



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A DIVERSAS CONDICIONES DE  
ESTRÉS Y DETERMINACIÓN DE LAS DIFERENCIAS A NIVEL  
MOLECULAR DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* AISLADAS DE  
PALENQUES DE MEZCAL EN EL ESTADO DE OAXACA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**PAULINA NAYELI MARTÍNEZ ZEPEDA**



**MÉXICO, D.F.**

**2014**



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: RODOLFO PASTELIN PALACIOS**

**VOCAL: AURORA IRMA ORTEGON AVILA**

**SECRETARIO: FRANCISCO RUIZ TERAN**

**1er. SUPLENTE: GLORIA DIAZ RUIZ**

**2° SUPLENTE: ROSALBA ESQUIVEL COTE**

**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 TERAN**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: PAULINA NAYELI MARTÍNEZ ZEPEDA**

\_\_\_\_\_

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>6</b>
2.1. Aspectos generales del mezcal.....	6
2.1.1. Proceso de elaboración del mezcal.....	9
2.2. Aspectos generales de las levaduras.....	12
2.3. Características de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	13
2.3.1. Metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	15
2.3.2. Constitución genética de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
2.4. Adaptación de las levaduras al ambiente y respuestas al estrés.....	17
2.4.1. Estrés osmótico (glucosa y sacarosa).....	18
2.4.2. Estrés por etanol.....	19
2.4.3. Estrés por pH ácido.....	21
2.4.4. Estrés por alta temperatura.....	21
2.5. Métodos moleculares para identificación de levaduras.....	22
2.5.1. Métodos para diferenciar a nivel cepa.....	23
2.5.1.1. Métodos basados en la técnica de PCR.....	23
2.5.1.1.1. Fragmentos $\delta$ .....	24
2.5.1.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	26
2.5.1.2.1. CHEF.....	29
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVO.....</b>	<b>31</b>
4.1. Objetivo General.....	31
4.2. Objetivos Particulares.....	31
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>31</b>
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>32</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
7.1. Cepas de estudio.....	33
7.2. Reconstitución de cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas de fermentaciones de mezcal.....	33
7.3. Tolerancia a diversas condiciones de estrés.....	34
7.3.1. Preparación de medios de cultivo.....	34
7.3.2. Pruebas de tolerancias para cada cepa de <i>S. cerevisiae</i> .....	34
7.4. Análisis molecular de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> .....	35
7.4.1. Extracción de ADN de las cepas de levadura.....	35

7.4.2. Cuantificación de ADN por espectrofotometría.....	36
7.4.3. Análisis de los fragmentos $\delta$ .....	37
7.4.4. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).....	38
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
8.1. Pruebas de tolerancia a diferentes condiciones de estrés.....	40
8.1.1. Tolerancia a glucosa y sacarosa.....	40
8.1.2. Tolerancia al etanol.....	45
8.1.3. Tolerancia a pH 3.....	48
8.1.4. Tolerancia a altas temperaturas.....	49
8.2. Selección de la cepa con mayor tolerancia a estrés.....	52
8.3. Análisis molecular de las cepas de levaduras.....	53
8.3.1. Análisis de fragmentos $\delta$ .....	53
8.3.2. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).....	56
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>62</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>63</b>
<b>12. ANEXO.....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distritos que integran la región del mezcal en Oaxaca, México (Granich <i>et al.</i> , 2009).....	<b>8</b>
<b>Figura 2.</b> Proceso de elaboración del mezcal.....	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Métodos para diferenciar a nivel cepa basados en la amplificación por PCR (Fernández-Espinar <i>et al.</i> , 2006).....	<b>24</b>
<b>Figura 4.</b> Técnica de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (Fernández-Espinar <i>et al.</i> , 2006).....	<b>27</b>
<b>Figura 5.</b> Dibujos esquemáticos que muestran geometrías de electrodos en los instrumentos comúnmente utilizados para la electroforesis en gel de campo pulsado (Nassonova, 2008).....	<b>28</b>
<b>Figura 6.</b> Campo pulsado eléctrico homogéneo en un instrumento CHEF (Nassonova, 2008).....	<b>29</b>
<b>Figura 7.</b> Estrategia experimental para establecer las diferencias o semejanzas de cepas de <i>S. cerevisiae</i> procedentes de fermentaciones naturales de mezcal.....	<b>32</b>

<b>Figura 8.</b> Comparación morfológica de las colonias de levaduras correspondientes a las cepas DH-1 (superior de la caja Petri) y DH-2 (inferior de la caja Petri) en agar YPD con 20% de sacarosa (lado izquierdo) y 25% de glucosa (lado derecho).....	<b>42</b>
<b>Figura 9.</b> Amplificación de los fragmentos $\delta$ mediante PCR empleando los cebadores $\delta 12$ y $\delta 21$ .....	<b>53</b>
<b>Figura 10.</b> Agrupamiento de cepas por similitud en el patrón de fragmentos $\delta$ .....	<b>55</b>
<b>Figura 11.</b> Imagen del gel obtenido por PFGE de las cepas 1 a la 11.....	<b>57</b>
<b>Figura 12.</b> Imagen del gel obtenido por PFGE de las cepas 12 a la 21.....	<b>58</b>
<b>Figura 13.</b> Perfil de separación de los cromosomas de <i>S. cerevisiae</i> (YNN295 Bio-Rad).....	<b>58</b>
<b>Figura 14.</b> Agrupamiento de cepas por similitud en el patrón de PFGE.....	<b>59</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Especificaciones físicas y químicas del mezcal. Fuente: NOM-070-SCFI-1994.....	<b>7</b>
<b>Tabla 2.</b> Cepas de levaduras provenientes de diferentes municipios del estado de Oaxaca.....	<b>33</b>
<b>Tabla 3.</b> Crecimiento de las cepas de levaduras en medio de cultivo agar YPD con diferentes concentraciones de glucosa y sacarosa.....	<b>44</b>
<b>Tabla 4.</b> Crecimiento de las cepas de levaduras en medio de cultivo agar YPD con diferentes concentraciones de etanol.....	<b>47</b>
<b>Tabla 5.</b> Crecimiento de las cepas de levaduras en medio de cultivo agar YPD con pH 3 y en agar YPD a distintas temperaturas.....	<b>51</b>
<b>Tabla 6.</b> Tamaño (pb) de los fragmentos $\delta$ obtenidos por PCR para las cepas 1 a la 11.....	<b>54</b>
<b>Tabla 7.</b> Tamaño (pb) de los fragmentos $\delta$ obtenidos por PCR para las cepas 12 a la 21.....	<b>54</b>

## RESUMEN

El mezcal es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras. El proceso de producción se realiza de manera artesanal empleando cepas de levaduras nativas de cada región productora, estos microorganismos juegan un papel muy importante en la fermentación, generando etanol y metabolitos secundarios que le dan las características sensoriales a la bebida.

En este proyecto de investigación se trabajó con 21 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas previamente de mostos de *Agave* de diferentes regiones productoras de mezcal del estado de Oaxaca, México. El estudio consistió en evaluar el comportamiento de las cepas a diversas condiciones de estrés, tales como estrés osmótico, tolerancia a etanol, altas temperaturas, así como también a un pH ácido. Encontrándose que, en general, todas las cepas toleraron las altas concentraciones de azúcar, sin embargo, sólo 3 de ellas demostraron una rápida recuperación ante el estrés por etanol. Por otro lado, únicamente 2 cepas toleraron temperaturas de 42°C, mientras que el pH de 3 no resultó ser una condición de estrés para ninguna cepa. Estas características de tolerancias a diversos factores ambientales se relacionan con el hábitat natural de donde las cepas se aislaron, es decir un ambiente selectivo característico del proceso de producción del mezcal.

La diferenciación de *S. cerevisiae* a nivel de cepa se hizo mediante pruebas moleculares empleando los métodos de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y análisis de los fragmentos  $\delta$ . Identificándose 18

grupos que corresponden a 18 cepas, donde 3 de los grupos presentaron 100% de similitud. Estos resultados sugieren que durante la fermentación del mezcal existen diversas cepas de *S. cerevisiae* que podrían estar contribuyendo de manera significativa en la producción de compuestos característicos del mezcal de cada región.

## 1. INTRODUCCIÓN

La palabra Mezcal tiene su origen en vocablos de la lengua náhuatl. Algunos sostienen que deriva de mexcalli (metl o meztli, significa maguey, y de ixcalli, cocer). La traducción sería entonces maguey cocido (SNMM, 2005).

Cada mezcal es diferente, no sólo por la especie de agave del cual proviene, sino por el proceso que se sigue al elaborarlo (herramientas, materiales, tiempos y temperaturas). Quizá ninguna otra bebida espirituosa del mundo derive sus sabores distintivos de tan amplia diversidad natural y cultural (Granich *et al.*, 2009).

Muchos de los procesos de producción de bebidas alcohólicas destiladas de agave involucran una fermentación compleja en la que bacterias (lácticas y acéticas) y levaduras (*Saccharomyces* y no *Saccharomyces*) están presentes en poblaciones mixtas estables o desplazándose unas a otras. Esta microbiota es responsable de la producción de varios compuestos químicos y volátiles que confieren las características particulares al producto final (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

Dentro de la comunidad de microorganismos presente en los mostos de mezcal, *Saccharomyces cerevisiae* es 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 (Zavala-Nacul, 2013). Una caracterización fenotípica y genotípica detallada de la microbiota debe llevarse a cabo con el fin de conservar esta biodiversidad específica y posteriormente evaluar su potencial como cultivos iniciadores y en la producción de diferentes compuestos químicos de importancia biotecnológica (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

Controlar el crecimiento y la actividad de las levaduras que alteran los alimentos y bebidas requiere una buena comprensión de su fisiología, bioquímica y respuestas genéticas. Conocer los factores que afectan el crecimiento y la supervivencia de la levadura, y saber cómo puede responder a estos factores, son puntos particularmente importantes en los niveles prácticos de control de calidad y seguridad. Para la mayoría de las levaduras, los límites de crecimiento y supervivencia, y la cinética de inactivación de los parámetros tecnológicos básicos, tales como temperatura, pH, concentración de azúcar y concentración de sales o minerales, no están bien definidos, y requieren mayor cuidado e investigación sistemática (Fleet, 2006).

Cada región del país cuenta con diferentes tipos de clima, por lo que el suelo para el cultivo cuenta con características distintas en cuanto a humedad, temperatura, disponibilidad de nutrientes y sales; estos factores abióticos seleccionan a los microorganismos en el ambiente. A lo largo del proceso de fermentación las levaduras se ven afectadas por una serie de condiciones de estrés que atacan su viabilidad y su eficiencia en la fermentación. Entre las condiciones de estrés, las más relevantes son la alta concentración de azúcar y bajo pH del mosto, la temperatura y, conforme la fermentación avanza, la acumulación de etanol (Belloch *et al.*, 2008).

La identificación y clasificación de las levaduras se ha realizado empleando métodos tradicionales basados en sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Sin embargo, las características morfológicas y fisiológicas pueden variar dependiendo de las condiciones de cultivo, por lo que los resultados obtenidos tienen un cierto grado de incertidumbre. La reproducibilidad de estas técnicas es cuestionable pues en muchos casos dependen del estado fisiológico de la levadura. Además, estos procedimientos requieren de un gran número de

ensayos, lo cual implica una gran inversión de tiempo y recursos. Una alternativa al uso de los métodos tradicionales de identificación de microorganismos son las técnicas moleculares, las cuales se basan en el análisis de los ácidos nucleicos, independientemente del estado fisiológico de la levadura, dejando en segundo plano el análisis de rasgos fenotípicos y así es posible caracterizar a los microorganismos a nivel de género y especie (Cova-Pérez, 2010; Zavala-Nacul, 2013).

Este trabajo tiene por objetivo evaluar la capacidad de 21 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de mostos de mezcal, para crecer y tolerar diversas condiciones de estrés, así como determinar las diferencias existentes a nivel molecular.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Aspectos generales del mezcal**

El mezcal es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible de ser enriquecido, para el caso del Mezcal tipo II, con hasta en 20% de otros carbohidratos en la preparación de dichos mostos, siempre y cuando no se eliminen los componentes que le dan las características a este producto, no permitiéndose las mezclas en frío (SECOFI, 1994).

El mezcal se define de acuerdo a la norma como un líquido de olor y sabor original de acuerdo a su tipo. Es incoloro o ligeramente amarillento cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble blanco o encino, o cuando se aboque (adición de uno o más productos naturales, saborizantes o colorantes permitidos en las disposiciones legales correspondientes para suavizar su sabor) sin reposarlo o añejarlo (SECOFI, 1994; Sectorial, 2011).

En 1997 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994 para el mezcal, con el objetivo de establecer características y especificaciones a cumplir para elaborar y comercializar la bebida. Dentro de la Norma se consideran aspectos como campo de aplicación (especies de *Agaves* reconocidos para la elaboración del mezcal), clasificación (considerando mezcales 100% agave y otros de preparación 80% agave - 20% otros azúcares), especificaciones (marcando máximos y mínimos de % de alcohol volumen, extracto seco, acidez, alcoholes superiores y metanol) y

condiciones para su comercialización al interior del país y en el extranjero (SNMM, 2005 en Granich *et al.*, 2009).

El producto objeto de esta NOM debe cumplir con las especificaciones físicas y químicas establecidas en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Especificaciones físicas y químicas del mezcal. Fuente: NOM-070-SCFI-1994.

Especificaciones	Mínimo	Máximo
% de alcohol en volumen a 20°C	36.0	55.0
Extracto seco g/L	0.2	10.0
Miligramos por 100 centímetros cúbicos referidos a alcohol anhidrido		
Acidez total (como ácido acético)	0.0	170.0
Alcoholes superiores mg/100 mL	100.0	400.0
Metanol mg/100 mL	30.0	300.0

En 1995 el mezcal obtuvo la DENOMINACIÓN DE ORIGEN, registrada ante la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) con sede en Ginebra, Suiza. La declaratoria de Denominación de Origen del Mezcal emitida por el Instituto Mexicano para la Propiedad Industrial (IMPI) en 1997, y modificada posteriormente, ampara la elaboración de la bebida en ocho estados de la República que son: Oaxaca, Guerrero, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, ampliándose esta protección al municipio de San Felipe Guanajuato (DOF del 21 de noviembre de 2001), posteriormente a 11 Municipios del Estado de Tamaulipas (DOF del 3 de marzo de 2003) y actualmente a 29 Municipios del Estado de Michoacán (DOF del 22 de noviembre de 2012). Entre éstos estados, destaca Oaxaca por la importancia que tiene su inventario de agave, por su extenso padrón de productores de agave y de mezcal, por sus altos volúmenes de producción y envasado de mezcal, y por la presencia del mezcal en el mercado regional, nacional e internacional (PRE, 2004; Granich *et al.*, 2009; CRM, 2014).

En Oaxaca, se particularizó la zona denominada “Región del Mezcal” (Figura 1) que comprende los distritos de: Zimatlán, Ocotlán, Tlacolula (donde está Santiago Matatlán), Yautepec, Ejutla, Miahuatlán y Sola de Vega (Salvatierra-García, 2003). Sea como sea que se considere la geografía del mezcal, el corazón de la bebida es Oaxaca.



**Figura 1.** Distritos que integran la región del mezcal en Oaxaca, México. (Granich et al., 2009).

México cuenta con cerca de 200 especies de agave, de las cuales, actualmente sólo unos 12 a 15 son agaves mezcaleros. Cada mezcal está asociado a una especie de agave y a una región campesina (Sectorial, 2011). En el estado de Oaxaca se han identificado 23 especies y variedades de agaves cultivados y silvestres que son empleados en la fabricación del mezcal; de las 5 más importantes, destaca el agave “Espadín” (*Agave angustifolia Haw*) al acumular casi el 60% del inventario de agave de la Región del Mezcal (PRE, 2004).

Los productores de mezcal de los distritos de Yautepec y Tlacolula utilizan en un 80% el agave “Espadín”, en tanto que los productores de Ejutla, Miahuatlán y Sola de Vega, por costumbre ó por la insuficiencia de una misma especie, mezclan diferentes agaves mezcaleros (Espadín,

Arroqueño, Cirial, Tepextate, Madrecuishe, etc.), así, en el mismo palenque los lotes de mezcal procedentes de hornadas diferentes tienen características y calidades diversas, según la temporada de producción, que satisfacen los gustos y costumbres de los consumidores locales (PRE, 2004).

