



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO[®]

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

TESIS PROFESIONAL

TIPIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE MEZCAL ARTESANAL CON *Agave angustifolia* Haw.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:
MAZA LÓPEZ BELEN

ASESORA:
DRA. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ

COMISIÓN REVISORA:
DR. FELIPE DE JESÚS PALMA CRUZ
M.C. MINERVA DONAJÍ MÉNDEZ LÓPEZ
I.Q. ALEJANDRO AQUINO GÓMEZ

OAXACA DE JUÁREZ, OAXACA **MARZO 2023**

I. AGRADECIMIENTO

Principalmente agradezco a Dios por darme la sabiduría y la inteligencia para concluir mis estudios en el Instituto Tecnológico de Oaxaca.

Agradezco a mi Asesora la Dra. Claudia López Sánchez; gracias por darme la oportunidad de realizar este proyecto en el Laboratorio de Control Ambiental ubicado en el edificio del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, muchas gracias porque estuvo atenta a los avances, por la paciencia, las enseñanzas y el tiempo dedicado a cada una de las revisiones.

Agradezco a mi Padres, mi papá Nicolás Leonardo Maza Palacios y mi mamá Azminda López Recillas; Gracias porque creen en mí, gracias porque a pesar de las circunstancias, buscaron la manera de sustentar mis estudios hasta el último día. Gracias por motivarme a ser mejor persona, gracias porque siempre exigían lo mejor mí y por ello he llegado a ser lo que soy y porque por ustedes logré un triunfo más para nuestra familia.

Agradezco a mi novio Lenin Espinosa Aranda, porque gracias a él tuve días muy lindos, gracias por motivarme y por tenerme paciencia, gracias a él tuve una instancia tranquila. Lo quiero mucho.

Agradezco a un gran amigo y compañero de trabajo, M.C. Víctor Adrián Espinoza, gracias por apoyarme a tener una mejor adaptación en el Laboratorio de Control Ambiental.

II. RESUMEN

La presente Tesis hace referencia a los microorganismos que participan en el proceso de producción de mezcal artesanal con *Agave angustifolia*, que es la especie más utilizada oficialmente por las instancias de gobierno en la entidad Oaxaqueña. La investigación se enfocó principalmente en aquellos poco estudiados, tal como bacterias ácido-lácticas (BAL) y ácido acéticas (BAA) que intervienen durante la fermentación para la producción de mezcal artesanal; se realizó la comparación de muestras de mostos de dos localidades pertenecientes al estado de Oaxaca, para lo cual se llevó a cabo la siguiente estrategia: (1) siembra y aislamiento de microorganismos a partir de cultivos mixtos con la finalidad de obtener cultivos completamente puros; (2) selección de colonias con características fenotípicas distintas; (3) caracterización morfológica de cada cepa microbiana seleccionada; (4) conservación de cepas en glicerol al 30%, para integrarlas a un banco de cepas derivadas del proceso de producción de mezcal artesanal; (5) caracterización funcional de cepas. Como resultado de todo el procedimiento llevado a cabo para ambas muestras, se aislaron e identificaron por métodos convencionales 11 cepas de BAL y 17 cepas de BAA pertenecientes al palenque de San Pedro Teozacoalco, Nochixtlán y además 10 cepas de BAL y 3 cepas de BAA correspondientes a la muestra del Palenque de San Isidro Tapanala, Yautepec.

En general, se lograron tipificar 21 cepas de bacterias ácido lácticas y 20 cepas de bacterias ácido acéticas. Las especies tipificadas de BAL pertenecen a los géneros de *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Weisella*. Así mismo, las especies tipificadas de BAA corresponden a los géneros *Asaia*, *Saccharibacter*, *Gluconobacter*.

III. ABSTRACT

This thesis refers to the microorganisms that participate in the production process of artisan mezcal with *Agave angustifolia*, which is the species most officially used by government agencies in the Oaxacan entity. The research focused mainly on little-studied microorganisms, such as lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid (BAA) that intervene during fermentation for the production of artisanal mezcal; The comparison of must samples from two localities belonging to the state of Oaxaca was carried out, for which the following strategy was carried out: (1) sowing and isolation of microorganisms from mixed cultures in order to obtain completely pure cultures; (2) selection of colonies with distinct phenotypic characteristics; (3) morphological characterization of each selected microbial strain; (4) conservation of strains in 30% glycerol, to integrate them into a bank of strains derived from the artisanal mezcal production process; (5) functional characterization of strains. As a result of the entire procedure carried out for both samples, 11 BAL strains and 17 BAA strains belonging to the San Pedro Teozacoalco, Nochixtlán, mezcal factory were isolated and identified by conventional methods, as well as 10 BAL strains and 3 BAA strains corresponding to the sample of the Palenque of San Isidro Tapanala, Yautepec.

In general, 21 strains of lactic acid bacteria and 20 strains of acetic acid bacteria were typified. The typed BAL species belong to the genera of *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Weisella*. Likewise, the typified species of BAA belong to the genera *Asaia*, *Saccharibacter*, and *Gluconobacter*.

IV. ÍNDICE GENERAL

I.	AGRADECIMIENTO	2
II.	RESUMEN	3
III.	ABSTRACT	4
IV.	ÍNDICE GENERAL	5
V.	ÍNDICE DE TABLAS	9
CAPITULO 1.	INTRODUCCIÓN.....	11
1.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
CAPITULO 2.	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GENERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	13
2.3	JUSTIFICACIÓN	14
CAPITULO 3.	MARCO TEÓRICO	15
3.1	ANTECEDENTES DEL MEZCAL.....	15
3.2	AGAVES EMPLEADOS EN LA ELABORACION DE MEZCAL EN OAXACA.....	18
3.3	MEZCAL	18
3.4	PROCESO DE PRODUCCIÓN ARTESANAL DE MEZCAL EN EL ESTADO DE OAXACA	20
3.5	CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS DEL AGAVE	24
3.6	TAXONOMÍA DEL <i>Agave angustifolia</i> Haw.....	26
3.6.1	Nombre científico.....	26
3.6.2	Forma biológica del <i>Agave angustifolia</i> Haw	26
3.7	CRECIMIENTO DE <i>A. angustifolia</i> Haw EN EL ESTADO DE OAXACA	27
3.8	PRODUCCIÓN DEL MEZCAL A PARTIR DE PIÑAS DE AGAVE	28
3.9	IMPORTANCIA DE ANALIZAR LA MICROBIOTA QUE PARTICIPA EN LA PRODUCCION DE MEZCAL ARTESANAL	29
3.10	BACTERIAS EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL MEZCAL.....	31
3.11	BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	32
3.11.1	¿Qué son las Bacterias Ácido Lácticas?	33
3.11.2	Clasificación de las Bacterias Ácido Lácticas	33
3.11.3	Fermentación Láctica	36
3.11.4	Características de los diversos géneros de BAL	37

3.12 BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS	40
CAPITULO 4. LUGAR DE MUESTREO	46
4.1 SAN PEDRO TEOZACOALCO.....	47
4.2 SAN CARLOS YAUTEPEC, TAPANALA	47
CAPITULO 5. METODOLOGÍA	48
5.1 SIEMBRA Y PURIFICACIÓN.....	48
5.1.1 Preparación de medios de cultivo.....	48
5.1.2 Inoculación de microorganismos	49
5.1.3 Conteo de UFC/ml.....	51
5.2 OBTENCIÓN DE CULTIVO AXÉNICO O PURO A PARTIR DE CULTIVOS MIXTOS	51
5.3 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA.....	53
5.3.1 Preparación de las extensiones.....	53
5.3.2 Tinción diferencial gram.....	54
5.4 CONSERVACION DE CEPAS.....	55
5.4.1 Bacterias ácido lácticas	55
5.4.2 BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS	55
5.5 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CEPAS	57
5.6 AISLAMIENTO DIRIGIDO.....	58
5.6.1 Bacterias ácido lácticas	58
5.6.2 Bacterias ácido acéticas	59
5.7 PRUEBA DE LA CATALASA.....	59
5.8 PRUEBA DE OXIDASA.....	60
5.9 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	61
5.9.1 Prueba de crecimiento para BAL.....	61
5.9.2 Tipo de fermentación (homoláctica y heteroláctica) BAL.....	61
5.9.3 Fermentación de carbohidratos (BAL)	62
5.9.4 Oxidación de acetato	63
5.9.5 Formación de ácido a partir de azúcares y alcoholes (BAA)	64
5.9.6 Crecimiento en agar manitol y agar glutamato para BAA.....	64
5.9.7 Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol (BAA).....	65
5.9.8 Oxidación de etanol a CO ₂ (BAA).....	66
5.10 DETERMINACIÓN DE ART Y ARD	66

CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
6.1 SIEMBRA Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS.....	70
6.1.1 Conteo de UFC/ML en cada medio	70
6.2 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE CULTIVOS MIXTOS Y OBTENCIÓN DE CULTIVO AXÉNICO O PURO	71
6.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS BACTERIAS AISLADAS.....	74
6.3.1 Caracterización macroscópica.....	74
6.3.2 Caracterización microscópica.....	79
6.4 CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LAS DISTINTAS CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	81
6.5 CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LAS DISTINTAS CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS	85
RELACIÓN DE CEPAS CONSERVADAS.....	90
CAPITULO 7. CONCLUSIONES	92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

V. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Normatividad aplicable en las etapas de producción de mezcal artesanal.....	24
Tabla 2.	Géneros de Bacterias Ácido Lácticas, su tipo de fermentación y productos.....	35
Tabla 3.	Caracterización fisiológica y bioquímica de especies del género <i>Pediococcus</i>	39
Tabla 4.	Géneros y especies de BAA de mayor interés en alimentos y fuentes donde fueron aisladas por primera vez.	42
Tabla 5.	Número de colonias aisladas en cada medio de la muestra 1.	52
Tabla 6.	Número de colonias aisladas en su respectivo medio de la muestra 2.	52
Tabla 7.	Medios de cultivo para el aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas.	58
Tabla 8.	Parámetros fisicoquímicos de las muestras de mosto de mezcal artesanal.....	69
Tabla 9.	Conteo de colonias obtenido del plaqueo de la muestra 1.	70
Tabla 10.	Conteo de colonias obtenido del plaqueo de la muestra 2.	70
Tabla 11.	Relación de cepas seleccionadas y purificadas en medio MRS.....	71
Tabla 12.	Relación de cepas seleccionadas y purificadas en medio GYC.	73
Tabla 13.	Resultados de la Caracterización Macroscópica de BAL en medio MRS.....	75
Tabla 14.	Resultados de la Caracterización Macroscópica de BAA en medio GYC.....	77
Tabla 15.	Caracterización microscópica realizada con un objetivo de x100 de BAL.	79
Tabla 16.	Caracterización microscópica realizada con un objetivo de x100 de BAA.....	80
Tabla 17.	Aislamiento dirigido de Bacterias Ácido Lácticas (Elliker, MSE, LBS).	82
Tabla 18.	Características microscópicas y funcionales de las cepas de BAL aisladas de dos muestras de mezcal artesanal de <i>Agave angustifolia</i> Haw.	83
Tabla 19.	Resultado de los perfiles de fermentación de carbohidratos de cepas de BAL....	85
Tabla 20.	Crecimiento en medios dirigidos para Bacterias Ácido Acéticas.	87
Tabla 21.	Características funcionales de las cepas aisladas de BAA recuperadas de dos muestras de mezcal artesanal de <i>A. angustifolia</i>	89
Tabla 22.	Nomenclatura utilizada para el código asignado según el banco de cepas del Laboratorio de Control Ambiental.	90
Tabla 23.	Nomenclatura asignada a cada cepa purificada de la muestra 1 de acuerdo al banco de cepas del Laboratorio de Control Ambiental.	90
Tabla 24.	Nomenclatura asignada a cada cepa purificada de la muestra 2 de acuerdo al banco de cepas del Laboratorio de Control Ambiental.	91

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estados con Denominación de Origen Mezcal en México. (COMERCAM, 2021).....	15
Figura 2. Ejemplar de agave Mezcalero.	16
Figura 3. Ejemplares de Agave spp. con mayor uso en México.	19
Figura 4. Proceso de producción artesanal de mezcal.....	20
Figura 5. Cultivo y cosechado en el estado de Oaxaca.	21
Figura 6. Molino egipcio controlado por un animal de carga.	22
Figura 7. Cocción de la piña del agave en un horno cónico de piedra.....	22
Figura 8. Etapa de Fermentación en tinas de madera de roble.....	22
Figura 9. Ollas de barro usadas para la destilación del Mezcal en Villa Sola de Vega.	23
Figura 10. Estructura de una planta de agave.	25
Figura 11. Ejemplar de Agave angustifolia Haw.....	26
Figura 12. División geoestadística de Oaxaca, con Denominación de Origen del Mezcal.	28
Figura 13. Morfología de las Bacterias.....	32
Figura 14. Síntesis de la fermentación láctica.....	36
Figura 15. Observación microscópica del género Lactobacillus spp.	37
Figura 16. Bacteria Láctica del género Leuconostoc.....	38
Figura 17. Ejemplar Bacteria Lactococcus spp.	38
Figura 18. Ejemplar de Bacteria ácida acética.	41
Figura 19. Síntesis del proceso bioquímico para la producción de ácido acético.....	43
Figura 20. Proceso de oxidación del glicerol.....	44
Figura 21. Localización geográfica del lugar del muestreo, Estado de Oaxaca.....	46
Figura 22. Municipio de San Pedro Teozacoalco, Muestra 1.....	47
Figura 23. San Carlos Yautepec, Tapanala. Muestra 2.	48
Figura 24. Esquema para la preparación de diluciones.	50
Figura 25. Técnica por extensión de placa.....	50
Figura 26. Conteo de colonias.....	51
Figura 27. Técnica de estría cruzada por agotamiento para la obtención de cultivos puros.	53
Figura 28. Esquema para la preparación de extensiones.	53
Figura 29. Esquema para realizar tinción Gram.....	54
Figura 30. Conservación de cepas con glicerol al 30%.....	56

Figura 31. Interpretación de resultados para la prueba de catalasa.	60
Figura 32. Tipo de fermentación realizado a cepas BAL.	62
Figura 33. Proceso de preparación para la prueba de Fermentación de carbohidratos.	63
Figura 34. Escala de pH del indicador Azul de Bromotimol.	64
Figura 35. Acidificación del medio debida a la oxidación del sustrato (Fructuosa).	64
Figura 36. Crecimiento en (a) Agar Manitol y (b) Agar Glutamato.	65
Figura 37. Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol con un cultivo fresco de 72 hrs.	65
Figura 38. Filtración de las muestras.	66
Figura 39. Medición de pH con un potenciómetro.	67
Figura 40. Solución Fehling (A+B) en cada matraz.	67
Figura 41. Titulación de las muestras para la determinación de ART y ARD.	68
Figura 42. Grados Brix de la muestra 1 con apoyo de un Refractómetro digital.	69
Figura 43. Medición de pH de la muestra 1 con un pH metro.	69
Figura 44. Crecimiento de BAA en medio GYC para la detección de producción de ácido acético.	86

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Control, dependiente del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica del Tecnológico Nacional de México campus Oaxaca. La tesis planteó la tipificación de bacterias que participan en el proceso de producción de mezcal artesanal con *Agave angustifolia* Haw. con el fin de aislar, caracterizar y tipificar cepas bacterianas a nivel de género, principalmente Bacterias Ácido Lácticas y Bacterias Ácido Acéticas, con ayuda de pruebas bioquímicas y fisiológicas. Esto se debe a que cada vez más, aumenta la importancia de estos microorganismos con el fin de aportar un valor agregado al producto final, y a la vez mejorar los procesos y tiempo de conservación de este producto. Sin embargo, en Oaxaca, para los pequeños productores artesanales es una tarea difícil de realizar ya que no cuentan con los recursos físicos, económicos y de conocimiento para realizar estas tareas, lo cual afecta directa e indirectamente la competitividad de productos al enfrentarse con marcas ya industrializadas.

Por esta razón, se propuso realizar una tipificación de bacterias con cepas nativas provenientes del proceso de producción de mezcal artesanal con *Agave angustifolia* Haw. de dos distintas localidades en el estado de Oaxaca, permitiendo crear un banco de cepas bacterianas que participan en dicho proceso, las cuales son responsables de dar ciertas características organolépticas y reológicas deseables, esta tesis permitirá a futuro dar conocimiento y continuidad a estudios posteriores de investigación en esta rama y potencialmente ser utilizadas como cultivos iniciadores ya determinados.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace tiempo, la producción de mezcal en Oaxaca ha sido caracterizada por ser artesanal, debido a que se sigue utilizando equipo rudimentario como un horno de piedra para cocer el agave con leña, un molino de piedra (tahona) para moler el agave cocido, tinas de madera para fermentar y destilación del mosto en alambiques de cobre u ollas de barro. Sin embargo, a pesar de la gran importancia económica que esta actividad representa en Oaxaca, se desconoce en gran parte a los microorganismos nativos (bacterias lácticas y acéticas) que están implicados en la etapa de fermentación, así mismo se desconoce el papel que juega cada uno de estos microorganismos en su contribución con los atributos del mezcal artesanal.

CAPITULO 2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Tipificar a las bacterias que participan en el proceso de producción de mezcal artesanal con *Agave angustifolia* Haw.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar y purificar Bacterias Ácido Lácticas y Bacterias Ácido Acéticas presentes en mostos de fermentación de tipo artesanal a partir de *Agave angustifolia* Haw.
- Identificar preliminarmente hasta género la diversidad bacteriana de microorganismos mediante pruebas morfológicas y bioquímicas.
- Generar un banco de Bacterias Ácido Lácticas y Bacterias Ácido Acéticas derivadas del proceso de producción del mezcal artesanal para estudios posteriores dentro del Laboratorio de Control Ambiental en el Instituto Tecnológico de Oaxaca.

2.3 JUSTIFICACIÓN

La tipificación se basa en la comparación de las características desconocidas de los microorganismos, con aquellas de cultivos tipo (previamente estudiados e identificados).

