

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
BIOQUÍMICA**

**MICROBIOTA CULTIVABLE QUE PARTICIPA EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE
MOSTOS DE *Agave angustifolia* Haw Y *Agave rhodacantha* Trel EN SAN PEDRO
TEOZACOALCO, OAXACA**

TESIS QUE PRESENTA:

BRIAN ANDRÉS MENDOZA RIVERA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

ASESOR:

DRA. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ

INTEGRANTES DEL JURADO:

DR. FELIPE DE JESÚS PALMA CRUZ

DRA. MARÍA DE JESÚS MARTÍNEZ ALTAMIRANO

ING. ALEJANDRO AQUINO GÓMEZ

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al personal del Laboratorio de Control Ambiental del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica del Instituto Tecnológico de Oaxaca por la ayuda que me proporcionaron al usar el equipo necesario de mi proyecto, así como su consideración para explicarme en los momentos en los que se me presentaban dudas y complicaciones de algunos procedimientos.

A mis asesores, a la Doctora Claudia López Sánchez por su guía en la elaboración de mi tesis y por tomarse el tiempo para las correcciones necesarias para completarla.

A mi familia y amigos por su apoyo en esta etapa de mi desarrollo académico, por sus palabras de aliento cuando la situación se complicaba y que no dejaron de pensar que podría terminar el proyecto.

RESUMEN

Existen diferentes tipos de mezcal, los cuales pueden diferir en su sabor, aroma e incluso color, todo ello depende del agave, del que están hechos, en el siguiente trabajo se estudió la microbiota presente en el mosto de dos especies de *Agave*, *angustifolia* Haw y *A. rhodacantha* Trel con el objetivo de identificar y comparar los géneros de microorganismos que participan durante la fermentación.

Se utilizaron medios selectivos para cultivar levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas, una vez que se consiguieron cepas purificadas se procedió a analizar la morfología macroscópica y microscópica, también se procedió a hacer una crioconservación para contar con un respaldo de las cepas obtenidas.

Por último, se realizaron diferentes pruebas bioquímicas dependiendo el tipo de microorganismo a analizar, esto para hacer la identificación del género que esté presente en cada cepa con ayuda de la morfología observada.

Se observó que el *Agave angustifolia* Haw tiene una menor variedad de géneros de levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas mientras que el *Agave rhodacantha* Trel tuvo mayor variedad especialmente en las bacterias ácido acéticas que se identificaron cuatro géneros diferentes contra dos géneros en *Agave angustifolia* Haw.

ÍNDICE

Introducción	11
CAPÍTULO 1 Marco Teórico	12
1.1 ¿Qué es el mezcal?	12
1.2 Etapas de producción	12
1.2.1 Selección	12
1.2.2 Corte	12
1.2.3 Cocción	13
1.2.4 Molienda.....	13
1.2.5 Fermentación.....	13
1.2.6 Destilación	14
1.3 Consorcios microbianos.....	15
1.3.1 Levaduras.....	15
1.3.1.1 Metabolismo.....	15
1.3.1.2 Clasificación	16
1.3.2 Bacterias ácido lácticas.....	16
1.3.2.1 Crecimiento	16
1.3.2.2 Morfología	17
1.3.2.3 Clasificación	17
1.3.2.3.1 Grupo homofermentativas.....	18
1.3.2.3.2 Grupo heterofermentativas	18
1.3.2.4 Nutrientes necesarios.....	19
1.3.3 Bacterias ácido acéticas.....	19
1.3.3.1 Clasificación	20
1.3.3.2 Metabolismo.....	20
CAPÍTULO II Objetivos.....	21
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
CAPÍTULO III Metodología	22
3.1 Toma de muestra.....	22
3.2 Medición de parámetros físico químicos	22

3.3 Determinación de azúcares reductores	22
3.3.1 Azúcares reductores directos	22
3.3.2 Azúcares reductores totales	22
3.4 Aislamiento	23
3.4.1 Aislamiento de levaduras	23
3.4.2 Aislamiento de bacterias ácido lácticas.....	23
3.4.3 Aislamiento de bacterias ácido acéticas.....	23
3.5 Purificación	23
3.6 Conservación	23
3.7 Caracterización macroscópica	24
3.8 Caracterización microscópica	24
3.9 Pruebas bioquímicas.....	24
3.9.1 Pruebas bioquímicas para levaduras.....	24
3.9.2 Pruebas Bioquímicas para bacterias ácido lácticas	25
3.9.2.1 Crecimiento en medio Elliker	25
3.9.2.2 Crecimiento en medio M17	25
3.9.2.3 Fermentación heteroláctica u homoláctica	25
3.9.2.4 Prueba en medio MIO (Movilidad-Indol-Ornitina).....	25
3.9.2.5 Prueba en medio SIM	26
3.9.2.6 Prueba en medio TSI (Agar Hierro y Triple Azúcar).....	26
3.9.2.7 Reducción de nitratos.....	26
3.9.2.8 Prueba de formación de Gas en medio MRS.....	26
3.9.2.9 Prueba Catalasa	27
3.9.3. Pruebas bioquímicas para Bacterias Ácido Acéticas	27
3.9.3.1 Prueba Catalasa	27
3.9.3.2 Oxidación de acetato de sodio	27
3.9.3.3 Crecimiento en 0.35% (v/v) de ácido acético	27
3.9.3.4 Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol	27
3.9.3.5 Crecimiento con metanol como fuente de carbono	27
3.9.3.6 Crecimiento en agar manitol	28
3.9.3.7 Crecimiento en 1% de KNO_3	28

3.9.3.8 Crecimiento en 3% de NaCl	28
3.9.3.9 Crecimiento en 30% de glucosa	28
3.9.3.10 Crecimiento en agar glutamato.....	28
3.9.3.11 Formación de ácido a partir de azúcares y alcoholes	28
3.9.3.12 Oxidación de etanol a CO ₂	28
3.10 Identificación de microorganismos hasta género	29
CAPÍTULO IV Resultados	30
4.1 Toma de muestra en el palenque.....	30
4.2 Medición de parámetros fisicoquímicos de cada muestra	30
4.3 Determinación de azúcares reductores totales y directos.....	31
4.4 Aislamiento	32
4.5 Purificación	32
4.6 Conservación de microorganismos	33
4.7 Caracterización macroscópica	35
4.7.1 Levaduras.....	35
4.7.2 Bacterias ácido lácticas.....	38
4.7.3 Bacterias ácido lácticas.....	40
4.8 Caracterización macroscópica	43
4.8.1 Tinción simple para levaduras	43
4.8.2 Bacterias ácido lácticas.....	44
4.8.3 Bacterias ácido acéticas.....	46
4.9 Pruebas bioquímicas.....	47
4.9.1 Fermentación de carbohidratos para levaduras	47
4.9.2 Pruebas bioquímicas para bacterias ácido lácticas	49
4.9.2.1 Crecimiento en medio Elliker	49
4.9.2.2 Crecimiento en medio M17	49
4.9.2.3 Fermentación heteroláctica u homoláctica	50
4.9.2.4 Prueba en medio MIO	50
4.9.2.5 Prueba en medio SIM	51
4.9.2.6 Prueba en medio TSI.....	51
4.9.2.7 Reducción de Nitratos	52

4.9.2.8 Formación de gas en medio MRS	52
4.9.2.9 Prueba catalasa	53
4.9.3 Pruebas bioquímicas para Bacterias Ácido Acéticas	55
4.9.3.1 Prueba catalasa	55
4.9.3.2 Oxidación de acetato de sodio	55
4.9.3.3 Crecimiento en 0.35% (v/v) de ácido acético	55
4.9.3.4 Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol	57
4.9.3.5 Crecimiento con metanol como fuente de carbono	57
4.9.3.6 Crecimiento en agar manitol	58
4.9.3.7 Crecimiento en 1% de KNO ₃	58
4.9.3.8 Crecimiento en 3% de NaCl	59
4.9.3.9 Crecimiento en 30% de glucosa	60
4.9.3.10 Crecimiento en agar glutamato	61
4.9.3.11 Formación de ácido a partir de azúcares y alcoholes	62
4.9.3.12 Oxidación de etanol a CO ₂	62
4.10 Identificación de microorganismos hasta género	64
4.10.1 Levaduras	64
4.10.2 Bacterias ácido lácticas	64
4.10.3 Bacterias ácido acéticas	64
CAPÍTULO V Conclusiones	66
CAPITULO VI REFERENCIAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Tina de fermentación para la obtención de la muestra	30
Figura 2 Medición de pH, parte superior Agave angustifolia Haw, parte inferior Agave rhodacantha Trel	30
Figura 3 Titulación para la determinación de azúcares reductores	31
Figura 4 Cultivo en medio líquido de las colonias purificadas	33
Figura 5 Frascos con los cultivos en agitadora orbital.....	34
Figura 6 Cultivos sometidos a centrifugación para separar los microorganismos del medio líquido	34
Figura 7 Tubos eppendorf con los cultivos protegidos con una solución de glicerol al 30% para su crioconservación	35
Figura 8 Observación de la fermentación de carbohidratos para levaduras	48
Figura 9 Prueba Elliker, negativo lado izquierdo y positivo lado derecho	49
Figura 10 Prueba M17 negativo lado izquierdo y positivo lado derecho.....	49
Figura 11 Medio M5 lado izquierdo fermentación heteroláctica (azul) lado derecho fermentación homoláctica (cambio de color del medio)	50
Figura 12 Prueba MIO con reactivo de Kovac	50
Figura 13 Prueba SIM con reactivo de Kovac	51
Figura 14 Prueba TSI	51
Figura 15 Bacterias cultivadas en caldo de Nitrato	52
Figura 16 Cultivo en caldo de nitrato de cada cepa con la solución de Griess-Ilosvay	52
Figura 17 Medio líquido MRS con campana Durham.....	52
Figura 18 Prueba catalasa, izquierda negativa, derecha positiva	53
Figura 19 Prueba catalasa izquierda negativa, derecha positiva	55
Figura 20 Prueba de oxidación de acetato de sodio, el segundo tubo se leyó como positivo	55
Figura 21 Lectura del espectrofotómetro a los medios cultivados.....	55
Figura 22 Gráfica de lo absorbancia del crecimiento en 0.35% de ácido acético	56
Figura 23 Prueba de dihidroxiacetona a partir de glicerol, izquierda negativa derecha positiva	57
Figura 24 Gráfico de las absorbancias obtenidas a partir del crecimiento con metanol.....	58
Figura 25 Prueba de crecimiento en agar manitol, izquierda negativo derecho positivo ...	58
Figura 26 Gráfico de las absorbancias obtenidas de crecimiento en 1% de KNO ₃	59
Figura 27 Gráfico de las absorbancias en crecimiento en 3% de NaCl	60
Figura 28 Gráfico obtenido de las absorbancias en crecimiento en 30% de glucosa	61
Figura 29 Prueba crecimiento en agar glutamato izquierda negativo derecha positivo	62
Figura 30 Prueba de formación de ácido a partir de azúcares y alcoholes, lo tubos 1 y 5 son positivos.....	62
Figura 31 Prueba de Oxidación de etanol sin resultados positivos.....	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Datos físico químicos obtenidos	31
Tabla 2 Gramos de azúcares reductores directos y totales presentes en 250 ml de mosto de Agave analizado	31
Tabla 3 Aislamiento de microorganismos Agave angustifolia Haw	32
Tabla 4 Aislamiento de microorganismos Agave rhodacantha Trel	32
Tabla 5 Purificación de microorganismos Agave angustifolia Haw	33
Tabla 6 Purificación de microorganismos Agave rhodacantha Trel	33
Tabla 7 Características macroscópicas de las cepas 1 y 2 de levaduras de cada mosto de agave	35
Tabla 8 Características macroscópicas de las cepas 3 y 4 de levaduras de cada mosto de agave	36
Tabla 9 Características macroscópicas de las cepas 5 y 6 de levaduras de cada mosto de agave	36
Tabla 10 Características macroscópicas de las cepas 7 y 8 de levaduras de cada mosto de agave	37
Tabla 11 Características macroscópicas de las cepas 9 y 10 de levaduras del mosto de Agave angustifolia Haw	37
Tabla 12 Características macroscópicas de las cepas 1 y 2 de BAL de cada mosto de agave	38
Tabla 13 Características macroscópicas de las cepas 3 y 4 de BAL de cada mosto de agave	38
Tabla 14 Características macroscópicas de las cepas 5 y 6 de BAL de cada mosto de agave	39
Tabla 15 Características macroscópicas de las cepas 7 y 8 de BAL de cada mosto de agave	39
Tabla 16 Características macroscópicas de las cepas 9 y 10 de BAL del mosto de Agave angustifolia Haw	40
Tabla 17 Características macroscópicas de las cepas 1 y 2 de BAA de cada mosto de agave	40
Tabla 18 Características macroscópicas de las cepas 3 y 4 de BAA de cada mosto de agave	41
Tabla 19 Características macroscópicas de las cepas 5 y 6 de BAA de cada mosto de agave	41
Tabla 20 Características macroscópicas de las cepas 7 y 8 de BAA de cada mosto de agave	42
Tabla 21 Características macroscópicas de las cepas 9 y 10 de BAA de cada mosto de agave	42
Tabla 22 Morfología microscópica de las cepas de levaduras de cada mosto analizado	43
Tabla 23 Morfología microscópica de las cepas de BAL de cada mosto analizado	44
Tabla 24 Morfología microscópica de las cepas de BAA de cada mosto analizado	46

Tabla 25 Resultados de la fermentación de carbohidratos de las cepas de Agave angustifolia Haw	48
Tabla 26 Resultados de la fermentación de carbohidratos de las cepas de Agave rhodantha Trel	48
Tabla 27 Resultados para las bacterias ácido lácticas en Agave angustifolia Haw	54
Tabla 28 Resultados para las bacterias ácido lácticas en Agave rhodacantha Trel	54
Tabla 29 Valores de absorbancia obtenidos de cada cepa de los dos mostos de agave	56
Tabla 30 Absorbancia obtenida de las cepas de los dos agaves	57
Tabla 31 Absorbancias obtenidas de las cepas de ambos agaves.....	59
Tabla 32 Absorbancias obtenidas de las cepas de cada agave	60
Tabla 33 Absorbancias obtenidas de las cepas de ambos agaves.....	61
Tabla 34 Resultados de pruebas bioquímicas para ambas muestras de agave	63
Tabla 35 Géneros de levadura identificados en ambos agaves	64
Tabla 36 Géneros de bacterias ácido lácticas identificadas en cada agave analizado.....	64
Tabla 37 Géneros de bacterias ácido acéticas identificados de los mostos de agave analizados	65

Introducción

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional que tiene como materia prima el Agave, existen diversas especies de agave por lo que el producto final puede variar dependiendo del Agave utilizado principalmente en el sabor, olor e incluso el color. Cada agave tendrá diferentes características que dependen del terreno en el que crezcan y las condiciones climatológicas en los que se encuentre, así como de otros seres vivos con los que comparte lugar.

El mezcal se elabora a partir de una serie de pasos los cuales son: selección, corte, cocción, molienda, fermentación y destilación. El proceso de fermentación es el paso importante para la producción ya que aquí se llevan diferentes reacciones en los que, los azúcares presentes en el agave son convertidos en etanol, esto es realizado por diferentes microorganismos que están presentes en el mosto de agave, la población microbiana difiere entre cada especie de agave además del material utilizado para el tratamiento del agave para la producción del mezcal, en algunos casos se utilizan animales de carga durante el proceso de molienda lo que puede contribuir al proceso de fermentación ya que los animales también cuentan con diversas poblaciones microbianas que terminan interactuando con el agave molido y estos terminan involucrados en el proceso de fermentación.

Los microorganismos que pueden estar presentes en el mosto de agave son levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas, las cuales son responsables de las características organolépticas del mezcal.

Para realizar una documentación de la población microbiana en dos diferentes especies de agave el siguiente estudio se realizó en el estado de Oaxaca, en el cual se eligió la comunidad de San Pedro Teozacoalco para el análisis de estas dos especies.

La identificación de los microorganismos se realizó hasta género realizando caracterización macroscópica y microscópica además de pruebas bioquímicas para facilitar la identificación, finalmente se compararon los géneros presentes en los mostos de agave seleccionados y se determinó la variación que existe entre ellos.

CAPÍTULO 1 Marco Teórico

1.1 ¿Qué es el mezcal?

La palabra mezcal proviene del náhuatl de la palabra compuesta *mexcalli*; su primera parte, el prefijo “me” precedente de *metl*, es el nombre aplicado a todas las plantas del género *Agave*, conocidas como magueyes; y la segunda parte “*ixcalli*”, se refiere a su condición de cocido o hervido; es decir, mezcal significa “maguey cocido” (Godínez Hernández, 2012).

El mezcal es una bebida alcohólica destilada mexicana, 100 % de maguey o agave, obtenida por destilación de jugos fermentados con microorganismos espontáneos o cultivados, extraídos de cabezas maduras de magueyes o agaves cocidos.

Es un líquido de aroma y sabor derivado de la especie de maguey o agave empleado, así como del proceso de elaboración; diversificando sus cualidades por el tipo de suelo, topografía, clima, agua, productor autorizado, maestro mezcalero, graduación alcohólica, microorganismos, entre otros factores que definen el carácter y las sensaciones organolépticas producidas por cada Mezcal (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 2016).

1.2 Etapas de producción

La producción artesanal del mezcal se realiza empleando herramienta y equipo rudimentario en pequeñas fábricas artesanales denominadas palenques. La producción artesanal tiene origen prehispánico, pero fue al parecer con la llegada de los españoles que se empezó la destilación con el uso del alambique de cobre (Palma, Pérez, & Meza, 2016).