### **2.1.1. Proceso de elaboración del mezcal**

La producción de mezcal es artesanal y por lo tanto varía de región en región. Sin embargo, se determina un proceso más o menos homogéneo que, como se observa en la Figura 2, sigue las siguientes etapas: 1) cultivo y cosecha; 2) selección de la materia prima más adecuada; 3) corte de las piñas; 4) traslado al palenque; 5) cocimiento; 6) molienda; 7) fermentación; 8) destilación; y 9) envasado (Salvatierra-García, 2003).



**Figura 2.** Proceso de elaboración del mezcal.

El proceso de elaboración de mezcal inicia con el cultivo del maguey. El agave tarda entre 8 y 10 años para estar "en su punto", es decir que cumple con las características adecuadas para su transformación. El productor realiza la selección del maguey considerando el grado de madurez, el cual se encuentra relacionado con la edad, eligiéndose aquellas plantas que están por iniciar o que se encuentran en el inicio de su etapa reproductiva. Posteriormente se cortan las pencas y raíces hasta dejar el centro del maguey al descubierto, a esta forma del maguey se le conoce comúnmente como piña. Las piñas son trasladadas a los palenques, que son las fábricas de mezcal, generalmente situados cerca de las plantaciones. Después las piñas son cocidas. Para esta operación se prepara el horno prendiendo leña en su interior y colocando inmediatamente piedra de mediano tamaño encima de la leña formando un montículo, una vez que se alcanza la máxima temperatura y que ya no hay emanaciones de humo (de 6 a 10 horas del inicio de la quema) el horno está listo, se colocan las piñas, se cubren con bagazo húmedo y tierra. Antes de meterlas al horno de piso, las piñas se pican con golpes de hacha para que se facilite su cocción. El horneado tiene una duración aproximada de tres días para lograr la plena cocción. Al terminar esta fase, el agave cambia de color blanco a caramelo, lo que indica la hidrólisis de los almidones contenidos en el maguey maduro y su conversión en azúcares como fructosa. Luego del horneado del maguey, se realiza la molienda, la cual facilita la fermentación de los azúcares contenidos en el maguey y se realiza de 3 maneras: macerado a mano, machacado en una tahona (molino que funciona por la fuerza de caballos o mulas), o en una desgarradora apoyándose además con una prensa. Al terminar la molienda se obtiene el jugo llamado mosto y el bagazo; el mosto es depositado o bombeado a las tinas de fermentación. La fermentación se realiza en tinas de madera, pilas forradas de madera o en tanques de acero inoxidable. En los palenques

de la Región del Mezcal, la fermentación del maguey cocido y molido se efectúa sin control de temperatura y concentración de azúcares. Se distinguen dos formas de fermentación: la natural y la inducida o acelerada; la primera es una fermentación espontánea que se basa sólo en las levaduras contenidas de manera natural en las "piñas" y puede requerir de hasta 30 días para alcanzar su óptimo. La segunda emplea aceleradores de la fermentación como el sulfato de amonio o la urea como fuentes de nitrógeno acortando el tiempo requerido para la fermentación de 2 a 5 días según las cantidades empleadas. En la fermentación se logra la conversión a etanol de los azúcares contenidos en el mosto. Al jugo fermentado se le conoce como mosto muerto y tiene un contenido de alcohol entre 6 y 7% (v/v). Al finalizar el proceso de fermentación, los mostos cocidos llamados "tepache" se pasan a los alambiques para llevar a cabo la destilación. Ésta se realiza con la presencia de bagazo y con el empleo de equipos de fabricación artesanal hechos completamente de cobre, equipos de ollas de barro con partes de cobre y/o fierro, equipos hechos de barro en su totalidad o alambiques de acero inoxidable. En esta operación se efectúa la separación de los alcoholes, aprovechando para ello sus diferentes puntos de ebullición. Al producto obtenido se le conoce como mezcal de primera destilación. La homogeneización está referida a la redestilación de la porción del mezcal de baja graduación, el equipo a utilizar es el mismo que en el proceso de destilación y el procedimiento es muy parecido. En esta etapa se destila por segunda vez el mezcal, con la finalidad de aumentar su graduación alcohólica; una vez efectuada la redestilación se procede al ajuste del grado alcohólico ubicándolo entre el 36 a 55% de alcohol en volumen a 20°C de acuerdo a la NOM del mezcal, empleando para ello la "venencia" (carrizo ahuecado con una perforación en su extremo inferior) con la cual se succiona con la boca el mezcal para dejarlo caer en una jícara y así observar la formación del

“cordón” o “perlado” cuya persistencia indica la graduación alcohólica. Entonces la bebida esta lista para envasarse según las marcas de los productores. Las plantas envasadoras presentan características diversas, desde el envasado manual, hasta las semiautomáticas. Éstas ayudan a llevar un adecuado control de la calidad del mezcal, sin embargo, existe también el mezcal a granel, que es más para consumo local o también los pequeños productores que no tienen marcas registradas y envasan su mezcal en recipientes de vidrio o de barro negro de forma totalmente manual (Salvatierra-García, 2003; PRE, 2004; Sectorial, 2011).

## **2.2. Aspectos generales de las levaduras**

Las levaduras, que están distribuidas en varios materiales ricos en azúcar, como jugos de frutas y néctar, pueden llevar a cabo los dos tipos opuestos de metabolismo quimiorganótrofo, la fermentación y la respiración. Cuando el oxígeno está presente, las levaduras crecen eficazmente sobre el azúcar formando biomasa y CO<sub>2</sub> (derivado del ciclo de ácido cítrico). Sin embargo, en condiciones anóxicas las levaduras cambian a un metabolismo fermentativo que origina menor cantidad de biomasa celular pero cantidades notables de etanol y CO<sub>2</sub>. La concentración de oxígeno en el medio tiene una relación inversamente proporcional a la productividad específica de etanol, lo cual se conoce como efecto Pasteur (García-Garibay *et al.*, 2004; Madigan *et al.*, 2009).

Las levaduras pueden crecer en medios simples que contengan carbohidratos fermentables (fuentes de carbono incluidos monosacáridos como D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, D-galactosa y la pentosa D-xilulosa, pero no otras pentosas) para generar energía y “esqueletos de carbono” para biosíntesis, nitrógeno adecuado para

síntesis de proteínas, y sales minerales (Priest y Campbell, 1996). Todas las especies fermentan D-glucosa, D-fructosa y D-manosa, y por lo general también otros azúcares; ninguna de las especies utiliza nitrato como fuente de nitrógeno (Barnett, 1992).

Las levaduras juegan un papel importante en la producción de bebidas alcohólicas típicas de México (tequila, mezcal, sotol, bacanora y raicilla), que son obtenidas de diferentes mostos de agave. La primer parte de este proceso es la transformación con la fermentación de las levaduras del mosto de agave en un producto alcohólico aromático, que luego se destila produciendo cada bebida típica de agave. Entre las levaduras de fermentación, se han reportado a *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces africana*, *Candida magnolia* y *Candida krusei* (Romano *et al.*, 2006).

### **2.3. Características de *Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levadura utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Buitrago-Estrada y Tenjo-Camacho, 2007).

Las células de *Saccharomyces* y de otros ascomicetos unicelulares son normalmente esféricas, ovals o cilíndricas y su división celular normalmente se produce por gemación. En el proceso de gemación, la nueva célula se forma como una pequeña excrecencia de la célula

progenitora; esta yema va engrosándose gradualmente y se acaba separando de la célula progenitora. Algunas levaduras presentan reproducción sexual mediante un proceso en el cual se fusionan dos células de levadura. Dentro de la célula producto de dicha fusión, denominada cigoto, acaban formándose ascosporas (Madigan *et al.*, 2009).

Las células de *S. cerevisiae* pueden existir en forma haploide (vegetativa, con 16 cromosomas), pero en la naturaleza dos células haploides de levadura pueden fusionarse para dar lugar a una célula diploide (con 32 cromosomas). *Saccharomyces* crece vegetativamente como un diploide. *S. cerevisiae* presenta dos formas diferentes de células haploides denominadas tipos de apareamiento; estas formas pueden considerarse análogas a los gametos masculino y femenino. El emparejamiento de tipos de apareamiento opuestos forma una célula diploide. A partir de una sola célula diploide creciendo en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, se forma un asca que contiene cuatro ascosporas, dos de cada tipo de apareamiento (Madigan *et al.*, 2009).

Este microorganismo muestra 5 fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivado en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase lag, la fase logarítmica, el cambio diáuxico, la fase postdiáuxica y la fase estacionaria. La fase lag es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su

resistencia al estrés gradualmente; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticasa (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

### **2.3.1. Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***

El metabolismo describe todas las reacciones enzimáticas que ocurren dentro de la célula y la organización y regulación de aquellas reacciones. Aunque desde el punto de vista bioquímico los aspectos individuales del metabolismo son considerados como vías separadas, en realidad no existen vías aisladas, pero son simplemente partes de todo el proceso metabólico integrado. Cada vía bioquímica consiste en series de reacciones químicas catalizadas por enzimas. Una enzima incrementa la velocidad de una reacción química y permite que la reacción ocurra a valores fisiológicos de temperatura y pH. (Priest y Campbell, 1996). La temperatura óptima de crecimiento de *S. cerevisiae* es entre 28°C y 35°C, cerca de 39°C se presenta pérdida de viabilidad de las células (Buitrago-Estrada y Tenjo-Camacho, 2007).

Las capacidades fisiológicas de las cepas de levadura aisladas de mostos de agave deben tener especial relevancia en la comprensión de los mecanismos implicados en la colonización y la determinación de las condiciones óptimas para mantener buenas fermentaciones. Al principio del proceso, las células de levadura se ven afectadas por el estrés osmótico debido a la alta concentración de azúcar en el mosto, alrededor de 14 al 16% de sacarosa. A medida que la fermentación progresa otras condiciones de estrés se vuelven relevantes como la acumulación de etanol (aproximadamente 7% (v/v) en el final del

proceso de fermentación) y la limitación de nutrientes. Por otra parte, durante el ciclo fermentativo, el estrés debido a las altas temperaturas (hasta 40°C) también afecta a las levaduras. Por lo tanto, el medio ambiente fermentativo tiene una fuerte influencia en la determinación de la diversidad y la resistencia a las condiciones de estrés de las levaduras (Badotti *et al.*, 2010).

Se prefiere la levadura *S. cerevisiae* para la producción de etanol industrial, debido a que es un microorganismo de fermentación eficiente. Este hecho ha permitido la selección de cepas industriales con rasgos adquiridos que las hacen las productoras de etanol superiores, más tolerantes a subproductos de la fermentación y con mayor resistencia al proceso, en comparación con cepas de *S. cerevisiae* adaptadas a las condiciones de laboratorio controladas (Garay-Arroyo *et al.*, 2004).

### **2.3.2. Constitución genética de *Saccharomyces cerevisiae***

Las especies de levadura viven en diferentes nichos ecológicos, pero sus genomas revelan muchas características conservadas (Bolotin-Fukuhara, 2006).

El genoma haploide de la levadura contiene 16 cromosomas dispuestos en 8 pares, cuyo tamaño varía entre 220 y 2352 kpb. El genoma nuclear total de la levadura (excluyendo las mitocondrias y algunos plásmidos y elementos genéticos similares a los virus) es aproximadamente de 13392 kpb. La levadura puede codificar hasta 5800 proteínas, de las cuales sólo 900 parecen esenciales para la viabilidad (Madigan *et al.*, 2009).

## **2.4. Adaptación de las levaduras al ambiente y respuestas al estrés**

Todos los organismos vivos crecen y se desarrollan de manera óptima bajo ciertas condiciones ambientales. Las condiciones de temperatura, humedad, salinidad, etc. en el medio ambiente varían en el espacio y el tiempo alejándose muchas veces de las condiciones óptimas para el crecimiento y reproducción del organismo en cuestión. Esto explica en gran medida la distribución geográfica y estacional de las distintas especies vivientes. El medio ambiente es un factor determinante en la evolución de los organismos, ya que induce la selección de mecanismos que les permiten su supervivencia y adaptación a las condiciones cambiantes de mismo. Para lograr este objetivo los microorganismos han adoptado estrategias que les llevan a modificar su metabolismo, regular su velocidad de crecimiento o modificar sus programas de diferenciación y así sobrevivir en condiciones adversas. Por lo general, durante los periodos de crecimiento activo las células son susceptibles al estrés, mientras que en periodos de fase estacionaria son resistentes (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Las células de levadura se ven sometidas a varios tipos de estrés a medida que las condiciones del medio cambian, tanto en situaciones naturales como durante procesos industriales. Tanto el daño provocado por el estrés como la respuesta de la levadura al mismo, depende del tipo y grado del estrés, y del estado de desarrollo de la levadura al momento en que ocurre el estímulo. Sin embargo, en general, las condiciones adversas a las que se enfrenta este organismo afectan principalmente a las estructuras celulares (por ejemplo las membranas) y a las diferentes macromoléculas, especialmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las cuales sufren modificaciones estructurales que dañan su función. Para hacer frente a estas situaciones desfavorables, la

levadura responde rápidamente sintetizando moléculas que le permiten atenuar o reparar el daño causado por el estrés. Entre las moléculas mejor caracterizadas en esta respuesta están las llamadas “proteínas de estrés”. Su estudio ha evidenciado que la respuesta a nivel transcripcional es importante para la supervivencia celular y ha llevado a la descripción de varias vías de transducción de señales y factores de transcripción involucrados en esta respuesta (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

#### **2.4.1. Estrés osmótico (glucosa y sacarosa)**

Las fuentes de azúcar que pueden asimilarse varían mucho según la especie de levadura, pero la glucosa sigue siendo una fuente de carbono universal de las levaduras. La glucosa se dirige a piruvato a través de la glucólisis y la mayoría de las levaduras metabolizan piruvato en parte por la fermentación y en parte a través de la respiración (tal es el caso de *K. lactis* o *P. stipitis*) o lo utiliza exclusivamente para la respiración como lo hace *Y. lipolytica* y otras especies típicamente respiratorias. *S. cerevisiae* y especies estrechamente relacionadas son, en contraste, las levaduras predominantemente fermentativas en las que las vías respiratorias están fuertemente reprimidas por la glucosa (efecto Crabtree positivo) (Bolotin-Fukuhara, 2006).

La utilización de los carbohidratos por las levaduras procede secuencialmente, con los asimilados más fácilmente asumiendo el primer lugar. La absorción de ciertos azúcares puede ser inhibida por la presencia de otros. La sacarosa es tomada típicamente primero por la célula de la levadura seguida de la fructosa y la glucosa (Gibson *et al.*, 2007).

### **2.4.2. Estrés por etanol**

La tolerancia al etanol es una resultante compleja que involucra fenómenos bioquímicos, fisicoquímicos y metabólicos; de hecho no existe una definición universal de tolerancia al etanol; este término puede referirse a la concentración de etanol que inhibe el crecimiento (la cual es la definición más común) o bien a la inhibición sobre la velocidad específica de fermentación o al efecto sobre la viabilidad. La tolerancia a este alcohol depende, además de las características genéticas de la cepa, de diversos factores ambientales como: concentración de azúcares en el medio desde el inicio de la fermentación y en fases posteriores, estado metabólico de las células, temperatura, pH, y de manera importante la concentración del etanol en las diferentes etapas de la fermentación. El efecto inhibitorio del etanol tiene de hecho dos modos de acción: uno no específico, que se debe a la reducción de la actividad de agua en el medio, y el otro específico, donde el solvente actúa en contra de algunos componentes celulares; por ejemplo algunas enzimas. Algunas cepas son más sensibles al efecto específico que otras. Los esteroides y ácidos grasos insaturados sintetizados en presencia de oxígeno, tienen también un papel fundamental en el incremento de la tolerancia al etanol. La suplementación del medio con vitaminas y proteínas también mejora la tolerancia al etanol. El efecto de inhibición por etanol y el de inhibición por una alta osmolaridad en el medio son sinérgicos, por lo tanto, altas concentraciones de azúcares reducen la capacidad de tolerar etanol (García-Garibay *et al.*, 2004).

La capacidad de producción de etanol y la tolerancia al mismo son dos características relacionadas desde el punto de vista funcional ya que la segunda puede limitar a la primera; sin embargo, son independientes en su origen fisiológico, es decir, la habilidad de una levadura de producir

etanol a partir de un carbohidrato no necesariamente implica que ésta tenga una alta tolerancia y viceversa (García-Garibay *et al.*, 2004).

