

TIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* AISLADAS DE LAS FERMENTACIONES DE PULQUE, TEQUILA Y MEZCAL.

Cecilia Cova Pérez, Francisco Ruiz Terán, Depto de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E Lab 321 .
Fac. de Química. UNAM. Fax: 56225309, ceci_chisa @ hotmail. com.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, tipificación, fermentaciones de agave.

Introducción. El maguey (*Agave spp*) es una planta de origen en mexicano de la cual se obtienen una variedad de bebidas entre las que destacan el pulque y los destilados como el tequila y el mezcal. En la elaboración de estas bebidas durante el proceso de fermentación se producen los diversos compuestos responsables del sabor y aroma característicos de las mismas. Además se sabe que en estas fermentaciones alcohólicas *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura predominante y se ha observado, que dependiendo de la cepa de *S. cerevisiae* utilizada se generan diferencias en el sabor y aroma debidas a la producción de distintos compuestos congénicos (1). Por consiguiente la tipificación a nivel molecular de las diversas cepas nos ayudará a establecer una relación entre la cepa y el sabor y el aroma generado.

El objetivo del presente trabajo es establecer las diferencias, a nivel molecular mediante la tipificación de *Saccharomyces cerevisiae*, entre las cepas obtenidas de una fermentación de tequila, mezcal y pulque.

Metodología. La identificación de las cepas se realizó por PCR-RFLP enfocado en dos regiones diferentes: a).La región 5.8S-ITS, utilizando los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTTATTATTGATATGC-.3') con las enzimas de restricción *CfoI* *HaeIII* y *HinfI* (2). b) El gen MET2 utilizando los primers metfw (5'CGGCTCAGACGAAAA CGTCCAAGAGCTGG-3') y metrev (5'CGGCTCAGA GACCACGATATGCACCAG GCAG-3') con las enzimas *EcoRI* y *PstI*. (3).

Una vez identificadas, la tipificación de las cepas de *S.cerevisiae* se llevó a cabo empleando dos técnicas: a) Amplificación de las regiones interδ por PCR, para lo cual se utilizaron los primers δ12 (5'-ATTCCAACAAC TCGACT-3') y δ21 (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3') (a). b) Electroforesis en campo pulsado (PFGE), el DNA cromosomal utilizado para ésta técnica fue preparado en tapones de agarosa utilizando el yeast genomic DNA plug kit (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados y discusión .En las tablas 1 y 2 se reporta el tamaño de los productos de PCR y de los fragmentos de restricción con los cuales, se identificaron 9 cepas procedentes de las fermentaciones de agave como *Sacchoromyces.cereviae*.

Tabla 1 Tamaño en pb de la región 5.8S-ITS y de los fragmentos de restricción obtenidos.

Muestra	5.8S-ITS	Fragmentos de restricción		
		HaeIII	CofI	HinfI
(2)Valor reportado	850	325+230+170+125	375+325+150	375+365+110
M1,M2,M3	870	320+245+165+135	380+325+145	
T1,T2,T3	868	316+233+178+145	386+330+145	380+100
P1,P2,P3	870	320+245+165+135	380+325+145	

Tabla 2 Tamaño en pb de la región 5.8S-ITS y de los fragmentos de restricción obtenidos.

(3)Muestra	Met2	Fragmentos de restricción EcoRI
Valor reportado	585	369+211
M1,M2,M3	575	342+224
T1,T2,T3	570	340+220
P1,P2,P3	570	340+220

En la fig. 1 se reportan las diferencias de los patrones de separación de los cromosomas para las cepas de *S.cerevisiae* provenientes del tequila.

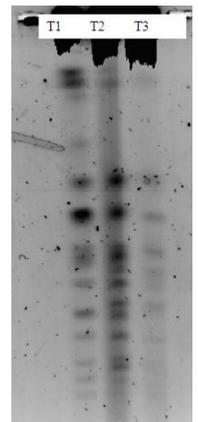


Fig. 1 Gel de PFGE para las cepas de tequila

Conclusiones. Se identificaron las cepas de *S. Cerevisiae* aisladas de las fermentaciones de agave por medio de los patrones de restricción del gen MET2 y la región ITS. Se logró establecer la diferencia genotípica entre las cepas de *S.cerevisiae* provenientes de las fermentaciones de agave.

Bibliografía.

1. Fleet G. Growth of yeasts during wine fermentation. (1990). *Journal of wine research*. 1(3) 211-219.
2. Fernández E, Esteve-Zarzoso B, Querol A, Barrio E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5,8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*. 78 (1) 87-97.
3. Masneuf S, Hansen J. Groth C., Piskur J., Dubourdieu D. New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. (1998) *Applied and environmental microbiology*. 64, (10) 3887-3892
4. Legras J, Karst F. Optimization of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. (2003). *FEMS Microbiology Letters*. 221 (2) 249-255