1.2.1 Selección

El agave tarda entre 8 y 10 años en madurar por lo que es necesario observar ciertas características tales como coloración verde-amarillenta en la base de las pencas y parda en la base del Agave, así como la presencia de pencas secas en esta zona. Desde el punto de vista bioquímico, el estado de madurez apropiado lo marca un alto contenido de azúcares que puedan ser aprovechados por los microorganismos para la generación de alcohol (Oliva Hernández, 2012).

1.2.2 Corte

En esta etapa es en la cual se cortan las pencas para dejar sólo la piña, la cual después es rasurada para eliminar la raíz y todo lo que pueda dar sabor desagradable al mezcal. Una vez obtenida la piña se lleva al horno de cocción (Arratia Mireles, 2009).

1.2.3 Cocción

Dependiendo del tamaño de la piña, se realiza una reducción de tamaño y es acomodada en un horno (u hornos), los cuales consisten de un pozo cónico de un diámetro aproximado de 2.5-3.5 metros cavado en la tierra. Estos suelen ser alineados con piedras calientes, con hojas de agave, petate y tierra, permitiendo así la cocción de la piña por un lapso de aproximadamente 2 a 3 días. Es en este proceso donde el producto puede absorber sabores que serán importantes para las características organolépticas especiales del producto. En este proceso se presenta la hidrólisis de la inulina, principal polisacárido presente en la piña del agave.

La conversión de la inulina produce una gama de azúcares libres, siendo vista principalmente la fructosa, la cual es importante para la fermentación. Sin embargo, en este proceso suelen presentarse no solo la hidrólisis de azúcares, sino que estos mismos pueden interaccionar con las proteínas dando consigo un conjunto de reacciones químicas las cuales son conocidas como reacción de Maillard. Este tipo de reacciones, así como las características de sabor y olor de la madera que se producen en el pozo al final suelen otorgar propiedades organolépticas que añaden cuerpo al mezcal (De la Torre González, 2010).

1.2.4 Molienda

La extracción de las piñas cocidas se realiza con un molino de piedra amonedada, la cual se hace girar sobre una pileta con piso de sillar ligeramente inclinado y con pequeños canales para facilitar el movimiento de los jugos por gravedad. Primeramente, las piñas cocidas son troceadas con hachas y después prensadas al paso de la rueda de piedra accionada por una flecha concéntrica a la misma, tirada por un animal (puede ser mula o caballo).

El subproducto generado (bagazo) se enjuaga en una pila de lavado y finalmente se exprime en una prensa de tornillo para extraer los jugos que quedaron entre las fibras. La extracción de jugos a golpes de mazo, que es utilizados en algunas fábricas de mezcal artesanal, resulta un trabajo muy pesado y poco eficiente. El color del bagazo lavado y exprimido sugiere que probablemente aún contenga azúcares fermentables en cantidad considerable (Godínez Hernández, 2012).

1.2.5 Fermentación

Molido el maguey, se traslada a tinas donde tardará en fermentar un mínimo de 3 días, pudiendo alargarse este tiempo hasta 20 o más días de acuerdo a las condiciones del medio ambiente, la dulzura del maguey y la capacidad de las tinas, mismas que pueden ser de madera, de cuero de res, de mampostería, oquedades hechas en la roca madre, troncos ahuecados, ollas de barro y tinas de acero inoxidable.

La fermentación transformará los azúcares contenidos en la piña en alcohol y bióxido de carbono y otros productos resultantes del proceso fermentativo, mediante un agente biológico como es la levadura y otras bacterias. La tradición del Mezcal dicta que la

fermentación debe ser natural, es decir, que son los microorganismos del medio ambiente los que harán su trabajo sin ayuda de ningún acelerante químico; estos microorganismos, varían dependiendo de cada microclima o región geográfica. Existen 2 métodos para fermentar: a) con bagazo y b) sin bagazo.

- a) Con bagazo. El maguey se coloca en la tina hasta $\frac{3}{4}$ de su capacidad durante un día. Se agrega agua tibia a la tina hasta casi llenarla cuando el olor ya es fuerte, cuando hay calor o se escucha un ruido de hervor en ella y se revuelve para homogeneizarla. Con el tiempo el ruido de hervor cesa y la fermentación concluye obteniéndose el llamado tepache, que se prueba para comprobar si tiene un sabor amargo y fuerte olor a mezcal.
- b) Sin bagazo. De la molienda se recoge sólo la miel en una tina; el bagazo se lava en un tanque de agua y se deja reposar en él durante un día iniciándose ahí la fermentación. En seguida, se exprime el bagazo y el agua resultante se vierte a la tina donde se vació anteriormente la miel de la primera molienda. La fermentación puede durar 4 días o más, obteniéndose el tepache (Pérez Ricardez, 2016).

1.2.6 Destilación

Involucra dos operaciones conjuntas, evaporación y condensación, por medio de las cuales se lleva a cabo la separación de alcoholes y agua. La evaporación da lugar a la obtención de alcohol etílico, a través de la aplicación del calor y de la diferencia de densidades se logra evaporar los elementos más ligeros, los cuales, son recuperados en su estado líquido mediante la segunda operación por medio de la diferencia de temperaturas, dando como resultado a un producto condensado denominado mezcal. Aunque se trata de dos operaciones vinculadas, cada una cuenta con su propio equipo, enlazados por medio de un turbante o pasa vapores. Estos equipos utilizados para las destilaciones, comúnmente llamados alambiques, son contruidos de cobre e integrados por una olla con capacidad que varía entre 300 y 350 litros, una montera (una cubierta convexa que tapa la caldera de un alambique y reúne los vapores de la destilación para que entren en el serpentín), un turbante y un serpentín. En la olla se deposita el mezcal de producto fermentado, enseguida se coloca la montera, posteriormente se une con la montera por uno de sus extremos, y por el otro, con el serpentín.

Cada lote tarda de 3 a 4 horas; para obtener un mezcal con dos grados distintos de alcohol, uno denominado “puntas” con un contenido que oscila entre 30 y 40 grados de alcohol y el otro denominado “colas” con un grado de alcohol entre 6 y 30. En algunos casos, los productores terminan el proceso en ese punto y combinan las fracciones anteriores para obtener el mezcal. Otros productores llevan las “colas” a una segunda destilación para obtener otras dos fracciones, las cuales son mezcladas de la siguiente forma: para lograr el grado alcohólico final se mezclan las “puntas” del primer destilado con las “puntas” del refinado. Si estas dan un grado alcohólico mayor de 50, se adicionan “colas” de refinado para obtener un mezcal de entre 45 a 50 de grado a alcohólico (Morales Rodríguez, 2008).

1.3 Consorcios microbianos

En la producción de mezcal, la fermentación espontánea es una práctica común, estas fermentaciones son aquéllas que se producen de forma natural, las realizan las levaduras provenientes de la planta (Agave) y del material de la bodega, sin ningún tipo de inoculación externa. Existen numerosos estudios basados en la identificación de las dinámicas poblacionales responsables de estas fermentaciones, las cuales se ha traducido en un menor rendimiento y calidad sensorial, debido a las variaciones en el proceso de producción entre cada lote, ocasionado por la presencia de varias especies de microorganismos en el mosto como las levaduras y los hongos, así como de bacterias de diversos géneros, las cuales compiten por el consumo de los azúcares del medio, transformándolos en una gran variedad de compuestos orgánicos que generan una disminución en la producción de etanol ocasionando un destilado de baja calidad. Es importante el estudio minucioso de las poblacionales que conforman dichas fermentaciones, ya que es la única forma de conocer la dinámica poblacional propia de una región, con lo cual se lograría utilizar las cepas nativas como iniciadoras de la fermentación en otros procesos y regiones, por encontrarse mejor adaptadas, presentar buenos rendimientos y mediante las cuales es posible conservar las características propias de una región determinada (Pérez Hernández, Chávez Parga, & González Hernández, 2016).

1.3.1 Levaduras

Las levaduras son hongos predominantemente unicelulares. Forman parte del reino Fungi, dentro del subreino *Dikarya*, que se divide en *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Generalmente las levaduras, ya sean ascomicetos o basidiomicetos, se caracterizan por su crecimiento asexual que se produce predominantemente por gemación o fisión, y que no forman sus estados sexuales dentro o sobre un cuerpo fructífero.

Generalmente se relaciona la palabra levadura directamente con el proceso de fermentación, más concretamente con el del pan, la cerveza y el vino. Por lo que es común el considerar a las levaduras como hongos fermentativos. De hecho, muchas veces se ha tratado a las levaduras como sinónimo de *Saccharomyces*. Sin embargo, no todas las levaduras tienen capacidad fermentativa (Ferrer Piquer, 2018).

1.3.1.1 Metabolismo

El metabolismo fermentativo de las levaduras de manera habitual genera alcoholes superiores, aldehídos, ácidos grasos, ésteres y compuestos azufrados e incluso fenólicos y algunos forman terpenos. Su fisiología obviamente está condicionada por factores fisicoquímicos durante la fermentación, dependiente de sus propiedades genéticas. Estos compuestos aparecen principalmente como metabolitos secundarios durante la fermentación glicerol-pirúvica, particularmente los alcoholes, ésteres y ácidos volátiles. Diversos estudios en vino, cerveza, whisky, coñac y ron sugieren que las diferencias en los componentes del sabor se atribuyen a la actividad biológica de los diferentes géneros y

cepas de levaduras usadas en los respectivos tipos de fermentación (Álvarez Ainza, Zamora Quiñones, & Acedo Félix, 2009).

1.3.1.2 Clasificación

Las levaduras son microorganismos que se encuentran clasificados dentro de los Ascomicetos y Basidiomicetos, no obstante, las levaduras no forman un grupo muy definido, ya que no son una entidad taxonómica natural que guarde uniformidad morfológica (Uribe Gutiérrez, 2007).

Considerando que son microorganismos unicelulares, su reproducción mayoritariamente es por germinación o reproducción vegetativa. También hay especies que tienen reproducción sexual por esporas que es la base de la distinción de géneros. La reproducción corresponde a una fase de su ciclo biológico, constituida por una alternancia de fases haploide y diploide, en la que las esporas de origen sexual presentan una morfología diferente (forma, aspecto, tamaño), pudiendo servir para la identificación de especies.

Con base a su aptitud para formar, o no, esporas de origen sexual se clasifican en Ascomicetos (levaduras ascosporógenas) y Deuteromicetos (levaduras esporógenas). Las levaduras que forman esporas por algún modo de reproducción sexual pueden clasificarse de acuerdo con los estados anamórficos que se presentan y se los relaciona con Ascomicetos, Basidiomiceto y Teleomórficos (formas perfectas) (Arevalo Chávez, 1998).

1.3.2 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas tienen características genéticas diversas, en general son microorganismos gram-positivos, no pigmentados, no forman esporas, y no reducen los nitratos, ni producen catalasa. Las bacterias lácticas son anaerobias pero aerotolerantes, y se caracterizan también por una producción de cantidades importantes de ácido láctico como resultado del metabolismo de los hidratos de carbono. Las bacterias lácticas requieren aminoácidos específicos, vitaminas B y otros factores de crecimiento, y son incapaces de utilizar hidratos de carbono complejos (Rodríguez Villanueva, 2007).

1.3.2.1 Crecimiento

Las bacterias se clasifican en función de sus requerimientos atmosféricos:

- Aerobias estrictas, que crecen solo en presencia de oxígeno.
- Anaerobias estrictas, que solo crecen en ausencia de oxígeno.
- Facultativas, que crecen tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.
- Microaerófilas, que crecen mejor en una atmósfera con reducida concentración de oxígeno.
- Capnófilas, que requieren CO₂ adicional para crecer.

Se clasifican además en función de la temperatura necesaria para su crecimiento:

- Psicrófilas, pueden crecer a bajas temperaturas entre 2-5°C (óptimo 10-30°C).

- Mesofílicas, crecen a temperaturas entre 10-45°C (óptimo 30-40°C).
- Termofílicas, crecen muy poco a 37°C (óptimo 50-60°C).

La mayoría de las bacterias encontradas en muestras clínicas son mesofílicas.

El estudio de los requerimientos nutricionales de un microorganismo se usa en la identificación. Tal es el caso de la capacidad para crecer en medios ordinarios, o con la adicción de sangre, suero o glucosa. También por la necesidad de factores específicos de crecimiento como el factor X (hemina) y el factor V (NAD) en el caso de *Haemophilus spp* (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010).

1.3.2.2 Morfología

La morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos. Para la observación morfológica es preferible examinar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos. En este paso de la identificación es muy importante el aislamiento de las bacterias en cultivo puro ya que esta debería estar compuesta por un solo tipo de microorganismos y procedería de una única célula. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus veces por su color.

El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie. Por ejemplo, las colonias de estreptococos tienen un tamaño más pequeño que las de los estafilococos y las enterobacterias. La forma está determinada por los bordes y el grosor de la colonia. El borde puede ser liso o rugoso e irregular; la colonia, abultada o plana. La textura de la colonia es también importante. Puede variar desde seca a viscosa, con superficie lisa o granular. Algunos microorganismos producen una colonia pigmentada, lo que puede ser de ayuda en el proceso de identificación (ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa* (pigmento verde), *Serratia marcescens* (pigmento rojo) aunque en una misma especie puede haber cepas no pigmentadas.

Algunas bacterias producen hemolisinas que causan la lisis de los hematíes en medios que contienen sangre. Esta hemólisis puede ser beta (zona clara alrededor de la colonia) o alfa (halo de color verdoso alrededor de la colonia) (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010).

1.3.2.3 Clasificación

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) se pueden clasificar en dos grupos según sus características bioquímicas: las homofermentativas y las heterofermentativas. también se pueden dividir a las BAL en tres grupos de acuerdo con sus características fermentativas: las homofermentativas estrictas, heterofermentativas estrictas, y las heterofermentativas facultativas. Las BAL homofermentativas estrictas degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico y no fermentan las pentosas o el gluconato. Los heterofermentativos estrictos degradan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂, y las pentosas a ácido láctico y ácido acético. Los facultativos heterofermentativos fermentan las hexosas a ácido

láctico y puede producir CO₂ a partir del gluconato, pero no de la glucosa. Ellos también fermentan las pentosas para producir ácido láctico y acético.

Las BAL de importancia en la industria de alimentos pertenecen a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Weissella*.

Dentro del grupo de las bacterias ácido-lácticas homofermentativas encontramos algunas especies de *Streptococcus* (*St. thermophilus* y *St. lactis*) y *Pediococcus* (*P. acidolactici*, *P. pentosaceus*), y de las heterofermentativas algunas especies de *Lactobacillus* (*L. brevis* y *L. buchnerii*) y *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*, *L. dextranicum* y *L. cremoris*) (Cabeza Herrera, 2006).

1.3.2.3.1 Grupo homofermentativas

El grupo homofermentativo compuesto por *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas al convertir un mol de glucosa en dos moles de ácido láctico, además que se produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa. En contraste, las bacterias heterofermentativas producen cantidades equimolares de lactato, CO₂ y etanol a partir de glucosa usando la hexosa monofosfato o la vía de las pentosas, y así solamente generan la mitad de energía del grupo homofermentativa.

Las bacterias pertenecientes a este grupo poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero carecen de la fosfocetolasa. Dentro de este grupo se tiene: *Lactobacillus* de bastones largos, aislados o en cadenas cortas, termófilos, acidificantes muy energéticos y de actividad caseolítica notable. *Streptococcus*, de formas esféricas en cadenas, acidificación rápida y poca actividad caseolítica (Parra Huertas, 2010).

1.3.2.3.2 Grupo heterofermentativas

Producen solamente 50% de ácido láctico. Éstas fermentan un mol de glucosa para formar un mol de ácido láctico, un mol de etanol y un mol de CO₂. Un mol de ATP es generado por mol de glucosa. Este grupo está compuesto de un número de géneros incluyendo: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Este grupo de bacterias contiene la enzima fosfocetolasa, pero carece de la aldolasa y hexosa isomerasa; utilizan las vías de la hexosa monofosfato o la de la pentosa.

Las especies heterolácticas obligadas utilizan solamente la ruta dependiente fosfocetolasa para metabolizar azúcares, y además de ácido láctico, ellas producen cantidades significantes de ácido acético y/o etanol con la generación de dióxido de carbono; la D-galactosa puede ser metabolizada a través de la ruta tagatosa-6-fosfato o ruta Leloir. Estas especies fermentativas metabolizan hexosas a través de la ruta glucolítica Embden-Meyerhoff, pero pentosas y algunas otras sustancias son metabolizadas vía fosfocetolasa para producir ácido láctico y otros productos (típicamente ácido acético y etanol) (Parra Huertas, 2010).

1.3.2.4 Nutrientes necesarios

Las BAL se asocian a hábitats ricos en nutrientes, como son diversos productos alimenticios tales como leche, carne, bebidas, granos y vegetales, aunque también a la superficie de las mucosas de animales.

Siendo muy exigentes en cuanto a su nutrición, todas fermentan glucosa, aunque hay algunas que pueden multiplicarse en ausencia de azúcares como es el caso de *Leuc. citrovorum* el cual puede desarrollarse en presencia de citrato como única fuente de carbono. Mientras algunas no fermentan la sacarosa, otras no atacan la lactosa, las pentosas o las dextrinas. Requieren aminoácidos como fuente de nitrógeno, siendo las sales amoniacales las que estimulan su desarrollo y una diversidad de factores de crecimiento. Esta demanda de determinados nutrientes permite diferenciar algunas especies.

A pesar de la utilidad que tienen las BAL para la industria de los alimentos, es reconocida la dificultad que representa el cultivarlas por la necesidad de una gran cantidad de requerimientos nutricionales. Las vitaminas son los factores de crecimiento que se necesitan con mayor frecuencia, ya que funcionan formando parte de coenzimas. Algunos géneros como *Streptococcus* y *Lactobacillus*, destacan por sus requerimientos vitamínicos complejos, mucho más amplios que los humanos. Las principales vitaminas requeridas por los microorganismos son tiamina (vitamina B1), biotina, piridoxina (vitamina B6) y cobalamina (vitamina B12), de aquí su uso en las pruebas microbiológicas para detectar estos compuestos.

