribosomal 26s, los ITS (Región Espaciadora Intergénica, Internal Transcribed Spacer), etc., para identificar a nivel especie las levaduras. La técnica polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción del ADN (RFLP) se basa en el polimorfismo del ADN que ocurre cuando éste es digerido con enzimas de restricción y los patrones que aparecen ayudan a diferenciar a las especies por medio del análisis de patrones de ruptura. Estos fragmentos polimórficos se generan debido a que los organismos de diferentes especies, e incluso cepas, difieren en la distancia de los sitios de corte para cada enzima de restricción. La similitud de los patrones generados permite establecer correlaciones entre especies y cepas; y la existencia de patrones únicos permite la identificación (Orberá, 2004., Cova, 2010).

Por otro *Saccharomyces cerevisiae*, ha sufrido a lo largo de los años diversos procesos adaptativos que le permite ajustarse a las diferentes condiciones de fermentación involucrados en la producción de diversos alimentos y bebidas. La resistencia a las condiciones estresantes de una fermentación alcohólica hace que las levaduras presenten características fisiológicas y genéticas que las distinguen del resto de las cepas naturales; en adición dichas características varían dependiendo de las diferentes bebidas en donde estén involucradas (Dujon *et al.*, 2004; Fay y Benavides, 2005); por lo cual las levaduras del mezcal presentan características de tolerancia particulares las cuales no han sido estudiadas y su conocimiento es fundamental para asegurar la supervivencia de las mismas y la obtención del producto final con las características deseadas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Aspectos generales del mezcal

En México existen varias bebidas alcohólicas elaboradas a partir del *Agave*, entre ellas se destacan el tequila y el mezcal, estas dos bebidas son consumidas y conocidas tanto en nuestro país, como en el mundo. En el caso particular del mezcal, éste es elaborado principalmente a partir del *Agave salmiana* y *Agave angustifolia*; y su proceso es por lo general artesanal y rudimentario. El mezcal representa un sector en crecimiento y año con año sus exportaciones aumentan, teniendo así un mayor impacto económico en las regiones productoras; para el año 2009 la producción de mezcal era de alrededor de 1.8 millones de litros (Salvatierra, 2003).

El mezcal, al igual que el tequila cuentan con denominación de origen, la región mezcalera en México comprende territorios en los estados de Durango, Guanajuato, Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas. Dentro de estos estados, Oaxaca se ha destacado en los últimos años como el principal productor al generar el 54.4% del total nacional (Sectorial, 2011).

La región del mezcal de Oaxaca se localiza en los Valles Centrales: distritos de Tlacolula, Zimatlán, Ejutla y Ocotlan y en la Sierra Sur: distritos de Yautepec, Miahuatlán y Sola de Vega. Esta región se encuentra ubicada en un rango altitudinal de entre 800 y 1800 msnm, con temperaturas medias de 20 a 25°C y precipitaciones anuales de 450 a 644 mm, por lo cual, el clima que predomina es el semicálido subhúmedo y el cálido seco. Actualmente se pueden distinguir dos subregiones dentro de la zona que están caracterizadas por su infraestructura y tipo de desarrollo. La región de Tlacolula y Yautepec, que es una región más tecnificada y la región de Valles centrales y parte de la Sierra Sur donde se preserva la producción rústica (Granich *et al.*, 2009).



Ilustración 1. Distritos de la región del mezcal en Oaxaca, México. (Granich *et al.*, 2009)

### **2.1.2 Etapas de la producción del mezcal**

La producción del mezcal incluye 5 etapas importantes que son: cocimiento, molienda, fermentación, destilación y rectificación. En el primer paso, se realiza el cocimiento del maguey en hornos de subsuelo o verticales de mampostería, hidrolizadores o en autoclaves. Este proceso permite la hidrólisis de los almidones para obtener glucosa y fructosa. Se le llama mezcal a las piñas cocidas. En segundo lugar, se realiza la molienda para obtener el jugo llamado mosto y el bagazo. Esta etapa se puede realizar de diferentes formas como son el macerado a mano o machacado en una tahona. Una vez que se cuenta con el mosto, se fermenta; y dependiendo de lo rudimentario del proceso, se puede llevar a cabo en tinajas de madera, pilas forradas de madera o en tanques de acero inoxidable. La fermentación es un punto crítico, es aquí donde se da la conversión de los azúcares contenidos en el mosto en alcohol. Esta etapa de producción dura aproximadamente tres días y el producto final que se obtiene es el mosto muerto, cuya graduación alcohólica va de entre 6% y 7%. Posteriormente, es en la destilación cuando se efectúa la separación del alcohol, debido a los diferentes puntos de ebullición, obteniéndose así el mezcal de primera destilación. Dicho proceso se puede llevar a cabo en ollas de barro sobrepuestas o en alambiques de cobre o acero inoxidable. Finalmente, en la rectificación se le realiza al mezcal una segunda

destilación para poder elevar su contenido alcohólico (Granich *et al.*, 2009; Sectorial, 2011).

Una de las etapas más importantes dentro de toda la producción del mezcal es la fermentación. Esta es una fermentación compleja en la que participan bacterias y levaduras, las cuales son responsables de la producción de etanol y de compuestos químicos y volátiles como ácidos orgánicos, ésteres, terpenos y aldehídos entre otros que confieren al producto, sus características organolépticas únicas. En el caso particular de las levaduras es *Saccharomyces cerevisiae* la principal productora de etanol. El etanol es el factor que rige el crecimiento y desarrollo microbiano durante la fermentación y es por ello que de manera indirecta, afecta la producción de metabolitos y congénicos que tienen una repercusión directa en el sabor y olor del mezcal. Esto se debe a que aquellas levaduras *no-Saccharomyces* son poco resistentes al etanol y ven limitado su crecimiento y actividad metabólica; mientras que las levaduras más resistentes, mantienen su desarrollo y se convierten en especies dominantes que dirigen la fermentación (Fleet, 2003; Lappe *et al.*, 2008).

<b>Mezcal</b>	
<b>Tipo de bebida</b>	Destilada
<b>Especie de Agave</b>	<b>Estado de producción</b>
<i>A. salmiana</i>	San Luis Potosí
<i>A. cupreata</i> <i>A. iaeuidens</i>	Michoacán
<i>A. angustifolia</i> <i>A. americana</i> var. <i>oaxacensis</i> <i>A. karkwinskii</i> <i>A. marmorata</i> <i>A. potatorum</i>	Oaxaca
<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</i> spp., <i>C. magnolia</i> , <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>H. vineae</i> , <i>Pichia caribbica</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>T. delbrueckii</i> ) y <i>Saccharomyces</i> ( <i>S. cerevisiae</i> ).
<b>Productos de fermentación</b>	Etanol, ácidos orgánicos, ésteres, terpenos, aldehídos, furanos.

Ilustración 2. Características generales del mezcal (Lappe *et al.*, 2008)

## **2.2 Aspectos generales de género *Saccharomyces***

Las levaduras que cuentan con la capacidad de llevar a cabo la fermentación de azúcares se agrupan, dentro del orden *Endomycetales*, en la familia *Saccharomycetaceae*. Dentro de esta familia se encuentra el género *Saccharomyces* que incluye tanto especies naturales como especies de levaduras que se utilizan para la producción de alimentos y bebidas por medio de fermentaciones industriales y tradicionales. Recientemente se han utilizado para la obtención de vitaminas del complejo B, pigmentos, cofactores y biomasa entre otros productos de interés biotecnológico (Arias, 2008).

En la actualidad, se aceptan para el género *Saccharomyces* 16 especies que están clasificadas en dos grupos establecidos por Van der Walt (Rainieri *et al.*, 2003; Kurtzman y Robnett, 2003; Barnett, 2004). Estas especies se encuentran divididas en dos grandes grupos, el grupo *Saccharomyces sensu stricto* donde se incluye *S. cerevisiae*, y otras especies con una gran capacidad fermentativa, en presencia o ausencia de oxígeno, para la producción de etanol; el segundo grupo es *Saccharomyces sensu lato* que comprende aquellas especies más distantes de *S. cerevisiae* como *S. barnettii* o *S. unispous*. La identificación y clasificación de especies dentro del género *Saccharomyces* siempre ha sido difícil, ya que comparten muchas características y no es posible ver una clara separación entre ellas, es por ello que las técnicas moleculares son necesarias para la diferenciación del grupo *Saccharomyces sensu stricto* ya que los grados de homologías existentes entre las especies de este grupo son: para *S. paradoxus* y *S. cerevisiae* 46-59% y para *S. pastorianus* *S. bayanus* del 70% (Rainieri *et al.*, 2003).

### **2.2.1 Características de *Saccharomyces***

El género de las levaduras *Saccharomyces* se caracteriza por tener una fase vegetativa con gemación multipolar como reproducción asexual. Las células son esféricas, ovoides o elongadas y pueden formar un pseudomicelio (Arias, 2008). Este tipo de levaduras son no filamentosas y por lo general son diploides o poliploides.

La característica fisiológica más importante es su capacidad para fermentar de manera eficiente anaerobia o semianaerobiamente uno o más azúcares para producir etanol, como

D-glucosa, D-fructosa y D-manosa. Adicionalmente, todas las cepas de este género pueden utilizar D-galactosa de manera aerobia o anaerobia, pero no así lactosa, pentosas, alditoles ni polisacáridos; otra fuente de carbono que les es imposible utilizar de manera aeróbica es el citrato. Para el caso de fuentes de nitrógeno, no pueden ocupar nitrato, ni hidrolizar urea. (Barnett, 2004).

### **2.2.2 Constitución genética de levaduras.**

Las cepas de *Saccharomyces* que se utilizan de manera industrial son organismos que han sido domesticados, es decir que han sufrido de una especialización gracias a que se han adaptado a diferentes ambientes creados por actividades humanas. Dicha domesticación es responsable de que estas levaduras presenten características genéticas particulares. La mayoría de las cepas que se utilizan en procesos industriales son organismos homotáticos, mientras que las cepas silvestres y de laboratorio son por lo general heterotáticas (Arias, 2008).

*S. cerevisiae*; es uno de los eucariotes más estudiados cuyo genoma fue el primero en ser secuenciado por completo (Goffeau *et al.*, 1996). *S. cerevisiae* presenta un genoma relativamente pequeño, con un gran número de cromosomas, poco DNA repetitivo y genes sin intrones en su mayoría. Cuando se trata de una cepa haploide ésta cuenta con 12–13 megabases de DNA nuclear, distribuidos en 16 cromosomas, y que varían en tamaños desde 250 a 2000 kb (Barre *et al.*, 1992; Pretorius, 2000). Como ya se había mencionado existen diferencias entre las cepas industriales, las cepas de laboratorio y las cepas silvestres. Por ejemplo, la gran mayoría de cepas de laboratorio son haploides o diploides y poseen la longitud de los cromosomas bien definidas; por otro lado, las industriales son principalmente diploides, aneuploides o poliploides (Codón y Benítez, 1995). Dicha característica otorga ventajas adaptativas a ambientes variables o también puede ser una manera de incrementar la dosis génica de algunos genes importantes para la fermentación (Bakalinsky y Snow, 1990). La diversidad genética se ve influenciada tanto por factores genéticos, ambientales y poblacionales. Los estudios de variabilidad genética nos permiten comprender mejor la generación, mantenimiento y eliminación de la misma variabilidad, así como conocer mejor la historia de las poblaciones y ayudar a la reconstrucción filogenética de la especie.

### **2.3. Métodos moleculares**

Las pruebas de identificación utilizadas anteriormente de manera tradicional, se basan principalmente en las características morfológicas y fisiológicas de las especies microbianas. Dichas pruebas presentan ciertos inconvenientes como que son laboriosas, complejas y consumen tiempo (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Entre los parámetros que se estudian están la morfología de la colonia, la morfología del estado asexual y sexual y la presencia de homo y heterotalismo, entre otras; no obstante dichas características sólo permiten la identificación hasta el nivel de género. Para el caso de la identificación de las levaduras, las principales pruebas fisiológicas utilizadas son la fermentación y asimilación de fuentes de carbono, la asimilación de compuestos nitrogenados, los requerimientos vitamínicos, la resistencia a cicloheximida y la termotolerancia. Sin embargo, estas pruebas no siempre resultan estables ni reproducibles ya que dependen de una serie de aspectos como las condiciones del cultivo, el estado fisiológico de la levadura o, para el caso de las fuentes de carbono y nitrógeno, que en ambos casos se pueden metabolizar por rutas comunes y en ocasiones su metabolismo es controlado por varios genes haciendo así que los resultados obtenidos, presenten mayor incertidumbre (Boekhout *et al.* 1996). Dentro de las pruebas bioquímicas prevalecen la electroforesis de proteínas, el análisis de los patrones de isoenzimas y de resonancia magnética nuclear, el número de unidades de isopreno en la coenzima Q y la cromatografía de ácidos grasos de cadena larga de la pared celular. Estas técnicas también dependen del estado fisiológico de las cepas y como principales desventajas en los resultados, están la presencia de ambigüedades e incorrecciones debido a que las características morfológicas y fisiológicas están fuertemente influenciadas por las condiciones de cultivo (Boekhout *et al.* ,1996; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

Alrededor de la década de los sesenta, se estudiaba la variabilidad genética comparando patrones de movilidad electroforética de proteínas entre individuos y poblaciones. Tras el avance del tiempo, con el descubrimiento y estudio del DNA, se desarrollaron diferentes técnicas basadas en el estudio del DNA y el RNA. Existen diversas técnicas moleculares para estudiar la variación genética de *Saccharomyces*. Se pueden clasificar de diferentes maneras, ya sea por el ADN que se utiliza para la técnica como ribosomal o mitocondrial o

por el nivel de identificación las cuales se pueden dividir en dos sub-categorías aquellos utilizados para la identificación a nivel especie y aquellos para la identificación a nivel cepa. Mencionando algunos ejemplos, para el caso de los primeros se cuenta con el análisis de las regiones ribosomales que puede ser PCR-RFLP y secuenciaciones; la electroforesis en gel desnaturalizante (DGGE). Para la identificación de la cepa, existen aquellos basados en el PCR como la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD), el análisis de DNA mitocondrial y la electroforesis en campo pulsado (PFGE) entre otros (Orberá, 2004, Cova, 2010).

### **2.3.1 Métodos basados en el análisis de regiones ribosomales**

En *Saccharomyces cerevisiae* así como en todos los hongos existen cuatro regiones de ADN ribosomal, 5S, 5.8S, 18S y 26S, estas regiones se encuentran agrupados en tandems o arreglos de cabeza a cola, formando así una unidad de transcripción que se repite en el genoma de 100 a 200 veces. En cada una de las unidades de transcripción existen los ITS (espaciadores de transcripción interna) y ETS (espaciadores de transcripción externa), dichas son secuencias no codificantes. Las partes codificantes se encuentran separadas por espaciadores intergénicos conocidos como NTS (espaciadores no transcritos); el gen 5S no cuenta con este arreglo pero sí con el número de repeticiones ((Fernández-Espinar *et al.* 2006). La región 5.8S es codificadora y conservada, y muestra baja variabilidad intraespecífica por lo que no permite la delimitación entre cepas de la misma especie. Por otro lado, los ITS que como se había mencionado con anterioridad, son regiones no codificadoras e hipersensibles que permiten el reconocimiento a nivel interespecífico (Orberá, 2004).