Desde un punto de vista fisiológico, el etanol inhibe el crecimiento de la levadura y su viabilidad (Alexandre *et al.*, 2001). El mecanismo de acción de etanol frente a levaduras se centra en la integridad de la membrana plasmática, provocando fugas y la disipación de la fuerza motriz de protones, y afectando los procesos de transporte (Stratford, 2006). Los efectos de la toxicidad del etanol en la fisiología de las levaduras son diversos, aunque las membranas celulares parecen ser los principales sitios dañados por el etanol. Entre algunos de los efectos específicos se encuentran la inhibición del crecimiento, reducción del tamaño celular, reducción de la viabilidad, reducción de la respiración y el consumo de glucosa, reducción de la fermentación, inactivación de enzimas, modificación de lípidos, pérdida de la fuerza motriz de los protones a través de la membrana plasmática, aumento de la permeabilidad de la membrana y reducción del pH citoplásmico (Gibson *et al.*, 2007).

No todas las levaduras presentan la misma sensibilidad al etanol. Las más resistentes son las especies de *Saccharomyces sp.* que se presentan en los procesos de fermentación alcohólica para la elaboración de bebidas o la producción industrial de etanol. Según las cepas y el estado fisiológico del cultivo, el etanol es tóxico en concentraciones del 6 al 14% (v/v). La tolerancia al etanol depende de la composición en ácidos grasos de las membranas citoplasmáticas. Las células cultivadas en presencia de ácido linoleico (C18:2) toleran mejor el etanol añadido al medio que las células en presencia de ácido oléico (C18:1). La viabilidad es mejor en presencia de ergosterol que de camosterol (Buitrago-Estrada y Tenjo-Camacho, 2007).

### **2.4.3. Estrés por pH ácido**

En general, las levaduras prefieren un medio ligeramente ácido y tienen un pH óptimo entre 4.5 y 5.5. Sin embargo, toleran un amplio rango de pH y crecen fácilmente a valores de pH entre 3 y 10. Por otra parte, las levaduras muestran una notable tolerancia a pH, y varias especies pueden crecer a valores de pH ácidos fuertes tan bajos como 1.5. El rango efectivo de pH de crecimiento para una especie dada depende del tipo de disociación ácida en el medio. El ácido acético es generalmente más inhibitorio que el láctico, el propiónico, el cítrico y otros ácidos tanto orgánicos como inorgánicos. Como en el caso de cada factor ambiental, el impacto del pH sobre el crecimiento es influenciado por otros factores. Por ejemplo, a bajas temperaturas el pH mínimo que permite el crecimiento es superior. Al respecto, debe considerarse la interacción de las levaduras con otros organismos en las comunidades microbianas. Las levaduras y bacterias lácticas se presentan juntas en muchos hábitats naturales debido a que poseen muchos requisitos ecológicos comunes. La concentración de ácido láctico producido por las bacterias y el pH bajo correspondiente, podría tener efectos inhibitorios para levaduras fermentativas; por otra parte, las levaduras que emplean el metabolismo aerobio pueden utilizar ácido láctico oxidativamente (Deak, 2006).

### **2.4.4. Estrés por alta temperatura**

Las levaduras no pueden regular su temperatura interna y el estrés térmico provoca daño celular mediante la interrupción de la unión de hidrógeno y desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos, que conduce a la pérdida rápida de la viabilidad celular de la levadura. Intrínsecamente las levaduras termotolerantes poseen valores de temperatura óptima por encima de 40°C y son capaces de sobrevivir a

temperaturas de choque térmico repentinos (por ejemplo, a 50°C), mientras que la termotolerancia inducida se produce cuando las células están acondicionadas previamente por la exposición a un choque térmico suave (por ejemplo, 30 min a 37°C) antes de un choque térmico más severo. El pH intracelular también influye en la termotolerancia de la levadura. Las células que crecen rápidamente en un medio rico en glucosa son más sensibles a la temperatura que las células en fase estacionaria, tal vez debido a que la glucosa reprime la síntesis de proteínas de defensa al estrés (Walker y Van Dijck, 2006).

Las levaduras son, sin excepción, relativamente sensibles al calor. Las temperaturas entre 45 y 53°C, dependiendo de la especie, matan rápidamente casi todas las levaduras. El valor D indica el tiempo necesario para matar 1log (90%) del inóculo. Valores D de levadura, rara vez superan 1 min a 55°C. Entre las especies de levadura con mayor resistencia al calor se encuentra *S. cerevisiae*. Como regla general, las ascosporas de levadura son 10°C más resistentes que sus homólogos de células vegetativas (Stratford, 2006).

### **2.5. Métodos moleculares para identificación de levaduras**

Estudios dirigidos a la identificación de diferentes especies de levaduras, así como las cepas que pertenecen a una especie, se han basado en enfoques morfológicos y fisiológicos. Estas características pueden variar de acuerdo a las condiciones de crecimiento y a veces las especies están definidas por una característica fisiológica única que es controlada por un solo gen. Por esto, las técnicas basadas en biología molecular son vistas como una alternativa a los métodos tradicionales, ya que se analiza el genoma de forma independiente al estado fisiológico de la célula. Muchas técnicas se han desarrollado utilizando las herramientas

que ofrece la biología molecular y muchas de ellas son útiles para identificar y caracterizar las levaduras a nivel molecular (Fernández-Espinar *et al.*, 2006).

La identificación de especies y la diferenciación de cepas siguen siendo importantes en las industrias que utilizan levaduras (de Barros-Lopes *et al.*, 1998). Los métodos moleculares de identificación de levaduras y microorganismos en general, se basan en el estudio de las moléculas de ADN y ARN. En levaduras se iniciaron con el estudio de complementariedad del ADN nuclear, determinándose la existencia de relaciones coespecíficas entre cepas cuyos caracteres fisiológicos y morfológicos considerados determinantes para discernir entre especies eran diferentes (Orberá-Ratón, 2004).

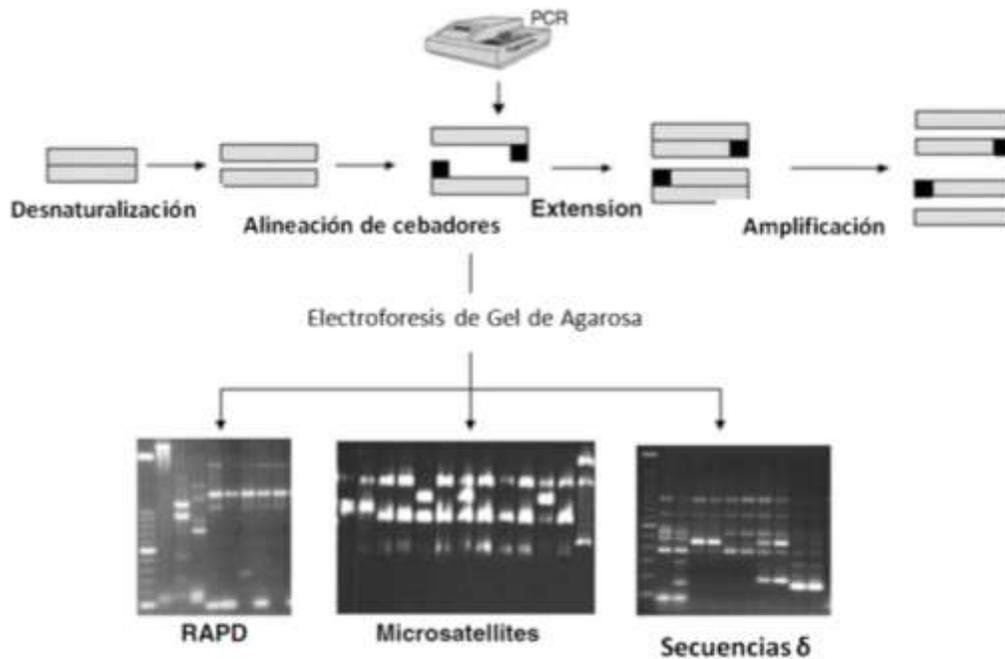
### **2.5.1. Métodos para diferenciar a nivel cepa**

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

El método de PCR no se ha desarrollado para reemplazar a las técnicas existentes en la taxonomía y sistemática de la levadura, sino como una herramienta preliminar en estas disciplinas. El método puede ayudar a los taxonomistas para detectar rápidamente levaduras no relacionadas en una especie heterogénea. La técnica es muy útil para los ecologistas en la agrupación de levaduras con genomas relacionados. Al comparar el patrón de amplificación por PCR de aislamientos con una base de datos de huellas dactilares cepa tipo, es posible identificar las especies de una levadura completamente sin caracterizar (de Barros-Lopes *et al.*, 1998).

Se han desarrollado algunas variantes de la técnica de PCR básica para poder ser usadas en la detección de polimorfismos de fragmentos de ADN sin necesidad de utilizar enzimas de restricción (Figura 3). Las técnicas que se utilizan con mayor frecuencia para diferenciar las

levaduras a nivel de cepa son la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) y los microsatélites. Otras técnicas, tales como la amplificación de secuencias  $\delta$  y la amplificación de los "sitios de empalme intrón", se han desarrollado específicamente para diferenciar las cepas de la especie *S. cerevisiae* (Fernández-Espinar *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Métodos para diferenciar a nivel cepa basados en la amplificación por PCR. (Fernández-Espinar *et al.*, 2006).

### **2.5.1.1.1. Fragmentos $\delta$**

Las secuencias  $\delta$  son elementos que miden 0.3 kb y se encuentran a un costado de los retrotransposones Ty1 y Ty2 en la levadura. Alrededor de 100 copias  $\delta$  están presentes en el genoma de la levadura como parte de los retrotransposones mencionados o como elementos aislados. Sin embargo, estas secuencias  $\delta$  se concentran en regiones genómicas adyacentes a los genes de ARN de transferencia. El número y la localización de estos elementos demuestran cierta variabilidad intraespecífica (Fernández-Espinar *et al.*, 2006). Esto fue aprovechado

por Ness *et al.* (1993) para desarrollar cebadores específicos ( $\delta 1$  y  $\delta 2$ ), y mostraron que los elementos  $\delta$  son lo suficientemente estables como para que esta técnica se pudiera utilizar como un método de identificación de cepas de *S. cerevisiae* a nivel industrial.

Más tarde, Legras y Karst (2003) optimizaron la técnica mediante el diseño de dos nuevos cebadores ( $\delta 12$  y  $\delta 21$ ) que se encuentran muy cerca de  $\delta 1$  y  $\delta 2$ . La especificidad de este par de cebadores la comprobaron mediante la comparación del patrón de electroforesis con un perfil virtual calculado a partir de datos del programa BLAST (herramienta de búsqueda de alineamientos locales). El análisis de 53 cepas de levadura *S. cerevisiae*, comerciales y de laboratorio, mostró una clara mejora de análisis interdelta usando los cebadores de nuevo diseño. También probaron que el uso de  $\delta 12$  y  $\delta 21$  o de  $\delta 12$  con  $\delta 2$  revela mayor polimorfismo (comparado con los primeros cebadores), que se refleja por la aparición de un mayor número de bandas. En consecuencia, los nuevos cebadores son capaces de diferenciar más cepas (Legras y Karst, 2003; Fernández-Espinar *et al.*, 2006; Cova-Pérez, 2010).

Un inconveniente importante de esta técnica es la influencia que la concentración de ADN puede tener en el perfil obtenido, como se muestra por Fernández-Espinar *et al.* (2001) quienes utilizaron diferentes concentraciones de ADN (60, 250 y 2500 ng) y observaron un número de bandas diferente para cada concentración. Aunque este problema se evita mediante la estandarización de la concentración de ADN, la comparación de los resultados entre laboratorios es difícil. Otro problema de esta técnica es la aparición de bandas "fantasma" debido a la baja temperatura de alineación (42°C), utilizada en la reacción de amplificación. Por lo que Ciani *et al.* (2004) usaron una temperatura de

alineación de 55°C para caracterizar las cepas *S. cerevisiae* de vino. De esta manera, los perfiles de amplificación obtenidos son mucho más estables, aunque se obtienen menos bandas.

Alrededor de 300 de elementos delta se describen en el genoma de S288C y son, por tanto, buenos candidatos objetivos para la identificación de polimorfismos. Este método interdelta ahora se utiliza a menudo para el análisis rutinario de cepas de levadura, pero es menos discriminatorio que la electroforesis de campo pulsado (Legras y Karst, 2003).

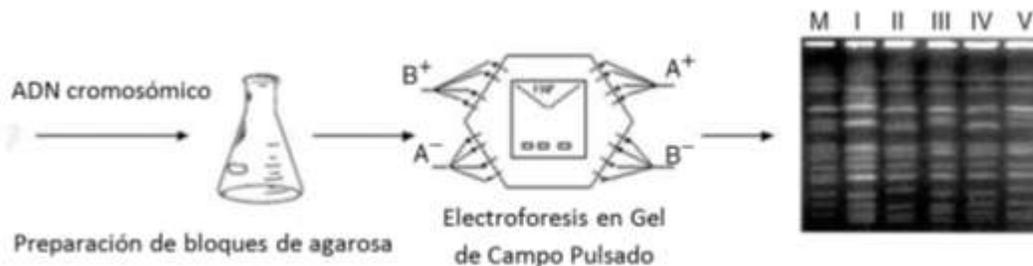
#### **2.5.1.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)**

ADN sometido a electroforesis en agarosa asume una conformación que sólo permite el movimiento de moléculas hasta alrededor de 20 kb de tamaño. Más allá de este límite, la movilidad disminuye rápidamente a medida que las moléculas quedan atrapadas en la matriz de agarosa. Una reducción en la concentración de agarosa al 0.5% y la aplicación de un voltaje reducido permite que la resolución sea aumente hasta por lo menos 50 kb, pero los geles de esta concentración o menos son demasiado frágiles y difíciles de manipular y los tiempos de corrida se vuelven excesivamente largos. Desde la introducción de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) en 1982, esta técnica se ha utilizado para separar moléculas tan grandes como de 12 MB. La técnica se basa en una corriente directa de campo eléctrico que cambia periódicamente la dirección y/o la intensidad en relación con el gel de agarosa (Maule, 1998).

Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es una técnica para el fraccionamiento de ADN de alto peso molecular que oscila entre 10 kb a

10 Mb por electroforesis en gel de agarosa con un campo eléctrico que se alterna en dos direcciones (Figura 4). Esta tecnología juega un papel clave en la genómica moderna, ya que permite manipulaciones de ADN con cromosomas enteros o sus fragmentos grandes (Nassonova, 2008).

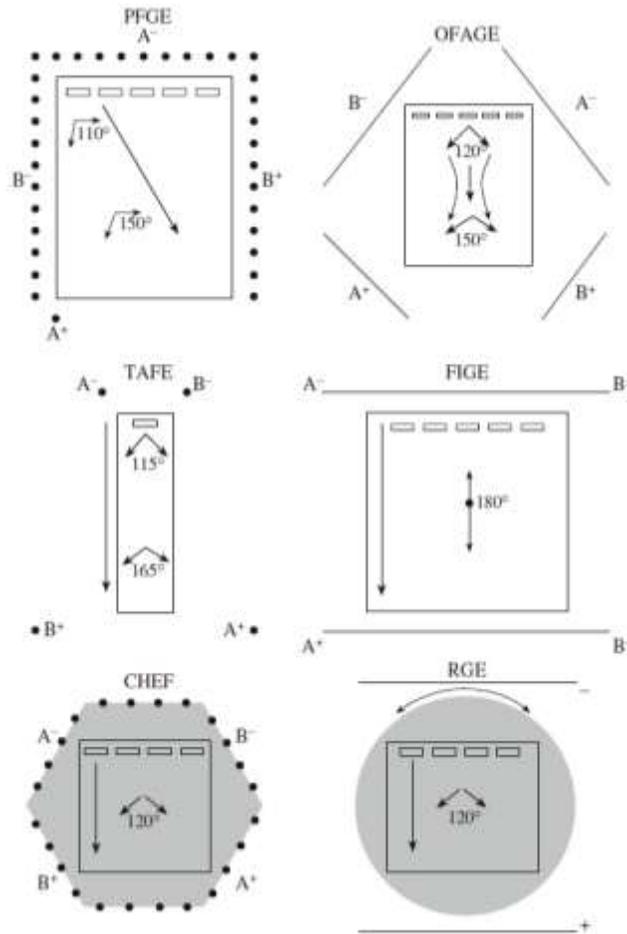
Dado que los 16 cromosomas (haploides) de las moléculas de ADN de *S. cerevisiae* varían en tamaño (de aproximadamente 200 kb a 3 MB) son una especie de levaduras eminentemente adecuadas para la separación por esta técnica. Esto proporciona una definición de "cariotipos electroforéticos" de las cepas dimensionando los cromosomas de acuerdo con la distancia a la que migran en el gel, después de la tinción de las bandas de ADN con bromuro de etidio (Johnston, 1994). La técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), es la de mayor poder discriminatorio (Orberá-Ratón, 2004).