Las exigencias nutricionales de las BAL a minerales son poco conocidas. Necesitan de Mn^{2+} y/o de Fe^{2+} para un buen medio de crecimiento. La necesidad de los iones en el metabolismo se explica en primer lugar por su función de cofactor para numerosas enzimas. Además, los minerales metálicos son de gran importancia en el metabolismo de las bacterias lácticas (Mora Peñaflor & García Guerrero, 2007).

1.3.3 Bacterias ácido acéticas

La clasificación de las bacterias acéticas (BA) ha variado enormemente en los últimos tiempos. En la actualidad, bajo este nombre se conoce un grupo de bacterias pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Neoasia*, *Granulibacter* y *Saccharibacter*. Sin embargo, esta clasificación está en constante revisión.

Al microscopio, las bacterias acéticas (BA) son Gram negativas, de entre 0,4 y 4,5 μm de largas y entre 0,4-1 μm de anchas, con forma elipsoidal y que pueden presentarse de manera individual, en parejas o en cadenas. Presentan flagelos de forma peritrica o polar, y no pueden formar endosporas como estructura de supervivencia.

Este grupo de microorganismos necesita del oxígeno como aceptor final de electrones, por lo que tienen un metabolismo aerobio obligado. Generalmente, las BA son catalasas

positivas, oxidasas negativas y pueden utilizar el etanol como fuente de carbono. El pH óptimo de crecimiento está entre 5 y 6,5, si bien puede llegar a crecer a pH cercanos a 3.

Dentro del mundo enológico, las especies más conocidas son *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter oxydans* (Hernández & Barbero, 2008).

1.3.3.1 Clasificación

Las bacterias acéticas eran divididas en dos géneros hasta hace pocos años: *Acetobacter* y *Gluconobacter*. *Acetobacter* oxida etanol más fuertemente que glucosa y *Gluconobacter* oxida glucosa más fuertemente que etanol. La oxidación de etanol por bacterias acéticas es catalizada por una reacción en dos pasos: la oxidación de etanol a acetaldehído seguida por la oxidación de acetaldehído a ácido acético, en el caso de *Acetobacter* este podía completar la oxidación de acético hasta CO₂ y agua, a diferencia de *Gluconobacter* que son incapaces de llevar a cabo la oxidación completa del ácido acético

La clasificación taxonómica bacteriana ha sufrido grandes cambios en los últimos años debido a la aplicación de nuevas pruebas basadas en técnicas de biología molecular, ha permitido la revisión de la clasificación de las bacterias acéticas, tanto por el reordenamiento de géneros y especies ya existentes, como por la identificación de nuevos géneros y especies. Actualmente las bacterias acéticas pertenecen a la familia *Acetobacteraceae* basada en 10 géneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasia* y *Granulibacter*. Las especies de estos dos géneros, *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*, son las que tradicionalmente se han asociado con la producción de vinagre, en especial las cepas de *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconoacetobacter europaeus* y *Gluconoacetobacter xylinus* (Rivera Caro, 2013).

1.3.3.2 Metabolismo

Una característica importante de las bacterias acéticas es la capacidad de oxidar una gran variedad de sustratos, y de poder acumular los productos del metabolismo en el medio sin gran toxicidad para las bacterias. La capacidad de oxidación es debida, en parte, a la gran actividad de las enzimas deshidrogenasas que poseen en la membrana celular.

La alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa pueden oxidar el etanol a acetaldehído, siendo la actividad enzimática óptima a un pH de 5 y de 6,6 respectivamente. Ambas enzimas poseen una afinidad diferente por el oxígeno, lo que implica que una limitación del oxígeno disuelto en el medio provoca la acumulación del acetaldehído en el medio de cultivo. La acumulación de este metabolito intermedio representa una fuente de toxicidad para las bacterias.

Las bacterias acéticas del género *Acetobacter* oxidan el etanol del medio a ácido acético, y cuando el etanol se ha consumido totalmente, oxidan el acetato. El etanol inhibe las enzimas que oxidan el acetato y a concentraciones elevadas el ácido acético inhibe la oxidación del etanol (Rivera Caro, 2013).

CAPÍTULO II Objetivos

2.1 Objetivo general

Comparar los microorganismos cultivables que participan en el proceso de fermentación de Mezcal a partir de mostos fermentados de *Agave angustifolia* Haw (maguey espadín) y *Agave rhodacantha* Trel (maguey mexicanito verde).

2.2 Objetivos específicos

- Realizar el muestreo de dos mostos producidos a partir de dos magueyes diferentes.
- Aislar en los medios selectivos levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas cultivables presentes en los dos mostos.
- Caracterizar macro y microscópicamente la morfología de los microorganismos aislados.

Identificar hasta género de los microorganismos cultivables aislados mediante pruebas bioquímicas

CAPÍTULO III Metodología

3.1 Toma de muestra

Se realizó el muestreo a partir del tercer día de fermentación en una fábrica de mezcal artesanal ubicada en la población de San Pedro Teozacoalco (coordenadas 17.0175299, -97.2961261) del estado de Oaxaca, bajo las medidas necesarias para evitar la contaminación en las tinas de fermentación y en la muestra tomada, todo el material fue esterilizado previo a la visita.

3.2 Medición de parámetros físico químicos

Se realizó la medición de pH con la ayuda de un potenciómetro marca HANNA modelo HI 2210 y grados Brix (utilizando un refractómetro portable Brix digital 0-90%).

3.3 Determinación de azúcares reductores

Para la determinación de azúcares reductores totales y directos, se realizó con la técnica de Fehling (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 2016).

3.3.1 Azúcares reductores directos

Para este procedimiento se introdujo una parte del mosto de mezcal extraído de la fábrica con bagazo en una licuadora, se mantuvo ahí hasta obtener una mezcla homogénea y después se extrajeron 25 ml.

Se procedió a agregar de manera paulatina ml por ml de acetato de plomo para clarificar, una vez clarificado se agregó oxalato de sodio para formar un precipitado, se siguió agregando hasta que ya no se formaron más sólidos.

Se hizo una filtración por decantación con ayuda de un papel filtro para separar el sólido formado de la muestra líquida, una vez completada la separación, la muestra se aforó a 250 ml con agua destilada.

Se depositó la muestra filtrada en una bureta, se colocó en un soporte universal, en la parte inferior del soporte se colocó una parrilla con agitación.

En un matraz se adicionó 5 ml de reactivo de Fehling A con 5 ml de reactivo de Fehling B, se agitó para después colocarlo en la parrilla y se procedió a hervir, una vez que empezó a hervir la solución de Fehling, se adicionaron 2 gotas de azul de metileno.

Se comenzó la titulación de la manera rutinaria de este proceso, este proceso se realizó por duplicado.

3.3.2 Azúcares reductores totales

Se repite el mismo procedimiento del apartado 3.3.1 hasta la separación de los sólidos del líquido, a la solución filtrada se le adicionó 5 ml de ácido clorhídrico concentrado, después se calentó a 75 grados centígrados por 15 minutos para hidrolizar la solución.

Se midió el pH de la solución y se neutralizó utilizando hojuelas de hidróxido de sodio hasta que la solución llegó a un pH entre 6.5 a 7.5. Se aforó la muestra a 250 ml con agua destilada.

Se depositó la muestra neutralizada en una bureta, se colocó la bureta en un soporte universal, en la parte inferior del soporte, se colocó una parrilla con agitación.

En un matraz se adicionaron 5 ml de reactivo de Fehling A con 5 ml de reactivo de Fehling B, se agitó para después colocarlo en la parrilla y se procedió a hervir, una vez que empezó a hervir la solución de Fehling, se adicionó 2 gotas de azul de metileno.

Se desarrolló de manera convencional la titulación hasta que se observó un vire a rojo ladrillo, el procedimiento se realizó por duplicado.

3.4 Aislamiento

El aislamiento se realizó utilizando una dilución de la muestra en caldo peptonado al 1%, se utilizaron 6 tubos de ensayo y se les adicionaron 9 ml del caldo peptonado a cada tubo. En el primer tubo se agregó 1 ml del mosto de mezcal y se agitó, este tubo fue la dilución a 1×10^{-1} , se le extrajo 1 ml a la primera dilución y se agregó ese ml al tubo 2, el tubo 2 fue la dilución a 1×10^{-2} , se siguió el mismo procedimiento hasta el tubo 6 que fue la dilución a 1×10^{-6} . Se realizó siembra por plaqueo o extensión de placa (colocando 50 μ l del tubo 6 en una caja Petri) en los medios correspondientes para los microorganismos de interés y se incubaron de 24 a 72 horas a 28 °C.

3.4.1 Aislamiento de levaduras

Se utilizó el medio selectivo ADS (Agar Dextrosa Sabouraud), adicionando 200 mg/L de Ampicilina para hacerlo selectivo para levaduras y evitar el crecimiento de bacterias.

3.4.2 Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Se utilizó el medio selectivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) adicionando 200 mg/L de Nistatina para impedir el crecimiento de levaduras.

3.4.3 Aislamiento de bacterias ácido acéticas

Se utilizó el medio selectivo GYC (agar, extracto de levadura, dextrosa y carbonato de sodio) adicionando Nistatina para impedir el crecimiento de levaduras.

3.5 Purificación

Se realizó en los medios anteriormente especificados para cada tipo de microorganismo, seleccionando las colonias más diferenciadas, el método de cultivo se hizo por la técnica de estría cruzada por agotamiento para obtener un cultivo axénico.

3.6 Conservación

Se realizó la conservación de los microorganismos por congelamiento utilizando glicerol al 30% como crioprotector. Para levaduras se utilizó medio líquido YPG formado por 2% de

dextrosa, 1% de peptona de caseína y 0.3% de extracto de levadura. Para bacterias ácido lácticas el medio MRS líquido y para bacterias ácido acéticas medio GYC líquido.

Se tomaron 20 ml de cada medio y se depositaron en frascos de vidrio esterilizados, después se inocularon los microorganismos de las cepas purificadas con la ayuda de un asa de cultivo, se agitó el asa con las células en el medio de cultivo. Se taparon los frascos y se dejaron en una agitadora orbital a 100 RPM por 48 horas. Después de las 48 horas se depositaron 2 ml de cada frasco en tubos eppendorf, los tubos utilizados se colocaron en una microcentrífuga a 10 000 RPM por 5 minutos para separar las células del medio, se retiró el medio líquido de los tubos y se le agregaron 2 ml nuevamente de los medio correspondientes para realizar la centrifugación una vez más, al terminar la segunda centrifugación, se retiró el medio líquido de los tubos, ahora para conservar se agregó 2 ml de glicerol al 30% (previamente esterilizado) para proteger las células de la baja temperatura en la que se conservará, se sellaron los tubos con Parafilm y se colocaron en frascos, se rotularon y almacenaron a una temperatura de -20 °C.

3.7 Caracterización macroscópica

Se observaron las colonias purificadas en el microscopio estereoscopio identificando características de forma, tamaño, color, elevación, etc. de cada una de las cepas seleccionadas.

3.8 Caracterización microscópica

Se realizó un montaje húmedo y una tinción simple con azul de metileno para levaduras y para bacterias se llevó a cabo un frotis y tinción de Gram. Se observaron en microscopio óptico (VELAB Serie P-VE-B4).

3.9 Pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación hasta género de las cepas de levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas obtenidas a partir de las purificaciones realizadas.

3.9.1 Pruebas bioquímicas para levaduras

Se realizó la prueba de fermentación de carbohidratos para cada una de las cepas obtenidas, el medio a emplear fue el Caldo Base Rojo de Fenol (CBRF), cuyos componentes son: 10 g/L de peptona de caseína, 5 g/L de cloruro sódico y 0.018 g/L de rojo de fenol. Se disolvió CBRF en agua destilada y se colocaron 4 ml en tubos de ensayo (el número de tubos dependerá de las cepas obtenidas) además de un tubo Durham para así esterilizar a 10 lb de presión por 10 min. Caldo base rojo de fenol (CBRF) representa un 99% de la composición total, el 1% lo formó el azúcar o alcohol a fermentar, para ello se hizo una solución al 5% del azúcar o alcohol a utilizar, se disolvió en agua esterilizada y se agregó 1 ml de la solución al 5% a los tubos con el medio CBRF para así tener una solución al 1% de carbohidrato, se utilizó un filtro para esterilizar el carbohidrato a utilizar, después se inoculó cada cepa de levadura con la ayuda de un asa de cultivo. Los carbohidratos a fermentar fueron los siguientes:

glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa, lactosa, manosa, maltosa, xilosa, manitol y sorbitol. Si el medio cambia de rojo a amarillo entonces la prueba se leerá como positiva y si en la campana Durham aparece una burbuja se leerá que la levadura es capaz de producir CO₂.

3.9.2 Pruebas Bioquímicas para bacterias ácido lácticas

3.9.2.1 Crecimiento en medio Elliker

Se elaboró el medio Elliker que está compuesto por 5 g/L de dextrosa, 2.5 g/L de gelatina, 1.5 g/L de acetato de sodio, 5 g/L de sacarosa, 5 g/L de extracto de levadura, 0.5 g/L de ácido ascórbico, 5 g/L de lactosa, 4 g/L de cloruro sódico y 20 g/L de triptona. Se diluyeron los compuestos en agua destilada para esterilizarse a 10 lb por 10 min. Se colocó el medio en cajas Petri y se inocularon las bacterias ácido lácticas para incubarlas a 33 - 37 °C durante 18 - 48 horas. Se observó si hay un crecimiento considerable de bacterias para considerarla positiva de ser así de forma presuntiva probó la presencia del género *Lactobacillus* y *Streptococcus*.

3.9.2.2 Crecimiento en medio M17

Se elaboró el medio M17 que está compuesto por 0.5 g/L de ácido ascórbico, 5 g/L de extracto de carne, 5 g/L de lactosa, 2.5 g/L de peptona de carne, 5 g/L de peptona de soja, 12.75 g/L de agar, 2.5 g/L de peptona de caseína, 0.25 g/L de sulfato magnésico, 19 g/L de glicerofosfato sódico y 2.5 g/L de extracto de levadura. Se disolvieron los compuestos en agua destilada después se esterilizó en autoclave a 10 lb por 10 min y se reguló el pH entre 7 a 7.4. Se colocó el medio en cajas Petri, se inocularon las BAL y se incubaron a 28 – 30 °C por 48 horas. Si se observa un crecimiento considerable de bacterias la prueba se considera positiva y de forma presuntiva se prueba la presencia del género *Streptococcus*.

3.9.2.3 Fermentación heteroláctica u homoláctica

Se elaboró el medio M5 que está compuesto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 2.5 g/L de fructosa, 2.5 g/L de fosfato de potasio monobásico, 1 ml de Tween 80, 0.2 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado, 0.05 g/L de sulfato de manganeso monohidratado, 20 ml de verde de bromocresol y 20 g/L de agar. Se ajustó el pH del medio a 6.5, se colocó el medio en cajas Petri y se inocularon las cepas de BAL obtenidas, si incubaron a 28 °C por 48 horas. Se consideran BAL homolácticas si el medio azul vira a amarillo y serán BAL heterolácticas si el medio permanece azul.

3.9.2.4 Prueba en medio MIO (Movilidad-Indol-Ornitina)

Se elaboró el medio MIO formado por 2 g/L de agar, 10 g/L de peptona de caseína, 10 g/L de peptona de gelatina, 5 g/L de L-Ornitina, 0.02 g/L de púrpura de bromocresol. 1 g/L de dextrosa y 3 g/L de extracto de levadura. Se disolvió en agua destilada y se distribuyeron 5 ml en cada tubo de ensayo necesario para esterilizar a 10 lb por 10 min. Se inoculó por punción las cepas de BAL y se incubaron a 33 – 37 °C por 18 – 24 horas. Si las BAL crecen más allá del camino que se realizó con la aguja, la prueba de movilidad es positiva, si hay un color púrpura en el medio la prueba de ornitina es positiva. Para la prueba de indol (después de haber hecho la lectura de movilidad y ornitina) se agregó de 3 a gotas de reactivo de

Kovac y se agitará suavemente el tubo, si hay una coloración rojo o rosado en la capa de reactivo la prueba de indol es positiva.

3.9.2.5 Prueba en medio SIM

Se elaboró el medio SIM compuesto por 3.5 g/L de agar, 6.1 g/L de peptona de carne, 0.2 g/L de sulfato de amonio, 20 g/L de peptona de caseína y 0.2 g/L de tiosulfato de sodio. Se disolvió en agua destilada y se colocaron 5 ml del medio en cada tubo, se esterilizó a 10 lb por 10 min. Se inocularon las BAL por punción a una profundidad de $\frac{3}{4}$ del tubo. Si el medio presenta oscurecimiento indica producción de ácido sulfhídrico. La movilidad es positiva si hay una turbidez lejos de la línea de inoculación. La presencia de indol se indicará por un color rojo al momento de adicionar el reactivo de Kovac.

3.9.2.6 Prueba en medio TSI (Agar Hierro y Triple Azúcar)

Se elaboró el medio TSI con los siguientes componentes 12 g/L de agar, 1 g/L de glucosa monohidratado, 0.025 g/L de rojo fenol, 0.3 g/L de tiosulfato de sodio, 3 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de mezcla de digerido péptico de tejido animal y pancreático de caseína (1:1), 0.3 g/L de citrato de amonio férrico, 3 g/L de extracto de carne, 5 g/L de cloruro sódico, 10 g/L sacarosa y 10 g/L de lactosa monohidrato. Se disolvió en agua destilada y se agregaron 5 ml del medio en tubos de ensayo para esterilizar a 10 lb por 10 minutos. Después de esterilizar se colocaron los tubos en una posición inclinada. Se inocularon las BAL en cada tubo picando el fondo y extendiéndolas sobre la superficie inclinada. Se incubaron a 33 – 37 °C por 18 – 72 horas. Si el medio se torna amarillo esto indica que se produjo ácido y si es rojo que hubo alcalinización. Observar la coloración de la superficie y fondo del tubo para verificar que azúcares fueron fermentados. Si se presenta un oscurecimiento en el medio probará la presencia de ácido sulfhídrico. Observar la formación de burbujas para la comprobar la producción de gas.