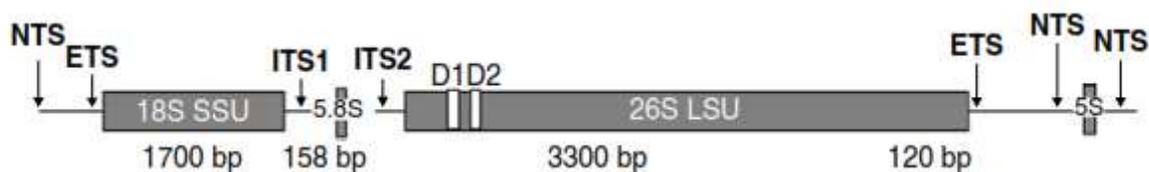


Ilustración 3. Estructura del DNA ribosomal nuclear (Fernández-Espinar *et al.*, 2006)

### 2.3.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica molecular *in vitro* que es utilizada comúnmente para amplificar regiones específicas de DNA que se encuentran dentro de dos áreas de una secuencia conocida. La técnica fue descrita por Kary Mullis en 1983. Para esta técnica, se requiere de varios componentes como los dNTP (desoxirribonucleósidos-trifosfato) que actúan como unidades formadoras del DNA, los primers u oligonucleótidos, que son cadenas cortas de ADN que se alinearán a secuencias complementarias de ADN muestra que ya ha sido desnaturalizado durante la amplificación. Otros componentes de esta reacción son los iones divalente que por lo general es el  $Mg^{+2}$ , los cuales actúan como cofactor de la enzima; una solución buffer o amortiguadora, que mantendrá el pH adecuado para llevar a cabo la reacción y la polimerasa, que es la enzima de la reacción. Dichos fragmentos ya amplificados pueden ser separados y visualizados por medio de un gel de agarosa. Esta técnica presenta ventajas como su rapidez, sensibilidad y reproducibilidad (Hoff, 2012).

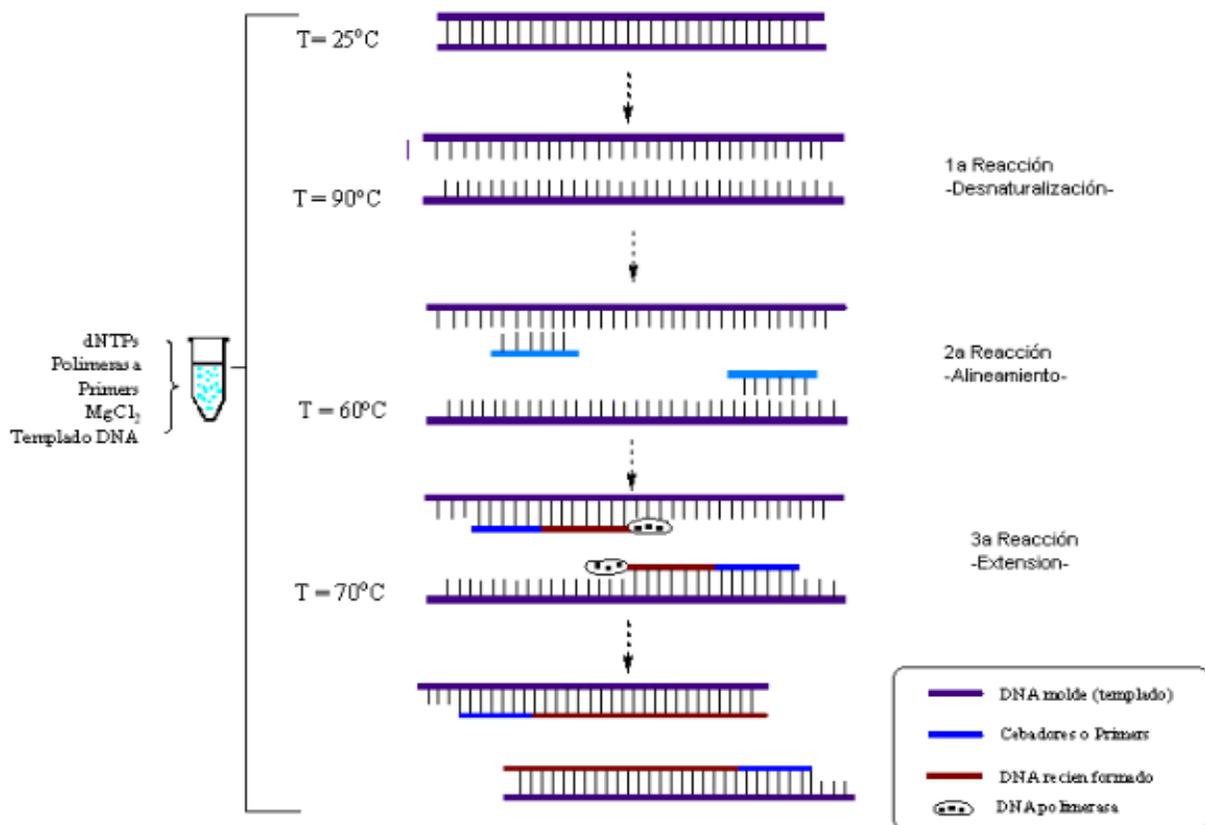


Ilustración 4. Representación de un ciclo de la reacción de PCR (Andrade 2006).

### **2.3.1.2 Polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción del rDNA/rRNA (RFLP)**

Esta técnica se basa en la diferenciación de los organismos por el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma cuando éste es cortado por enzimas de restricción (endonucleasas). Los patrones obtenidos presentan diferentes tamaños dependiendo de los cortes que genere cada una de las enzimas utilizadas y pueden ser observados en un gel de electroforesis. Cada uno de los fragmentos polimórficos obtenidos se deben a que los organismos de diferentes especies, e incluso de diferentes cepas, difieren en la distancia de los sitios de clivaje o corte para cada enzima de restricción.

Cuando se encuentran similitudes en los patrones generados, se pueden establecer correlaciones entre las especies y las cepas, y la existencia de patrones únicos permite su identificación. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en estudios de identificación y filogenia de levaduras de interés industrial utilizando principalmente la región del rDNA 5.8S y los espaciadores internos ITS1 e ITS2 (Orberá, 2004; Hoff, 2012).

Adicionalmente, se utiliza el PCR-RFLP que es básicamente una combinación de ambas técnicas mencionadas en el cual, primero se realiza la amplificación de ADN deseado y luego se realizan las restricciones con las enzimas deseadas.

Dentro de las regiones ribosomales que más se utilizan, se encuentra ITS1-5.8S-ITS2 empleada para identificar 191 levaduras relacionadas principalmente con alimentos y bebidas. (Fernández-Espinar *et al.* 2006). En dicho caso, para obtener los patrones de restricción se utilizaron las enzimas *HaeIII*, *HinfI*, *CfoI* y *DdeI* ya que éstas generan un patrón especie-específico, no obstante en especies muy cercanas, las diferencias no son notables. Actualmente dicha información está disponible en un sitio web (<http://yeast-id.com>) para facilitar la consulta y poder comparar los resultados por medio de cepas de referencia. Este método ha sido utilizado por varios autores como Ramos *et al.* 1998; Fernández-Espinar *et al.*, 2000; Cadez *et al.*, 2002; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2003; Naumova *et al.*, 2003. para la identificación de especies en una amplia gama de productos (Arias, 2008).

El análisis de restricción de la región ribosomal NTS, NTS-18S y NTS-ITS ha sido utilizado para identificar especies pertenecientes al género *Saccharomyces sensu stricto*. Sin embargo, no se cuenta con una base de datos disponible por lo que los resultados obtenidos no se pueden generalizar (Fernández-Espinar *et al.* 2006). Algunos de los autores que han utilizado esto son Baleiras Couto *et al.* (1996); Nguyen y Gaillardin (1997); Pulvirenti *et al.* (2000); Nguyen *et al.* (2000); Caruso *et al.* (2002); Romero *et al.* (2005).

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

Esta técnica se basa en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción del DNA genético, en otras palabras consiste en cortar el ADN con enzimas de restricción, una de corte frecuente y otra de corte poco frecuente. A los fragmentos obtenidos de dichos cortes se les amplifica por PCR, probando diferentes combinaciones de complementariedad del oligonucleótido con el sitio de restricción, con ello se puede disminuir o aumentar el número de bandas amplificadas y comparar el polimorfismo generado (Arratia, 2009). La técnica se ha utilizado para identificar la variación genética en cepas vínicas comerciales aisladas de viñedos, así como para identificar cepas industriales de *Saccharomyces* spp. (Arias, 2008).

#### **2.3.1.4 Polimorfismo del DNA aleatoriamente amplificado (RAPD)**

El RAPD es una técnica basada en la amplificación por PCR simultánea del DNA genómico en presencia de un único cebador de pocos oligonucleótidos. El uso de esta técnica, permite obtener las diferencias del número y tamaño en los fragmentos del DNA amplificado, sirviendo como huellas digitales ya que son específicas de las especies e incluso de las cepas. La técnica ha sido utilizada para estudios de control de calidad de inóculos para fabricación de bebidas como la cerveza, pues la comparación del cultivo original con las líneas subcultivadas, permite identificar fácilmente cualquier contaminante (Hoff, 2012).

## **2.4 Adaptación a los ambientes fermentativos y respuestas a estrés de las levaduras**

Las levaduras del género *Saccharomyces* han sufrido a lo largo de la historia cambios en sus procesos adaptativos para adecuarse a los diferentes procesos donde son utilizadas. Uno de los principales cambios es la resistencia a condiciones estresantes que ocurren dentro de una fermentación alcohólica. Las levaduras que se utilizan hoy en día para este tipo de procesos son levaduras que presentan características fisiológicas y genéticas que las diferencian de las cepas de ambientes naturales (Dujon *et al.*, 2004; Fay y Benavides, 2005). Con el avance en las técnicas moleculares se han podido descubrir mecanismos involucrados en la adaptación a dichos ambientes.

Dentro de los ambientes fermentativos se destacan una serie de factores que producen estrés para las levaduras y que afectan su capacidad de supervivencia. Dentro de los principales se encuentran: el estrés osmótico que se presenta al inicio de la fermentación gracias a la alta concentración de azúcares, el pH ácido del medio, la concentración de etanol al final de la fermentación, el agotamiento de nutrientes como fuentes de nitrógeno y carbono y cambios drásticos en la temperatura (Bauer y Pretorius, 2000; Querol *et al.*, 2003). Dos de los factores determinantes en el daño que provoca el estrés como la respuesta de la levadura al mismo, son el tipo y grado del estrés y el estado de desarrollo de la levadura en el momento del estímulo. No obstante, las condiciones de estrés afectan principalmente a las estructuras celulares, como membranas, y a las macromoléculas modificando su estructura y con ello dañando su función, en particular a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Folch-Mallol *et al.* 2004).

Como ya se mencionó previamente *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado; está estrechamente relacionado con diversos procesos fermentativos siendo uno de ellos, la producción mezcalera. Este microorganismo presenta cinco fases de crecimiento cuando se cultiva en un medio líquido, utilizando la glucosa como fuente de carbono. La primera fase, es la fase lag que consiste en un periodo de adaptación en el cual, la células se preparan para dividirse. La fase logarítmica es aquella donde las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y presentan un metabolismo fermentativo que produce etanol. La siguiente fase, es el cambio diáuxico el cual ocurre cuando existe una disminución en la concentración de glucosa; en este punto, la

división celular se detiene y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. Posteriormente en la fase postdiáuxica, las células utilizan el etanol previamente producido como fuente de carbono e incrementan su resistencia gradualmente al estrés. En la fase estacionaria, los nutrientes del medio se han agotado y ya no ocurre división celular; la pared se vuelve más gruesa, se presenta la acumulación de carbohidratos de reserva, como la trehalosa y el glucógeno, y se alcanza el máximo de resistencia al nivel de estrés (Werner-Washburne y Johnston, 1993).

#### **2.4.1 Respuesta general al estrés: protección cruzada**

Una de las respuestas más rápidas de las levaduras a las condiciones de estrés, es la síntesis de moléculas que permite aminorar o reparar el daño que dicha condición ocasione. Las moléculas mejor estudiadas son conocidas como proteínas de estrés. Los estudios realizados sobre éstas muestran que para la supervivencia celular es importante la transducción de señales y factores de transcripción involucrados en las respuestas (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Un factor principal que contribuye a la supervivencia celular y a la respuesta al estrés mismo, es la inducción previa a dicho tipo de estrés, ya que se ha demostrado que esto a su vez, conlleva a la tolerancia de otros tipos de estrés. Este tipo de respuesta se conoce como protección cruzada. La teoría de protección cruzada es apoyada gracias a estudios moleculares donde se demuestra que al existir estrés nutricional, ocurre un incremento en la transcripción de genes de respuesta a estrés por calor (HSP Proteínas de Choque Térmico Heat Shock Proteins) (Werner-Washburne *et al.*, 1989) o si existe estrés de tipo térmico, se da la expresión de genes relacionados con la respuesta a condiciones hiperoxidantes. Una explicación a la protección cruzada es que, al inducir diversas respuestas de estrés se genera una serie de mecanismos de defensa; se establece un metabolismo basal que disminuye así el gasto energético y la tasa de crecimiento; dicha integración de respuestas determina la capacidad adaptativa y la supervivencia de la misma.

Uno de los mecanismos de coordinación que permite integrar las funciones en situaciones adversas, es la secuencia consenso que regula la expresión en los promotores de varios

genes de respuesta a diferentes condiciones de estrés, dicha secuencia es conocida como STRE (AGGGG) por sus siglas en inglés Stress Responsive Element (Elemento de Respuesta a Estrés). El STRE permite a la levadura no sólo proteger y mantener sus funciones básicas sino también convertirse en un organismo biológicamente eficiente (Kobayashi y McEntee, 1990). Dentro de los controles centrales de esta respuesta general a estrés se encuentra los niveles de AMP cíclico, los cuales a través de la proteína-quinasa A (PKA) advierte de cambios en el medio ambiente, por ello la vía PKA participa en la percepción de la situación nutricional y la respuesta a estrés (Folch-Mallol *et al.*, 2004). Otra estrategia para la coordinación del sistema complejo conformado de elementos que participan en diversas funciones utilizados por las células, es presentar blancos comunes en genes que codifican para dichas funciones diversas. Estos blancos son posibles gracias a la intervención de factores transcripcionales, capaces de captar varios estímulos que coinciden en proteínas que activan estos factores, los cuales a su vez activan la transcripción de diferentes genes y por ende la expresión de las proteínas a las que codifican (Folch-Mallol *et al.*, 2004)

La expresión de genes mediada por el elemento STRE es muy baja en medios con glucosa como fuente de carbono y resulta lo contrario en medios con fuentes no fermentables de carbono y en fase diáuxica o estacionaria. El elemento STRE es reconocido por los factores de transcripción Msn2p y Msn4p que en condiciones normales de crecimiento, se encuentran en el citoplasma, lo que impide que estos factores activen los genes banco; pero cuando se tiene una situación de estrés estos factores son transportados al núcleo para que comience la respuesta (Martínez-Pastor *et al.*, 1996).

