

# **UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

## **T E S I S**

**ESTUDIO DE LAS RELACIONES  
FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES  
ENTRE CEPAS DE  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*  
ASOCIADAS A LA TABERNA,  
BEBIDA EXTRAÍDA DE LA PALMA DE  
COYOL (*ACROCOMIA ACULEATA*,  
JACQ. LODD EX. MART).**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN  
BIODIVERSIDAD DE  
ECOSISTEMAS TROPICALES**

PRESENTA

**MARITZA TAWAS PENAGOS**



TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

Noviembre 2022

# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## T E S I S

ESTUDIO DE LAS RELACIONES  
FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES ENTRE  
CEPAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*  
ASOCIADAS A LA TABERNA, BEBIDA  
EXTRAÍDA DE LA PALMA DE COYOL  
(*ACROCOMIA ACULEATA*. JACQ. LODD EX.  
MART).

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD  
DE ECOSISTEMAS TROPICALES

PRESENTA  
MARITZA TAWAS PENAGOS

Directora  
DRA. ALMA GABRIELA VERDUGO VALDEZ  
UNICACH

Co-Directora  
DRA. PATRICIA ESTER LAPPE OLIVERAS  
UNAM

Asesora  
DRA. CAROLINA ORANTES GARCÍA  
UNICACH

Asesora  
DRA. MARÍA SILVIA SÁNCHEZ CORTES  
UNICACH

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

25 de Noviembre de 2022



Dedico esta tesis a mis padres,  
porque gracias a su apoyo he logrado  
cada uno de mis objetivos

# AGRADECIMIENTOS

Este apartado es exclusivo para todas esas personitas que estuvieron presentes durante todo el esfuerzo realizado durante este trabajo. Principalmente agradezco a mis directoras por el haber confiado en mí durante este trabajo. A la Dra. Alma le agradezco su guía, confianza y dedicación. La paciencia que tuvo conmigo cuando mis pequeñas levaduras no querían cooperar, el esfuerzo que también tuvo que realizar para que este trabajo pudiera concluirse, así como el apoyo económico cuando se nos acabaron los recursos. A la Dra. Patricia Lappe le agradezco el apoyo en el trabajo, su tiempo y dedicación para que esto fuera posible.

A Andy, Evelyn y Karen, les agradezco el haber estado ahí, impidiendo que todo esto se saliera de control en el último momento. Agradezco a mis profesores el haberme transmitido ese conocimiento que fue bien implementado en el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a mis padres por la paciencia, apoyo y confianza en que su hija podría lograr este proyecto. Agradezco a mi hermana, mi cuñado y a mi sobrina por estar ahí en los momentos difíciles.

Le agradezco a la universidad por permitirme estar en el posgrado y por último pero no menos importante, agradezco a CONACYT por la confianza y el apoyo tanto académico como económico para que este proyecto pudiera lograrse con éxito.

## ÍNDICE O CAPITULADO

1. INTRODUCCIÓN.....	1.
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3.
3. JUSTIFICACIÓN.....	4.
4. MARCO TEÓRICO.....	5.
4.1 Generalidades de la materia prima y la bebida.....	5.
4.2 Descripción botánica y taxonómica de <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq. Lodd ex. Mart).....	6.
4.3 Origen y distribución.....	7.
4.4 Usos de la planta <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq. Lodd ex. Mart).....	8.
4.5 Procesos metabólicos básicos.....	8.
4.5.1 Metabolismo anaerobio de los hidratos de carbono.....	9.
4.5.2 Fermentación homolítica.....	11.
4.5.3 Fermentación alcohólica.....	12.
4.5.4 Metabolismo del nitrógeno.....	14.
4.6 Microorganismos en la fermentación.....	15.
4.7 Generalidades de las levaduras.....	18.
4.7.1 Formación de ascosporas.....	19.
4.8 Factores que afectan el crecimiento en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Meyen ex E.C.Hansen) y sus mecanismos para enfrentarlo.....	22.
4.8.1 Respuesta a cambios de temperatura.....	22.
4.8.2 Respuesta a cambios de presión osmótica.....	24.
4.8.3 Tolerancia al estrés por etanol.....	28.
4.9 Pruebas moleculares para determinación de diversidad biológica en levaduras.....	30.
4.9.1 AP-PCR (Iniciadores arbitrarios con la reacción en cadena de la polimerasa (AP-PCR).....	30.
4.9.2 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	31.
4.10 Aplicaciones biotecnológicas de las levaduras.....	31.
5. ANTECEDENTES.....	33.
6. HIPÓTESIS.....	36.
7. OBJETIVOS.....	36.

8. MATERIALES Y MÉTODO.....	37.
8.1 Material biológico.....	37.
8.2 Caracterización macroscópica de levaduras.....	37.
8.3 Formación de ascas y ascosporas.....	37.
8.4 Caracterización fisiológica de levaduras.....	37.
8.4.1 Evaluación de crecimiento a diferentes temperaturas .....	37.
8.4.2 Evaluación de crecimiento a diferentes presiones osmóticas .....	38.
8.4.3 Tolerancia a diferentes concentraciones de etanol .....	39.
8.4.4 Fermentación de carbohidratos.....	39.
8.5 Caracterización molecular.....	40.
8.5.1 Extracción de ADN.....	40.
8.5.2 Análisis de la amplificación con primers o iniciadores arbitrarios con la reacción en cadena de la polimerasa (AP-PCR) .....	41.
8.5.3 Análisis PCR-RFLP de rDNA.....	42.
9. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	43.
9.1 Análisis estadístico.....	43.
10. RESULTADOS.....	44.
10.1 Caracterización macroscópica.....	44.
10.2 Formación de ascas y ascosporas.....	47.
10.3 Caracterización fisiológica.....	48.
10.4 Caracterización molecular.....	53.
10.4.1 Análisis de amplificación arbitraria con reacción en cadena de polimerasa (AP-PCR) .....	53.
10.4.2 Análisis RFLP de las regiones ITS 5.8s y NTS.....	59.
10.4.3 Análisis de la caracterización molecular.....	63.
10.4.4 Análisis de la caracterización molecular y fisiológica.....	68.
11. DISCUSIÓN.....	70.
12. CONCLUSIÓN .....	74.
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Elaboración de la taberna.....	6.
Figura 2. Esquema del ciclo biológico de <i>S. cerevisiae</i> .....	20.
Figura 3. Representación esquemática de las funciones celulares en la osmorregulación de levaduras.....	24.
Figura 4. Pruebas de fermentación de carbohidratos utilizando tubos de Durham.....	40.
Figura 5. Ascas y ascosporas producidas por los aislados de <i>S. cerevisiae</i> en el medio.....	48.
Figura 6. Análisis de las características fisiológicas (termotolerancia, osmotolerancia, tolerancia a etanol y fermentación de carbohidratos) de los diferentes aislados con UPGMA.....	52.
Figura 7. Perfil de bandas de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido por AP-PCR con el microsatélite (CAG) <sub>5</sub> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100pb.....	53.
Figura 8. Perfil de bandas de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido por AP-PCR con el microsatélite (GAC) <sub>5</sub> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	53.
Figura 9. Perfiles de bandas de los diferentes aislados de <i>S. cerevisiae</i> obtenido por AP-PCR con el microsatélite MR, en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	54.
Figura 10. Análisis con UPGMA del patrón de bandas de los diferentes aislados obtenidos con el microsatélite (CAG) <sub>5</sub> .....	55.
Figura 11. Análisis de UPGMA del perfil de bandas de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenidos con el microsatélite (GAC) <sub>5</sub> .....	56.
Figura 12. Análisis con UPGMA del perfil de bandas de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenidos con el microsatélite MR.....	57.
Figura 13. Análisis con UPGMA del perfil de bandas de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con los microsatélites (GAC) <sub>5</sub> , (CAG) <sub>5</sub> y MR.....	58.
Figura 14. Productos de amplificación por PCR de la región ITS-5.8S de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	59.
Figura 15. Productos de amplificación por PCR de la región NTS de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	59.
Figura 16. Perfiles de bandas de la región ITS-5.8S de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con la enzima de restricción <i>AluI</i> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	60.
Figura 17. Perfiles de bandas de la región ITS-5.8S de los aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido con la enzima de restricción <i>MspI</i> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	60.

Figura 18. Perfiles de bandas de la región ITS-5.8S de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenidos con la enzima de restricción <i>HaeIII</i> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	60.
Figura 19. Perfiles de bandas de la región ITS-5.8S de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido con la enzima de restricción <i>TaqI</i> en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	61.
Figura 20. Perfiles de bandas de la región NTS de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido con la enzima de restricción <i>AluI</i> en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	61.
Figura 21. Perfiles de bandas de la región NTS de los aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido con la enzima de restricción <i>TaqI</i> en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 5000 pb.....	62.
Figura 22. Perfiles de bandas de la región NTS de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> obtenido con la enzima de restricción <i>HaeIII</i> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	62.
Figura 23. Perfiles de bandas de la región NTS de los aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido con la enzima de restricción <i>MspI</i> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 5000 pb.....	63.
Figura 24. Análisis de la caracterización molecular RFLP de las regiones ITS-5.8S y NTS en aislados de <i>S. cerevisiae</i> .....	65.
Figura 25. Análisis UPGMA de la caracterización molecular (AP-PCR y análisis RFLP de las regiones ITS 5.8S y NTS) en aislados de <i>S. cerevisiae</i> .....	67.
Figura 26. Análisis con UPGMA de la caracterización fisiológica y molecular de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> .....	69.

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Características de las colonias gigantes de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> crecidas en WL agar durante 3 semanas. (BJ: Localidad Benito Juárez, TL: Localidad Tierra y Libertad, 0, i, f; etapas inicial, intermedia y final, respectivamente) .....	44.
Cuadro 2. Caracterización de los aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> respecto a la formación de ascosporas, termotolerancia, osmotolerancia y tolerancia a 0.1 y 0.01% de cicloheximida .....	49.
Cuadro 3. Tolerancia de los diferentes aislados de <i>S. cerevisiae</i> a distintas concentraciones de etanol ...	50.
Cuadro 4. Pruebas de fermentación de carbohidratos por aislados de <i>S. cerevisiae</i> .....	51
Cuadro 5. Perfiles de bandas obtenidos por AP-PCR con los microsatélites (GAG) <sub>5</sub> , (GAC) <sub>5</sub> y MR, y RFLP con las enzimas de restricción <i>HaeIII</i> , <i>MspI</i> , <i>TaqI</i> , <i>AluI</i> de las regiones ITS-5.8S Y NTS de todos los aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aislados de diferentes etapas de fermentación de taberna elaborada en las localidades de Benito Juárez y Tierra y Libertad, Chiapas.....	65.

## RESUMEN

La taberna es una bebida tradicional que se elabora a partir de la fermentación de la savia extraída de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*). Se produce en diferentes países, desde México hasta Centroamérica y consume principalmente durante la época de cuaresma; es una bebida que tiene un valor importante para la población indígena y mestiza de dichas regiones. En el estado de Chiapas, es una bebida a la que se le atribuyen además diversas propiedades medicinales. Durante el proceso de fermentación de la savia se registra un cambio tanto en la composición química como en la presencia de los microorganismos involucrados, entre los que se ha observado a la especie *Saccharomyces cerevisiae* como levadura mayoritaria. En un estudio previo sobre la microbiología de la taberna elaborada en dos localidades de Chiapas, Benito Juárez en el Municipio de Villaflores y Tierra y Libertad en el municipio de Jiquipilas, se observó que los aislados de *S. cerevisiae* recuperados de las distintas etapas de fermentación de la bebida, presentaron diferencias en su morfología colonial. Por ello el objetivo del presente estudio fue evaluar las características morfológicas, fisiológicas y molecular de los 21 aislados de *S. cerevisiae*, obtenidos durante las tres etapas del proceso fermentativo de la taberna elaborada en las localidades mencionadas, analizando la posible relación entre dichas características con las etapas del proceso y las localidades de donde fueron obtenidos los aislados.

Las características morfológicas permitieron la formación de ocho grupos en función del color, forma, borde, elevación y textura. De acuerdo a la caracterización fisiológica y utilizando el análisis estadístico ANOSIM de una sola vía se observó que existen diferencias significativas ( $R^2=0.46$  y  $p= 0.0006$ ) en cuanto a la localidad y a la respuesta fisiológica de los aislados. Además, se observó que los aislados obtenidos de la comunidad Tierra y Libertad presentaron características fisiológicas distintivas que podrían considerarse con un alto potencial biotecnológico, al ser organismos autóctonos, esto permitiría la conservación de la biodiversidad de la región y de los recursos involucrados. Así mismo, se lograría un aporte al ser utilizados en el mejoramiento de la producción de la bebida o en la producción de otros productos de interés tanto cultural, como comercial.

## ABSTRACT

Taberna is a traditional beverage, made from the fermentation of the sap extracted from the coyol palm (*Acrocomia aculeata*). It is produced in different countries, from Mexico to Central America and mostly consumed during lent. It's a beverage with important value between the populations that produce it. In the state of Chiapas, it's a beverage to which various medicinal properties are attributed. During the fermentation process of the sap, a change is registered both in the chemical composition and in the presence of the microorganisms that are involved, among which the species *Saccharomyces cerevisiae* has been observed as the majority yeast. In a previous study on the microbiology of the tavern made in two locations in Chiapas, Benito Juárez in the Municipality of Villaflores and Tierra y Libertad in the Municipality of Jiquipilas, it was found that the isolates of *S. cerevisiae* recovered from the different stages of fermentation of the drink, differences appeared in its colonial morphology. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the morphological, physiological and molecular characteristics of the 21 isolates of *S. cerevisiae*, obtained during the three stages of the fermentation process of the tavern elaborated in the mentioned localities, analyzing the possible relationship between said characteristics with the stages of the process and the localities from where the isolates were obtained.

Morphological characteristics were observed that allowed the formation of seven groups based on color, shape, edge, elevation and texture. According to the physiological characterization and using the one-way ANOSIM statistical analysis, it was observed that there are significant differences ( $R^2=0.46$  y  $p=0.0006$ ) in terms of the location and the physiological response of the isolates. It was observed that the isolates belonging to the Tierra y Libertad community, show distinctive physiological characteristics, as well as high genetic variability, which could be considered with high biotechnological potential, by being autochthonous organisms, this would allow the conservation of the regions biodiversity and of the involved resources. Likewise, a contribution would be achieved by being used in the improvement of the production of the drink or in the production of other products of both cultural and commercial interest.



# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

## SECRETARÍA ACADÉMICA

### DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 07 de octubre de 2022

Oficio No. SA/DIP/743/2022

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

C. Maritza Tawas Penagos  
CVU CONACyT 201156  
Candidata al Grado de Maestra en Ciencias en Biodiversidad y  
Conservación de Ecosistemas Tropicales  
Instituto de Ciencias Biológicas  
UNICACH  
Presente

Con fundamento en la opinión favorable emitida por escrito por la Comisión Revisora que analizó el trabajo terminal presentado por usted, denominado Estudio de las relaciones Fisiológicas y Moleculares entre Cepas de *Saccharomyces Cerevisiae* asociadas a la Taberna, bebida extraída de la palma de coyol (*Acrocomia Aculeata (Jacq. Lodd Ex. Mart)* cuya Directora de tesis es la Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez (69054), quien avala el cumplimiento de los criterios metodológicos y de contenido; esta Dirección a mi cargo autoriza la impresión del documento en cita, para la defensa oral del mismo, en el examen que habrá de sustentar para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales.

Es imprescindible observar las características normativas que debe guardar el documento impreso, así como realizar la entrega en esta Dirección de un ejemplar empastado.

ATENTAMENTE  
"POR LA CULTURA DE MI RAZA"

DRA. CAROLINA ORANTES GARCÍA  
DIRECTORA



DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN  
Y POSGRADO

C.c.p. Mtro. Ricardo Hernández Sánchez, Director del Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH. Para su conocimiento.  
Dr. José Antonio De Fuentes Vicente, Coordinador del Posgrado, Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH. Para su conocimiento  
Archivo/minutario.

RJAG/COG/ecolig/gtr

# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## T E S I S

ESTUDIO DE LAS RELACIONES  
FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES ENTRE  
CEPAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*  
ASOCIADAS A LA TABERNA, BEBIDA  
EXTRAÍDA DE LA PALMA DE COYOL  
(*ACROCOMIA ACULEATA*. JACQ. LODD EX.  
MART).

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD  
DE ECOSISTEMAS TROPICALES

PRESENTA  
MARITZA TAWAS PENAGOS

Directora  
DRA. ALMA GABRIELA VERDUGO VALDEZ  
UNICACH

Co-Directora  
DRA. PATRICIA ESTER LAPPE OLIVERAS  
UNAM

Asesora  
DRA. CAROLINA ORANTES GARCÍA  
UNICACH

Asesora  
DRA. MARÍA SILVIA SÁNCHEZ CORTES  
UNICACH

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

25 de Noviembre de 2022



Dedico esta tesis a mis padres,  
porque gracias a su apoyo he logrado  
cada uno de mis objetivos

# AGRADECIMIENTOS

Este apartado es exclusivo para todas esas personitas que estuvieron presentes durante todo el esfuerzo realizado durante este trabajo. Principalmente agradezco a mis directoras por el haber confiado en mí durante este trabajo. A la Dra. Alma le agradezco su guía, confianza y dedicación. La paciencia que tuvo conmigo cuando mis pequeñas levaduras no querían cooperar, el esfuerzo que también tuvo que realizar para que este trabajo pudiera concluirse, así como el apoyo económico cuando se nos acabaron los recursos. A la Dra. Patricia Lappe le agradezco el apoyo en el trabajo, su tiempo y dedicación para que esto fuera posible.

A Andy, Evelyn y Karen, les agradezco el haber estado ahí, impidiendo que todo esto se saliera de control en el último momento. Agradezco a mis profesores el haberme transmitido ese conocimiento que fue bien implementado en el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a mis padres por la paciencia, apoyo y confianza en que su hija podría lograr este proyecto. Agradezco a mi hermana, mi cuñado y a mi sobrina por estar ahí en los momentos difíciles.

Le agradezco a la universidad por permitirme estar en el posgrado y por último pero no menos importante, agradezco a CONACYT por la confianza y el apoyo tanto académico como económico para que este proyecto pudiera lograrse con éxito.

## ÍNDICE O CAPITULADO

1. INTRODUCCIÓN.....	1.
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3.
3. JUSTIFICACIÓN.....	4.
4. MARCO TEÓRICO.....	5.
4.1 Generalidades de la materia prima y la bebida.....	5.
4.2 Descripción botánica y taxonómica de <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq. Lodd ex. Mart).....	6.
4.3 Origen y distribución.....	7.
4.4 Usos de la planta <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq. Lodd ex. Mart).....	8.
4.5 Procesos metabólicos básicos.....	8.
4.5.1 Metabolismo anaerobio de los hidratos de carbono.....	9.
4.5.2 Fermentación homolítica.....	11.
4.5.3 Fermentación alcohólica.....	12.
4.5.4 Metabolismo del nitrógeno.....	14.
4.6 Microorganismos en la fermentación.....	15.
4.7 Generalidades de las levaduras.....	18.
4.7.1 Formación de ascosporas.....	19.
4.8 Factores que afectan el crecimiento en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Meyen ex E.C.Hansen) y sus mecanismos para enfrentarlo.....	22.
4.8.1 Respuesta a cambios de temperatura.....	22.
4.8.2 Respuesta a cambios de presión osmótica.....	24.
4.8.3 Tolerancia al estrés por etanol.....	28.
4.9 Pruebas moleculares para determinación de diversidad biológica en levaduras.....	30.
4.9.1 AP-PCR (Iniciadores arbitrarios con la reacción en cadena de la polimerasa (AP-PCR).....	30.
4.9.2 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	31.
4.10 Aplicaciones biotecnológicas de las levaduras.....	31.
5. ANTECEDENTES.....	33.
6. HIPÓTESIS.....	36.
7. OBJETIVOS.....	36.

8. MATERIALES Y MÉTODO.....	37.
8.1 Material biológico.....	37.
8.2 Caracterización macroscópica de levaduras.....	37.
8.3 Formación de ascas y ascosporas.....	37.
8.4 Caracterización fisiológica de levaduras.....	37.
8.4.1 Evaluación de crecimiento a diferentes temperaturas .....	37.
8.4.2 Evaluación de crecimiento a diferentes presiones osmóticas .....	38.
8.4.3 Tolerancia a diferentes concentraciones de etanol .....	39.
8.4.4 Fermentación de carbohidratos.....	39.
8.5 Caracterización molecular.....	40.
8.5.1 Extracción de ADN.....	40.
8.5.2 Análisis de la amplificación con primers o iniciadores arbitrarios con la reacción en cadena de la polimerasa (AP-PCR) .....	41.
8.5.3 Análisis PCR-RFLP de rDNA.....	42.
9. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	43.
9.1 Análisis estadístico.....	43.
10. RESULTADOS.....	44.
10.1 Caracterización macroscópica.....	44.
10.2 Formación de ascas y ascosporas.....	47.
10.3 Caracterización fisiológica.....	48.
10.4 Caracterización molecular.....	53.
10.4.1 Análisis de amplificación arbitraria con reacción en cadena de polimerasa (AP-PCR) .....	53.
10.4.2 Análisis RFLP de las regiones ITS 5.8s y NTS.....	59.
10.4.3 Análisis de la caracterización molecular.....	63.
10.4.4 Análisis de la caracterización molecular y fisiológica.....	68.
11. DISCUSIÓN.....	70.
12. CONCLUSIÓN .....	74.
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Elaboración de la taberna.....	6.
Figura 2. Esquema del ciclo biológico de <i>S. cerevisiae</i> .....	20.
Figura 3. Representación esquemática de las funciones celulares en la osmorregulación de levaduras.....	24.
Figura 4. Pruebas de fermentación de carbohidratos utilizando tubos de Durham.....	40.
Figura 5. Ascas y ascosporas producidas por los aislados de <i>S. cerevisiae</i> en el medio.....	48.
Figura 6. Análisis de las características fisiológicas (termotolerancia, osmotolerancia, tolerancia a etanol y fermentación de carbohidratos) de los diferentes aislados con UPGMA.....	52.
Figura 7. Perfil de bandas de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido por AP-PCR con el microsatélite (CAG) <sub>5</sub> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100pb.....	53.
Figura 8. Perfil de bandas de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido por AP-PCR con el microsatélite (GAC) <sub>5</sub> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	53.
Figura 9. Perfiles de bandas de los diferentes aislados de <i>S. cerevisiae</i> obtenido por AP-PCR con el microsatélite MR, en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	54.
Figura 10. Análisis con UPGMA del patrón de bandas de los diferentes aislados obtenidos con el microsatélite (CAG) <sub>5</sub> .....	55.
Figura 11. Análisis de UPGMA del perfil de bandas de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenidos con el microsatélite (GAC) <sub>5</sub> .....	56.
Figura 12. Análisis con UPGMA del perfil de bandas de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenidos con el microsatélite MR.....	57.
Figura 13. Análisis con UPGMA del perfil de bandas de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con los microsatélites (GAC) <sub>5</sub> , (CAG) <sub>5</sub> y MR.....	58.
Figura 14. Productos de amplificación por PCR de la región ITS-5.8S de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	59.
Figura 15. Productos de amplificación por PCR de la región NTS de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	59.
Figura 16. Perfiles de bandas de la región ITS-5.8S de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con la enzima de restricción <i>AluI</i> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	60.
Figura 17. Perfiles de bandas de la región ITS-5.8S de los aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido con la enzima de restricción <i>MspI</i> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	60.

Figura 18. Perfiles de bandas de la región ITS-5.8S de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenidos con la enzima de restricción <i>HaeIII</i> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	60.
Figura 19. Perfiles de bandas de la región ITS-5.8S de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido con la enzima de restricción <i>TaqI</i> en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	61.
Figura 20. Perfiles de bandas de la región NTS de los diferentes aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido con la enzima de restricción <i>AluI</i> en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	61.
Figura 21. Perfiles de bandas de la región NTS de los aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido con la enzima de restricción <i>TaqI</i> en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 5000 pb.....	62.
Figura 22. Perfiles de bandas de la región NTS de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> obtenido con la enzima de restricción <i>HaeIII</i> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.....	62.
Figura 23. Perfiles de bandas de la región NTS de los aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenido con la enzima de restricción <i>MspI</i> , en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 5000 pb.....	63.
Figura 24. Análisis de la caracterización molecular RFLP de las regiones ITS-5.8S y NTS en aislados de <i>S. cerevisiae</i> .....	65.
Figura 25. Análisis UPGMA de la caracterización molecular (AP-PCR y análisis RFLP de las regiones ITS 5.8S y NTS) en aislados de <i>S. cerevisiae</i> .....	67.
Figura 26. Análisis con UPGMA de la caracterización fisiológica y molecular de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> .....	69.

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Características de las colonias gigantes de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> crecidas en WL agar durante 3 semanas. (BJ: Localidad Benito Juárez, TL: Localidad Tierra y Libertad, 0, i, f; etapas inicial, intermedia y final, respectivamente) .....	44.
Cuadro 2. Caracterización de los aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> respecto a la formación de ascosporas, termotolerancia, osmotolerancia y tolerancia a 0.1 y 0.01% de cicloheximida .....	49.
Cuadro 3. Tolerancia de los diferentes aislados de <i>S. cerevisiae</i> a distintas concentraciones de etanol ...	50.
Cuadro 4. Pruebas de fermentación de carbohidratos por aislados de <i>S. cerevisiae</i> .....	51
Cuadro 5. Perfiles de bandas obtenidos por AP-PCR con los microsátelites (GAG) <sub>5</sub> , (GAC) <sub>5</sub> y MR, y RFLP con las enzimas de restricción <i>HaeIII</i> , <i>MspI</i> , <i>TaqI</i> , <i>AluI</i> de las regiones ITS-5.8S Y NTS de todos los aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aislados de diferentes etapas de fermentación de taberna elaborada en las localidades de Benito Juárez y Tierra y Libertad, Chiapas.....	65.

## RESUMEN

La taberna es una bebida tradicional que se elabora a partir de la fermentación de la savia extraída de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*). Se produce en diferentes países, desde México hasta Centroamérica y consume principalmente durante la época de cuaresma; es una bebida que tiene un valor importante para la población indígena y mestiza de dichas regiones. En el estado de Chiapas, es una bebida a la que se le atribuyen además diversas propiedades medicinales. Durante el proceso de fermentación de la savia se registra un cambio tanto en la composición química como en la presencia de los microorganismos involucrados, entre los que se ha observado a la especie *Saccharomyces cerevisiae* como levadura mayoritaria. En un estudio previo sobre la microbiología de la taberna elaborada en dos localidades de Chiapas, Benito Juárez en el Municipio de Villaflores y Tierra y Libertad en el municipio de Jiquipilas, se observó que los aislados de *S. cerevisiae* recuperados de las distintas etapas de fermentación de la bebida, presentaron diferencias en su morfología colonial. Por ello el objetivo del presente estudio fue evaluar las características morfológicas, fisiológicas y molecular de los 21 aislados de *S. cerevisiae*, obtenidos durante las tres etapas del proceso fermentativo de la taberna elaborada en las localidades mencionadas, analizando la posible relación entre dichas características con las etapas del proceso y las localidades de donde fueron obtenidos los aislados.

Las características morfológicas permitieron la formación de ocho grupos en función del color, forma, borde, elevación y textura. De acuerdo a la caracterización fisiológica y utilizando el análisis estadístico ANOSIM de una sola vía se observó que existen diferencias significativas ( $R^2=0.46$  y  $p= 0.0006$ ) en cuanto a la localidad y a la respuesta fisiológica de los aislados. Además, se observó que los aislados obtenidos de la comunidad Tierra y Libertad presentaron características fisiológicas distintivas que podrían considerarse con un alto potencial biotecnológico, al ser organismos autóctonos, esto permitiría la conservación de la biodiversidad de la región y de los recursos involucrados. Así mismo, se lograría un aporte al ser utilizados en el mejoramiento de la producción de la bebida o en la producción de otros productos de interés tanto cultural, como comercial.