En Oaxaca, una de las actividades que tiene mayor importancia económica es la producción de mezcal artesanal. Con el estudio de las bacterias que participan en el proceso de producción de este tipo de bebida, se pretende conocer no solo que tipo de microorganismos están presentes en la etapa de fermentación, sino, se busca aprender sobre ellos para tener otros usos, como por ejemplo, manejarlos en su lugar de producción, y conservarlos en laboratorio con el objetivo de contar una colección a manera de banco de especies que intervienen en los procesos de fermentación.

Cabe recalcar, que es importante conocer qué tipo de microorganismos están presentes en la etapa de fermentación, ya que, ayudará a explicar de manera presuntiva como se obtienen ciertas características organolépticas y reológicas deseables en el mezcal. Además, se busca contar con el conocimiento necesario para poder manejarlos en su lugar de producción y que se pueda obtener mejores rendimientos en los procesos de producción.

CAPITULO 3. MARCO TEÓRICO

El mezcal es una bebida ancestral de origen mexicano que desde hace más de varias décadas está brillando en el mercado internacional y extranjero. De acuerdo a investigaciones realizadas por la Universidad Nacional Autónoma de México en el estado de Oaxaca, antropólogos se percataron que el origen del mezcal data aproximadamente del año 400 a.C., en donde esta bebida artesanal se destilaba en ollas de barro.

Esta exquisita bebida es creada a partir de la destilación del corazón del agave o maguey. Dentro del origen del mezcal, es importante conocer porque se le nombra así. El vocablo “mezcal” viene del náhuatl “*mexcalli*”, compuesta de “*metl*” que traducido al español es “maguey” e “*ixcalli*” que hace referencia al termino “cocido”, esto es, maguey cocido u horneado.

3.1 ANTECEDENTES DEL MEZCAL

Los magueyes o también conocidos como agaves o mezcales, han sido aprovechados por el hombre durante miles de años. En México se registra la mayor diversidad de especies de *Agave*, debido a su ubicación geográfica y las diferentes condiciones ambientales que existe en cada región del país. Hasta el momento se



Figura 1. Estados con Denominación de Origen Mezcal en México. (COMERCAM, 2021)

han contabilizado cerca de 340 especies de agaves, de las cuales, en México se encuentran 261 especies, es decir, el 75% del total de especies, con 177 especies endémicas (Reynoso *et al.*, 2012).

Actualmente, son 9 estados (Guanajuato, Guerrero, Durango, San Luis Potosí, Zacatecas, Oaxaca, Tamaulipas, Michoacán y Puebla) y en algunos de ellos solo algunos municipios pueden ostentar la Denominación de Origen Mezcal de acuerdo con la Dirección General de Comunicación Social, en 2015.

Hernández (2015) describe al maguey o agave mezcalero como una planta de la familia de las amarilidáceas, caracterizada por tener hojas largas y fibrosas de forma lanceolada, de color verde azulado como se observa en la Figura 2; de la cual se aprovecha la piña o cabeza para la elaboración de mezcal.



Figura 2. Ejemplar de agave Mezcalero.

Hoy en día existen muchos tipos de agaves. Cada tipo de agave le da al mezcal un sabor y aroma unico. Los agaves crecen en las planicies, las montañas, los acantilados, en dunas costeras o en los picos montañosos y se adaptan al tipo de clima de la región. El género *Agave* le da nombre a la familia de las *Agaváceas*, como los amoles (géneros *Beschorneria*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*), pitas (*Furcrea*), samandoques (*Hesperaloe*) e izotes (*Hesperoyucca* y *Yuca*) (Mendoza, 2017).

Una de las especies de mayor uso y una de las mas conocidas a nivel nacional por los productores de mezcal es el *Agave angustifolia* mejor conocido como maguey espadín. Este agave, tiene mas de 30 nombres comunes según Mendoza (2017), como son: *chacaleño*, *espadín espadilla*, *ixtero*, *mezcal*, *lineño* y *tepomete*, entre muchos otros.

Las especies más utilizadas regionalmente a nivel nacional de acuerdo con Mendoza, (2017) son:

- **Tamaulipas.** En la Sierra San Carlos se produce mezcal conocido como “vino” o “vino de mezcal”, se emplea el maguey cenizo (*Agave americana* subespecie *protamericana*) y la jarcia (*Agave montium-santicaroli*); en menor proporción se ocupan las lechuguillas (*Agave funkiana* y *Agave univittata*).
- **San Luis Potosí-Zacatecas.** Estas dos regiones comparten el uso del maguey verde (*Agave asalmiana* subespecie *crassispina*) para producir mezcal. En Zacatecas, el mezcal se prepara con el *Agave azul* (*Agave tequilana*).
- **Durango.** En el estado, el mezcal se obtiene a partir del maguey cenizo (*Agave durangensis*), aunque también se elabora de tepemete (*Agave angustifolia*) y de magueyes masparillo (*Agave bovicornuta* y *Agave maximiliana*).
- **Michoacán.** En la cuenca del Río Balsas y Sierra Madre del Sur se utilizan el maguey chino (*Agave cupreata*); el maguey largo (*Agave tequilana*), cultivado en la región de Sahuayo-Jiquilpan.
- **Guerrero.** En la región centro-montaña de Guerrero, se emplea el maguey papalote (*Agave cupreata*), especie silvestre endémica de la cuenca del Río Balsas, y a baja escala el maguey delgado (*Agave angustifolia*).
- **Puebla.** El mezcal se hace con papalometl (*Agave potatorum*), maguey pizometl (*Agave marmorata*), espadilla (*Agave angustifolia*) o a partir del pulque del maguey amarillo (*Agave salmiana* subespecie *salmiana*).
- **Oaxaca.** La elaboración de mezcal involucra ocho especies y 17 formas protegidas o silvestres, la mayor producción se da en la “región del mezcal” de los Valles Centrales y Sierra Sur. El espadín (*Agave angustifolia*) se cultiva con fines comerciales en siete distritos. Otras especies corresponden al maguey mexicano (*Agave rhodacantha*), papalometl (*Agave potatorum*), tobalá (*Agave marmorata*), cirial, barril, bicuixe, tobashiche (*Agave karwinskii*), arroqueño (*Agave americana* variedad *americana*) maguey Sierra Negra (*Agave americana* variedad *oaxacensis*).

3.2 AGAVES EMPLEADOS EN LA ELABORACION DE MEZCAL EN OAXACA

Oaxaca es el estado más rico en agaváceas de México, cuenta aproximadamente con 58 especies, 13 de las cuales son endémicas; algunas de ellas proveen la materia prima para la elaboración de los mezcales (García Mendoza, 2004). La mayor producción se da en la “región del mezcal”, en el estado de Oaxaca, y comprende los distritos de Sola de Vega, Miahuatlán, Yautepec, Santiago Matatlán, Tlacolula, Ocotlán, Ejutla y Zimatlán, en donde se concentra el mayor número de especies y envasadoras (Diario Oficial de la Federación, 2012).

Actualmente, en cada una de las entidades con Denominación de Origen en el estado de Oaxaca, se produce mezcal con variedades y especies de agave distintivas de la zona, las cuales están validadas por la Norma Oficial Mexicana (Diario Oficial de la Federación, 1994); (Martínez Jiménez *et al.*, 2019).

La elaboración de mezcal con especies nativas de agave, han producido gran arraigo socioeconómico y cultural. De acuerdo a Martínez Jiménez *et al.*, (2019), tan solo en Villa Sola de Vega ya cuentan con 136 localidades, 18 dedicadas a producir maguey-mezcal. Por otro lado, existen 64 fábricas de mezcal, de las cuales, 26 de ellas destilan tradicionalmente en ollas de barro, 23 en alambiques y 15 en tambos de lámina. Este proceso de elaboración del mezcal se considera artesanal a diferencia de otras regiones mezcateras del país.

3.3 MEZCAL

La NOM-070-SCFI-1994, bebidas alcohólicas-mezcal-especificaciones, el mezcal es una bebida alcohólica que se obtiene por destilación y rectificación de los mostos (o jugos) preparados directamente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves previamente cocidas y sometidas a fermentación (Diario Oficial de la Federación, 1997).

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 mezcatero,



Agave americana
var. oaxacensis



Agave durangensis



Agave tequilana



Agave angustifolia



Agave salmiana
subsp. crassispina



Agave univittata
subsp. lophanta



Agave rhodacantha



Agave maximiliana



Agave potatorum



Agave cupreata



Agave americana



Agave marmorata

Figura 3. Ejemplares de *Agave* spp. con mayor uso en México.

carácter y las sensaciones organolépticas producidas por cada Mezcal (Diario Oficial de la Federación, 2017).

La industria del mezcal se inició en el siglo XVI, pero no fue hasta la Revolución Mexicana que tuvo su primer impulso. Sin embargo, su crecimiento fue muy lento, hace solo 50 años la producción de manera artesanal del mezcal era ilegal, por lo que todo se elaboraba de manera clandestina. En los últimos años se ha tratado de organizar e impulsar fuertemente a la industria. La creación de la norma oficial mexicana, la denominación de origen, la creación del Consejo Regulador del Mezcal, así como la Cámara Nacional de la Industria del Mezcal son sólo algunos ejemplos de la importancia que se ha dado a este producto (Diario Oficial de la Federación, 1997).

3.4 PROCESO DE PRODUCCIÓN ARTESANAL DE MEZCAL EN EL ESTADO DE OAXACA

En Oaxaca, desde hace tiempo la elaboración de mezcal ha sido caracterizada por ser artesanal. Este proceso se desarrolló como una actividad complementaria más a la actividad agrícola, manteniendo sus relaciones técnicas y sociales, su carácter de pequeña producción mercantil orilló con el paso de los años entrar al capital comercial, utilizando en el proceso de producción la contratación de mano de obra, el equipo de destilación, tinas de fermentación y barricas de madera para el almacenamiento (Bautista, *et al.*, 2015).



Figura 4. Proceso de producción artesanal de mezcal.

De acuerdo con Hidalgo Reyes *et al.*, (2010); Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (1999), las fases que caracterizan el proceso de obtención del mezcal son:

- I. Cultivo y Cosecha. El agave tarda entre 8 y 10 años aproximadamente para estar “en su punto” (García S., 2003). Cuando el agave alcanza la madurez, se procede a la cosecha, separándoles las hojas hasta dejar limpio el tallo, llamándosele “piña”. Posteriormente las piñas son transportadas a las fábricas de mezcal, conocidas como palenques.



Figura 5. Cultivo y cosechado en el estado de Oaxaca.

- II. Cocción de la piña del agave. García (2003), menciona que previo a la cocción, las piñas deben ser fraccionadas para facilitar su cocción. Tradicionalmente la cocción se realiza en un horno a flor de tierra que pueden ser revestidos de piedra. El cocimiento tiene una duración aproximada de 72 horas (tres días), finalizado este periodo, el agave cambia de color blanco a caramelo, lo que indica un buen cocimiento, ya que, se ha logrado que los carbohidratos se transformen en azúcares (García S., 2003).
- III. Seccionado del agave en estado cocido. El seccionado de las piñas se lleva a cabo en estado cocido, y se realiza con el fin de obtener un material más cómodo para trabajar en la siguiente etapa.



Figura 7. Cocción de la piña del agave en un horno cónico de piedra.



Figura 6. Molino egipcio controlado por un animal de carga.



Figura 8. Etapa de Fermentación en tinas de madera de roble.

- IV. Molienda o desgarre. La molienda consiste en reducir de tamaño el agave previamente seccionado, para esto, es colocado en un molino egipcio o molino chileno, donde pasará una rueda dentada o lisa controlada por una persona o con un animal de carga (Figura 7), con el fin de reducirlo a una masa fibrosa.
- V. Fermentación. Se coloca el material o mejor conocido como “mosto” a tinajas de madera de roble o encino (Figura 8), y se añade un porcentaje del 5 a 10 % de la capacidad de la tina de agua tibia. El tiempo de fermentación varía según la calidad del maguey y la temperatura del lugar y puede variar de 72 a 200 hrs.
- VI. Destilación. La destilación se lleva a cabo en alambiques, elaborados con materiales de la región. Los equipos utilizados para esta etapa del proceso pueden ser industriales de destilación continua, hasta de materiales de cobre, ollas de barro o rusticos que predominan en Oaxaca.



Figura 9. Ollas de barro usadas para la destilación del Mezcal en Villa Sola de Vega.

- VII. Condensación – refinamiento. Este proceso se caracteriza por ser “artesanal” y la calidad del mezcal se determina a base de la experiencia del productor y la determinación del grado alcohólico se realiza de forma empírica utilizando una pipeta de carrizo.

La producción artesanal del mezcal cuenta con normatividad aplicable a cada una de las etapas que comprenden la producción de esta bebida, como se resume en la tabla 1.

Tabla 1. Normatividad aplicable en las etapas de producción de mezcal artesanal.

PROCESO	NOM	NMX	OTROS
COCIMIENTO	NOM-012-RECNAT-1996 NOM-120-SSA1-1994 NOM-017-STPS-2008		Prácticas Seguras en el Sector Agroindustrial (Producción de Mezcal) Lineamientos del COMERCAM
MOLIENDA	NOM-120-SSA1-1994 NOM-017-STPS-2008		Prácticas Seguras en el Sector Agroindustrial (Producción de Mezcal) Lineamientos del COMERCAM
FERMENTACIÓN	NOM-070-SCFI-1994 NOM-120-SSA1-1994 NOM-017-STPS-2008		Prácticas Seguras en el Sector Agroindustrial (Producción de Mezcal) Lineamientos del COMERCAM
DESTILACIÓN	NOM-070-SCFI-1994 NOM-120-SSA1-1994 NOM-017-STPS-2008 NOM-142-SSA1-1995 NOM-251-SSA1-2009	NMX-004-NORMEX-2013 NMX-005-NORMEX-2013 NMX-006-NORMEX-2013 NMX-013-NORMEX-2005 NMX-015-NORMEX-2006 NMX-017-NORMEX-2005	Prácticas Seguras en el Sector Agroindustrial (Producción de Mezcal) Lineamientos del COMERCAM

(CIATEJ, 2014)

3.5 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DEL AGAVE

De acuerdo al CIATEJ (2014), los *agaves* son plantas que por sus características fisiológicas pueden adaptarse a diversas condiciones o habitats, por lo que se pueden encontrar de forma silvestre en valles y planicies, así como en cerros e incluso laderas pedregosas.

Tienen forma de piña, de la cual salen hojas de gran tamaño o pencas en forma de roseta compacta, a veces rectas y otras curvas o dobladas de manera caprichosas y carnosas con bordes provistos de espinas (dientes) de color amarillo y con una púa en la punta (Valdez, 2017). Su escapo floral o quilete llega a medir aproximadamente 8 a 12 metros según cada especie, y generalmente el color que distingue cada uno de los agaves va desde el verde claro hasta el verde oscuro, pasando por varios tonos de color azul (CIATEJ, 2014).

Valdez (2017), menciona que estas plantas crecen y se llegan a desarrollar mejor en ambientes áridos y semiáridos, aunque como ornato, en parques y jardines, se adaptan a climas húmedos y templados. La parte que mas se aprovecha para la produccion de mezcal es la piña o cabeza (tallo y base de sus hojas).

De esta definicion nacen dos formas de nombrar a un agave según Valdez (2017).

Agave maduro. Es el agave que ha logrado el estado óptimo para ser cosechado (madurez), en todas las especies el indicador de madurez es el surgimiento del quiate y en algunas la coloracion de sus hojas, etc.

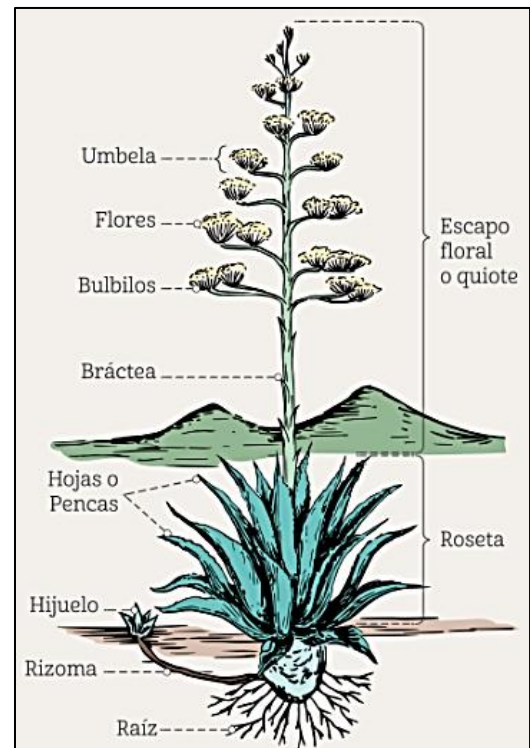


Figura 10. Estructura de una planta de agave.

Agave tierno. Se le dice así al agave que se encuentra en la etapa del nacimiento hasta antes de alcanzar la madurez. En esta etapa no se recomienda la cosecha ya que se encuentra en una etapa de bajo contenido de azúcares.

Según la NOM-070-SCFI-1994, los magueyes que pueden ser utilizados para el proceso de producción de mezcal, son:

Agave Angustifolia Haw (maguey espadín);

Agave Esperrima jacobi, Amarilidáceas (maguey de cerro, bruto o cenizo);

Agave Weberi cela, Amaralidáceas (maguey de mezcal);

Agave Patatorum zucc, Amaralidáceas (maguey de mezcal);

Agave Salmiana Otto Ex Salm SSP Cassispina (Trel) Gentry (maguey verde o mezcalero);

y otras especies de agave, siempre que no se utilicen como materia prima para otras bebidas con denominaciones de origen dentro del mismo estado.

3.6 TAXONOMÍA DEL *Agave angustifolia* Haw

En esta tesis trabajaremos con el *A. angustifolia* Haw, por lo que es importante saber y conocer más a fondo sobre las características de este Agave en México y principalmente en el estado de Oaxaca.

3.6.1 Nombre científico

Agave angustifolia Haw, denominado como “maguey delgado”, “maguey gubuk” o “maguey espadín”, es la fuente de fibra y de bebidas alcohólicas como el bacanora en Sonora y mezcal en Oaxaca (Vázquez *et al.*, 2007).