**Figura 4.** Técnica de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado. (Fernández-Espinar et al., 2006).

Los tipos originales de aparatos se han modificado y desarrollado de diversas maneras, en particular en el diseño y la geometría de los electrodos y los campos eléctricos producidos (Figura 5). Todos los sistemas dependen del hecho de que los cambios periódicos en la dirección del campo eléctrico retardan la migración a través de la matriz de geles de agarosa de moléculas de ADN más grandes y este retardo es dependiente del tamaño de las moléculas de ADN. Aunque hay varias otras variables que intervienen en PFGE, tales como la intensidad del

campo, el gel de agarosa y las concentraciones de sal; la geometría de campo eléctrico y los intervalos de conmutación de impulsos son de suma importancia (Johnston, 1994).



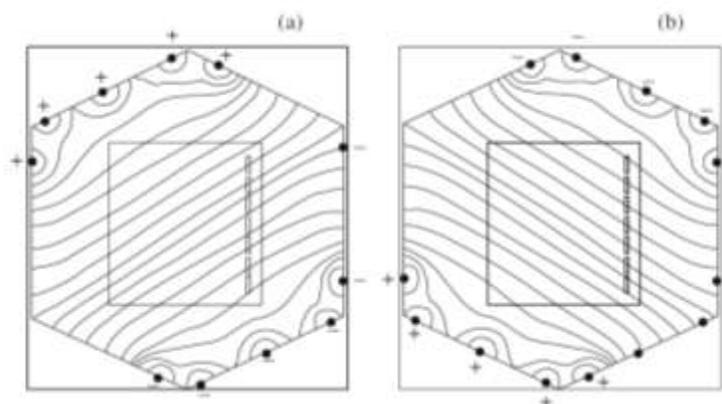
**Figura 5.** Dibujos esquemáticos que muestran geometrías de electrodos en los instrumentos comúnmente utilizados para la electroforesis en gel de campo pulsado.

Los sistemas con campos eléctricos no homogéneos: (PFGE) electroforesis en gradiente de campo pulsado; (OFAGE) electroforesis en gel de campo alternante ortogonal; (TAFE) electroforesis de campo alternado transversal. Sistemas con campos eléctricos homogéneos: (FIGE) electroforesis en gel de campo invertido; (CHEF) electroforesis de campo eléctrico homogéneo en contorno cerrado; (RGE) electroforesis en gel rotante. Flechas delgadas cortas muestran los vectores de intensidad de campo de los campos eléctricos alternativos; ángulo de reorientación se indica en el interior.

Flechas anchas indican la dirección neta de migración. Los símbolos  $A^+$  y  $A^-$ ,  $B^+$  y  $B^-$  indican las posiciones de los pares de electrodos de los campos eléctricos alternos. Los electrodos están indicados por puntos en los esquemas de PFGE, TAFE y CHEF, y por líneas rectas en los esquemas de OFAGE, FIGE y RGE. (Nassonova, 2008).

### 2.5.1.2.1. CHEF

Típicamente, este sistema cuenta con una disposición hexagonal de 24 pequeños electrodos conectados por una serie de resistencias. Los campos eléctricos resultantes, en un ángulo de 120°, son altamente uniformes, debido a la sujeción de potenciales del electrodo, y por lo tanto producen pistas rectas como se puede observar en la Figura 6 (Johnston, 1994).



**Figura 6.** Campo pulsado eléctrico homogéneo en un instrumento CHEF. (Nassonova, 2008).

Con CHEF, es posible lograr carriles rectos y la separación del ADN estable. CHEF es la variante de electroforesis en campo pulsado más aplicada, ya que garantiza el fraccionamiento más eficaz de moléculas de ADN en un amplio rango de tamaños. Por ejemplo, este sistema es el que permite la separación casi completa de ADN cromosómico a partir de la levadura *S. cerevisiae* en gemación (Nassonova, 2008).

La mayoría de los instrumentos comerciales utilizados actualmente se basan en el principio de CHEF, por ejemplo, CHEF-DR<sup>®</sup> III sistema de electroforesis de campo pulsado (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos) y el sistema de Gene Navigator<sup>™</sup> (GE Healthcare Bio-Sciences, Suecia) (Nassonova, 2008).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La gran variedad de agaves y sus múltiples usos han jugado un papel importante en la identificación cultural de México. Estos han sido explotados en muchas formas durante muchos años, y una de estas aplicaciones es la producción de bebidas alcohólicas y destilados. Hasta hoy, la microbiota que participa en la fermentación y su función bioquímica en este proceso, sigue siendo en gran parte desconocida, por lo tanto, es esencial llevar a cabo más estudios sobre los procesos tradicionales que todavía están en uso, ya que son la fuente de importantes consorcios microbianos que podrían desaparecer con la introducción de nuevas tecnologías (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

El resultado de esta investigación, enfocada a cepas de *S. cerevisiae*, servirá como base para la realización de pruebas de fermentación y determinación de las cepas con mayor producción de etanol y metabolitos secundarios, y de esta forma poder seleccionar de manera fundamentada la cepa con mayores cualidades para la producción de mezcal.

## 4. OBJETIVO

### 4.1. *Objetivo General*

Evaluar la capacidad para crecer bajo diversas condiciones de estrés entre las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de mezcal, así como determinar las diferencias existentes a nivel molecular.

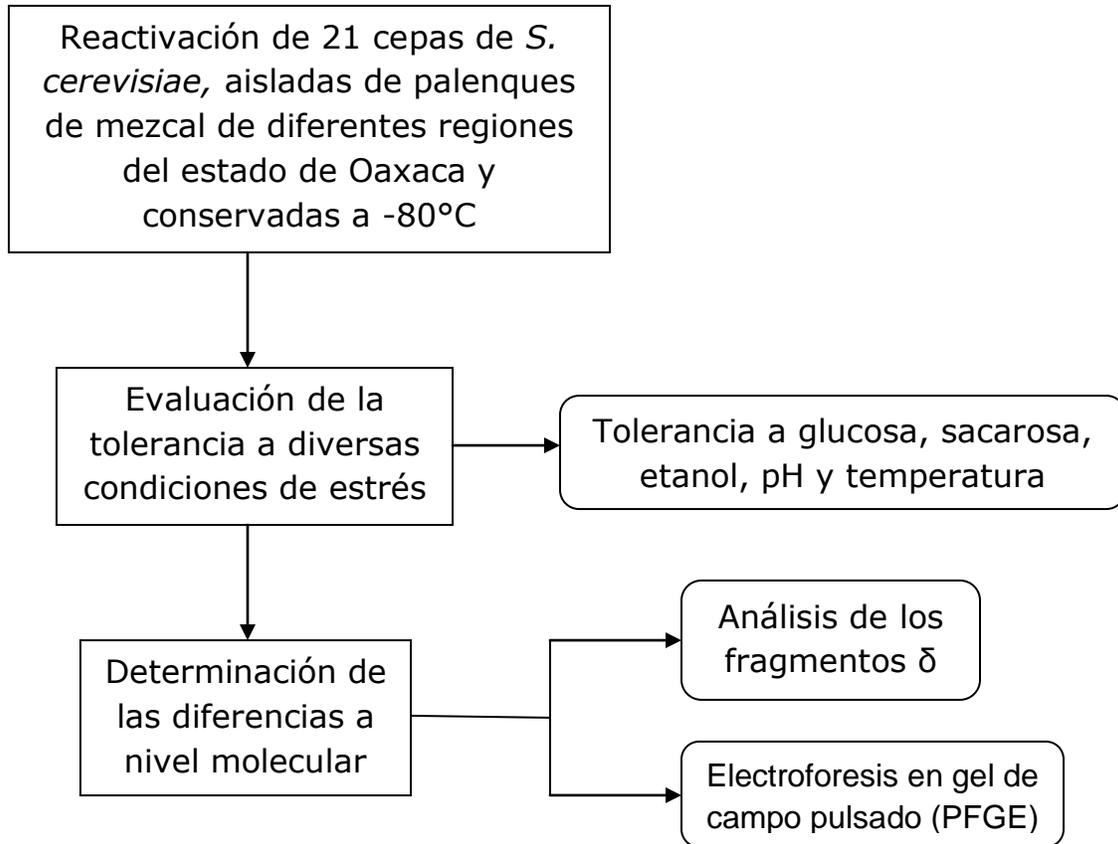
### 4.2. *Objetivos Particulares*

- ✓ Evaluar el crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* en:
  - Concentraciones de glucosa de 20, 25 y 30% p/v
  - Concentraciones de sacarosa de 10, 15 y 20% p/v
  - Concentraciones de etanol de 8, 10, 12 y 15% v/v
  - Valor de pH 3
  - Temperatura de 37, 42 y 45°C
  
- ✓ Establecer las diferencias a nivel molecular entre las cepas de *S. cerevisiae* utilizando los métodos de análisis de fragmentos  $\delta$  y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

## 5. HIPÓTESIS

Si el hábitat y las condiciones de fermentación del mezcal seleccionan a las cepas de *S. cerevisiae*, entonces cepas del mismo hábitat y proceso tenderán a presentar los mismos niveles de tolerancia bajo diversos factores de estrés. Asimismo, las cepas tenderán a ser genéticamente semejantes.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**Figura 7.** Estrategia experimental para establecer las diferencias o semejanzas de cepas de *S. cerevisiae* procedentes de fermentaciones naturales de mezcal.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Cepas de estudio

Se utilizaron 21 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de palenques de mezcal de diferentes regiones del estado de Oaxaca (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cepas de levaduras provenientes de diferentes municipios del estado de Oaxaca.

Distrito	Municipio	Cepas
Ocotlán	Minas	LC-12, LC-14
	Chichicapam	PA-16, PA-18, FV-10, FV-11, FV-13
Yautepec	Majadas	FF-07, ZA-06
Tlacolula	Guelavila	CH-01, CH-02, CH-03, CH-07, DH-2, DH-I
	Matatlán	D1-01, D1-14, DI-03, DI-10, DI-11, DI-12

### 7.2. Reconstitución de cepas de *S. cerevisiae* aisladas de fermentaciones de mezcal

Las cepas de levaduras se encontraban conservadas en una solución de glicerol (30%) y almacenadas a -80°C. Así, los microorganismos fueron recuperados raspando una pequeña cantidad de la cepa congelada y suspendiéndola en tubos con 5 mL de medio líquido YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% dextrosa) previamente estéril, los tubos se incubaron por 24 horas a 30°C. Luego, los tubos que mostraron crecimiento microbiano se emplearon para inocular y reactivar las cepas en tubos con 5 mL de caldo YPD, incubados a 30°C durante la noche (aprox. 18 horas). Después de esto, las cepas se sembraron en cajas de

Petri con medio YPDA (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa y 1.5% agar) y se incubaron por 24 horas a 30°C. Las cajas donde se observó crecimiento se almacenaron en refrigeración (4°C aprox.) para su uso posterior.

### **7.3. Tolerancia a diversas condiciones de estrés**

#### **7.3.1. Preparación de medios de cultivo**

Para evaluar la tolerancia de las cepas de *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de glucosa, se prepararon medios de cultivo YPDA conteniendo 20, 25 y 30% (p/v) de este azúcar, mientras que para evaluar la tolerancia a sacarosa se prepararon cajas de Petri con agar YPD conteniendo 10, 15 y 20% (p/v) del disacárido. Por otra parte, la tolerancia a etanol se evaluó empleando medios de cultivo YPDA con 8, 10, 12 y 15% (v/v) de etanol. Para la tolerancia a pH bajo, se prepararon cajas de Petri con agar YPD acidificado con HCl a un pH de 3. Para las pruebas de temperatura (37, 42 y 45°C) se preparó agar YPD.

#### **7.3.2. Pruebas de tolerancias para cada cepa de *S. cerevisiae***

De cada cepa en refrigeración se tomó una colonia y se inoculó por asada en un tubo con 5 mL de YPD, se incubó por 24 h a 30°C, después de observar crecimiento, los tubos se agitaron y se tomaron 0.1 mL para inocular a otro tubo con 5 mL de YPD, se incubó a 30°C durante la noche (aprox. 18 horas).

Posteriormente se realizó un ajuste turbidimétrico para obtener una absorbancia de 0.5 a 600 nm en el espectrofotómetro. Luego, se realizaron diluciones decimales seriadas ( $10^{-8}$ ) en tubos con solución

peptonada (0.1%). De cada dilución se tomaron 3  $\mu$ L y se sembraron en cada uno de los medios de cultivo descritos anteriormente. Las cajas se incubaron durante 24 h a 30°C, o hasta observar crecimiento microbiano. Para las condiciones de temperatura se incubó cada caja a la temperatura correspondiente (37, 42 y 45°C) de 24 a 96 horas.

Todas las pruebas se realizaron por duplicado para cada cepa.

#### **7.4. Análisis molecular de las cepas de *S. cerevisiae***

##### **7.4.1. Extracción de ADN de las cepas de levadura**

Para la extracción de ADN las cepas se resembraron en 5 mL de caldo YPD y se incubaron 18 h a temperatura ambiente con ligera agitación constante.

Luego, las células fueron recuperadas mediante centrifugación. Aproximadamente 1.5 mL del cultivo fue centrifugado a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el pellet fue resuspendido en 200  $\mu$ L de buffer de ruptura, 200  $\mu$ L de PCI (Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1), saturado con 10 mM Tris a pH 8 y 1 mM EDTA de la marca Sigma-Aldrich) y se agregaron también aproximadamente 0.3 g de perlas de vidrio estériles de 425-600  $\mu$ m (Sigma-Aldrich). Posteriormente la mezcla fue sometida a un disruptor de células (Disruptor Genie SI-D236) durante 40 segundos. Se agregaron 200  $\mu$ L de buffer TE (1 mM EDTA y 10 mM Tris a pH 8) y se centrifugó durante 10 min a 4°C y 14000 rpm en una microcentrifuga (Eppendorf). La fase acuosa se colectó en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL y se le agregó 1 mL de etanol absoluto frío. Se incubó en el congelador sobre hielo durante 30 minutos. Luego, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C en la microcentrifuga (Eppendorf). El

sobrenadante se descartó y el pellet resultante se lavó con 0.5 mL de etanol frío al 70%, finalmente la mezcla se centrifugó por 5 minutos empleando las condiciones descritas anteriormente. El sobrenadante se eliminó y el pellet de células se dejó secar durante toda la noche. El ADN se resuspendió en 150  $\mu$ L de agua desionizada estéril, agitando suavemente cada 10 min durante 1.5 h. Las muestras se guardaron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser utilizadas posteriormente.

#### **7.4.2. Cuantificación de ADN por espectrofotometría**

Una vez que se realizó la extracción del ADN de las cepas de levaduras, se evaluó su pureza y concentración, para lo cual se midió la absorbancia de la muestra a dos longitudes de onda (260 y 280 nm). La relación de las lecturas  $[A_{260}/A_{280}]$  permitió estimar el grado de pureza del ADN, por lo cual el resultado de esta relación debió estar entre 1.8 y 2.0.

Para determinar la concentración de ADN se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS GBC-Cintral con una celda de microvolumen (150  $\mu$ L) con 1 cm de trayecto óptico. La concentración de ADN se calculó a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\mu\text{g ADN/mL} = (DO_{260\text{nm}})(\text{factor de conversión})(\text{dilución})$$

$$1 \text{ unidad } A_{260\text{nm}} \text{ de ADN} = 50 \mu\text{g/mL} = \text{FC}$$

$$\text{Volumen final/volumen inicial} = \text{dilución} = 40 \text{ mL}$$

Se estandarizaron todas las muestras preparando en tubos nuevos 50  $\mu$ L a una concentración de 50  $\mu$ g/mL.