## ABSTRACT

Taberna is a traditional beverage, made from the fermentation of the sap extracted from the coyol palm (*Acrocomia aculeata*). It is produced in different countries, from Mexico to Central America and mostly consumed during lent. It's a beverage with important value between the populations that produce it. In the state of Chiapas, it's a beverage to which various medicinal properties are attributed. During the fermentation process of the sap, a change is registered both in the chemical composition and in the presence of the microorganisms that are involved, among which the species *Saccharomyces cerevisiae* has been observed as the majority yeast. In a previous study on the microbiology of the tavern made in two locations in Chiapas, Benito Juárez in the Municipality of Villaflores and Tierra y Libertad in the Municipality of Jiquipilas, it was found that the isolates of *S. cerevisiae* recovered from the different stages of fermentation of the drink, differences appeared in its colonial morphology. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the morphological, physiological and molecular characteristics of the 21 isolates of *S. cerevisiae*, obtained during the three stages of the fermentation process of the tavern elaborated in the mentioned localities, analyzing the possible relationship between said characteristics with the stages of the process and the localities from where the isolates were obtained.

Morphological characteristics were observed that allowed the formation of seven groups based on color, shape, edge, elevation and texture. According to the physiological characterization and using the one-way ANOSIM statistical analysis, it was observed that there are significant differences ( $R^2=0.46$  y  $p=0.0006$ ) in terms of the location and the physiological response of the isolates. It was observed that the isolates belonging to the Tierra y Libertad community, show distinctive physiological characteristics, as well as high genetic variability, which could be considered with high biotechnological potential, by being autochthonous organisms, this would allow the conservation of the regions biodiversity and of the involved resources. Likewise, a contribution would be achieved by being used in the improvement of the production of the drink or in the production of other products of both cultural and commercial interest.

## I. INTRODUCCIÓN

La elaboración de bebidas fermentadas es una práctica realizada desde la antigüedad y se utilizaban diversas especies de plantas para la obtención de bebidas alcohólicas (Moreno y Paradowska, 2009).

El vino de palma es una bebida alcohólica obtenida por la fermentación natural de la savia extraída de diversas especies de palmas pertenecientes a la familia Arecaceae (Santiago-Urbina y Ruíz-Terán; 2014).

Entre dichas bebidas se encuentra la *tuba* que se obtiene de la palma *Cocos nucifera*, la chicha de la palma *Parajubaea* sp. (Borchsenius y Morales, 2006; Meléndez *et al.*, 2011), las bebidas obtenidas por fermentación de la savia de las palmas *Elaeisguineensis* sp. y *Raphia hookeri* en Nigeria, el mimbo de Camerún que se elabora con savia de *Phoenix dactylifera* (Ogbulie *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009), y la taberna de la palma de *Acrocomia aculeata* (Balick, 1990). La obtención de la bebida se realiza de acuerdo con las costumbres y con valor cultural de cada región (Santiago *et al.*, 2014).

En la savia de las palmas se llevan a cabo fermentaciones naturales o espontáneas, que incluyen fermentaciones ácidas y/o alcohólicas, que le confieren características específicas a cada bebida (Valdez *et al.*, 2012).

Se han identificado diversos grupos microbianos responsables de los procesos fermentativos, donde se ha observado que al poco tiempo la microbiota autóctona presente en el sustrato, utiliza los compuestos, principalmente los azúcares del presentes en éste para subsistir, y a su vez transforman el sustrato, produciendo diferentes compuestos como resultado de su actividad metabólica como son alcoholes, ácidos orgánicos, esteroides, cetonas, por mencionar algunos (Zambonelli, 1988).

Las levaduras juegan un importante papel en la naturaleza, siendo uno de los principales grupos microbianos responsables de la producción de etanol y otros metabolitos de interés industrial y comercial. Especies como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Dekkera burxellensis*, entre otras especies, son consideradas como las más importantes en diversos procesos biotecnológicos (Parra, 2010).

Otros microorganismos involucrados en la fermentación espontánea son las bacterias ácido lácticas (BAL), llamadas así porque producen ácido láctico,

entre los géneros más destacadas están: *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Pediococcus* (Holguín *et al.*, 2010). Todos estos microorganismos les confieren a las bebidas diversos atributos como sabor, olor, color, textura, además de que tienen la capacidad de inhibir organismos patógenos, y también de proporcionar algunas propiedades terapéuticas y un valor nutricional (Parra, 2010).

La caracterización fisiológica y molecular de levaduras es importante debido al potencial biotecnológico que pueden presentar en distintas áreas como: agricultura, médica o medioambiental. Algunos medios selectivos y diferenciales son utilizados para detectar especies específicas o grupos de levaduras. Dentro de las técnicas para caracterización molecular se encuentran los análisis de las regiones ribosomales (5.8S, 18S y 26S), los espaciadores internos transcritos ITS y las regiones externas (ETS), la PCR en tiempo real, microchips, análisis de cromosomas por electroforesis en campo pulsado, análisis de restricción del ADN mitocondrial, los RAPD's (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico), PCR de regiones repetitivas del genoma (microsatélites y minisatélites) y los AFLP (amplificación de fragmentos de longitud polimórfica). Estas técnicas son rápidas fiables y precisas, por lo tanto, adecuadas para el cribado rápido de cepas aisladas (Díaz, *et al.*, 2016; Baselga *et al.*, 2015).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En un estudio previo realizado por Ambrocio (2018) sobre la ecología de las levaduras asociadas a la taberna, bebida elaborada por fermentación de la savia de la palma de coyol (*A. aculeata*) en las comunidades de Benito Juárez, en el Municipio de Villaflores y Tierra y Libertad en el Municipio de Jiquipilas, ambas en el estado de Chiapas, se obtuvieron aislados de diferentes colonias de levaduras en el que se identificaron cinco especies, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la especie mayoritaria, además, de estar presente durante todo el proceso fermentativo realizado en ambas comunidades.

En los 21 aislados *S. cerevisiae* obtenidos de las diferentes etapas del proceso de fermentación de la taberna elaborada en ambas comunidades, se observaron diferencias macromorfológicas en sus colonias, lo que llevó al planteamiento de la existencia de diferencias intraespecíficas. Por ello el presente este estudio tiene como principal objetivo realizar la caracterización morfológica, fisiológica y molecular de los aislados para evidenciar si existen diferencias, y además establecer si existe una relación entre dichas características con la etapa de la fermentación de la que fueron aislada y/o con la localidad en la que fue elaborada la taberna.

### III. JUSTIFICACIÓN

La taberna es una bebida fermentada tradicional, con un alto valor cultural y económico para las poblaciones que las producen. Su elaboración consiste en la tala de las palmas y en la fermentación espontánea de la savia, donde se involucran diversos microorganismos como bacterias ácido-lácticas, y levaduras, que aprovechan los azúcares presentes en la savia, transformándola en un producto fermentado con las características esenciales para su consumo. Debido a las diferencias morfológicas observadas en los 21 aislados de *S. cerevisiae* a lo largo de la fermentación en las dos comunidades estudiadas, este trabajo centra su importancia en esclarecer si dichas diferencias se deben a una variabilidad fisiológica y molecular de la especie y si existe una asociación con la localidad y las etapas del proceso fermentativo, como se ha descrito en otros estudios, en los que se ha encontrado que hay una sucesión no solo de especies, sino también de cepas de la misma especie a lo largo de fermentaciones espontáneas (Lachenmeier *et al.*, 2006; Pérez-Brito *et al.*, 2007). Con estos resultados será posible continuar explorando el potencial biotecnológico de los aislados de *S. cerevisiae* obtenidos de la taberna, para ser utilizadas no sólo en el mejoramiento de la producción de esta bebida sino también o en la obtención de otros productos de interés.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Generalidades de la materia prima y la bebida

La *taberna*, es una bebida tradicional del estado de Chiapas que se consume principalmente durante la época de cuaresma. Es una bebida alcohólica cuyo sabor es semejante al de los “vinos de palma” de África (Alcántara *et al.*, 2010). La *taberna* se produce en diferentes países, desde México hasta Centroamérica; en Honduras se le conoce como “vino de savia”; elaborado a partir de *Acrocomia mexicana* (Lentz, 1990).

En México, la extracción y consumo de la *taberna*, tiene un valor importante entre las poblaciones que la producen; convirtiéndose incluso en algunos ejidos del Istmo de Tehuantepec (Oaxaca), en una de las principales tradiciones que se llevan a cabo en distintas festividades (Mondragón, 2015). En el estado de Chiapas, la *taberna* es consumida principalmente por poblaciones de la región de la Sierra Madre. A dicha bebida se le atribuyen propiedades medicinales diversas, como el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, biliares y prostáticos (Bermúdez, 2011; Gómez, 2014; Mondragón, 2015).

Esta bebida se elabora con la savia que se extrae de *Acrocomia aculeata* (comúnmente conocida como coyol o palma real). Las palmas se talan por la mañana, y la savia se dejan fermentar de forma natural o espontánea por 24 horas, este proceso es conocido como “hirviendo” o “ebullición del vino” (Bermúdez, 2011). El proceso para producir la *taberna* consiste en elegir la palma de una altura considerable (aproximadamente 5 m de altura). La palma es arrancada desde la raíz, quitando hojas y en la parte del “cogollo” (palmito) se le hace un incisión en forma rectangular de 10 cm de ancho por 15 cm de largo y de aproximadamente unos 30 centímetros de profundidad, ésta es denominada “canao” (y se espera a que brote la savia del árbol. Es importante no cortar demasiado por debajo del palmito, debido a que limita el flujo máximo de la savia. La cavidad se cubriera con un trozo de madera o cartón para dejar que el líquido brote. La savia se recoge dos veces al día, el flujo de la savia de las palmeras recién cortadas es tan fuerte que la recolección puede llegar a realizarse hasta tres veces durante los primeros días (Ambrocio-Ríos, 2021). Este proceso es similar al que se realiza para extraer el aguamiel o savia

azucarada de los magueyes pulqueros empleada en la elaboración de pulque (Godoy *et al.*, 2003).



Figura 1. Elaboración de la taberna. A) Corte del tallo de *A. aculeata*; B) Canoa de drenaje de la savia (Ambrocio-Ríos, 2021).

Una palma puede producir de dos a tres litros de savia cada 12 h durante 15-30 días, lo que depende del tamaño de la palma (Ambrocio-Ríos, 2021). En tanto se produzca la savia, la cavidad se cubre con un pedazo de tabla o cartón para evitar la entrada de vectores no deseados como moscas, mosquitas y hormigas (Ambrocio-Ríos, 2021). Es necesario vaciar y raspar todos los días la cavidad para abrir los vasos, que la savia siga fluyendo (Bermúdez, 2011); y se acumule en la canoa para que posteriormente se extraiga y se transfiera a los recipientes en los que continúa la fermentación (Ambrocio-Ríos, 2021).

#### **4.2 Descripción botánica y taxonómica de *Acrocomia aculeata* (Jacq. Lodd ex. Mart)**

*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., es un árbol nativo de los bosques tropicales, es una palma espinosa originaria de América Latina. Es una palma de reproducción rápida; se encuentra en potreros y sabanas, y está adaptada a hábitats perturbados. Llega a tener de 15 a 20 m de altura; la parte inferior del tronco es menos espinosa que la parte apical; sus inflorescencias interfoliares son de color amarillo intensos; el periodo de floración empieza en marzo y termina a finales de junio, siendo abril y mayo los meses de mayor floración (Mondragón, 2015; Gómez, 2014).

Presenta una abundante fructificación entre los cuatro a cinco años; los frutos aparecen en racimos o “cachos” , una palma adulta bien desarrollada

produce de cuatro hasta 13 cachos anuales con entre 200 hasta 700 frutos; los frutos son drupas esféricas de cáscara lisa y quebradiza, de entre 25- 50 cm de diámetro, de color verde oliváceo a amarillo acaramelado (Gómez, 2014), su mesocarpio está constituido de almidón de color dorado, dulce al madurar; presenta un endocarpio duro, el cual está formado por un coco o semilla oleosa con un 40% 21 de aceite; los frutos no caen del árbol y casi un año después de madurar toman un color amarillento (Ambrocio, 2018). Las hojas verdes, están situadas en diferentes planos, lo que le da un aspecto plumoso a la corona; son pinnadas con longitud variable 4-5 m, con cerca de 130 folíolos en cada lado y espinas en la región central (Lorenzi, 1996; Miranda, 2001). El tallo, puede ser del tipo vainas y/o espinas. Las inflorescencias son de color amarillo y pueden alcanzar hasta 2 m de longitud. Los frutos son esféricos con diámetros que van desde 2 cm a 5 cm, y poseen de una a tres semillas por fruto (Lacerda, 2008). Se ha reportado que las palmas de *A. aculeata*, forman bosques extensos llamados “coyolares”; los cuales son más comunes en las costas del océano Pacífico, que en las del Atlántico (Lentz, 1990).

#### **4.3 Origen y distribución**

Diferentes variedades de *A. aculeata* crecen naturalmente en México, algunas de ellas resisten heladas y temperaturas bajo cero, lo que facilita que sean plantadas en toda la región subtropical (Mondragón, 2015). *A. aculeata* posee una amplia distribución geográfica a lo largo de los trópicos americanos, desde México hasta Argentina, Bolivia, Paraguay y las Antillas, excepto Ecuador y Perú. Existen registros de su presencia en los Andes colombianos.

Habita en regiones con una estación lluviosa bien definida y altitudes moderadas (Henderson *et al.*, 1995). En Brasil, se considera como la palma con mayor dispersión, con el desarrollo de bosques naturales en casi todos los territorios del país. En México esta palma se encuentra a lo largo de las planicies costeras del Golfo de México y del Pacífico; en Chiapas se localiza especialmente en las regiones de la Frailesca, Centro y Soconusco (Zuart, 1999).

#### **4.4 Usos de la planta *Acrocomia aculeata* (Jacq. Lodd ex. Mart)**

La palma de coyol (*Acrocomia aculeata*) es una planta de gran importancia desde el punto de vista ecológico, debido a su aprovechamiento como alimento para animales silvestres, contribuyendo a la protección de la fauna nativa y del ecosistema. Desde el punto de vista tradicional y económico, la importancia de esta palma, radica en la diversidad de usos que se dan a las diversas estructuras de la palma por la población regional, entre los que destacan el uso comestible de los frutos y flores, y su empleo como terapéutico, debido a sus propiedades medicinales, así como su utilización en diversas actividades artesanales (Orantes-García *et al.*, 2010). La flor, es utilizada de diversas ceremonias; en cuanto a sus usos comestibles, es preparada con pepita de calabaza durante la Semana Santa en el municipio de Ocozocoautla (Farrera, 1997; Gómez, 2014) y en Pichucalco es hervida o guisada con huevo (Bermúdez, 2011; Flores y Farrera-Sarmiento, 2007). El fruto de la palma, se ha empleado desde la época prehispánica, existiendo registro de ello en las comunidades de Cajón y Copán, Chiapas, así como en el Centro de México específicamente en el Valle de Tehuacán, Puebla, donde los pobladores ingerían la pulpa y el núcleo fresco (Lentz, 1990) y extraían el aceite de la semilla (Mondragón, 2015). Los frutos presentan un alto contenido de aceite en la pulpa y la almendra (Lorenzi, 1996). Este alto contenido en aceite otorga a la palma un gran potencial a la hora de su aplicación en el sector industrial y/o energético. Los subproductos generados a partir del procesamiento de la pulpa para la obtención de aceite pueden ser utilizados en nutrición animal y/o como fertilizante (Motta *et al.*, 2002). Otro subproducto importante es el endocarpio del fruto, que puede ser utilizado como carbón debido a su alto poder calorífico (Boas *et al.*, 2010).

Es del fruto del cual se elabora el denominado “dulce de coyol” elaborado con el fruto sin cáscara que se cuece con azúcar o panela (Bermúdez, 2011; Gutiérrez, 2006; Mayorga y De la Cruz, 2000); con el mucílago o baba revuelto con harina se preparan obleas (Bermúdez, 2011); el aceite, se extrae del endocarpio y mesocarpio; y el fruto entero se proporciona al ganado como forraje (Lentz, 1986). Con respecto a su composición nutricional, el fruto contiene vitaminas A, B, C y E, además de minerales como el magnesio, el calcio y el hierro, entre otros (Mondragón, 2015).

En Guatemala la parte dura de la nuez es usada para fabricar artesanías como anillos y rosarios (Maldonado-Mares, 1992). Del tallo, se obtiene la savia con la que se elabora la taberna, bebida alcohólica que posee propiedades digestivas y diuréticas (Bermúdez, 2011). La parte central del tallo denominada palmito es comestible (Ambrosio, 2019). En regiones como Honduras, las hojas se emplean para construir y techar viviendas tradicionales. La raíz es utilizada como remedio para sanar el dolor o la inflamación vesicular (Ríos, 2006). Durante mucho tiempo los pueblos indígenas de los estados de Yucatán, Tamaulipas y México, la raíz ha sido utilizada para el tratamiento de la diabetes, debido a que contiene diversos compuestos hipoglucémicos (Toledo, 2014).

## **4.5 Procesos metabólicos básicos**

### **4.5.1 Metabolismo anaerobio de los hidratos de carbono**

La fermentación es un conjunto de procesos metabólicos en el que bacterias y levaduras transforman compuestos químicos orgánicos; principalmente azúcares, en otras sustancias orgánicas como alcoholes como el etanol y metanol; ácidos orgánicos como láctico, acético, butírico; cetonas; aldehídos; vitaminas, aminoácidos, por mencionar algunos (Puerta, 2010; Quintero, 1987). La fermentación es un proceso en el que se potencia deliberadamente el crecimiento de los microorganismos que consumen una cantidad de sustrato y enriquecen, por medio del cultivo los productos del metabolismo. Es un proceso catabólico de oxidación incompleta, totalmente anaeróbico, siendo el producto final un compuesto orgánico. Estos productos finales son los que caracterizan los diversos tipos de fermentaciones (Bailón, 2012).

Durante la glucólisis el piruvato ocupa una importante encrucijada en el metabolismo. En condiciones aeróbicas el piruvato se oxida a acetato, el cual entra en el ciclo del ácido cítrico y es oxidado a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , y el NADH formado por la deshidrogenación del gliceraldehído 3-fosfato se reoxida a  $\text{NAD}^+$  mediante el paso final de sus electrones al  $\text{O}_2$  en el proceso de la respiración mitocondrial. No obstante, en condiciones de hipoxia, como en los músculos esqueléticos muy activos, en las plantas sumergidas o en las bacterias del ácido láctico, el NADH generado en la glucólisis no puede ser reoxidado por el

oxígeno. La incapacidad para regenerar  $\text{NAD}^+$  dejaría a la célula sin aceptor de electrones para la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato, con lo que se detendrían las reacciones de la glucólisis que producen energía. Por tanto, se ha de regenerar el  $\text{NAD}^+$  por otra reacción (Lehninger y Cox, 2006).

Las primeras células vivieron en una atmósfera casi sin oxígeno, por lo que tuvieron que desarrollar estrategias para obtener energía a partir de moléculas en condiciones anaeróbicas. La mayoría de los organismos modernos han mantenido la capacidad de regenerar continuamente el  $\text{NAD}^+$  durante la glucólisis anaeróbica por medio de la transferencia de los electrones desde el  $\text{NADH}$  para formar un producto final reducido tal como el lactato o el etanol.

La levadura y otros microorganismos fermentan la glucosa a etanol y  $\text{CO}_2$ , en lugar de formar lactato. La glucosa se convierte en piruvato durante la glucólisis y el piruvato se transforma en etanol y  $\text{CO}_2$  en un proceso de dos pasos (Lehninger y Cox, 2006).

En el primer paso, el piruvato se descarboxila en una reacción irreversible catalizada por el piruvato descarboxilasa. Esta reacción es una descarboxilación simple que no supone la oxidación neta del piruvato. El piruvato descarboxilasa necesita  $\text{Mg}^{2+}$  y tiene una coenzima unida muy fuertemente, la tiamina pirofosfato. En el segundo paso, el acetaldehído se reduce a etanol a través de la acción de la alcohol deshidrogenasa mediante el poder reductor proporcionado por  $\text{NADH}$  proveniente de la deshidrogenación del gliceraldehído 3-fosfato. Esta reacción es un caso bien estudiado de transferencia de hidruro a partir del  $\text{NADH}$ . Por lo tanto, los productos finales de la fermentación alcohólica son el etanol y el  $\text{CO}_2$  y la ecuación global es:

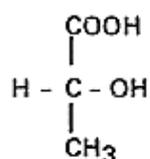


#### 4.5.2 Fermentación homolítica

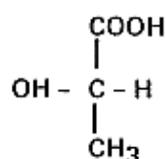
La fermentación homolítica tiene lugar en tejidos animales, en un grupo de organismos eucarióticos pertenecientes a los hongos y protozoos y en varios grupos bacterianos, notablemente en bacterias lácticas.

La conversión de glucosa a ácido pirúvico en la fermentación homoláctica transcurre, por la vía glicolítica de Embden-Meyerhof. En la fermentación homoláctica el ácido pirúvico, en presencia de la enzima lactatodeshidrogenasa, actúa como aceptor de electrones en la reoxidación de NADH, convirtiéndose en ácido láctico (Carbonero, 1975).

El ácido láctico es totalmente miscible en agua, alcohol y éter, pero insoluble en cloroformo, polimeriza fácilmente. El ácido láctico contiene un átomo de carbono asimétrico y puede presentarse en dos formas ópticamente activas:



D (-) -ácido láctico



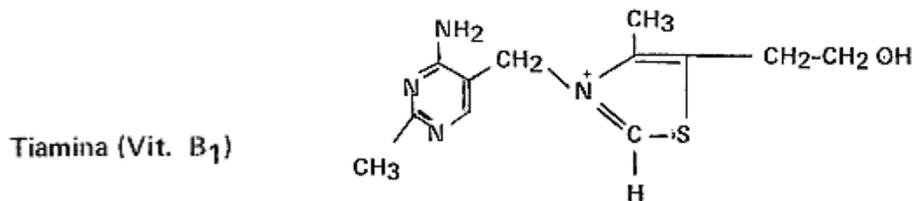
L (+) -ácido láctico

El isómero producido a partir del pirúvico depende de la naturaleza de la lactato-deshidrogenasa presente en el microorganismo que lleva a cabo la fermentación. Así, las bacterias lácticas homofermentativas y el hongo *Rhizopus oryzae* producen L (+) ácido láctico, mientras que las bacterias lácticas heterofermentativas (formadoras de ácidos volátiles además del ácido láctico) producen D (-) ácido láctico. No obstante, frecuentemente, en las fermentaciones bacterianas se obtiene el racemato (mezclas equimorales de D y L láctico), ópticamente inactivo. La racemización del D (-) ó el L (+) lactato, formado, primeramente, se lleva a cabo por la actividad de una enzima, racemasa, producido entre otras por las bacterias. La racemasa, requiere ácido nicotínico para su acción, y por tanto variando el nivel de este último en el medio de cultivo se puede controlar en parte el tipo de ácido láctico producido. Este control sólo puede ser parcial pues el ácido nicotínico es un factor de crecimiento para las bacterias lácticas (Carbonero, 1975).

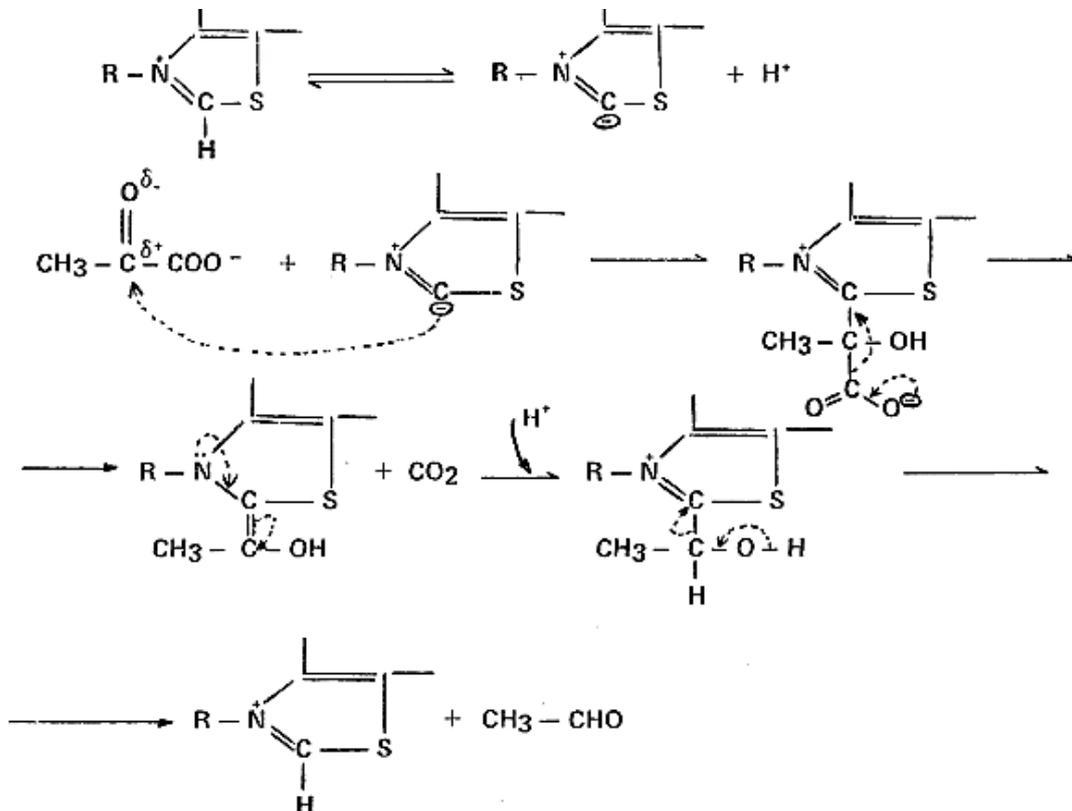
### 4.5.3 Fermentación alcohólica

El metabolismo anaerobio de los hidratos de carbono, que se produce en ausencia de aire, tiene importancia teórica y práctica en dos casos que son la a) Fermentación alcohólica, y b) la glicólisis del glicógeno en los músculos (Klages, 1968).

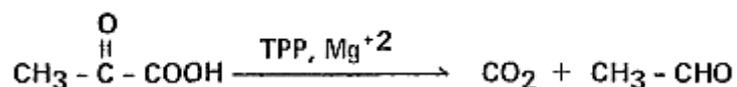
La fermentación alcohólica se lleva a cabo en tejidos vegetales, en ciertos hongos y en particular en levaduras. El esquema metabólico seguido es la vía glicolítica de Embden-Meyerhof hasta el ácido pirúvico. A continuación, el piruvato se descarboxila no oxidativamente por acción de la descarboxilasa pirúvica, una enzima que requiere tiaminpirofosfato (TPP) y  $Mg^{2+}$ , produciendo acetaldehído y  $CO_2$  (Carbonero, 1975).



La descarboxilación ocurre en el carbono 2 del anillo tiazólico del tiaminpirofosfato:



La reacción general será:



El acetaldehído actúa como aceptor de electrones del nicotinaminadeninucleótido reducido, produciendo etanol y  $\text{NAD}^+$ . La reacción es catalizada por la alcohol deshidrogenasa:



En la fermentación alcohólica industrial se utilizan casi exclusivamente levaduras, siendo la especie empleada dependiente del tipo de carbohidrato utilizado como materia prima; así cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizan en la fermentación de hexosas, *Candida pseudotropicalis* en la fermentación de lactosa, y *Candida utilis* en la de pentosas. Los rendimientos de alcohol etílico son con frecuencia superiores al 90% sobre el azúcar consumido, en cepas seleccionadas por su gran tolerancia al alcohol (Carbonero, 1975).