#### **2.4.2 Estrés osmótico: sacarosa y glucosa**

En muchos procesos comerciales de producción de bebidas alcohólicas, como es el caso del mezcal, el medio de fermentación es una mezcla compleja de diferentes azúcares. Por ello se espera que *S. cerevisiae* pueda ser capaz de percibir, resistir y adaptarse al estrés hiperosmótico. El estrés hiperosmótico se define como una disminución del potencial hídrico del ambiente, en el cual, se está desarrollando un organismo (Folch-Mallol *et al.*, 2004; Gibson *et al.*, 2007).

La osmoregulación en las levaduras es dependiente de su capacidad de censar los estímulos externos y por ello, realizar cambios fisiológicos, bioquímicos y de otras funciones celulares para acoplarse al medio ambiente modificado donde ésta se encuentre. Existen principalmente dos tipos de respuesta que se pueden obtener de una célula ante los cambios osmóticos: osmotolerancia y osmoadaptación. La respuesta y supervivencia de la cepa así como la reanudación del ciclo celular normal dependen del tipo y severidad del estrés, el fondo genético de la cepa y el estado de crecimiento de la misma (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

La osmotolerancia se puede describir como la capacidad fisiológica innata de resistencia ante el estrés osmótico como respuesta a una exposición crónica de presión hiperosmótica y éste representa un mecanismo mediante el cual, la célula mantiene su viabilidad en la presencia de elevada concentración de solutos. Algunos aspectos que permiten la osmotolerancia son: contar con una estructura de membrana superior, una vacuola en correcto funcionamiento y presentar trehalosa que protege a la membrana contra la desecación y la desnaturalización proteica; pero principalmente se debe a la abundancia en macromoléculas osmoprotectoras que no sólo permiten estabilizar la membrana celular, las enzimas, ciertas proteínas e inclusive ácidos nucleídos sino también no presentan efecto en el potencial de agua intracelular (Gibson *et al.*, 2007).

La osmoadaptación es un proceso de ajuste celular que trata con un sistema refinado y sensible de censado y respuesta, se basa en adquirir osmotolerancia de manera paulatina y a través de un camino de transducción de señales mediado por la alteración en los niveles de ciertas proteínas (Gibson *et al.*, 2007).

En cualquier caso, lo primero que ocurre al presentarse una condición de estrés osmótico, es una respuesta inmediata de salida de agua intracelular, gracias a esta pérdida de agua se incrementan las concentraciones intracelulares de iones y biomoléculas causando una disminución en la actividad celular. Para el caso de *S. cerevisiae* ésta sufre un cambio en el volumen celular gracias a la pérdida de agua del citosol, dicho proceso se compensa por la acción de la vacuola que acumula los iones tóxicos en pro del citoplasma y los organelos. En las primeras fases de adaptación, la levadura sufre de una reestructuración del citoesqueleto de actina, detención del ciclo celular y reprogramación del metabolismo y a la

vez, ocurren cambios involucrados con la resistencia al estrés, como un aumento en la concentración del glicerol y la exclusión de iones tóxicos (Tao *et al.*, 1999).

Como ya se mencionó, la síntesis y acumulación de glicerol es la principal respuesta en el mecanismo de osmoregulación y está directamente relacionado con el mantenimiento del turgor celular. La biosíntesis del glicerol está regulada por la vía de HOG (Glicerol de Alta Osmolaridad, High Osmolarity Glicerol); esta es una de las vías de MAP cinasas. Las MAP cinasas son unidades de señalización altamente conservadas y con un papel vital en la respuesta de factores ambientales, entre otros. Dentro de la vía de HOG se destaca la participación de una proteína Sln1p que actúa como un regulador negativo de la vía, es decir si la proteína está activa la vía no y viceversa. La vía de HOG está relacionada con la activación de Msn2p y Msn4p por lo que se cree que esta vía tiene un efecto regulador de la vía de respuesta cruzada o general. (Schuller *et al.*, 1994).

El glicerol forma parte de un grupo de moléculas conocidas como osmolitos compatibles, las cuales se acumulan en la célula para contrarrestar los efectos de la deshidratación causada por el estrés y no afectan el funcionamiento celular (Folch-Mallol *et al.*, 2004). Las principales ventajas de los osmolitos compatibles son que pueden incrementar el potencial osmótico intracelular sin la necesidad de producir proteínas estabilizantes y que pueden ser fácilmente asimiladas una vez que el factor de estrés sea removido (Gibson *et al.*, 2007).

### **2.4.3 Estrés ácido**

En la industria alimenticia y en la mayor parte de las fermentaciones alcohólicas se presentan condiciones ácidas para el desarrollo de las levaduras, ya sea por la adición de ácidos orgánicos, que funcionan como conservadores en la mayoría de los casos, o por la producción de metabolitos secundarios de otros microorganismos; las levaduras han demostrado presentar un alta capacidad de tolerancia y adaptación a estos ambientes.

Para el estrés generado debido a pH ácido se presentan diversos escenarios, principalmente; un ambiente ácido generado por ácidos fuertes y aquel generado por ácidos débiles (Folch-Mallol *et al.*, 2004). Recientemente se ha demostrado que si las cepas sufren una pre-

adaptación a medios ácidos, éstas no son sólo capaces de sobrevivir sino que además presentan un ciclo celular normal en condiciones de estrés y crecen sin sufrir alteraciones (Mira y Sá-Correia, 2010).

Tratándose del primer escenario y que en el medio solo éste presente ácidos fuertes, se genera una elevada concentración de protones extra-celular, dichos protones afectan la estructura de la pared celular, principalmente actuando sobre las proteínas de la membrana plasmática. Sin embargo, los protones son difícilmente acarreados a través de dicha membrana, que es una bicapa hidrofóbica, y no son capaces de acumularse interiormente y por ello presentan un potencial de inhibición menor que el caso de los ácidos débiles. (Mira y Sá-Correia, 2010). Dentro de los mecanismos para contrarrestar esta situación se encuentra la síntesis de macromoléculas protectoras de membrana y pared, además se conoce que los procesos productores de energía situados en la membrana, pueden revertir y bombear protones al interior de la célula para que las reacciones enzimáticas puedan llevarse a cabo en las condiciones adecuadas. Por ello, dos de los factores que deben ser regulados son el flujo de protones entre el interior y el ambiente y la concentración interna de  $H^+$  (Brown y Mayes, 1980).

Para el caso de que se presenten ácidos débiles, el daño de este tipo de ácidos depende de sus características químicas, en particular de su hidrofobicidad, volatilidad y su  $pK_a$ . Si existe en el medio un valor de pH menor al  $pK_a$  del ácido, éste se encontrará en forma no disociada ( $RCOOH$ ) y permeará la membrana plasmática a través de difusión simple. Una vez que esto ocurra, el ácido débil se disociará en el citosol -que prácticamente es neutro- y con ello afectará no sólo el pH interno de la célula, sino también la organización lipídica, la función de las membranas celulares, la síntesis de ADN y ARN y la actividad metabólica. En adición, una vez que las proteínas de membrana están dañadas, se afecta la permeabilidad a iones y se permite el paso de protones y otros metabolitos por difusión pasiva causando así un mayor descenso de pH intracelular y afectando el potencial electroquímico que es vital para el transporte secundario (Mira y Sá-Correia, 2010).

Para evitar la modificación interna del pH, las levaduras dependen de la estimulación de la actividad de  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática ( $PM-H^+$ -ATPasa), Pma1p que en

conjunto con hidrólisis de ATP, permite la expulsión de protones; y también de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la vacuola (V-ATPasa) que regula el pH intracelular secuestrando protones del lumen de la vacuola para recobrar el pH citosólico y contrarresta la disipación transmembranal del potencial. El correcto funcionamiento de V-ATPasa ayuda también a la endocitosis, a colocar las nuevas enzimas lisosómicas generadas, a la producción de proteínas y al paso de Pma1p por la membrana plásmica (Carmelo *et al.*, 1997; Mira y Sá-Correia, 2010).

Un factor importante a considerar es la expulsión activa de los aniones, la cual sería un gasto de energía inútil si éstos pudieran reingresar a un ritmo similar, por lo que existe una restricción en la difusión pasiva y un decremento en la porosidad de la pared celular; se cree que en este proceso, se encuentran relacionadas dos proteínas de membrana Pdr12 y Hsp30, la cual también está relacionada con el estrés por calor (Mira & Sá-Correia, 2010). En adición, Pdr2 trabaja en conjunto con H<sup>+</sup>-ATPasa, esto se debe a que Pdr 2 cataliza la expulsión de aniones de ácidos orgánicos y H<sup>+</sup>-ATPasa ayuda a la expulsión de cationes con lo cual bajan los niveles de acidez intracelular. Por desgracia, todos estos procesos requieren un alto gasto energético ya que se calcula que por cada molécula de ácido débil que penetra en la célula, se requieren 2 ATPs para contrarrestar el efecto (Warth, 1991).

#### **2.4.4 Estrés por calor**

Los cambios abruptos en la temperatura están entre los principales factores de estrés que deben sufrir y soportar las levaduras en los diferentes procesos de producción de alimentos y bebidas. Se conoce que cuando una *S. cerevisiae* sufre de un aumento de 10 a 15°C por arriba de la temperatura óptima de crecimiento, se presenta una respuesta a dicho estrés que está principalmente guiada por la síntesis de un grupo de proteínas conocidas como HSP (Proteínas de Choque Térmico; Heat Shock Proteins) (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Dentro de los principales daños debido al calor se encuentran la acumulación de proteínas desnaturalizadas o mal plegadas; además el calor aumenta la permeabilidad de la membrana permitiendo así que haya una disminución en el pH intracelular (situación que se explicó

previamente) y se afecten las rutas metabólicas y las estructuras de los organelos celulares. (Piper, 1993).

Cuando la levadura sensa que existe daño proteico, se da un cambio en la expresión génica y la síntesis de las HSP, que son un grupo de proteasas chaperonas moleculares que están involucradas en: impedir la desnaturalización e inducir la re-naturalización de proteínas, la degradación de proteínas mal plegadas y la disgregación de agregados proteicos. Otro factor importante es que la síntesis de otras proteínas, se detiene para evitar que éstas sufran de daños. El factor génico más importante que se une al elemento regulatorio HSE (Elemento de Choque Térmico; Heat Shock Element) es Hsf1p, dicho factor está codificado por un gen único y esencial para *S. cerevisiae*. Una proteína estrechamente relacionada con la termotolerancia es Hsp7 la cual actúa como sensor o termómetro del medio y regula la actividad de Hsf1 y de las HSP. (Wiederrecht y Parker, 1988). Como ya se había mencionado, los mecanismos de respuestas al estrés están interrelacionados por lo que se ha demostrado que la ATPasa de membrana plasmática también está relacionada con la síntesis de HSP, ya que si ésta sufre una reducción en su actividad, se reduce la inducción de HSP (Piper, 1993)

Otro mecanismo de termoadaptación, es la producción y acumulación de trehalosa que funciona como protector ya que permite la estabilización de membranas y proteínas. Para poder generar trehalosa se da un aumento en la concentración de glucosa intracelular y una inhibición parcial en la glucólisis, esto ocurre para evitar problemas de toxicidad al no presentarse una glucosa totalmente fosforilada (Piper, 1993). Otro factor relacionado con la producción de trehalosa, es la proteína cinasa A AMP-dependientes (cAMP-PK) que afecta la termotolerancia pues en cultivos que están en proliferación se presentan altos niveles de cAMP-PK y baja termotolerancia y en cultivos estacionarios pasa lo inverso; esto ocurre porque al perder sub-unidades libres y activas de cAMP-PK, se da la producción de glucógeno y trehalosa (Thevelein, 1992).

### **2.4.5 Estrés por etanol**

La producción de etanol a partir de azúcares fermentables y la producción de compuestos con sabores particulares, es el principal objetivo de la industria de fermentaciones, en especial de la industria de bebidas alcohólicas. Sin embargo, a medida que la fermentación avanza, la concentración de etanol es cada vez más elevada y se puede llegar a presentar niveles tóxicos para las levaduras (Gibson *et al.*, 2007).

El efecto dañino del etanol depende de la concentración del mismo, en concentraciones bajas éste inhibe la división celular, disminuye tanto el volumen celular como el ritmo de crecimiento; cuando se trata de concentraciones elevadas, afecta el metabolismo, causa la desnaturalización de proteínas en específico las enzimas glucolíticas, favorece la pérdida del gradiente electro-químico, inhibe los procesos de transporte y la acción de la H<sup>+</sup>-ATPasa, además aumenta la permeabilidad de la membrana causando un descenso en el pH intracelular e induce a la formación de mutante con deficiencia respiratoria. Los principales sitios de acción del etanol son las membranas celulares, las proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas y el retículo endoplásmico (Stanley *et al.*, 2010).

Dentro de los principales mecanismos relacionados con la tolerancia al etanol, se encuentra la composición de la membrana plasmática, ya que al existir presencia de niveles tóxicos de etanol, se dan cambios como el incremento en el índice de insaturación en ella para evitar o reducir su fluidez y permeabilidad. Los ácidos grasos mono insaturados predominantes mono-UFAs (Ácidos Grasos mono Insaturados; mono Unsaturated Fatty Acids) en dicha membrana son palmitoleico (16:1) y el oleico (18:1) y son obtenidos de la de-saturación del ácido palmítico y esteárico respectivamente, dicha reacción es catalizada por una enzima de de-saturación de membrana regida en *S. cerevisiae* por el gen OLE1. Otras modificaciones que ocurren en la membrana, además del incremento del contenido de ácidos grasos insaturados sobre los saturados, es el aumento en la longitud de cadenas carbonadas de los ácidos grasos. En adicción, se da una modificación en la composición lipídica de las membranas ya que éstas se enriquecen de esteroides como ergosterol y lanosterol (Gibson *et al.*, 2007) Al modificarse la permeabilidad de la membrana, se tiene un comportamiento similar al causado por el estrés ácido o térmico que involucra la acción de la H<sup>+</sup>-ATPasa para contrarrestar el flujo de protones (Leao y Van Uden, 1984). Para el caso de la

membrana mitocondrial, se ha observado una elevación en la composición de ergosterol/fosfolípidos para evitar la inducción de células con deficiencias respiratorias. Otro factor significativo en el mantenimiento de la integridad de la membrana y la reducción de permeabilidad de protones, aniones y nucleótidos, son los iones de Magnesio, ya que al aumentar la biodisponibilidad de Mg antes o durante la exposición al etanol, se aumenta la viabilidad de la célula (Salgueiro *et al.*, 1988).