El *A. angustifolia* posee un ciclo de vida largo, pues en general tarda alrededor de 6 a 8 años para que de sus frutos con semilla. A demás esta planta es muy curiosa ya que presenta un solo evento reproductivo sexual y al término de este muere. De igual manera, se conoce que esta planta tiene un porcentaje incierto de fertilidad, de igual manera posee una tasa germinativa y de supervivencia baja (Esqueda *et al.*, s/f).

3.6.2 Forma biológica del *Agave angustifolia* Haw

El *Agave angustifolia* presenta una amplia variación morfológica, que con frecuencia genera una gran dificultad en su taxonomía. Las plantas de este género morfológicamente consisten en rosetas cespitosas ampliamente abiertas de aproximadamente 1.0 a 1.5 metros de alto por 1.5 a 2.0 metros de diámetro, con tallos desde 20 a 60 cm de largo. Sus hojas maduras tienen formas que varían de lineales a lanceoladas de 60 a 120 por 3.5 a 10 cm, son ascendentes a horizontales, de color verde claro a verde grisáceo. Este tipo de agave son planas o cóncavas hacia el ápice, convexas hacia la base, estrechas, angostándose hacia la base y terminando en una espina apical de 1.5 a 3.5 cm aproximadamente de



Figura 11. Ejemplar de *Agave angustifolia* Haw.

longitud, esta llega a ser cónica, de color marrón a rojizo oscuro, algunas veces es cartilaginoso y posee dientes de 2 a 5 mm de longitud (Esqueda Valle *et al.*, s.f.).

3.7 CRECIMIENTO DE *A. angustifolia* Haw EN EL ESTADO DE OAXACA

En el estado de Oaxaca, el *A. angustifolia* se aprovecha como materia prima demandada para la producción y comercialización del mezcal. Este agave, es capaz de soportar condiciones ambientales, tales, como déficit hídrico, alta temperatura, suelos moderadamente salinos y de fertilidad baja, que limitan el crecimiento y productividad de otras plantas de cultivo (Ríos *et al.*, 2021).

La producción de mezcal, es una de las principales actividades económicas del estado de Oaxaca. El bagazo de maguey obtenido después de la destilación de los mostos producidos durante la fermentación, representa el subproducto más impactante al ambiente, por el gran volumen que de él se genera (López Sánchez *et al.*, 2019).

De acuerdo a la Denominación de Origen Mezcal (DOM), en el estado de Oaxaca, la resolución legal mencionada, declara para la protección de la Denominación de Origen del Mezcal según la Resolución Presidencial del 28 de noviembre de 1994, se ha delimitado en los 131 municipios que abarcan los siguientes Distritos Administrativos (Figura 12): Sola de Vega, Miahuatlán, Yautepec, Tlacolula, Ocotlán, Ejutla y Zimatlán (Palma Cruz *et al.*, 2016).

Hay una estimación de que existen alrededor de 1,000 productores de mezcal en los distritos de Ejutla, Ocotlán, Tlacolula, Miahuatlán, Zimatlán, Sola de Vega, Yautepec, Sierra Norte y Mixteca; que cuentan con diferentes métodos de producción. La mayor parte elabora mezcal de manera artesanal, ya sea con destilación en alambiques de cobre u ollas de barro. Para el caso del mezcal elaborado por métodos tecnificados (industrial), existen tres plantas industriales, que, en orden de importancia, son: Casa Armando Guillermo Prieto, Benevá y Fandango (Palma Cruz *et al.* 2016).

En Oaxaca la cantidad de magueyes es amplia por tipo de nombre de acuerdo Palma Cruz *et al.* (2016), cabe resaltar que el espadín azul y el llamado tequila weber que se utiliza para la elaboración del tequila, está por debajo del Agave espadín, predominando en las plantaciones de la región del mezcal de Oaxaca.

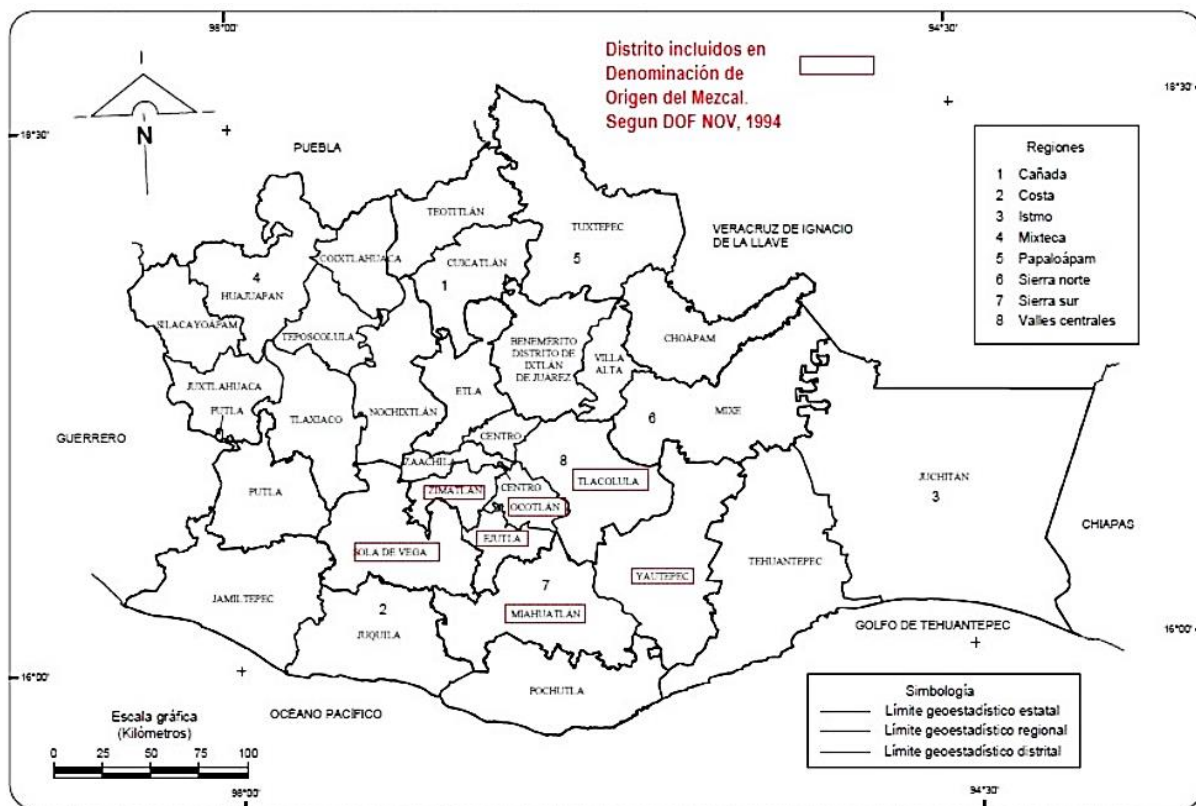


Figura 12. División geoestadística de Oaxaca, con Denominación de Origen del Mezcal.

3.8 PRODUCCIÓN DEL MEZCAL A PARTIR DE PIÑAS DE AGAVE

Como se mencionó en apartados anteriores el mezcal es una bebida alcohólica mexicana obtenida de la destilación de los jugos fermentados por levaduras y bacterias espontáneas o cultivadas a partir de consorcios extraídos de cabezas maduras de maguey previamente procesadas en tierras mexicanas.

Como podemos recordar, en el tema del mezcal se pueden producir dos tipos de mezcal, Palma Cruz *et al.* (2016), los define a continuación:

- Mezcal Artesanal.** Para este caso la bebida se obtiene mediante cuatro etapas utilizando equipo rudimentario como un horno de piedra para cocer el

maguey con leña, un molino de piedra con tahona para moler el agave cocido, tinajas de madera o cuero de animal para fermentar los jugos y destilación del mosto en alambiques de cobre u ollas de barro. En esta producción el trabajo se realiza con trabajo predominantemente familiar en pequeñas unidades productivas llamadas palenques.

- II. **Mezcal Industrial.** En este caso el mezcal se obtiene con maquinaria e infraestructura tecnificada como es una autoclave que cuece a vapor el maguey, molino de rodillos con desgarradoras para moler la materia prima, inoculación artificial de microorganismos fermentadores y destiladores con controles de temperatura para obtener el alcohol.

En este trabajo, se estudiará más a fondo los microorganismos que participan en el proceso de producción de mezcal artesanal, por lo que hablaremos más a detalle en los siguientes apartados.

3.9 IMPORTANCIA DE ANALIZAR LA MICROBIOTA QUE PARTICIPA EN LA PRODUCCION DE MEZCAL ARTESANAL

El termino microbiota, hace referencia a todos aquellos microorganismos que participan en los procesos de transformación de las materias primas, en este caso del Agave, para la producción de diferentes bebidas destiladas y no destiladas artesanalmente, este tipo de estudios o investigaciones son de gran importancia para poder saber y comprender más sobre cada una de las propiedades y fenómenos que rodean su aprovechamiento.

De acuerdo con Moreno Terrazas, la microbiota evoluciona en función del grado de fermentación, en el que las bacterias lácticas disminuyen el pH y acidifican el producto para dar paso a las levaduras, que son las encargadas de producir el alcohol. Las levaduras incrementan su presencia en este proceso y, a medida que hay una mayor producción de alcohol, las bacterias lácticas disminuyen, por lo que el producto final puede dañarse si el proceso de fermentación se deja por más tiempo del debido (Porcayo, 2016).

A través de investigaciones realizadas por López Sánchez *et al.* (2020); Espinoza Martínez *et al.* (2020); Jiménez Pacheco *et al.* (2021); entre otros, se ha logrado demostrar que existe una gran cantidad de microorganismos presentes a lo largo de la fermentación de forma espontánea en productos como el mezcal en el estado de Oaxaca. Y esto ha originado el mejoramiento de identificación y taxonomía de los diferentes microorganismos que se presentan en Agaves.

Con el estudio de la microbiota se pretende conocer no solo de ella, sino que se busca aprender a controlarla para tener otros usos, como, por ejemplo, aprender como poseer el conocimiento necesario para manejarlos en su lugar de producción, así como aprender a conservarlos en laboratorio con el objetivo de tener reservas a manera de banco de especies que intervienen en los procesos de fermentación de las bebidas.

Al principio podemos encontrar bacterias lácticas, las cuales acidifican el producto. Una vez que cambian las condiciones de acidez de la bebida, las levaduras, que son la responsables de producir alcohol, son las que incrementan su presencia, por lo que a medida que aumenta el grado de alcohol, las bacterias lácticas disminuyen, por lo que si se deja la fermentación más tiempo, pueden surgir otros microorganismos que deterioren o alteren la calidad del producto final (Ministerio de Industria, Energía y Turismo, dentro del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011., 2010).

Durante la etapa de fermentación se desarrollan microorganismos como hongos (levaduras) y bacterias que se alimentan del azúcar del maguey, transformándola en alcohol (en este proceso una molécula de azúcar se desdobra en dos de alcohol). La degradación de sustancias orgánicas por enzimas microbianas, acompañada frecuentemente de desprendimiento de gases (CIATEJ, 2014).

Como podemos comprender el etanol no es el único producto que se origina de la fermentación, también se forma una serie de sustancias que contribuyen al sabor y olor del mezcal denominados “compuestos aromáticos volátiles”, que se producen en diferentes momentos de la fermentación por lo que el tiempo puede afectar tanto

la cantidad como la variedad de estos compuestos. Se debe de evitar finalmente que haya una contaminación demasiado pronunciada por bacterias, ya que esto puede afectar seriamente las características organolépticas del mezcal (CIATEJ, 2014).

En este trabajo nos centraremos principalmente en las bacterias que participan en el proceso de producción de mezcal artesanal con *Agave angustifolia* Haw en el estado de Oaxaca con dos puntos estratégicos de interés (dos palenques). Es por ello que tenemos que adentrarnos más a fondo en qué tipo de bacterias están presentes en el transcurso de esta etapa (fermentación), y principalmente nos enfocaremos en las bacterias ácido láctico y bacterias ácido acético.

3.10 BACTERIAS EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL MEZCAL

En el proceso de producción de mezcal, la etapa de fermentación es importante para obtener esta bebida alcohólica, esta fermentación se lleva a cabo con bagazo y se caracteriza por la presencia de bacterias. De acuerdo con el CIATEJ (2014), las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria, las bacterias integran el reino procariota (M. Mota, s/f) y miden pocos micrómetros y son mas pequeñas que las levaduras. Estas bacterias presentan diversas formas (Figura 13) como esferas (cocos), barras, filamentos y son los organismos más abundantes del planeta.

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral) (M. Mota, s/f).

De acuerdo con M. Mota (s/f), las bacterias pueden mantenerse unidas unas con otras después de la división celular, pero conservando siempre la independencia celular. Si el plano de división es único, podemos encontrar diplococos o cocos en cadena (microorganismos del género *Streptococcus*). Si los planos de división son muchos, los cocos pueden agruparse en tétradas o en racimos (*Staphylococcus*). Los bacilos pueden ser muy cortos (cocobacilos) o muy largos. Sus extremos

pueden ser redondeados o rectos; pueden estar aislados, en cadenas, en filamentos o formando letras chinas (Corynebacterium). Los bacilos curvos pueden tener forma de coma (Vibrio cholerae).

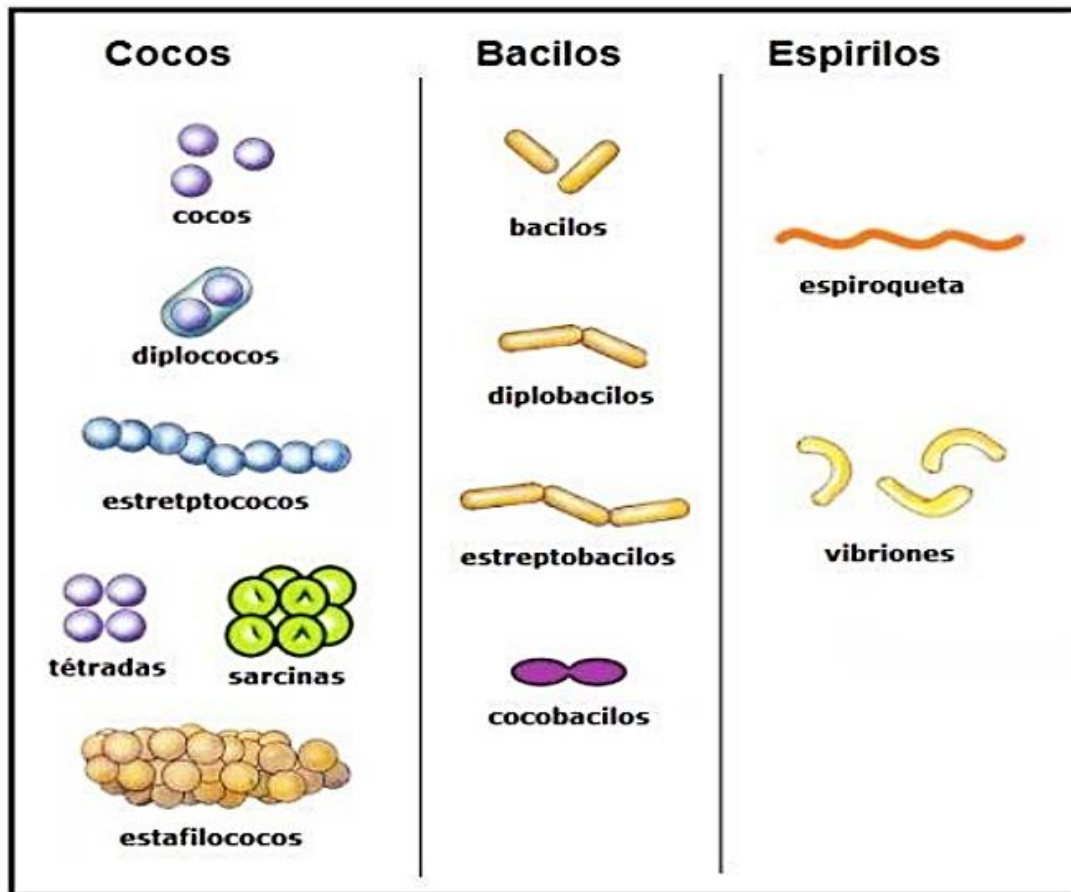


Figura 13. Morfología de las Bacterias

Las bacterias pertenecen a diferentes familias, y en el mezcal es importante mencionar dos grupos de gran importancia: las bacterias lácticas y las bacterias acéticas.

3.11 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias Ácido Lácticas (BAL) son microorganismos que tienen diversas aplicaciones, una de las principales es la fermentación de alimentos, como la leche, carne y vegetales, para poder obtener productos como el yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, ensilados, etc. Así mismo, las BAL son de gran utilidad en los procesos de producción de bebidas alcohólicas (Ramírez Ramírez, Rosas Ulloa, Velázquez Gonzáles, Armando Ulloa, & Arce Romero, S.f.).

3.11.1 ¿Qué son las Bacterias Ácido Lácticas?

Según Ramírez Ramírez *et al.* (S.f.), las BAL son un grupo de microorganismos representados por varios generos con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en comun. En general las BAL son cocos, cocobacilos y bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaerobios, microaerófilos o aerotolerantes; presentan oxidasa, catalasa y benzidina negativas y carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Ramírez Ramírez *et al.* (S.f.) también menciona que las BAL, son ácido tolerantes, lo que hace que se puedan desarrollar en condiciones con pH bajos (3.2) y en pH altos (9.6) y la mayoría de estos microorganismos crecen en excelentes condiciones a un pH entre 4 y 4.5, permitiéndole vivir a este tipo de bacterias naturalmente en medios donde otras bacterias no soportarían la actividad ácida orgánica.