La fermentación alcohólica de las levaduras se inicia con la ruta del glucolisis, que conduce a la obtención de dos moléculas de piruvato por cada molécula de azúcar metabolizada. Posteriormente el piruvato se descarboxila y conduce a la producción de etanol y  $\text{CO}_2$  (Zumárraga y Barbero, 2014). A concentraciones iniciales iguales de diferentes carbohidratos en el mosto, *S. cerevisiae* presenta preferencia hacia la glucosa. Esta preferencia se debe a que los transportadores celulares de estas hexosas presentan una mayor afinidad por la glucosa que por la fructosa. Sin embargo, existen variaciones en la capacidad de consumir fructosa, y hoy en día encontramos levaduras "fructofílicas" que asimilan ambos azúcares prácticamente por igual y que pueden evitar problemas de final de fermentación (Zumárraga y Barbero, 2014).

El metabolismo de azúcares produce otros subproductos derivados de rutas metabólicas secundarias, que usan intermediarios de la degradación de azúcares, entre dichos subproductos están: glicerol, acetaldehídos, ácidos

orgánicos como acético, que contribuye a la acidez volátil, láctico, tartárico, málico, succinico, compuestos volátiles como monoterpenos, ésteres, entre otros, que contribuyen con aromas frutales y florales; compuestos no volátiles como los ácidos grasos y los alcoholes superiores que dan cuerpo y volumen del vino (Zumárraga y Barbero, 2014).

En la fermentación alcohólica espontánea o natural, participa un complejo consorcio microbiano constituido por microorganismos nativos o autóctonos que interactúan entre sí y con la materia prima a lo largo del proceso, y la levadura. *S. cerevisiae* tiene un papel central en éste. Generalmente se obtiene una bebida alcohólica con características particulares según los insumos usados, la mano de obra que lo procesa, las condiciones climáticas y geográficas de la región, las características del proceso y el tipo de microorganismos involucrados en él, lo que confiere una gran variabilidad organoléptica y química entre una fermentación y otra (Oliva, 2012).

#### **4.5.4 Metabolismo del nitrógeno**

Los microorganismos tienen la capacidad de utilizar una variedad de compuestos como única fuente de nitrógeno. Las levaduras pueden emplear nitratos, nitritos, sales de amonio, urea, distintos aminoácidos, bases nitrogenadas y derivados de la purina. Las moléculas de nitrógeno entran a las células a través de las permeasas y pueden usarse inmediatamente como bloques de construcción en la biosíntesis, convertirse en un compuesto relacionado y utilizarse en biosíntesis o catabolizarse para liberar nitrógeno en forma de amonio mediante la desaminación, glutamato a través de la transaminación, o ambas (Magasanik y Kaiser, 2002; Gutiérrez, 2013).

La célula de levadura convierte estas moléculas en amonio, glutamato y glutamina, que funcionan como donadores del grupo amino en todas las demás reacciones biosintéticas (Gutiérrez, 2013).

Las levaduras pueden crecer en fuentes de nitrógeno relativamente pobres, aumentando la expresión de las enzimas para la síntesis de glutamato y glutamina, y aumentando las actividades de las permeasas responsables de la absorción de aminoácidos para su uso como fuente de nitrógeno. *S. cerevisiae* puede utilizar diferentes fuentes de nitrógeno para su crecimiento,

aunque no en todas se desarrollan bien, por lo que selecciona aquellas que permiten el óptimo crecimiento a través de del mecanismo denominado Represión de catabolitos de nitrógeno (NCR) (Gutiérrez, 2013).

*S. cerevisiae* incorpora el nitrógeno de compuestos simples, como el amonio, para la síntesis de compuestos estructurales tales como aminoácidos, péptidos y proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas (Zumárraga y Barbero, 2014). El contenido en nitrógeno condiciona la realización, velocidad y eficacia de la fermentación alcohólica. En el mosto la mayoría de las fuentes nitrogenadas (amonio y aminoácidos) son precursoras de compuestos aromáticos, determinando en cierta forma el perfil aromático de las bebidas fermentadas. El nitrógeno del mosto puede estar presente en forma inorgánica, básicamente como sales de amonio, u orgánica como aminoácidos, péptidos y proteínas. La presencia de nitrógeno en cualquiera de estas formas químicas es variable, y depende de diversos factores (Mas *et al.*, 2013).

Como parte de una estrategia adaptativa a la fermentación del mosto, *S. cerevisiae* no consume el nitrógeno asimilable de manera aleatoria, sino que sigue un orden de preferencia por las distintas fuentes de nitrógeno. Esta especie ha desarrollado diferentes mecanismos moleculares que le permiten utilizar selectivamente aquellas fuentes que mantienen su óptimo crecimiento (Mas *et al.*, 2013).

#### **4.6 Microorganismos en la fermentación**

Evidencias arqueológicas que demuestran que desde hace más de 7000 años de antigüedad los humanos aprendimos a encausar las fermentaciones alcohólicas de diversos sustratos en forma empírica. Quizá las primeras bebidas se hicieron con base a sustratos azucarados como jugos de fruta, ya que estos sólo requieren ponerse en contacto con la levadura silvestre presente en la superficie de la propia fruta (Bailón, 2012). A finales del siglo XIX, cuando Pasteur demostró que las levaduras eran microorganismos vivos causantes de la fermentación, y estableció la relación que existe entre la presencia de éstos y la transformación del azúcar en alcohol y gas carbónico (Lafon-Lafourcade, 1983). A partir de entonces, se han realizado numerosos estudios microbiológicos sobre el aislamiento e identificación de los microorganismos asociadas a la fermentación del vino (Ganga, 2008).

Desde principios del siglo XX se sabe que en la elaboración de vinos intervienen además de levaduras, bacterias, cuya función es transformar el ácido málico del vino en ácido láctico. Esta transformación, denominada fermentación maloláctica llevada a cabo por diversas especies de bacterias lácticas (Ganga, 2008).

Los microorganismos relacionados con el vino pueden ser distribuidos en cuatro grupos. Las levaduras, que son las encargadas de realizar la fermentación alcohólica, las bacterias lácticas, que llevan a cabo la fermentación maloláctica, las bacterias acéticas, que junto con algunas levaduras y algunas bacterias lácticas pueden causar alteraciones y descomposición de los mismos, y por último los mohos, algunas especies pueden desarrollarse sobre la uva y en las vides causando mermas importantes en la cantidad y en la calidad de la uva (Suárez e Iñigo, 1992).

Existen especies de levaduras patógenas como *Botrytis cinérea* que afectan de manera directa a las plantas de uva, ocasionado podredumbre tanto en las hojas como en los frutos, generando deshidratación en el fruto, en el que los azúcares presentes pasan a mayor concentración y por lo tanto se obtiene un mejor aprovechamiento (Mesas y Alegre, 1999; Gómez-Díaz, 2021).

La fermentación alcohólica espontánea del vino es un proceso microbiano resultante de la acción secuencial de diferentes levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* (Escribano, 2021).

La levadura de mayor relevancia utilizadas en la industria enológica es *Saccharomyces cerevisiae* ya que es la responsable de la fermentación de la mayor parte de los azúcares del mosto. Su poder alcoholígeno es elevado (17°C) y es bastante resistente al dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), *Saccharomyces bayanus*, semejante a la anterior resiste también 250 mg/L de SO<sub>2</sub>, pero su poder alcoholígeno es mayor pudiendo superar los 18°. *S. bayanus* es la levadura que se encuentra comúnmente durante las etapas finales de la fermentación y a menudo la responsable de las refermentaciones de vinos embotellados. *Zygosaccharomyces bailii* con un poder alcoholígeno de tan solo 10°, su principal característica es su elevada resistencia al SO<sub>2</sub> (250 a 400 mg/L) lo que le permite iniciar la fermentación en mostos muy sulfitados, comportándose en estos casos como levadura de primera fase. *Debaryomyces*

*bailii* tiene un poder alcohológeno de 8 a 14° y su principal característica es su capacidad para fermentar lentamente los azúcares con lo que los niveles de acidez volátil producidos son menores (Mesas y Alegre, 1999).

Aunque *S. cerevisiae* es considerada la levadura responsable de la fermentación alcohólica, muchas otras especies de levaduras no-*Saccharomyces* están presente durante gran parte de este proceso, participando en las primeras etapas de la fermentación contribuyendo a las características organolépticas del vino (Benito, *et al.*, 2019; Del Fresno *et al.*, 2017; Morata *et al.*, 2018). Tradicionalmente, las levaduras no-*Saccharomyces* han sido consideradas poco relevantes e incluso alterantes, debido a que eran aisladas de vinos defectuosos (Jolly *et al.*, 2014), así como por su elevada producción de compuestos que podrían resultar negativos para la calidad del vino como el ácido acético, el acetato de etilo, el acetaldehído o la acetoína (Cominiti *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha demostrado que, mediante la selección adecuada, las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* pueden tener una influencia positiva en las características del vino (Benito *et al.*, 2015, Ciani *et al.*, 2010; Lambrechts y Pretorius, 2000, Liu *et al.*, 2017; Loira *et al.*, 2015, Medina *et al.*, 2012; Escribano, 2021).

Las características diferenciales encontradas en vinos fermentados en presencia de levaduras no-*Saccharomyces* pueden deberse a su capacidad para secretar enzimas como esterasas, glicosidasas, lipasas, proteasas o celulasas, que actúan sobre los sustratos presente en el medio, mejorando algunas etapas del proceso, como la maceración, la filtración y clarificación, el rendimiento y la extracción de color o las características del vino, especialmente el aroma (Escribano, 2021). Entre las levaduras no-*Saccharomyces*, que generalmente se desarrollan en las primeras fases de la fermentación y que se caracterizan por producir gran cantidad de metabolitos secundarios enriquecedores del sabor y aroma del vino, destacan: *Hanseniaspora uvarum* que junto con *S. cerevisiae* es la levadura más frecuentemente encontrada en los mostos. Su poder alcohológeno es muy bajo (4-5°) y también lo es su rendimiento en alcohol (21 a 22 g de azúcar/1° de alcohol). Además de la producción de enzimas y metabolitos secundarios, las levaduras no-*Saccharomyces* contribuyen a la calidad del vino al reducir el grado alcohólico y la acidez volátil, la modulacion de la acidez mediante la

acidificación y desacidificación biológica o el efecto bioprotector (Mesas y Alegre, 1999; Dutraive, *et al.*, 2019; Gobbi *et al.*, 2013, Quirós, *et al.*, 2014, Simonin *et al.*, 2020; Vilela, 2018).

#### **4.7 Generalidades de las levaduras**

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una gran variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad.

Las levaduras son hongos unicelulares, sus teleomorfos se clasifican en los phyla Ascomycota y Basidiomycota del reino Fungi. En 2011 se reconocían 149 géneros y 1500 especies, actualmente se han identificado 6000 especies clasificadas en los Phyla Ascomycota y Basidiomycota del reino Fungi, por lo que se considera que las levaduras no constituyen una unidad taxonómica real.

A pesar de que han sido aisladas de una gran variedad de hábitats tanto terrestres como acuáticos, algunas están restringidas a la fuente original de donde fueron aisladas (Kurtzman y Fell, 1998).

Son organismos eucariotas con gran diversidad respecto a su tamaño, forma y color. Presentan células generalmente ovaladas, pero también puede con forma esférica, cilíndrica o elíptica; y en ocasiones, bajo condiciones especiales pueden formar cadenas de pseudomicelio o micelio verdadero micelio. Son mayores que las bacterias, alcanzando un diámetro máximo de entre 4-5  $\mu\text{m}$ . Se reproducen vegetativamente por gemación o por fisión (Suárez-Machín, *et al.*, 2016). Forman sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituidas en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoides o alargadas (Carrillo *et al.*, 2007).

Presentan reproducción asexual gemación o fisión, y no forman sus estados sexuales dentro o sobre cuerpos fructíferos. Durante la fase vegetativa, las levaduras se reproducen por gemación. La célula hija inicia su crecimiento formando una yema en la célula madre, posteriormente ocurre la división nuclear, la síntesis de la pared y finalmente la separación de las dos células. Este ciclo puede ocurrir en células haploides o diploides, (González y Valenzuela, 2011). La temperatura de crecimiento de la mayoría de las levaduras oscila entre 5 y 37°C, pero la óptima es de 28° C (Uribe-Gutiérrez y Gutiérrez, 2007). La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre

3 y 10, pero el óptimo es ligeramente ácido, entre 4,5 a 6,5 (Suárez-Machín, et al., 2016).

Algunas especies del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas. Constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso de la humanidad (González y Valenzuela, 2011).

Las levaduras se han utilizado, desde la antigüedad, en la elaboración de cervezas, pan y vino, pero los fundamentos científicos de su cultivo y uso en grandes cantidades fueron descubiertos por el microbiólogo francés Louis Pasteur en el siglo XIX. Se hallan diseminadas por toda la naturaleza. Llegan a la uva por el viento y los insectos siendo retenidas en la pruina, una sustancia cerosa que recubre la piel de la uva. De ahí pasan al mosto cuando se rompe el grano de uva en las operaciones enológicas de estrujado y prensado (Mesas y Alegre, 1999).

#### **4.7.1 Formación de ascosporas**

Las levaduras ascósporógenas pueden ser homotálicas o heterotálicas, y la fase vegetativa es normalmente diploide o haploide o una mezcla de las dos. También se ha reportado la existencia de mayores grados de ploidía (Kurtzman y Fell, 1999).

El ciclo de ciclo de la levadura *S. cerevisiae* alterna dos fases, una haploide y otra diploide. Las células haploides presentan dos posibilidades en su ciclo biológico: un ciclo de reproducción vegetativo, por el que la célula se divide para dar dos células iguales, y un ciclo sexual, en el que dos células de tipo sexual opuesto se fusionan para dar lugar a una célula diploide que entra de nuevo en un ciclo de división vegetativo (Arias, 2012).

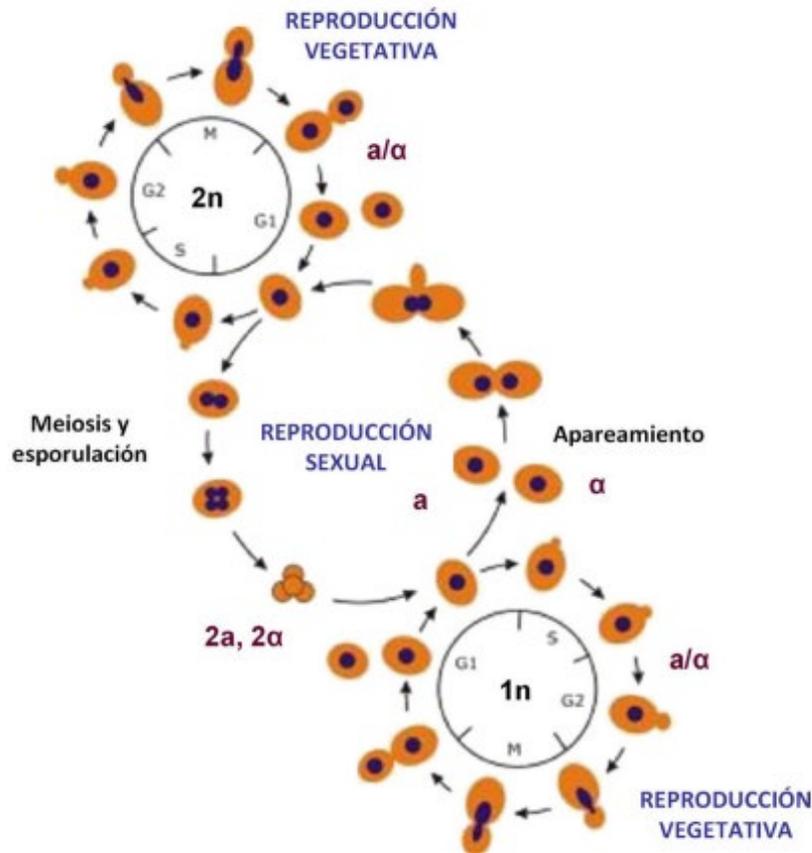


Figura 2. Esquema del ciclo biológico de *S. cerevisiae* (Arias, 2012).

Durante el ciclo de vida vegetativo, la levadura se divide por gemación. La célula hija inicia su crecimiento formando una yema en la célula madre hasta que alcanza un tamaño similar a ésta, teniendo lugar en este momento la citoquinesis, septación y separación de las dos células. Este ciclo está organizado en periodos de división celular bien definidos, coordinados e irreversibles (mitosis), separados por periodos de gran actividad metabólico (interfase). La mitosis es el proceso celular que asegura el reparto equitativo del material hereditario, duplicado durante la interfase, y culmina con la citoquinesis, responsable de la división de los orgánulos y otros componentes citoplasmáticos entre las dos células. La separación se inicia por contracción del anillo de actomiosina, dividiéndose así el citoplasma y dando lugar a dos células idénticas, cada una de ellas con su propio núcleo. El resto de procesos que tienen lugar entre dos mitosis sucesivas y que constituyen la interfase, se puede dividir en varias etapas Gap1 (G<sub>1</sub>), síntesis (S), y Gap2 (G<sub>2</sub>). La fase G<sub>1</sub> se caracteriza por el crecimiento celular y la síntesis de proteínas. Éste es el

momento en el que emerge la yema de la célula madre y se duplica el cuerpo polar de huso (SPB), que es el centro de organización de los microtúbulos, funcionalmente equivalente al centrosoma en las células eucariotas superiores (Bloom y Cross, 2007). A continuación, tiene lugar la fase S, donde se replica el ADN. Después de esta etapa, las cromátidas empiezan a condensarse comenzando la fase G<sub>2</sub>, que permite la preparación para la mitosis. En determinadas circunstancias como la falta de factores de crecimiento o sustancias nutritivas, se ha descrito la existencia de una fase llamada G<sub>0</sub> (fase de latencia o quiescencia), que es reversible, pero de duración indefinida, en la cual las células detienen su maquinaria de replicación y permanecen inalterados su masa y volumen hasta que las condiciones son adecuadas para reanudar el ciclo (Gray *et al.*, 2004).

En cuanto al ciclo sexual, en *S. cerevisiae* existen dos tipos celulares sexualmente opuestos, **a** y **α**, determinados por un par de alelos heterocigóticos: *MATa* y *MATα*. Tanto en células haploides **a** como las **α** expresan de forma constitutiva una feromona del mismo nombre. Estas feromonas permiten detener el ciclo celular de las células de tipo sexual opuesto en G<sub>1</sub>, sincronizándolas así en la misma etapa del ciclo celular, y originando unas proyecciones en ambas células (conocidas como *shmoos*), que se fusionarán formando el cigoto, que será diploide y sufrirá sucesivas mitosis, entrando de esta manera en el ciclo mitótico diploide (Arias, 2012).

Las células diploides pueden reproducirse vegetativamente por gemación si el medio en el que se encuentran tiene los nutrientes apropiados para ello o pueden esporular en condiciones ambientales de limitación de nutrientes, como pueden ser la falta de nitrógeno y la ausencia de una fuente de carbono fermentable en el medio. Durante la esporulación, la célula diploide se divide por meiosis, dando lugar a cuatro células hijas haploides con una dotación cromosómica que será la mitad de la célula madre, las cuales quedan contenidas dentro de un saco denominado asca. Las ascas poseen una pared gruesa capaz de proteger a las células de las adversidades del medio ambiente durante largos periodos de tiempo. Si las condiciones de medio lo permiten, la pared del asca se degrada y libera los productos haploides (ascosporas), que germinarían y comenzaría un ciclo mitótico haploide, dividiéndose por gemación. Además de eso, se ha demostrado que

la levadura puede presentar dos tipos de crecimiento pseudohifal y un crecimiento agarinvasivo (Arias, 2012).

#### **4.8 Factores que afectan el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen) y mecanismos para enfrentarlos.**

##### **4.8.1 Respuesta a cambios de temperatura**

La temperatura es una variable que afecta directamente la tasa de crecimiento de los microorganismos (Arroyo-López *et al.*, 2009), y la composición final del sustrato (Torija *et al.*, 2003).

*S. cerevisiae* exhibe un crecimiento óptimo entre 25° y 30°C. Sin embargo, a temperaturas >36-37°C, las células de levadura activan una respuesta al choque térmico (Proteínas de choque térmico) y modifican varios componentes de su fisiología, incluida la composición de la membrana celular y el flujo de carbohidratos. *S. cerevisiae* y otras levaduras mesófilas mantienen su crecimiento a temperaturas de hasta ~42°C, pero no pueden hacer frente a una exposición continua a temperaturas más elevadas, hecho, la ARN polimerasa II de levadura se inactiva a temperaturas >42°C; (Yamamoto *et al.* 2008 en Morano *et al.*, 2012). Como las células de levadura pueden experimentar este rango de temperatura en el transcurso de un ciclo día/noche, la investigación del HSR inducido por el cambio de 30° a 37°C (el clásico "choque térmico") en un entorno de laboratorio es fisiológicamente relevante (Morano, *et al.*, 2012).

La respuesta a estrés por calor en levadura es de las mejor estudiadas. El incremento de 10 a 15°C por arriba de la temperatura óptima de crecimiento induce la síntesis de un grupo de proteínas llamadas HSP (proteínas de choque térmico). 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 presentes a temperaturas óptimas, y estudios genéticos indican que son proteínas indispensables para mantener el plegamiento correcto de las proteínas, ensamblar y desensamblar proteínas en estados oligoméricos, y degradar proteínas desnaturalizadas o

mal plegadas (Lindquist, 1992). La transcripción de genes inducidos por calor depende de dos elementos regulatorios: el STRE (Elemento de Respuesta a Estrés), y el HSE (Elemento de choque térmico). Este último elemento consta de por lo menos tres copias de la secuencia nGAAn (donde n puede ser cualquier nucleótido) arreglados en orientaciones alternadas. Cambios de secuencia y/o distancia entre los elementos son tolerados *in vivo*, pero la afinidad por el factor de transcripción puede verse afectada, y por lo tanto disminuir la transcripción desde estos promotores mutantes.

El factor transcripcional que se une a los HSEs y activa a los genes que están bajo su control se ha denominado Hsf1p (Factor de Choque Térmico) y está codificado por un gen único y esencial en esta levadura (Santoro *et al.*, 1998).

Algunas células de *S. cerevisiae* pueden crecer rápidamente en temperaturas entre 25°C y 37°C que son bien toleradas, pero a 41°C el crecimiento de disminuye. A temperaturas de 46°C se observa el incremento de las proteínas HSP104 (HSP, proteína de choque térmico) evidenciadas por un análisis tipo Western blot (Holubářová *et al.*, 2000).

El estrés a altas temperaturas influye adversamente en la fisiología y viabilidad celular de la levadura; afecta la morfología de la célula al producir una gemación atípica, el crecimiento de la pared celular es irregular ocasionando el aumento del tamaño de la célula, todo esto afecta la división y crecimiento celular. La temperatura influye en la estructura y función de la membrana plasmática, disminuyendo la cantidad ácidos grasos insaturados de la membrana. Los cambios en la temperatura afectan la disminución del pH intracelular; así como la represión de síntesis de muchas proteínas mitocondriales y en el incremento de la frecuencia de mutaciones y daños por calor al ADN.

Con el objetivo de proteger a las células e inhibir los efectos de la temperatura, Sun *et al.*, (2007) estudiaron el efecto de utilizar microcápsulas (con núcleo líquido y sólido) en una cepa silvestre de *S. cerevisiae*, obteniendo mayor tolerancia al estrés térmico y la acumulación de metabolitos importantes como glicerol y trehalosa.

Carrasco *et al.* (2001) observaron también la expresión de los genes HSP12 y HSP104, mientras que Garay-Arroyo *et al.*, (2004) y Gibson *et al.*,

(2007) describen la producción de las proteínas HSP104, HSP26 y una sobrevivencia de entre 20% y 40% cuando se sometía a las levaduras a un choque térmico a 51°C (López y Larralde, 2016).

#### 4.8.2 Respuesta a cambios de presión osmótica

El éxito de supervivencia de un organismo está vinculado a su habilidad para adaptarse a los cambios que suceden a su alrededor. El estrés osmótico se produce cuando la osmolaridad del medio es superior a la del rango fisiológico de la levadura, puede ser causado por la glucosa, sal, sorbitol o cualquier otro osmolito del medio (Gomar, 2015).

El funcionamiento de las macromoléculas celulares depende de un ambiente químico apropiado que en todas las formas de vida consiste en agua. La molécula de agua es pequeña y en la célula es la molécula dominante por peso y número. La disponibilidad de agua frecuentemente impone límites al proceso de la vida y en los ambientes deficientes en ella solo pueden prosperar formas de vida muy especializadas (Blomber, 1988).

En levaduras hay diversas funciones celulares involucradas en osmorregulación (Blomberg, 1988; Hocking, 1993).

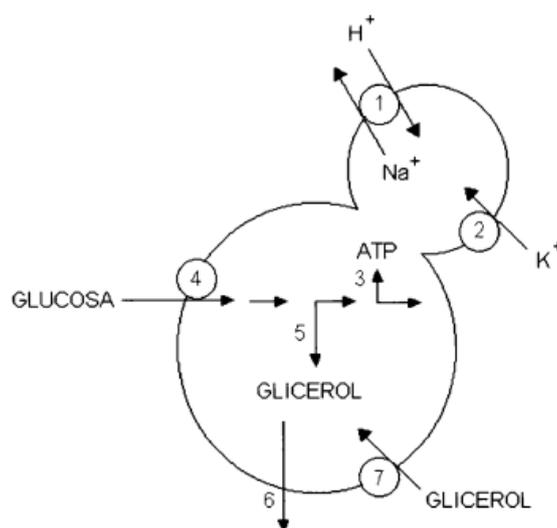


Figura 3. Representación esquemática de las funciones celulares en la osmorregulación de levaduras 1) Expulsión de  $\text{Na}^+$  (ATPasa del tipo P). 2) Incorporación de  $\text{K}^+$ . 3) Aporte de energía. 4) Captación de glucosa. 5) Producción de glicerol. 6) Liberación de glicerol (Fps 1, difusión facilitada). 7) Incorporación de glicerol (Loray, 2002).

- 1) Expulsión de iones de sodio: Para mantener las actividades enzimáticas en niveles apropiados las células aceptan niveles relativamente bajos de iones de sodio. Esto se logra por la baja permeabilidad de las membranas de iones y por la expulsión activa de  $\text{Na}^+$ . En levaduras ocurre un intercambio electroneutro de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  como un sistema de transporte secundario de tipo antiport dirigido por la ATPasa generadora del gradiente de  $\text{H}^+$  y también se ha encontrado en *S. cerevisiae* una  $\text{Na}^+$ -ATPasa que expulsa y que opera a pH más alcalino (Loray, 2002).
- 2) Incorporación de potasio: El transporte de  $\text{K}^+$  en levaduras requiere ATP y está acoplado a la bomba de protones que es el responsable de crear un gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática. Se encontró que en *S. cerevisiae* y *Zigosaccharomyces rouxii* el estrés osmótico, por descenso de la  $a_w$  del medio, provoca la disminución transitoria del  $\text{K}^+$  intracelular y que esto, al menos en *Z. rouxii*, podría ser responsable del disparo de la respuesta adaptativa de las células consistente en la síntesis de ciertas proteínas y la acumulación de glicerol (Loray, 2002).
- 3) Aporte de energía: Los procesos de transporte de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  dependen de un aporte apropiado de energía, el cual explicaría en parte la disminución del rendimiento durante el crecimiento en medio con sal. *S. cerevisiae* disipan más calor por gramo de peso seco formado, como una respuesta al incremento en la salinidad del medio, Eso indica que más energía dirigida durante el crecimiento a bajos potenciales de agua.
- 4) Incorporación de glucosa: Glucosa y otro tipo de sustrato es necesario en la respuesta osmorregulatoria como un sustrato energético en la síntesis de ATP y como fuente de carbono en la producción de solutos compatibles. En levaduras osmotolerantes, el sistema de transporte de glucosa es en general menos afectado por bajos potenciales de agua que el de levaduras menos osmotolerantes, como *S. cerevisiae* (Loray, 2002).
- 5) Producción de polioles: Glicerol es el principal soluto compatible inducible en levaduras. El proceso de producción de glicerol está estrechamente ligado al catabolismo de la glucosa, puesto que uno de los intermediarios en glucólisis sirve como sustrato (Loray, 2002).