Se ha demostrado que el estrés térmico y el del etanol presentan efectos y respuestas muy similares en la célula. Ya que en ambos casos, se da la síntesis de HSP donde la más importante en estrés por etanol, es la Hsp104 que actúa como agente remodelador en la disgregación de proteínas desnaturalizadas (Stanley *et al.*, 2010). Otro factor en común entre ambos es la acumulación y mayor producción de trehalosa. Por otro lado, estos dos tipos de estrés presentan un efecto sinérgico, ya que se conoce que en temperaturas elevadas los efectos tóxicos del etanol se potencializan y se tiene una disminución en el glucógeno celular y en la acción de la alcohol deshidrogenasa, por otro lado existe un aumento en las mutaciones *petit* (Gibson *et al.*, 2007).

Por último, se ha demostrado que el someter a las levaduras a bajas dosis de estrés resulta en que éstas presentan una mayor tolerancia a diferentes factores estresantes en tratamientos posteriores. Esto se debe a la protección cruzada y al hecho de que las respuestas de estrés de los diferentes factores, estén interrelacionadas. Dentro de las respuestas cruzadas más comunes está la producción de HSP y la acumulación de trehalosa. Sin embargo, también se ha demostrado que aunque parte de las respuestas al estrés sean comunes, existen mecanismos específicos de cada factor, un ejemplo es que las levaduras sometidas a un leve shock térmico, no resultó en la adquisición de una mayor resistencia a estrés osmótico (Stanley *et al.*, 2010).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La levadura predominante en las fermentaciones de mezcal es *Saccharomyces cerevisiae*, quien es la responsable del perfil organoléptico de esta bebida tradicional mexicana (Fleet *et al.* 2008). Es por ello que su estudio, identificación y determinación de sus tolerancias a una serie de condiciones de estrés son importantes para poder predecir su comportamiento, sobrevivencia y adaptación a lo largo de la fermentación. Y así poder utilizar esto como criterio de selección dependiendo de las condiciones de trabajo.

El resultado de esta investigación servirá como base para realizar posteriores pruebas de fermentación para determinar las cepas con mejor producción de etanol y congenéricos, y con todos estos estudios en conjunto, seleccionar de manera fundamentada a la cepa más adecuada para la producción de mezcal.

## 4. OBJETIVO

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar las cepas de *Sacchararomyces cerevisiae* aisladas de mezcal mediante PCR-RFLP y evaluar las diferencias existentes dentro de esta especie en su capacidad para tolerar y crecer en diversos parámetros de estrés.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Caracterizar las cepas de *S. cerevisiae* utilizando el método de PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2
  
- ◆ Evaluar el crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* en:
  - Concentraciones de glucosa de 200, 250 y 300 g/L
  - Concentraciones de sacarosa de 100, 150 y 200 g/L
  - pH 2.8, 3.0 y 3.2,
  - Temperatura de 37, 42 and 45°C
  - Concentraciones de etanol a 8, 10, 12 y 15%

## 5. HIPÓTESIS

Si el hábitat y las condiciones de fermentación del mezcal seleccionan a las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, entonces cepas del mismo hábitat y proceso tenderán a presentar los mismos niveles de tolerancia a diversos factores de estrés. Mientras que estos niveles de tolerancia serán diferentes al ser comparados con cepas aisladas de otras condiciones y hábitats diferentes.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la Ilustración 5 se plasma la metodología experimental general que se siguió en este trabajo.

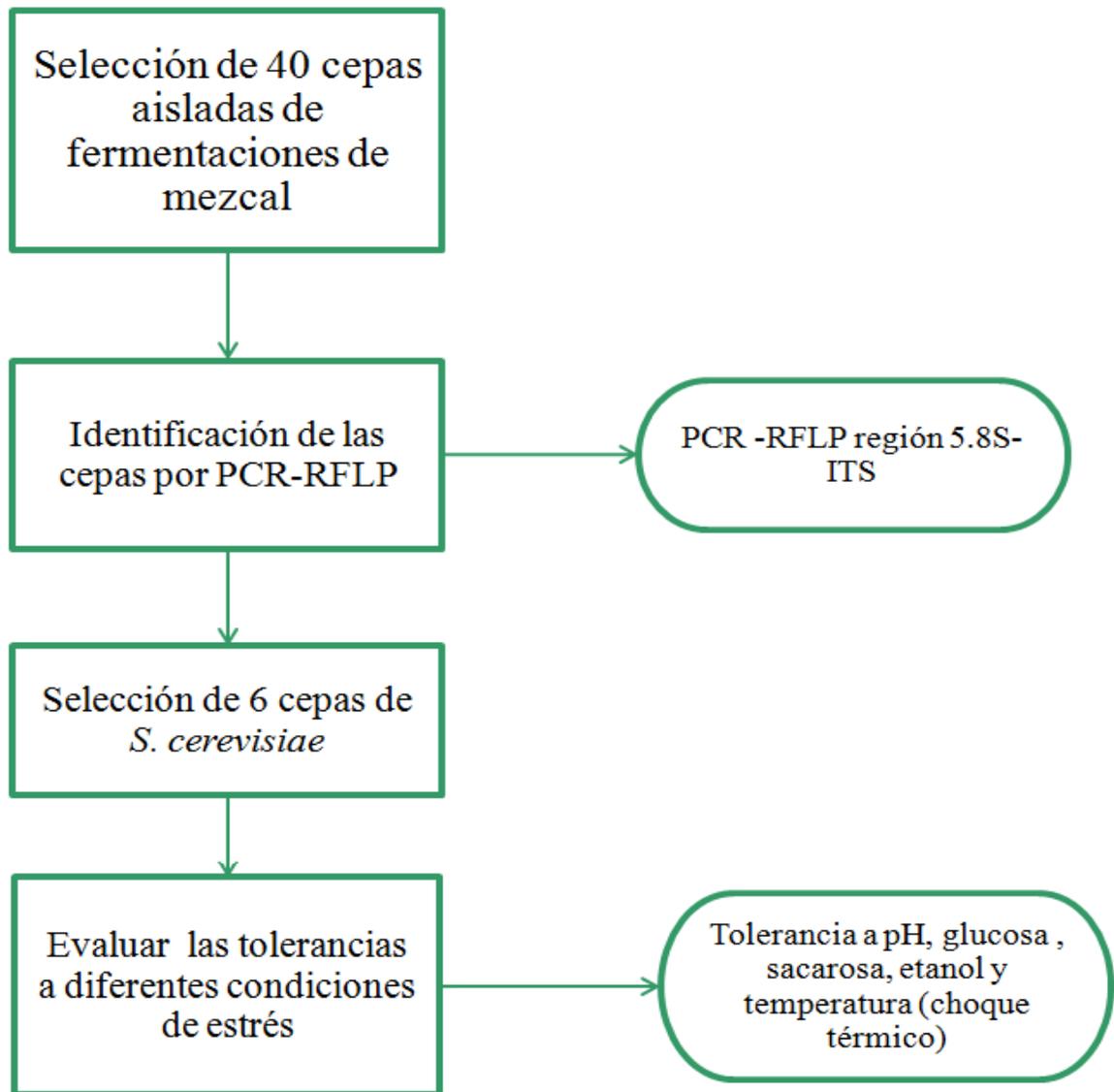


Ilustración 5. Estrategia experimental

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Reconstitución de cepas

Las levaduras con las que se realizó este trabajo fueron previamente aisladas de fermentaciones de mezcal de los tres municipios mezcaleros del estado de Oaxaca presentados en la tabla 1 y se mantenían a  $-80^{\circ}\text{C}$  en una solución de glicerol al 30%.

Tabla 1. Municipios de la región mezcalera de Oaxaca donde se tomaron las muestras

Distrito	Municipios
Tlacolula	San Luis Matatlán San Dionisio Guelavila
Yautepec	Coyul Reforma Majadas
Ocotlan	Minas Chichicapan

La región D1 y D2 del gen ribosomal 26S de estas levaduras fueron amplificadas y se les realizó una restricción con las enzimas *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI*. Con estos resultados se les agrupó en 16 patrones de los cuales los patrones 3 y 5 presentan la mayor frecuencia de aislamiento en las casas productoras (Nolasco, 2011 en proceso). Los patrones 3 y 5 fueron seleccionados por ser aquellos que podían comprender un mayor número de cepas de *S. cerevisiae*. Las cepas elegidas se resembraron en agar YPD (Agar de Extracto Levadura, Peptona y Dextrosa; Yeast Extract Peptone Dextrose Agar) utilizando las siguientes concentraciones: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa y 1.5% de agar. Las cajas inoculadas se incubaron de 24 a 48 horas a  $28^{\circ}\text{C}$  para su utilización posterior.

## **7.2 Extracción de ADN de levaduras**

El método empleado fue PCI (Fenol:Cloroformo : Alcohol Isoamílico). Para ello, se coloca 150µL de buffer TE (1mM EDTA y 10mM TRIS a pH 8) en un microtubo de centrifuga de rosca; posteriormente se tomó con una punta amarilla estéril una colonia. Se agregan a continuación alrededor de 0.3g de perlas de vidrio estériles de 425-600µm (Sigma-Aldrich,) y 150µL de PCI (Fenol:Cloroformo : Alcohol Isoamílico 25:24:1, saturado con 10mM Tris a pH 8 y 1mM EDTA de la marca Sigma-Aldrich). Posteriormente se llevó la mezcla a un *disruptor* de células (Disruptor Genie SI-D236) durante 40s. Después se centrifugó durante 15 minutos a 14000rpm en una microcentrifuga (Eppendorf), se recuperó el sobrenadante y se le almacenó en congelación.

## **7.3 Cuantificación utilizando un método espectrofotométrico del ADN de levaduras**

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  $[A_{260}/A_{280}]$  permite estimar el grado de pureza del ADN; en el caso de preparaciones puras de ADN la razón de esta relación debe ser 1.8 y 2.0.

Para determinar la concentración del ADN se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS GBC-Cintra con una celda de micro-volumen (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  $C=(A_{260})/\epsilon$ . Donde:  $A_{260}$  es la absorbancia a 260nm,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar  $=1/50=0.02$ ,  $C$  es la concentración  $[\text{ADN}\mu\text{g}/\text{ml}]$  y  $\lambda$  es el espesor de la celda=1.

## **7.4 Identificación de las cepas**

Se utilizó el método de PCR-RFLP de la región:

\*ITS1-5.8S-ITS2 (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

Para esta reacción se emplearon los termocicladores Gene Termal (Perkin Elemer), (Biometral T-Personal, Thermal Cyler Piko 24, Thermo Scientific); utilizando los siguientes reactivos:

1. Cebadores [0.5µM] (Invitrogen)  
ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') y  
ITS4 (5'TCCTCCGCTTTTAGATATGC-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 fue de 50µL.

El programa de temperatura utilizado fue:

Tabla 2. Condiciones de amplificación para la región 5.8S-ITS

Cebador	Programa de temperatura
ITS 1 ITS 4	Desnaturalización inicial de 5min a 95°C y después 35 ciclos de: 1min de desnaturalización a 95°C, 2min de alineamiento a 52°C y 2min de extensión a 72°C, seguidas por una extensión final de 10min a 72°C

El producto de amplificación se separó por electroforesis (Pharmacia Biotech GNA 100) en gel de agarosa 1% con buffer TBE 0.5X a 100V durante 40 min, utilizando un marcador de peso molecular de 100bp (Trackit ADN ladder Invitrogen). Los resultados se observaron en un fotodocumentador (Flour S Multi Imager, Bio-Rad) y las imágenes obtenidas fueron capturadas y analizadas utilizando el programa Kodak Molecular Imaging Software Version 5.0.

Para el siguiente paso, 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 esta reacción fue de 25µL; dicha mezcla de reacción se incubó a 37°C por 3horas. Las enzimas utilizadas para la región 5.8S-ITS fueron: *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* (Roche).

Los fragmentos resultantes se separaron por electroforesis Pharmacia Biotech GNA 100) en gel de agarosa 2% utilizando un buffer TBE 0.5X y un marcador de peso molecular de 1Kb (Trackit ADN ladder Invitrogen) a 80V por 60 min. Dichas restricciones se visualizaron en un fotodocumentador (Flour S Multi Imager, Bio-Rad) analizando las imágenes obtenidas en el programa Kodak Molecular Imaging Software Version 5.0.

Finalmente, los resultados obtenidos se compararon con [yeast-id.com](http://yeast-id.com) la base de datos de identificación rápida de levaduras de la Unidad Asociada CECT-IATA de la Universidad de Valencia.

### **7.5 Tolerancia a distintos tipos de estrés**

Para evaluar la tolerancia a diferentes parámetros de estrés que sufren las levaduras durante la fermentación alcohólica se preparó medio GPYA (Agar Glucosa, Peptona y extracto de levadura; Glucose Peptone Yeast Extract Agar) como base con las siguientes concentraciones peptona 0.5%, extracto de levadura 0.5%, glucosa 2% y agar 1.5%; todos los medios se incubaron a 30°C. Esta metodología es reportada por Badotti *et al.* (2009) y Belloch *et al.* (2008). Las modificaciones realizadas al medio base para cada parámetro se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Modificaciones realizadas al medio de cultivo base para cada condición de estrés.

Parámetro	Condiciones	Modificaciones al medio GPYA base
Estrés osmótico debido a glucosa	Concentraciones de glucosa de 200, 250 y 300 g/L	Se modificó el porcentaje de glucosa agregado para obtener las concentraciones deseadas de cada caso
Estrés osmótico debido a sacarosa	Concentraciones de sacarosa de 100, 150 y 200 g/L	No se agregó glucosa en el medio de cultivo sólo se agregaron las concentraciones deseadas de sacarosa para cada caso.
Estrés por acidez	pH de 2.8, 3.0 y 3.2	No hubo modificación de las concentraciones en el medio, sin embargo el pH se modificó utilizando HCl

Estrés térmico	Temperaturas de 37, 42 y 45°C	No hubo modificación de las concentraciones en el medio, sin embargo justo después de la inoculación se incubaron las cajas por tres horas a las temperaturas establecidas y posteriormente se incubaron de manera regular a 30°C
Estrés por etanol	Concentraciones de etanol a 8, 10, 12 y 15%	Se preparó el medio GPYA y posterior a la esterilización, se adicionó el etanol para evitar su evaporación.
Control de crecimiento	Peptona 0.5%, extracto de levadura 0.5%, glucosa 2% y agar 1.5%	No hubo modificación de las concentraciones en el medio.