No obstante, estas características están sometidas a discusión, debido a una serie de factores, entre los que cabe enfatizar la excesiva especialización de los medios de cultivo (Santos, 1993). Aunque las BAL son de catalasa negativa, se conoce que muchas cepas de los géneros *Pediococcus* y *Lactobacillus* producen una “pseudocatalasa” que descompone el peróxido de hidrógeno (Santos, 1993). Whittenbury (1964), argumentó que esta reacción depende de dos catalasas distintas: 1) una pseudocatalasa, estable al cianuro y a la azida de sodio y 2) la catalasa clásica, sensible a estas dos sustancias y que solamente se produce si el medio contiene hemo como grupo prostético. En la práctica, algunas bacterias lácticas han tenido la capacidad de sintetizar la apocatalasa pero no su grupo prostético (Ingram, 1975); (Santos, 1993). Dentro del análisis, Hastings y Holzapfel (1987), lograron observar la presencia de una pseudocatalasa en 100 cepas de *Lactobacillus sake*, aisladas de una muestra de carne radurizada.

3.11.2 Clasificación de las Bacterias Ácido Lácticas

Las BAL se clasifican en diferentes géneros, y esta clasificación se basa principalmente al principio de su morfología, modo de fermentación de la glucosa, como homofermentativa o heterofermentativa, el crecimiento a diferentes

condiciones, como la temperatura, la configuración de ácido láctico producido y la tolerancia acida o alcalina que pueden soportar. Sin embargo, las BAL se han dividido en dos grandes grupos, de acuerdo con los productos finales de la fermentación de la glucosa. Santos (1993) describió que las especies que producían fundamentalmente ácido láctico se denominaron homofermentativas, mientras que las que producían una mezcla de productos finales (lactato, acetato, etanol, CO₂) se consideraron heterofermentativas. La configuración de los estereoisómeros del ácido láctico (D, L o DL) producido durante la fermentación del carbohidrato, también puede ser utilizada en la clasificación de algunas Bacterias Lácticas (Tabla 2) (Santos, 1993).

Ramírez Ramírez *et al.* (S.f.), menciona a continuación algunos géneros de BAL que podemos encontrar en la naturaleza, por mencionar algunos:

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| ○ <i>Aerococcus</i> | ○ <i>Lactosphaera</i> |
| ○ <i>Alloinococcus</i> | ○ <i>Leuconostoc</i> |
| ○ <i>Carnobacterium</i> | ○ <i>Oenococcus</i> |
| ○ <i>Dolosigranulum</i> | ○ <i>Pediococcus</i> |
| ○ <i>Enterococcus</i> | ○ <i>Streptococcus</i> |
| ○ <i>Globicatella</i> | ○ <i>Tetragenococcus</i> |
| ○ <i>Lactobacillus</i> | ○ <i>Vagococcus</i> |
| ○ <i>Lactococcus</i> | ○ <i>Weisella</i> |

Como bien sabemos las BAL pueden dividirse en subgrupos, esto de acuerdo a dos características fundamentales como son sus productos finales del metabolismo de fermentación y su temperatura optima de crecimiento, de este modo se llegan a nombrar las BAL Homofermentativas obligadas, las cuales carecen de las dos deshidrogenasas pero poseen aldolasa, Homofermentativas facultativas, que aunque poseen las dos deshidrogenasas degradan la glucosa preferentemente como los homofermentadores obligados, las cuales comprenden bacterias que generan ácido láctico como principal producto de fermentación, por otro lado, existen aquellas que además de generar ácido láctico, son capaces de generar etanol y anhídrido carbónico, y estas son agregadas al subgrupo de las bacterias heterofermentativas (Fiorelli, 2003).

Cabe destacar que la capacidad de producir grandes cantidades de ácidos orgánicos (como ácido láctico) por fermentación de los carbohidratos presentes en los alimentos y el consecuente descenso del pH son los factores primarios en los que se basa la actividad antimicrobiana de las Bacterias Lácticas. Sin embargo, en los fenómenos de antibiosis de las BAL también llegan a participar activamente otros metabolitos, entre ellos las bacteriocinas (Heredia Castro, Hernández Mendoza, Gonzáles Córdova, & Vallejo Cordoba, 2017); (Fiorelli, 2003).

Tabla 2. Géneros de Bacterias Ácido Lácticas, su tipo de fermentación y productos.

GÉNERO (SUBGÉNERO)	TIPO DE FERMENTACIÓN	PRODUCTO FINAL MAYORITARIO	CONFIGURACIÓN DEL LACTATO
<i>Lactococcus</i>	Homofermentativa	Lactato	L(+)
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativa	Lactato: acetato: CO ₂	D(-)
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativa	Lactato	DL, L(+)
<i>Streptococcus</i>	Homofermentativa	Lactato	L(+)
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentativa	Lactato	
<i>Thermobacterium</i>	Homofermentativa	Lactato	D(-),L(+),DL
<i>Streptobacterium</i>	Homofermentativa	Lactato	D(-),L(+),DL
<i>Streptobacterium*</i>	Heterofermentativa	Lactato: acetato (1:1)	D(-),L(+),DL
<i>Betabacterium</i>	Heterofermentativa	Lactato: acetato: CO ₂	DL
<i>Bifidobacterium</i>	Heterofermentativa	Lactato: acetato: CO ₂	L(+)
<i>Carnobacterium</i>	Heterofermentativa		
* EN CASO DE QUE UTILICE PENTOSAS			

(Kandler, 1983)

Las Bacterias Lácticas también se clasifican según la temperatura ideal de crecimiento en: mesófilas y termófilas. Pese a esto, la mayoría de las BAL son mesofílicas, aunque algunas son capaces de crecer en temperaturas de 5°C y otras en 45°C, aunque existe evidencia de que hay subgéneros de *Lactobacillus* y *Pediococcus* que llegan a desarrollarse en buenas condiciones a 50°C (Solórzano, 2008).

3.11.3 Fermentación Láctica

Las BAL hoy en día gozan de gran importancia económica, ya sea de forma natural o añadida, desempeñan un papel sumamente importante en la fermentación de una gran variedad de alimentos. En ellos sus actividades metabólicas no solo aportan al desarrollo de características organolépticas y reológicas deseables, además permiten conservar o aumentar el valor nutritivo añadido y la salubridad de la materia prima (Fiorelli, 2003).

La fermentación láctica es un proceso celular anaeróbico donde se utiliza glucosa para obtener energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico. Este proceso lo realizan muchas bacterias en especial las llamadas bacterias lácticas, sabemos que en condiciones de ausencia de oxígeno (anaerobias), la fermentación responde a la necesidad de la célula de generar la molécula de NAD^+ , que ha sido consumida en el proceso energético de la glucólisis. Olivares (2011), dice que en la glucólisis la célula transforma y oxida la glucosa en un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido pirúvico, obteniendo dos moléculas de ATP; sin embargo, en este proceso se emplean dos moléculas de NAD^+ que actúan como aceptores de electrones y se reducen a NADH.

Para que puedan tener lugar las reacciones de las glucólisis productoras de energía es necesario reoxidar el NADH; esto se consigue mediante la cesión de dos electrones del NADH al ácido pirúvico, que se reduce a ácido láctico (Olivares, 2011).

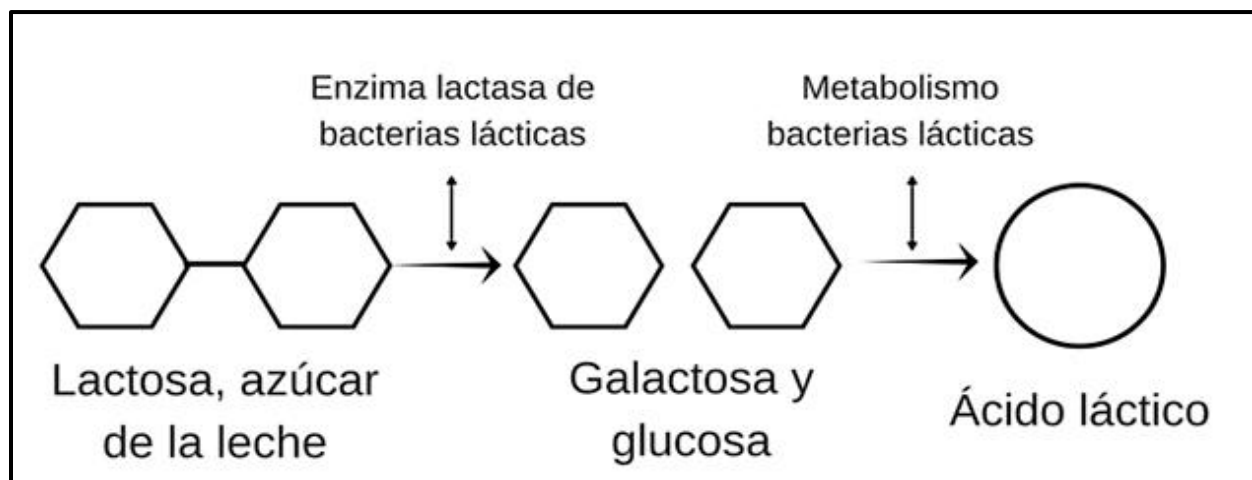
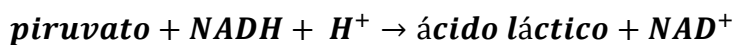


Figura 14. Síntesis de la fermentación láctica.



Un ejemplo de este tipo de fermentación es la acidificación de la leche. Donde intervienen bacterias como, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, que al desarrollarse en la leche utilizan la lactosa como fuente de carbono, y esta al fermentar produce energía que es aprovechada por las bacterias y el ácido láctico es eliminado, Figura 14. Cabe mencionar que los factores más importantes que debemos controlar en la fermentación ácido láctica es la temperatura, la concentración de sal común, y la exclusión de aire ya que estos influyen en el curso de la fermentación.

3.11.4 Características de los diversos géneros de BAL

En la actualidad, diversos estudios científicos han logrado identificar y caracterizar los diferentes géneros de Bacterias Lácticas que se pueden llegar a encontrar en alimentos; a continuación, se describirán algunos géneros de BAL que participan y podemos llegar a encontrar en el proceso de producción de mezcal artesanal.

➤ Género *Lactobacillus*

Son bacterias Gram (+), con catalasa (-), logran tener forma de bastones aislados o en cadenas, no esporulados anaerobios facultativos o microaerófilos, incapaces de reducir los NO_3 y de hidrolizar la gelatina. Son homofermentativos con producción de 85% de ácido láctico a partir de glucosa, los heterofermentativos producen ácido láctico, ácido acético y CO_2 . El género *Lactobacillus* se subdivide en tres grupos (Fiorelli, 2003), los cuales son:

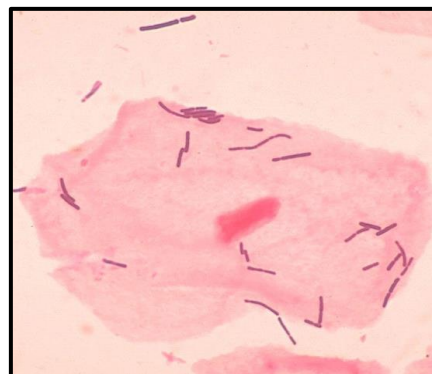


Figura 15. Observación microscópica del género *Lactobacillus* spp.

- Grupo I:** *Lactobacillus* homofermentativos estrictos. En los cuales entran: *L. delbrueckii lactis*, *L. delbrueckii bulgaricus*, *L. helvéticos*, entre otros.
- Grupo II:** *Lactobacillus* heterofermentativos facultativas. En este grupo podemos encontrar *L. plantarum* y los *L. casei*.
- Grupo III:** *Lactobacillus* heterofermentativos estrictos. 0

➤ **Género *Leuconostoc***

Tienen un metabolismo heterofermentativo, son capaces de producir CO₂, etanol y ácido láctico. La disposición celular es en pares o en cadenas. Los cocos son alargados y se confunden con bacilos cortos que se pueden diferenciar por pruebas fisiológicas, análisis de isómeros y por hibridación (Fiorelli, 2003).

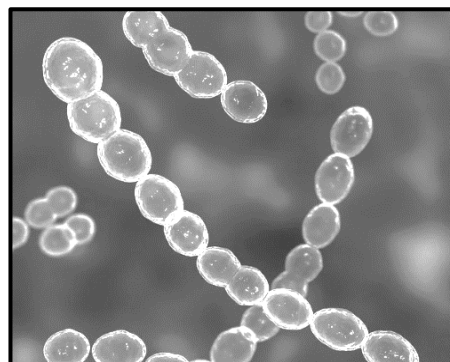


Figura 16. Bacteria Láctica del género *Leuconostoc*.

➤ **Género *Pediococcus***

El género *Pediococcus* comprende microorganismos pertenecientes al grupo de los cocos Gram-positivos con catalasa negativa. Se trata de bacterias esféricas cuya división tiene lugar en dos planos en ángulos rectos con lo que se forman tétradas, si bien no siempre sucede así, observándose solamente parejas de células. Es rara la existencia de células aisladas y no forman cadenas ni esporas. La temperatura óptima de crecimiento es entre 25 a 40 °C (Fiorelli, 2003) aunque en este género existen subgéneros que llegan a tolerar hasta 70°C sobre todo si son recién aisladas.

Las características fisiológicas y bioquímicas de las diferentes especies del género *Pediococcus* se muestran en la **Tabla 3**. Estas características pueden ser utilizadas para para la identificación y separación inicial entre estas los demás géneros.

➤ **Género *Streptococcus***

Son bacterias que encontramos en forma de cocos, Gram (+), con catalasa (-), no esporulados y principalmente metabolismo homofermentativo. Algunos llegan a producir ácido láctico como por ejemplo *Streptococcus thermophilus* que podemos encontrarlo en cadenas largas, podemos encontrar en este género *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, entre otros (Fiorelli, 2003).

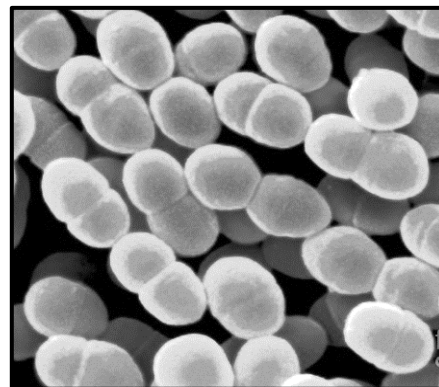


Figura 17. Ejemplar Bacteria *Lactococcus* spp.

TIPIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE MEZCAL ARTESANAL
CON *Agave angustifolia* Haw.

Tabla 3. Caracterización fisiológica y bioquímica de especies del género *Pediococcus*.

Especies de <i>Pediococcus</i>								
Características	P.d	P.p	P.i	P.de	P.pe	P.a	P.h	P.u
Crecimiento a:								
35 °C	-	+	+	+	+	+	+	+
40 °C	-	-	-	+	+	+	+	+
45 °C	-	-	-	-	d	+	-	-
50 °C	-	-	-	-	-	+	-	-
pH 4.2	+	+	-	-	+	+	-	-
pH 7.5	-	d	+	+	+	+	+	+
pH 8.5	-	-	-	-	d	d	+	+
4% NaCl	-	+	+	+	+	+	+	+
6.5% NaCl	-	+	d	-	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	d	-	+	-
18% NaCl	-	-	-	-	-	-	+	-
Catalasa	-	-	ND	-	+	+	-	-
Hidrólisis de Arginina	-	-	-	-	+	+	-	-
Fermentación de:								
Arabinosa	-	-	-	-	+	d	+	d
Ribosa	-	-	-	-	+	+	+	ND
Xilosa	-	-	-	-	d	+	-	d
Ramnosa	-	-	-	-	d	d	-	ND
Lactosa	-	-	+	d	d	d	-	d
Maltosa	d	+	+	+	+	-	+	+
Melizitosa	d	-	-	-	-	-	+	-
Trehalosa	+	d	+	-	+	d	+	+
Glicerol	-	-	-	-	-	-	+	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	d
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Metilglucosido	d	d	d	+	-	-	+	ND

Pd= *P. damnosus*, Pp=*P. parvulus*, Pi=*P. inopinatus*, Pde= *E. dextrinicus*, Ppe=*P. pentosaceus*, Pa=*P. acidilactici*, Ph=*P. halophilus*, Pu=*P. urinaeequi*, ND= No Detectable y d=débil].

(Santos, 1993)

3.12 BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS

La actividad de las bacterias acéticas se conoce desde hace siglos por la producción de vinagre, la acetificación de bebidas alcohólicas y el deterioro de los frutos. Las acrobacterias son un grupo de microorganismos gram negativos que se desarrollan en distintas plantas (Fuentes R., y otros, 2003). De acuerdo con Gerard (2015), las bacterias ácido acéticas o BAA pertenecen a la familia Acetobacteriaceae; por lo tanto las bacterias acéticas son un grupo de microorganismos presentes de forma natural en el mosto y pueden causar problemas durante la elaboración y envejecimiento de cualquier bebida alcohólica (Hernández & Barbero, 2008). Hernández & Barbero (2008), menciona que las BAA utilizan el glicerol como fuente de carbono, generando principalmente dihidroxiacetona, sin embargo Blanco de la Cruz, (2016), menciona que Bacterias del ácido acético muestran una oxidación eficiente de una amplia variedad de sustratos mediante enzimas deshidrogenasas y oxiredutasas. Estas enzimas se encuentran en la membrana celular realizando sus actividades en el espacio periplásmico con el centro activo hacia el exterior. De ahí que los metabolitos producidos por la oxidación parcial de los sustratos como azúcares y alcoholes utilizados en la fermentación son excretados hacia el exterior de la célula quedando disueltos en el medio transformados en productos como aldehídos y cetonas (Blanco de la Cruz, 2016).

3.12.1 Taxonomía de las BAA

En la antigüedad, las BAA se conocían como “bacterias del vinagre”, esto debido a que los primeros estudios realizados fueron en base a vinagres, posteriormente en base a vinos y finalmente a base de cerbezas o bebidas fermentadas (Pérez, 2010). De acuerdo con Pérez (2010), la primer clasificación de este grupo de bacterias se atribuye a Peerson en 1822, sin embargo fue Luis Pasteur quien publicó en 1868 el primer estudio en donde habla sobre los microorganismos que llevan a cabo la fermentación acética.

Actualmente según Pérez (2010), la taxonomía se a construido en base a los criterios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, Asai (1935) clasificó las BAA en dos géneros (*Acetobacter* y *Gluconobacter*). Fue ahí, donde la clasificacion aumento, generando especies de cada género de bacterias. Hoy en día se han asentado y reorganizado varios

géneros y especies de BAA, algunas de mayor interés para este trabajo, se muestran en la **Tabla 4**, de acuerdo con Pérez, (2010).