- 6) Acumulación de glicerol: Durante el crecimiento en bajos potenciales de agua las levaduras acumulan principalmente glicerol como soluto compatible para lograr reestablecer la relación volumen/turgencia de las células. Se ha demostrado en bacterias y en levaduras que la acumulación de un soluto compatible es el principio central de la respuesta osmorregulatoria a bajos potenciales de agua (Loray, 2002).

En un estudio realizado con una cepa de *Candida tropicalis* aislada de suelos salinos de Pakistán y una cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* se comparó la capacidad de síntesis de osmolitos, como la trehalosa, y el transporte de cationes bajo el estrés salino y demostraron en que cada cepa tenía una capacidad diferente para acumular glicerol y trehalosa, y que la trehalosa actuaba como un protector de membrana (García *et al.*, 1997 en López y Larralde, 2016). Asimismo, Hounsa *et al.* (1998) utilizó una cepa silvestre de *S. cerevisiae* para comparar su maquinaria transcripcional con la de cepas modificadas concluyendo que la trehalosa actúa como un metabolito osmoprotector (López y Larralde, 2016).

De la misma forma, en un estudio comparativo realizado por Tekolo *et al.* (2010) con cepas de levaduras basidiomicetos se observó la aparición de los polioles arabitol y manitol, que actúan como osmolitos que desempeñan un papel importante en la regulación de la presión osmótica. Se sugiere que, la adición de diferentes compuestos a los medios de fermentación, como catequina, inositol, u SO<sub>2</sub>, que son tolerados por las levaduras presentan cambios en los niveles de acumulación y rendimiento de metabolitos importantes, mejorándolos o disminuyéndolos (Caridi, 2003).

Jiménez *et al.* (2011), mencionan que cepas de *S. cerevisiae* utilizadas para la producción de vino, han dado pistas sobre la adaptación de cepas de levadura al alto estrés osmótico, basado en la adaptación a los medios de crecimiento. En otros trabajos que involucran pruebas de tolerancia a dicho tipo de estrés, se observa una alta capacidad osmótica (con 50 y 80% de viabilidad) en cepas industriales de *S. cerevisiae*, donde se relaciona la viabilidad a la síntesis de glicerol (análisis por Northern blot); así mismo se han observado resultados similares en la producción de glicerol bajo el estrés osmótico con sorbitol (Kaino y Takagi, 2008; Garay-Arroyo *et al.*, 2004; López y Larralde, 2016).

El estrés hiperosmótico relacionado con la presencia de sales en el medio fue estudiado con cepas de *S. cerevisiae* industriales y de laboratorio (Modig *et al.*, 2007). Se observó que el tiempo de conversión de la glucosa disminuía entre 80 y 90% en presencia del estrés osmótico, y que; además, aumentaba el rendimiento de glicerol, y disminuía la producción de biomasa en todas las cepas estudiadas. En contraste, con otras cepas Garay-Arroyo *et al.* (2004) no observaron diferencia en el comportamiento a este tipo de estrés.

*Saccharomyces cerevisiae* es una especie que se caracteriza por su capacidad de adaptación constante a su medio ambiente. Para responder al estrés osmótico *S. cerevisiae* presenta distintos mecanismos de acción que implican: la producción de glicerol; la producción de proteínas protectoras del estrés; el reajuste del metabolismo de carbohidratos, de aminoácidos, de lípidos y del sistema redox (Hohman, 2002). En el caso de un incremento exterior de osmolaridad la levadura se adapta acumulando solutos compatibles, como el glicerol, para equilibrar la presión osmótica celular con el exterior. Sin embargo, esta respuesta no se puede considerar como un efecto aislado en la célula, ya que la respuesta al estrés osmótico tiene grandes consecuencias en la fisiología celular, como son la reorganización del citoesqueleto, cambios en la dinámica de la pared celular, alteración en la homeostasis iónica, ajustes metabólicos y el cese del ciclo celular; además de tener un gran impacto en la expresión génica, donde alrededor del 10% de los genes se ven afectados en su expresión (Posas *et al.*, 2002; Rep, *et al.*, 2000).

La estimulación de la expresión génica frente a un choque osmótico está mediada fundamentalmente por la ruta del glicerol de alta osmolaridad (HOG) (O'Rourke *et al.*, 1996). La ruta HOG de *S. cerevisiae* es una ruta de señalización tipo Mapa de quinasas (MAPK) altamente conservada en todos los organismos eucariontes, tanto superiores como inferiores (Hohman, 2002). Las rutas de las quinasas se activan por estímulos externos y están compuestas por módulos de señalización formados por cascadas de tres proteínas quinasas que se activan secuencialmente. La activación de la ruta MAPK supone, en última instancia, la modificación de una serie de proteínas, a menudo factores de transcripción, que permiten modular la expresión génica y así, generar una respuesta celular apropiada a los estímulos externos. De la ruta HOG, que responde específicamente a un incremento de osmolaridad y

es necesaria para la supervivencia celular en esas condiciones, se han caracterizado la mayoría de sus componentes (Tomás, 2005).

La activación de la ruta HOG se realiza a través de dos sistemas de señalización diferentes: el sistema de dos componentes de la histidina quinasa Sln1 y el sistema osmosensor de Sho1. Aunque en condiciones de alta osmolaridad la función de los dos sistemas es redundante, cada uno actúa de un modo distinto. De tal forma que la rama de la quinasa Sln1 es capaz de activarse ante pequeñas variaciones en la osmolaridad extracelular, mientras que la activación de la ruta a través del osmosensor Sho1 requiere diferencias más significativas en la osmolaridad extracelular. La señalización a través de la proteína de membrana Sln1 se basa en la transferencia de fosfato, utilizando para ello un sistema de dos componentes formado por las proteínas Ypd1 y Ssk1. En condiciones normales Sln1 se halla constitutivamente activa, y transfiere el fosfato al aceptor Ssk1 haciendo uso de la proteína intermediaria Ypd1. La fosforilación de Ssk1 impide la unión a las MAPKKK, Ssk2 y Ssk22, lo que se traduce en una inactivación de la ruta HOG. Ante un estrés osmótico, Sln1 se inactiva dejando de transferir el fosfato a Ssk1, lo que permite la interacción de esta quinasa con las MAPKKK (Ssk2 y Ssk22), activándose finalmente la MAPK Hog1 (Hohman, 2002; O'Rourke, 2002).

#### **4.8.3 Tolerancia al estrés por etanol.**

La eficiencia de fermentación y la tolerancia a niveles relativamente altos de etanol son rasgos que ha hecho de *S. cerevisiae* la piedra angular de las actuales industrias de la fermentación. Mientras que la fermentación avanza, y los nutrientes se agotan, el etanol continúa acumulándose en el medio, difundándose libremente a través de la membrana biológica y genera efectos negativos en las funciones celulares. El alcohol etílico es el principal producto metabólico de las levaduras en la fermentación, y es cuantitativamente el principal producto biotecnológico a escala global. Un dilema a confrontar en la tecnología de las levaduras es la acumulación del etanol durante la fermentación que actúa como estrés químico potente hacia las células de levaduras. Los principales efectos del etanol afectan la viabilidad de la célula y su crecimiento, la biosíntesis de macromolécula, y la estructura de la

membrana y su función (Casey y Ingledew, 1986; D'Amore y Stewart 1987; D'Amore *et al.*, 1990; Bai *et al.*, 2004; Pina *et al.* 2004; Navarro, 2016).

Altos niveles de etanol afectan la integridad de la membrana celular, dañan la permeabilidad a numerosas especies iónicas, disminuyen la fluidez de la membrana plasmática, lo que conduce a la disipación del potencial electroquímico transmembrana y, posteriormente, acidifican las condiciones intracelulares y vacuolares (Van Uden 1985; Salgueiro *et al.*, 1988; Rosa y Sá-Correia 1996; Teixeira *et al.*, 2009). En altas concentraciones de etanol, se ha observado que el etanol modifica la conformación de proteínas, como las enzimas glucolíticas, el piruvato quinasa y la hexoquinasa, provocando su desnaturalización y disfunción (Menggen y Lewis, 2010).

De acuerdo con Ma *et al.*, (2013) se ha observado un aumento intracelular de malondialdehído (MDA) en presencia de etanol en el medio. El MDA es uno de los principales productos de la peroxidación de la membrana plasmática y puede oxidar lípidos asociados, ácidos nucleicos y proteínas, fundamentales en el mantenimiento de proteínas, grupos Sulfhídrico (SH) y la membrana celular. La disminución de los grupos SH genera daños en la membrana plasmática y un aumento de su permeabilidad, dando lugar a la pérdida de componentes intracelulares y una mayor entrada de etanol a la célula (Garreau *et al.*, 2000, Alexandre *et al.*, 2001, Del Río *et al.*, 2005).

Mediante estudios de calorimetría y de cálculo de concentración mínima inhibitoria del etanol se ha observado que cepas industriales seleccionadas de *Saccharomyces* aisladas de viñedos rumanos presentaban un rango variable de resistencia al etanol (López y Larralde, 2016). Otras cepas de *S. cerevisiae* han sido modificadas genéticamente para tolerar etanol en medio ácido y a temperaturas elevadas (39 y 41°C), lo cual sugiere su potencial uso en la producción de bioetanol, debido a que fermentación se realiza a altas temperaturas (López y Larralde, 2016).

Muchos de los genes identificados y asociados con la tolerancia a etanol están implicados en la composición de la membrana. Por ejemplo, ETR1, OAR1, SUR4, FEN1, y HTD2 están relacionados con la saturación del metabolismo de los ácidos grasos; COQ1, CDS1, KCS1, ARG82, AYR1, LCB5, LIP5, PDX3, LDB19, y OPI3 están asociados con el metabolismo de los fosfolípidos; y DEP1, FEN2, UME6, HAC1, PEX15 están comúnmente

relacionados con la regulación de lípidos, ácidos grasos y el metabolismo de isoprenoides (Kubota *et al.* 2004; Fujita *et al.* 2006; Van Voorst *et al.* 2006; Auesukaree *et al.*, 2009; Teixeira *et al.* 2009; Yoshikawa *et al.* 2009; Ogawa *et al.* 2000; Alexandre *et al.* 2001; Chandler *et al.* 2004; en Menggen and Lewis, 2010).

#### **4.9 Pruebas moleculares para la caracterización de la diversidad biológica en levaduras**

##### **4.9.1 AP-PCR (Reacción en cadena de polimerasa del cebador arbitrario)**

Es un método empleado en el que utilizan oligonucleótidos o iniciadores arbitrarios para cebar la síntesis de ADN. AP-PCR o Arbitrary primer polymerase chain reaction, por sus siglas en inglés, es un proceso más simple y menos costoso que la técnica RFLP o (fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) (Adamsson *et al.*, 1999).

La técnica AP-PCR o DAF (Amplificación de huellas dactilares) se basa en la amplificación simultánea de múltiples fragmentos de ADN total mediante PCR, utilizando para ello un único cebador, normalmente de 15 bases, cuya secuencia se elige al azar. Las temperaturas de alineamiento empleadas son menores en comparación a las utilizadas en la PCR tradicional, lo cual favorece la inespecificidad de la reacción. Los fragmentos se analizan mediante electroforesis. El número y tamaño de los fragmentos amplificados a partir de del ADN total mediante AP-PCR, se mantiene constante siempre que se utilice el mismo iniciador y se haga el estudio bajo las mismas condiciones (Salas *et al.*, 2001).

La secuencia del iniciador es elegida *a priori* y de manera arbitraria y sólo se utiliza un iniciador por reacción, que actuará al mismo tiempo como iniciador sentido (3'- 5') y antisentido (5'-3'). Los fragmentos obtenidos se visualizan como un patrón de bandas característico de cada cepa, y cada banda observada se considera un locus. La presencia o la ausencia de las bandas entre cepas o aislados se deben a cambios en la secuencia o a la pérdida de los sitios con los que se alinea el iniciador (Navarro, 1999). La inserción o eliminación de nucleótidos en la secuencia intermedia entre los dos sitios de acoplamiento, aumentará o disminuirá el tamaño de la banda amplificada (Rocha *et al.*, 2014.).

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

Esta técnica permite diferenciar distintos microorganismos mediante el análisis de patrones de bandas, derivados de la fragmentación de regiones específicas de su ADN. Estos patrones, conocidos como perfiles de restricción del ADN, se originan por actividad de las enzimas endonucleasas de restricción (Salas *et al.*, 2001).

Cuanto menor sea el tamaño de la secuencia de nucleótidos, mayor será el número de fragmentos o bandas que se generen. Las endonucleasas de restricción se denominan con tres o cuatro letras que proceden del nombre de la bacteria de la que se han aislado, por ejemplo, la enzima Eco procede de *Escherichia coli*, y además se le añade un número romano (Eco RI, Eco RII, Eco 47III), debido a que se pueden encontrar varias enzimas de restricción distintas en la misma bacteria, que reconocen distintas secuencias de nucleótidos. Los fragmentos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose perfiles de restricción característicos. Los perfiles dependerán de la enzima de restricción empleada, de la región de ADN utilizada (ADNn o ADNmt), aunque la más empleado es ADNmt. La comparación entre los perfiles de bandas permite diferenciar cepas de especies entre sí, o incluso poblaciones dentro de una misma especie (Salas *et al.*, 2001).

#### **4.10 Aplicaciones biotecnológicas de las levaduras.**

Desde la antigüedad, las levaduras se han reconocido como protagonistas en la producción de alimentos y bebidas fermentadas. Actualmente, son utilizadas en diferentes áreas de la biotecnología como en la industria alimentaria; la biocatálisis de fármacos y probióticos; en biotecnología ambiental por su aplicación en biorremediación y degradación de contaminantes; como biocontrol para la protección de cultivos; para la producción de proteínas heterólogas, enzimas, hormonas, vacunas y toxinas; como modelos para estudios de la biología molecular y celular, genómica, vías de ingeniería y mecanismo de sistemas biológicos (Mejía-Barajas *et al.*, 2016).

El crecimiento del mercado de sabores, fragancias y pigmentos para el uso en alimentos, bebidas, cosméticos y detergentes, requiere nuevas estrategias de producción que no sean nocivas para el ambiente o para la

salud. Este cambio de mentalidad se basa en la idea de una nutrición sana, natural y económica, debido a que las fuentes de estos compuestos al ser de origen biológico son menos costosas y de fácil acceso. Los hongos por presentar un alto crecimiento y desarrollo, permiten que, a través del metabolismo primario de fuentes precursoras, se logre la obtención de metabolitos secundarios, como sustancias de interés industrial por medio de procesos biotecnológicos, lo cual ha generado una alta expectativa en su uso (Reyes-González y Franco-Correa, 2006).

Las levaduras se emplean actualmente para la producción comercial de cantidades relevantes de alcohol deshidrogenasa, gliceraldehído-3-hidrogenasa, hexoquinasa, lactato hidrogenasa, glucosa 6-fosfato hidrogenasa, así como Coenzima A, nucleótidos difosfopiridinos y mono, di y tri-fosfatos de adenina, guanina, citidina y uridina. La levadura *S. cerevisiae* es la fuente tradicional de invertasa, que tiene un apreciable significado tradicional y se emplea en modo creciente en la producción de bebidas, en la industria repostería y en la agricultura, así como para fines de investigación y tecnológicos. El uso de las levaduras como probióticos es ampliamente utilizado en la alimentación de los rumiantes (Suárez *et al.*, 2016).

## V. ANTECEDENTES

Baleiras, *et al.*, (1996), realizaron una evaluación de diferentes técnicas de tipificación molecular para la asignación de diversidad genética de cepas de *S. cerevisiae*. Las tres técnicas utilizadas en su estudio fueron RAPD, huella genética por PCR utilizando los microsatélites (GAC)<sub>5</sub> y (GTC)<sub>5</sub>, y amplificación y RFLP de las regiones ITS-5.8S y NTS con las enzimas de restricción *TaqI* y *MseI*. Observaron diferencias en las bandas obtenidas con la técnica de huella genética.

Kurtzman y Robnett (1998), realizaron la identificación y filogenia de levaduras ascomicetes a partir de análisis de secuencias parciales del dominio D1/D2 LSU 26S ADNr, y además analizaron el perfil de consumo de azúcares en diferentes medios de cultivo, con el fin de determinar la expresión de transportadores de hexosa durante la fermentación. Esto reveló diferencias significativas en la respuesta de las cepas comparadas al consumo de azúcares, y obtuvieron una cepa con características tecnológicas prometedoras a escala industrial.

Fell *et al.* (2000), realizaron un estudio sobre la biodiversidad y sistemática de levaduras basidiomicetes analizando la secuencia de pares de bases del dominio D1/D2 LSU 26S ADNr y de la región ITS-5.8S. Evaluaron la relación inter e intraespecífica entre cepas de diferentes especies, y observaron diferencias en la secuencia de pares de base en las dos regiones estudiadas.

Caruso, *et al.*, 2002 realizaron un estudio de tipificación de cepas de *S. cerevisiae* y *Kloeckera apiculata* del vino Aglianico utilizando los microsatélites (GAC)<sub>5</sub> y (GTC)<sub>5</sub>, así como la amplificación de la región NTS y RFLP utilizando las enzimas de restricción *HaeIII* y *MspI*.

Kurtzman y Robnett (2003), hicieron un estudio de las relaciones filogenéticas entre levaduras pertenecientes al complejo *Saccharomyces* utilizando el análisis de secuencia multigénica. Realizaron una comparación de la divergencia de nucleótidos intraespecíficos entre genes de especies seleccionadas y observaron diferencias entre cepas pertenecientes a la misma especie y una relación entre cepas de diferentes especies lo que podría ser resultado de una hibridación.

Hernández (2005) realizó la caracterización molecular de especies de *Malassezia* con el fin de relacionar diferentes cepas, las que se dividieron en cuatro grupos diferentes genéticamente.

Pérez-Brito *et al.* (2007), hicieron la caracterización molecular, mediante el análisis de AP-PCR de la región ITS-5.8S con los microsatélites (GAC)<sub>5</sub> MR, (CAG)<sub>5</sub>, (GTC)<sub>5</sub>, M13 (TCC)<sub>5</sub>, (GACAC)<sub>3</sub> y PCR-RFLP de la región NTS con las enzimas de restricción *AluI*, *MspI* y *HaeIII* de 14 cepas de *Kluyveromyces marxianus* aisladas de *Agave fourcroydes* (Lem.) en Yucatán, México. Se observó polimorfismos por parte de las cepas estudiadas y se determinó una nueva cepa.

Arias, *et al.* (2009) realizaron un estudio de caracterización fisiológica de cepas de *S. cerevisiae* aisladas de masato, bebida fermentada tradicional de Perú, y encontraron que las cepas presentaban diferencias en cuanto a su tolerancia a altas temperaturas y a concentraciones de etanol, así como en su actividad enzimática con comparación con cepas aisladas de otros sustratos.

Csoma *et al.* (2010) realizaron un estudio de diversidad biológica de cepas de *Saccharomyces* aisladas de vinos, con fermentación espontánea, provenientes de cuatro regiones vinícolas de Hungría, mediante un análisis fenotípico y genotípico comparativo y determinaron una diversidad muy alta en las cepas estudiadas.

Alcántara *et al.* (2010), analizaron la comunidad bacteriana presente en la taberna, bebida alcohólica tradicional del sureste de México, y observaron que la especie *Zymomonas mobilis* era la dominante durante todo el proceso fermentativo

Santiago-Urbina *et al.* (2015) identificaron nueve especies de levaduras asociadas a la fermentación espontánea de la taberna de 450 aislados y mediante un análisis de UPGMA de los datos obtenidos por RFLP de la región ITS-5.8S.

Illescas (2015) realizó la caracterización morfológica, fisiológica y molecular de una colección de levaduras aisladas de un sistema glaciar en la isla Greenwich en la Península Antártica; identificó nueve especies (*Rhodotorula sp.*, *Rhodotorula laryngis*, *Leucosporidium scottii*, *Guehomyces pullulans*, *Cryptococcus victoriae*, *Candida sake*, *Cystofilobasidium*

*infirmominiatum*, *Debaryomyces hansenii* y *Candida zeylanoides*), observó que únicamente las especies *Candida sake* y *Debaryomyces* asimilaron la glucosa.

Santiago-Urbina (2015), realizó un estudio sobre las especies de levaduras asociadas a la fermentación espontánea en la taberna, observó que las levaduras no-*Saccharomyces* predominaban en las etapas tempranas de la fermentación, seguido de una sucesión y predominio de *S. cerevisiae*.

Díaz *et al.* (2016) caracterizaron fisiológica y molecularmente levaduras aisladas de suelo, y observaron diferencias en su patrón de asimilación de los compuestos de carbono y de nitrógeno.

Santiago-Urbina *et al.* (2016) evaluaron los cambios fisicoquímicos y microbianos durante la producción y fermentación de taberna. Observaron que las poblaciones y la diversidad de especies de levaduras disminuía conforme avanzaba el proceso fermentativo.

Ambrocio (2018), determinó la diversidad de especies de levaduras y la asoció con la composición de su microambiente durante a la producción de taberna provenientes en las localidades Tierra y Libertad y Benito Juárez, Villaflores, Chiapas. Obtuvo 31 aislados representativos para Tierra y Libertad y 117 para la Benito Juárez, identificándose en cinco especies (*Hanseniaspora opunitae*, *Isstachenkia orientalis*, *Pichia manshurica*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kluyveri*), siendo *S. cerevisiae* la especie mayoritaria durante el proceso fermentativo.

## VI. HIPÓTESIS

Durante el proceso de fermentación de la taberna, se observó que *Saccharomyces cerevisiae*, se presentó como la especie mayoritaria y dominante durante las distintas etapas del proceso fermentativo, del cual se obtuvieron 21 aislados que presentaron diferencias morfológicas a nivel de colonia, en las distintas etapas; por lo que se asume que los aislados de *S. cerevisiae* asociadas a la fermentación de la bebida, exhiben diferencias fisiológicas y moleculares dependiendo de la etapa del proceso de la que fueron aisladas, así como la localidad de procedencia de la taberna.

## VII. OBJETIVOS

- Evaluar las diferencias morfo-fisiológicas y moleculares existentes entre 21 aislados de *S. cerevisiae* asociados a la taberna bebida alcohólica tradicional elaborada a partir de la fermentación de savia de palma de coyol (*A. aculeata*) en las localidades Benito Juárez y Tierra y Libertad de Villaflores, Chiapas.

### Específicos

- Determinar las características morfo-fisiológicas de los aislados de *S. cerevisiae* obtenidos de las diferentes etapas del proceso fermentativo de la “taberna”.
- Realizar la caracterización molecular de los aislados de *S. cerevisiae*.
- Analizar la relación de las características morfo-fisiológicas y moleculares entre los aislados de *S. cerevisiae* obtenidos de la fermentación de la taberna de dos localidades.

## VIII. MÉTODO

### 8.1 Material biológico

Los aislados de *S. cerevisiae* empleados en este estudio se seleccionaron de los obtenidos por Ambrocio (2018), y que están conservados en ultracongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH). Los aislados se seleccionaron de acuerdo con las etapas del proceso fermentativo (etapa inicial del día 1 al 4, etapa intermedia del día 5 a 10 y etapa final del día 11 a 15) y considerando las dos localidades donde se elaboró la taberna.

### 8.2 Caracterización macroscópica de levaduras

El cultivo de cada uno de los 21 aislados de *S. cerevisiae* se llevó a cabo en placas de agar WL (Wallerstain, Fluka, Indiana, EUA). Cada uno de los aislados se inoculó en centro de la placa, la que se incubó durante cuatro semanas a  $27^{\circ}\text{C}$ . De acuerdo con su morfología colonial (forma, color del anverso y reverso, superficie, brillo, elevación, textura, olor, borde) los aislados se congregaron en ocho grupos diferentes (Kurtzman *et al.* 2011a).

### 8.3 Formación de ascas y ascosporas

Para inducir la formación de ascas y ascosporas de los 21 aislados de *S. cerevisiae* se inocularon en placas del medio de esporulación de McClary (glucosa 1 g, cloruro de potasio 1.8 g, acetato de sodio trihidratado 8.2 g, extracto de levadura 2.5 g, agar 15 g y agua destilada 1 L) (McClary *et al.*, 1959). El medio se esterilizó en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, ya frío se vació en placas de Petri.

Las placas inoculadas con 6 aislados diferentes de *S. cerevisiae* se incubaron a  $27^{\circ}\text{C}$ , durante varios días o semanas. Diariamente se hicieron preparaciones de cada aislado para observar en el microscopio y verificar la presencia de ascas y ascosporas

### 8.4 Caracterización fisiológica de levaduras.

#### 8.4.1 Evaluación del crecimiento a diferentes temperaturas.

Las levaduras aisladas se evaluaron en su capacidad para crecer a diferentes rangos de temperatura, de  $37^{\circ}\text{C}$  a  $47^{\circ}\text{C}$ , en medio YPD (extracto de levadura

10 g/L, peptona de caseína 20 g/L y dextrosa 20 g/L, agua destilada 1L), siguiendo la metodología descrita por Kurtzman *et al.* (2011a).

#### **8.4.2 Evaluación del crecimiento a diferentes presiones osmóticas.**

##### **Medios**

El crecimiento y resistencia a diferentes presiones osmóticas de los 21 aislados, se evaluó en tres medios de cultivo, dos con concentraciones de 50 y 60% de glucosa, y otro con una concentración de 10% de NaCl y 5% de glucosa (Kurtzman *et al.* 2011).

(1) Agar glucosa al 50%. En un litro de una solución al 1% de extracto de levadura se disolvieron 13 g de agar y posteriormente 500 g de glucosa. El medio se esterilizó a 120°C durante 15 min y posteriormente se vació en placas de Petri.

(2) Agar glucosa al 60%. En un litro de una solución al 1% de extracto de levadura se disolvieron 13 g de agar y posteriormente 600 g de glucosa. El medio se esterilizó a 120°C durante 15 min y posteriormente se vació en placas de Petri.

(3) Medio de 10% NaCl más 5% de glucosa. En 200 mL de agua destilada se disolvieron 20 g de cloruro de sodio y 10 g de glucosa; alícuotas de 4.5 mL se dispensaron en tubos de ensaye con tapa de rosca que se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 15 min. A cada tubo ya frío se le añadieron 0.5 mL de una solución microfiltrada de Base Nitrogenada para levaduras (BNL, Difco, 6.7 g/100mL agua destilada).

##### **(4) Resistencia a cicloheximida**

La prueba se realizó en concentraciones de 0.1% y 0.01% de cicloheximida (p/v): Alícuotas de 4.5 mL se dispensaron en tubos de con tapa de rosca que se esterilizaron a 121 °C durante 15 min. Ya fríos a cada tubo se le añadieron 0.5 mL de la solución microfiltrada de BNL

Los resultados se registraron de la siguiente manera

- + crecimiento positivo
- +/-d crecimiento débil
- -/d crecimiento muy débil
- - sin crecimiento

### 8.4.3 Tolerancia a diferentes concentraciones de etanol

El crecimiento en presencia de etanol se evaluó en placas de agar YM suplementado con 8 % de glucosa de acuerdo con la metodología de Lachance, 1995). El medio se esterilizó a 120°C por 15 minutos. Al medio estéril con una temperatura de entre 45-50°C, se le añadió etanol tibio (6 a 12 % v/v con incrementos de 1 %) inmediatamente antes de vaciarlo a las placas de Petri.

Los 21 aislados de *S. cerevisiae* se inocularon en las placas con las diferentes concentraciones de etanol, se sellaron con Parafilm, se colocaron en bolsa de plástico con cierre y se incubaron a 27°C. El crecimiento de los aislados de *S. cerevisiae* se evaluó durante 9 días (Lachance, 1995).