Para realizar el inóculo y evaluar la tolerancia a los diferentes parámetros se realizaron en primer lugar pre-siembras de las cepas aisladas de mezcal en agar GPYA (peptona 0.5%, extracto de levadura 0.5%, glucosa 2% y agar 1.5% las cuales se incubaron por 48hr, posteriormente se utilizó una colonia para inocular 5ml de GPYA líquido y se dejaron incubar por 18 horas a 30°C con agitación. De manera subsecuente se utilizó 1ml del previo GPYA para la inoculación de 9ml de GPYA líquido ajustando la absorbancia de los cultivos a 0.3 a 655nm utilizando agua estéril. El incremento en la absorbancia después la incubación fue un indicativo de su viabilidad. Una vez ajustada la absorbancia se incubaron dichos tubos con agitación por 4 horas a 30°C. Transcurrido el tiempo se realizaron 6 diluciones decimales utilizando solución salina (9g/L). Para la siembra en caja se inocularon 5µL de cada serie de diluciones a los diferentes medios de estrés con las condiciones previamente mencionadas. Toda las cajas se colocaron en condiciones aeróbicas a 30°C (excepto aquellas de estrés térmico) y se verificó el crecimiento por 6 días consecutivos. Para evitar y detectar alguna variación debido a errores experimentales, se realizaron por duplicado todas las pruebas.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Cepas de estudio

En estudios anteriores, realizados por Nolasco (2011 en proceso), se aislaron diferentes cepas de levaduras involucradas en las fermentaciones de mezcal. Estas cepas se encontraban pre-agrupadas en diferentes patrones de bandas, los cuales fueron creados con los resultados obtenidos del análisis de las subunidades nucleares de rADN (26S). Se seleccionaron ciertas cepas de cada grupo y se secuenció la región D1/D2 del gen ribosomal 26S. Los resultados obtenidos indicaron que las cepas DI-14 y LC-14 son *Saccharomyces cerevisiae* del patrón 3 y PA-16 es *Kluyveromyces marxianus* del patrón 5. Para los fines de este experimento se trabajó con 40 cepas que formaban el patrón de bandeos 3 y el patrón 5.

Tabla 4. Cepas de estudio previamente aisladas de las fermentaciones de mezcal

Patrón	Cepas			
3	CH-01	DI-01	FF-07	LC-14
	CH-02	DI-02	FV-06	PA-12
	CH-03	DI-03	FV-10	PA-18
	CH-07	DI-08	FV-11	SI-01
	DA-12 A	DI-10	FV-15	SI-02
	DA-16	DI-11	LA-03	SI-13
	DH-01	DI-12	LC-11	SI-15
	DH-02	DI-14	LC-12	ZA-06
5	DA-06		PA-10	
	LC-05		PA-12	
	PA-08		PA-16	
	PA-09		VB-03	

## 8.2 PCR-RFLP de la región 5.8-ITS

Como ya se había mencionado las cepas a utilizar, se encontraban previamente separadas en diferentes patrones, de los cuales el patrón 3 y 5 se presumían eran *Sacharomyces cerevisiae* gracias a estudios realizados previamente. Sin embargo y según lo reportado por Kurtzman y Robnett, 1998, la secuencia de D1/D2 no es un parámetro suficiente para la total identificación de estos microorganismos, ya que incluso al combinar el análisis de 18s rADN con las secuencias de D1/D2 es difícil separar e identificar por completo el clado *Saccharomyces* debido a que éste presenta homologías con otros géneros como *Kluyveromyces*, *Toralaspora*, *Zygosaccharmyces* e incluso ciertas cepas de *Candida*; se realizó el PCR-RFLP de la región 5.8-ITS de las 40 cepas de estudio, dicho método es propuesto y utilizado en una gran variedad de artículos como: Verdugo-Valdez *et al.* (2011); Fernández-Espinar *et al.* (2000); Esteve-Zarzoso *et al.* (1999).

Al principio se presentó cierta dificultad para obtener productos de PCR que no sólo fueran fácilmente medibles y apreciables en el gel de agarosa, sino además que fueran útiles para poder utilizarlos para la realización de las restricciones. Para ello, era necesario obtener bandas de las amplificaciones con una buena concentración en el producto de PCR. Por esto, previo a realizar el PCR se evaluó la pureza y concentración de los extractos de ADN obtenidos por medio de PCI. En la mayoría de las ocasiones se realizaban sólo lecturas de 20 de los 40 extractos ya que si la mitad de las lecturas eran favorables se podía presumir que la otra mitad cumpliría con la pureza esperada.

El valor esperado para la razón entre 260nm/280nm es entre 1.8 y 2, ya que esto indica que se cuenta con un ADN puro y sin contaminantes como proteínas las cuales podrían actuar como inhibidores de la amplificación o compuestos fenólicos, que interaccionan con enzimas líticas (Cova, 2010). Como precauciones, para extracciones posteriores se verificó que se mantuviera una temperatura de 4°C después de la lisis celular y que sólo se recuperara la fase acuosa para evitar contaminaciones de la fase orgánica. Los extractos eran guardados por un periodo máximo de 2 semanas en el refrigerador y en el caso de que éstos llegaran a congelarse, que no pasaran por más de 3 ciclos de congelado-descongelado ya que esto afecta la calidad del extracto y desnaturaliza el DNA extraído (Corkill *et al.*, 2008).

### **8.2.1 Estandarización de la técnica de PCR-RFLP**

Primero se estandarizó la técnica: al principio de la experimentación se presentó el problema de que la amplificación no se llevó a cabo. Se estudiaron las posibles causas que ocasionan esto, entre ellas se encuentran que no se haya colocado la cantidad suficiente de DNA, que el DNA se encontrara degradado, que la enzima utilizada se haya inactivado, que los dNTPs o los primers se encuentren degradados o desnaturalizados, que existan inhibidores interfiriendo con la reacción y finalmente que la concentración de  $MgCl_2$  sea inadecuada. Se procedió a descartar dichos factores, primero se verificó que los extractos utilizados contaran con las características óptimas en cuanto a concentración y pureza. Una vez corroborado que la concentración del DNA era la adecuada, se comenzó a modificar el protocolo original de Esteve-Zarzoso, el primer parámetro en modificarse fue la concentración de  $MgCl_2$  utilizada. Se sabe que el  $Mg^{+2}$  actúa como cofactor de la enzima Taq polimerasa afectando su actividad, y que el aumento en la concentración tiene el efecto neto de disminuir la severidad de la unión de los primers y por lo tanto causar una baja especificidad de la reacción; por otro lado las bajas concentraciones de este catión pueden originar una pobre eficiencia de la reacción. Además este catión interfiere impidiendo la formación de dímeros de primer-primer. Sabiendo que la concentración de  $Mg^{+2}$ , debe calcularse como función de la concentración de nucleótidos y según lo reportado (Innis, M., *et.al.*, 1990), debe probarse un rango de  $[Mg^{+2}]$  entre 0.5 y 2.5mM por encima de la concentración de nucleótidos. Otro factor a considerar es que las soluciones de  $MgCl_2$  tienden a precipitar después de los ciclos de congelación-descongelación por ello la solución stock debe mantenerse a 4°C y añadirse a la Master Mix justo antes de la amplificación. Considerando esto se elevó la concentración empleada de  $MgCl_2$  1.5mM a 2mM. (Riedel *et.al.*, 1992 y Cha *et. al.*, 1993).

Sin embargo, al repetir el experimento con las condiciones modificadas se encontró una vez más con resultados negativos. Por este motivo se realizaron de nuevo modificaciones esta vez se consideró modificar la concentración de dNTPs ya que ésta debe estar entre 20 y 200 $\mu$ M para dar resultados de alta especificidad y fidelidad; una baja concentración de dNTPs reduce que se acoplen a zonas incorrectas y por ello reduce la posibilidad de amplificar nucleótidos mal incorporados. Sin embargo concentraciones demasiado bajas pueden provocar un bajo rendimiento de los productos de amplificación. Se sabe que para

el correcto funcionamiento de este componente es necesario que los 4 dNTPs se encuentren en concentraciones equivalentes ya que esto minimiza errores de mala incorporación. Finalmente se elevó la concentración de dNTPs a 200 $\mu$ M (Innis *et.al.*, 1990 y Cha *et. al.*, 1993).

Los resultados una vez más fueron negativos; el último factor a evaluar eran los primers utilizados, se realizaron varios geles modificando la concentración de éstos con base en que si la concentración de primers es baja puede ocasionar un pobre rendimiento de la reacción. Si es demasiado alta puede ocasionar una disminución de la especificidad que se manifiesta por un incremento en los productos de amplificación inespecíficos; además, puede favorecer la formación de dímeros de primer, ambos fenómenos afectan la reacción de PCR ya que compiten con el producto que se desea utilizando la enzima, los dNTPs y los primers restantes, dando como resultado una concentración muy baja del producto de interés. (Riedel *et.al.*, 1992 y Cha *et. al.*, 1993).

Como factor final para corroborar que los primers eran la causa de no obtener las amplificaciones deseadas se observó que en otros estudios donde se realizan amplificaciones de regiones diferentes del DNA y se emplean los mismos reactivos con excepción obvia de los primers , si se lograban los productos deseados de buena intensidad, con ello se presume que los primers ITS1 e ITS 4 utilizados en este experimento sufrieron de una desnaturalización (Dan *et.al.*, 1991). Se solicitaron nuevos primers para obtener los resultados esperados. Una vez que se contaba con los primers nuevos se procedió con el protocolo original mencionado en Materiales y Métodos.

Una vez que se estandarizó el método se procedió a realizar el PCR-RFLP de la región 5.8-ITS; para ello se trabajó con 2 lotes de 20 cepas cada uno. En la tabla 5 se muestran las primeras 20 cepas utilizadas. Esta medida se tomó para facilitar el trabajo experimental.

Tabla 5. Cepas del primer lote para realización de PCR-RFLP

CEPA			
1	LC-05	11	VB-03
2	LC-12	12	LC-11
3	ZA-06	13	D1-02
4	CH-01	14	PA-08
5	LC-03	15	PA-12
6	DI-08	16	PA-15
7	CH-07	17	PA-16
8	FV-13	18	PA-18
9	D1-14	19	DH-2
10	DI-12	20	DH-I

NOTA: Para todos los geles realizados se siguió la numeración de las cepas presentadas en la Tabla 5; es decir en todas las ocasiones en el carril 1 se colocaba la cepa LC-05 y así sucesivamente.

En la Figura 1 se puede observar el tamaño de amplicon para 17 de las 40 cepas utilizadas siguiendo el criterio de numeración presentado en la tabla 5. En dicha figura se puede apreciar que no en todos los casos se cuentan con un amplicon de ~850pb esperado para *Saccharomyces cerevisiae* según lo reportado por Verdugo-Valdez *et al.* (2011); Fernández-Espinar *et al.* (2000); Esteve-Zarzoso *et al.* (1999); con lo cual se indica que no sólo se está trabajando con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sino también, con otros microorganismos agrupados dentro de los patrones originalmente seleccionados.

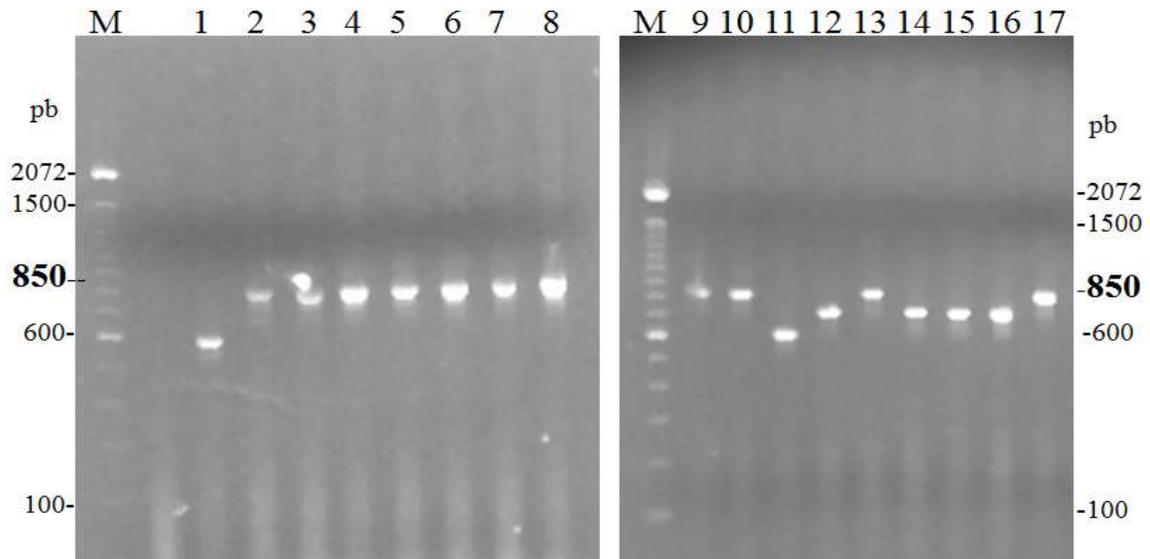


Figura 1. Amplificación de la región 5.8-ITS de 17 cepas aisladas de mezcal siguiendo la numeración de la tabla 5. Condiciones de electroforesis: gel de agarosa 1% con buffer TBE 0.5X a 100V durante 40 min. M es el marcador molecular de 100bp de Invitrogen

Posteriormente se realizó el análisis de restricción utilizando las enzimas *CfoI*, *Hae II* y *HinfI*, las cuales generan un patrón especie-específico que fue útil para identificar a las levaduras presentes, cabe destacar que, *Saccharomyces cerevisiae* presenta una elevada homología genética con otras especies pertenecientes al grupo de *Saccharomyces sensu stricto* y esto dificulta su correcta identificación (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). En la Figura 2, 3 y 4 se puede apreciar algunos de los resultados de los análisis para las primeras 17 de las cuarenta cepas, posteriormente en la Tabla 6 se presentan todos los resultados obtenidos.

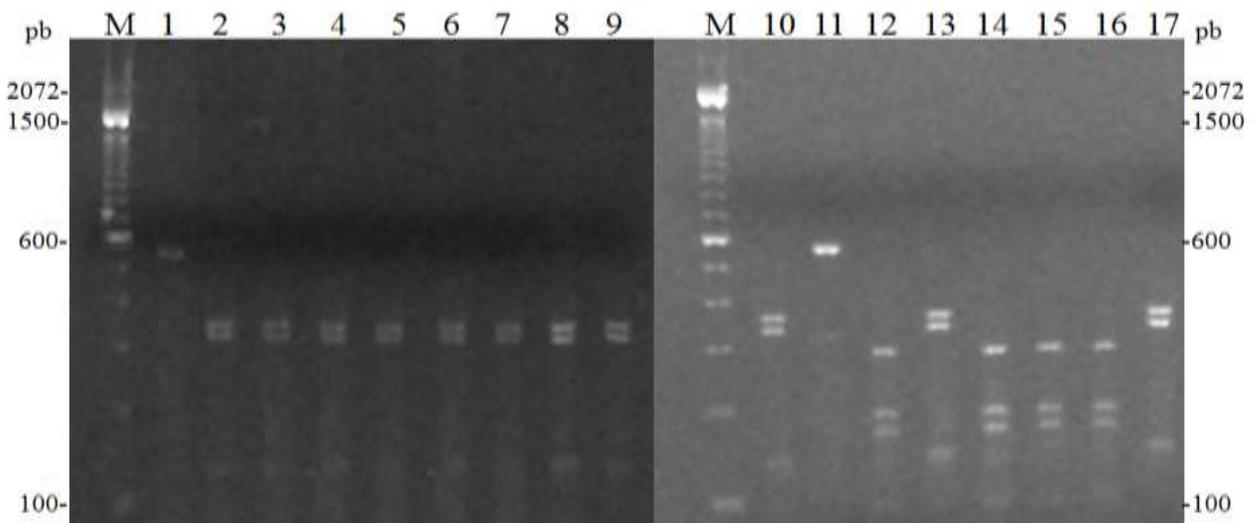


Figura 2. Perfil de restricción de 17 cepas aisladas de las fermentaciones de mezcal siguiendo la numeración de la tabla 5 utilizando la *CfoI*. Condiciones de electroforesis: gel de agarosa 2% con buffer TBE 0.5X a 80V durante 60 min. M es el marcador molecular de 100bp de Invitrogen.