3.9.2.7 Reducción de nitratos

Se elaboró el caldo nitrado que se compone de 5 g/L de extracto de carne, 10 g/L de peptona de carne, 1 g/L de nitrato de potásico y 1 g/L de cloruro sódico. Se disolvió en agua destilada y se distribuyeron 5 ml del medio en tubos de ensayo para esterilizar a 10 lb por 10 min. Se inocularon las BAL con la ayuda de un asa de cultivo y se incubaron a 35 – 39 °C por 24 horas. Después de pasar las 24 horas se extrajo 1 ml del cultivo para colocarlo en un tubo nuevo, se elaboró reactivo Griess-ilosvay que se compone por 1 ml de solución A (8 g ácido sulfanílico con 1 litro de ácido acético 5N) con 1 ml de solución B (5 g de alfa-Naftilamina con 1 litro de ácido acético 5N), se adicionó la solución Griess-ilosvay al ml anteriormente extraído, si el medio se torna rojo se probará la existencia de nitritos lo que confirma la reducción de Nitratos.

3.9.2.8 Prueba de formación de Gas en medio MRS

Se elaboró el medio MRS líquido, compuesto por 10 g/L de peptona bacteriológica, 20 g/L de dextrosa, 2 g/L de fosfato dipotásico, 0.2 g/L de sulfato magnésico, 0.05 g/L de sulfato de manganeso, 8 g/L de extracto de carne, 5 g/L de acetato de sodio, 1 g/L Tween 80, 4 g/L

de extracto de levadura, 2 g/L de citrato amónico. Se disolvió en agua destilada, se colocaron 5 ml en tubos de ensayo y se le agregaron campanas de Durham, se esterilizaron a 10 lb por 10 minutos. Se inocularon las BAL con la ayuda de un asa de cultivo. Se incubaron a 35 °C por 72 horas, la formación de una burbuja en la campana de Durham indicará la formación de Gas.

3.9.2.9 Prueba Catalasa

Una vez terminadas las pruebas anteriores, se agregó unas gotas de peróxido de hidrogeno al 30% a las BAL, si se observa un burbujeo indicará la presencia de la enzima catalasa.

3.9.3. Pruebas bioquímicas para Bacterias Ácido Acéticas

3.9.3.1 Prueba Catalasa

Con la ayuda de un asa de cultivo, se tomó de la caja Petri del medio GYC una muestra de células, se colocó en un porta objeto y se le adicionaron 2 a 4 gotas de peróxido de hidrógeno al 30%, si comienza a burbujear la prueba se tomará como positiva.

3.9.3.2 Oxidación de acetato de sodio

Se elaboró el medio compuesto por 0.3% de peptona, 0.2% de extracto de levadura, 0.2% de acetato de sodio y 0.002% de azul de bromotimol, se ajustó el pH a 6.4. Se colocó el medio en tubos de ensayo y se inocularon las BAA con la ayuda de un asa de cultivo. Se incubaron durante 7 días a 29 – 31 °C. El cambio de color de verde a amarillo, producido por la alcalinización del medio debido a la oxidación del sustrato se interpretará como prueba positiva.

3.9.3.3 Crecimiento en 0.35% (v/v) de ácido acético

Se inocularon las BAA en un medio compuesto por 1% de glucosa, 0.3% de extracto de levadura, 0.5% de peptona, 0.3% de extracto de malta y 0.35% (v/v) de ácido acético. Se incubaron en tubos de ensayo durante 10 días a 29 – 31 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro.

3.9.3.4 Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol

Se elaboró un medio compuesto por 3% glicerol, 0.5% de extracto de levadura, 1% de peptona y 1.5% de agar, ajustando el pH a 6, se vació en cajas Petri y se inocularon las BAA. Se incubaron durante 10 días. Después de incubar se agregó reactivo de Fehling sobre la superficie de la placa Petri. La aparición de un color naranja oscuro probará la presencia de dihidroxiacetona indicando un resultado positivo.

3.9.3.5 Crecimiento con metanol como fuente de carbono

Se probó la asimilación de metanol en el medio Hoyer-Frateur compuesto por, 0.1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% de K_2HPO_4 , 0.09% de KH_2PO_4 , 0.025% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0005% de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 3% (v/v) de metanol. Se agregó el medio en tubos de ensayo y se inocularon en ellos las BAA. Se incubaron por 7 días a 29 – 31 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro.

3.9.3.6 Crecimiento en agar manitol

Se observó el crecimiento de las BAA en un medio formado por 2.5% de manitol, 0.5% de extracto de levadura, 0.3% de peptona y 2% agar, se ajustó el pH a 6. Se colocó el medio en cajas Petri y se inocularon las BAA. Se incubaron durante 10 días a 29 – 31 °C.

3.9.3.7 Crecimiento en 1% de KNO₃

Se elaboró el medio compuesto por 1% de glucosa, 0.3% de extracto de levadura, 0.5% de peptona, 0.3% de extracto de malta y 1% de KNO₃. Se distribuyó el medio en tubos de ensayo y se inocularon las BAA. Se incubaron durante 10 días a 29 – 31 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm en espectrofotómetro.

3.9.3.8 Crecimiento en 3% de NaCl

Se formuló el medio compuesto por 1% glucosa, 0.3% extracto de levadura, 0.5% de peptona, 0.3% de extracto de malta y 3% de NaCl. Se distribuyó el medio en tubos de ensayo y se inocularon las BAA. Se incubaron durante 10 días a 29 – 31 °C. Se evaluó el crecimiento midiendo densidad óptica a 540 nm en espectrofotómetro.

3.9.3.9 Crecimiento en 30% de glucosa

El medio compuesto por 30% de glucosa, 0.3% de extracto de levadura, 0.5% de peptona y 0.3% de extracto de malta fue distribuido en tubos de ensayo en el cual se inocularon las BAA y se incubaron durante 10 días a 29 – 31 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm en espectrofotómetro.

3.9.3.10 Crecimiento en agar glutamato

Se elaboró el medio compuesto por 0.5% de glutamato de sodio, 0.5% de extracto de levadura, 0.3% de peptona y 2% de agar, se ajustó el pH a 6. Se distribuyó el medio en cajas Petri y se inocularon las BAA. Se incubaron durante 10 días a 29 – 31 °C.

3.9.3.11 Formación de ácido a partir de azúcares y alcoholes

Para probar la formación de ácidos se formuló el medio compuesto por 0.5% de extracto de levadura, 0.002% de púrpura de bromocresol y 1% de azúcar/alcohol. Se colocó el medio en tubos de ensayo utilizando los siguientes azúcares y alcoholes: sacarosa, manitol, glucosa, lactosa, sorbitol, galactosa, manosa, glicerol, etanol y propano, se inocularon las BAA y se incubaron durante 7 días a 29 – 31 °C. El cambio de color de púrpura a amarillo, producido por la acidificación del medio debida a la oxidación del sustrato, se interpretó como prueba positiva.

3.9.3.12 Oxidación de etanol a CO₂

Se utilizaron cultivos de etanol verde de bromocresol, cuya composición es: 3% de extracto de levadura, 0,0022% verde de bromocresol y 3,85% (v/v) de etanol. Se incubaron durante 10 días a 29 – 31 °C. La producción de ácido acético a partir de etanol se observa por el cambio de color del medio (amarillo) y la oxidación posterior del ácido formado, a CO₂ y H₂O por un nuevo cambio de color (verde azulado).

3.10 Identificación de microorganismos hasta género

De acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas se hizo una comparación de los resultados obtenidos en cada procedimiento con la literatura consultada para la identificación de géneros y de ser necesario también se tomó en cuenta la morfología observada.

CAPÍTULO IV Resultados

4.1 Toma de muestra en el palenque

Se utilizaron materiales previamente esterilizados para la toma de muestra en el palenque (fábrica donde se produce el Mezcal) del municipio de San Pedro Teozacoalco (coordenadas 17.0175299,-97.2961261) así como repientes limpios para su transporte al laboratorio de Control Ambiental del Instituto Tecnológico de Oaxaca.



Figura 1 Tina de fermentación para la obtención de la muestra

4.2 Medición de parámetros fisicoquímicos de cada muestra

Para la medición de pH se utilizó un potenciómetro marca HANNA modelo HI2210 perteneciente al laboratorio de Control Ambiental



Figura 2 Medición de pH, parte superior Agave angustifolia Haw, parte inferior Agave rhodacantha Trel

Se utilizó un Refractómetro portable Brix digital 0-90% para medir los grados Brix de cada muestra.

Tabla 1 Datos físico químicos obtenidos

Tipo de Agave	pH	Grados Brix
<i>A. angustifolia</i> Haw	4.12	7.3
<i>A. rhodacantha</i> Trel	4.48	8.6

4.3 Determinación de azúcares reductores totales y directos

Para azúcares reductores directos se realizaron a partir de una muestra de 250ml de mosto de cada agave, de igual forma para la determinación de azúcares reductores totales, siguiendo la técnica de Fehling (Secretaría de Economía, 2011).



Figura 3 Titulación para la determinación de azúcares reductores

Tabla 2 Gramos de azúcares reductores directos y totales presentes en 250 ml de mosto de Agave analizado

Tipo de Agave	ARD	ART
<i>A. angustifolia</i> Haw	2.85g	1.04g
<i>A. rhodacantha</i> Trel	3.76g	1.65g

4.4 Aislamiento

Se utilizaron medios selectivos para aislar levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas, siendo ADS, MRS y GYC respectivamente, para el aislamiento de levaduras se añadió Ampicilina como antibiótico, en el caso de las bacterias se le adicionó Nistatina, la cantidad de antibiótico adicionado fue de 200 mg/L esto para evitar contaminación, el cultivo se realizó por el método de plaqueo.

Tabla 3 Aislamiento de microorganismos *Agave angustifolia* Haw

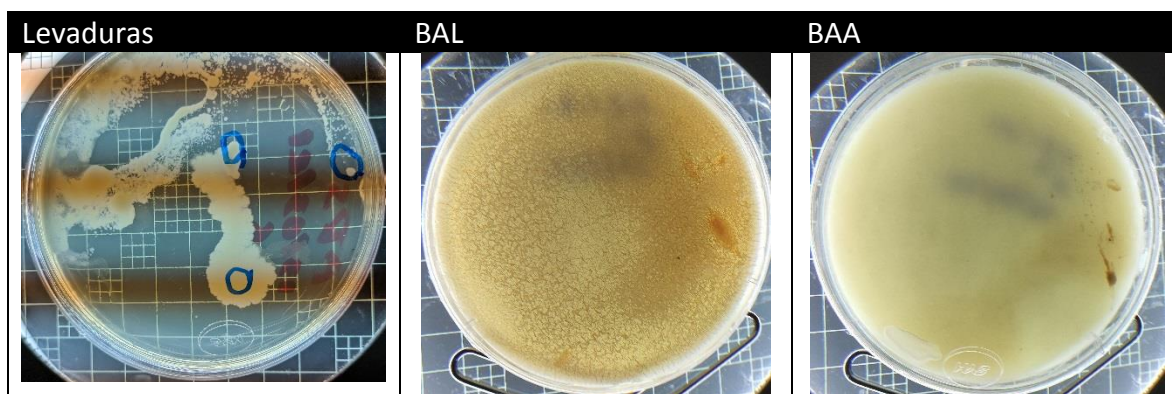
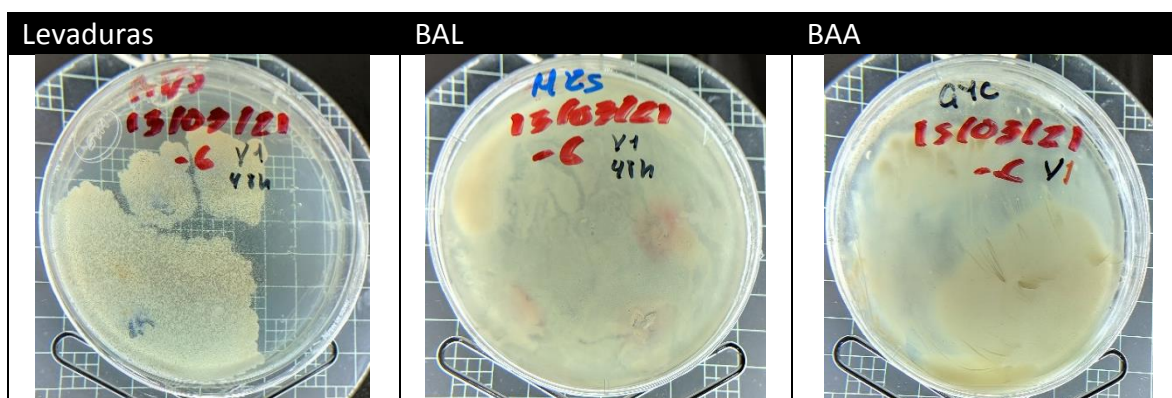


Tabla 4 Aislamiento de microorganismos *Agave rhodacantha* Trel



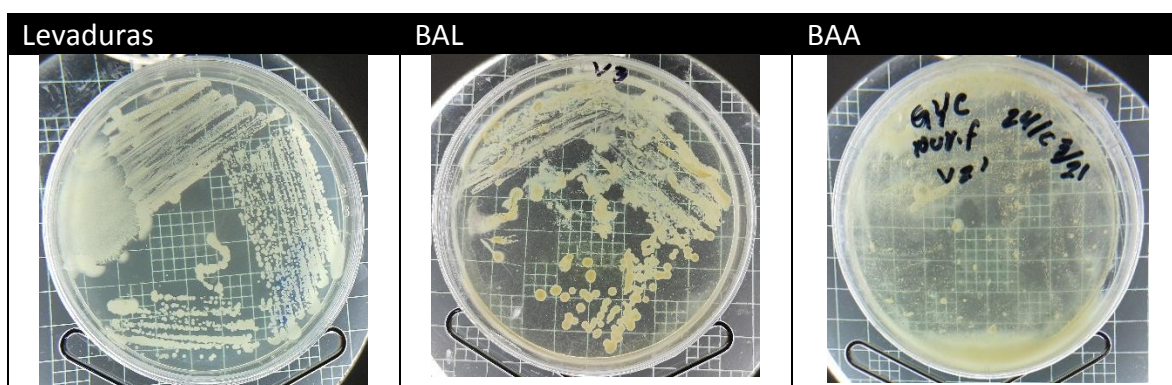
4.5 Purificación

Utilizando los mismos medios de cultivo con la misma concentración de antibióticos se realizó la purificación de colonias utilizando la técnica de estría cruzada por agotamiento.

Tabla 5 Purificación de microorganismos *Agave angustifolia* Haw



Tabla 6 Purificación de microorganismos *Agave rhodacantha* Trel



4.6 Conservación de microorganismos

Se realizó una crioconservación para tener un respaldo de las colonias en caso de que los cultivos hechos en cajas Petri llegasen a contaminarse, para así asegurarse de que el experimento se llevaría a cabo en su totalidad.



Figura 4 Cultivo en medio líquido de las colonias purificadas



Figura 5 Frascos con los cultivos en agitadora orbital



Figura 6 Cultivos sometidos a centrifugación para separar los microorganismos del medio líquido

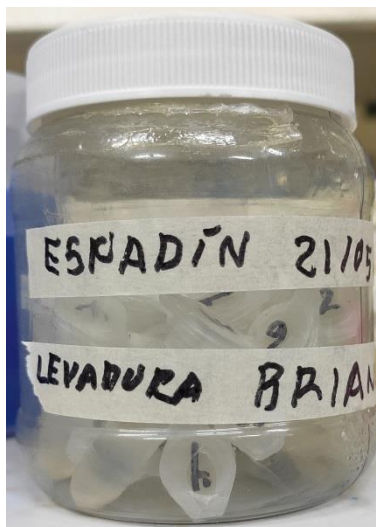


Figura 7 Tubos eppendorf con los cultivos protegidos con una solución de glicerol al 30% para su crioconservación

4.7 Caracterización macroscópica

Se especificaron las características físicas de las colonias de cada cepa de los mostos de Agave analizados.