Los resultados se evaluaron de la siguiente manera):

- +++++ crecimiento positivo muy vigoroso
- ++++ crecimiento positivo vigoroso
- +++ crecimiento positivo menos vigoroso
- ++ crecimiento positivo
- + d crecimiento débil
- - sin crecimiento

### 8.4.4 Fermentación de carbohidratos

Esta prueba se realizó en el medio basal Wickerham (4 g/L de extracto de levadura y 7,5 g/L de peptona de caseína). Se colocaron alícuotas de 2 mL del medio basal en tubos con tapa de rosca, que contenían un tubo de Durham invertido, de acuerdo con la metodología de Kurtzman *et al.* (2011a). Los tubos se esterizaron a 120°C durante 15 min, y se verificó que los tubos de Durham estuviesen llenos de medio basal. A cada uno de los tubos ya estériles se le agregó asépticamente 1 mL de solución concentrada de cada azúcar (2.5 g/100 mL agua destilada), esterilizada por microfiltración para obtener una concentración final de azúcar en el medio de fermentación del 2% (p/v).

Los azúcares que se emplearon en la prueba de fermentación fueron:

- D-Glucosa
- Maltosa
- Sacarosa
- Lactosa
- D-galactosa
- Fructosa
- Rafinosa
- Arabinosa
- D- xilosa

Todos los azúcares fueron de grado analítico y de la marca Sigma-Aldich (Misuri, Estados Unidos)

Los resultados de esta prueba se registraron como se indica a continuación, si la levadura fermentó el azúcar, produjo CO<sub>2</sub> que desplazó el medio de fermentación contenido en el tubo de Durham al llenarlo con CO<sub>2</sub>, y la cantidad de líquido desplazado del tubo de Durham se evaluó de la siguiente manera, (Kurtzman *et al.*, 2011a):

- + si fermentó el carbohidrato y produjo CO<sub>2</sub>
- - no fermentó el carbohidrato ni produjo CO<sub>2</sub>
- + ½ si fermentó el carbohidrato, pero el CO<sub>2</sub> producido sólo vació la mitad del tubo de Durham
- + 1/3 si fermentó el carbohidrato, pero el CO<sub>2</sub> producido sólo vació 1/3 del tubo de Durham (Figura 1).

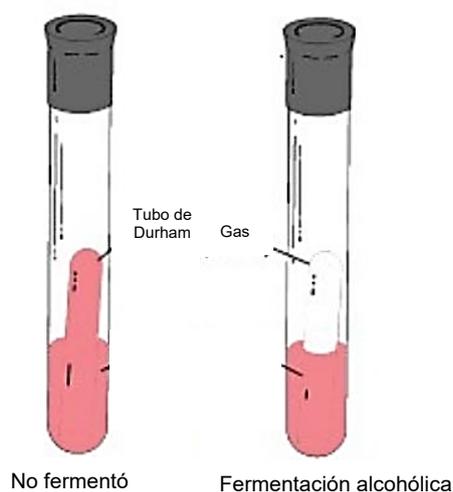


Figura 4. Pruebas de fermentación de carbohidratos utilizando tubos de Durham.

## **8.5 Caracterización molecular.**

### **8.5.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN total se realizó con el Kick Quick DNA Fungal and Bacteria Mini Prep (Zymo Research, Irvin, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante, para después realizar la cuantificación de ADN mediante un espectrofotómetro (Eppendorf BioSpectrometer basic, Hamburgo, Alemania).

### **8.5.2 Análisis de la amplificación con primers o iniciadores arbitrarios con la reacción en cadena de la polimerasa (AP-PCR)**

La reacción AP-PCR se realizó usando tres cebadores o microsatélites de 15 pb, (GAC)<sub>5</sub>, (CAG)<sub>5</sub> y MR (GAC GGT GGC GGT TCT) a 50°C, 60°C y 42°C como temperatura de alineamiento, respectivamente.

Las reacciones de PCR se realizaron en 25 µL de volumen de reacción que contenían 12.5 µL de Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), 1 µL del microsatélite o iniciador (Integrated DNA Technologies, Iowa, EUA), 10 ng de ADN, H<sub>2</sub>O libre de nucleasas la necesaria para completar el volumen de reacción.

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador T-100 Thermal Cycler (BIO-RAD, California, EUA), de acuerdo al siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de: 40s a 95°C de desnaturalización, 60s de alineamiento a la temperatura apropiada para cada cebador y 60s a 72°C de extensión; y un paso de extensión final de 5 min a 72°C.

Los fragmentos de ADN amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p/v), en 1X tampón TBE (Tris-Borate-EDTA) a 100 V durante 40 minutos y teñidos con bromuro de etidio. A cada gel se le añadió un marcador de peso molecular de 100 pb (PROMEGA, Wisconsin, EUA) como referencia. Los patrones de bandas de ADN se visualizaron con un transiluminador GelMax Imager, (UVP, California, EUA) y se adquirieron imágenes con el software Vision Works.

### 8.5.3 Análisis PCR-RFLP de rDNA

La región ITS-5.8S se amplificó con los cebadores universales ITS1 forward (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 reverse (5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 25  $\mu$ L que contenían 25 ng de ADN genómico, 12.5  $\mu$ L Dream Taq Green PCR Master Mix, 1  $\mu$ L DE CADA UNO DE los cebadores ITS 1 e ITS 4 (Integrated DNA Technologies), H<sub>2</sub>O libre de nucleasas la necesaria para completar el volumen de reacción. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador T-100 Thermal Cycler, con el siguiente programa: un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 25 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 58 °C y 60s a 72°C; y una etapa de extensión final de 5 min a 72°C.

La región NTS completa se amplificó con los cebadores JV51ET forward (5' -TGA ACG CCT CTA AGY CAG AAT-3') y JV52ET reverse (5' -TTA TAC TTA GAC ATG CAT GGC-3'). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 25  $\mu$ L que contenían 25 ng de ADN genómico, 12.5  $\mu$ L Dream Taq Green PCR Master Mix 1  $\mu$ L de cada uno de los cebadores JV51ET y JV52ET (Integrated DNA Technologies, H<sub>2</sub>O libre de nucleasas la necesaria para completar el volumen de reacción. El programa de PCR fue el siguiente: 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30s a 94°C, 60s a 57°C y 3 min a 72°C; y un paso de extensión final de 5 min a 72°C.

En ambos casos, los productos de la PCR obtenidos se digirieron con las enzimas de restricción *AluI* (Thermo Scientific), *HaeIII*, *TaqI* y *MspI* (Promega, Wisconsin, EUA).

Cada tubo de digestión constaba de 25  $\mu$ L de volumen de reacción con 4  $\mu$ L del producto de PCR amplificado, 13.3  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, 2  $\mu$ L de buffer 10X (Promega), 0.2  $\mu$ L de Albumina de suero bovino (Promega), 0.5  $\mu$ L de la enzima de restricción. Las reacciones se realizaron bajo las condiciones recomendadas por los fabricantes. Los productos de digestión se analizaron en un gel de agarosa al 2%, utilizando tampón Tris-borato EDTA 1X (Promega), teñido con 15  $\mu$ L de bromuro de etidio. Los patrones de digestión se visualizaron con un transiluminador UV y las imágenes se adquieren con un transiluminador GelMax Imager (UVP) (Pérez-Brito *et al.*, 2007).

## **IX. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Los resultados de cada determinación se registraron en dos matrices binarias; una con los datos morfológicos y fisiológicos, y la otra con los datos moleculares, para comparar los perfiles generados para cada uno de los aislados de *S. cerevisiae* obtenidos de taberna elaborada en las localidades Benito Juárez y Tierra y Libertad, de Villaflores, Chiapas.

### **9.1 Análisis estadístico**

Los datos registrados en cada matriz-fueron analizados mediante un análisis de conglomerados por el método UPGMA con base a las distancias de Jaccard y posteriormente se sometieron a un ANOSIM de una sola vía (Past 4.03).

## X. RESULTADOS

### 10.1 Caracterización macroscópica

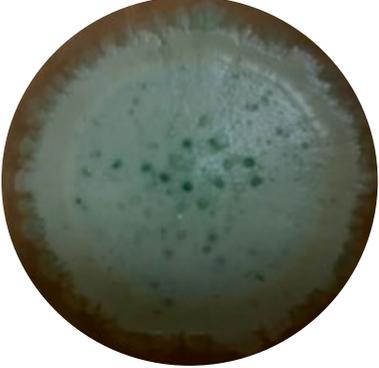
En las colonias de levaduras *S. cerevisiae* aisladas de taberna en las localidades Benito Juárez y Tierra y Libertad del municipio de Villaflores, Chiapas, se observaron características diferentes que permitió agruparlas en ocho grupos (Cuadro 1).

De acuerdo con las características observadas en los ocho grupos, se obtuvieron tres perfiles morfológicos para la localidad Tierra y Libertad y cinco para Benito Juárez, pero no se encontró relación entre las etapas del proceso fermentativo.

Cuadro 1. Características de las colonias gigantes de los aislados de *S. cerevisiae* crecidas en WL agar durante 3 semanas. (BJ: Localidad Benito Juárez, TL: Localidad Tierra y Libertad, 0, i, f; etapas inicial, intermedia y final, respectivamente).

Grupo	Características morfológicas	Colonia/Tipo	Aislados/Origen
I	Colonias redondas, color verde olivo en el centro; color del borde verde, forma ligeramente ondulada a continua; la superficie lisa y brillante, elevada, textura cremosa.		Y14/BJ <sub>f</sub> M24/BJ <sub>i</sub>

<p><b>II</b></p>	<p>Colonias redondas, centro color verde olivo; borde color verde con forma ondulada a continua; superficie lisa y mate, plana de textura cremosa.</p>		<p>X15/BJ<sub>f</sub> X16/BJ<sub>f</sub> C15/BJ<sub>0</sub></p>
<p><b>III</b></p>	<p>Colonias redondas; centro color blanco verdoso con pequeños puntos blanquecidos; borde de color blanco y ondulado a fimbriado; superficie elevada y brillante; textura cremosa</p>		<p>H22/BJ<sub>0</sub> M18/BJ<sub>i</sub> Q25/BJ<sub>i</sub> F31/BJ<sub>0</sub> G30/BJ<sub>0</sub></p>
<p><b>IV</b></p>	<p>Colonias redondas; centro color blanco/beige con pequeños puntos blancos en su superficie; borde color verde jade seguido de un halo blanco, el borde ondulado; superficie ligeramente elevada y opaca; textura cremosa</p>		<p>Ñ35/BJ<sub>i</sub> W36/BJ<sub>f</sub> L22/BJ<sub>0</sub></p>

<p><b>V</b></p>	<p>Colonia redonda, centro color verde blancuzco, con pequeños puntos de color verde claro; seguido de un halo color verde jade-azuloso y con zonas radiales de color verde jade oscuro; borde verde claro ondulado; superficie de la colonia elevada, brillante; textura cremosa (Figura</p>		<p>T35/BJ<sub>i</sub></p>
<p><b>VI</b></p>	<p>Colonias redondas a ovaladas; centro color blanco; borde color verde jade continuo; la superficie plana, lisa y opaca; la textura cremosa</p>		<p>E7/TL<sub>0</sub> X5/TL<sub>f</sub></p>
<p><b>VII</b></p>	<p>Colonias redondas, color blanco, con pequeños puntos verdes en toda la superficie; borde blanco, ondulado a crenado; superficie</p>		<p>K8/TL<sub>i</sub> Ñ5/TL<sub>f</sub></p>

	elevada, brillante; textura cremosa.		
<b>VIII</b>	Colonias redondas a ovaladas; centro color blanco con algunas inclusiones de color blanco más claro, seguido de un halo de color verde claro y un borde de color verde jade oscuro, continuo; superficie elevada, mate; textura cremosa.		F13/TL <sub>0</sub> J5/TL <sub>i</sub>

## 10.2 Formación de ascas y ascosporas

Todos los aislados de *S. cerevisiae* obtenidos de las diferentes etapas de fermentación de la taberna elaborada en ambas localidades formaron ascas no conjugadas con 1-4 ascosporas redondas. No se observó un patrón distintivo entre ambas localidades en lo que respecta a la formación de ascas y ascosporas (Figura 5, Cuadro 4).



Figura 5. Ascas y ascosporas producidas por los aislados de *S. cerevisiae* en el medio McClary.

### 10.3 Caracterización fisiológica

En las pruebas de termotolerancia los aislados C15, K8 y X5, crecieron a 45°C, siendo los únicos que presentaron resistencia a estas temperaturas (Cuadro 2). En las pruebas osmotolerancia se observó que a concentraciones de glucosa del 50% todos los aislados de *S. cerevisiae* tuvieron crecimiento positivo, mientras que en el medio con 60% de glucosa se observó que sólo los aislados C15, T35, Q25, M24, Ñ35, W36, V25, X15, X16, Y14, E7 J5 X5 y Ñ5 crecieron en este medio. Los aislados F13, K8, Ñ5 y M18 presentaron crecimiento débil en el medio concentraciones de 10% de NaCl y 5% de glucosa, siendo este último de la localidad Benito Juárez. En las pruebas de resistencia a concentraciones de 0.1 y 0.01% de cicloheximida, ninguno de los aislados fue capaz de crecer en las concentraciones señaladas. De las pruebas realizadas se obtuvieron seis perfiles, donde se observó que para Tierra y Libertad, los perfiles se asocian a las etapas del proceso fermentativo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Caracterización de los aislados de *Saccharomyces cerevisiae* respecto a la formación de ascosporas, termotolerancia, osmotolerancia y tolerancia a 0.1 y 0.01% de cicloheximida.

S. <i>cerevisiae</i>	Formación de ascosporas	TEMPERATURA (°C)				OSMOTOLERANCIA			TOLERANCIA		
		37°C	40°C	42°C	45°C	50% Glu	60% Glu	10% NaCl 5%Glu	Cicloheximida		P.G.
BENITO JUÁREZ											
ETAPA INICIAL (Día 1-4)											
G30	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	A
H22	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	A
L22	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	B
F31	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	C
C15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	D
ETAPA INTERMEDIA (Día 5-10)											
T35	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	D
Q25	+	+	+	-	-	+	-/d	-	-	-	E
M18	+	+	+	-	-	+	-	-/d	-	-	E
M24	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	A
Ñ35	+	+	+	-	-	+	+/d	-	-	-	E
ETAPA FINAL (Día 11-15)											
W36	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	E
V25	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	F
X15	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	C
X16	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	E
Y14	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	E
TIERRA Y LIBERTAD											
ETAPA INICIAL (Día 1-4)											
E7	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	A
F13	+	+	+	-	-	+	-	-/d	-	-	E
ETAPA INTERMEDIA (Día 5-10)											
J5	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	B
K8	+	+	+	+	+	+	-	-/d	-	-	B
ETAPA FINAL (Día 11-15)											
X5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	E
Ñ5	+	+	+	-	-	+	+/d	-/d	-	-	E

Perfil general se obtuvo de la combinación de los resultados de los diferentes enfoques de tipificación. se le dio una letra diferente a una nueva combinación o tipo de patrón.

En lo que a la tolerancia al etanol se refiere, a partir de la concentración del 12% se observó una disminución en la tolerancia en la mayoría de los aislados, sólo T35, V25, X15, E7, F13, J5, X5, Ñ5 crecieron a 13% de etanol y únicamente E7, J5, X5, Ñ5 al 14 %, el aislado Ñ5 fue el único que toleró a 15%

de etanol. De acuerdo a la tolerancia diferentes concentraciones de etanol se obtuvieron once perfiles (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tolerancia de los diferentes aislados de *S. cerevisiae* a distintas concentraciones de etanol.

<i>S. cerevisiae</i>	CONCENTRACIÓN DE ETANOL %										Perfil General
	2	4	6	8	10	12	13	14	15	16	
<b>BENITO JUÁREZ</b>											
<b>ETAPA INICIAL (Día 1-4)</b>											
G30	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	A
H22	++	++	++	++	++	+/d	-	-	-	-	B
L22	+	+	+	+	++	+	-	-	-	-	C
F31	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	A
C15	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	A
<b>ETAPA INTERMEDIA (Día 5-10)</b>											
T35	++	++	++	++	++	+	+/d	-	-	-	D
Q25	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	A
M18	+	+	+	+	++	+	-	-	-	-	C
M24	+	+	+	+	++	+	-	-	-	-	C
Ñ35	++	++	++	++	++	+d	-	-	-	-	B
<b>ETAPA FINAL (Día 11-15)</b>											
W36	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	E
V25	++	++	++	++	++	++	+/d	-	-	-	F
X15	++	++	++	++	++	+	+/d	-	-	-	D
X16	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	G
Y14	++	++	++	++	+	+/d	-	-	-	-	H
<b>TIERRA Y LIBERTAD</b>											
<b>ETAPA INICIAL (Día 1-4)</b>											
E7	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	I
F13	++	++	++	++	++	++	+/d	-	-	-	F
<b>ETAPA INTERMEDIA (Día 5-10)</b>											
J5	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	I
K8	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	E
<b>ETAPA FINAL (Día 11-15)</b>											
X5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	J
Ñ5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	K

El perfil general se obtuvo de la combinación de los resultados de los diferentes enfoques de tipificación. Se le asignó una letra diferente a una nueva combinación o tipo de patrón.

En las pruebas de fermentación de carbohidratos, en todos los aislados se observó una fermentación positiva de D-glucosa, D-galactosa, fructosa, sacarosa, negativa de la lactosa, arabinosa y D-xilosa, y la maltosa no fue fermentada por los aislados C15, T35 y V25 (Cuadro 4). En el caso de la rafinosa la mayoría de los aislados provenientes de la localidad Tierra y Libertad fermentaron este azúcar, con excepción de E7, mientras que de la localidad Benito Juárez los aislados G30, H22, C15, T35, M24 no la

fermentaron. También se observó que la mayoría los aislados obtenidos de la etapa inicial de la fermentación de la taberna de ambas localidades, no fermentaron o fermentaron parcialmente la rafinosa. Para la etapa inicial del proceso fermentativo en la localidad Tierra y Libertad únicamente el aislado F13 fermentó por completo. Para las pruebas de fermentación se obtuvieron seis perfiles, los cuales en relación a la localidad Tierra y Libertad, se asocian a las etapas del proceso fermentativo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Pruebas de fermentación de carbohidratos por aislados de *S. cerevisiae*.

<i>S. cerevisiae</i>	D-Glu	D-Galac	Malt	Sac	Lac	Raf	Fruc	Arab	D-xilosa	P.G.
<b>PRUEBAS DE FERMENTACIÓN</b>										
<b>BENITO JUÁREZ</b>										
<b>ETAPA INICIAL (Día 1-4)</b>										
<b>G30</b>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	A
<b>H22</b>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	A
<b>L22</b>	+	+	+	+	-	+ (1/2)	+	-	-	B
<b>F31</b>	+	+	+	+	-	+ (1/3)	+	-	-	C
<b>C15</b>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	D
<b>ETAPA INTERMEDIA (Día 5-10)</b>										
<b>T35</b>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	D
<b>Q25</b>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	E
<b>M18</b>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	E
<b>M24</b>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	A
<b>Ñ35</b>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	E
<b>ETAPA FINAL (Día 11-15)</b>										
<b>W36</b>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	E
<b>V25</b>	+	+	-	+	-	+	+	-	-	F
<b>X15</b>	+	+	+	+	-	+ (1/3)	+	-	-	C
<b>X16</b>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	E
<b>Y14</b>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	E
<b>TIERRA Y LIBERTADA</b>										
<b>ETAPA INICIAL (Día 1-4)</b>										
<b>E7</b>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	A
<b>F13</b>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	E
<b>ETAPA INTERMEDIA (Día 5-10)</b>										
<b>J5</b>	+	+	+	+	-	+ (1/2)	+	-	-	B
<b>K8</b>	+	+	+	+	-	+ (1/2)	+	-	-	B
<b>ETAPA FINAL (Día 11-15)</b>										
<b>X5</b>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	E
<b>Ñ5</b>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	E

El tipo de patrón general se obtuvo de la combinación de los resultados de los diferentes enfoques de tipificación. Se le asignó una letra diferente a una nueva combinación o tipo de patrón.

De acuerdo al análisis de UPGMA de la caracterización fisiológica (termotolerancia, osmotolerancia, tolerancia a etanol y fermentación de carbohidratos) presentadas por los aislados de *S. cerevisiae* obtenidos de la taberna, se obtuvieron diez grupos, con una correlación cofenética de 0.68, después de una prueba ANOSIM de una sola vía considerando a las localidades como variables independientes; se observó que hay diferencias estadísticamente significativas ( $R^2=0.46$  y  $p= 0.0006$ ) (Figura 6).

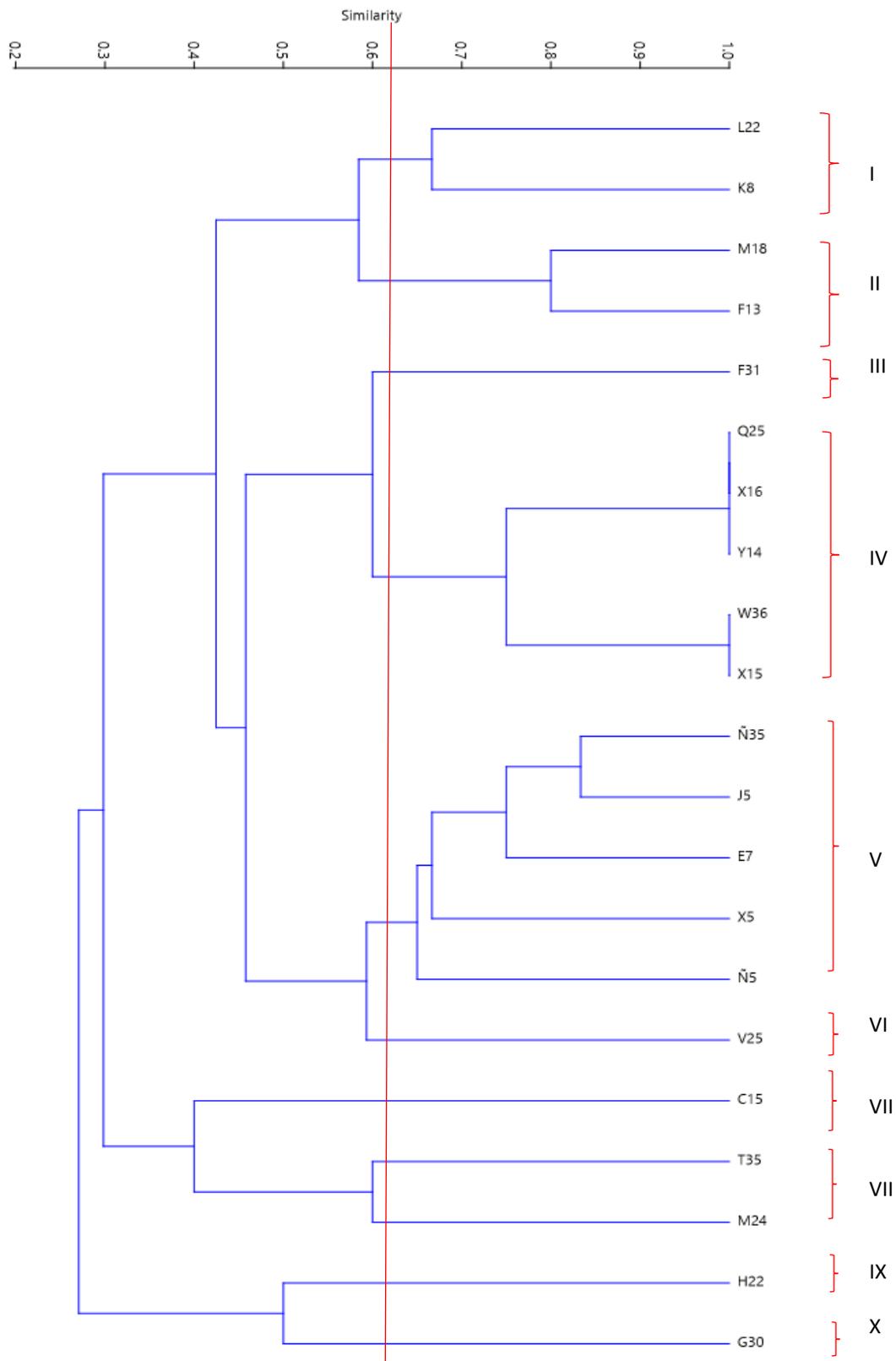


Figura 6. Análisis de las características fisiológicas (termotolerancia, osmotolerancia, tolerancia a etanol y fermentación de carbohidratos) de los diferentes aislados con UPGMA.

## 10.4 Caracterización molecular.

### 10.3.1 Análisis de amplificación arbitraria con reacción en cadena de polimerasa (AP-PCR)

Del análisis de AP-PCR con el microsatélite (CAG)<sub>5</sub> se observaron siete distintos patrones de banda en los diferentes aislados, pero no se observó una relación entre localidades ni etapas del proceso fermentativo (Figura 7). Los tipos de patrón que se identificación están representados por un código de letra (Figuras 7-9).

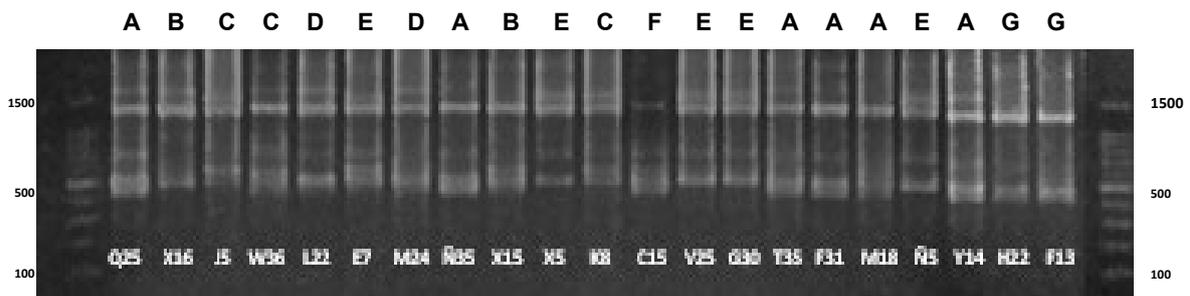


Figura 7. Perfil de bandas de los diferentes aislados de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido por AP-PCR con el microsatélite (CAG)<sub>5</sub>, en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100pb.

Para el microsatélite (GAC)<sub>5</sub> se observaron nueve perfiles polimórficos, del cual el aislado M24 no presentó bandas. De los perfiles obtenidos, no se observó relación entre las localidades o etapas del proceso fermentativo (Figura 8, Cuadro 4).

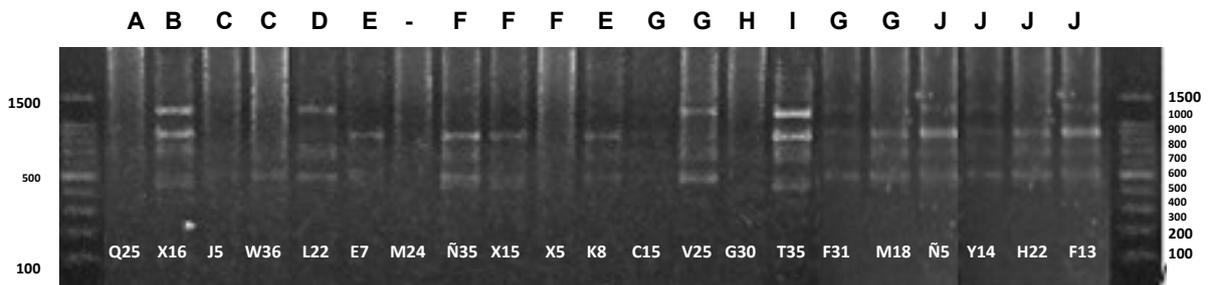


Figura 8. Perfil de bandas de los diferentes aislados de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido por AP-PCR con el microsatélite (GAC)<sub>5</sub>, en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.

Para el microsatélite MR se obtuvieron bandas únicamente en los aislados M24, X5, T35, F31, M18, Ñ5, Y14, F13 y H22, en el que se observaron dos patrones de bandas (Figura 9).