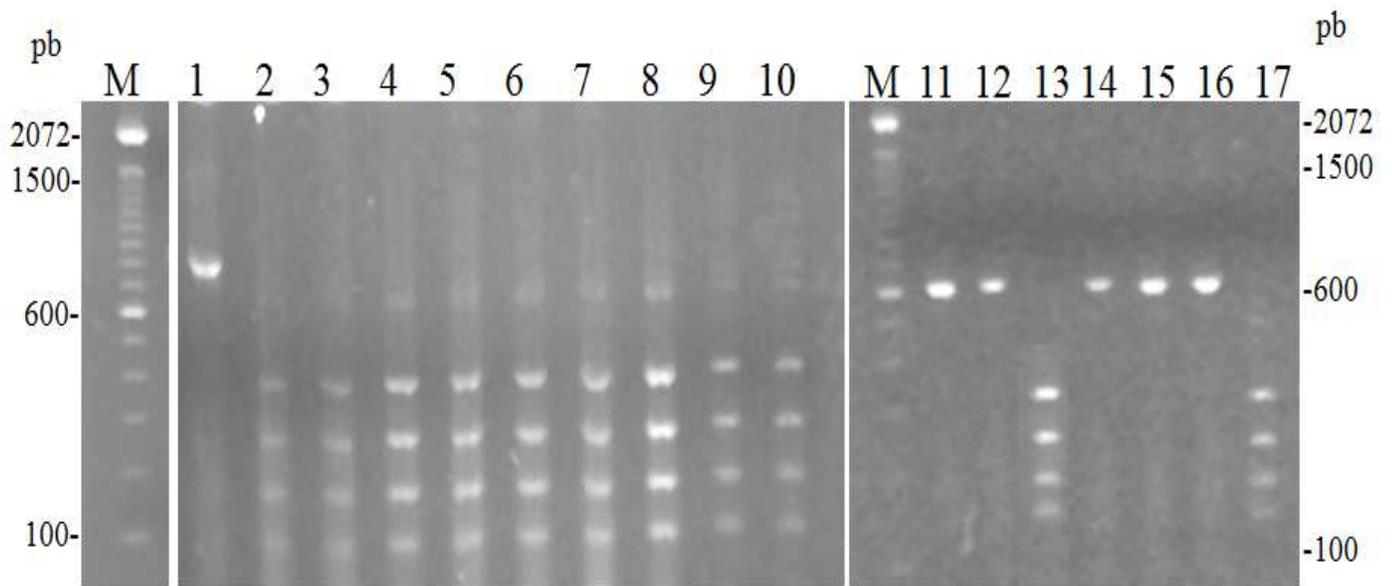


Figura 3. Perfil de restricción de 17 cepas aisladas de las fermentaciones de mezcal siguiendo la numeración de la tabla 5 utilizando la *Hae II*. Condiciones de electroforesis: gel de agarosa 2% con buffer TBE 0.5X a 80V durante 60 min. M es el marcador molecular.

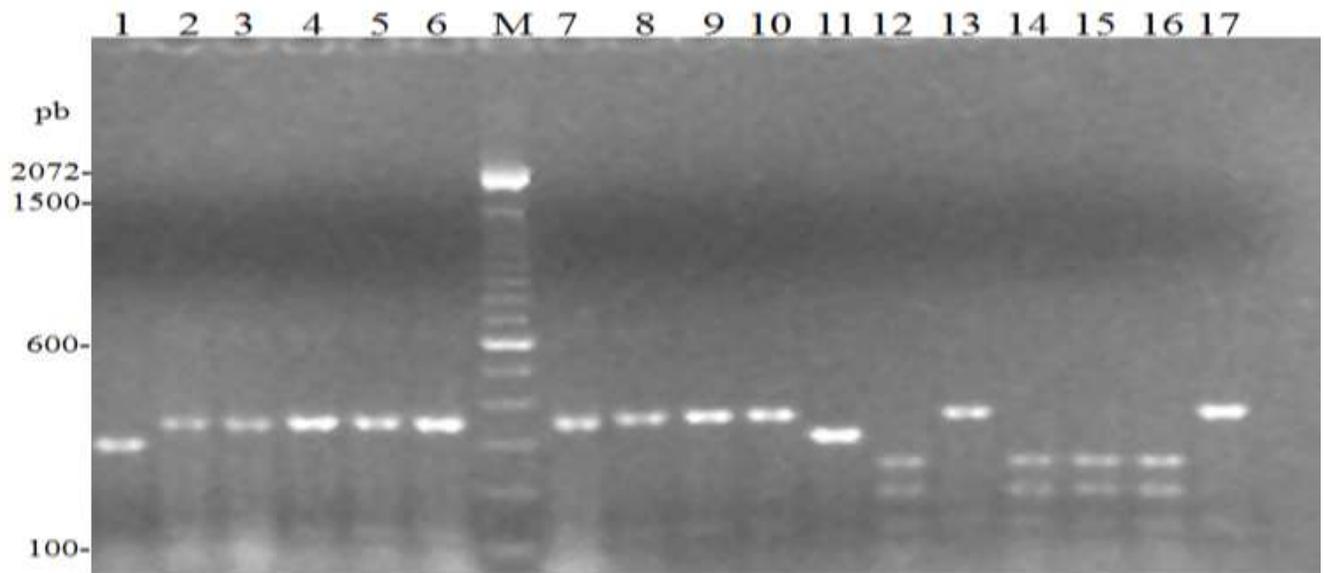


Figura 4. Perfil de restricción de 17 cepas aisladas de las fermentaciones de mezcal siguiendo la numeración de la tabla 5. utilizando la *Hinf I*. Condiciones de electroforesis: gel de agarosa 2% con buffer TBE 0.5X a 80V durante 60 min. M es el marcador molecular

Tabla 6. Tamaño (en pb) del amplicón de la región 5.85-ITS y de los fragmentos de restricción obtenidos por las enzimas: *Cfo I*, *Hae III* y *Hinf I* de una muestra representativa. Los colores representan los 4 diferentes tipo de patrones encontrados.

CEPA	5.8S-ITS	FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN		
		<i>Cfo I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Hinf I</i>
1 LC-05	610	500	610	300
2 LC-12	846	350+322+137.5	317.6+237+183+130	353.8+110.5
3 ZA-06	847	355.6+327.8+140.5	317.6+234+179+133	346.2+121.1
4 CH-01	838	344.4+322.2+135.1	320.5+233+179+133	353.8+126.3
5 LC-03	854	338.9+316.7+135.1	321+234+180+130	353.8+136.8
6 DI-08	853	333.3+311.1+135.1	321+234+180+130	346.2+136.8
10 DI-12	857	363.2+336.8+144.7	320.5+233+179+133	361.5+131.6
20 DH-I	840	369.2+353.8+135.7	307.7+230.8+171.4+135.7	361.5+128.6
21 PA-10	716.7	300+192.9+184.6+156.2+105.8	628.6	261.5+200+145.9
22 PA-09	716.7	298.8+195.6+180+165+100	629.5	292.3+198.9+154.3
23 DA-06	750	295.7+196.7+175.3+111	660	257.1+189+125.7
24 FV-11	866.7	380+330+127.3	310+338.5+190.9+138.2	370+136.4

Con los resultados obtenidos se pudieron identificar 4 diferentes patrones, dichos resultados se presentan en la tabla 6.

Tabla 7. Clasificación de las cepas según su identificación correspondiente con los patrones obtenidos de PCR-RFLP de la región 5.8-ITS

Cepas		Identificación	
2	LC-12	26	FF-07
3	ZA-06	27	LC-14
4	CH-01	28	SI-02
5	LC-03	29	SI-01
6	DI-08	30	D1-01
7	CH-07	31	CH-03
8	FV-13	32	CH-02
9	D1-14	33	FV-06
10	DI-12	34	DI-10
13	D1-02	35	DI-11
18	PA-18	36	DA-16
19	DH-2	37	DA-12A
20	DH-I	38	DI-03
24	FV-11	39	FV-10
25	SI-13	40	SI-15

*Saccharomyces cerevisiae*

Cepas		Identificación
12	LC-11	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
14	PA-08	
15	PA-12	
16	PA-15	
17	PA-16	
21	PA-10	
22	PA-09	
23	DA-06	<i>Hanseniaspora</i> spp.
1	LC-05	No identificado
11	VB-03	

Para el caso del primer grupo identificado como *Saccharomyces cerevisiae* la enzima *CfoI* generó 3 fragmentos de tamaños (~375+335+144bp) que son similares para todas las cepas dentro de este grupo. Para *Hae III* se encontraron 4 fragmentos (~320+230+180+130), se ha observado que esta enzima es importante para la identificación molecular dentro del grupo de *Saccharomyces sensu stricto* ya que permite dividir en dos subgrupos el primero de ellos presenta sólo tres fragmentos de (495+230+125) e incluye a *S. bayanus/S. pastorianus* y el segundo que genera 4 fragmentos (325+230+170+125) donde se encuentra *S. paradoxus /S. cerevisiae* (Fernández-Espinar *et al.*, 2000). Posteriormente con *Hinf I* se obtuvieron dos fragmentos (~365+150bp), en el caso de las tres enzimas los resultados concuerdan con lo reportado por Verdugo-Valdez *et al.* (2011), Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) y Pham *et al.* (2011); gracias a estos resultados podemos observar que un tiempo de digestión de 3 horas, es suficiente para que las enzimas actúen de manera correcta.

Como se menciona para el caso de las tres enzimas, se obtuvieron resultados esperados, sin embargo, en el artículo de Fernández-Espinar *et al.* (2000) para el caso de *Hinf I* se reportan la presencia de 3 fragmentos (~375+365+110pb), los fragmentos de 375 y 365 son muy similares en su peso molecular por lo que su medición es complicada y depende en gran parte de la corrida del gel, este factor ayuda a explicar porque existen variaciones entre lo reportado.

El segundo grupo fue identificado como *Kluyveromyces marxianus*, ya que se obtuvieron fragmentos muy similares a los reportados como el amplicón que se esperaría es de 740bp, aquí se encontró de ~720pb. Con respecto a la restricción, para *CfoI* se obtuvieron 5 fragmentos, uno más que lo esperado, no obstante, de los 5 fragmentos (298.8+195.6+180+165+100pb), 4 presentan correspondencia con lo establecido por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) de (285+185+140+100bp), en *Hae III* se presentó un solo fragmento de ~630bp que es similar a (655+80bp), finalmente para *Hinf I* se obtuvieron 3 fragmentos de (~292.3+198.9+154.3bp) que concuerdan con 3 de los 4 reportados de (240+185+120+80bp).

Las levaduras identificadas *Saccharomyces cerevisiae*, y *Kluyveromyces marxianus* son comunes en las fermentaciones de mezcal y estos resultados concuerdan con lo reportado por Verdugo-Valdez *et al.* (2011) y Escalante-Minakata *et al.* (2008), ya que ambos identificaron la comunidad de levaduras presentes en la fermentación de mezcal a partir de *Agave salmiana*, y para ambos casos se tiene la presencia de estas dos especies de manera predominante.

Posteriormente para corroborar los resultados obtenidos, se utilizó [yeast-id.com](http://yeast-id.com) que es la base de datos de identificación rápida de levaduras de la Unidad Asociada CECT-IATA de la Universidad de Valencia, con la cual se comparan los patrones de bandeo obtenidos con aquellos pertenecientes a la base de datos de una serie de levaduras, dicho bandeo está basado en el análisis de restricción de la zona que incluye el gen que codifica el 5,8S rRNA y las zonas intergénicas transcritas ITS (5,8S-ITS); de esta manera se pueden identificar las especies de levaduras con las que se están trabajando. Estos resultados concuerdan con lo ya mencionado y permiten así identificar a las cepas según se indica en las Tablas 6 y 7.

En lo que respecta a los demás grupos, los fragmentos obtenidos se compararon con lo reportado por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) y Pham *et al.* (2011) para poder obtener su identificación, en el caso del tercer grupo su identificación fue un poco más complicada ya que los valores obtenidos no presentaban una correspondencia tan cercana con lo reportado. Sin embargo se piensa que se trata de una levadura del grupo *Hanseniaspora* ya que el valor del amplicón corresponde a las 750bp reportadas, por otro lado, los patrones de restricción no coinciden perfectamente con ninguna especie siendo la más cercana

*Hanseniaspora osmophila* con valores para *CfoI* de (275+185+150+95bp) que corresponden con (295.7+196.7+175.3+111bp), para *Hae III* se esperan valores de (460+120+90+80bp) sin embargo sólo se presentó un fragmento de 660bp que nos lleva a pensar no se obtuvo una digestión completa; y para *Hinf I* se esperan valores de (390+360bp) que tampoco corresponden a lo obtenido de (257.1+189+125.7bp). Por otro lado, de dos cepas no fue posible la identificación, aunque se piensa que se trata de levaduras del género *Candida*. Este resultado se puede deber a una serie de factores como que se trate de dos cepas aún no reportadas o que el tiempo de digestión no sea suficiente como se aprecia para el caso de *Hae III* donde no hubo corte alguno. Para fines de este estudio sólo se requería saber cuáles eran *S. cerevisiae* por lo que no se condujo mayor investigación con estas cepas y por ello no fue posible identificarlas.

### **8.3 TOLERANCIAS A DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS**

Una vez que se conocía con seguridad cuáles de las cepas de trabajo eran *Saccharomyces cerevisiae*, se seleccionaron 6 cepas para realizar la evaluación de tolerancia a diferentes parámetros de estrés. Esta selección se llevó a cabo tomando como base las diferentes regiones mezcaleras, para así poder tener una visión global del comportamiento de *S. cerevisiae*.

Tabla 8. Cepas seleccionadas para la evaluación de tolerancias a estrés y la región mezcalera de donde provienen.