4.7.1 Levaduras

Tabla 7 Características macroscópicas de las cepas 1 y 2 de levaduras de cada mosto de agave

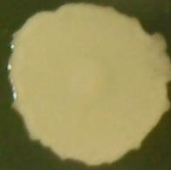
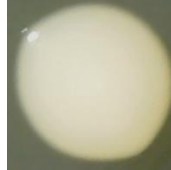
	CEPA 1 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 1 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 2 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 2 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Crema	Crema	Crema	Blanco
FORMA	Circular	Irregular	Circular	Circular
ELEVACIÓN	Convexa	Plana	Convexa	Convexa
BORDE	Entero	Ondulado	Entero	Entero
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
CONSISTENCIA	Suave	Suave	Suave	Suave
IMAGEN				

Tabla 8 Características macroscópicas de las cepas 3 y 4 de levaduras de cada mosto de agave

	CEPA 3 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 3 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 4 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 4 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Crema	Crema	Crema	Blanco
FORMA	Circular	Circular	Circular	Circular
ELEVACIÓN	Convexa	Plana	Convexa	Plana
BORDE	Entero	Entero	Entero	Entero
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
ASPECTO	Húmeda	Seca	Húmeda	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Brillante	Mate	Brillante	Brillante
CONSISTENCIA	Suave	Dura	Suave	Suave
IMAGEN				

Tabla 9 Características macroscópicas de las cepas 5 y 6 de levaduras de cada mosto de agave

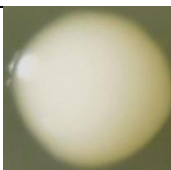
	CEPA 5 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 5 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 6 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 6 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Crema	Blanco	Crema	Blanco
FORMA	Irregular	Circular	Irregular	Irregular
ELEVACIÓN	Convexa	Convexa	Convexa	Umbonada
BORDE	Lobulada	Entero	Lobulada	Ondulado
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa	Rugosa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Seca
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Brillante	Brillante	Brillante	Mate
CONSISTENCIA	Suave	Suave	Suave	Dura
IMAGEN				

Tabla 10 Características macroscópicas de las cepas 7 y 8 de levaduras de cada mosto de agave

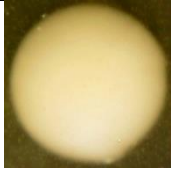
	CEPA 7 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 7 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 8 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 8 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Crema	Blanco	Crema	Blanco
FORMA	Circular	Irregular	Irregular	Circular
ELEVACIÓN	Convexa	Plana	Convexa	Convexa
BORDE	Entero	Ondulado	Lobulada	Entero
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
CONSISTENCIA	Suave	Suave	Suave	Suave
IMAGEN				

Tabla 11 Características macroscópicas de las cepas 9 y 10 de levaduras del mosto de *Agave angustifolia* Haw

	CEPA 9 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 10 <i>Agave angustifolia</i> Haw
TAMAÑO	Grande	Grande
COLOR	Crema	Crema
FORMA	Irregular	Circular
ELEVACIÓN	Convexa	Convexa
BORDE	Entero	Entero
SUPERFICIE	Lisa	Lisa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Brillante	Brillante
CONSISTENCIA	Suave	Suave
IMAGEN		

Se observó que la morfología de las colonias de las cepas de los dos mostos en su mayoría son circulares con bordes enteros, de color blanco y en algunos casos de color crema, también la mayor parte de las cepas tienen una elevación convexa.

4.7.2 Bacterias ácido lácticas

Tabla 12 Características macroscópicas de las cepas 1 y 2 de BAL de cada mosto de agave

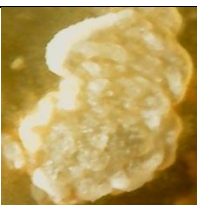
	CEPA 1 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 1 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 2 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 2 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Blanco	Blanco	Crema	Blanco
FORMA	Irregular	Circular	Filamentosa	Irregular
ELEVACIÓN	Convexa	Plana	Umbonada	Umbonada
BORDE	Entera	Entero	Lobulada	Lobulado
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Rugosa	Rugosa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Seca	Seca
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Brillante	Brillante	Mate	Mate
CONSISTENCIA	Suave	Suave	Suave	Dura
IMAGEN				

Tabla 13 Características macroscópicas de las cepas 3 y 4 de BAL de cada mosto de agave

	CEPA 3 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 3 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 4 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 4 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Crema	Blanco	Crema	Blanco
FORMA	Circular	Irregular	Circular	Irregular
ELEVACIÓN	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
BORDE	Entero	Entera	Entero	Entera
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante

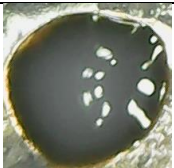
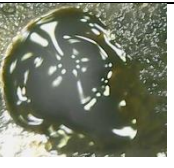
CONSISTENCIA	Suave	Suave	Suave	Suave
IMAGEN				

Tabla 14 Características macroscópicas de las cepas 5 y 6 de BAL de cada mosto de agave

	CEPA 5 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 5 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 6 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 6 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Blanco	Blanco	Blanco	Crema
FORMA	Filamentosa	Circular	Filamentosa	Irregular
ELEVACIÓN	Umbonada	Plana	Umbonada	Plana
BORDE	Lobulada	Entero	Lobulada	Ondulado
SUPERFICIE	Rugosa	Lisa	Rugosa	Lisa
ASPECTO	Seca	Húmeda	Seca	Seca
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Mate	Brillante	Mate	Brillante
CONSISTENCIA	Dura	Suave	Dura	Suave
IMAGEN				

Tabla 15 Características macroscópicas de las cepas 7 y 8 de BAL de cada mosto de agave

	CEPA 7 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 7 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 8 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 8 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Crema	Crema	Naranja	Amarillo
FORMA	Irregular	Circular	Filamentosa	Irregular
ELEVACIÓN	Convexa	Convexa	Umbonada	Convexa
BORDE	Rizado	Entero	Filamentoso	Entero
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Rugosa	Lisa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda

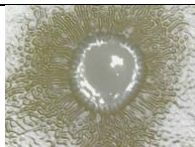
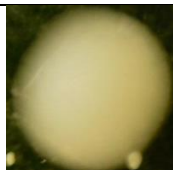
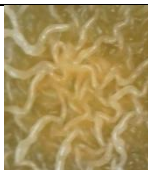
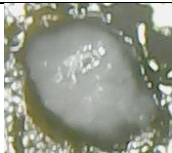
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Opaca	Traslúcida
LUZ REFLEJADA	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
CONSISTENCIA	Suave	Suave	Suave	Suave
IMAGEN				

Tabla 16 Características macroscópicas de las cepas 9 y 10 de BAL del mosto de *Agave angustifolia* Haw

	CEPA 9 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 10 <i>Agave angustifolia</i> Haw
TAMAÑO	Grande	Grande
COLOR	Blanco	Blanco
FORMA	Irregular	Irregular
ELEVACIÓN	Convexa	Convexa
BORDE	Ondulada	Ondulado
SUPERFICIE	Rugosa	Lisa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Brillante	Brillante
CONSISTENCIA	Suave	Suave
IMAGEN		

4.7.3 Bacterias ácido lácticas

Tabla 17 Características macroscópicas de las cepas 1 y 2 de BAA de cada mosto de agave

	CEPA 1 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 1 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 2 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 2 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Blanco	Crema	Blanco	Crema
FORMA	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular
ELEVACIÓN	Plana	Convexa	Convexa	Plana
BORDE	Ondulado	Ondulado	Ondulada	Ondulado
SUPERFICIE	Rugosa	Lisa	Lisa	Rugosa
ASPECTO	Seca	Húmeda	Húmeda	Seca

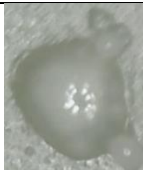
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Mate	Brillante	Brillante	Mate
CONSISTENCIA	Dura	Suave	Dura	Dura
IMAGEN				

Tabla 18 Características macroscópicas de las cepas 3 y 4 de BAA de cada mosto de agave

	CEPA 3 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 3 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 4 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 4 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Crema	Naranja	Amarillo	Crema
FORMA	Irregular	Rizoide	Irregular	Irregular
ELEVACIÓN	Convexa	Umbonada	Elevada	Umbonada
BORDE	Entera	Filamentoso	Ondulado	Ondulado
SUPERFICIE	Lisa	Rugosa	Rugosa	Rugosa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
CONSISTENCIA	Suave	Suave	Suave	Suave
IMAGEN				

Tabla 19 Características macroscópicas de las cepas 5 y 6 de BAA de cada mosto de agave

	CEPA 5 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 5 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 6 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 6 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Blanco	Naranja	Blanco	Naranja
FORMA	Circular	Irregular	Circular	Circular
ELEVACIÓN	Plana	Plana	Plana	Convexa
BORDE	Entera	Ondulado	Entero	Entero

SUPERFICIE	Rugosa	Rugosa	Rugosa	Lisa
ASPECTO	Seca	Húmeda	Seca	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Mate	Brillante	Mate	Brillante
CONSISTENCIA	Dura	Suave	Dura	Suave
IMAGEN				

Tabla 20 Características macroscópicas de las cepas 7 y 8 de BAA de cada mosto de agave

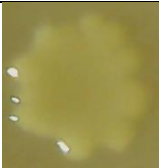
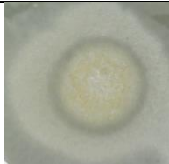
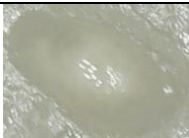
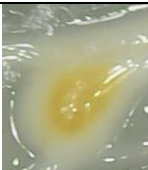
	CEPA 7 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 7 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 8 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 8 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Amarilla	Crema	Crema	Naranja
FORMA	Irregular	Irregular	Circular	Circular
ELEVACIÓN	Plana	Plana	Plana	Convexa
BORDE	Ondulado	Ondulado	Entero	Entero
SUPERFICIE	Rugosa	Lisa	Rugosa	Lisa
ASPECTO	Seca	Húmeda	Seca	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Traslúcida	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Mate	Brillante	Mate	Brillante
CONSISTENCIA	Dura	Suave	Dura	Suave
IMAGEN				

Tabla 21 Características macroscópicas de las cepas 9 y 10 de BAA de cada mosto de agave

	CEPA 9 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 9 <i>Agave rhodacantha</i> Trel	CEPA 10 <i>Agave angustifolia</i> Haw	CEPA 10 <i>Agave rhodacantha</i> Trel
TAMAÑO	Grande	Grande	Grande	Grande
COLOR	Crema	Naranja	Amarilla	Amarilla
FORMA	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular

ELEVACIÓN	Convexa	Plana	Convexa	Convexa
BORDE	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado
SUPERFICIE	Lisa	Rugosa	Lisa	Rugosa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Opaca	Traslúcida
LUZ REFLEJADA	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
CONSISTENCIA	Suave	Suave	Suave	Suave
IMAGEN				

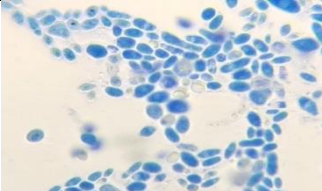
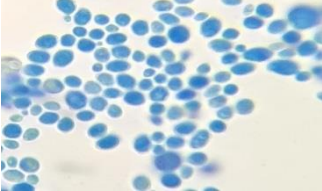
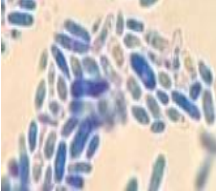
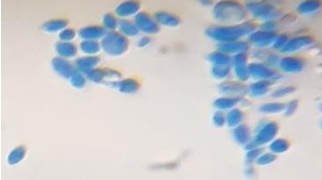
La morfología observada muestra que en el caso del *Agave rhodacantha* Trel presenta una coloración amarilla mientras que en *Agave angustifolia* Haw mayormente son blancas en ambos tipos de bacterias, entre las cepas observadas se puede apreciar que en algunos casos hay formas filamentosas, a diferencia de las levaduras se presentan mayor variedad en los bordes entre las cepas observadas e incluso en la elevación.

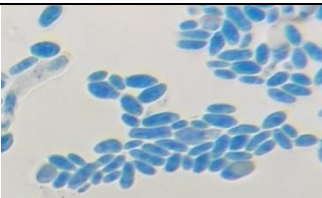
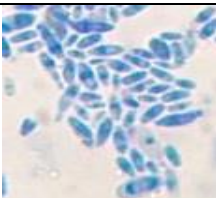
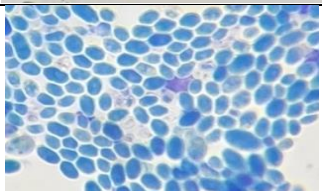
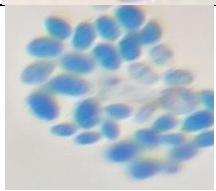
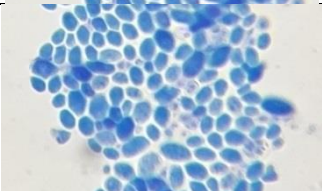
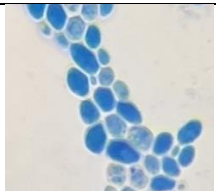
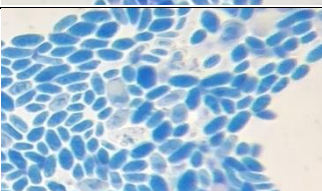
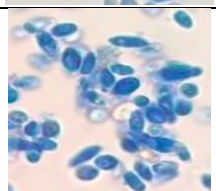
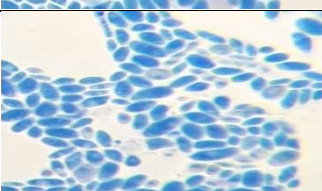
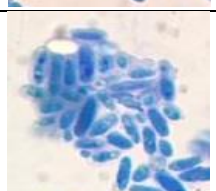
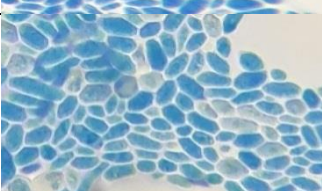
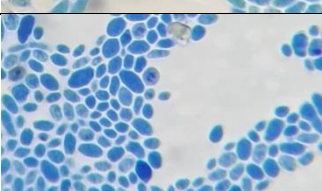
4.8 Caracterización macroscópica

Se realizó tinción simple para las levaduras y una tinción diferencial de Gram para los dos tipos de bacterias, en tinción de Gram si se observa una tinción azul será positiva de presentar una tinción roja serán negativas.

4.8.1 Tinción simple para levaduras

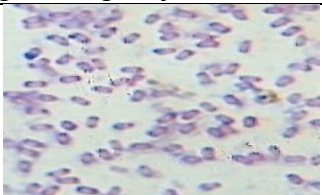
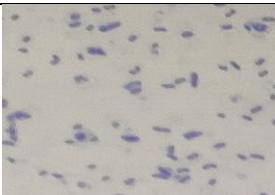
Tabla 22 Morfología microscópica de las cepas de levaduras de cada mosto analizado

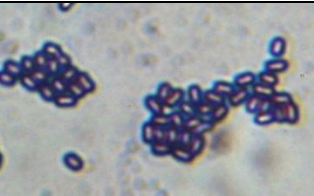
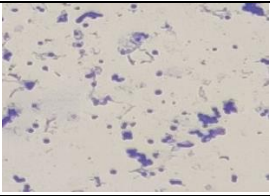
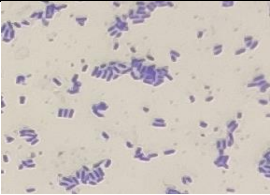
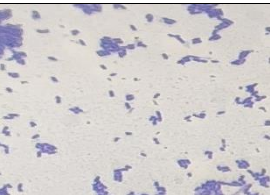
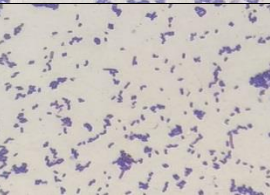
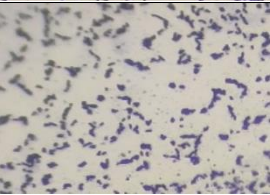
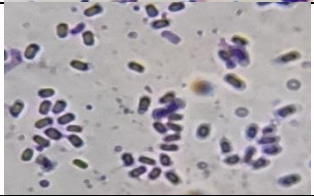
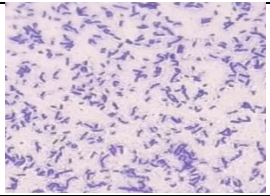
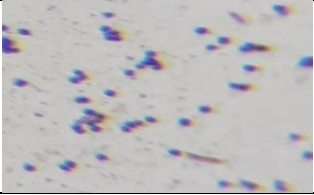
Cepa	<i>Agave angustifolia</i> Haw	<i>Agave rhodacantha</i> Trel
1		
2		
3		

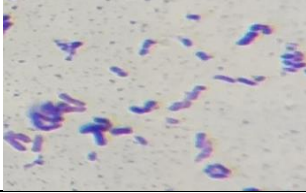
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

4.8.2 Bacterias ácido lácticas

Tabla 23 Morfología microscópica de las cepas de BAL de cada mosto analizado

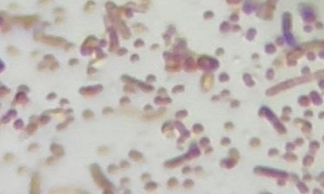
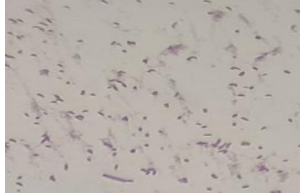
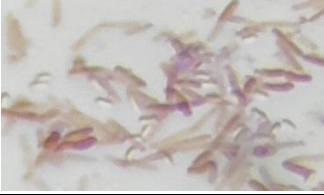
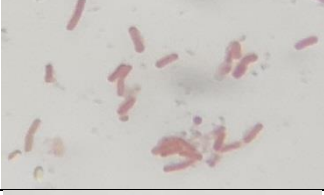
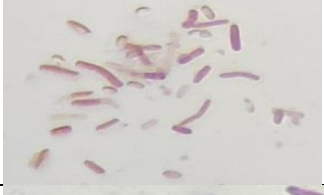
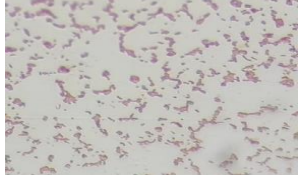
Cepa	<i>Agave angustifolia</i> Haw	<i>Agave rhodacantha</i> Trel
1		

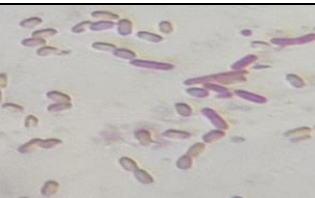
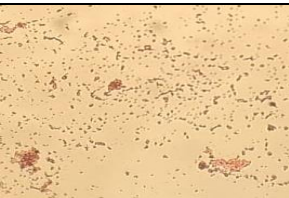
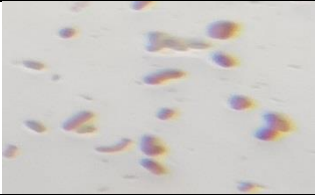
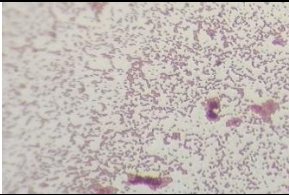
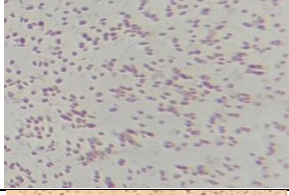
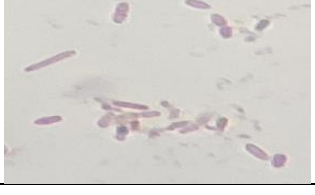
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		

10		
----	---	--

4.8.3 Bacterias ácido acéticas

Tabla 24 Morfología microscópica de las cepas de BAA de cada mosto analizado

Cepa	<i>Agave angustifolia</i> Haw	<i>Agave rhodacantha</i> Trel
1		
2		
3		
4		
5		
6		

7		
8		
9		
10		

Se observa que en las cepas de las dos muestras de mosto las levaduras presentan una morfología ovoide mientras que en las cepas de bacterias tanto ácido lácticas y ácido acéticas se pueden observar la presencia de bacilos y cocos, de acuerdo a la tinción diferencial realizada las bacterias ácido lácticas son Gram positivas mientras que las bacterias ácido acéticas son Gram negativas.