### **7.4.3. Análisis de los fragmentos $\delta$**

Las regiones interdelta fueron amplificadas de acuerdo a la metodología descrita por Legras y Karst (2003) utilizando:

- 1) Agua
- 2) Buffer [1X] para PCR (Invitrogen)
- 3)  $MgCl_2$  [2.5 mM] (Invitrogen)
- 4) los cebadores  $\delta 12$  (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') y  $\delta 21$  (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3') [1  $\mu M$ ]
- 5) dNTPs [200  $\mu M$ ] (Invitrogen)
- 6) ADN templado [ $\sim 100 \mu g/mL$ ]
- 7) Taq polimerasa recombinante [4U] (Invitrogen)

El volumen final de la reacción fue de 25  $\mu L$  (3  $\mu L$  de ADN y 22  $\mu L$  de reacción).

Las condiciones empleadas para la reacción de PCR en el termociclador (Thermo Scientific PIKO24 Thermal Cycler) fueron: desnaturalización inicial de 4 minutos a 95°C y 40 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de alineación a 46°C y 90 segundos de extensión a 72°C, seguidos por una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1% conteniendo 0.7  $\mu g/mL$  de bromuro de etidio. 6  $\mu L$  de amplicon se mezclaron con 2  $\mu L$  de buffer de carga 6X y se cargaron en los pozos del gel. La electroforesis se realizó a 90V durante 90 min empleando buffer de corrida TBE 0.5X (45 mM Tris-Cl, pH 8.3, 45 mM ácido bórico y 1 mM EDTA). El gel fue fotografiado bajo luz UV transiluminada. El tamaño de los fragmentos se determinó usando un marcador de peso molecular

1Kb Plus DNA Ladder y el software Kodak Molecular Imaging versión 5.0 (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, USA).

#### **7.4.4. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)**

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

De cada muestra se tomó una colonia del medio sólido YPDA y se inoculó en un tubo con 5 mL de medio líquido YPD. Las muestras se incubaron en agitación (Lab-line) a temperatura ambiente hasta alcanzar una densidad óptica ( $OD_{600}$ ) igual o mayor a 1, la cual se determinó utilizando un espectrofotómetro UV/VIS GBC-Cintral. Un mL de cultivo se centrifugó a 7000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 1 mL de EDTA 50 mM y se centrifugó nuevamente.

Las células se resuspendieron en 63  $\mu$ L de buffer de suspensión celular (Tris 10 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, EDTA 50 mM) y se mantuvieron en un baño de agua a 50°C, a esta suspensión celular se le añadieron 3  $\mu$ L de Liticasa stock y 37  $\mu$ L de agarosa al 2%. Luego, la mezcla se homogeneizó manteniendo siempre la temperatura 50°C. Para formar los tapones, la mezcla se transfirió a los moldes desechables de 100  $\mu$ L y se dejaron solidificar de 10 a 15 minutos a 4°C. Después, los tapones de agarosa se colocaron en tubos eppendorf con una solución de Liticasa (8.5  $\mu$ L de Liticasa stock en 250  $\mu$ L de buffer de Liticasa, por cada tapón de 100  $\mu$ L) y se incubaron por 2 h a 37°C. En seguida, la solución de Liticasa se removió y los tapones se enjuagaron con agua estéril. A cada tapón se agregaron 250  $\mu$ L del buffer de reacción de Proteinasa K seguido de 10  $\mu$ L de Proteinasa K stock. Los tapones se incubaron toda la noche a 50°C sin agitación. Posteriormente, se lavaron 4 veces en

buffer de lavado 1X; un lavado cada hora a temperatura ambiente con agitación suave (para cada tapón se usó 1 mL del buffer de lavado 1X). El buffer de lavado se preparó diluyendo la solución stock 10X (1:10) con ddH<sub>2</sub>O estéril. Finalmente los tapones se guardaron en refrigeración a 4°C hasta ser utilizados.

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

El voltaje de la fuente de poder se divide entre los electrodos de tal forma que el gradiente de voltaje que se produce es constante a lo largo del gel, y el ángulo de reorientación es de 120°.

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

Tiempo de cambio (s): 60-120

Voltaje: 6Vcm

Tiempo de corrida: 24 h

Ángulo: 120°

Después de la corrida, se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio con agitación constante durante 30 minutos. Luego, el gel se lavó durante 1 h con agua destilada, cambiando el agua cada 15 minutos. Los resultados se visualizaron en el equipo Kodak Molecular Imaging Software versión 5.0 (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, USA) y el análisis de los datos se realizó con el software Past versión 3.01.

## **8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **8.1. Pruebas de tolerancia a diferentes condiciones de estrés**

Antes de evaluar la tolerancia de las cepas de levaduras a diferentes condiciones de estrés, las células se cultivaron en placa para comprobar su viabilidad, encontrando que todas las cepas fueron viables.

#### **8.1.1. Tolerancia a glucosa y sacarosa**

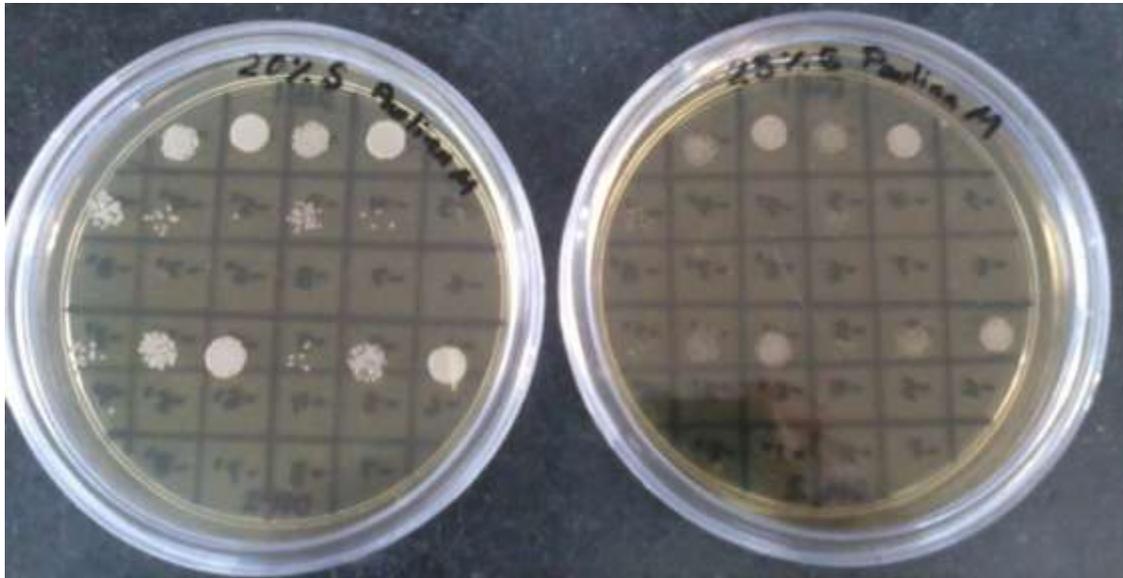
En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos del crecimiento de las cepas de levaduras en medios de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa y sacarosa. Los resultados expresados con los números 3, 4 y 5 indican las diluciones donde hubo crecimiento de las células de levaduras evaluadas.

Los resultados muestran que todas las cepas analizadas toleran concentraciones de 30% de glucosa y 20% de sacarosa. Sin embargo, se observa que hay un mayor crecimiento celular en la cepa FV-13, puesto que presenta la dilución más alta en la que se observó crecimiento. Por otra parte, las cepas que presentaron menos crecimiento en medios de cultivo con 30% de glucosa fueron D1-01, D1-03 y ZA-06, mientras que la cepa DH-2, presentó el menor crecimiento en agar YPD con 20% de sacarosa.

La tolerancia a altas concentraciones de azúcar puede deberse a que la principal vía de respuesta activada por estrés osmótico en *S. cerevisiae* es la HOG (high-osmolarity-glycerol), la cual provoca la acumulación rápida de solutos compatibles, principalmente el glicerol. Primero, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, es inducida rápidamente por medio de un gen que codifica para esta enzima que es la principal limitante de la velocidad de la biosíntesis de glicerol. Después, con la producción

elevada de glicerol, el flujo a través de la glucólisis es estimulado a nivel de la fosfofructoquinasa. 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. La acumulación y liberación de glicerol a partir de las células de levadura se ven favorecidas por el rápido cierre y apertura del canal de glicerol en la membrana plasmática en respuesta al estrés osmótico. La vía de señalización HOG también afecta otras cosas, además de la producción de glicerol, tales como la organización del citoesqueleto y la composición de la membrana plasmática (Tanghe *et al.*, 2006).

Es importante mencionar que la morfología colonial de las cepas de levaduras en los medios de cultivo conteniendo sacarosa y glucosa fue diferente. En las tres concentraciones de sacarosa el crecimiento de las colonias fue el característico de la levadura en un medio YPDA (colonias redondas, lisas, cóncavas y blanquecinas), pero en casi todas las concentraciones de glucosa (principalmente las dos concentraciones más altas) las colonias se observaron con un color menos blanco de lo normal (translúcido) y de un tamaño más pequeño (Figura 8). Lo anterior puede deberse a que, de los dos azúcares, estas fueron las concentraciones más altas, por lo que las levaduras se encontraban sometidas a un mayor estrés y sus colonias a pesar de resistir dicho estrés, no pudieron crecer y desarrollarse completamente.



**Figura 8.** Comparación morfológica de las colonias de levaduras correspondientes a las cepas DH-1 (superior de la caja Petri) y DH-2 (inferior de la caja Petri) en agar YPD con 20% de sacarosa (lado izquierdo) y 25% de glucosa (lado derecho).

Estas formaciones de menor diámetro y corrugadas son conocidas como colonia compleja, se han observado en medios con bajo contenido en dextrosa, ya que la baja disponibilidad de la fuente de carbono fermentable induce este tipo de morfología (Granek y Magwene, 2010). Sin embargo, en este caso donde las concentraciones son elevadas, se pueden observar las mismas formaciones, lo que implica que éste es un mecanismo de respuesta contra un ambiente hostil, ya que involucró la producción de una matriz extracelular de protección (Santiago-Urbina, 2010, citado en Zavala-Nacul, 2013).

En condiciones normales de nutrición, la glucosa es la fuente de carbono preferida por la levadura, pero cuando se encuentra sometida a estrés, como en este caso, la célula induce una variedad de genes que afectan al metabolismo de la glucosa. Esto incluye genes que codifican los transportadores de glucosa que sirven para importar glucosa externa dentro de la célula y las glucosa cinasas que activan el azúcar para su posterior catabolismo. En respuesta a ambientes estresantes, el destino

de la glucosa se divide entre la síntesis de trehalosa, el almacenamiento de glucógeno, la síntesis de ATP a través de la glicólisis, y regeneración de NADPH por el traslado de las pentosas fosfato (Gasch, 2003).

Otra razón por la que se pudo observar un mejor crecimiento de colonias en condiciones de estrés con sacarosa, es que, a pesar de que las levaduras metabolizan rápidamente ambos azúcares durante la etapa inicial de la fermentación de los mostos de agave, la sacarosa es hidrolizada por la enzima invertasa, la cual está situada en el exterior de la membrana celular y ligada dentro de la pared celular, en cambio, la glucosa producida durante la hidrolisis, junto con la presente en el mosto, es transportada dentro de la célula. El transporte es facilitado posiblemente por una molécula transportadora (permeasa) localizada en la membrana, por lo que la glucosa entra a la célula un millón de veces más rápido de lo que puede explicarse por simple difusión a través de la membrana, sin embargo, como ya se mencionó, en condiciones de estrés se produce una matriz extracelular de protección, la cual dificulta de alguna manera el transporte de la glucosa al interior de la célula. Además, *S. cerevisiae* pertenece a los denominados tipos de levaduras sensibles a la glucosa, ya que se reprime la respiración en presencia de una pequeña concentración ( $\leq 0.4\%$ ) de glucosa libre en el medio. Esta represión se aplica independientemente de la presencia o ausencia de oxígeno molecular. El efecto de los niveles de represión de la glucosa es producir cambios en la composición enzimática (en particular los niveles de las enzimas del ciclo de Krebs) e influir en la estructura de la mitocondria de la célula (en particular los niveles de componentes de la cadena respiratoria). Este efecto de la glucosa se conoce como el efecto Crabtree, la represión de glucosa o represión catabólica. (Priest y Campbell, 1996).

**Tabla 3.** Crecimiento de las cepas de levaduras en medio de cultivo agar YPD con diferentes concentraciones de glucosa y sacarosa.

Cepa	Glucosa (% p/v)			Sacarosa (% p/v)		
	20%	25%	30%	10%	15%	20%
<b>CH-01</b>	5	5	4	4	4	4
<b>CH-02</b>	4	4	4	4	4	4
<b>CH-03</b>	4	4	4	4	4	4
<b>CH-07</b>	4	4	4	4	4	4
<b>D1-01</b>	4	4	3	4	4	4
<b>D1-14</b>	4	4	4	4	4	4
<b>DH-I</b>	4	4	4	4	4	4
<b>DH-2</b>	4	4	4	4	4	3
<b>DI-03</b>	4	3	3	4	4	4
<b>DI-10</b>	4	4	4	4	4	4
<b>DI-11</b>	4	4	4	4	4	4
<b>DI-12</b>	4	4	4	4	4	4
<b>FF-07</b>	5	4	4	4	4	4
<b>FV-10</b>	4	4	4	4	4	4
<b>FV-11</b>	4	4	4	4	4	4
<b>FV-13</b>	5	5	5	5	5	5
<b>LC-12</b>	4	4	4	5	4	4
<b>LC-14</b>	4	4	4	4	4	4
<b>PA-16</b>	4	4	4	4	4	4
<b>PA-18</b>	4	4	4	4	4	4
<b>ZA-06</b>	4	4	3	5	4	4

\* Los números 3, 4 y 5 representan diluciones donde hubo crecimiento.

En la literatura se reporta que en el caso de las fermentaciones de agave para la producción de mezcal, el contenido de azúcar es de alrededor de 300 g/L y contiene aproximadamente 90% de fructosa y 10% de glucosa. Por lo que, de manera similar al presente estudio, Páez

*et al.* (2011) evaluaron el estrés osmótico con glucosa y fructosa en concentraciones de 200, 250 y 300 g/L, en cepas aisladas de mostos fermentados de manera espontánea de *A. duranguensis* en las regiones productoras de El Mezquital y Durango, Dgo., México, encontrando que esas cepas de mezcal son tolerantes a las tensiones osmóticas que se encuentran típicamente en la fermentación del mezcal de esa región.

### **8.1.2. Tolerancia al etanol**

En la Tabla 4 se presentan los resultados correspondientes al crecimiento de las cepas de levaduras en medios de cultivo con diferentes concentraciones de etanol (8, 10, 12 y 15 % (v/v)). Durante las primeras 24 h de incubación, las cepas CH-07, LC-12 y PA-18 presentaron desarrollo de colonias en los medios de cultivo que contenían 8 y 10% de etanol, sin embargo, para el día 3, todas las cepas presentaron crecimiento en estos medios. Además, en este mismo tiempo, las cepas CH-02, CH-07, FF-07, FV-13, LC-12, PA-16 y PA-18 se desarrollaron en el agar YPD con 12% de etanol, mientras que las cepas FF-07 y FV-13 crecieron a una concentración de 15%. Finalmente, en el sexto día de incubación, todas las cepas mostraron crecimiento celular a la concentración de 12% de etanol, y solo algunas toleran 15% en el medio de cultivo.

Los resultados muestran que, en general, la mayoría de las cepas resisten las altas concentraciones de etanol. Sin embargo, el crecimiento fue muy lento para casi todas las cepas (Tabla 4). Esto se debe a que las células fueron dañadas parcialmente con el etanol. Se ha reportado que el etanol inhibe el crecimiento de los microorganismos y causa daños en el ADN mitocondrial de las células de las levaduras y la inactivación de algunas enzimas (Buitrago-Estrada y Tenjo-Camacho, 2007). Así las células requieren de tiempo para poder recuperarse y

reparar los daños, manteniendo de esta manera su viabilidad ante este compuesto tóxico. Dake *et al.* (2010) mencionan que cuando el etanol aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática y la fluidez, el glucano insoluble presente en la pared celular de la levadura es responsable de la prevención de fugas a través de la membrana celular y por lo tanto juega un papel importante en la mejora de la tolerancia a etanol. Por otra parte las cepas que crecieron en menor tiempo (Tabla 4) probablemente tienen la capacidad de incrementar la cantidad de ácidos grasos insaturados en sus membranas como una alternativa ante el estrés generado por la toxicidad del etanol (Buitrago-Estrada y Tenjo-Camacho, 2007).