Cepa	Región
CH-02	San Baltazar Tlacolula, Valles Centrales
DI-14	Santiago Matatlan, Tacolula Valles Centrales
FF-07	Las Majadas, Yautepec Sierra Sur
FV-13	San Baltazar Chichicapan, Ocotlan Valles Centrales
LC-14	Santa Catarina Minas, Ocotlan Valles Centrales
PA-18	San Baltazar Chichicapan, Ocotlan Valles Centrales

Como se mencionó previamente, la fermentación alcohólica implica que las células de levaduras estén bajo diferentes condiciones de estrés las cuales varían durante el proceso. Se han realizado previamente estudios de tolerancia de levaduras, de diferentes bebidas, a una serie de factores, sin embargo esto nunca se ha llevado a cabo con levaduras del mezcal. Se sabe que las cepas aisladas de diferentes bebidas mexicanas como tequila y pulque -que presentan características semejantes- pueden sobrevivir a condiciones extremas, por lo que se esperaba que las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de mezcal presentaran un comportamiento similar (Arias, 2008).

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos. El desarrollo de la colonia está indicado con un número correspondiente a la dilución donde se presentó crecimiento, es decir el número 6 representa crecimiento en la sexta dilución, el 5 en la quinta y así sucesivamente. En el caso de que la cepa no tolere la condición de estrés se marca 0 sin crecimiento.

Tabla 9. Tolerancia a diferentes concentraciones de glucosa y sacarosa; y condiciones de pH, temperatura y etanol como factor de estrés de las cepas seleccionadas aisladas del mezcal; los números representan la dilución máxima donde se presento crecimiento siendo 0 ausencia de crecimiento en cualquier dilución y 6 crecimiento de la cepa en la sexta dilución.

Cepa	Condiciones de estrés															
	Glucosa de (g/L )			Sacarosa de (g/L )			pH			Temperatura (°C)			Etanol (%)			
	200	250	300	100	150	200	2.8	3	3.2	37	42	45	8	10	12	15
CH-02	6	6	5	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	5	2
DI-14	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5	6	6	6	5
FF-07	6	6	5	6	6	5	6	6	6	6	6	4	6	6	5	0
FV-13	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	5	5	6	5	3	0
LC-14	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	4
PA-18	6	6	5	6	6	5	6	6	6	6	4	1	6	6	4	0

### **8.3.2 Estrés osmótico: sacarosa y glucosa**

En el mezcal existe la presencia de glucosa y fructosa gracias a la hidrólisis de los almidones debido al cocimiento del maguey, además algunos productores agregan sacarosa a la mezcla para favorecer la fermentación; por ello es importante conocer la sobrevivencia

de *S. cerevisiae* ante estos azúcares. Dichas condiciones son llevadas a niveles extremos, ya que esto nos permite evaluar hasta donde es capaz de sobrevivir la levadura en una situación hipotética y poder presumir que dicha levadura sobreviviría incluso a otros procesos más hostiles. Como se puede observar en la tabla 9 todas las cepas toleran y son capaces de crecer tanto en 200, 250 y 300g/L de glucosa y en 100, 150 y 200 g/L de sacarosa. El crecimiento se observaba a las 24h de incubarse a 30°C. Las cepas que presentaron una menor tolerancia para este parámetro son en el caso de glucosa FF-07 y PA-18 y para sacarosa FF-07, FV-13 y PA-18 ya que éstas sólo presentan crecimiento hasta la quinta dilución.

En lo referente a la morfología de la colonia, las colonias de las cajas con mayor concentración tanto de glucosa como sacarosa presentaban colonia de menor diámetro y corrugadas; estas formaciones conocidas como colonia compleja se han observado en medios con bajo contenido en dextrosa, ya que la baja disponibilidad de carbono induce este tipo de morfología. Sin embargo, en este caso donde las concentraciones son elevadas podemos ver la misma formación, lo que implicó que éste es un mecanismo de respuesta contra un ambiente hostil ya que involucró la producción de una matriz extracelular de protección (Santiago, 2010).

Los resultados obtenidos son similares a aquellos reportados por Belloch-Orlic *et al.* (2008), Badotti-Belloch (2009) y Arias (2008) donde se sometieron a una serie de *S. cerevisiae* aisladas de diferentes bebidas a las mismas condiciones de estrés con respecto a glucosa y en la mayoría de los casos se presentan crecimiento en la sexta dilución. No se encontraron estudios similares con sacarosa, sin embargo aunque éste sea un disacárido se cree que el mecanismo de respuesta es muy similar para ambos azúcares ya que los resultados son muy similares para todas las cepas.

Esta alta tolerancia y supervivencia se puede deber a una serie de factores como la producción de solutos compatibles principalmente el glicerol. Esto fue demostrado por Albertyn *et al.* (1994) y Blomberg y Adler (1989), donde se realizó la caracterización de la respuesta a estrés osmótico, y se observó una acumulación de glicerol triple a lo normal, debido a la inducción de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citoplásmica cuya actividad también lidia con la represión de glucosa. Del glicerol que se produce se retiene alrededor

del 70% de manera intracelular y a medida que se disminuye el estrés, el glicerol se va liberando lo que involucra también la síntesis de proteínas que permitan esta retención o permeabilidad según sea el caso. Por ello podemos decir que las cepas de mezcal cumplen con estos mecanismos de manera eficiente ya que son capaces de crecer y adaptarse hasta las últimas diluciones.

### **8.3.3 Estrés ácido**

En el mezcal según lo reportado por Lappe *et al.* (2008) existe la presencia de diversos ácidos orgánicos, debido a ello sabemos que el mezcal cuenta con un pH ácido, sin embargo no existen reportes de una medida estándar de pH; por ello al igual que en el caso del estrés osmótico se optó por someter a las levaduras a extremos ácidos. Dichos extremos se seleccionaron utilizando los reportes de Belloch *et al.* (2007), Badotti *et al.* (2009) y Arias (2008). Los resultados de la tabla 9 se observa que las cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* presentan una buena tolerancia a pH ácidos, ya que todas ellas fueron capaces de crecer incluso en pH de 2.8 hasta la sexta dilución con excepción de PA-18 que sólo crece hasta la quinta dilución. El crecimiento para esta condición de estrés pudo ser observado a las 24h incubando a 30°C.

La capacidad de tolerar estas condiciones dependen prácticamente de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* y su capacidad de resistir y no ser permeable. Ya que de permitir la entrada de iones, ya sean cationes o aniones u otro tipo de moléculas implica, para esta levadura, un elevado gasto energético y la interferencia de sus rutas metabólicas. Para el caso particular de  $\text{Cl}^-$ , este anión interfiere con algunas enzimas que presentan interacción específica con este ion en sitios importantes (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Según lo reportado por Kapteyn *et al.* (2001), la capacidad de tolerar un bajo pH externo depende de las proteínas de pared celular (CWP cell wall proteins) y del anclaje que presentan bajo estas condiciones. En este estudio se demostró que Cwp1p es una de las principales proteínas involucradas con la resistencia a bajos pHs, y que el incremento de ésta en la pared celular, no se debe a una mayor inducción génica que aumente su síntesis,

sino a un doble anclaje en pared por medio de dos uniones a  $\beta$ 1,3-glucano, la primera álcali-sensible y la segunda álcali-resistente que permite reducir la permeabilidad de pared. Otras proteínas que se describen en este artículo y que también están involucradas con dicha tolerancia son Pir2p/Hsp150, las cuales también presentan un anclaje más resistente bajo condiciones ácidas; esto se puede explicar gracias a que a pH bajo los sitios aceptores a  $\beta$ 1,3-glucano se hacen disponibles para estas proteínas. Como ya se ha mencionado, las respuestas de estrés a diferentes factores están relacionadas y esto se confirma de igual manera en este artículo al demostrar que las modificaciones en la estructura de la pared celular son dependientes de la vía HOG1 relacionada con la síntesis de glicerol. Estos mecanismos se asume, son similares en las 6 cepas de estudio, y se puede decir que en todo el grupo *sensu stricto* lo cual se ve reflejado en la semejanza con otros estudios.

Una vez más los resultados obtenidos son similares a los artículos antes mencionados Belloch *et al.* (2007), Badotti *et al.* (2009) y Arias (2008); esto implica que la capacidad de crecer en pH ácidos es común para todas las cepas de *S. cerevisiae* sin importar de donde hayan sido aisladas; según lo reportado por Belloch *et al.* (2007), esta tolerancia también es común para todas las especies del género *Saccharomyces sensu stricto*. Por lo tanto, la capacidad de crecer a un pH bajo no debería considerarse como un factor de estrés para esta levadura en fermentaciones alcohólicas. Incluso Serra *et al.* (2005) demostró que el pH no afecta de manera significativa el crecimiento en *Saccharomyces*.

#### **8.3.4 Estrés por calor**

Para el estrés por calor podemos notar en la tabla 9 que es donde las cepas presentan una mayor variabilidad en los resultados siendo CH-02 y LC-14 las que presentan la mejor respuesta al poder crecer hasta la quinta dilución para 45°C y sexta en las otras dos temperaturas. Para DI-14 y FV-13 tenemos resultados iguales presentando sólo crecimiento hasta la 5 dilución tanto para 42 y 45°C y finalmente PA-18 resulta ser de nuevo la más sensible a estas condiciones pudiendo crecer sólo hasta la cuarta dilución para 42°C y la primera para 45°C. El crecimiento se observó a las 24h para todas las condiciones. Los resultados obtenidos son similares a los reportados previamente, ya que en todos los casos

la tolerancia a este parámetro depende de la cepa y de donde se aisló y no presenta un patrón similar como en las condiciones anteriores.

No obstante, los resultados a estas condiciones fue un poco sorprendentes ya que en lo establecido por Arias (2008) donde se trabaja con cepas aisladas de bebidas mexicanas como pulque, tequila y tepache, se reporta que las cepas no presentan una buena tolerancia a 42°C creciendo la mayoría de ellas sólo en la primera dilución, sin embargo podemos apreciar que en el caso de las cepas del mezcal, el crecimiento a 42 grados en todos los casos es favorable siendo la cuarta la dilución mínima de crecimiento, y adicionalmente todas presentan crecimiento a 45°C. Este resultado se puede deber a que en nuestro caso sólo se les dio un choque térmico de dos horas a las temperaturas establecidas y luego se incubaron todas las cepas a 30°C y en los otros artículos no se reporta si se siguió este mismo procedimiento o las cepas crecen todo el tiempo en las condiciones de temperatura indicadas.

Así mismo, no se esperaría este tipo de tolerancia ya que la región mezcalera de Oaxaca es una región semi-cálida con temperaturas promedio entre los 20-25°C así que incluso aquellas cepas como FV-13, LC-14 y PA-18 que provienen de la región menos desarrollada y de procesamiento más rústico, es decir procesos donde la temperatura no es controlada o supervisada como ocurre en los procesamientos más industrializados; son rara vez sometidas a estas temperaturas ya que la temperatura ambiental no alcanza los 40°C. Por ende, se esperaría que las cepas provenientes de Tlacolula y Yautepec es decir CH-02, DI-14 y FF-07 presentaran una menor tolerancia.

La tolerancia a altas temperaturas está estrechamente relacionada con la síntesis de HSP (Proteínas de Choque Térmico, Heat Shock Proteins), pero en el artículo de Piper (1993), se establece que hay factores que pueden ser más trascendentales para la termotolerancia; como los cambios fisiológicos que ocurren, la acumulación de trealosa, y la ATPasa de la membrana plasmática. Por otro lado, Chatterje *et al.* (1997), identificó un cambio en los lípidos celulares habiendo un aumento de ácidos grasos insaturados que presentan mayor resistencia al calor. Por lo que podemos inferir que las cepas CH-02 y LC-14 presentarían una conducción más efectiva de estos mecanismos y adecuaciones incrementado su tolerancia en comparación con las otras 4 cepas, por otro lado también se puede suponer

que estas cepas presentan una mejor tolerancia debido a que son capaces de reparar de manera más eficiente el daño causado por el calor.

### **8.3.5 Estrés por etanol**



Ilustración 6. Desarrollo de las cepas FF-07, FV-13 y PA-18 para las condiciones de 8, 10, 12 y 15% de etanol respectivamente

Finalmente para el etanol encontramos una gran variación en los resultados. Como se aprecia en la tabla 9 todas las cepas son capaces de crecer hasta 12% de etanol; dentro de esto encontramos que la cepa DI-14 es la que presenta mayor tolerancia ya que en 15% de etanol hubo crecimiento hasta la quinta dilución, la sigue LC-14 que presenta crecimiento hasta la 4 dilución y posteriormente CH-02 con crecimiento hasta la segunda dilución para 15% y crecimiento hasta la quinta dilución para 12%. Existen tres cepas que no fueron capaces de crecer en 15% de etanol estas fueron FF-07, FV-13 y PA-18. De estas cepas la que presenta más afectación por el etanol es FV-13 que desde 10% sólo puede crecer hasta la quinta dilución y en 12% sólo hay crecimiento hasta la tercera. Mientras que FF-07 y PA-18 crecen hasta la sexta dilución para 10% y hasta la quinta y cuarta respectivamente para 12%.

Estos resultados se pueden asociar al proceso en que cada una de las cepas se vió involucrada, ya que aunque se trate de la misma bebida, cada productor varía las condiciones de trabajo para obtener productos con ligeras variaciones entre ellos, entre estas variaciones se incluye el % de etanol. Sin embargo el mezcal no presenta más allá de 10% de etanol por lo que la sobrevivencia en 15% indica que las cepas están bien adaptadas

a las condiciones más adversas. Estos resultados son semejantes a los de Arias (2008) donde se reflejó que las cepas de pulque, tequila y tepache también pueden crecer hasta 15% de etanol en la mayoría de los casos, mientras que los reportados por Belloch-Orlic *et al.* (2007) difieren un poco ya que en este caso la mayoría de las cepas estudiadas no son capaces de crecer en 15%, dichas cepas fueron aisladas en su mayoría de cerveza, suelos y uvas. Esto refleja que existen semejanzas entre las bebidas tradicionales mexicanas.

Estas diferencias encontradas entre las cepas puede relacionarse con la composición de lípidos en la pared celular siendo la presencia de ácidos grasos insaturados la más importante; esto fue corroborado por Santiago (2010) donde se determinó la composición de ácidos grasos en las células con mayor resistencia a alcohol y se observó que aquellas cepas con mayor resistencia presentan un contenido más elevado de ácido palmitoleico.