4.9 Pruebas bioquímicas

Se eligieron distintas pruebas para las cepas purificadas para que de acuerdo a la forma de interactuar con los medios y condiciones empleadas se pueda identificar hasta qué género son las levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas.

4.9.1 Fermentación de carbohidratos para levaduras

De acuerdo a los diferentes carbohidratos que puedan fermentar las levaduras se puede identificar el género al que pertenecen, se utilizó el medio caldo base rojo de fenol con 1% del carbohidrato a fermentar.

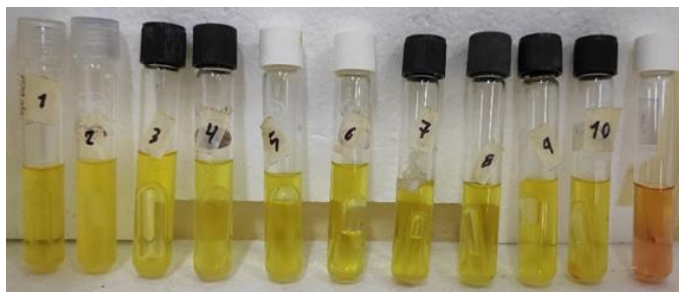


Figura 8 Observación de la fermentación de carbohidratos para levaduras

El medio es de color rojo si la levadura es capaz de fermentar el carbohidrato utilizado el medio cambiará a un color amarillo dando un resultado positivo.

Tabla 25 Resultados de la fermentación de carbohidratos de las cepas de *Agave angustifolia* Haw

Azúcar	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9	Cepa 10
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂
Lactosa	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
				CO ₂						CO ₂
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂
Sorbitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 26 Resultados de la fermentación de carbohidratos de las cepas de *Agave rhodantha* Trel

Azúcar	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+
	CO ₂			CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂
Manosa	+	+	+	-	+	-	+	+
			CO ₂		CO ₂			
Lactosa	+	+	-	-	-	-	-	+
Glucosa	+	+	-	+	+	+	+	+
	CO ₂	CO ₂			CO ₂		CO ₂	CO ₂
Sacarosa	+	+	-	+	+	-	-	+
				CO ₂	CO ₂			
Xilosa	-	+	-	-	-	-	-	-
		CO ₂	CO ₂	CO ₂				
Maltosa	+	-	-	-	-	-	-	-
			CO ₂					
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	+	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
	CO ₂			CO ₂		CO ₂		

Se resaltaron los resultados positivos con color verde para facilitar la comparación entre las asimilaciones de las cepas de cada mosto, se observa que *Agave angustifolia* Haw tiene una mejor asimilación con diferentes azúcares además que ninguno de los dos mostos analizados tuvo una fermentación relevante con los alcoholes utilizados.

4.9.2 Pruebas bioquímicas para bacterias ácido lácticas

4.9.2.1 Crecimiento en medio Elliker

Se utilizó el medio Elliker como prueba presuntiva para la presencia de *Streptococcus* y/o *Lactobacillus* en el cual si se presentó un crecimiento de colonias de microorganismos la prueba se leyó como positiva.

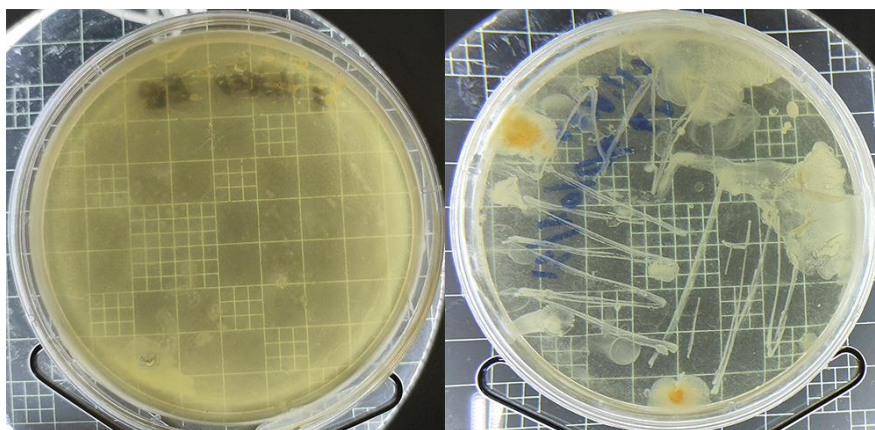


Figura 9 Prueba Elliker, negativo lado izquierdo y positivo lado derecho

4.9.2.2 Crecimiento en medio M17

De la misma forma que el medio Elliker el medio M17 se utilizó como prueba presuntiva para la presencia de *Streptococcus*, el crecimiento de microorganismos se interpretó como positivo.



Figura 10 Prueba M17 negativo lado izquierdo y positivo lado derecho

4.9.2.3 Fermentación heteroláctica u homoláctica

El medio M5 fue utilizado para identificar el tipo de fermentación que es capaz de provocar las bacterias de cada cepa obtenida, el medio tiene un color azul el cual si permanece en esta coloración las bacterias lograron una fermentación heteroláctica mientras que si el medio cambia de color la fermentación es homoláctica.

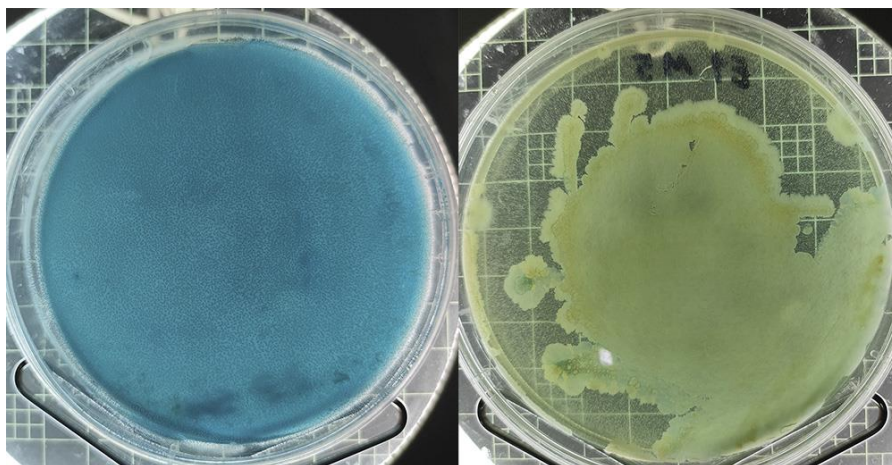


Figura 11 Medio M5 lado izquierdo fermentación heteroláctica (azul) lado derecho fermentación homoláctica (cambio de color del medio)

4.9.2.4 Prueba en medio MIO

Esta prueba se observa si las bacterias tienen la capacidad de movilidad, formación de indol y si son capaces de degradar el compuesto L-Ornitina, se cultivan por el método de punción y si presenta una precipitación fuera del área por donde pasa la aguja, la prueba de movilidad es positiva, para la degradación de ornitina el medio cambia de color de morado a amarillo para después de un tiempo regresar a color morado, si el medio vuelve a tornarse morado la prueba de ornitina es positiva, por último se agrega el reactivo Kovac en la superficie del medio y si hay una coloración roja la prueba es positiva.

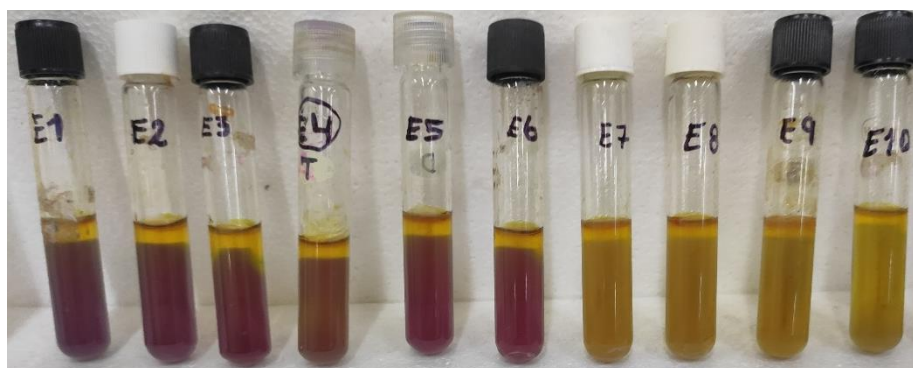


Figura 12 Prueba MIO con reactivo de Kovac

Se analizó si las bacterias crecieron más allá de donde fueron cultivadas por la técnica de punción, si el medio cambió a color amarillo y si volvió a ser morado, por último, la tonalidad de la superficie del medio después de agregar el reactivo de Kovac.

4.9.2.5 Prueba en medio SIM

De la misma forma que el medio MIO se cultivaron las bacterias en por técnica de punción y se analizó si hay movilidad, formación de indol y de ácido sulfhídrico.

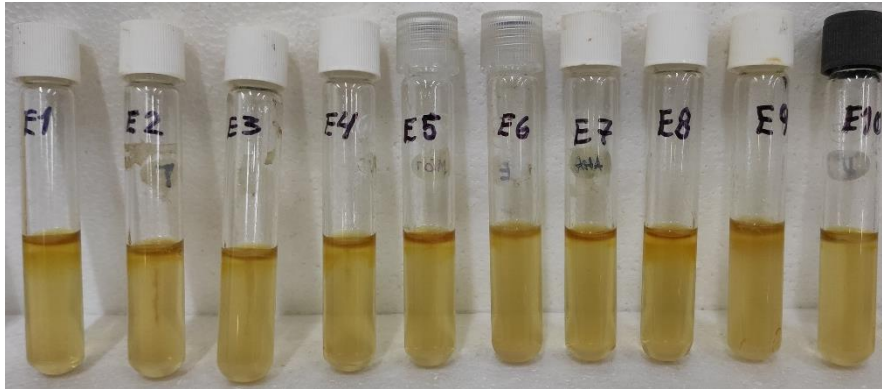


Figura 13 Prueba SIM con reactivo de Kovac

Se observó si hubo una precipitación alrededor del área de cultivo, si se formó un oscurecimiento para probar la presencia de ácido sulfhídrico y el color de la superficie del medio al agregar reactivo de Kovac.

4.9.2.6 Prueba en medio TSI

El medio se colocó en forma de “punta de flauta” y se cultivaron las bacterias con la técnica de “cola de pescado”, este medio cuenta con tres azúcares, se analizó el color del medio para reportar el área de fermentación.



Figura 14 Prueba TSI

Se analizó el área de fermentación que lograron las bacterias, si el medio crea un ambiente ácido el medio presenta color amarillo y se reportó si fue en el fondo, superficie o ambos extremos del medio, si el ambiente es alcalino, el medio permanece de color rojo, para identificar el ambiente del medio para ácido se utilizó la letra “a” y para el alcalino “k”. se observó si hubo presencia de ácido sulfhídrico (por oscurecimiento del medio) y si hubo presencia de gas.

4.9.2.7 Reducción de Nitratos

Se utilizó caldo de Nitrato y se cultivó en tubos de ensayo, se colocó un mililitro de cada tubo en uno nuevo y agregó la solución Griess-Ilosvay el cual permite revelar si las bacterias fueron capaces de reducir el nitrato a nitritos.

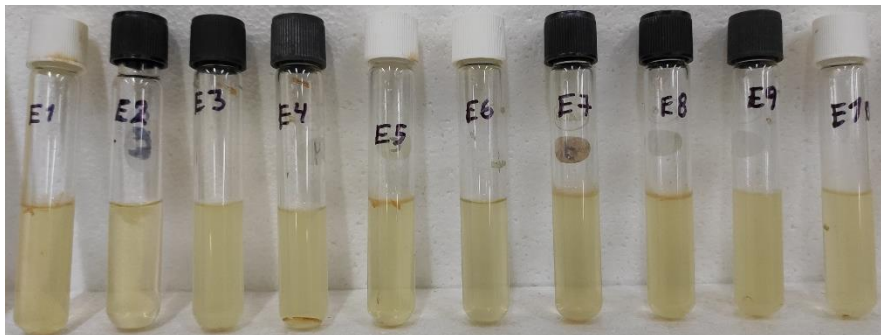


Figura 15 Bacterias cultivadas en caldo de Nitrato

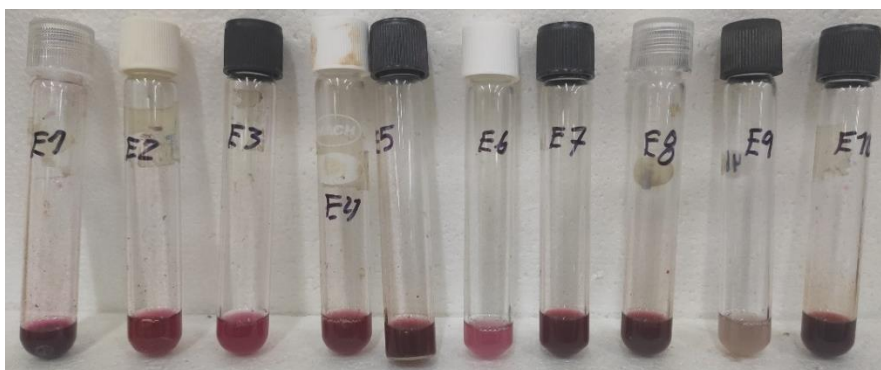


Figura 16 Cultivo en caldo de nitrato de cada cepa con la solución de Griess-Ilosvay

Se observó si al agregar la solución Griess-Ilosvay al mililitro de cultivo en caldo de Nitrato cambia a un color violeta de ser el caso la prueba de reducción es positiva.

4.9.2.8 Formación de gas en medio MRS

En medio líquido MRS se cultivaron las bacterias con la adición de una campana Durham para analizar la formación de gas.

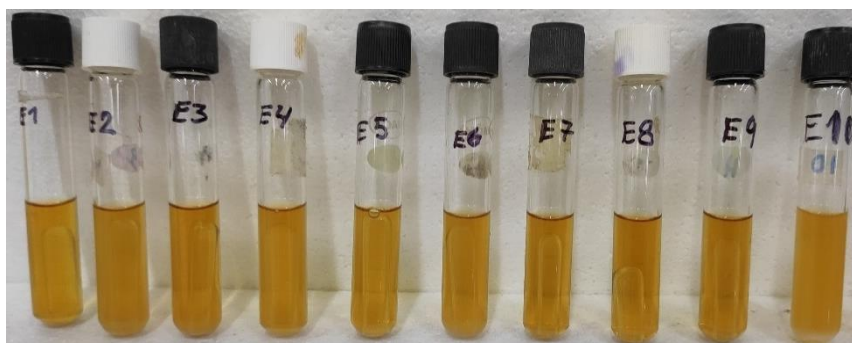


Figura 17 Medio líquido MRS con campana Durham

4.9.2.9 Prueba catalasa

En un portaobjetos se colocaron 3 gotas de peróxido de hidrógeno para después adicionar una muestra de cada cepa cultivada, la formación de burbujas denota la presencia de la enzima catalasa.



Figura 18 Prueba catalasa, izquierda negativa, derecha positiva

Tabla 27 Resultados para las bacterias ácido lácticas en *Agave angustifolia* Haw

Cepa	Elliker	M17	M5	MIO			SIM			TSI			NO ₃	CO ₂ MRS	Catalasa
				Ornitina	Movilidad	Indol	SH ₂	Movilidad	Indol	SH ₂	Gas	S/F			
1	-	+	Homoláctica	+	-	-	-	-	-	-	-	A/A	+	-	+
2	+	+	Heteroláctica	+	-	-	-	-	-	-	-	A/A	D	-	-
3	+	-	Homoláctica	+	-	-	-	+	-	-	-	A/A	D	-	-
4	+	+	Heteroláctica	-	-	-	-	-	-	-	-	A/A	D	-	-
5	-	+	Heteroláctica	+	-	-	-	-	-	-	-	A/A	+	-	-
6	-	-	Heteroláctica	+	-	-	-	-	-	-	-	A/A	-	-	-
7	+	+	Heteroláctica	-	-	-	-	-	-	-	-	A/A	+	-	-
8	-	+	Heteroláctica	-	-	-	-	-	-	-	-	A/A	+	-	+
9	+	-	Heteroláctica	-	-	-	-	+	-	-	-	A/A	-	-	+
10	+	+	Heteroláctica	-	-	-	-	+	-	-	-	A/K	+	-	-

Tabla 28 Resultados para las bacterias ácido lácticas en *Agave rhodacantha* Trel

Cepa	Elliker	M17	M5	MIO			SIM			TSI			NO ₃	CO ₂ MRS	Catalasa
				Ornitina	Movilidad	Indol	SH ₂	Movilidad	Indol	SH ₂	Gas	S/F			
1	+	+	Homoláctica	-	-	-	-	-	-	-	-	A/A	-	-	+
2	+	+	Homoláctica	-	-	-	+	+	-	+	-	K/K	+	-	-
3	+	+	Homoláctica	-	-	-	-	-	-	-	-	A/A	-	-	-
4	+	-	Homoláctica	+	-	-	-	-	-	-	-	K/K	+	-	-
5	+	-	Homoláctica	+	-	-	-	-	-	-	-	K/K	+	-	-
6	+	-	Heteroláctica	-	-	-	-	-	-	-	-	A/K	+	-	+
7	+	-	Heteroláctica	-	-	-	-	-	-	-	-	K/K	-	-	+
8	+	-	Heteroláctica	+	-	-	-	+	-	-	-	A/K	+	+	+

Se compilaron los resultados de ambas muestras de mosto y se resaltaron los resultados positivos para una mejor comparación, se puede observar que en el mosto de *Agave rhodacantha* Trel hay un mayor crecimiento en el medio Elliker y más de la mitad de las cepas purificadas tiene fermentación homoláctica, mientras que el *Agave angustifolia* Haw tuvo mejor crecimiento en el Medio M17 y mayor fermentación heteroláctica entre sus cepas purificadas.