3.12.2 Características de las bacterias acéticas y su clasificación

Según Jorgensen (1959), las bacterias ácido acéticas son llamadas así por la producción de ácido acético, las cuales se encuentran en la naturaleza jugando un papel muy importante en el ciclo del carbono. Condición que permite hablar con frecuencia de ellas como infecciones en líquidos que contienen azúcar o son ligeramente alcohólicos (Bernal Martínez & Cortés Páez, 2011).

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* (Hernández & Barbero, 2008). Al microscopio, las bacterias acéticas son gram negativas como se mencionó anteriormente, las BAA son de entre 0.4 y 4.5 μm de anchas, con forma elipsoidal y pueden presentarse de manera individual, en parejas o

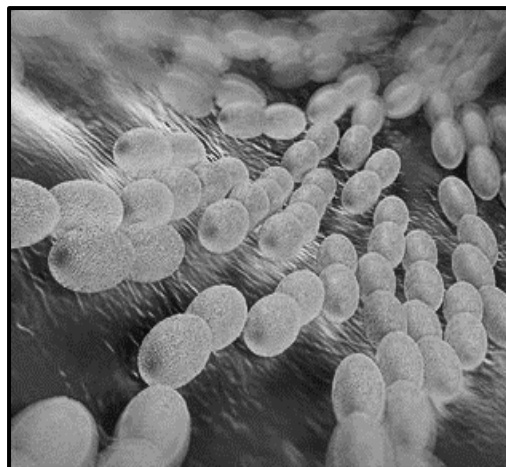


Figura 18. Ejemplar de Bacteria ácida acética.

cadena. Presentan flagelos de forma peritrica o polar, y no pueden formar endosporas como estructura de supervivencia (Hernández & Barbero, 2008).

De acuerdo con Hernández & Barbero (2008), estos microorganismos necesitan del oxígeno como aceptor final de electrones, por lo que tienen un metabolismo aerobio obligado. Generalmente las BAA son de catalasa (+), oxidasa (-) y pueden utilizar el etanol como fuente de carbono, el pH ideal de crecimiento de estos microorganismos ronda entre 5 y 6.5, incluso pueden llegar a crecer en pH cercano a 3.

La temperatura óptima de crecimiento es de entre 25 y 30 °C, aunque también hay registro de supervivencia a temperaturas más altas, como por ejemplo entre 38 a 40 °C y otras BAA en temperaturas bajo de 10°C (Gerard, 2015).

TIPIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE MEZCAL ARTESANAL
CON *Agave angustifolia* Haw.

Tabla 4. Géneros y especies de BAA de mayor interés en alimentos y fuentes donde fueron aisladas por primera vez.

GÉNEROS Y ESPECIES	FUENTE	REFERENCIA
ACETOBACTER (A.)		
<i>A. aceti</i>	Vinagre	(Pasteur, 1864) Beijerinck (1898)
<i>A. cerevisiae</i>	Cerveza	Cleenwerck et al. (2002)
<i>A. cibernongensis</i>	Guanábana	Lisdiyanti et al. (2001)
<i>A. estunensis</i>	Sidra	(Carr 1958); Lisdiyanti et al. (2000)
<i>A. fabarum</i>	Grano de cacao	Cleenwerck et al. (2008)
<i>A. ghanensis</i>	Grano de cacao	Cleenwerck et al. (2008)
<i>A. indonesiensis</i>	Frutas y flores de guanábana	Lisdiyanti et al. (2000)
<i>A. malorum</i>	Manzana	Cleenwerck et al. (2008)
<i>A. nitrogenifigens</i>	Té de Kombucha	Dutta and Gachhui et al. (2006)
<i>A. oeni</i>	Vino	Silva et al. (2006)
<i>A. orleanensis</i>	Cerveza	(Henneberg 1906); Lisdiyanti et al. (2000)
<i>A. pasteurianus</i>	Cerveza	(Hansen 1879); Beijerinck y Folpmers (1916)
<i>A. pomorum</i>	Vinagre industrial (de sidra)	Sokollek et al. (1998a)
<i>A. senegalensis</i>	Fruta de mango	Ndoye et al. (2007)
<i>A. sysygi</i>	Zumo de manzana orgánico	Lisdiyanti et al. (2000)
<i>A. tropicalis</i>	Coco	Lisdiyanti et al. (2000)
ACIDOMONAS (Ac.)		
<i>Ac. methanolica</i>	Fermentación de levaduras	(Uhlí et al., 1986) Urakami (1989 corregido)
GLUCONOBACTER (G.)		
<i>G. cerinus</i>	Cereza	Katsura et al. (2002)
<i>G. frateurii</i>	Fresa	Mason and Claus (1989)
<i>G. oxydans</i>	Cerveza	Mason and Claus (1989)
<i>G. sphaericus</i>	Uva fresca	Malimas et al. (2008b)
GLUCONACETOBACTER (Ga.)		
<i>Ga. diazotrophicus</i>	Caña de azúcar	(Gillis et al., 1989); Yamada et al. (1997)
<i>Ga. entanii</i>	Vinagre industrial (acidez alta)	Schüller et al. (2000)
<i>Ga. europaeus</i>	Vinagre industrial (acidez alta)	(Sievers et al., 1992); Yamada et al. (1997)
<i>Ga. hansenii</i>	Vinagre	(Gosselé et al., 1983); Yamada et al. (1997 corregido); Lisdiyanti et al. (2006)
<i>Ga. oboediens</i>	Vinagre de vino industrial	(Sokollek et al., 1998a); Yamada (2000)
<i>Ga. sacchari</i>	Caña de azúcar	Franke et al. (1999)

(Pérez, 2010)

3.12.3 Metabolismo de las Bacterias Ácido Acéticas

Pérez (2010) describe el metabolismo de las BA con un metabolismo estrictamente aerobio, por lo que para su desarrollo necesitan disponer de oxígeno molecular, que actúa como aceptor terminal de electrones. No obstante, también menciona que han existido condiciones muy cercanas a las anaerobias en donde se han demostrado que son capaces de sobrevivir, esto debido a la posibilidad de utilizar quinonas, como aceptores terminales de electrones, en lugar del oxígeno.

3.12.4 Metabolismo del Etanol

La oxidación del etanol a ácido acético es la característica más conocida de estas bacterias ácidos acéticas, este proceso bioquímico consta de dos etapas: en la primera el etanol es transformado en acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y posteriormente, el acetaldehído se transforma en ácido acético por la enzima acetaldehído deshidrogenasa (ALDH). Ambas enzimas están ubicadas en la membrana citoplasmática, con el centro activo hacia el exterior, por lo que su actividad se presenta principalmente en el espacio periplasmático y no en el interior de la célula (Gerard, 2015).

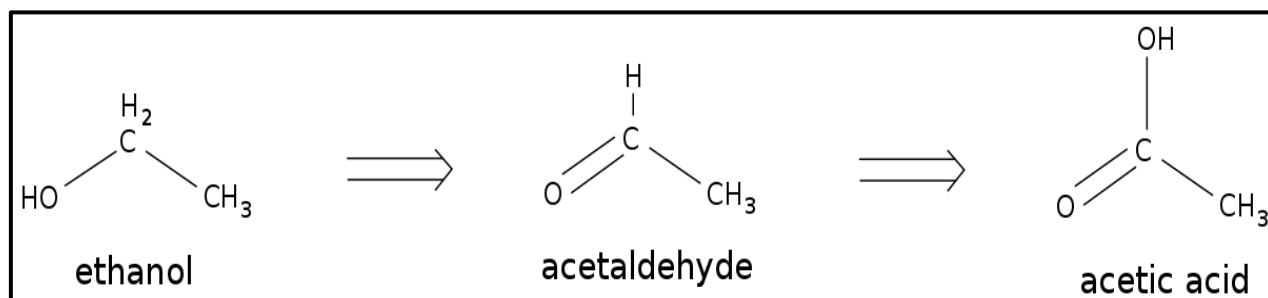


Figura 19. Síntesis del proceso bioquímico para la producción de ácido acético.

3.12.5 Metabolismo del Glicerol

La oxidación del glicerol, es un proceso innovador para la bioconversión de sustratos en derivados químicos mediante la aplicación de microorganismos del género perteneciente a las Acetobacterias. Dentro de la obtención de productos se pueden mencionar el ácido glicérico y la dihidroxiacetona que son producidos por las bacterias bajo condiciones aerobias (Figura 20), y hasta ahora sólo se han determinado cepas como *Gluconobacter*

sp., *Acetobacter* sp., y *Gluconacetobacter* sp. las cuales han demostrado tener la capacidad de oxidar el glicerol para producir estos derivados (Blanco de la Cruz, 2016).

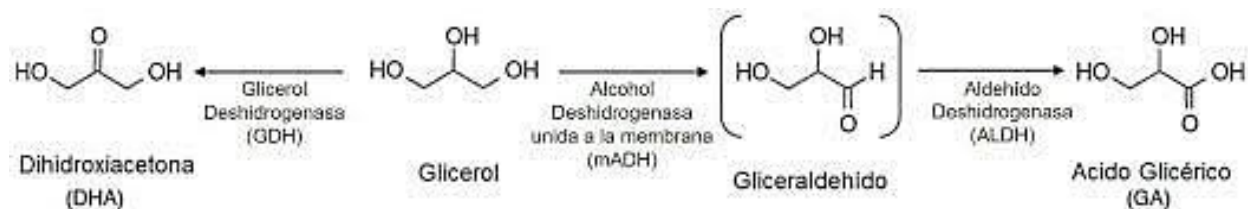


Figura 20. Proceso de oxidación del glicerol.

3.12.6 Metabolismo de los Azúcares

Las BAA pueden utilizar diferentes carbohidratos como fuente de Carbono, siendo la glucosa la más utilizada. La oxidación directa de los azúcares, sin fosforilación e incompleta conduce a las cetosas correspondientes. Las aldosas son oxidadas en ácidos aldónicos; así la glucosa es oxidada a ácido glucónico, reacción catalizada por la glucosa oxidasa (Ribéreau Gayón et al. 2003); (Gerard, 2015). Las fuentes de carbono que son más frecuentes de utilizar con este tipo de microorganismos son: fructuosa, galactosa, arabinosa, manosa, ribosa, xilosa.

3.12.7 Factores que influyen en el crecimiento de BAA

Según Gerard (2015), los factores que pueden influir en la fermentación acética están relacionados con el metabolismo, por ejemplo, el sustrato que va de la concentración de etanol y de ácido acético, de oxígeno y temperatura.

- Temperatura.** Este parámetro es sumamente importante de controlar, de acuerdo a Gerard (2015), el rango de temperatura óptima para el crecimiento de BAA es de entre 25 a 30 °C. Habitualmente en la producción industrial del vinagre se realiza a 30 °C, incrementos de 2 o hasta 3 °C puede causar serios inconvenientes en el proceso. Sin embargo, se han realizado estudios donde han demostrado que BAA son capaces de crecer y producir ácido acético a temperaturas de hasta 40°C.
- Concentración de Etanol.** Gerard (2015), menciona que el etanol presente en el mosto destinado puede causar efectos adversos. Él menciona que a altas concentraciones de etanol puede provocar inhibición en el crecimiento de las BAA y valores superiores a 50 g/L influye negativamente la acetificación. Cabe

mencionar que a bajas concentraciones de etanol también afecta la viabilidad celular.

- c. **Concentración de ácido acético.** Este es otro factor muy importante ya que ocasiona estrés fisiológico en las células. El ácido acético no disociado puede alterar los procesos, disociando el interior de las células originando niveles tóxicos y aumento de acidez en los productos. El efecto de ácido acético sobre el crecimiento de las BAA depende de las concentraciones del sustrato y del producto y de las condiciones de crecimiento (Gerard, 2015).

El medio con glucosa, como por ejemplo GYC, descrito por Carr y Passmore (1975), es tan solo uno de los medios más utilizados para el aislamiento y recuento de BAA, sin embargo, se han desarrollado medios de cultivos para lograr aislar BAA, que pueden ser utilizados incluso como medios de enriquecimiento, por ejemplo, el medio GEY adicionado con CaCO_3 , medio AE el cual contiene ácido acético y etano, medio RAE, medio V50, son tan solo algunos medios utilizados para el aislamiento de BAA procedentes de mostos, vinos y vinagre según Gerard (2015).

La consecuencia más conocida de la actividad de las BA es el picado acético. Este proceso se caracteriza por la oxidación del etanol en ácido acético, lo que puede elevar la acidez volátil. La velocidad de este proceso se determina por la especie, la cantidad de BA presentes y por las características del fermento. En las BA, esta ruta metabólica se favorece cuando la concentración de oxígeno es baja. Por último, algunas BA son capaces de liberar en el vino cadenas de polisacáridos, lo que incrementa su viscosidad y dificulta los procesos de clarificación y filtración del mosto (Hernández & Barbero, 2008).

CAPITULO 4. LUGAR DE MUESTREO

La Tesis planteó la tipificación de las bacterias que participan en el proceso de producción de mezcal artesanal con *Agave angustifolia* Haw o conocido también como Maguey Espadín a partir de dos muestras de mosto de la región, las cuales se recolectaron en el mes de marzo - abril del año 2022.

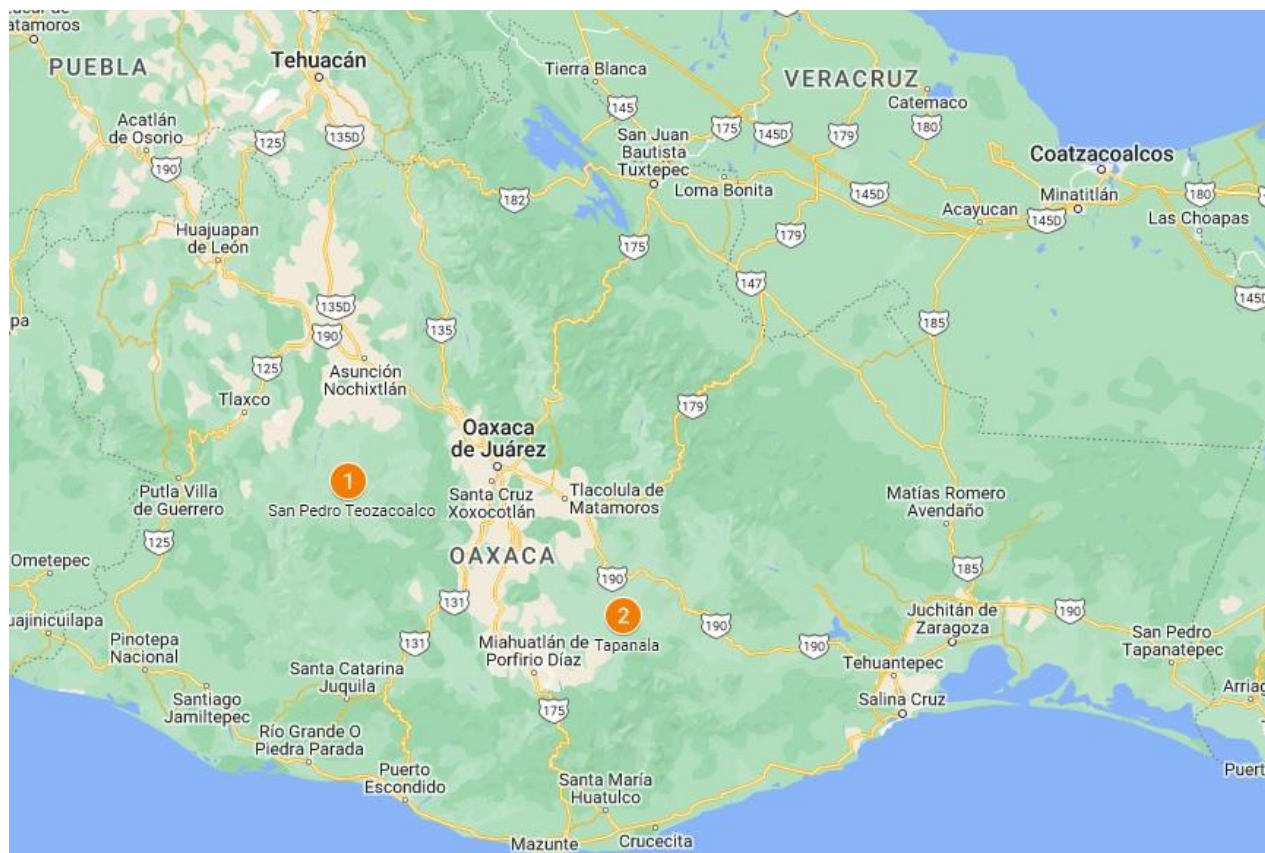


Figura 21. Localización geográfica del lugar del muestreo, Estado de Oaxaca.

Las dos muestras se recolectaron de dos distintos municipios (San Pedro Teozacoalco y San Isidro Tapanala) del estado de Oaxaca y posteriormente transportadas al Laboratorio de Control Ambiental en el Instituto Tecnológico de Oaxaca, de ambas muestras se obtuvo el pH y grados Brix, esto con el fin de tipificar los microorganismos presentes y ver si existe variedad o similitud entre las dos muestras de un mismo tipo de maguey (Espadín). A continuación, se redacta la información geográfica de donde se realizó el muestreo para poder realizar la tipificación con las condiciones características de cada municipio.

4.1 SAN PEDRO TEOZACOALCO

La **muestra 1**, proviene del municipio de San Pedro Teozacoalco, localizado en la región de la Mixteca Alta, con las coordenadas 17°01'N 97°17'O. La localidad se encuentra a una mediana altura de 1586 metros sobre el nivel del mar.