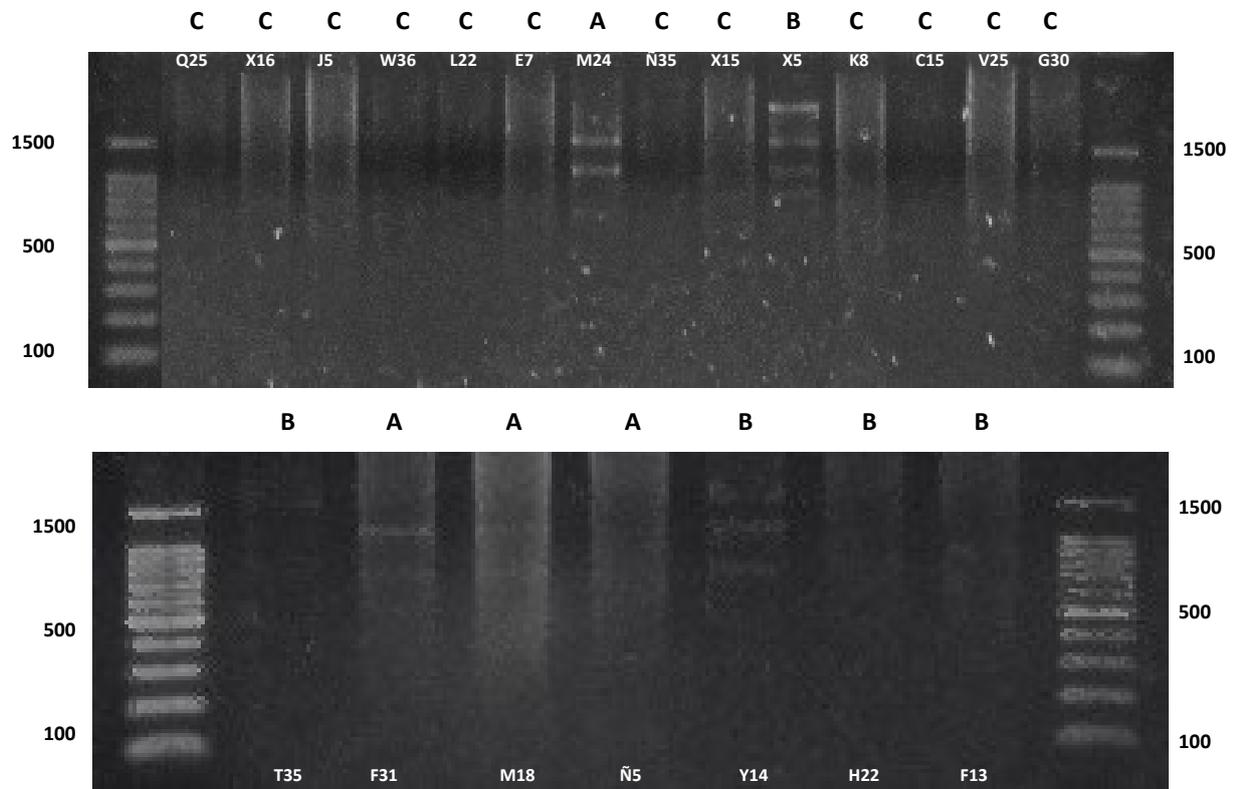


Figura 9. Perfiles de bandas de los diferentes aislados de *S. cerevisiae* obtenido por AP-PCR con el microsatélite MR, en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.

Para el análisis UPGMA utilizando el microsatélite (CAG)<sub>5</sub>, se obtuvieron seis grupos en donde no se observó relación entre localidades o etapas del proceso fermentativo (Figura 10).

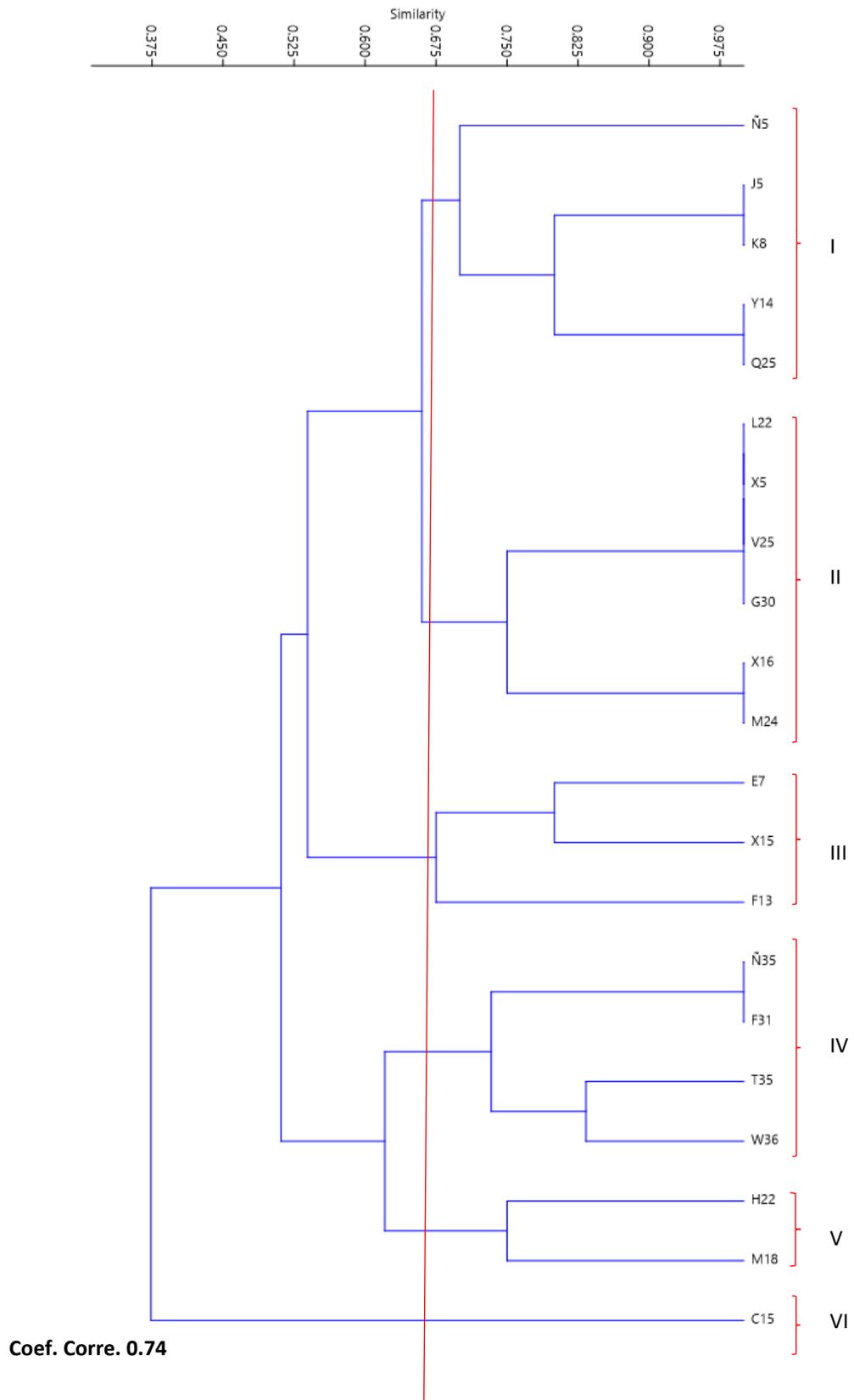


Figura 10. Análisis con UPGMA del patrón de bandas de los diferentes aislados obtenidos con el microsatélite (CAG)<sub>5</sub>.

Para el análisis UPGMA utilizando el microsatélite (GAC)<sub>5</sub>, se obtuvieron cuatro grupos en los cuales no se observa una relación entre las regiones o las etapas del proceso fermentativo (Figura 11).

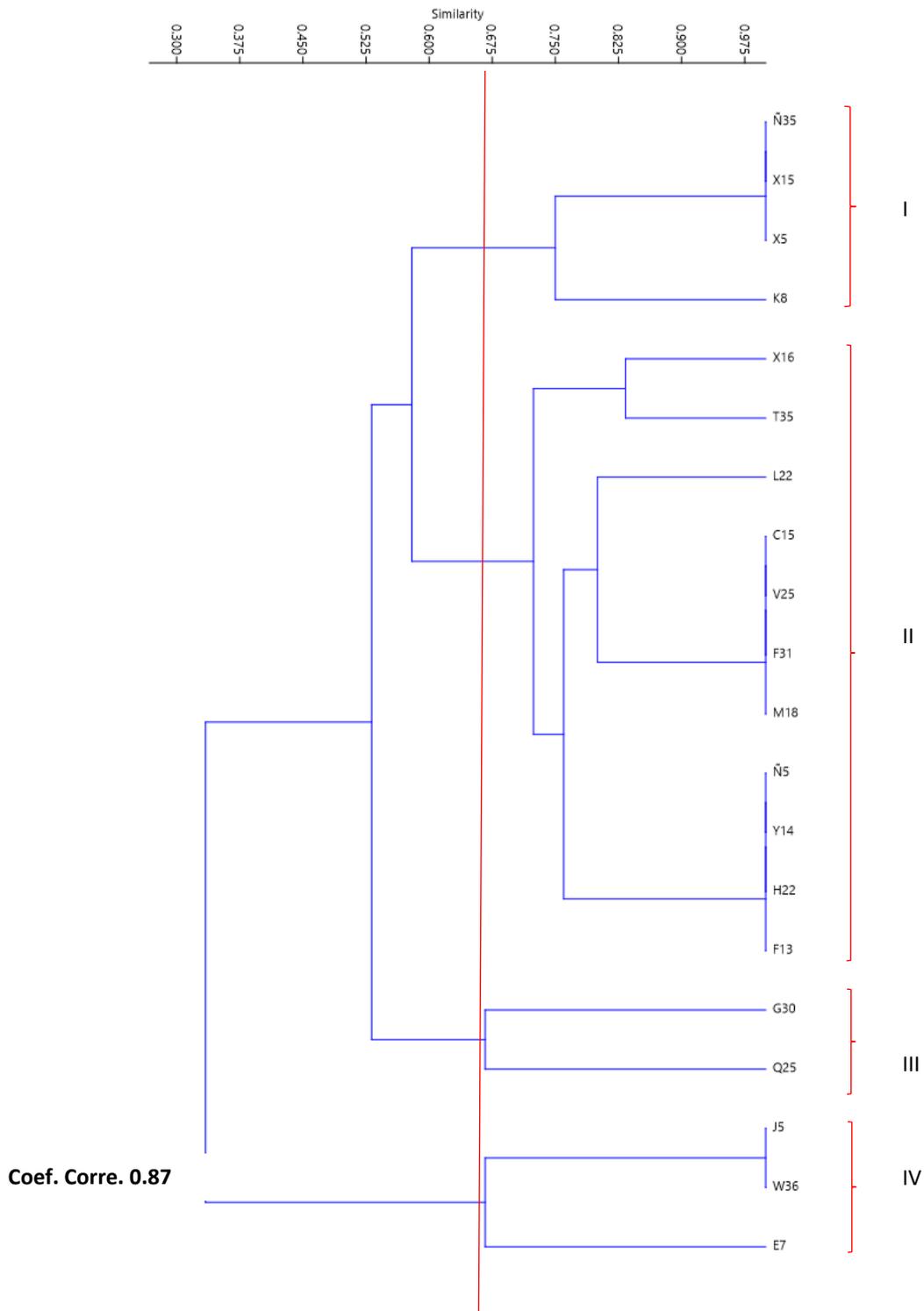


Figura 11. Análisis de UPGMA del perfil de bandas de los diferentes aislados de *Saccharomyces. cerevisiae* obtenidos con el microsatélite (GAC)<sub>5</sub>.

Para el análisis UPGMA utilizando el microsatélite MR, se obtuvieron dos grupos en los cuales no se observa una relación entre las regiones o las etapas del proceso fermentativo (Figura 12).

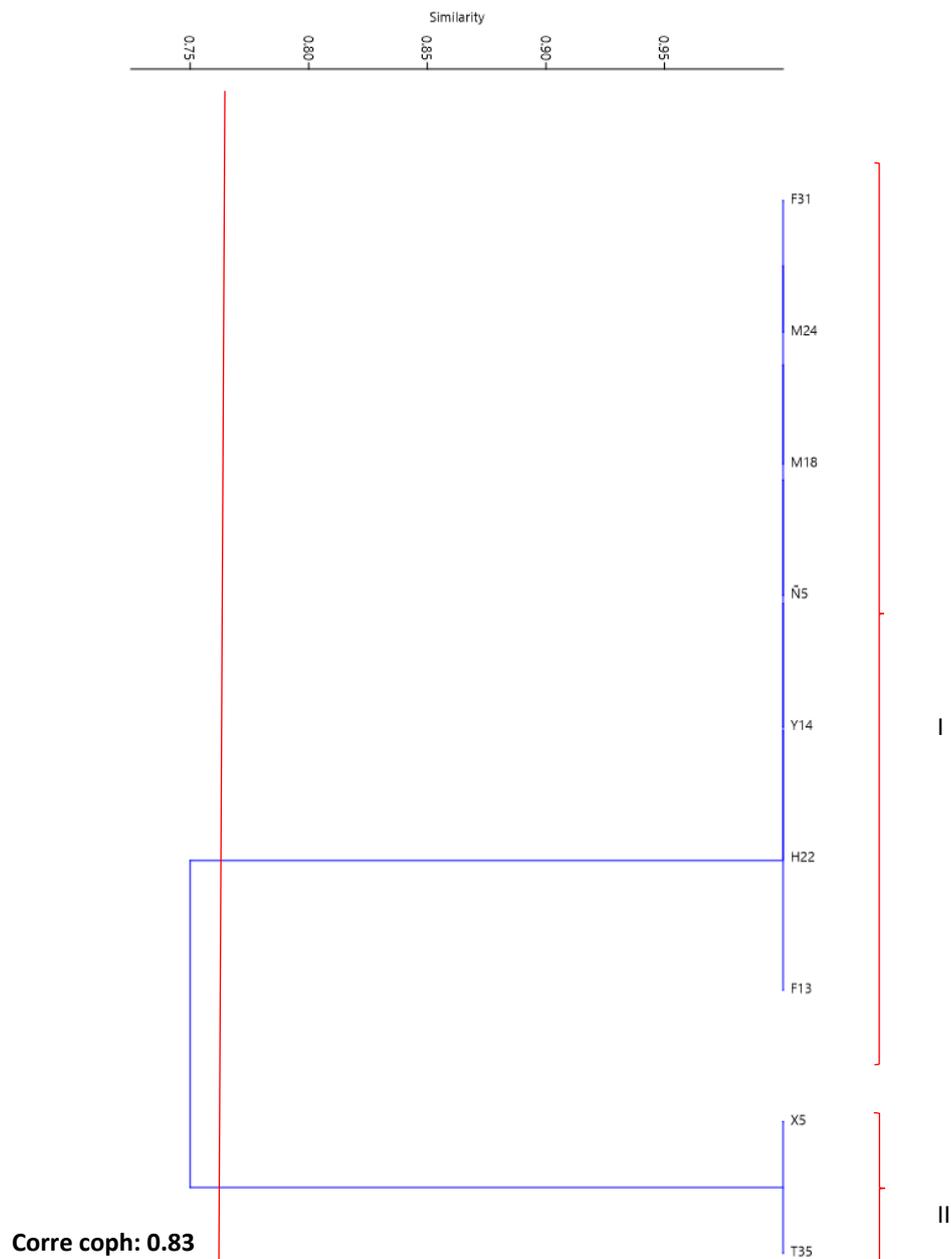


Figura 12. Análisis con UPGMA del perfil de bandas de los diferentes aislados de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidos con el microsatélite MR.

En el análisis de UPGMA, de los tres microsatélites, se determinó que no existe relación entre los perfiles moleculares y las localidades de donde fueron obtenidos los aislados o las etapas del proceso fermentativo (Figura 13).

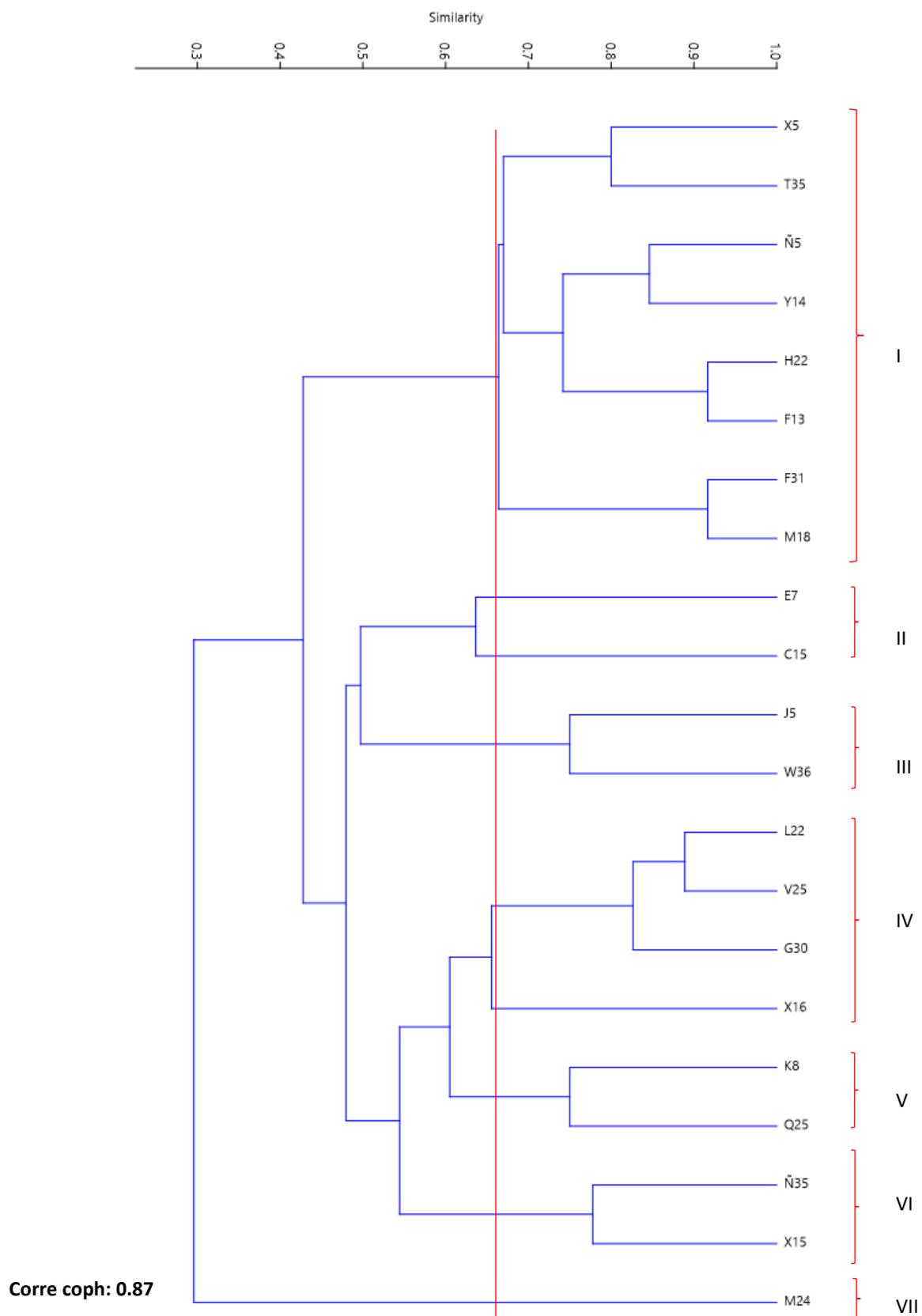


Figura 13. Análisis con UPGMA del perfil de bandas de los diferentes aislados de *Saccharomyces cerevisiae* con los microsatélites (GAC)<sub>5</sub>, (CAG)<sub>5</sub> y MR.

#### 10.4.2 ANÁLISIS POR RFLP DE LAS REGIONES ITS-5.8S Y NTS

En la amplificación de las regiones ITS-5.8S y NTS no se observaron diferencias significativas en cuanto a la presencia de bandas, así como en el peso molecular de cada una de ellas (Figuras 14 y 15). Los perfiles de bandas obtenidos en cada uno de los análisis fueron nombrados con claves de letras (Figuras 14-23).

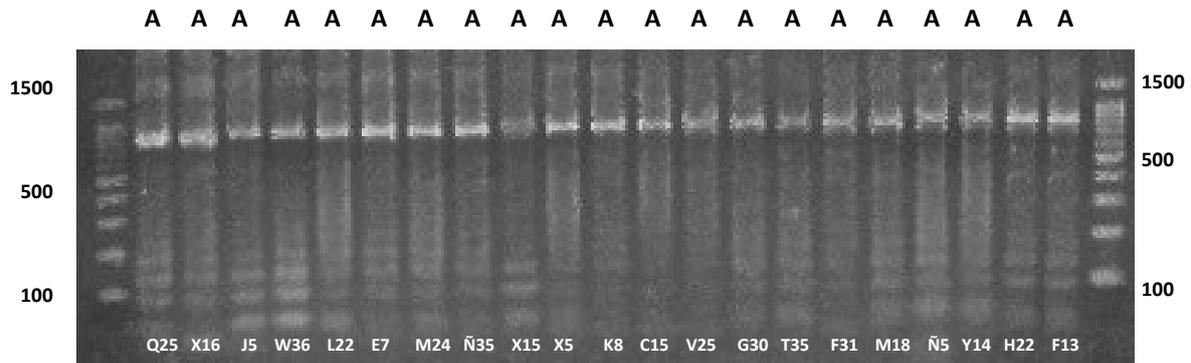


Figura 14. Productos de amplificación por PCR de la región ITS-5.8S de los diferentes aislados de *Saccharomyces cerevisiae* en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.

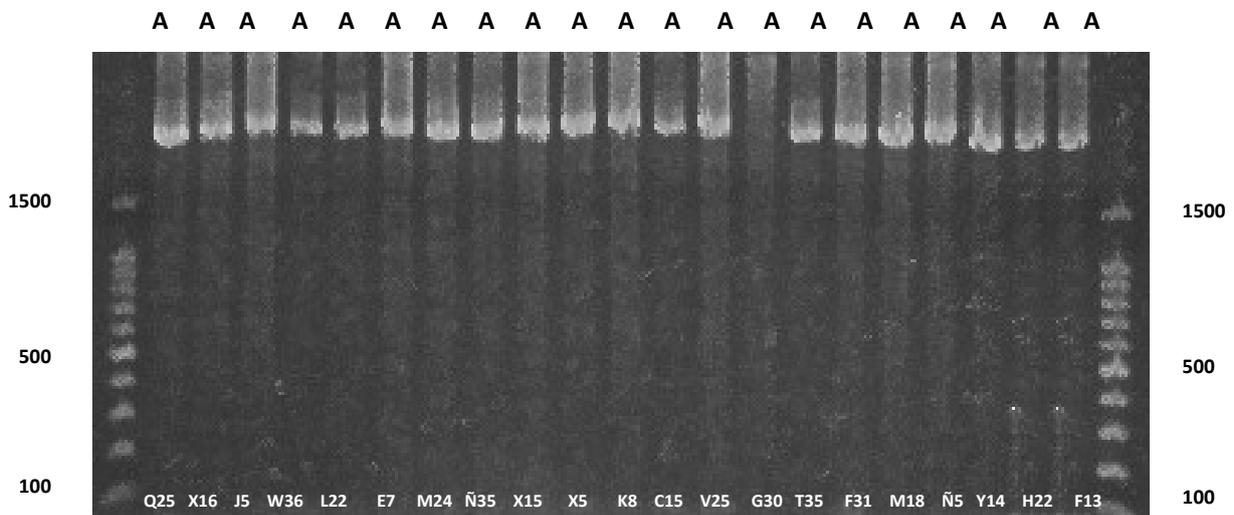


Figura 15. Productos de amplificación por PCR de la región NTS de los diferentes aislados de *Saccharomyces cerevisiae* en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.

Al utilizar las enzimas restricción *AluI* y *MspI* no se observaron cortes en la región ITS-5.8S (Figuras 16 y 17).

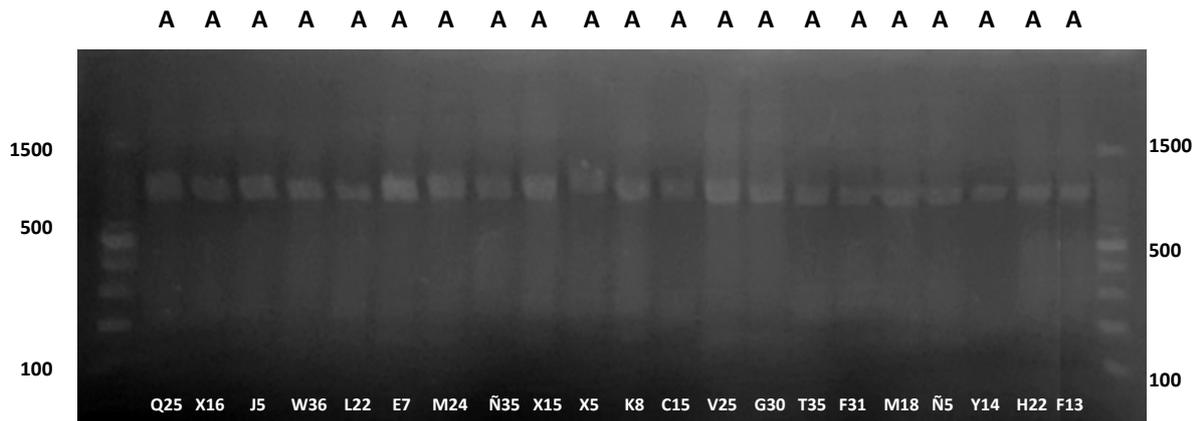


Figura 16. Perfiles de bandas de la región ITS-5.8S de los diferentes aislados de *Saccharomyces cerevisiae* con la enzima de restricción *AluI*, en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.

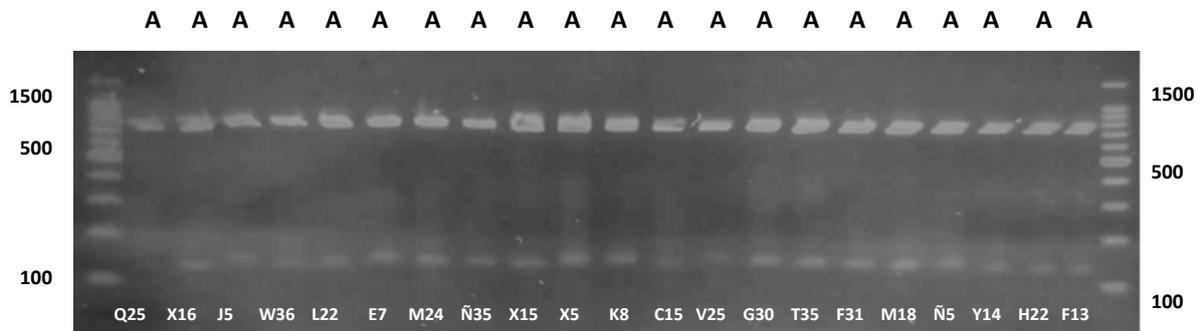


Figura 17. Perfiles de bandas de la región ITS-5.8S de los aislados de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido con la enzima de restricción *MspI*, en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.

En los cortes realizados con la enzima *HaeIII* en la región ITS-5.8S no se observan diferencias en cuanto a los perfiles de las bandas obtenidas, todas presentan el mismo patrón (Figura 18).