### 8.3.6 Selección de la mejor cepa

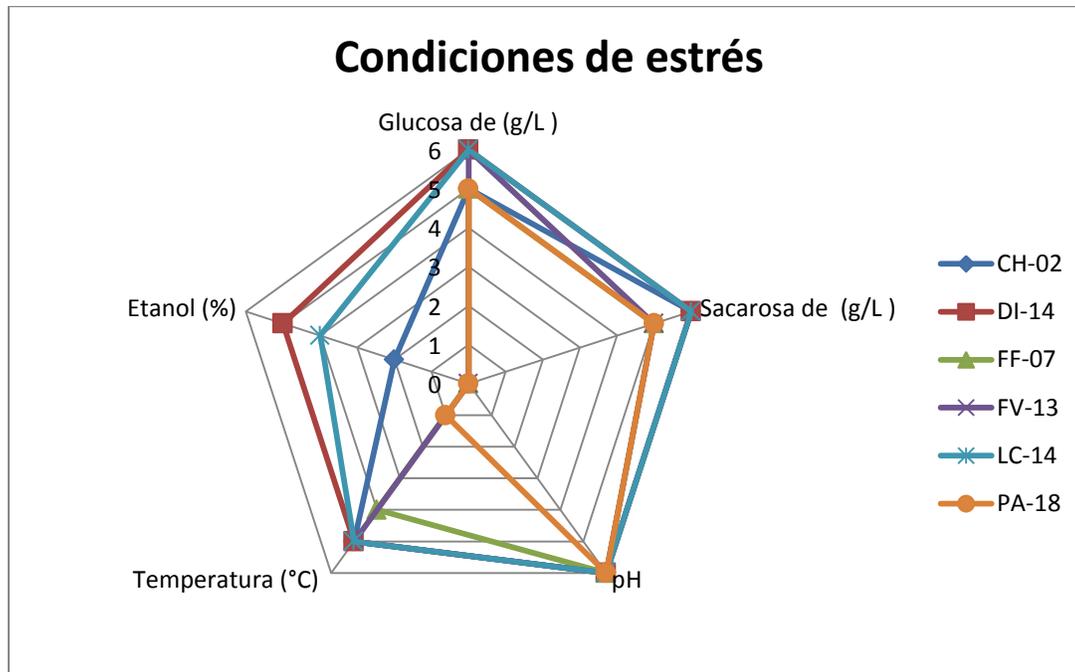


Figura 5. Comparación de todas las cepas a las 5 condiciones de estrés establecidas. En esta gráfica sólo se presentan las condiciones más extremas: concentración de glucosa 300g/L, concentración de sacarosa 200g/L, pH 2.8, temperatura de 45°C y 15% de etanol.

La figura 5 facilita la comparación para poder determinar cuál es la mejor cepa para la fabricación de mezcal tomando únicamente los parámetros de tolerancia como fundamento de decisión; cabe destacar que para determinar cuál es la mejor cepa de manera más completa sería interesante conocer sus capacidades fermentativas.

Como se aprecia en la figura 5 la cepa seleccionada como la mejor es DI-14 siendo su resistencia a etanol el factor decisivo ya que LC-14 presenta un comportamiento muy similar sin embargo tolera menos el etanol. Por otro lado, PA-18 presenta la peor capacidad de tolerancia a los diferentes estreses sometidos ya que en todas las condiciones con excepción de pH muestra la menor capacidad adaptativa siendo la tolerancia a temperatura y etanol las más evidentes. Es importante conocer el comportamiento de las cepas ya que así podemos determinar y predecir su sobrevivencia a lo largo de la fermentación.

## 9. CONCLUSIONES

- ♣ Se identificaron como *Saccharomyces cerevisiae* a treinta cepas de levaduras de mezcal provenientes de diferentes municipios de la región mezcalera de Oaxaca; utilizando el método de PCR-RFLP enfocado en la región 5.8S-ITS.
- ♣ Se identificaron como *Kluyveromyces marxianus* a 7 cepas de levaduras de mezcal provenientes de diferentes municipios de la región mezcalera de Oaxaca; utilizando el método de PCR-RFLP enfocado en la región 5.8S-ITS
- ♣ Se reagruparon las cepas utilizadas ya que la clasificación previa utilizando la región D1 y D2 del gen ribosomal 26S era incorrecta debido a que agrupaba como iguales cepas que con PCR-RFLP enfocado en la región 5.8S-ITS se pudieron establecer como diferentes.
- ♣ Se demostró que las 6 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas pueden tolerar y crecer en 200, 250 y 300 g/L de glucosa y 100, 150 y 200 g/L de sacarosa.
- ♣ Se demostró que el pH de ácido 2.8 no es una condición que afecte el crecimiento celular de las *Saccharomyces cerevisiae*.
- ♣ La temperatura y el % de etanol son los dos factores que presentan mayor impacto celular, ya que la tolerancia a estas dos condiciones generó los resultados más variables. Las 6 cepas seleccionadas fueron capaces de crecer a 45°C y a 12% de etanol.
- ♣ La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que presentó la mejor tolerancia a las condiciones de estrés aquí estudiadas fue DI-14 y la que presenta la peor tolerancia fue PA-18.
- ♣ Las cepas de mezcal aisladas de diferentes regiones y tipos de proceso presentaron diferencias en sus tolerancias a las condiciones de estrés sometidas.

## 10. PERSPECTIVAS

El estudio de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de mezcal resulta muy interesante ya que es un tema poco estudiado, ya que la mayoría de estudios en bebidas alcohólicas son llevados a cabo en vino y cerveza.

Dentro de los objetivos a futuro se pueden encontrar:

- Aumentar el número de cepas de estudio lo cual permitiría incluir cepas de todos los municipios involucrados para poder conocer las diferencias entre ellas y establecer diferencias o similitudes por región.
- Incluir además de las condiciones de estrés estudiadas, condiciones de estrés simultáneas como estrés a pH y temperatura, estrés a temperatura y % de etanol, estrés osmótico y % de etanol, eso permitiría conocer de manera más real la capacidad de tolerancia de las cepas y su adaptación en un ambiente más similar al de una fermentación.
- Realizar una tipificación molecular de las cepas de trabajo para saber si las cepas que presentan diferencias en las tolerancias presentan diferencias a nivel genético, ya que esto es un parámetro de control de calidad a nivel industrial.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Albertyn, J., Hohmann, S., & Prior, B. A., 1994. Characterization of the osmotic-stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently, *Current Genetics*, 25: 12–18.

Andrade, O., 2006. Identificación de levaduras por medio de PCR-RFLP e la región RNAr 5.8S-ITS aisladas durante la fermentación de mezcal de la región de Sola de Vega Oaxaca. Tesis de M.C. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química

Arias, J., 2008. Diversidad genética en las especies del complejo *Saccharomyces sensu stricto* de fermentaciones tradicionales. Tesis de Doctorado Universidad de Valencia. Facultad de Ciencias biológicas. Departamento de Genética

Arratia, J. 2009. Diversidad genética de levaduras involucradas en la fermentación del mezcal tamaulipeco. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica

Badotti, F., Belloch, C., Rosa, C. a., Barrio, E., & Querol, A. 2009. Physiological and molecular characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* cachaça strains isolated from different geographic regions in Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 579–587.

Bakalinsky, A.T. & Snow, R. 1990 The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6: 367-382.

Barnett, J., 2004. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyenex Reess: A short review for non-taxonomists. *Yeast*, 8:1-23.

Barre P., Vézinhel F., Dequin S. y Blondin B. 1993. Genetic improvement of wine yeast.: Fleet G.H., ed., *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, Singapore, pp. 421-447.

Bauer, F.F. and Pretorius, I.S. 2000 Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine - a review . *South African Journal of Enology and Viticulture* 21: 27-51.

Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E., & Querol, A. 2008. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *International journal of food microbiology*, 122(1-2), 188–95.

Belloch, C., Querol, a, García, M. D., & Barrio, E. 2000. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(1), 405-16.

Blomberg, a, & Adler, L. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 171(2), 1087–92.

Boekhout T, Kutzman C. 1996. Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. En: Wolf K (Eds.) *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook*. Berling, Germany: 1-81.

Booth, I.R., and Statford, N. 2003. Acidulants and low pH. In Food Preservatives. Russel N, Gould G, eds. (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York), pp 25–48.

Brown, M.H. y Mayes, T. 1980 The Growth of microbes at low pH values. En: Microbial growth and survival in extremes of environment. Gould, G.W. y Corry, J.E.L. (eds.) Ed. Academic Press. Estados Unidos. 71-98 pp.

Cai, J., & Roberts, I. 1996. Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene. *International journal of systematic bacteriology*, 46(2), 542-549.

Carmelo, V., Santos, H., and Sa-Correia, I. (1997). Effect of extracelular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1325, 63–70.

Cha, R. S., & Thilly, W. G. 1993. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR methods and applications Genome Research*, 3(3), 18-29.

Chatterjee, M. T., Khalawan, S. a, & Curran, B. P. 1997. Alterations in cellular lipids may be responsible for the transient nature of the yeast heat shock response. *Microbiology (Reading, England)*, 143 ( Pt 9)(1 997), 3063–8.

Codón,A.C. & Benítez,T. 1995 Variability of the physiological features and of the nuclear and mitochondrial genomes of baker's yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 18:343-352.

Corkill, G., & Rapley, R. 2008. The manipulation of nucleic acids. Basic Tools and Techniques. En J.M.Walker y R.Rapley eds *Molecular Methods Handbook*. Hertfordshire:Human Press, pp 3-15

Cova, C., 2010. Caracterización molécula de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* , aisladas de la fermentación de mezcal pulque y tequila . Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química

Dujon,B., Sherman,D., Fischer,G., Durrens,P., Casaregola,S., Lafontaine, I. 2004 Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35-44.

Dan, Y., Ugozzoli, L., Bijay, K., & Wallace, R. B. 1991. The Effect of Temperature and Oligonucleotide Primer Length on the Specificity and Efficiency of Amplification by the Polymerase Chain Reaction Enzymatic, *DNA and Cell Biology* 10(3), 233-238.

Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial (2011). Monografía del Mezcal.

Escalante-Minakata, P., Blaschek, H. P., Barba de la Rosa, a P., Santos, L., & De León-Rodríguez, a. 2008. Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in applied microbiology*, 46(1999)

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International journal of systematic bacteriology*, 49 (1), 329-37.

Fay, J.C. and Benavides, J.A. 2005 Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genet.* 1: 66-71.

Fleet, G., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11-22.

Fernández-Espinar, M., Martorrel, P., De Llanos, R. Querol, A., 2006. Capítulo 3. Molecular Methods to Identify and characterize yeast in food and beverages. Vol. 2, en: *The yeast Handbook vol. 2 Yeast in food and beverages.*, por A. Querol and G. Fleet, Germany: Springer-Verlag, 56-82

Fernández-Espinar, M. T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, a, & Barrio, E. 2000. 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(1), 87-97.

Folch-Mallol, J., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Robles, A., 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46(1), 24-46.

Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P. R., Powell, C. D., & Smart, K., 2007. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS microbiology reviews* 31, pp. 535-69

Granich, C. I., Giovannucci, D., & Bautista, C. 2009. La Dinámica Territorial de la Zona Mezcalera de Oaxaca Entre la Cultura y el Comercio

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B. y Feldmann, H. 1996. Life with 6000 Genes. *Science* 274: 546-567.

Hoff, J. W. 2012. Molecular Typing of Wine Yeasts : Evaluation of Typing Techniques and Establishment of a database. Stellenbosch University. Faculty of AgriScience

Innis M.S. y Gelfand D.H. 1990. Optimization of PCRs **En** Innis M.S., Gelfand D.H., Snisnsky J.J. y White T.J. eds. *PCR Protocols: a guide to methods and application*. New York: Academic Press, pp 3-12

Kapteyn, J. C., Ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H., & Klis, F. M. (2001). Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Molecular microbiology*, 39(2), 469–79.

Kobayashi, N. & K McEntee. 1990. Evidence for heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6550-6554.

Kurtzman, C., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 3, 417-432.

Kurtzman, C., Robnett, C.J., 2003. Phylogenetic relationships among yeast of the *Saccharomyces complex* determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research*, 7, 331-371

Lappe, P., Moreno, R., Arrizón, J., Herrera, T., García, A., Gschaedler, A., 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1037–1052.

Leao C & Van Uden N., 1984. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 774: 43–48.

Martínez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. & F. Estruch. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J*. 15:2227-2235.

Mira, N. P., Teixeira, M. C., & Sá-Correia, I. 2010. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. *Omics: a journal of integrative biology*, 14(5), 525–40.

Nolasco H., 2011 en proceso. Caracterización de la fermentación y la destilación en el proceso de producción del mezcal. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química

Orberá, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21, 15-19.

Pham, T., Wimalasena, T., Box, W. G., Koivuranta, K., Storgårds, E., Smart, K. a., y Gibson, B. R. 2011. Evaluation of ITS PCR and RFLP for Differentiation and Identification of Brewing Yeast and Brewery “Wild” Yeast Contaminants. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(4), 556–568.

Piper, P. W. 1993. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 11(4), 339–55.

Piper, P., Calderon, C. O., & Hatzixanthis, K., 2001. REVIEW ARTICLE Weak acid adaptation : the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives, *Microbiology* 147:2635–2642. ( Piper et al., 2001)

Pretorius,I.S. 2000 Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches tothe ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.

Querol,A., Fernández-Espinar,M.T., del Olmo,M., and Barrio,E. 2003 Adaptative evolution of wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 3-10.

Rainieri, S., Zambonelli, C., Kaneko, Y.,2003. *Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetics diversity and evolution. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96,1-9.

Riedel, K. H., Wingfield, B. D. y Britz, T. J. 1992. Combined influence of magnesium concentration and polymerase chain reaction specificity enhancers. *FEMS microbiology letters*, 71(1), 69-72.

Salgueiro SP, Sa-Correia I y Novais JM., 1988. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Appl Environ Microbiol* 54: 903–909.

Salvatierra García, A. 2003. El mezcal y su importancia para el desarrollo económico del estado de Oaxaca. El sector exportador: retos y oportunidades en el mercado de la Unión Europea. Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Relaciones Internacionales e Historia, Escuela de Ciencias Sociales.

Santiago J., 2010. Optimización de un medio de cultivo a base de pulpa de mango para la producción de etanol empleando levaduras aisladas de una bebida fermentada. Tesis de Maestría Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

Schuller G, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC & Ruis H., 1994. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J.* 13: 4382–4389.

Serra, A., Strehaiano, P., Taillandier, P., 2005. Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *International Journal of Food Microbiology* 104, 257–265.

Stanley, D., Bandara, a, Fraser, S., Chambers, P. J., & Stanley, G. a., 2010. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of applied microbiology*, 109(1), 13–24.

Tao, W., Deschenes, R.J., & J.S. Fassler. 1999. Intracellular glicerol levels modulate the activity of Sln1p, a *Saccharomyces cerevisiae* two-component regulator. *J Biol Chem.* 274(1):360-367.

Thevelein, J.M., 1992. The RAS-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 62, 109-130.

Verdugo Valdez, a, Segura Garcia, L., Kirchmayr, M., Ramírez Rodríguez, P., González Esquinca, a, Coria, R., & Gschaedler Mathis, a. 2011. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(4), 497–506.

Warth, A.D. 1991. Effect of benzoic acid on glycolytic metabolite levels and intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 57, 3415–3417.

Wiederrecht G, S. D., & C.S. Parker. 1988. Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell* 54(6):841-53.

Werner-Washburne, M. B., J., Kusic-Smithers, J. & E.A. Craig., 1989. Yeast HSP70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *Journal of Bacteriology* 171:2680-2688.

Werner-Washburne M., B. E., Johnston G.C., & R.A, Singer. 1993. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* 57:383-401.