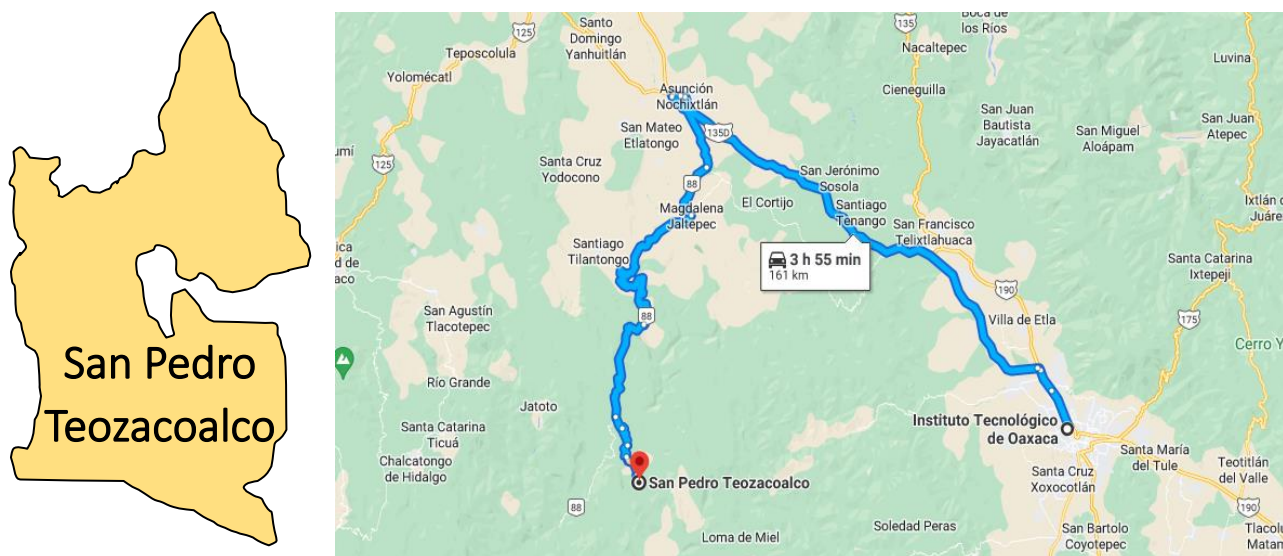


Figura 22. Municipio de San Pedro Teozacoalco, Muestra 1.

La temporada calurosa dura 4.2 meses, del 22 de abril al 29 de agosto, y la temperatura máxima promedio diaria es más de 33 °C. El mes más cálido del año en San Pedro es junio, con una temperatura máxima promedio de 35 °C y mínima de 22 °C. La temporada fresca dura 2.3 meses, del 26 de noviembre al 7 de febrero, y la temperatura máxima promedio diaria es menos de 24 °C. El mes más frío del año en San Pedro es enero, con una temperatura mínima promedio de 8 °C y máxima de 22 °C.

4.2 SAN CARLOS YAUTEPEC, TAPANALA

Esta muestra se identificó como la **muestra 2**, se recolectó en el mes de marzo del 2022, la localidad de Tapanala se localiza en el Municipio San Carlos Yautepec en el Estado de Oaxaca, México y se encuentra en las coordenadas con longitud: -95.725833 y con latitud: 15.965556. La localidad se encuentra a una mediana altura de 40 metros sobre el nivel del mar. Este municipio presenta una temperatura media anual de 27.7 °C y una temperatura promedio anual durante el día es 33.9 °C.



Figura 23. San Carlos Yautepec, Tapanala. Muestra 2.

Esta localidad limita al norte con Magdalena Tequisistlán, Santa María Ecatepec y Santo Domingo Tehuantepec; al sur con el Océano Pacífico y Santiago Astata; al poniente con San Carlos Yautepec, San Miguel del Puerto y Santa María Ecatepec; al oriente con Santo Domingo Tehuantepec.

CAPITULO 5. METODOLOGÍA

La metodología que será aplicada para la Tipificación de bacterias que participan en el proceso de producción de mezcal artesanal con *Agave angustifolia* Haw se basa en los siguientes componentes.

5.1 SIEMBRA Y PURIFICACIÓN

La inoculación de ambas muestras se realizó en medios preparados correspondientes para el crecimiento específico de Bacterias Ácido Acéticas (GYC) y Bacterias Ácido Lácticas (MRS).

5.1.1 Preparación de medios de cultivo

■ BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Se suspendieron 14.2625 g en un matraz Erlenmeyer de 500 ml de Agar MRS, de acuerdo a la fórmula g/L, en 250 ml de agua destilada. Se tapó el matraz con un tapón de algodón y gasa el matraz para evitar su evaporación de acuerdo con la técnica de Briones (2009). Se mezcló y disolvió por calentamiento con agitación frecuente hasta su

ebullición, se dejó hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos siguiendo las indicaciones de la ficha técnica de este medio (Condalab, 2019). Posteriormente se dejó enfriar y se agregaron 0.015 g de nistatina para inhibir el crecimiento de hongos/levaduras y posteriormente se dispensó en cajas Petri y se dejaron solidificar.

■ BACTERIAS ACIDO ACÉTICAS

Asimismo, se suspendieron 21.25 g del Agar GYC en 250 ml de agua destilada (10 cajas), según la fórmula g/L, se tapó el matraz con un tapón de algodón y gasa (Briones, Microbiología Aplicada, 2009), se mezcló y calentó hasta hervir por 1 minuto hasta que los grumos del medio se disuelvan completamente. Es muy importante recalcar que este medio no se esterilizó, solo se dejó enfriar y se agregó asépticamente 17.5 mL de etanol. Finalmente se dispensó el medio en cajas Petri (Condalab, 2019).

5.1.2 Inoculación de microorganismos

Una vez solidos los medios, se procedió a inocular las muestras. Este procedimiento se realizó haciendo diluciones seriadas de 1×10^1 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 con el jugo del mosto fermentado y agua peptonada.

Preparación de Agua peptonada

Se preparó agua peptonada al 1%; en un vaso precipitado se añadieron 100 ml de agua destilada con 1 g de peptona, se disolvió y distribuyeron 9 mL de esta agua en tubos (5 tubos) de ensayo, se esterilizaron en autoclave por 15 min a 121°C.

Dilución de la muestra

Con una micropipeta se tomó 1 ml del jugo de la muestra 1 y se vertió en el primer tubo con agua peptonada, se cerró y se agitó, posteriormente del tubo 1 se toma con una nueva punta 1 ml y se vertió al tubo 2 y así sucesivamente con cada uno de los tubos de ensayo, véase la Figura 24. Para la muestra 2 se realiza el mismo procedimiento.

Una vez obtenidas las diluciones se realizaron las inoculaciones con la metodología de vertido en placa o por extensión de placa (plaqueo) utilizada por Hoben & Somasegaran, (1982), como se muestra en la Figura 25, que consiste en realizar diluciones seriadas

1:10 y extender 100µl de cada dilución en una placa de agar, en este caso para Bacterias Ácido Lácticas se inoculó en medio MRS y para Bacterias Ácido Acéticas en medio GYC.

Para aislar los diversos microorganismos presentes en las muestras fermentadas del

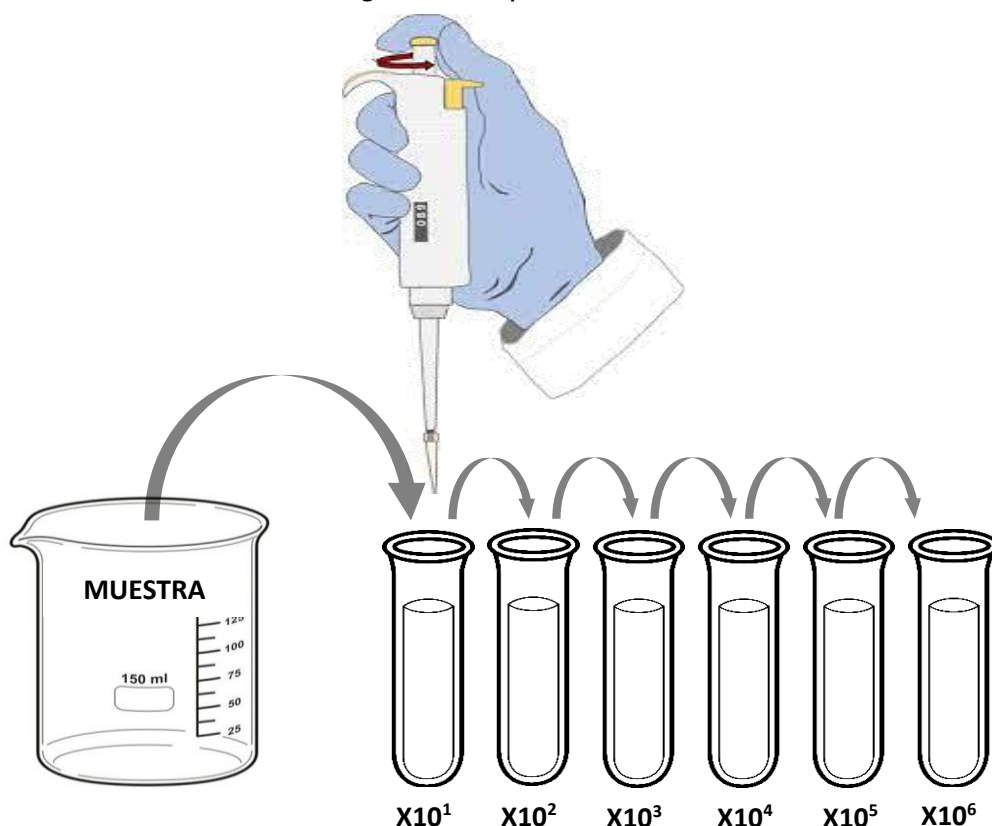


Figura 24. Esquema para la preparación de diluciones.

agave para cada medio, se seleccionaron las diluciones de interés $\times 10^3$, $\times 10^4$, $\times 10^5$, $\times 10^6$.

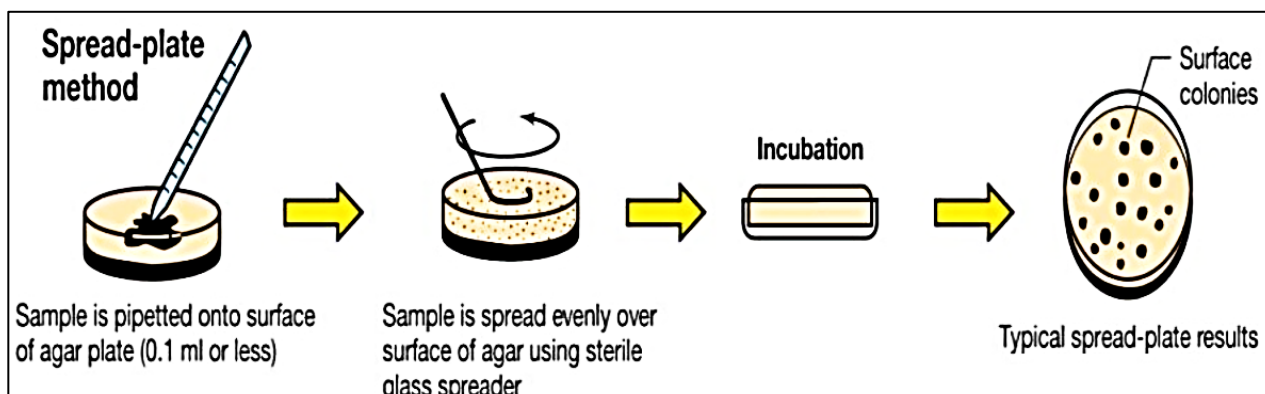


Figura 25. Técnica por extensión de placa.

La incubación se realizó de manera específica según las condiciones ambientales del lugar de recolección de cada una de las muestras. Para el caso de las Bacterias Ácido Lácticas se incubaron las cajas a una temperatura de 28 ± 2 °C durante 42-48 horas y para Bacterias Ácido Acéticas se incubó a 28 ± 2 °C durante 120 horas. Posteriormente se colocaron los medios inoculados 24 horas en un refrigerador para poder conservar a los microorganismos y estos tengan la oportunidad de desarrollarse un poco más.

5.1.3 Conteo de UFC/ml

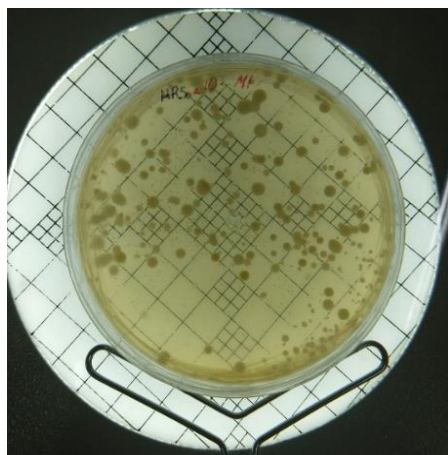


Figura 26. Conteo de colonias.

Finalizado el tiempo de incubación de cada medio, se realizó el conteo de colonias utilizando un equipo cuenta colonias y posteriormente se calculó el UFC de cada caja plaqueada. Se tomó en cuenta únicamente aquellas cajas Petri que tuvieron entre 30 y 300 colonias. Este número de colonias es estadísticamente representativo. Aquellas placas que tuvieron más de 300 colonias se reportan como “INCONTABLES”.

5.2 OBTENCIÓN DE CULTIVO AXÉNICO O PURO A PARTIR DE CULTIVOS MIXTOS

Se realizó una observación visual de todas las cajas Petri, y se seleccionaron las colonias que presenten características visuales distintas unas de otras como el color, bordes, tamaño, elevación, opacidad y consistencia. En la Tabla 3 y 4, se detallan la distribución exacta entre los medios de las colonias seleccionadas para aislar. De la **muestra 1**, se seleccionaron 28 colonias distintas entre los 2 medios; 11 colonias se aislaron y purificaron en medio MRS y 17 se aislaron y purificaron en medio GYC, mientras que, de la **muestra 2**, se seleccionaron 14 colonias, 10 colonias se aislaron y purificaron en medio MRS y 4 colonias fueron aisladas y purificadas en medio GYC, cabe resaltar que 1 colonia de esta muestra se considera una cepa “variable” al no presentar la característica de un halo transparente alrededor de la colonia como lo menciona Gerard, 2015.

Tabla 5. Número de colonias aisladas en cada medio de la muestra 1.

DILUCIÓN MEDIO					TOTAL DE CEPAS AISLADAS
	X10 ³	X10 ⁴	X10 ⁵	X10 ⁶	
	NÚMERO DE COLONIAS A SELECCIONAR				
MRS	8 COLONIAS	3 COLONIAS	2 COLONIAS	0 COLONIAS	11
GYC	6 COLONIAS	5 COLONIAS	3 COLONIAS	0 COLONIAS	17

Tabla 6. Número de colonias aisladas en su respectivo medio de la muestra 2.

DILUCIÓN MEDIO	 X10 ³	 X10 ⁴	 X10 ⁵	 X10 ⁶	TOTAL DE CEPAS AISLADAS
	NÚMERO DE COLONIAS A SELECCIONAR				
MRS	2 COLONIAS	3 COLONIAS	2 COLONIAS	3 COLONIAS	10
GYC	1 COLONIAS	2 COLONIAS	0 COLONIAS	0 COLONIAS	3

La técnica que se empleó para obtener cultivos axénicos o puros de cada una de las cepas a tipificar en placas de agar fue por estría cruzada por agotamiento. Para ello se realizaron los siguientes pasos para poder realizar un agotamiento continuo y progresivo y poder separar las colonias de la cepa de interés, Figura 27.

- ✓ Se esterilizó el asa en la flama del mechero.
- ✓ Se enfrió el asa en un extremo de la placa de agar.
- ✓ Se tomó una pequeña parte de la colonia con el asa esterilizada.
- ✓ Se estrió la superficie del medio con el cuidado de no romper el agar.
- ✓ Se volvió a esterilizar el asa y se dejó enfriar.
- ✓ Se estrió el segundo sector, cruzando tres de las estrías con el primer sector para arrastrar microorganismos.

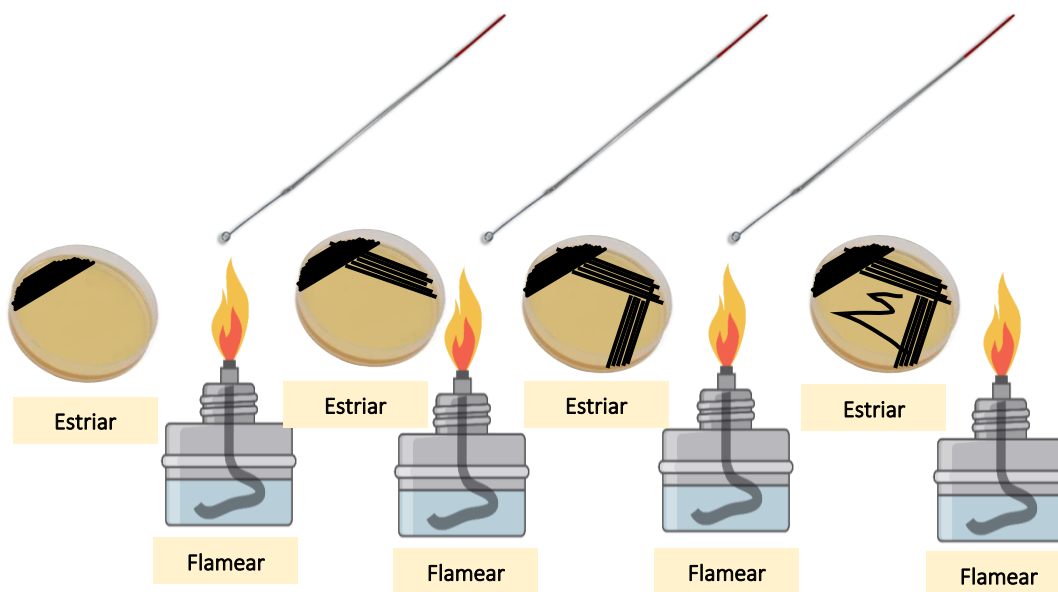


Figura 27. Técnica de estria cruzada por agotamiento para la obtención de cultivos puros.

Las placas de agar estriados se incubaron respetando las mismas condiciones que se mencionan en el apartado de inoculación de microorganismos.

5.3 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

Cumplido el tiempo de incubación, se examinó al microscopio con objetivo de inmersión (100x) depositando una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación teñida. El enfoque fue esencialmente a la tinción Gram para diferenciar entre bacterias gram positivas (BAL) y gram negativas (BAA).