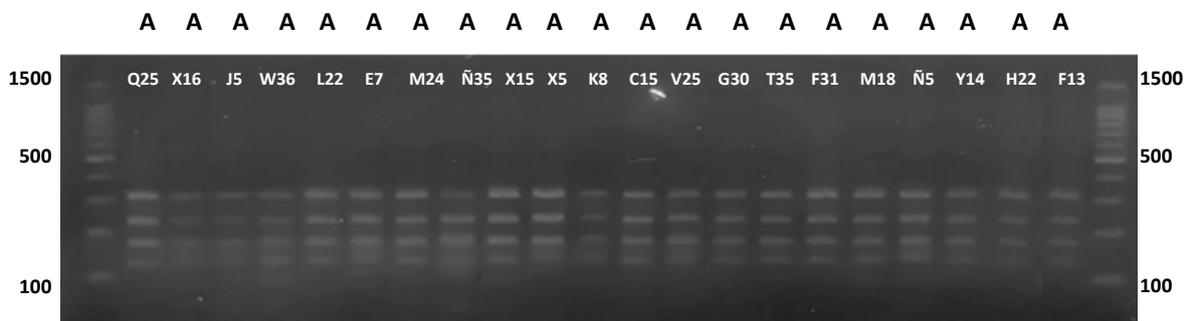


Figura 18. Perfiles de bandas de la región ITS-5.8S de los diferentes aislados de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidos con la enzima de restricción *HaeIII*, en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.

Con la enzima *TaqI* se observó mayor polimorfismo por parte de los aislados, pero no se observa relación entre los perfiles obtenidos y las localidades o etapas del proceso (Figura 19).

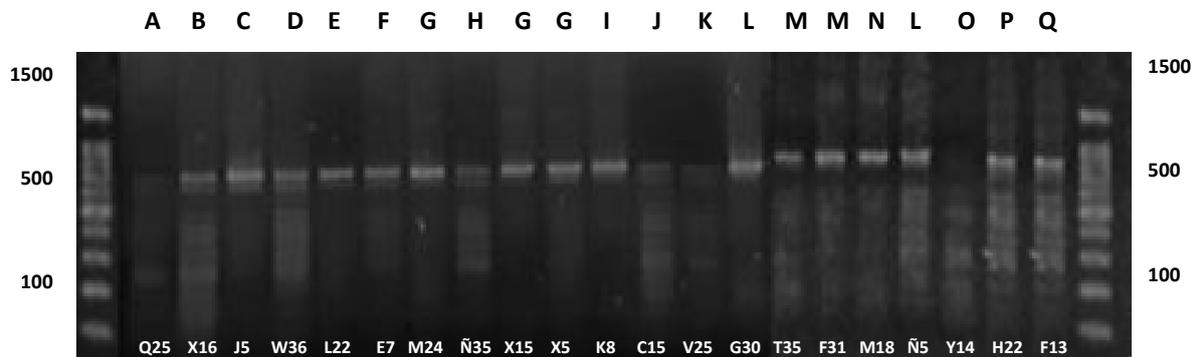


Figura 19. Perfiles de bandas de la región ITS-5.8S de los diferentes aislados de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido con la enzima de restricción *TaqI* en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.

Para la región NTS utilizando la enzima *AluI* no se observan diferencias en cuando a la presencia y tamaño de las bandas excepto para el aislado V25, en donde solo se presentó una banda (Figura 20).

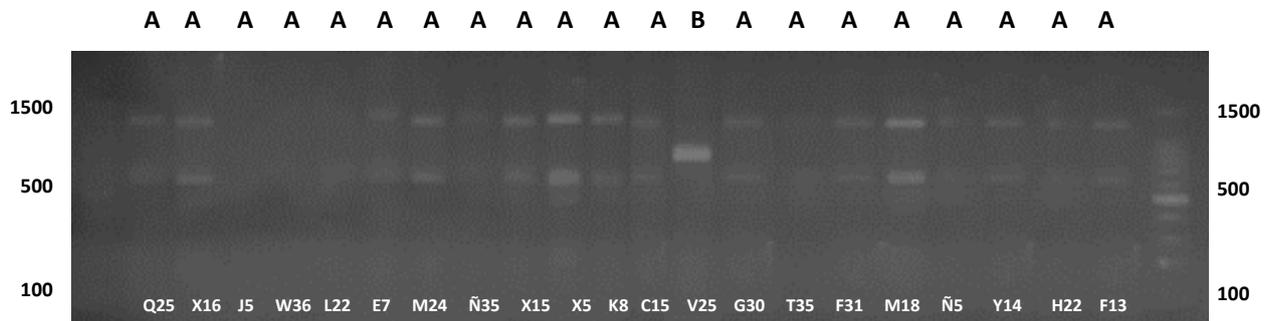


Figura 20. Perfiles de bandas de la región NTS de los diferentes aislados de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido con la enzima de restricción *AluI* en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.

Para los cortes realizados por las enzimas de restricción de la región NTS se observó un alto polimorfismo por parte de los aislados. Con la enzima *TaqI* se obtuvieron siete patrones de banda (Figura 21).

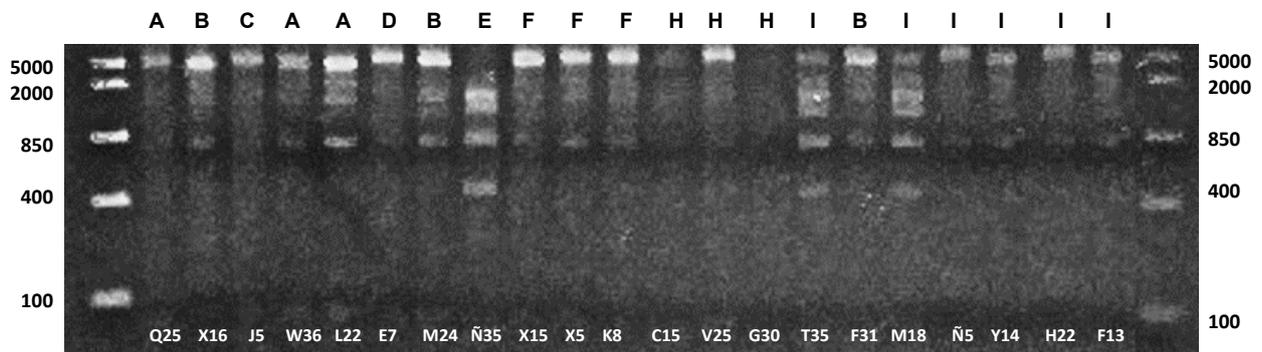


Figura 21. Perfiles de bandas de la región NTS de los aislados de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido con la enzima de restricción *TaqI* en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 5000 pb.

En la enzima *HaeIII* se observan diferencias en la presencia de bandas en la cepa E7 y F31 pertenecientes a la fase inicial del proceso fermentativo en las localidades Benito Juárez y Tierra y Libertad, respectivamente (Figura 22).

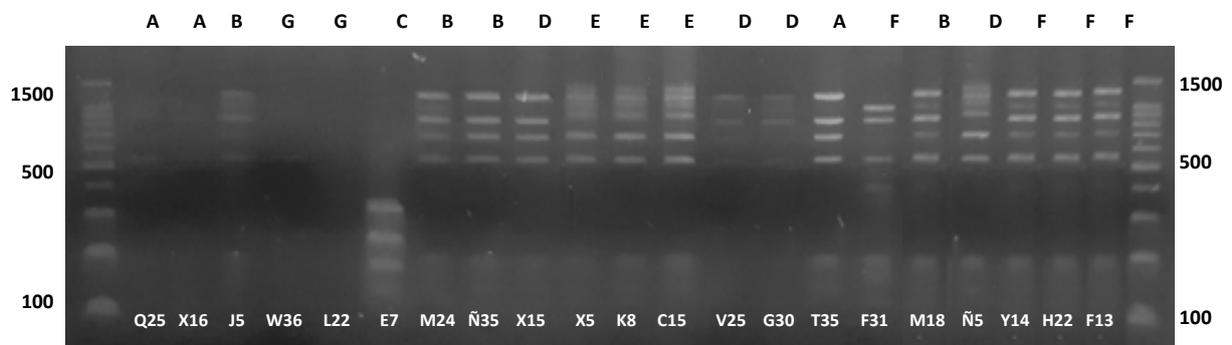


Figura 22. Perfiles de bandas de la región NTS de los aislados de *S. cerevisiae* obtenido con la enzima de restricción *HaeIII*, en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 100 pb.

En los cortes realizados por la enzima *MspI* se observa que la cepa X5 presenta siete bandas, esta cepa pertenece a la etapa final del proceso fermentativo de Tierra y Libertad (Figura 23).

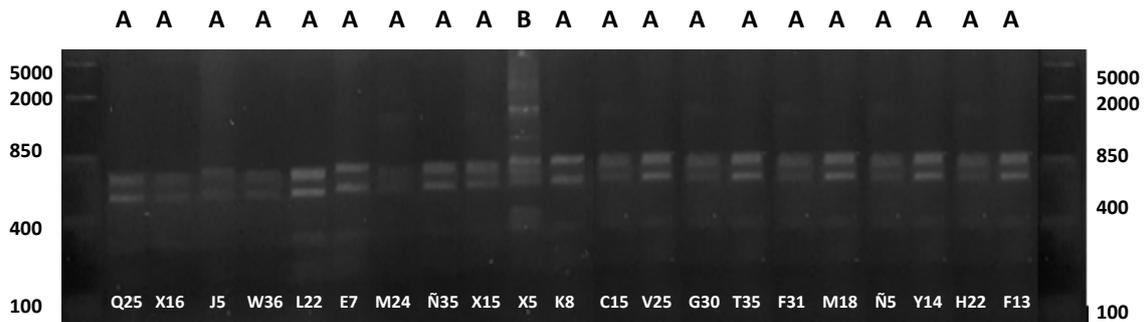


Figura 23. Perfiles de bandas de la región NTS de los aislados de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido con la enzima de restricción *MspI*, en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, con un marcador de 5000 pb.

#### 10.4.3 Análisis de la caracterización molecular

Para las pruebas de AP-PCR con los microsatélites CAG<sub>5</sub>, GAC<sub>5</sub> y MR se obtuvieron diferentes perfiles de bandas lo que es indicativo de un alto polimorfismo en los diferentes aislados. Para el microsatélite (CAG)<sub>5</sub> se obtuvieron siete perfiles diferentes, mientras que para el microsatélite (GAC)<sub>5</sub> se observaron nueve. En el microsatélite MR se obtuvieron dos perfiles moleculares. De los perfiles obtenidos por los microsatélites no se observó que existe relación entre los patrones y las localidades o etapas del proceso fermentativo (Cuadro 5).

Para la amplificación de las regiones ITS-5.8S y NTS no se observan diferencias en los perfiles de las bandas obtenidas. Las enzimas de restricción *HaeIII*, *MspI* y *AluI* utilizadas para la región ITS-5.8S no se presentaron patrones de banda diferentes. En cuanto a la enzima *TaqI* utilizada para la misma región se obtuvieron ocho perfiles diferentes (Cuadro 5).

Para la enzima *HaeIII* utilizada en la región NTS se obtuvieron seis perfiles diferentes. En el caso de la enzima *MspI* para la misma región se obtuvieron tres perfiles. La enzima *TaqI* se presentó ocho perfiles o patrones de banda diferentes. Para la enzima *AluI* se obtuvieron dos perfiles en el que la cepa V25 fue la única con un perfil diferente. De los perfiles obtenidos en ambas regiones no se observa relación entre las localidades, ni las etapas del proceso fermentativo (Cuadro 4). En el análisis general de los patrones de bandas se obtuvieron 20 perfiles generales, en los cuales no se observa

relación entre las localidades, ni las etapas del proceso de fermentación (Cuadro 5).

Cuadro 5. Perfiles de bandas obtenidos por AP-PCR con los microsatélites (GAG)<sub>5</sub>, (GAC)<sub>5</sub> y MR, y RFLP con las enzimas de restricción *HaeIII*, *MspI*, *TaqI*, *AluI* de las regiones ITS-5.8S Y NTS de todos los aislados de *Saccharomyces cerevisiae* aislados de diferentes etapas de fermentación de taberna elaborada en las localidades de Benito Juárez y Tierra y Libertad, Chiapas.

Aislado	Microsatélites			Región ITS 5.8S				Región NTS				Patrón general
	(CAG) <sub>5</sub>	(GAC) <sub>5</sub>	MR	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>TaqI</i>	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>TaqI</i>	<i>AluI</i>	
<b>BENITO JUÁREZ</b>												
<b>ETAPA INICIAL</b>												
G30	E	H	-	A	A	E	A	D	A	H	A	A
H22	J	J	B	A	A	A	A	B	A	I	A	B
L22	E	D	-	A	A	C	A	-	B	A	A	C
F31	I	G	A	A	A	G	A	F	A	B	A	D
C15	H	E	-	A	A	A	A	E	A	H	A	E
<b>ETAPA INTERMEDIA</b>												
T35	I	I	B	A	A	F	A	D	A	I	A	F
Q25	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	G
M18	J	G	A	A	A	G	A	B	A	I	A	H
M24	B	-	C	A	A	C	A	B	A	B	A	I
Ñ35	F	F	-	A	A	D	A	B	A	E	A	J
<b>ETAPA FINAL</b>												
W36	D	C	-	A	A	B	A	-	A	A	A	K
V25	E	G	-	A	A	A	A	D	A	H	B	L
X15	G	F	-	A	A	B	A	D	A	F	A	M
X16	B	B	-	A	A	A	A	A	A	B	A	N
Y14	K	J	B	A	A	H	A	B	A	I	A	Ñ
<b>TIERRA Y LIBERTAD</b>												
<b>ETAPA INICIAL</b>												
E7	F	E	-	A	A	D	A	C	B	D	A	O
F13	J	J	B	A	A	A	A	B	A	I	A	B
<b>ETAPA INTERMEDIA</b>												
J5	C	C	-	A	A	D	A	B	A	C	A	P
K8	C	E	-	A	A	B	A	E	A	F	A	Q
<b>ETAPA FINAL</b>												
X5	E	F	B	A	A	A	A	E	C	F	A	R
Ñ5	E	J	A	A	A	A	A	E	A	I	A	S

Los tipos de patrón de identificación están representados por un código de letra idéntico en una columna, el tipo de patrón general se obtuvo de la combinación de los resultados de los diferentes enfoques de tipificación. se le dio una letra diferente a una nueva combinación o tipo de patrón.

En el análisis de clúster por el método de UPGMA de la caracterización molecular por RFLP de las regiones ITS 5.8s y NTS se obtuvieron 12 grupos, los cuales no mantienen ninguna relación entre las etapas del proceso fermentativo o las localidades de donde fueron aisladas (Figura 24).

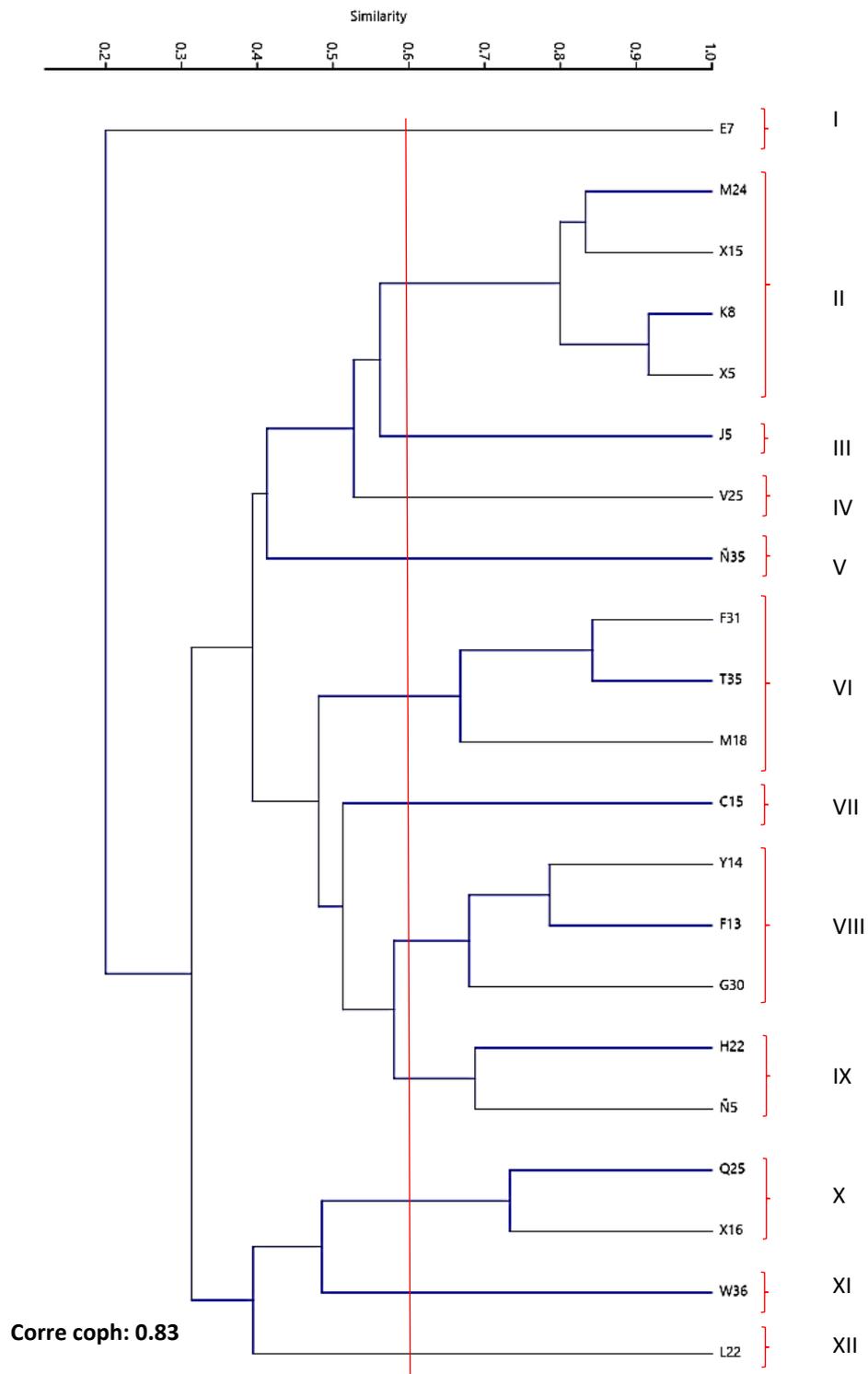


Figura 24. Análisis de la caracterización molecular RFLP de las regiones ITS-5.8S y NTS en aislados de *S. cerevisiae*.

De acuerdo con el análisis de UPGMA de la caracterización molecular presentada por los diferentes aislados obtenidos de la taberna, se obtuvieron 13 grupos; con 0.6 de similitud, con una correlación cofenética de 0.84, después de una prueba ANOSIM ( $R^2=0.12$   $p=0.15$ ) de una sola vía considerando a las localidades como variable independiente; se observó que no existe diferencia significativa entre localidades, es decir, las diferencias moleculares de los aislados de *S. cerevisiae* no presentan relación alguna con la localidad o etapas del proceso fermentativo (Figura 25).

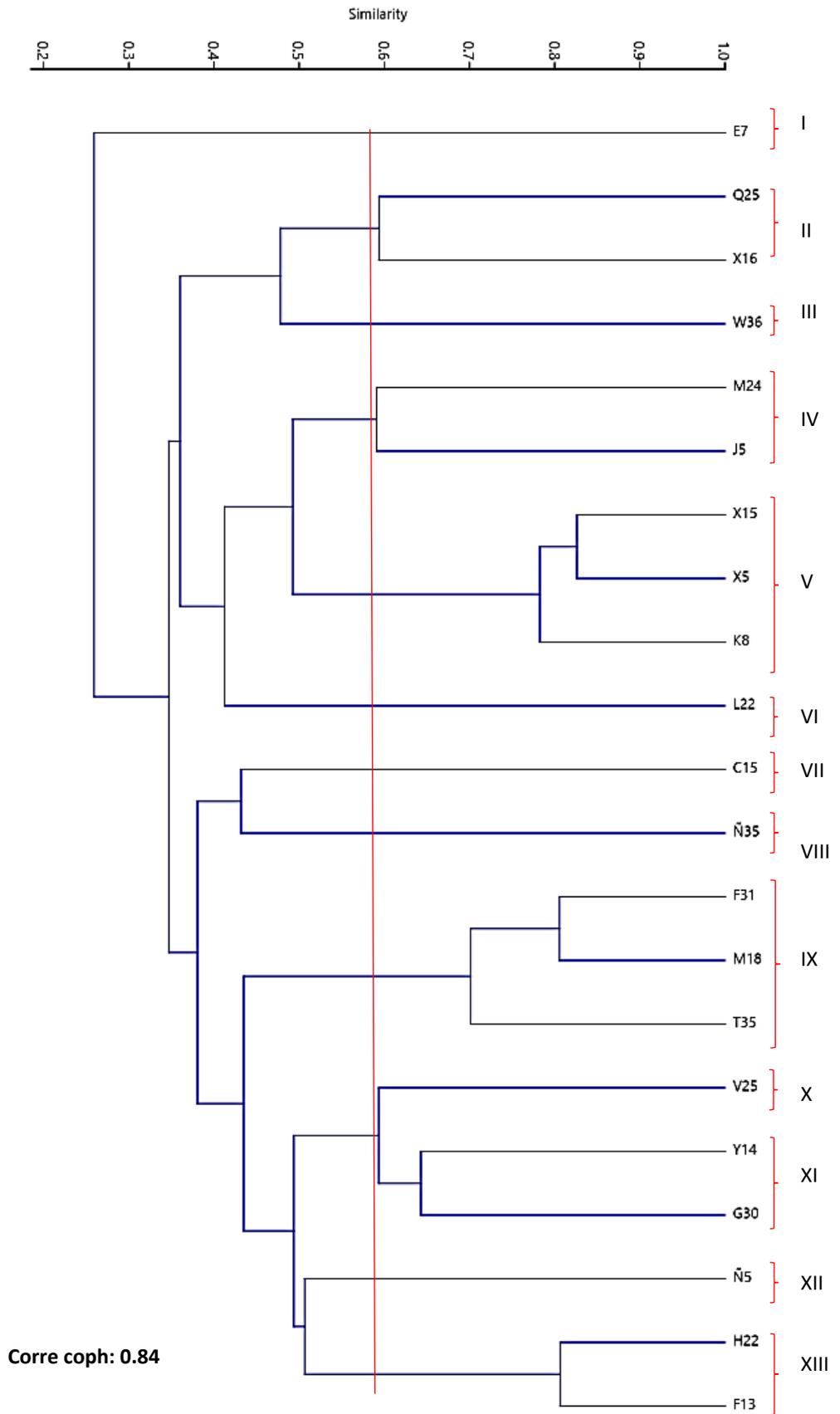


Figura 25. Análisis UPGMA de la caracterización molecular (AP-PCR y análisis RFLP de las regiones ITS 5.8S y NTS) en aislados de *S. cerevisiae*.

#### **10.4.4 Análisis de la relación molecular y fisiológico de cepas de *S. cerevisiae***

En el análisis de UPGMA de la caracterización fisiológica y molecular de los aislados de *S. cerevisiae*, se obtuvieron siete grupos, con una correlación cofenética de 0.82, en el que no se observa un orden de agrupamiento. Después de una prueba ANOSIM ( $R^2=0.15$   $p=0.08$ ) de una sola vía considerando a las localidades como variable independiente, se determinó que existe una amplia variabilidad intraespecífica por parte de los aislados de *S. cerevisiae* (Figura 26).

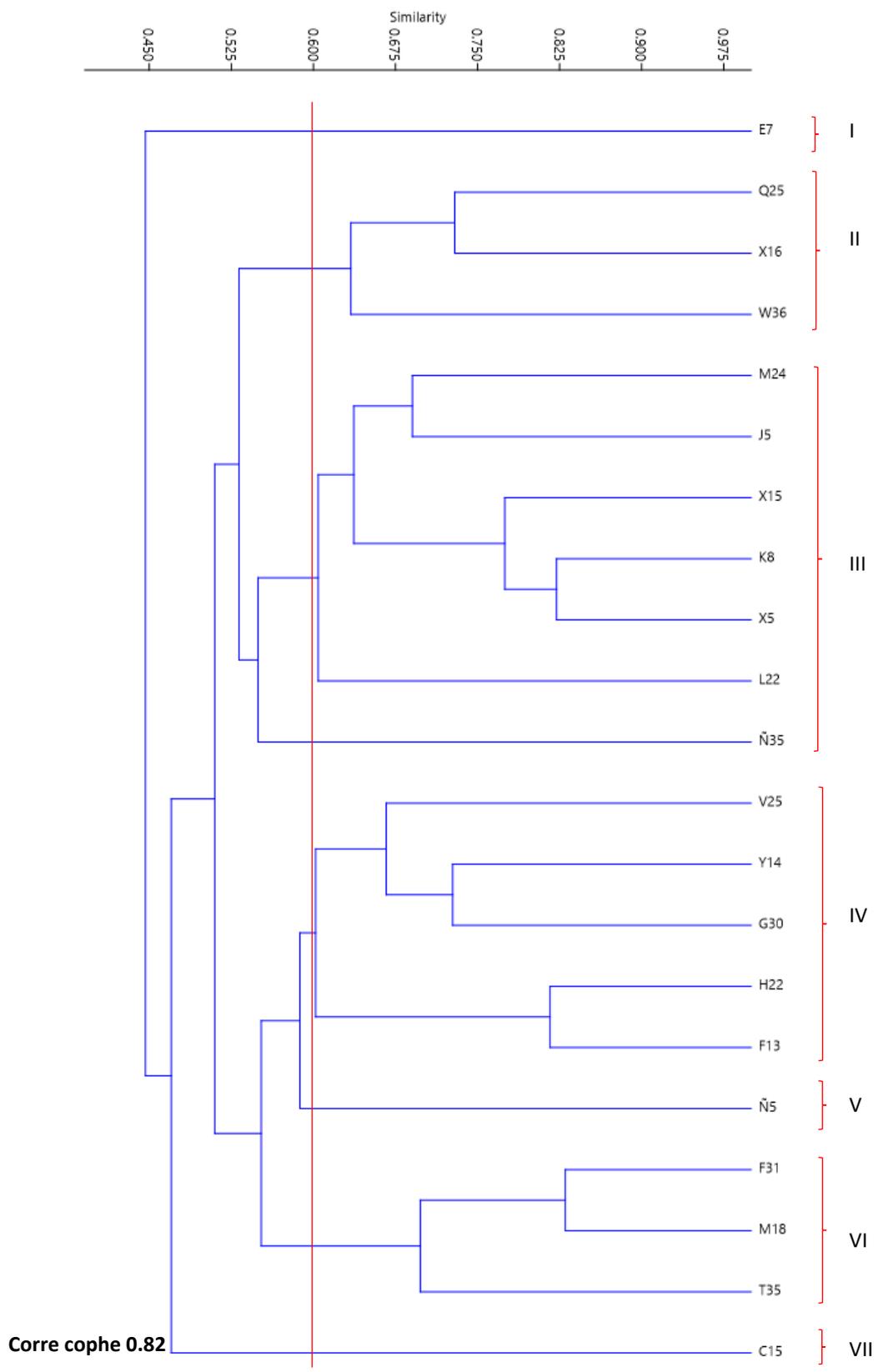


Figura 26. Análisis con UPGMA de la caracterización fisiológica y molecular de los aislados de *S. cerevisiae*.

## XI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los 21 aislados obtenidos en ambas localidades se observaron para Tierra y libertad tres perfiles morfológicos diferentes y cinco para la localidad Benito Juárez. Ichikawa *et al.*, (2016) y Lagos, (2017) mencionan que la diversidad morfológica de las colonias depende del origen del aislado, esto concuerda con lo observado en el presente estudio, debido a que los perfiles obtenidos no se mezclan entre localidad, sino que son específicos para cada una.

Todos los aislados de *S. cerevisiae* estudiados esporularon en medio McClary. De acuerdo con San *et al.*, (1993), *S. cerevisiae* tiene un gen (SSG1) que codifica una 1,3-beta-glucanasa específica que permite la esporulación en *S. cerevisiae*, por lo que los aislados obtenidos del proceso fermentativo de la taberna presentan este gen.