Así también, se ha reportado que las células de levadura han desarrollado los mecanismos adecuados para hacer frente a varios tipos de daños causados por el aumento de la concentración de etanol. Ding *et al.* (2009) describen todos los factores relacionados con la tolerancia al etanol de *S. cerevisiae* y sus funciones cuando las células de levadura se encuentran con estímulos de etanol. Entre estos, se pueden destacar, en primer lugar, el aumento de la fluidez de la membrana plasmática y destrucción de las estructuras normales de la membrana. En respuesta, las células de levadura pueden cambiar composiciones de membrana para antagonizar la fluidez y estabilizar la membrana plasmática. Específicamente, se ha demostrado que los niveles de ácidos grasos insaturados (UFA) y ergosterol aumentan en respuesta a la alta concentración de etanol. En segundo lugar, la expresión de factores que estabilizan y/o reparan las proteínas desnaturalizadas en células de levadura, tales como trehalosa y proteínas de choque térmico inducido (HSP), han puesto de manifiesto que se correlacionan con la capacidad para tolerar el alcohol. Tercero, algunas proteínas candidatas que

participan en la expresión de genes relacionados con el estrés, también juegan un papel en la tolerancia al etanol en *S. cerevisiae*.

**Tabla 4.** Crecimiento de las cepas de levaduras en medio de cultivo agar YPD con diferentes concentraciones de etanol.

Cepa	Etanol (% v/v)											
	1 día				3 días				6 días			
	8%	10%	12%	15%	8%	10%	12%	15%	8%	10%	12%	15%
<b>CH-01</b>	ND	ND	ND	ND	4	4	ND	ND	4	4	4	2
<b>CH-02</b>	ND	ND	ND	ND	5	4	4	ND	5	4	4	ND
<b>CH-03</b>	ND	ND	ND	ND	4	4	ND	ND	4	4	4	3
<b>CH-07</b>	4	4	ND	ND	4	4	1	ND	4	4	4	1
<b>D1-01</b>	ND	ND	ND	ND	5	4	ND	ND	5	4	4	3
<b>D1-14</b>	ND	ND	ND	ND	4	4	ND	ND	4	4	4	ND
<b>DH-I</b>	ND	ND	ND	ND	4	4	ND	ND	4	4	4	ND
<b>DH-2</b>	ND	ND	ND	ND	5	1	ND	ND	5	1	1	ND
<b>DI-03</b>	ND	ND	ND	ND	4	4	ND	ND	4	4	4	3
<b>DI-10</b>	ND	ND	ND	ND	4	4	ND	ND	4	4	4	4
<b>DI-11</b>	ND	ND	ND	ND	4	4	ND	ND	4	4	4	4
<b>DI-12</b>	ND	ND	ND	ND	5	5	ND	ND	5	5	5	ND
<b>FF-07</b>	ND	ND	ND	ND	5	4	2	2	5	4	4	4
<b>FV-10</b>	ND	ND	ND	ND	4	4	ND	ND	4	4	4	4
<b>FV-11</b>	ND	ND	ND	ND	5	5	ND	ND	5	5	5	4
<b>FV-13</b>	ND	ND	ND	ND	5	4	4	4	5	4	4	4
<b>LC-12</b>	4	2	ND	ND	4	4	4	ND	4	4	4	ND
<b>LC-14</b>	ND	ND	ND	ND	5	4	ND	ND	5	4	4	ND
<b>PA-16</b>	ND	ND	ND	ND	5	5	4	ND	5	5	4	ND
<b>PA-18</b>	5	5	ND	ND	5	5	4	ND	5	5	4	4
<b>ZA-06</b>	ND	ND	ND	ND	4	4	ND	ND	4	4	4	ND

\* Los números 1, 2, 3, 4 y 5 representan diluciones donde se observó crecimiento celular. ND = crecimiento no detectado.

Lo anterior, se confirma también por Ramirez-Córdova *et al.* (2012) quienes utilizaron el análisis de microarreglos para identificar los genes de *S. cerevisiae* que participan en la respuesta de etanol. Encontrando así, que algunos están asociados con la composición de la membrana

como por ejemplo, los genes OLE1 y OLE2 que codifican para la producción de ácido oléico y los genes para la producción de ergosterol (ERG3, ERG11, y ERG25), que está específicamente relacionada con la fluidez de la membrana.

### **8.1.3. Tolerancia a pH 3**

En la Tabla 5 se puede observar que la condición ácida (pH 3) en el medio de cultivo, es tolerada por todas las cepas estudiadas. Esta capacidad se encuentra relacionada con el ambiente del cual las levaduras fueron aisladas, es decir, el mosto de agave, el cual presenta un pH entre 3.0 y 3.9.

De manera similar, Serra *et al.* (2005) y Belloch *et al.* (2008) reportan resultados que indican que la capacidad de crecimiento a pH bajo podría considerarse común en todas las especies e híbridos dentro del grupo de *Saccharomyces sensu stricto*. En consecuencia, si comparamos con otras bebidas alcohólicas, el mosto de uva o de cerveza con bajo pH no deben considerarse un factor de estrés para las levaduras en la fermentación alcohólica. La disminución de pH durante una fermentación de cerveza típica es conocida por causar un cambio considerable en la expresión génica (Gibson *et al.*, 2007). Cepas haploides de *S. cerevisiae* que experimentan un cambio de pH 5.5 a 3.5 en un medio mínimo de crecimiento demuestran un aumento (1.4 veces o más) en la expresión de 36 genes, incluyendo cuatro relacionados con la pared celular (CWP1, HOR7, SPI1, YGP1) (Kapteyn *et al.*, 2001, citado en Gibson *et al.*, 2007).

La pared celular de *S. cerevisiae* se compone de  $\beta$ 1, 3-glucano,  $\beta$ 1, 6-glucano, quitina y manoproteínas en proporciones de aproximadamente el 53%, 5%, alrededor del 2% y 40% del peso seco de la pared celular, respectivamente. El bajo pH del medio ambiente afecta fuertemente la

organización de la pared celular de *S. cerevisiae*, lo que resulta rápidamente en la resistencia inducida a  $\beta$ 1, 3-glucanasa (Kapteyn *et al.*, 2001).

El pH óptimo de *S. cerevisiae* es de 5. Sin embargo, esta puede crecer en un rango de pH de 3 a 6. Esta información fue demostrada por Aguilar-Uscanga *et al.* (2005) quienes indican que la levadura *S. cerevisiae* debe adaptarse a su medio y a la condición de cultivo, adoptando cambios durante la fase de crecimiento, principalmente en la composición y estructura de la pared celular ya que reportan que durante la cinética de crecimiento a los diferentes valores de pH, la levadura presentó una velocidad de crecimiento de  $0.18 \text{ h}^{-1}$  a pH 6,  $0.32 \text{ h}^{-1}$  a pH 5,  $0.29 \text{ h}^{-1}$  a pH 4 y  $0.28 \text{ h}^{-1}$  a pH 3. Además, demostraron que la variación de pH del medio de cultivo no afectó la composición de los polisacáridos de la pared celular.

#### **8.1.4. Tolerancia a altas temperaturas**

Otro factor, con el que se que se experimentó, fue la influencia de altas temperaturas, la cual, como se muestra en la Tabla 5, no representó ningún problema en el crecimiento de colonias a  $37^\circ\text{C}$  para ninguna de las cepas. En cambio, para la temperatura de  $42^\circ\text{C}$ , se detectó crecimiento únicamente en dos de las cepas estudiadas (CH-07 y PA-18) y a  $45^\circ\text{C}$  no se detectó crecimiento de ninguna de las cepas.

La respuesta a estrés por calor en levadura es de las mejor estudiadas. Un incremento de 10 a  $15^\circ\text{C}$  por arriba de la temperatura óptima de crecimiento induce la síntesis de un grupo de proteínas llamadas HSP (de las siglas en inglés por Heat Shock Proteins). La mayoría de las proteínas de este grupo son proteasas y chaperonas moleculares que están involucradas en impedir la desnaturalización o inducir la renaturalización de proteínas, la degradación de proteínas mal plegadas

y la disgregación de agregados proteínicos causados por desnaturalización. Algunas de estas proteínas se encuentran también presentes a temperaturas óptimas y, estudios genéticos indican que son proteínas indispensables para mantener el plegamiento correcto de otras proteínas, ensamblar y desensamblar proteínas en estados oligoméricos y degradar proteínas desnaturalizadas o mal plegadas (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Trabajos con *S. cerevisiae* indican que la trehalosa también es crucial para la supervivencia de las levaduras a altas temperaturas. El calor daña las células de diferentes maneras, tal vez la más crítica es la ruptura de la integridad de las membranas causando la desnaturalización de proteínas. La trehalosa impide que las proteínas se desnaturalicen a altas temperaturas. Sin embargo, la estabilización de las proteínas desnaturalizadas por la trehalosa puede interferir con su posterior reactivación y por eso, a menos que la trehalosa sea degradada rápidamente después de choque térmico, el disacárido puede obstaculizar la capacidad de las HSP para resolver el daño inducido por el calor a las proteínas celulares con rapidez (Singer y Lindquist, 1998).

Estudios previos, han demostrado la tolerancia a altas temperaturas de cepas de la levadura *S. cerevisiae* (Carrasco *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2008; Zavala-Nacul, 2013), sin embargo, estos se han realizado dando un choque térmico a la levadura por un periodo corto de tiempo, ya sea de minutos o de pocas horas, con lo que se explica la capacidad de la levadura para soportar altas temperaturas y reponerse del daño. En cambio, en el presente estudio se expusieron las cepas a estrés térmico durante un periodo prolongado de tiempo (24 h) por lo que pudo observarse con mayor claridad la resistencia de las mismas a altas temperaturas.

**Tabla 5.** Crecimiento de las cepas de levaduras en medio de cultivo agar YPD con pH 3 y en agar YPD a distintas temperaturas.

Cepa	pH	Temperatura		
	3	37°C	42°C	45°C
<b>CH-01</b>	5	4	ND	ND
<b>CH-02</b>	4	4	ND	ND
<b>CH-03</b>	4	4	ND	ND
<b>CH-07</b>	4	5	4	ND
<b>D1-01</b>	5	4	ND	ND
<b>D1-14</b>	4	4	ND	ND
<b>DH-I</b>	4	5	ND	ND
<b>DH-2</b>	4	4	ND	ND
<b>DI-03</b>	5	4	ND	ND
<b>DI-10</b>	4	4	ND	ND
<b>DI-11</b>	5	4	ND	ND
<b>DI-12</b>	5	4	ND	ND
<b>FF-07</b>	5	5	ND	ND
<b>FV-10</b>	4	5	ND	ND
<b>FV-11</b>	5	5	ND	ND
<b>FV-13</b>	5	5	ND	ND
<b>LC-12</b>	4	4	ND	ND
<b>LC-14</b>	4	5	ND	ND
<b>PA-16</b>	5	4	ND	ND
<b>PA-18</b>	4	4	4	ND
<b>ZA-06</b>	5	4	ND	ND

*\*Los números 4 y 5 representan diluciones donde se observó crecimiento celular. ND = crecimiento no detectado.*

En las regiones de Oaxaca, de donde provienen las cepas estudiadas, la máxima temperatura ambiente oscila normalmente entre los 25 y 30°C, por lo que en condiciones normales estas cepas no podrían verse

sometidas a un estrés por alta temperatura, pero este análisis serviría si se quisiera utilizar alguna de estas cepas para la producción de otra bebida alcohólica, por ejemplo, para la cachaça brasileña donde, dependiendo de la temporada y la región donde se produzca, se puede alcanzar una temperatura de 41°C durante el proceso de elaboración (Vianna *et al.*, 2008).

## **8.2. Selección de la cepa con mayor tolerancia a estrés**

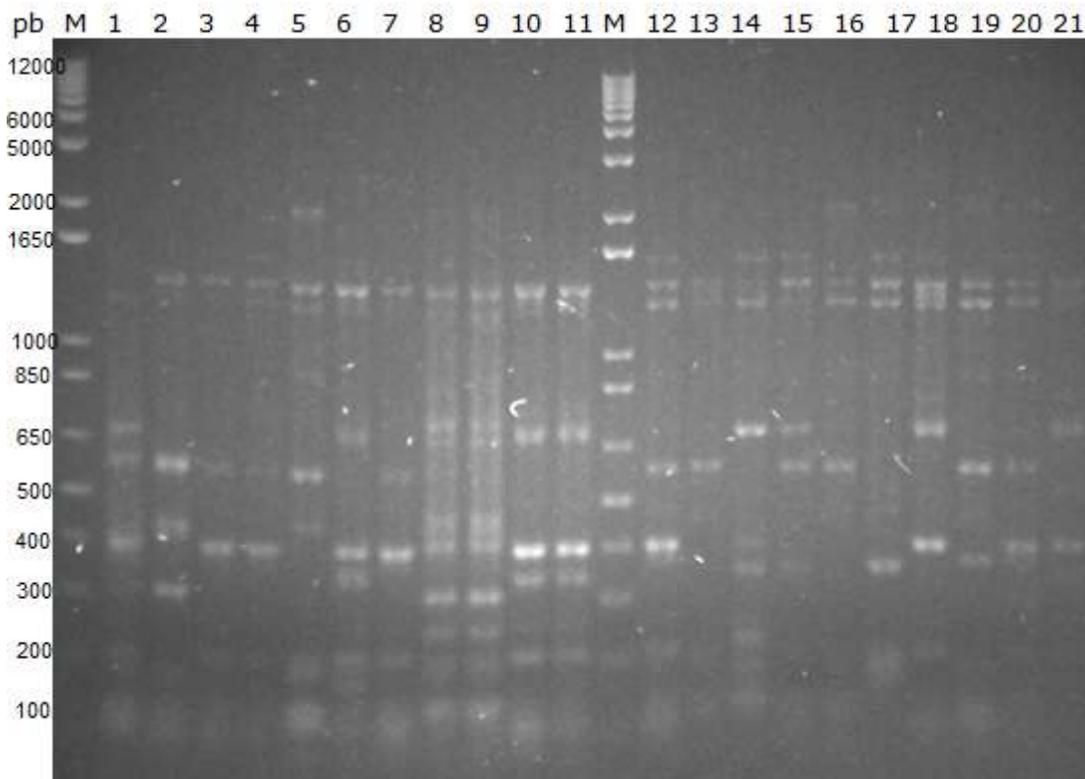
De las 21 cepas de *S. cerevisiae* estudiadas, la cepa con mayor tolerancia al estrés fue PA-18, ya que creció bien en la concentración más alta de etanol (15%) y fue, junto con CH-07, de las únicas que soportaron 42°C.

Pataro *et al.* (2000) mencionan que los cambios en el pH del mosto, el contenido de alcohol, junto con la concentración de azúcar, que se mantiene elevada debido a la adición diaria de jugo de caña de azúcar fresca, afecta la selección y prevalencia de especies y cepas de levaduras involucradas en la elaboración de aguardiente, así como la tolerancia a etanol y la adaptación a la alta acidez, también influyen en la persistencia de algunas especies y la desaparición de otras durante el proceso de fermentación del vino. Esta información confirma, una vez más, la importancia de que las cepas tengan la capacidad de tolerar ciertas condiciones de estrés. Así, los resultados obtenidos en este estudio indican que las cepas de *S. cerevisiae* del mezcal toleran bien las condiciones de estrés a las que pueden ser expuestas durante el proceso de fermentación.

### 8.3. Análisis molecular de las cepas de levaduras

#### 8.3.1. Análisis de fragmentos $\delta$

En la Figura 9 se observa el perfil de los fragmentos  $\delta$  obtenidos mediante PCR utilizando los cebadores  $\delta 12$  y  $\delta 21$  (Legras y Karst, 2003).



**Figura 9.** Amplificación de los fragmentos  $\delta$  mediante PCR empleando los cebadores  $\delta 12$  y  $\delta 21$ . M: marcador de peso molecular; números del 1 al 21 corresponden a cada una de las cepas estudiadas; pb: pares de bases.

En las Tablas 6 y 7 se indica el tamaño en pares de bases (pb) de cada uno de los fragmentos  $\delta$  obtenidos para cada cepa, así como la cantidad de fragmentos obtenidos. En general, el número de fragmentos obtenidos para cada cepa varió en un rango de 4 a 10.