5.3.1 Preparación de las extensiones

Briones, menciona que las extensiones deben ser finas y uniformes para permitir el paso de la luz a través de ellas y facilitar su observación. Para ello se realizaron los siguientes pasos, observe Figura 28:

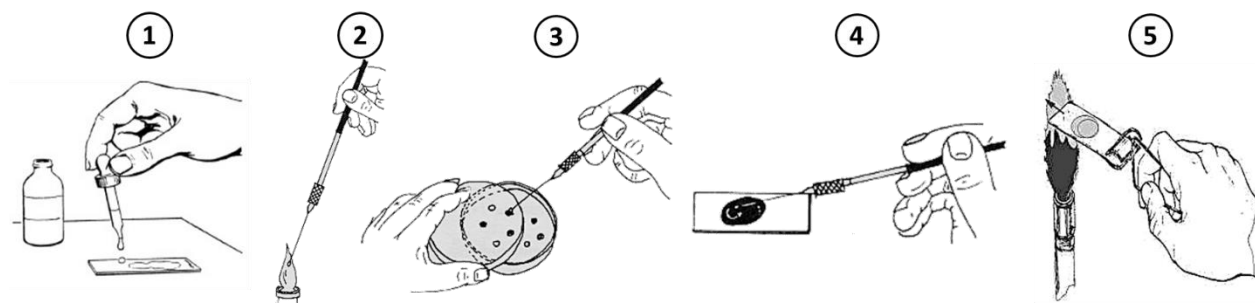


Figura 28. Esquema para la preparación de extensiones.

1. Se colocó una gota de solución salina al 3% en el centro del portaobjetos.
2. Se esterilizó el asa bacteriológica.
3. Con el asa bacteriológica estéril, se tomó una pequeña cantidad de la cepa purificada.
4. Se extendió uniformemente en una superficie aproximada de 1 cm².
5. Se fijó al calor suave, pasando rápidamente el portaobjetos sobre la flama del mechero, sin calentar demasiado.

5.3.2 Tinción diferencial gram

En la tinción diferencial Gram se esperan resultados: gram positivos, células moradas (+) para BAL y gram negativos o células rojas o rosas (-) para BAA. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

- Se cubrió la extensión con cristal violeta y se dejó actuar durante un minuto.
- Se lavó con agua corriente.
- Se cubrió la extensión con solución lugol y se dejó actuar por un minuto.
- Se lavó con agua corriente.
- Se decoloró con alcohol cetona, aproximadamente 15 segundos.
- Se lavó con agua corriente.
- Se cubrió la extensión con safranina y se dejó actuar por 1 minuto.
- Se lavó con agua corriente.
- Se secó la preparación al aire o colocándola entre 2 capas de papel absorbente.
- Se colocó una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y se observó al microscopio con objetivo de inmersión.

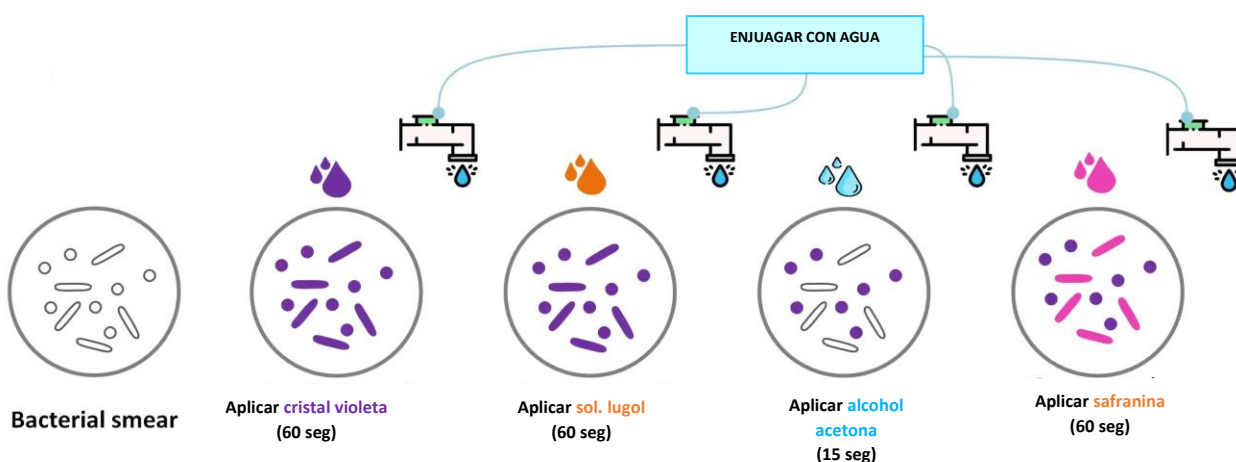


Figura 29. Esquema para realizar tinción Gram.

5.4 CONSERVACION DE CEPAS

Para la conservación de cepas se necesitó hacer la tinción previamente para poder asegurarnos que los microorganismos a conservar sean los microorganismos que buscamos (bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas). Posterior a esto se preparó medio líquido o caldo de acuerdo a los medios en donde se sembró y se purificó cada cepa.

5.4.1 Bacterias ácido lácticas

En el caso de las BAL se conservaron 21 cepas de ambas muestras. Cada cepa fue sembrada en medio líquido MRS (sin agar bacteriológico) de acuerdo a la fórmula g/L. Cada cepa fue inoculada en 50 ml de caldo MRS esterilizado en autoclave a 121° C durante 15 minutos y se añadió nistatina para inhibir el crecimiento de hongos.

5.4.2 BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS

Para las BAA se conservaron **17 cepas** de la **muestra 1** y **3 cepas** de la **muestra 2**, considerando que estas 3 cepas solo 1 es BAA y las otras 2 cepas las consideraremos como “**variables**”. Cada cepa fue sembrada en medio líquido GYC (sin Agar bacteriológico) de acuerdo a la fórmula g/L. Cada cepa fue inoculada en 50 ml de caldo GYC en envases de vidrio limpios. Se dejó enfriar y se añadió nistatina para inhibir el crecimiento de hongos. Los medios líquidos inoculados fueron encubados respectivamente según el tipo de microorganismo (Bacterias Lácticas por 48 Hrs y Bacterias Acéticas 120 Hrs).

Pasado el tiempo de incubación tanto de las BAL como de las BAA, se preparó nuevamente medio líquido para cada cepa inoculada respectivamente. En este caso se prepararon 2 ml por cada cepa más su repetición, por lo que fueron 4 ml por cepa de cada medio (MRS, GYC ambos medios sin Agar bacteriológico). A estos medios líquidos preparados se les agregó respectiva 30% (v/v) de glicerol. Posteriormente los medios previamente inoculados y encubados, se centrifugaron 3 veces en tubos eppendorfs de 2 ml con su tubo de repetición, y se centrifugaron como se muestra en la Figura 30 para obtener suficiente biomasa para conservar. Posteriormente, se agregaron los 2 ml a cada

tuvo del medio que contiene glicerol, se rotularon los tubos y se guardaron en un congelador. Cada cepa conservada se le asignó un código según el banco de cepas del Laboratorio de Control Ambiental, como se describe en el siguiente apartado.

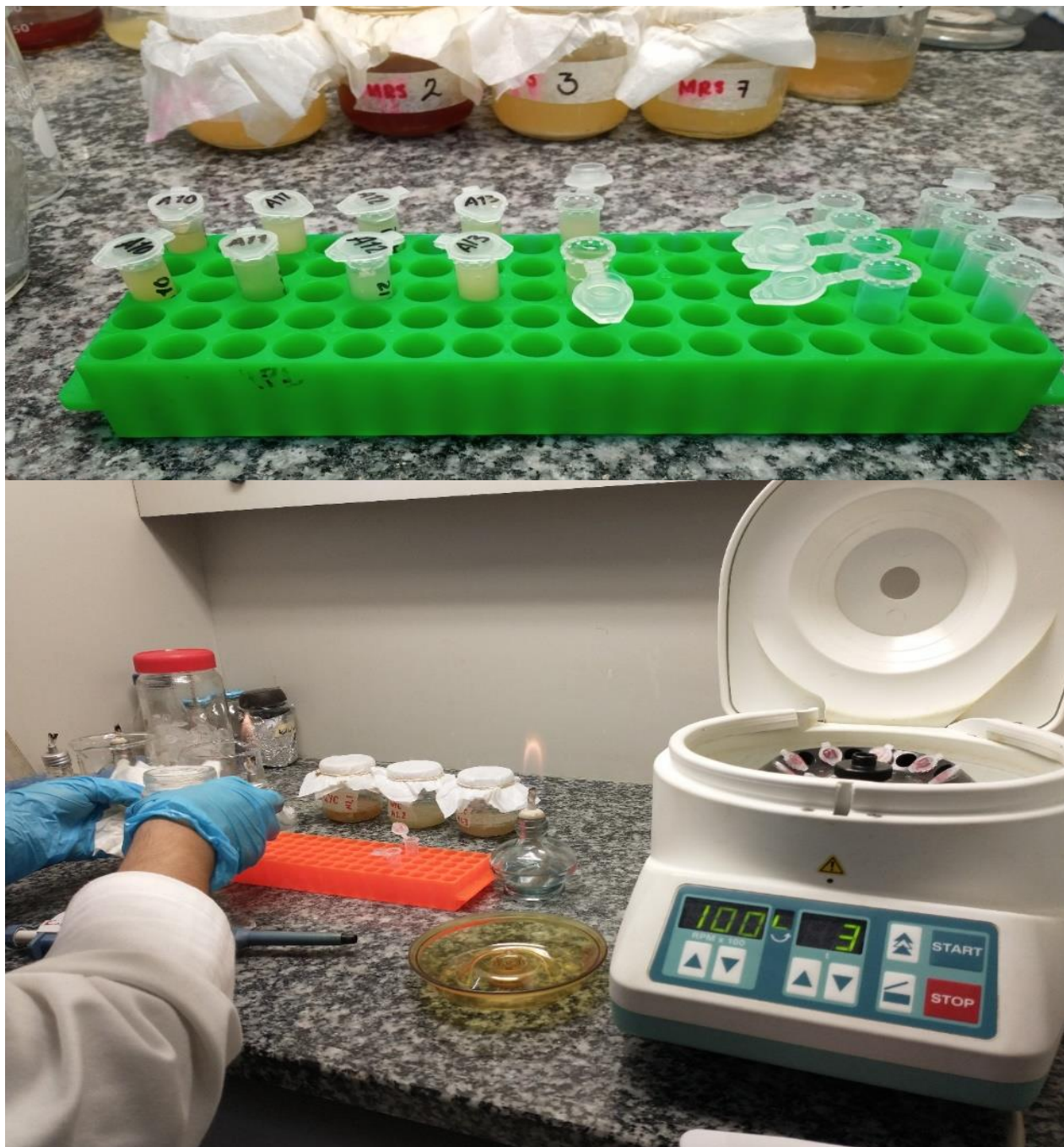


Figura 30. Conservación de cepas con glicerol al 30%.

5.5 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CEPAS

Las pruebas de caracterización tecnológica consistieron en: aislamientos dirigidos, prueba de la catalasa y prueba de oxidasa, sin embargo, para cada tipo de Bacterias se les realizaron pruebas preliminares adicionales según su clasificación, véase el Diagrama 1 en donde se mencionan las pruebas realizadas.

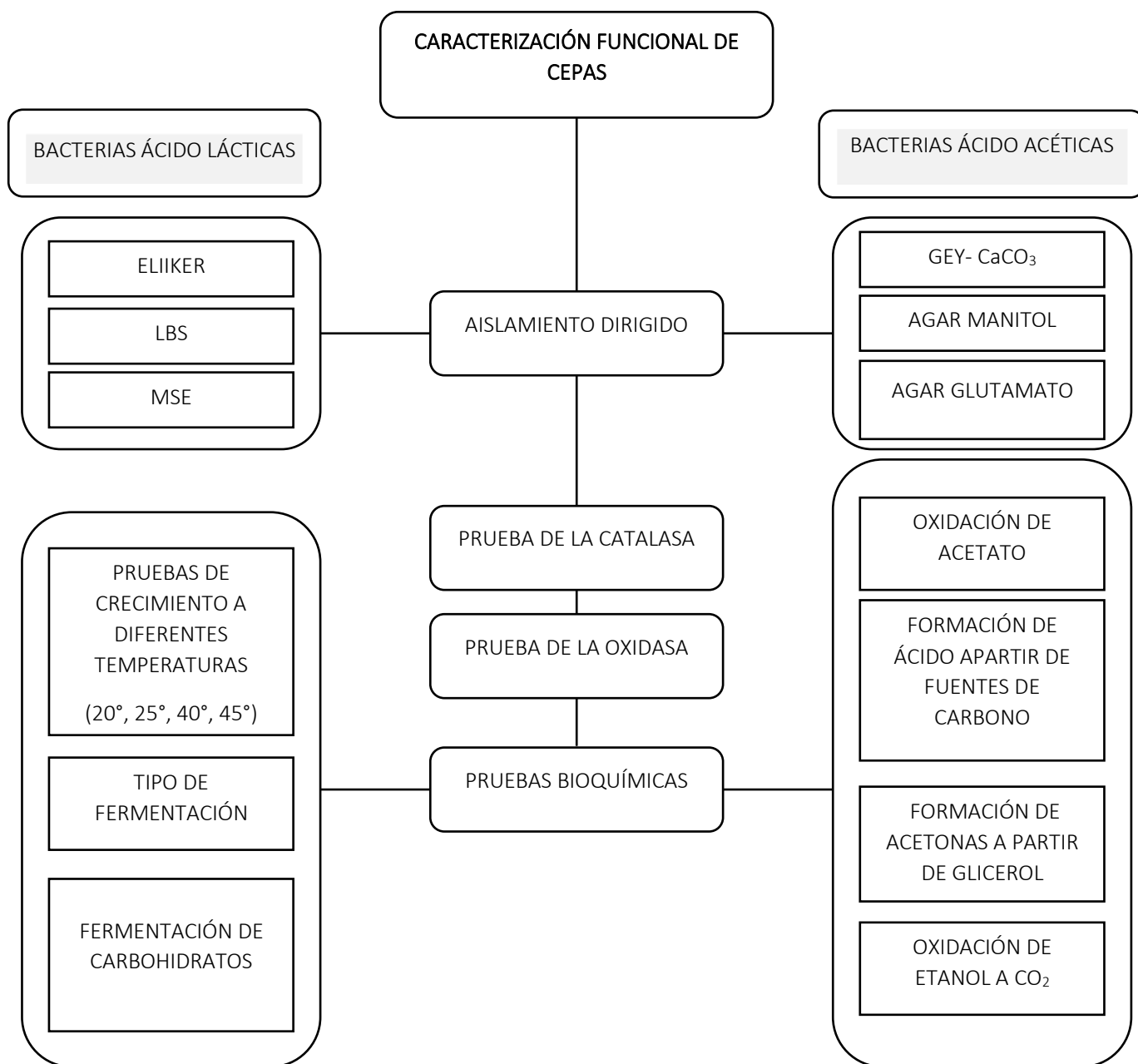


Diagrama 1. Metodología para la caracterización de Bacterias.

Es importante destacar que esta caracterización funcional de las cepas conservadas nos ayudó a identificar y tipificar cada cepa, y es importante realizarlas correctamente para evitar interpretaciones confusas, es por ello que se describe a continuación como se realizó cada fase de la caracterización.

5.6 AISLAMIENTO DIRIGIDO

Esta es la etapa principal para la caracterización funcional de cepas, con esta etapa se pudo comprobar y corroborar que cada cepa conservada pertenece de forma certera al grupo de bacterias de interés. Así mismo se empezó a identificar el tipo de bacterias al que pertenece cada cepa al llevarse a cabo un aislamiento dirigido con medios específicamente selectivos, como se describe a continuación:

5.6.1 Bacterias ácido lácticas

Para su aislamiento e identificación se han señalado el uso de diferentes medios de cultivo para BAL, véase la **Tabla 7**. Empleando estos medios y siguiendo las indicaciones de incubación de cada uno, se pudo realizar un aislamiento dirigido y discernir que géneros de BAL tenemos en nuestras cepas conservadas.

Tabla 7. Medios de cultivo para el aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas.

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMOS
Man Rogosa Sharpe (MRS)	<i>Lactobacillus spp</i>
Man Rogosa Sharpe (MRS)	<i>Pediococcus spp</i>
Rogosa Agar (LBS)	<i>Lactobacillus spp</i>
Medio Elliker	<i>Lactobacillus spp</i>
Medio Elliker	<i>Enterococcus spp</i>
Medio Elliker	<i>Streptococcus spp</i>
M17	<i>Lactococcus spp</i>
MSE	<i>Leuconostoc spp</i>

(Ramírez López & Vélez Ruiz, 2016)

Cabe resaltar que en el medio MRS existe la posibilidad de que se desarrollen varios géneros de bacterias, es por ello que todas las cepas conservadas fueron rehabilitadas

nuevamente en su medio óptimo y posteriormente se resembraron 21 cepas en medio Elliker, MSE y LBS como se describe a continuación.

En términos generales para la identificación de *Lactobacillus* se empleó el medio Elliker, también conocido como agar Lactobacilli, el cual se preparó de acuerdo a la ficha técnica del medio y se incubó a 35 ± 2 °C durante 18-48 horas y se observó el crecimiento y consistencia de cada una de las cepas en este medio; asimismo las 21 cepas se sembraron en Agar Rogosa (LBS) y se incubó a 35 - 37 °C durante 2-3 días, cabe resaltar que existe la posibilidad de que en ambos medios el crecimiento sea bueno y se trate de *Lactobacillus* o *Lactococcus*. Dentro del aislamiento también se menciona el medio MSE (Mayeux, Sandine Y Elliker), el cual sirve para la detección y enumeración de *Leuconostoc* junto con el *Streptococcus*, dicho medio se incubó por 4 días a una temperatura entre 21 ± 1 °C. En todos los medios se observó el crecimiento.