4.9.3 Pruebas bioquímicas para Bacterias Ácido Acéticas

4.9.3.1 Prueba catalasa

Se adicionó una muestra de las cepas obtenidas a unas gotas de peróxido de hidrógeno para observar la formación de burbujas, de ser el caso, la prueba se consideró positiva.



Figura 19 Prueba catalasa izquierda negativa, derecha positiva

4.9.3.2 Oxidación de acetato de sodio

En esta prueba el medio es de color verde, si el medio cambió a color azul se prueba la oxidación del acetato de sodio.

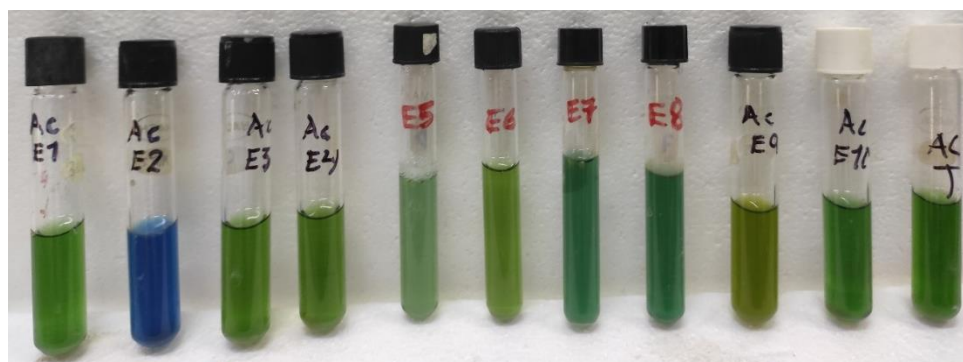


Figura 20 Prueba de oxidación de acetato de sodio, el segundo tubo se leyó como positivo

4.9.3.3 Crecimiento en 0.35% (v/v) de ácido acético

En medio líquido se cultivan las células y con la ayuda de un espectrofotómetro se evaluó el crecimiento con el componente principal mencionado.



Figura 21 Lectura del espectrofotómetro a los medios cultivados

Tabla 29 Valores de absorbancia obtenidos de cada cepa de los dos mostos de agave

Cepa	Absorbancia <i>Agave angustifolia</i> Haw	Absorbancia <i>Agave rhodacantha</i> Trel
1	0.933	1.073
2	0.206	0.992
3	0.105	0.968
4	0.043	1.172
5	0.056	0.965
6	0.144	0.941
7	0.138	0.987
8	0.134	1.017
9	0.29	0.32
10	0.192	1.086

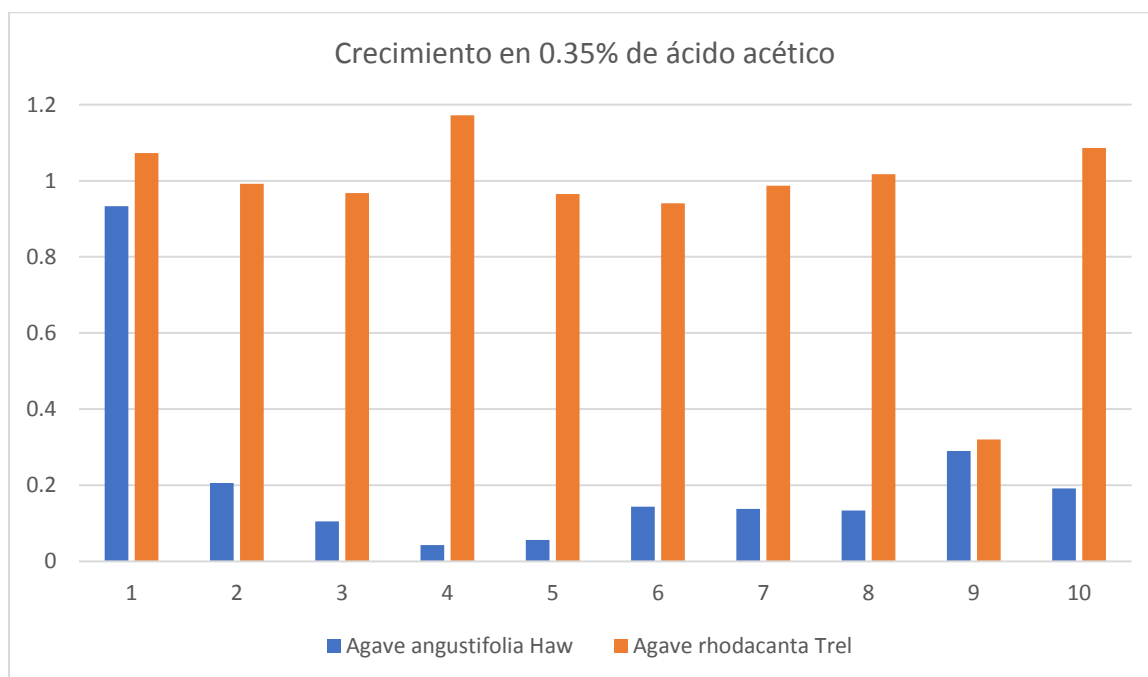


Figura 22 Gráfica de lo absorbancia del crecimiento en 0.35% de ácido acético

Para indicar la lectura de la prueba se consideró, el valor más bajo y el valor mayor de acuerdo a cada mosto, se promedió y los valores que superen la media se tomaron como positivos. Se observa que el *Agave rhodacantha* Trel tuvo una mejor asimilación.

4.9.3.4 Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol

Las BAA fueron cultivadas en este medio y al pasar el tiempo de incubación se les agregó unas gotas de solución de Fehling, si al agregar las gotas se forma un color naranja la prueba se tomó como positiva.

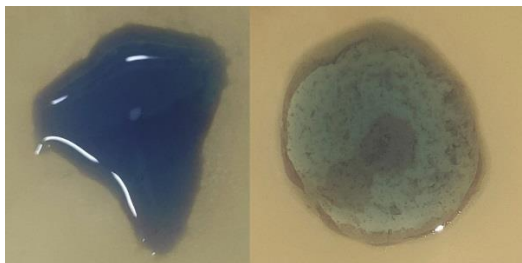


Figura 23 Prueba de dihidroxiacetona a partir de glicerol, izquierda negativa derecha positiva

4.9.3.5 Crecimiento con metanol como fuente de carbono

Se cultivaron las BAA en medio líquido y se evaluó su crecimiento con la ayuda del espectrofotómetro

Tabla 30 Absorbancia obtenida de las cepas de los dos agaves

Cepa	Absorbancia <i>Agave angustifolia</i> Haw	Absorbancia <i>Agave rhodacantha</i> Trel
1	0.259	0.189
2	0.166	0.050
3	0.156	0.074
4	0.16	0.009
5	0.172	0.237
6	0.191	0.069
7	0.184	0.039
8	0.239	0.134
9	0.306	0.081
10	0.195	0

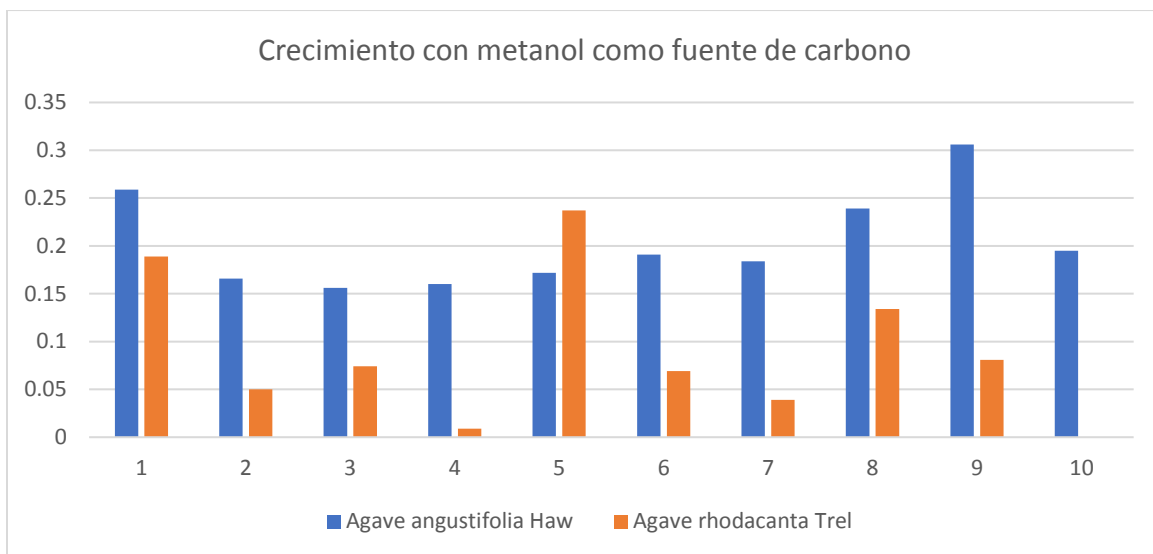


Figura 24 Gráfico de las absorbancias obtenidas a partir del crecimiento con metanol

En esta prueba las cepas de *Agave angustifolia* Haw tuvieron una mejor asimilación.

4.9.3.6 Crecimiento en agar manitol

Se cultivaron las BAA en el medio sólido, si hay crecimiento relevante la prueba se considera positiva

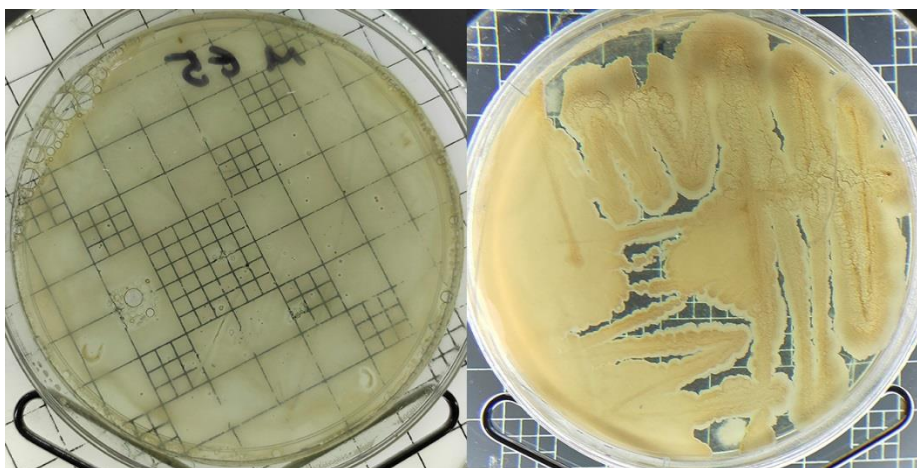


Figura 25 Prueba de crecimiento en agar manitol, izquierda negativo derecho positivo

6.9.3.7 Crecimiento en 1% de KNO_3

Se evaluó el crecimiento de BAA en medio líquido utilizando un espectrofotómetro.

Tabla 31 Absorbancias obtenidas de las cepas de ambos agaves

Cepa	Absorbancia <i>Agave angustifolia</i> Haw	Absorbancia <i>Agave rhodacantha</i> Trel
1	0.614	1.021
2	0.763	0.244
3	0.4	0.143
4	0.641	0.857
5	0.205	0.588
6	0.528	0.381
7	1.594	1.099
8	0.6	1.835
9	1.88	1.442
10	1.19	1.620

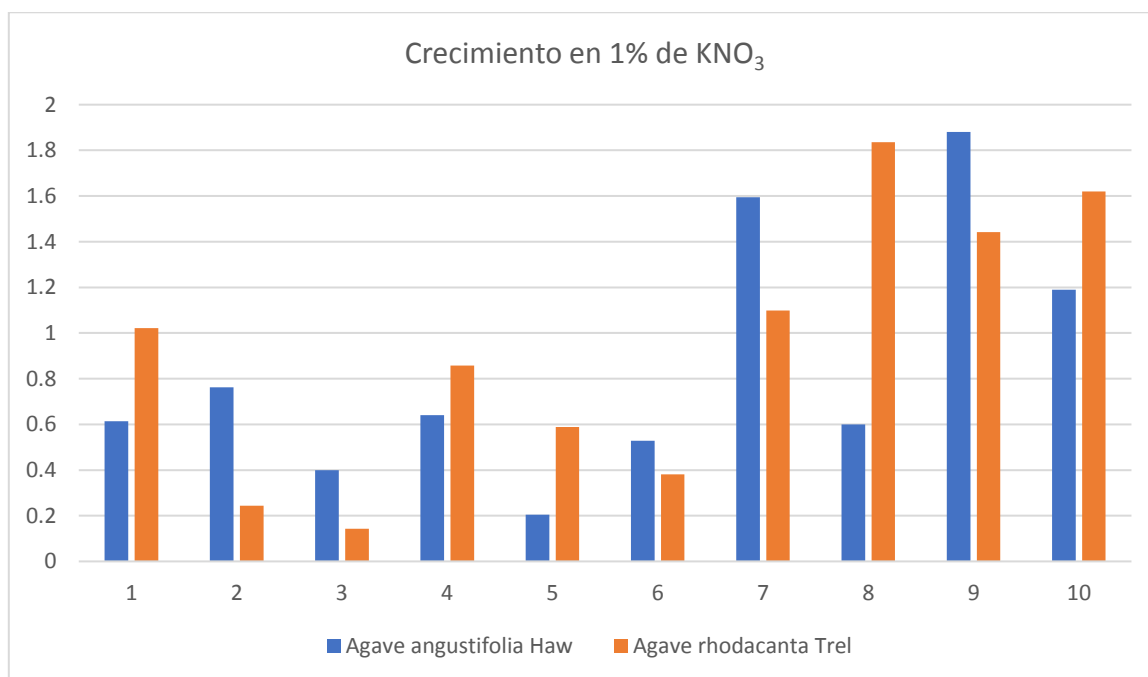


Figura 26 Gráfico de las absorbancias obtenidas de crecimiento en 1% de KNO₃

Se puede observar que en ambos casos el crecimiento fue variando, teniendo una mejor asimilación en las cepas 7, 8, 9 y 10 de ambos agaves.

4.9.3.8 Crecimiento en 3% de NaCl

De igual forma se midió el crecimiento de las BAA en medio líquido con ayuda de un espectrofotómetro.

Tabla 32 Absorbancias obtenidas de las cepas de cada agave

Cepa	Absorbancia <i>Agave angustifolia</i> Haw	Absorbancia <i>Agave rhodacantha</i> Trel
1	0.451	0.830
2	0.404	0.856
3	0.201	0.505
4	0.277	0.812
5	0.645	0.783
6	0.366	0.490
7	0.109	0.867
8	0.394	0.314
9	0.38	0.730
10	0.366	0.508

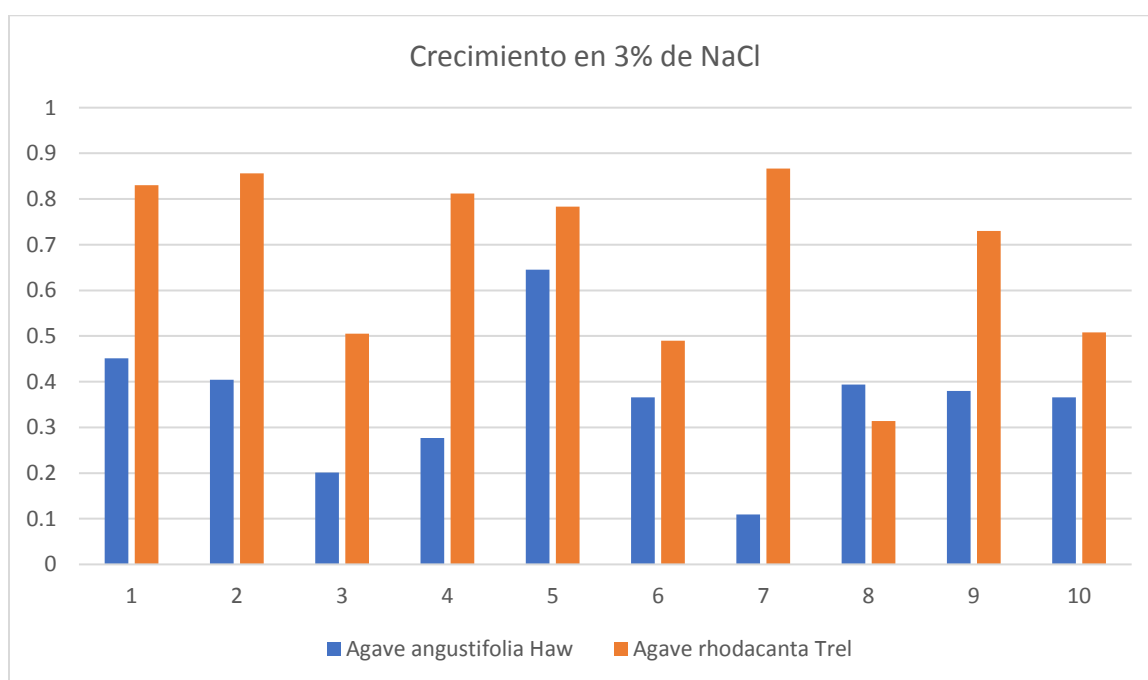


Figura 27 Gráfico de las absorbancias en crecimiento en 3% de NaCl

Se observa que las cepas de *Agave angustifolia* Haw tuvieron una mejor asimilación en el medio.