En cuanto a la caracterización fisiológica realizada (termotolerancia, osmotolerancia, tolerancia a etanol y fermentación de carbohidratos), se observaron diferencias en la termotolerancia de los aislados, en donde el aislado C15 de la localidad Benito Juárez, y los aislados K8 y X5 de la localidad Tierra y Libertad, crecieron hasta los 45°C, esto difiere de lo reportado por Morano *et al.*, (2002) quienes indican que *S. cerevisiae* y otras levaduras mesófilas mantienen su crecimiento sólo hasta ~42°C, debido a que la expresión de las HSP (Proteína de choque térmico) no pueden hacer frente a la exposición crónica a temperaturas más altas que inactiva la ARN polimerasa II a temperaturas >42°C, por lo que el crecimiento de estas levaduras podría deberse a la expresión de algún gen alternativo o la mutación del gen que permitiría conservarse a altas temperaturas.

Para la prueba de tolerancia a etanol se observó que los aislados E7, J5, X5 y Ñ5, obtenidos de la localidad Tierra y Libertad toleraron un 14% también y que el aislado Ñ5 creció a concentraciones de etanol de hasta 15%.

En el presente trabajo se observó que el aislado X5 presentó tolerancia tanto a altas temperaturas (45°C) como elevadas concentraciones de etanol (14%). Esta resistencia podría relacionarse a la expresión de dos genes asociados como lo reportaron Piper *et al.*, (1994), quienes mencionaron que en genes que codifican HSP que se indujeron bajo estrés por etanol exhibieron además una amplia superposición con genes asociados con la respuesta al

estrés por calor, por lo que la respuesta de la cepa X5 a ambos factores podrían estar expresándose en conjunto.

Loray, (2002) menciona que *S. cerevisiae* es una especie no osmotolerante, por lo que no crece a altas concentraciones de sales o azúcares, esto difiere de lo observado en el presente estudio. Todos los aislados de *S. cerevisiae* aislados de taberna de ambas localidades crecieron en medio con 50% de glucosa, mientras que a 60% de glucosa se observaron variaciones entre los aislados, siendo los que se obtuvieron de ambas localidades y de la etapa final de fermentación los de mayor osmotolerancia.

En lo que a la tolerancia al 10% NaCl + 5% de glucosa se refiere, tres de seis de los aislados de Tierra y Libertad y uno de Benito Juárez presentaron un crecimiento leve. De acuerdo con lo descrito por Hohman (2002), la osmotolerancia en *S. cerevisiae* está regulada por la ruta HOG (alta osmolaridad del glicerol), en la que participan dos proteínas las cuáles se activan dependiendo de las condiciones del medio. La histidina quinasa Sln1 se activa ante pequeñas variaciones en la osmolaridad extracelular, mientras que la activación de la ruta a través del osmosensor Sho1 requiere diferencias más significativas en la osmolaridad extracelular, por lo que la baja tolerancia a concentraciones del 60% de glucosa y 5% de NaCl + 10% de glucosa podría deberse a una inexpressión en la ruta que dé lugar a estas proteínas.

Para la prueba de resistencia a diferentes concentraciones de cicloheximida no se observó crecimiento de ninguno de los aislados de *S. cerevisiae*. Widoczynski, (1963) menciona que la cicloheximida es un antibiótico que provoca la pérdida de la actividad de la permeasa general de aminoácidos en *S. cerevisiae* debido a la reducción del número de moléculas transportadoras activas en la membrana plasmática, esto debido a la inhibición de la síntesis de algún componente proteico requerido para su actividad, así mismo () menciona que en *S. cerevisiae* en la cicloheximida frena la elongación de traducción, impidiendo la formación de PB (Cuerpo de proteína) y SG (gránulos de estrés) inducidos por estrés.

Pero se han identificado cepas de *S. cerevisiae* que presentan resistencia a este antibiótico debido a que el ergosterol (presencia en *Saccharomyces*) aumenta la rigidez de la membrana plasmática en dichas cepas regulando el paso de sustancia a través de la membrana. Katzmann *et*

*al.*, (1995) mencionan que se requiere de la expresión de un gen que codifica transportadores de casete de unión a ATP para la alta o baja resistencia a cicloheximida en cepas de *S. cerevisiae*. Las mutaciones semidominantes en el gen PDR1 o PDR3 conducen a la resistencia de ciclohexamida en *S. cerevisiae*, así mismo se requiere la presencia del gen codificador de transportadores de membrana PDR5, el cual podría no expresarse en las levaduras obtenidas en ambas localidades.

En la fermentación de azúcares se observaron diferencias en algunos de ellos. Los aislados C15, V25 y T35 no tuvieron la capacidad de fermentar la maltosa, a diferencia de las demás aislados.

Charron *et al.* (1989) reportaron que *S. cerevisiae* requiere uno de los cinco loci MAL encargado de la fermentación de la maltosa (MAL1), que está constituido por tres genes, un gen regulador y dos estructurales que codifican la maltosa permeasa, proteína que transporta la maltosa al interior de la célula, y la maltasa, enzima que hidroliza la maltosa en dos unidades de glucosa, por lo que la deficiencia en la fermentación de la maltosa observada en los tres aislados mencionados podría deberse a que uno de los genes encargados de la fermentación de la maltosa no se expresó o que no se encuentra dentro del loci MAL1.

La fermentación de la rafinosa no fue realizada por un mayor número de aislados, la mayoría obtenidos de la etapa inicial del proceso fermentativo de la localidad Benito Juárez. Losada (1958) menciona que las  $\alpha$ -galactosidasas son inactivas frente a la sacarosa de la rafinosa, donde la glucosa se encuentra bloqueada por la unión de la molécula de galactosa, pero si la  $\alpha$ -galactosidasa, que separa la galactosa de la rafinosa, está simultáneamente presente en la misma levaduras, las  $\alpha$ -galactosidasas se activa y liberando los monosacáridos glucosa y fructuosa, directamente para la fermentación, esto se encuentra asociado al gen MEL1 que permite la expresión de la enzima, por lo que las cepas que no presentan este proceso fermentativo podría relacionarse a la inactividad de la enzima  $\alpha$ - galactosidasa.

Para la caracterización molecular de los 21 aislados, se observaron semejanzas con el estudio de Baleiras *et al.* (1996) realizado con cepas aisladas de vino en descomposición; en el que se presentaron diferencias en los perfiles de bandas obtenidos con el microsatélite (GAC)<sub>5</sub>.

Respecto a los resultados del análisis RFLP de la región NTS con la enzima *TaqI* se obtuvieron diferentes fragmentos de restricción que presentaron bandas de 400 a 5000 pb, difieren con lo obtenido por Baleiras *et al.*, (1996), dado que en su estudio las bandas generadas se mantienen en un margen de 100 a 1500 pb en esta misma región, mientras que para la región ITS-5.8S con la misma enzima, reportaron fragmentos de restricción 100 a 400 pb, a diferencia de este trabajo variaron de 200 a 800 pb, estos resultados pueden deberse a que los aislados de *S. cerevisiae* que ellos estudiaron provienen de ambientes diferentes al que se estudiaron en este trabajo siendo aislados de cerveza y vino.

De acuerdo con el estudio de Caruso *et al.* (2002), sobre el polimorfismo de treinta cepas de *S. cerevisiae*, evaluado por huellas dactilares, por AP-PCR utilizando el microsarlite (GAC)<sub>5</sub> y el análisis de RFLP de la región NTS con las enzimas de reatricción *HaeIII* y *MspI*, las cepas de *S. cerevisiae* generaron dos patrones con (GAC)<sub>5</sub>, a diferencia de ello en el presente estudio se detectó mayor polimorfismo, en que se lograron conjuntar los aislados en 3 grupos polimórficos. El análisis de restricción de la región NTS amplificada por Caruso *et al.*, (2002) presentó el mismo perfil para todas las colonias dentro de la misma especie, excepto para una cepa de *S. cerevisiae*, este resultado es muy similar al obtenido en nuestro estudio en el que se formaron tres grupos que presentaban patrones de bandas diferentes, y uno de los aislados que se manejó como un grupo diferente presentó un alto polimorfismo con respecto a las demás en ambas enzimas de restricción.

## XII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se observó una alta variabilidad en la caracterización tanto morfológica, fisiológica y molecular entre los aislados de *S. cerevisiae* de la bebida tradicional “Taberna” de las localidades de Benito Juárez y Tierra y Libertad. De los grupos obtenidos por la caracterización morfológica de las colonias gigantes de los aislados en el que se obtuvieron cinco grupos para Benito Juárez y tres grupos para Tierra y Libertad, se observó que los perfiles morfológicos obtenidos fueron característicos de cada localidad.

De acuerdo a los análisis clúster realizados se determina que la caracterización fisiológica se encuentra relacionada a la localidad de donde fueron aisladas las cepas, pero no, en relación a las etapas del proceso fermentativo. También se observó que los aislados pertenecientes a la localidad Tierra y Libertad presentan una mayor tolerancia al estrés por calor, presión osmótica y concentración de etanol, por lo que el presente estudio presentaría bases a futuras pruebas para el uso y aprovechamiento de este recurso.

De la caracterización molecular, no se encontró una relación en cuanto a la localidad y la etapa del proceso fermentativo. Se observó que existe variabilidad genética intraespecífica en los aislados de ambas localidades. El polimorfismo que presentaron los aislados no se asocia con sus características fisiológicas. De acuerdo a la alta variabilidad molecular dentro de las localidades, así como las diferencias morfológicas y fisiológicas de los aislados se determinó que los aislados de *Saccharomyces cerevisiae* son cepas diferentes y no la clonación de las mismas.

### XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcántara- Hernández, R. J.; Rodríguez- Álvarez, J. A.; Valenzuela- Encinas, C.; Gutiérrez- Miceli, F. A.; Castañón- González, H.; Marsh, R.; Ayora- Talavera, T. y Dendooven, L. 2010. The bacterial community in “taberna” a traditional beverage of Southern México. *Letters in Applied Microbiology*. 51 (5): 558-563.
- Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., Blondin, B. 2001. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*. 498 (1): 98-103.
- Ambrocio, A. 2018. Ecología de levaduras asociadas a la taberna, bebida extraída de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata* (Jacq) LooD. Ex. Mart). Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas.
- Ambrocio-Ríos. 2019.
- Use of the Coyol Palm (*Acrocomia aculeata*) for the Production of “Taberna), a traditional Fermented Beverage in Mexico. *Fronteirs in Sustainable Food Systems*. 5: 1-8.
- Arias, A., Barrio, E., Belloch, C., Quillama, E., y Querol A. 2009. Caracterización fisiológica y enzimática de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de masato, bebida fermentada tradicional de Perú. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Universitat de Valencia. España.
- Arias, P. 2012. Análisis genómico de la integridad celular en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Doctorado en Farmacología. Departamento de Microbiología. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Arroyo-López, N. F., Orlic, S., Querol, A., & Barrio, E. 2009. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*. 131: 120-127.
- Bailón, R. C. 2012. Fermentaciones industriales. Informe Final de investigación. Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos. Universidad Nacional del Callao. Perú.

- Baleiras, M. M., Eijnsma, B., Hofstra, H., Huis, J. J., IN'T Veld, & Vande Vossen, J. M. B. M. 1996. Evaluation of Molecular Typing Techniques To Assign Genetic Diversity among *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (1). 41-46.
- Balick M. J., 1990. Production of coyol wine from *Acrocomia mexicana* (Arecaceae) in Honduras. *Economic Botany*. 44 (1): 84-93.
- Baselga, I., Zafra, O., Pérez L. E., Francisco-Álvarez, R., Rodríguez- Tarduchy, G., and Santos, C. 2017. An AFLP based method for the detection and identification of indigenous yeast in complex must samples without a microbiological culture. *International Journal of Food Microbiology*. 241: 89-97.
- Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3th Ed. Cambridge University Press, Cambridge, **2000**. pp. 1-1139.
- Bermúdez H., I. D. 2011. Elaboración in vitro de una bebida tipo “taberna”. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Reporte de residencia. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Departamento de Ingeniería Bioquímica. 67 pp.
- Bloom, J., & Cross, F. R. 2007. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Review Molecular Cell Biology*. 8: 149-160.
- Boas, M. V., Carneiro, A., Vital, B., Carvalho, A., & Martins, M. (2010). Efeito da temperatura de carbonização e dos resíduos de macaúba na produção de carvão vegetal. *Scientia Forestalis, Piracicaba* 38, 481-490.
- Borchsenius, F., Morales, R. M. 2006. Diversidad y usos de palmeras andinas (Arecaceae). *Botánica Económica de los Andes Centrales*, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. pp. 412-433.
- Carbonero, P. 1975. *Bioquímica de las fermentaciones*. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid.
- Carrillo, L., Audisio, C., Bejarano, N., Molina, S., Ancasi, G. y Benítez, M. 2007. Levaduras. *Manual de Microbiología de los Alimentos*. México. Pp.40-46.
- Caruso, M., Capece, A., Salzano, G., y Romano. 2002. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Letters in Applied Microbiology*. 34 (5): 323-328.

- Charron, M. J. Read, E., Haut, S. R. and Michels, C. A. Molecular evolution of the telomere-associated MAL loci of *Saccharomyces*. *Genetics*, 122 (2): 307-316.
- Del Rio, D., Stewart A. J., Pellegrini, N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 15 (4): 316-328.
- Escribano, R. 2021. Selección de levaduras no-*Saccharomyces* para la elaboración de vinos tintos de calidad. Tesis de Doctorado en Ciencia y Tecnología. Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de la Rioja. España.
- Ganga, a. 2008. Las levaduras: Microorganismos responsables de la producción de Vinos. *Contribuciones Científicas y Tecnológicas*. 135: 31-36.
- Garreau, H., Hasan, R.N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte. E., & Jacquet, M. 2000. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 146 (9): 2113-2120.
- Godoy, A. 2013. Aislamiento e identificación molecular de especies de levaduras no- *Saccharomyces* presentes en uvas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de la República de Uruguay. Uruguay.
- Gomar, M. 2015. Respuesta de las levaduras al estrés osmótico causado por elevadas concentraciones de Glucosa. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universitat de Valencia. España.
- Gómez T. G. 2014. Método de extracción de la taberna. Tesis de Licenciatura. Facultad de Gastronomía. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.
- Gómez-Díaz. 2021. *Botrytis cinerea* y los vinos procedentes de uvas con *Botrytis*. Tesis de licenciatura en Tecnología de industrias agrarias y alimentarias. Departamento de Química y Tecnología de los Alimentos. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España.

- González, A. y Valenzuela, L. 2011. *Saccharomyces cerevisiae*. En Martínez, E. y Martínez, J. C. (eds) Microbios en línea. México. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>. 30 de mayo de 2020.
- Groewald, M., Robert, V., y Smith M. T. 2011. The value of the D1/D2 and internal transcribed spacers (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus *Yamadazyma*. *Personia*. 26: 40-46.
- Gutiérrez, A. 2013. Nitrogen metabolism in wine yeast during alcoholic fermentation: effect on growth, fermentation activity and aroma production. Tesis de Doctorado. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A., & Werner-Washburne, M. 2004. "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Molecular Biology Review*. 68: 187-206.
- Henderson, A., Chávez, F., Galeano, G., and Bernal, R. 1995. Field guide to the palms of the Americas. Princeton University Press, New Jersey.
- Ichikawa, T. Hirata, C., Takei, M., Tagami, N. Murasawa, H., & Ikeda, R. Cell Surface hydrophobicity and colony morphology of *Trichosporon asahii* clinical isolates. *Yeast*. 34 (3): 129-137.
- Illescas, D. F. 2015. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de levaduras de la Colección de Levaduras Quito-Católica, aisladas de un sistema glaciar en la isla Greenwich en la Península Antártica". Tesis de Licenciatura. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Universidad de las Fuerzas Armadas. Ecuador.
- Hohman, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeast. *Microbiology and molecular biology*. 62: 300-372.
- Katzmann, D. J., Hallstrom, T. C., Voet, M. Wysock, W., Golin, J., Volckaert, G., Moye, Rowley, W. S. 1995. Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (YOR1) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 15 (12): 6875-6883.
- Klages, F. 1968. Tratado de química orgánica. Volumen 3. Campos especiales. Editorial Reverté, S. A. España. Pp. 880
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26s)

- ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 331-371.
- Kurtzman C. P. and Robnett C. J. 2003. Phylogenetic relationships among yeast of the “*Saccharomyces complex*” determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research*. 3: 417-432.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. and Robert, V. 2011a. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeast. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W and Teun, B., Eds., *The Yeasts, a Taxonomy*, 5th Edition, Elsevier. Amsterdam. 87-110.
- Kurtzman, C.P.; Fell, J.W., Boekhout, T., Robert, V. Chapter 7. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In C. P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, T *The Yeasts. A taxonomic study*; (5<sup>th</sup> Ed.). Elsevier B.V., Amsterdam, **2011a**; Vol. 1. pp. 87–110.
- Kurtzman, C. P., Fell, J.W., Boekhout, T. 2011b. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 5th edition. Elsevier. Amsterdam. 2011.
- Lacerda, S. 2008. Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de biocombustibles y bioproductos. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrárias- Universidad de Valladolid. España.
- Lachance, M. A. 2004. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 68. 151–160
- Lachenmeier, D. W., Sohnus, E. M., Atting, R., and López, M. G. 2006. Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican agave spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 3911-3915.
- Lafon-Laforcade, S. 1983. Wine and Brandy. En “Bio- En “Biotechnology” Vol. 5 de: Reed, G. Verlag-Chemie. Heidelberg.
- Lagos, J. F: 2017. Identificación y caracterización de levaduras fermentadoras de cacao (*Theobroma cacao*) provenientes de centros de acopio de dos localidades del Ecuador. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Escuela de Ciencias Biológicas. Ecuador.
- Lehninger, A. L. y Cox, M. M. 2006. Principios de bioquímica. 4a Edición. Editorial Omega. Barcelona. Pp 1232.

- Lentz, D. L. 1990. *Acrocopia mexicana*: Palm of the ancient Mesoamericans. *Etnobiology* 10(2): 183- 194.
- Lindquist, S. 1992. Heat shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Curr. Opin. Genetics Dev Biology*. 2: 748-755.
- López, P., y Larralde, C. p. 2016. Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial. *Investigación y Ciencia*. 24 (67): 86-91.
- Lorenzi, H. S., H. M.; Medeiros-Costa, J. T.; Cerqueira, L. S. C.; Behr, N. 1996. Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas. Nova Odessa.
- Ma, M., Han, P., Zhang, R., Li, H. 2013. Ultrastructural changes of *Saccharomyces cerevisiae* in response to ethanol stress. *Canadian journal of microbiology*. 59 (9): 589-597.
- Magasanik, B. and Kaiser, C. A. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics Deb Biology*. 290 (1–2): 1–18.
- Losada, M. 1958. Hidrólisis de la rafinosa por la melibiosa de levadura y fermentación de dicho azúcar por acción complementaria de genes. *Anales de Edafología y Fisiología Vegetal*. 123-127.
- Maldonado-Mares G. 1992. Frutas Tropicales de Tabasco, Centro de Investigación de Ciencias Biológicas Unidad Sierra, Editorial Impresory Distribuidora S.A., Villahermosa, Tabasco. p.100.
- Martini, A. 1992. Biodiversity and conservation of yeasts. *Biodiversity and Conservation*. 1 (4): 324-325.
- Mas, A. Beltrán, G., Sancho, M., Gutiérrez, A., Chiva, R., Guillamón y J. M. 2013. Metabolismo nitrogenado de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación vinica. [http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/metabolismo\\_nitrogenado\\_scerevisiae\\_cienc1013.htm](http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/metabolismo_nitrogenado_scerevisiae_cienc1013.htm). Consultado el 02 de abril de 2020.
- Mayorga M., F. y De la Cruz, S. 2000. Recetario zoque de Chiapas: Cocina indígena y popular de México. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. CONACULTA. 1a. Edición. México. Pp. 211.
- Mejía-Barajas, J. A., Montoya-Pérez, R., Cortés-Rojo, C. y Saavedra-Molina, A. 2016. Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, estrés oxidativo y respuesta antioxidante. *Información Tecnológica*. 27 (4): 3-16.

- Meléndez, N. P., Rodríguez, R., Velázquez, J., Aguilar, C. N. 2011. Tuba: una bebida fermentada tradicional de Colima. *Ciencia Acierta*. 7 (25): 1-15.
- Menggen M. Lewis Z. 2010. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology Biotechnology* 87: 829-845.
- Mesas, J. M. y Alegre, M. T. 1999. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Journal of Food*. 2 (4): 174-183.
- Miranda, I. 2001. Frutos de palmeiras da Amazônia. Presidência da República. Ministério da Ciência e Tecnologia. Presidência da República, Ministério da Ciência e Tecnologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Eds.). Manaus, Brazil. Pp 65-68.
- Mondragón R., M. A. 2015. Creación de 10 recetas con Taberna de la Palma de Coyol (*Acrocomia aculeata*). Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Licenciatura en Gastronomía. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Pp 60.
- Moreno, C. P. and Paradowska, K. 2009. Useful plants of tropical dry forest on the coastal dunes of the center of Veracruz State. *Madera Bosques*. 15 (3): 21-44.
- Motta, P. D., Curi, N., Oliveira-Filho, A. D., y Gomes, J. B. V. 2002. Ocorrência de macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37: 1023-1031.
- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Row, W. S. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 190 (4): 1157-1195.
- Navarro Q. A. 1999. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto sonorenses a partir de RAPDs. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F. 96 pp.
- Navarro, E. 2016. Estudio de la adaptación a estrés por etanol en cepas *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad de Valencia. España.
- Ogbulie, T. E., Ogbulie, J. N., Njoku, H. O. 2007. Comparison study on the microbiology and shelf-life stability of palm wine from *Elaeis guinnensis*

- and *Raphia hookeri* obtained from Okigwe, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 6 (7): 914-922.
- Ochoa, J. L. y Vázquez, R. 2004. Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológicas. *Universidad y Ciencia* 1: 39-50.
- Oliva, A. A. 2012. Evaluación cinética y molecular de levaduras fructofílicas aisladas de mezcal tamaulipeco. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Orantes- García, C.; Miceli M., C. L; Garrido R, E. R. y Pérez F., M. A. 2010. Estudios de latencia en la germinación de *Acrocomia mexicana* Karw (coyol). En Reyes E. F. Biodiversidad y Sustentabilidad. Colección Jaguar. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. 91- 105.
- Orberá T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericanoamericana de Micología*. 21:15-19.
- O'Rourke, S.M., Herskowitz, I., O'Shea, E.K. 2002. Yeast to the Whole HOG for the hyperosmotic response. *TRENDS in Genetics*. 18: 405-412.
- Oshima, Y., and I. Takano. 1972. Genetic controlling system for homothallism and a novel method for breeding triploid cells in *Saccharomyces*. *Fermentation Technology Today, Proceedings 4th International Fermentation. Symposium*. pp. 847-852.
- Piper, P.W., Talreja, K., Panaretou, B., Moradas-Ferreira, P., Byrne, K., Praekelt, U.M., Meacock, P., Récnacq, M., Boucherie, H. 1994. Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology* 140:3031–3038.
- Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler J. P., Nadal, E. and Ariño J. 2000. The transcriptional response of yeasts to the saline stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 17249-17255
- Puerta, G. I. 2010. Avances técnicos Cenicafé. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Colombia.
- Quintero R. 1987. Ingeniería Bioquímica: teoría y sus aplicaciones. Editorial Alhambra Mexicana. México. Pp. 332.

- Rep., M., Krantz, M., Thevelin, J. M., and Hohman, S. 2000. The transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *The Journal of Biological Chemistry*. 327 (12): 8290-8300.
- Reyes-González, G. y Franco-Correa M. 2006. Producción biotecnológica de sabores, pigmentos y aromas a partir de hongos miceliales y levaduras. *Universitas Scientiarum*. 11 (2): 23-30.
- Ríos A., A. 2006. Plantas medicinales del ejido Monterrey, municipio de Villa Corzo, Chiapas. México. *Título de Licenciatura en Biología*. Instituto de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. México.
- Robert, V., Stalpeers, J., Boekhout, T., & Tan, S.-H. 2006. Yeast Biodiversity and Culture Collections. Peter, G. and Rosa (Eds.). *Biodiversity and Ecophysiology of yeasts*. Springer. New York. Pp. 31-44.
- Rocha, M. G., González, A., y Aguirre, D. 2014. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y regiones intermedias entre secuencias simples repetidas. Cornejo, A. Serrato, A., Rendón, B., y Rocha, M.G.(Eds). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticas*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio climático (INECC-SEMARNAT) México. Pp. 101-125.
- Rodríguez, D. S. 1990. Evaluación de tolerancia a etanol de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Licenciatura en Biología. Instituto de Ciencias biológicas. Universidad de Guadalajara. México.
- Salas, E., y Arenas, R. 2001. Biología molecular en micología médica. *Revista Venezolana de Dermatología*. 39: 07-10.
- Santiago-Urbina, J. A., Verdugo-Valdez, A. G. & Ruíz-Terán, F. Physicochemical and microbiological changes during tapping of palm sap to produce an alcoholic beverage called “taberna”, which is produced in the southeast of Mexico. *Food Control*. 33: 58-62.
- Santiago-Urbina & Ruíz-Terán. 2014. Microbiology and Biochemistry of traditional palm wine produced around the world. *International Food Research Journal*. 21: 1261-1269.
- Santiago-Urbina, J. A., Arias-García J. A. y Ruíz Terán, F. 2015. Yeast species associated with spontaneous fermentation of *taberna*, a traditional palm wine from the southeast of Mexico. *Annals of Microbiology*. 65: 287-296.

- Santoro, N., Johansson, N. and & D.J. Thiele. 1998. Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. *Molecular Cellular Biology* 18: 6340-6352.
- San, P., Correa, J., Vazquez, C. R. and del Rey, F. 1993. SSG1, a gene encoding a sporulation-specific 1,3-beta-glucanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 175 (12): 3823-3837.
- Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., and Ciani, M. 2009. Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food Microbiology*, Elsevier. 26: 415-420.
- Suárez-Machín, C., Garrido-carralero, N. A. y Guevara-rodríguez, C. A. 2016. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *Instituto Cubano de Investigadores Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)*.50 (1): 20–28.
- Toledo E., X. E. 2014. Micropropagación y genética del paisaje de *Acrocomia aculeata* (Jacq. Lodd. ex Mart.) en Chiapas, conocimiento para su manejo. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 95 pp.
- Trujillo, L. C., y Echeverry, S. 2015. Aislamiento y caracterización de levaduras presentes en el fruto del *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M. Perry (pomorroso) en la columna 1 de la ciudad de Neiva-Huila. *Revista Ingeniería y Región*. 13 (1): 37-45.
- Uribe-Gutiérrez, L. y Gutiérrez, L. 2007. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de Mora. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
- Vazquez, J. A., Ramírez M., y Monsalve, Z. I. 2016. Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología* 18 (2): 129-139.
- Wickerham, J. L. 1951. Taxonomy of yeasts. *Technical Bulletin No. 1029*. United States Department of Agriculture, Washington, USA.
- Wickerham, L. J. 1958. Sexual agglutination of heterothallic yeasts in diverse taxonomic areas. *Science*. 128 (3337): 1504-1505.
- Widuczynski, I. 1963. Efectos del antibiótico cicloheximida sobre el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus. Tesis de

Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

Winge, G., and O. Laustsen. 1937. On two types of spore germination, and on genetic segregations in *Saccharomyces*, demonstrated through single-spore cultures. *Compte rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg, Ser. Physiology*. 22. 99- 116.

Zumárraga, M. y Barbero, F. 2014. *Saccharomyces cerevisiae*, contribución organoléptica en la vinificación. Asociación de Bodegas de Rioja Alavesa. 4: 42–45.

Zuzuarregui, A. 2005. Caracterización fisiológica y molecular de cepas vínicas de *Saccharomyces sp.* Influencias en su comportamiento durante la vinificación. Tesis de Doctorado. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Universitat de València. Valencia. Pp. 199.