**Tabla 6.** Tamaño (pb) de los fragmentos  $\delta$  obtenidos por PCR para las cepas 1 a la 11.

Cepa	PA-16	LC-12	D1-14	DI-11	CH-01	LC-14	DI-10	DH-2	DH-I	FV-13	FV-10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Fragmentos delta (pb)	1915.5										
	1524.7										
		1391.6	1399.4	1383.7	1336.7	1328.9	1336.7	1328.9	1321.1	1328.9	1344.6
	1289.8	1250.6	1274.1	1266.3	1211.4	1227.1		1203.6	1172.3	1227.1	1242.8
	908.9										
	675.5					654.3		692.6	692.6	658.5	671.3
	586.7	573.3	560	560	543.3		546.7	640	636.7		
		426.3			423.7			439.5	442.1		
	392.9		383.3	378.6		376.2	371.4	390.5	390.5	381	388.1
	298.2	300				326.2		294.6	294.6	326.2	333.3
	200	192.5	201.8	200	190.6	201.8	205.4	239.3	244.6	250	250
						160.4		192.5	198.1	210.7	212.5
	124.5	124.5	124.5	117	113.2		118.9	126.4	120.8	109.4	111.3
<b>Total</b>	7	7	6	7	7	8	5	10	10	8	8

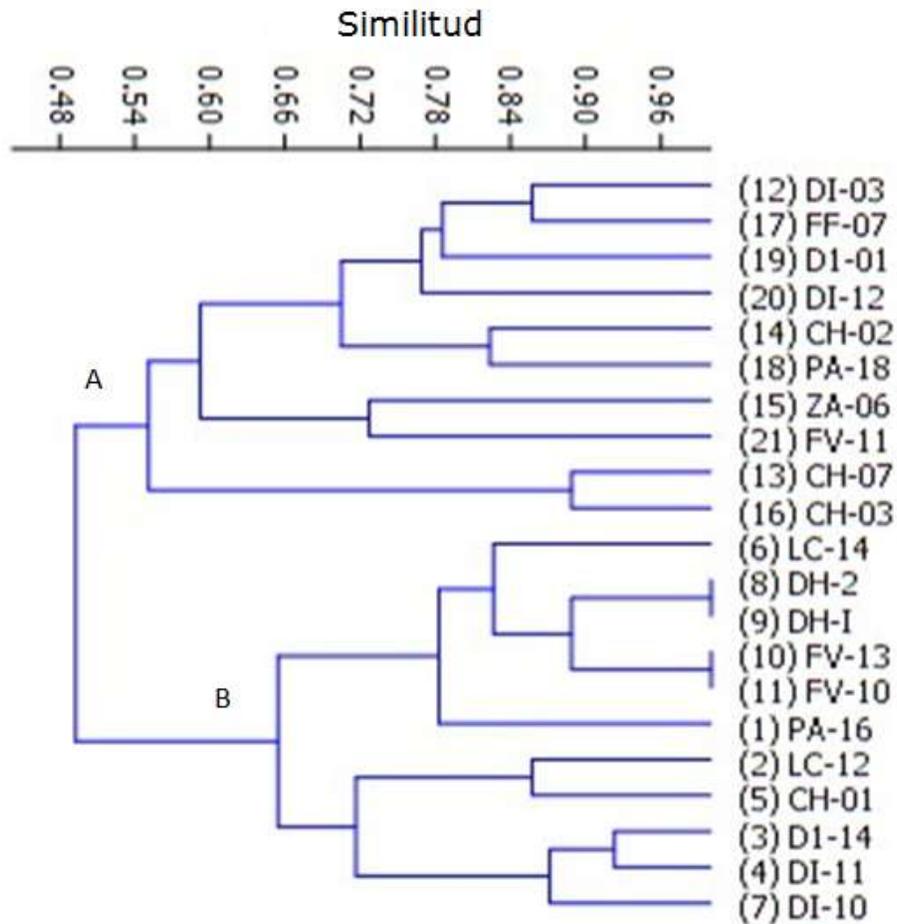
**Tabla 7.** Tamaño (pb) de los fragmentos  $\delta$  obtenidos por PCR para las cepas 12 a la 21.

Cepa	DI-03	CH-07	CH-02	ZA-06	CH-03	FF-07	PA-18	D1-01	DI-12	FV-11	
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Fragmentos delta (pb)	2276.6										
	1610.8		1634.3	1642.2		1610.8	1610.8		1634.3		
	1454.2	1477.7	1477.3	1469.9	1469.9	1454.2	1446.4	1454.2	1462	1469.9	
	1328.9	1352.4	1336.7	1360.2	1352.4	1336.7	1328.9	1328.9	1344.6	1328.9	
	819.6 907.7 942.3										
			702.2	710.9			710.9				710.9
	578.4	595.5		595.5	595.5	595.5		588.6	588.6		
	402.7		405.4			475.7	402.7	478.4		402.7	
	355 357.5 360 342.5										
	208.5		227.7			200	212.8	183	208.5		
	178.7										
	102.1	104.3	123.4		114.9		117	114.9			
	<b>Total</b>	7	4	9	6	5	7	8	7	6	5

El perfil de bandas se agrupó empleando el índice Dice y el software Past versión 3.01. El dendograma obtenido (Figura 10), muestra dos grupos denominados A y B. En el grupo A, las cepas varían en similitud de un 55 a un 89% aproximadamente, sin embargo, en el grupo B, se encuentran cepas de un 66 a 100% de similitud.

De acuerdo a esta prueba molecular, si se presenta el mismo patrón de fragmentos  $\delta$  se considera que se trata de la misma cepa, por lo tanto, tenemos que las cepas DH-2 y DH-I son una misma, así como las cepas

FV-13 y FV-10 son iguales entre sí. No obstante, algunas cepas difieren en similitud entre el 92 y 50%.



**Figura 10.** Agrupamiento de cepas por similitud en el patrón de fragmentos  $\delta$ .

Como se menciona en los antecedentes, este método tiene algunos inconvenientes. Como es el caso de la aparición de bandas “fantasma” debido a la baja temperatura de alineación. El número de fragmentos obtenidos varía con la cantidad de ADN utilizado, por lo que a pesar de haberse estandarizado, es una limitante. Además, este método demuestra un bajo poder discriminatorio para el caso de cepas nativas, las cuales están estrechamente relacionadas a nivel genético (Schuller, 2004, citado en Cova-Pérez, 2010) por lo que este método interdelta se utiliza a menudo para el análisis rutinario de cepas de levadura a nivel

industrial, pero es menos discriminatorio que la electroforesis de campo pulsado (Legras y Karst, 2003).

Se ha demostrado por algunos autores (Legras y Karst, 2003; Schuller *et al.*, 2005; Xufre *et al.*, 2011) que si se utiliza el par de primers  $\delta 12$  (Legras y Karst, 2003) y  $\delta 2$  (Ness *et al.*, 1993) se obtiene una mayor resolución y un mayor poder discriminatorio. Este método resulta rápido, reproducible y muy sensible. Aunado a esta combinación de cebadores Capece *et al.* (2012) realizaron la amplificación de la región interdelta directamente de la colonia de levadura, sin la extracción de ADN, resultando este método el más ventajoso, de los que utilizaron, para la evaluación rápida de la variabilidad genética entre la amplia población de *S. cerevisiae* que estudiaron.

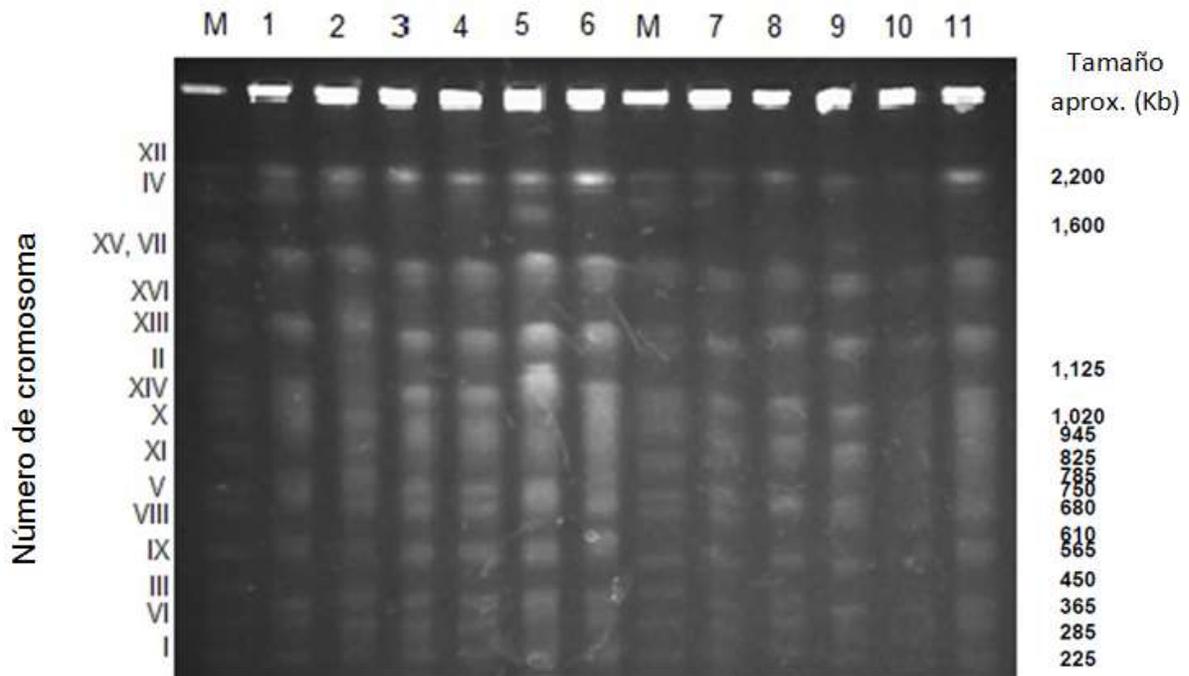
### **8.3.2. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)**

En las Figuras 11 y 12 se pueden observar las imágenes de los geles, que se obtuvieron mediante PFGE, con los perfiles cromosómicos de cada cepa.

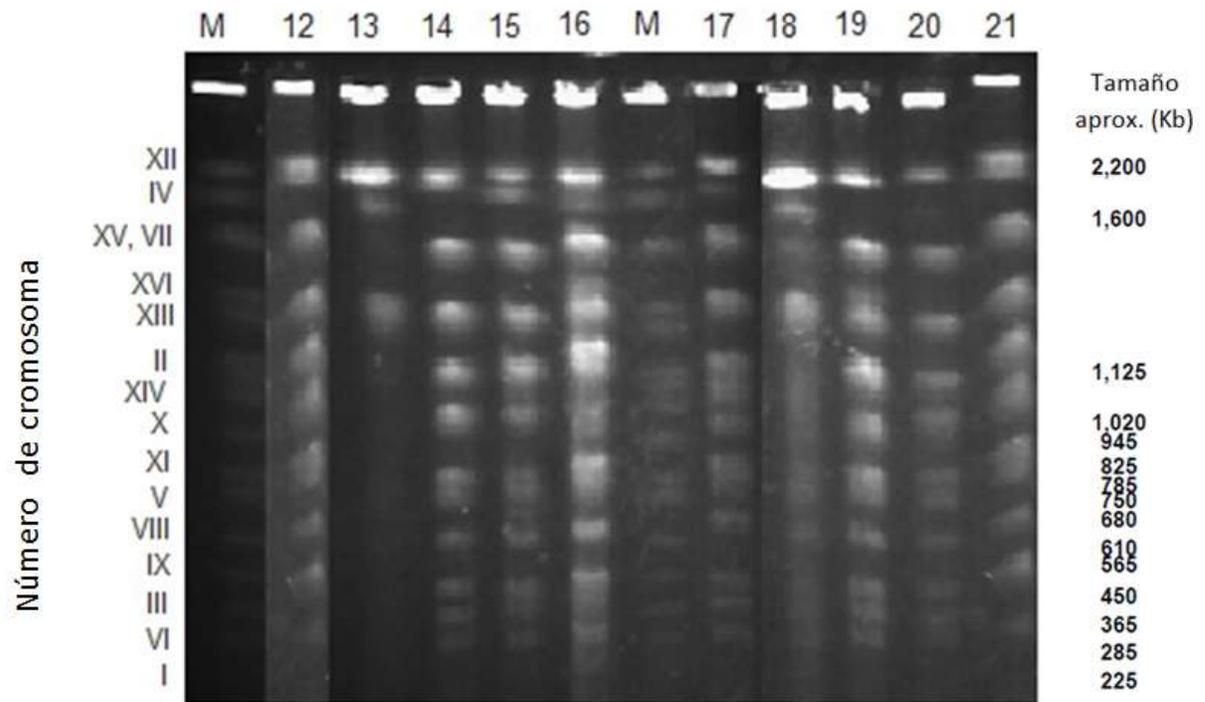
Si se comparan los perfiles obtenidos con el marcador (que se observa con mayor claridad en la Figura 13) se puede notar la ausencia de algunas bandas, lo cual no quiere decir que no se trate de cepas de *S. cerevisiae*, sino que la separación de los cromosomas es por tamaño y el polimorfismo revelado en esta técnica es resultado de la adición o eliminación de fragmentos largos de ADN en cromosomas homólogos durante la evolución del genoma de la levadura (Longo y Vezinhet, 1993; Pérez-Ortín *et al.*, 2002; Fernández-Espinar, 2006).

La cariotipificación cromosómica por electroforesis en gel de campo pulsado es un proceso complejo y lento, pero es muy eficaz para la identificación de las cepas de *S. cerevisiae*, ya que hace posible

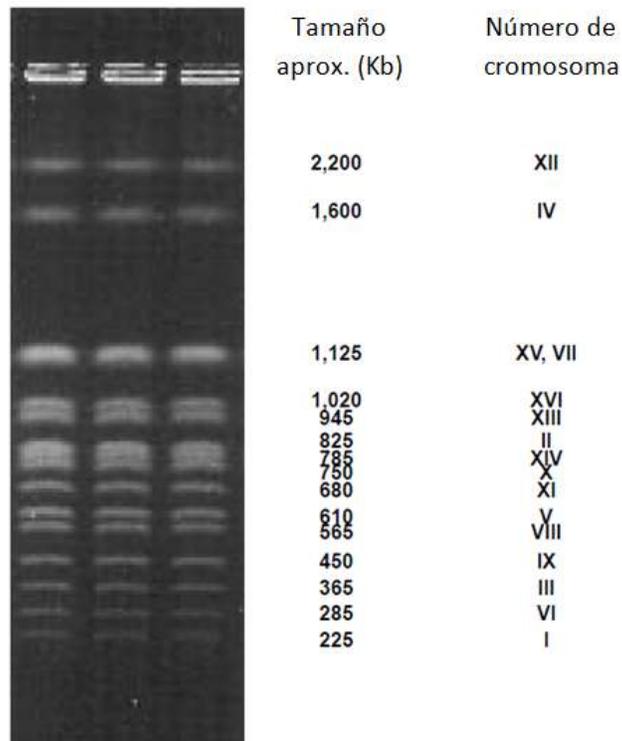
distinguir cepas, tanto en a nivel intra como interespecie (Aparecida-Oliveira *et al.*, 2008). Así, Longo y Vezinhet (1993) realizaron pruebas para obtener los cariotipos electroforéticos de dos cepas de *S. cerevisiae*, una cepa de laboratorio haploide y una cepa salvaje diploide, el cariotipo de la cepa haploide fue muy estable; sin embargo, la cepa diploide sufrió modificaciones frecuentes. En la mayoría de los casos el número de bandas se redujo, pero ocasionalmente se observaron una banda dividida en dos. Estudiaron principalmente los diferentes tamaños de los cromosomas I y VI, así como los cromosomas VIII y V. Llegaron a la conclusión de que el polimorfismo de la longitud cromosómica observada en las cepas silvestres de *S. cerevisiae* podría explicarse en parte por la reorganización de la estructura cromosómica que se produce durante la mitosis.