4.9.3.9 Crecimiento en 30% de glucosa

Las BAA se cultivaron en medio líquido y se evaluó el crecimiento utilizando un espectrofotómetro

Tabla 33 Absorbancias obtenidas de las cepas de ambos agaves

Cepa	Absorbancia <i>Agave angustifolia</i> Haw	Absorbancia <i>Agave rhodacantha</i> Trel
1	0.811	0.913
2	0.192	0.870
3	0.073	0.438
4	0.112	1.390
5	0.747	0.716
6	0.63	0.381
7	0.139	0.373
8	0.084	0.490
9	0.598	0.939
10	0.603	0.689

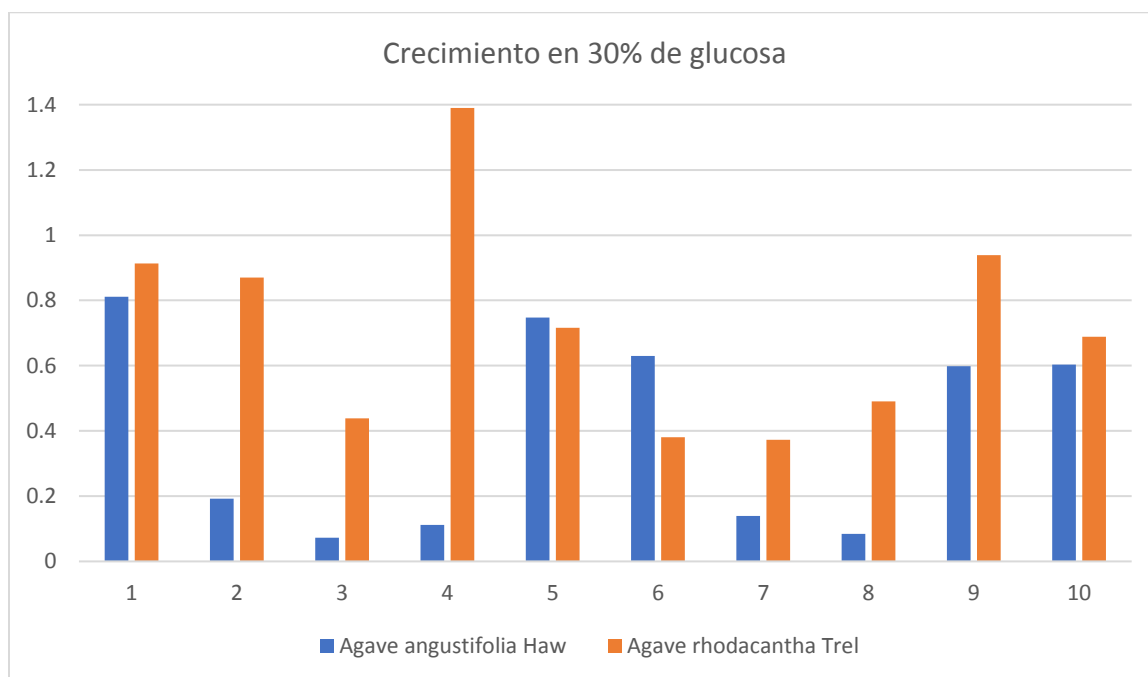


Figura 28 Gráfico obtenido de las absorbancias en crecimiento en 30% de glucosa

Se observa que las cepas de *Agave rhodacantha* Trel tienen una mejor asimilación con el medio.

4.9.3.10 Crecimiento en agar glutamato

Se cultivaron las cepas de BAA en medio sólido y se observó si hubo un crecimiento relevante en cada placa.

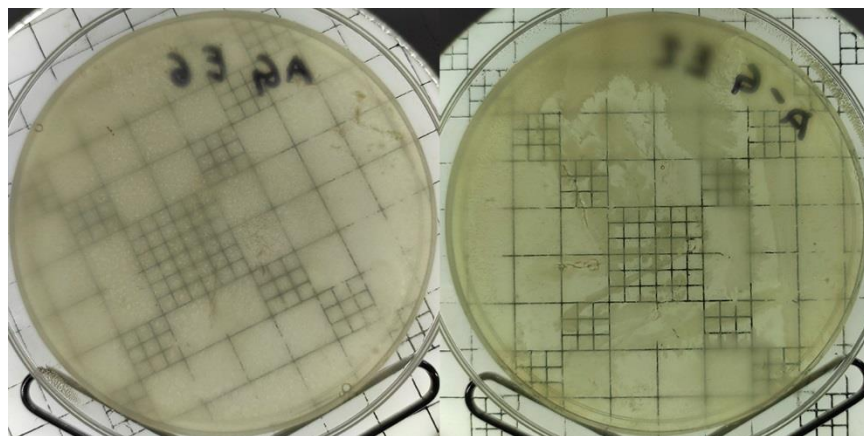


Figura 29 Prueba crecimiento en agar glutamato izquierda negativo derecha positivo

4.9.3.11 Formación de ácido a partir de azúcares y alcoholes

En medio líquido se utilizó púrpura de bromocresol como indicador de que la reacción se lleva a cabo en medio ácido utilizando alcoholes y azúcares, el cambio de color del medio de morado a amarillo se tomó como prueba positiva.

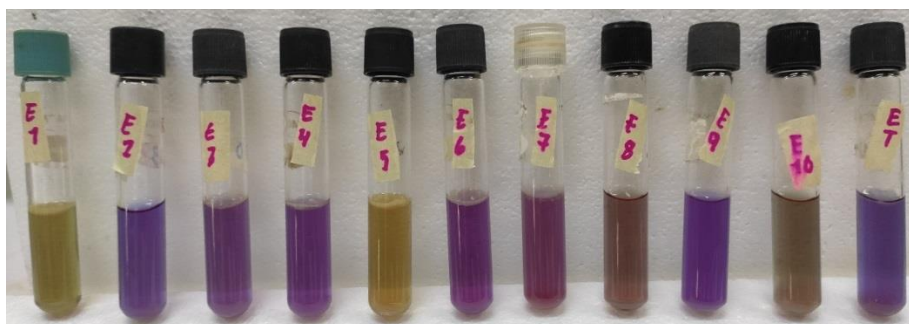


Figura 30 Prueba de formación de ácido a partir de azúcares y alcoholes, lo tubos 1 y 5 son positivos

4.9.3.12 Oxidación de etanol a CO₂

Se incubaron las BAA en tubos, el medio originalmente es de color verde, cambio a color amarillo se observa por la producción de ácido acético a etanol y la oxidación posterior a CO₂ y H₂O se prueba si el medio cambia de color a verde azulado.

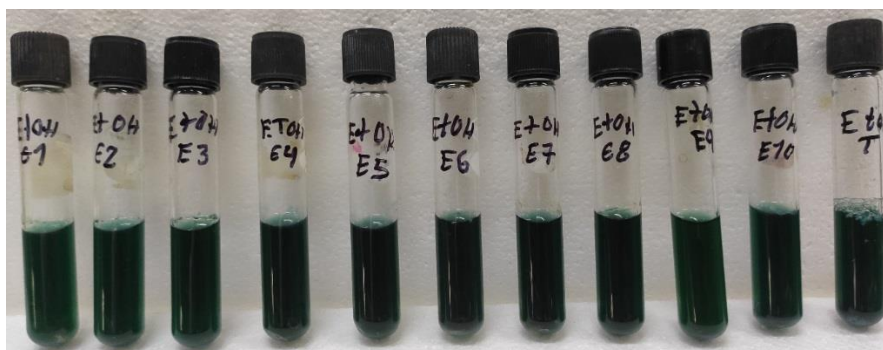


Figura 31 Prueba de Oxidación de etanol sin resultados positivos

Tabla 34 Resultados de pruebas bioquímicas para ambas muestras de agave

Prueba	Agave angustifolia Haw										Agave rhodacantha Trel									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Catalasa	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Oxidación de acetato	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Crecimiento en 0.35% v/v de AA	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Crecimiento en agar manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en agar glutamato	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en 30% glucosa	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Crecimiento en 1% de KNO ₃	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Crecimiento en 3% de NaCl	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
Crecimiento en metanol	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Crecimiento en ácido a partir de:																				
Etanol	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de dihidroxiacetona	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Oxidación de EtOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Se compilaron los resultados de ambas muestras en la tabla resaltando los resultados positivos con color verde para facilitar la comparación.

4.10 Identificación de microorganismos hasta género

4.10.1 Levaduras

De acuerdo a las tablas 25 y 27, se compararon los resultados con la literatura consultada (Garibay Marcelo, 2019) obteniendo los siguientes géneros:

Tabla 35 Géneros de levadura identificados en ambos agaves

Cepa	<i>Agave angustifolia</i> Haw	<i>Agave rhodacantha</i> Trel
1	<i>Kluyveromyces sp</i>	<i>Saccharomyces</i>
2	<i>Candida</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
3	<i>Kluyveromyces sp</i>	<i>Candida</i>
4	<i>Candida</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
5	<i>Saccharomyces</i>	<i>Candida</i>
6	<i>Candida</i>	<i>Candida</i>
7	<i>Candida</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
8	<i>Candida</i>	<i>Torulaspora</i>
9	<i>Candida</i>	
10	<i>Candida</i>	

4.10.2 Bacterias ácido lácticas

Comparando los resultados de las tablas 27 y 28 con las características reportadas en la literatura (Ramírez López & Vélez Ruiz, 2016) y (Jesica, 2017) se identificaron los siguientes géneros.

Tabla 36 Géneros de bacterias ácido lácticas identificadas en cada agave analizado

Cepa	<i>Agave angustifolia</i> Haw	<i>Agave rhodacantha</i> Trel
1	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactobacillus</i>
2	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>
3	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
4	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leuconostoc</i>
5	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>
6	<i>Weissella</i>	<i>Streptococcus</i>
7	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
8	<i>Bacillus</i>	<i>Pediococcus</i>
9	<i>Leuconostoc</i>	
10	<i>Lactobacillus</i>	

4.10.3 Bacterias ácido acéticas

A partir de los resultados obtenidos registrados en la tabla 34 se compararon con lo registrado en la literatura (Mabel Gerard, 2015) y se identificaron los siguientes géneros.

Tabla 37 Géneros de bacterias ácido acéticas identificados de los mostos de agave analizados

Cepa	<i>Agave angustifolia</i> Haw	<i>Agave rhodacantha</i> Trel
1	<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter</i>
2	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
3	<i>Acetobacter</i>	<i>Acidomonas</i>
4	<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter</i>
5	<i>Acetobacter</i>	<i>Asaia</i>
6	<i>Acetobacter</i>	<i>Acidomonas</i>
7	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
8	<i>Saccharibacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
9	<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter</i>
10	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>

CAPÍTULO V Conclusiones

Cada uno de los microorganismos a analizar pueden verse afectados por los medios en los que crecen de forma positiva y negativa es por ello que es importante utilizar los nutrientes que más les beneficie, además del uso de antibióticos para evitar contaminaciones dependiendo del tipo de microorganismo a identificar.

Una de las formas preliminares para la identificación de microorganismos es el de analizar su morfología, de forma macroscópica hay géneros que al formar la colonia lo hacen con forma y bordes específicos. De forma microscópica los microorganismos pueden ayudarnos a identificar el género, así como la tinción diferencial para clasificar el tipo de bacteria que se estudia, pero hacer hincapié que estas características nos ayudan de forma preliminar para hacer una identificación a nivel de género.

Las pruebas bioquímicas ayudan para caracterizar la capacidad de cada cepa microbiana en asimilar algún sustrato con el objetivo de inferir a qué género pertenecen los microorganismos que tenemos presentes en la muestra, la forma en que interactúan en medios diferenciales, así como los nutrientes disponibles nos facilitan el camino a identificar los géneros junto con la morfología analizada.

Se identificaron 3 géneros de levaduras en el *Agave angustifolia* Haw y 4 géneros de levadura en el *Agave rhodacantha* Trel; en bacterias ácido lácticas se encontraron 4 géneros en *A. angustifolia* Haw mientras que en *A. rhodacantha* Trel 5 géneros; por último, en bacterias ácido acéticas en *A. angustifolia* Haw se hallaron 2 géneros y en *A. rhodacantha* Trel 4 géneros.

Se notó que el mosto de *Agave rhodacantha* Trel cuenta con más géneros de levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas que el *Agave angustifolia* Haw.

CAPITULO VI REFERENCIAS

- Álvarez Ainza, M. L., Zamora Quiñones, K. A., & Acedo Félix, E. (2009). Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacarona. *Revista latinoamericana de Microbiología*, 58-63.
- Arevalo Chávez, S. M. (1998). *Optimización de la producción del Agente de Biocontrol Candida sake (CPA-1)*. Universitat de Lleida.
- Arratia Mireles, J. M. (2009). *Diversidad Genética de Levaduras Involucradas en la Fermentación de Mezcal Tamaulipeco*. Reynosa: Instituto Politécnico Nacional.
- Cabeza Herrera, E. A. (15 de Septiembre de 2006). *ResearchWeb*. Obtenido de Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica: https://www.researchgate.net/publication/264762337_Bacterias_acido-lacticas_BAL_aplicaciones_como_cultivos_estarter_para_la_industria_lactea_y_carnica
- De la Torre González, F. J. (2010). *Caracterización Cinético-Molecular de Microorganismos en Mostos de Mezcal*. Tamaulipas: Instituto Politécnico Nacional.
- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimiento en Microbiología Clínica*.
- Ferrer Piquer, M. M. (2018). *Aislamiento, selección e identificación de levaduras Saccharomyces cerevisiae nativas de Alboraya para la producción de cerveza*. Valencia: Universitat Politècnica de Valencia.
- Garibay Marcelo, M. d. (2019). *Caracterización de la diversidad de levaduras presentes durante el proceso de fermentación del mezcal en el estado de Guerrero*. Cilpancingo de los Bravo, Guerrero: Universidad Autónoma.
- Godínez Hernández, C. I. (2012). *Caracterización y eficiencia de la fermentación en la elaboración del mezcal potosino*. San Luis Potosí: Facultad de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina.
- Hernández, I., & Barbero, F. (2008). Bacterias acéticas: técnicas de detección y eliminación. *Vinoteq*, 12-16.
- Jesica, C. N. (2017). *CARACTERIZACIÓN DE Weissella ceti AISLADA EN BROTES SEPTICÉMICOS DE GRANJAS DE TRUCHA ARCOÍRIS (Oncorhynchus mykiss) de México*. Toluca: Universidad Autónoma del Estado de México.

- Mabel Gerard, L. (2015). *Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas*. Valencia, España: Universitat Politècnica de València.
- Mora Peñaflor, N., & García Guerrero, A. (2007). *Susceptibilidad de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos*. Pachuca de Soto, Hidalgo: Universidad Autónoma de Hidalgo.
- Morales Rodríguez, R. (2008). *Ingeniería Básica de una Planta para la Industria del Mezcal en Mitla, Tlaxiaco, Oaxaca*. Oaxaca: Instituto Politécnico Nacional.
- Oliva Hernández, A. A. (2012). *Evaluación Cinética y Molecular de Levaduras Fructofílicas Aisladas de Mezcal Tamaulipeco*. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Palma, F., Pérez, P., & Meza, V. (2016). *Diagnóstico de la Cadena de Valor Mezcal en las Regiones de Oaxaca*. Oaxaca de Juárez.
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias Ácido Lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 93-105.
- Pérez Hernández, E., Chávez Parga, M. d., & González Hernández, J. C. (2016). Revisión del Agave. *Revista Colombiana de Biotecnología*.
- Pérez Ricardez, C. I. (01 de Septiembre de 2016). *Los Mezcales y sus Tradiciones, Gastronomía, Control Social y Gusto Histórico*. Obtenido de Real Minero: <https://realminero.com.mx/wp-content/uploads/2016/09/1-Mezcales-y-tradiciones.pdf>
- Ramírez López, C., & Vélez Ruiz, J. F. (2016). *Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Artesanal de Cabra*. Cholula: Universidad de las Américas Puebla.
- Rivera Caro, C. A. (2013). *Efecto de una cepa de bacteria acética nativa sobre la composición fenólica de vinagres obtenidos a partir de vino blanco y tinto*. Santiago de Chile: Universidad de Chile.
- Rodríguez Villanueva, G. L. (2007). *Aislamiento e identificación de Bacterias Ácido Lácticas a partir de leche cruda y queso Paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyaca)*. Bogotá, Colombia: Universidad de La Salle.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (2016). *NOM-070-SCFI-2016, Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones*. Ciudad de México: Diario Oficial de la Federación.

Secretaría de Economía. (2011). *NORMA MEXICANA NMX-F-496-SCFI-2011 INDUSTRIA AZUCARERA Y ALCOHOLERA - DETERMINACIÓN DE REDUCTORES TOTALES EN AZUCARES Y MATERIALES AZUCARADOS*. México D.F.: Diario Oficial de la Federación.

Uribe Gutiérrez, L. A. (2007). *Caracterización Fisiológica de Levaduras Aisladas de la Filósfera de Mora*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.