**Figura 11.** Imagen del gel obtenido por PFGE de las cepas 1 a la 11.



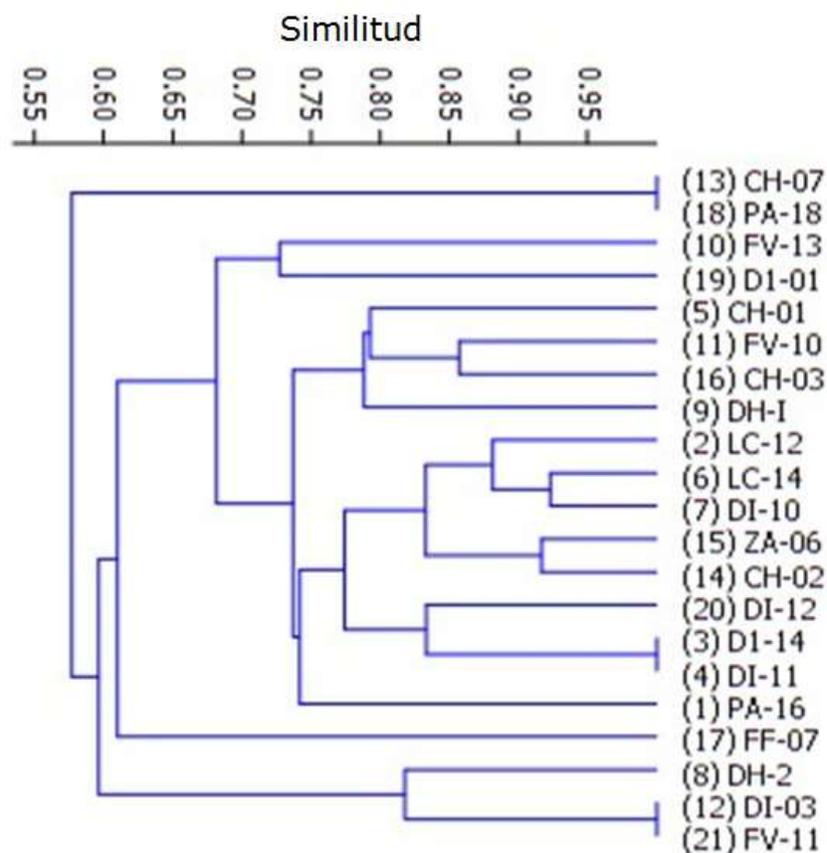
**Figura 12.** Imagen del gel obtenido por PFGE de las cepas 12 a la 21.



**Figura 13.** Perfil de separación de los cromosomas de *S. cerevisiae* (YNN295 Bio-Rad).

La alta diversidad de cariotipo en cepas de *S. cerevisiae* ha sido reportada por Csoma *et al.* (2010), quienes mencionan que el genoma de *S. cerevisiae* puede ser más flexible que el genoma de *S. uvarum* y por lo tanto puede permitir una adaptación más rápida y más eficiente a los cambios del entorno de forma continua durante la fermentación debido a que sus cambios pueden resultar en diversas subpoblaciones. Es posible que estos cambios puedan contribuir significativamente a la singularidad de un vino.

El perfil de bandas se agrupó empleando el índice Jaccard y el software Past versión 3.01. El dendograma obtenido (Figura 14), muestra el agrupamiento en el cual se pueden observar 18 patrones distintos con similitudes del 58 al 92% entre sí.



**Figura 14.** Agrupamiento de cepas por similitud en el patrón de PFGE.

De acuerdo al Figura 14, las cepas CH-07 y PA-18 son iguales, así como D1-14 y DI-11, y también DI-03 y FV-11.

Lo anterior se puede confirmar con las pruebas de tolerancia, ya que CH-07 y PA-18, presentaron un comportamiento similar y destacado, al ser las que tuvieron mejor crecimiento en las concentraciones de etanol. De igual manera fueron las únicas dos cepas capaces de tolerar los 42°C. Sin embargo, provienen de regiones distintas.

Para las cepas D1-14 y DI-11 la mayor coincidencia es que ambas provienen de la misma región.

En el caso de DI-03 y FV-11 son cepas provenientes de dos regiones diferentes, pero presentan similitudes en las pruebas de tolerancia.

## 9. CONCLUSIONES

- Se demostró que las 21 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estudiadas son capaces de tolerar concentraciones altas de azúcares como glucosa (20, 25 y 30% (p/v)) y sacarosa (10, 15 y 20% (p/v)).
- Solamente las cepas CH-07, LC-12 y PA-18 crecieron a las 24 h. de incubación en 8 y 10% de etanol, pero de ellas, solo PA-18 tuvo buen crecimiento en concentración del 15% después de 6 días.
- Se demostró que todas las cepas son viables a pH 3, por lo que este pH ácido no es una condición de estrés para *Saccharomyces cerevisiae* ya que no afecta el crecimiento celular de la levadura.
- Se comprobó que todas las cepas crecen a 37°C.
- Solamente las cepas CH-07 y PA-18 son capaces de tolerar los 42°C.
- Ninguna de las cepas estudiadas es capaz de tolerar 45°C.
- El método de fragmentos  $\delta$  presenta un bajo poder discriminatorio para cepas nativas.
- Las cepas CH-07 y PA-18 son iguales, así como D1-14 y DI-11, y también DI-03 y FV-11.

A pesar de presentar características similares en cuanto a las tolerancias que presentan ante las diferentes condiciones de estrés, todas las cepas restantes son diferentes entre sí, por lo tanto la región y los factores propios del medio ambiente son factores que influyen directamente en las características de cada cepa.

## 10. PERSPECTIVAS

El mezcal es una bebida artesanal mexicana que tiene denominación de origen en varios estados, incluyendo Oaxaca, y sin embargo, existen muy pocos estudios acerca de la microbiología del mismo. Se necesitan más estudios sobre el proceso de elaboración del mezcal, no solamente durante la fermentación, sino también de las otras etapas de elaboración como son la molienda, el cocido de las piñas y la destilación, aunque es durante la fermentación que ocurren los procesos biológicos que determinan en gran medida la calidad final del producto (Arratia-Mireles, 2009).

Dentro de los objetivos a futuro se encuentran:

- ✓ Incluir estudios de tolerancia a condiciones de estrés de manera simultánea, como estrés a bajo pH y alta temperatura, estrés a alta temperatura y alta concentración de etanol, estrés con alta concentración de azúcar y alta concentración de etanol, lo cual permitiría conocer de manera más apropiada la capacidad de tolerancia de las cepas y su adaptación en un ambiente similar al de una fermentación.
  
- ✓ Realizar fermentaciones de mezcal con las cepas que mostraron diferencias moleculares y, mediante pruebas en HPLC, estudiar las diferencias existentes en la producción de compuestos volátiles.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Uscanga, B., Solis-Pacheco, J. y François, J., 2005. Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *e-Gnosis*, 3, pp. 1-8.

Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S. y Blondin, B., 2001. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 498, pp. 98-103.

Aparecida-Oliveira, V., Araújo-Vicente, M., Gomes-Fietto, L., de Miranda-Castro, I., Coutrim, M. X., Schüller, D., Alves, H., Casal, M., de Oliveira-Santos, J., Dias-Araújo, L., Alves da Silva, P. H., Lopes-Brandão, R., 2008. Biochemical and Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Obtained from Sugar-Cane Juice Fermentations and Their Impact in Cachaça Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), pp. 693-701.

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

Badotti, F., Belloch, C., Rosa, C. A., Barrio, E. y Querol, A., 2010. Physiological and molecular characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* cachaça strains isolated from different geographic regions in Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, pp. 579–587.

Barnett, J. A., 1992. The Taxonomy of the Genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: a Short Review for Non-taxonomists. *Yeast*, 8, pp. 1-23.

Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E. y Querol, A., 2008. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *International Journal of Food Microbiology*, 122, pp. 188–195.

Bolotin-Fukuhara, M., 2006. Genomics and Biodiversity in Yeast. **En:** C. Rosa y G. Péter eds. *The Yeast Handbook Volume 1: Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 45-66.

Buitrago-Estrada, J. C. y Tenjo-Camacho, D. G., 2007. *Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de Grado Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá, D.C.

Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G. y Romano, P., 2012. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian "heroic vine-growing area". *Food Microbiology*, 31, pp. 159-166.

Carrasco, P., Querol, A. y del Olmo, M., 2001. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology*, 175, pp. 450-457.

Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F. y Martini, A., 2004. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85, pp. 159-164.

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

CRM, 2014. *Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal COMERCAM*. [En línea] (Actualizado al 13 de febrero de 2014). Disponible en: <http://www.crm.org.mx/> [Último acceso el 1 de marzo de 2014].

Csoma, H., Zakany, N., Capece, A., Romano, P. y Sipiczki M., 2010. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 140, pp. 239-248.

Dake, M. S., Jadhv, J. P. y Patil, N. B., 2010. Variations of two pools of glycogen and carbohydrate in *Saccharomyces cerevisiae* grown with various ethanol concentrations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, pp. 701-706.

De Barros-Lopes, M., Soden, A., Martens, A. L., Henschke, P. A. y Langridge, P., 1998. Differentiation and species identification of yeast using PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, pp. 279-286.

Deak, T., 2006. Environmental Factors Influencing Yeasts. **En:** C. Rosa y G. Péter eds. *The Yeast Handbook Volume 1: Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 155-174.

Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D. y Zhang, K., 2009. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mini-Review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, pp. 253-263.

Fernández-Espinar, M. T., López, V., Ramón, D., Bartra, E. y Querol, A., 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 70, pp. 1-10.

Fernández-Espinar, M. T., Martorell, P., De Llanos, R. y Querol, A., 2006. Molecular Methods to Identify and Characterize Yeasts in Foods and Beverages. **En:** A. Querol y G. Fleet eds. *The Yeast Handbook Volume 2: Yeasts in Food and Beverages*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 54-82.

Fleet, G. H., 2006. The Commercial and Community Significance of Yeast in Food and Beverage Production. **En:** A. Querol y G. Fleet eds. *The Yeast Handbook Volume 2: Yeasts in Food and Beverages*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 1-12.

Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F. y Covarrubias, A., 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46 (1-2), pp. 24-46.

Garay-Arroyo, A., Covarrubias, A. A., Clark, I., Niño, I., Gosset, G. y Martínez, A., 2004. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, pp. 734-741.

García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R. y López-Munguía, A., 2004. *Biología Alimentaria*. D.F.: Editorial Limusa.

Gasch, A. P., 2003. The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. **En:** S. Hohmann y W. H. Mager eds. *Topics in Current Genetics, Vol. 1, Yeast Stress Responses*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 11-70.

Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P. R., Powell, C. D. y Smart, K. A., 2007. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling: A review. *FEMS Microbiology Review*, 31, pp. 535-569.

Granek, J. A. y Magwene, P. M., 2010. Environmental and Genetic Determinants of Colony Morphology in Yeast. *PLoS Genetics*, 6(1).

Granich, C. I., Giovannucci, D. y Bautista C., 2009. La Dinámica Territorial de la Zona Mezcalera de Oaxaca Entre la Cultura y el Comercio. Centro Latinoamericano para el Desarrollo Rural.

Johnston, J. R., 1994. *Molecular Genetics of Yeast. A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.

Kapteyn, J. C., ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H. y Klis, F. M., 2001. Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Molecular Microbiology*, 39(2), pp. 469-479.

Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A. y Gschaedler-Mathis A., 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages: A minireview. *FEMS Yeast Research*, 8, pp. 1037-1052.

Legras, J. L. y Karst, F., 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 221, pp. 249-255.

Longo, E. y Vezinhet, F., 1993. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), pp. 322-326.

Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. y Clark, D., 2009. *Brock Biología de los Microorganismos*. Duodécima edición. Madrid: Pearson Educación.

Maule, J., 1998. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Review. *Molecular Biotechnology*, 9(2), pp. 107-126.

Nassonova, E. S., 2008. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Theory, Instruments and Application. *Cell and Tissue Biology*, 2(6), pp. 557-565.

Ness, F., Lavallée, F., Dubordieu, D., Aigle, M., y Dulau, L., 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, pp. 89-94.

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

Páez, J., Córdova, E., Soto, Ó., Barrio, E., Belloch, C. y Rutiaga-Quiñones, O. M., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* strains with robust responses to fermentation stresses isolated from the alcoholic fermentation of *Agave duranguensis* musts. *African Journal of Microbiology Research*, 5(8), pp. 865-871.

Pataro, C., Guerra, J. B., Petrillo-Peixoto, M. L., Mendonça-Hagler, L. C., Linardi, V. R. y Rosa, C. A., 2000. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 89, pp. 24-31.

Pérez-Ortín, J. E., Querol, A., Puig, S. y Barrio, E., 2002. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement in the adaptative evolution of yeast strains. *Genome Research. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 12, pp. 1533-1539.

PRE, 2004. *Plan Rector Estatal del Sistema Producto Maguey-Mezcal*. Sistema Producto Maguey-Mezcal, la SAGARPA-Delegación Oaxaca y la SEDAF del Gobierno del Estado de Oaxaca a través del Consejo Oaxaqueño del Maguey y Mezcal A.C. [PDF]. Disponible en: <http://www.amsda.com.mx/PREstatales/Estatales/OAXACA/PREmezc al.pdf> [Último acceso el 28 de febrero de 2014]

Priest, F. G. y Campbell, I., 1996. *Brewing Microbiology*. Second edition. London: Chapman & Hall.

Ramirez-Córdova, J., Drnevich, J., Madrigal-Pulido, J. A., Arrizon, J., Allen, K., Martínez-Velázquez, M. y Álvarez-Maya, I., 2012. Transcriptome analysis identifies genes involved in ethanol response of *Saccharomyces cerevisiae* in *Agave tequilana* juice. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102, pp. 247–255.

Romano, P., Capece, A. y Jespersen, L., 2006. Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts. **En:** A. Querol y G. Fleet eds. *The Yeast Handbook Volume 2: Yeasts in Food and Beverages*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 13-53.

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*. Tesis de Licenciatura. Relaciones Internacionales. Departamento de Relaciones Internacionales e Historia, Escuela de Ciencias Sociales, Universidad de las Américas Puebla.

Santiago-Urbina, J. A., 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.

SECOFI, 1994. *NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones*. Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Raúl Ramos Tercero.

Sectorial, 2011. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial. Financiera Rural. Monografía del Mezcal.

Serra, A., Strehaiano, P. y 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, pp. 257-265.

Shuller, D., Valero, E., Dequin, S. y Casal, M., 2004. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS. Microbiology Letters*, 231, pp. 19-26.

Singer, M. A. y Lindquist, S., 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Ying and Yang of trehalose. Review. *Trends in Biotechnology*, 16, pp. 460-468.

SNMM, 2005. *Plan Rector Sistema Nacional Maguey-Mezcal*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGRAPA), Tecnológico de Monterrey-INCA-Rural. [PDF] (Actualizado al 31 de julio de 2006). Disponible en: <http://www.sientemezcal.com/pdf/PlanRector.pdf> [Último acceso el 27 de febrero de 2014]

Stratford, M., 2006. Food and Beverage Spoilage Yeast. **En:** A. Querol y G. Fleet eds. *The Yeast Handbook Volume 2: Yeasts in Food and Beverages*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 335-379.

Tanghe, A., Prior, B. y Thevelein, J. M., 2006. Yeast Responses to Stresses. **En:** C. Rosa y G. Péter eds. *The Yeast Handbook Volume 1: Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 175-195.

Vianna, C. R., Silva, C. L., Neves, M. J. y Rosa, C. A., 2008. *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93, pp. 205-217.

Walker, G. M. y Van Dijck, P., 2006. Physiological and Molecular Responses of Yeast to the Environment. **En:** A. Querol y G. Fleet eds. *The Yeast Handbook Volume 2: Yeasts in Food and Beverages*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 111-152.

Xufre, A., Albergaria, H., Gírio, F. y Spencer-Martins, I., 2011. Use of interdelta polymorphisms of *Saccharomyces cerevisiae* strains to monitor population evolution during wine fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, pp. 127-132.

Zavala-Nacul, H., 2013. *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 de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

## 12. ANEXO

Composición de los medios de cultivo utilizados.

- Medio líquido YPD  
1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de dextrosa y agua destilada.
- Medio YPDA  
1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de dextrosa, 1.5% de agar y agua destilada.
- Agar YPD con glucosa  
1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 1.5% de agar, 20%, 25%, 30% de dextrosa y agua destilada.
- Agar YPD con sacarosa  
1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 1.5% de agar, 10%, 15% y 20% de sacarosa y agua destilada.
- Agar YPD con etanol  
1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de dextrosa, 1.5% de agar, 8%, 10%, 12% y 15% de etanol, y agua destilada.
- Agar YPD pH 3  
1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de dextrosa, 3% de agar y agua destilada acidificada con 0.6% de HCl 1N.