5.6.2 Bacterias ácido acéticas

En la presente tesis, se trabajó con el medio GYC, para rehabilitar las cepas, asimismo, el aislamiento dirigido se efectuó con el medio GEY adicionado con CaCO_3 . Gerard (2015) menciona que la adición de carbonato de calcio (CaCO_3) a ambos medios (GYC y GEY) convierte a estos medios diferenciales exclusivamente para BAA, puesto que pone en evidencia el metabolismo de la fuente de carbono (glucosa, etanol respectivamente) con la producción de ácido acético, el cual disuelve el CaCO_3 , formando un halo transparente alrededor de la colonia en crecimiento, confirmando que se trata de una Bacteria Ácido Acética.

5.7 PRUEBA DE LA CATALASA

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias facultativas que contienen el citocromo oxidasa. La principal excepción son los estreptococos (*Streptococcus*).

Esta prueba se realizó a cepas BAL y BAA a temperatura ambiente y se realizó siguiendo dos técnicas (para el caso de las BAL):

1. Método del portaobjetos (recomendado):

- ✓ Con el asa de siembra se recogió el centro de una colonia pura de 18-24 horas y se colocó sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- ✓ Se agregó con un gotero o pipeta Pasteur una gota de H_2O_2 (Agua Oxigenada o Peróxido de Hidrogeno) al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
- ✓ Se observó inmediatamente el resultado, la formación inmediata de burbujas se considera un resultado positivo.
- ✓ Se desechó el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.

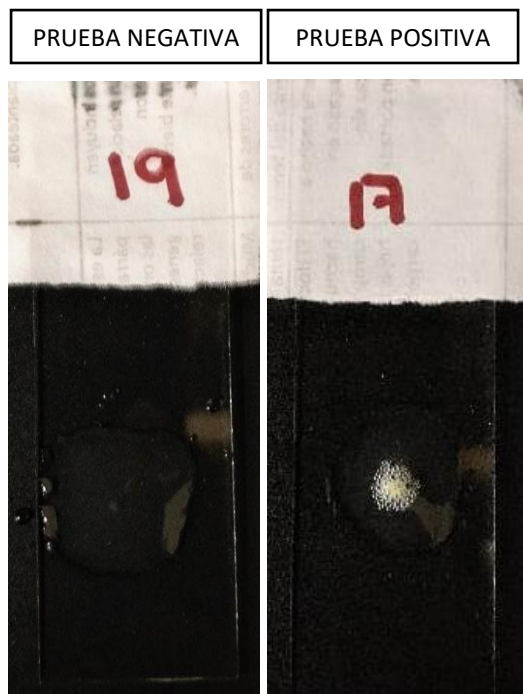


Figura 31. Interpretación de resultados para la prueba de catalasa.

Nota: Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.

2. Método del tubo de ensayo:

Se agregó 1ml de H_2O_2 al 30% directamente a un cultivo puro de agar densamente inoculado.

Se observó la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

5.8 PRUEBA DE OXIDASA

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa. El reactivo de la oxidasa más recomendado es la solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (reactivo de Kovacs). Este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso. Esta prueba se realizó exclusivamente para BAL, de la siguiente manera:

- **Método en placa directa o en tubos de crecimiento:**

Se agregó directamente 2-3 gotas de reactivo a cada uno de los tubos de crecimiento con un tiempo de incubación de 18-24 horas de cada cepa. Como recomendación no se recomienda inundar todo el tubo y no invertirlo y se observan los cambios de color. Con el reactivo de Kovacs la reacción se produce entre 10 a 15 segundos.

5.9 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

5.9.1 Prueba de crecimiento para BAL

En esta prueba se evaluó la resistencia térmica de cada una de las cepas BAL, esta consiste en inocular tubos con agar inclinado de MRS con un cultivo fresco de 48 horas, los tubos fueron sellados e incubados a diferentes temperaturas (20, 25, 40 y 45 °C) durante 72 horas, como se muestra en el **Diagrama 2**.

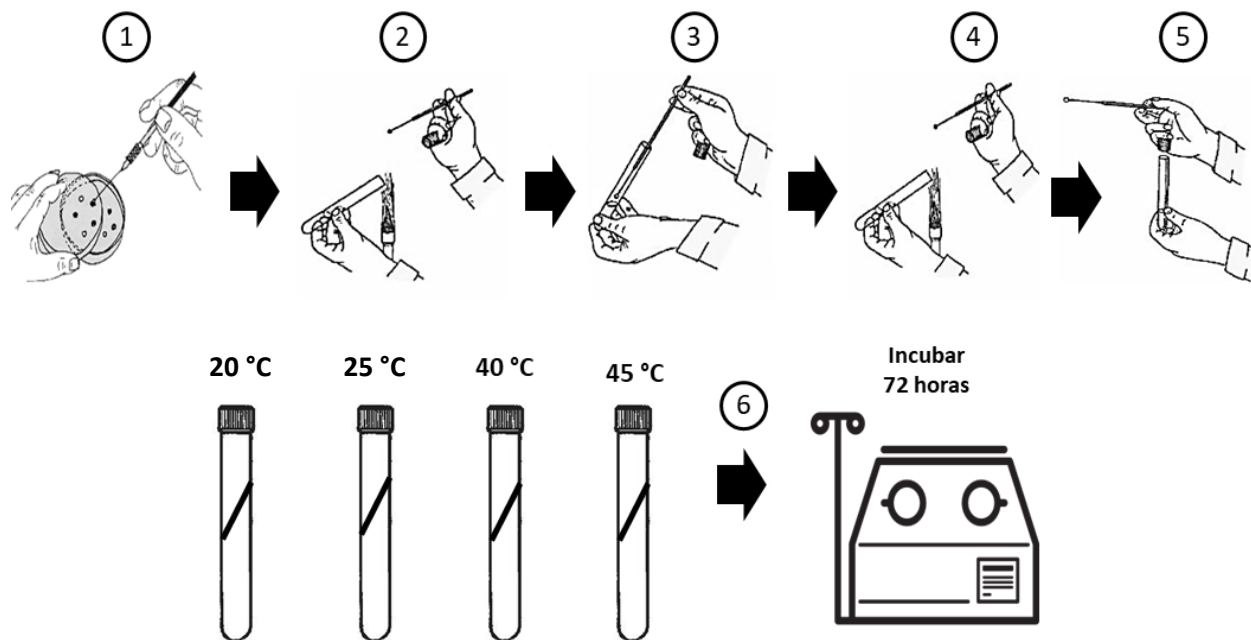


Diagrama 2. Esquema práctico para la evaluación de crecimiento a diferentes temperaturas.

5.9.2 Tipo de fermentación (homoláctica y heteroláctica) BAL

A partir de un cultivo puro de 48 horas, cada cepa fue sembrada por estría en un medio mejorado propuesto por Zúñiga, et al. (1993) al que nombró M5, este medio es usado

para la identificación y diferenciación de BAL como homolácticas y heterolácticas. Este medio se elaboró en base a la composición propuesta por Zuñiga *et al.*, (1993), y se incubó a una temperatura de 35 °C.



Figura 32. Tipo de fermentación realizado a cepas BAL.

Se consideraron BAL homolácticas (homofermentativas) aquellas colonias azul-verdoso con vire en el medio de azul a amarillo, mientras que las BAL heterolácticas (heterofermentativas) son aquellas colonias de color blanco que no provocan cambio de color en el medio, es decir el medio permanece azul, tal como se observa en la Figura 32 (Ramírez López & Vélez Ruiz, 2016).

5.9.3 Fermentación de carbohidratos (BAL)

Para lograr la identificación del perfil fermentativo de cada una de las cepas de BAL se realizó la prueba bioquímica de fermentación de carbohidratos. Para ello, se utilizó el Caldo base rojo de fenol; este medio se inoculó preferentemente a partir de un cultivo en medio sólido fresco no mayor a 48 horas y procurando no llevar nada del medio de cultivo con el inóculo, para evitar la posible incorporación de azúcares que se encuentren presentes en dicho medio. El medio se preparó en base a su ficha técnica, se esterilizó,

y se le añadió la solución del carbohidrato (previamente esterilizada por filtración) en cantidad suficiente para obtener una concentración final entre 0,5 a 1% del carbohidrato (D- Glucosa, Sacarosa, D- Maltosa, Lactosa, D- Fructuosa y Galactosa). El tubo de ensayo contenía un pequeño tubo invertido y lleno del medio (tubo de fermentación o tubo de Durham).

5.9.4 Oxidación de acetato



Figura 33. Proceso de preparación para la prueba de Fermentación de carbohidratos.

Esta prueba es exclusivamente para bacterias ácido acéticas, se preparó en tubos de ensayo (previamente esterilizados) el medio que contenía 0,3% de peptona, 0,2% de extracto de levadura, 0,2% de acetato de sodio y 0,002% de azul de bromotimol, se inocularon e incubaron durante 7 días a una temperatura de 30 ± 1 °C según Gerard (2015).

El indicador de pH utilizado en esta prueba es el azul de bromotimol, el cual debe estar en un rango de pH de 6.4, el cambio de color de verde a azul es producido por la alcalinización del medio debida a la oxidación del sustrato (acetato), este cambio en el medio se interpretó como prueba positiva. En esta prueba es necesario estabilizar el pH para poder apreciar si el medio se acidifica o alcaliniza de acuerdo a la Figura 34 que se muestra a continuación.

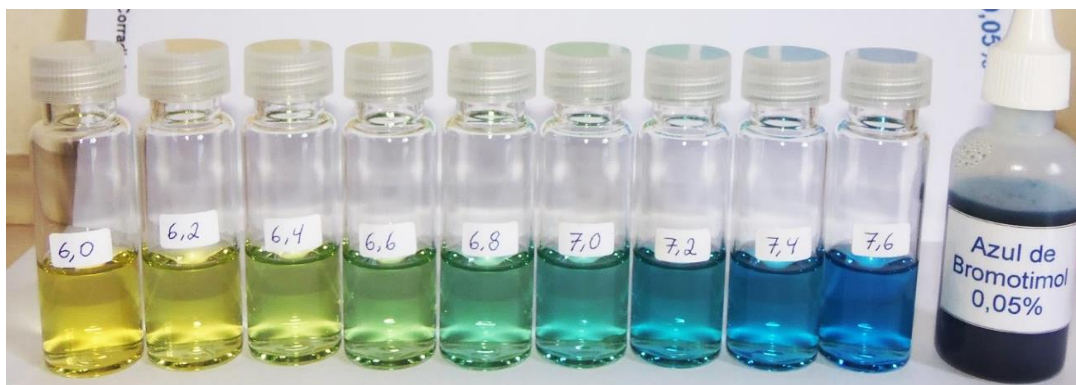


Figura 34. Escala de pH del indicador Azul de Bromotimol.

5.9.5 Formación de ácido a partir de azúcares y alcoholes (BAA)

Para esta prueba se utilizaron tubos de ensayo previamente esterilizados, el medio se preparó con 0,5% de extracto de levadura, 0,002% de púrpura de bromocresol, incorporando 1% de un azúcar (D- manosa, D-glucosa, D-fructosa, sacarosa, D-manitol) o Alcohol (glicerol y etanol). Cada una de las cepas fue inoculada en cada uno de los azúcares y alcoholes mencionados anteriormente a partir de cultivos frescos de 72-96 hrs. Posteriormente los tubos se incubaron durante 7 días. La visualización del cambio de color (de púrpura a amarillo) como se observa en la Figura 35, es producido por la acidificación del medio debida a la oxidación del sustrato, interpretando esta acidificación como una prueba positiva (Gerard, 2015).

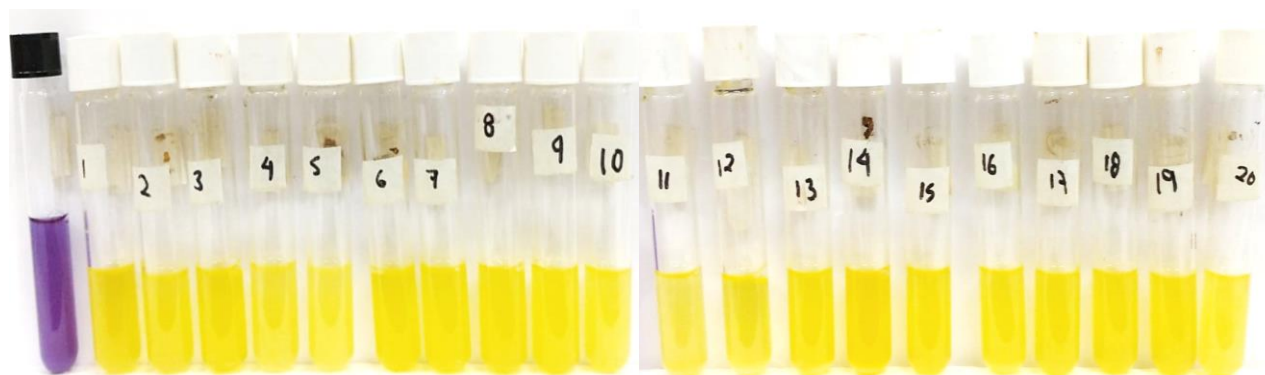


Figura 35. Acidificación del medio debida a la oxidación del sustrato (Fructuosa).

5.9.6 Crecimiento en agar manitol y agar glutamato para BAA

En esta prueba se utilizaron dos medios, agar manitol y agar glutamato, estos medios sirven como medios diferenciales entre géneros de BAA como menciona Gerard (2015)

y Toshinobu *et al.*, (1964). Estos medios se incubaron durante 10 días a 30 ± 1 °C, cabe mencionar que estos medios son de color transparente y el crecimiento de las bacterias es igual al color del medio por lo que se utilizó un fondo negro para generar un contraste significativo entre el medio y el crecimiento.



Figura 36. Crecimiento en (a) Agar Manitol y (b) Agar Glutamato.

5.9.7 Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol (BAA)

Esta prueba pretende la conversión de glicerol a dihidroxiacetona (DHA), para ello se preparó un medio mencionado por Gerard (2015), el cual incluye 3% de glicerol, 0,5% de extracto de levadura, 1% de peptona y 1,5 % de agar, este medio se inoculó con cada una de las cepas de BAA y se incubó por 10 días a 30 ± 1 °C. Después del periodo de incubación se agregó solución de Fehling sobre la superficie de la placa de Petri. La aparición de un color naranja oscuro pone de manifiesto la presencia de dihidroxiacetona.

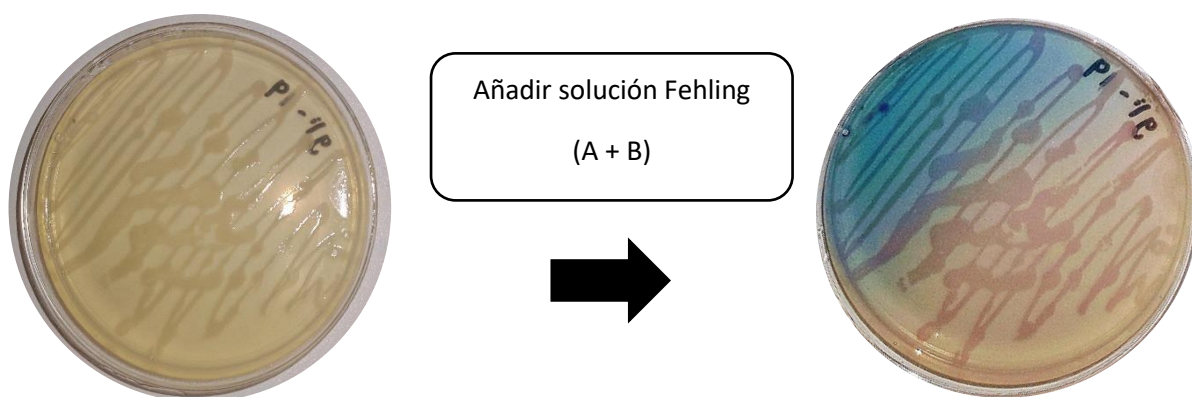


Figura 37. Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol con un cultivo fresco de 72 hrs.

5.9.8 Oxidación de etanol a CO₂ (BAA)

Dentro de esta prueba se observó la producción de ácido acético a partir de etanol, para ello, se utilizaron tubos (previamente esterilizados) con cultivos inclinados, el medio utilizado es el agar levadura etanol verde de bromocresol (**Anexo 13**), se incubó por 10 días a 30±1 °C, el resultado visualizado arroja una visualización en 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) (Gerard, 2015).

5.10 DETERMINACIÓN DE ART Y ARD

Para esta determinación se usó 20 gramos de cada muestra (muestra 1 y muestra 2) y se molieron en licuadora posteriormente se realizaron los siguientes pasos:

- ✓ En un matraz se agregaron los 10 gramos de la muestra 1 y se añadieron 100 ml de agua esterilizada, de igual forma se hizo este procedimiento con la muestra 2.
- ✓ Se agregó 2 ml de acetato de plomo a cada matraz que contiene respectivamente cada muestra.

Nota: como se observó sedimentación se añadió 1 ml más a cada matraz.

- ✓ Cada matraz se saturó de oxalato de potasio y se dejó sedimentar.
- ✓ se filtraron los matraces respectivamente como se muestra en la Figura 38.



Figura 38. Filtración de las muestras.

- ✓ A un matraz de cada muestra se añadieron 5 ml de HCl para hidrolizar los matraces.
- ✓ Se calentó agua (baño maría) a una temperatura de 80 °C, se introdujo cada matraz hidrolizado cuidando que la temperatura del líquido dentro del matraz no pase de 65-70 °C esto para que no se caramelicen las muestras.
- ✓ Se preparó una solución al 10% de NaOH en 200 ml de agua destilada.



Figura 39. Medición de pH con un potenciómetro.

- ✓ Una vez alcanzada la temperatura en los matraces hidrolizados, se neutralizó con la solución previamente preparada de NaOH hasta alcanzar un pH aproximado entre 6.5 y 7 como se observa en la figura 39.
- ✓ Una vez neutralizadas las muestras, se aforaron con agua destilada hasta 200 ml respectivamente.
- ✓ A 12 matraces se le agregaron 5 ml de Fehling A y 5 ml de Fehling (A+B).



Figura 40. Solución Fehling (A+B) en cada matraz.

- ✓ Con ayuda de una parrilla, se calentó cada matraz, y se le agregaron 2 gotas de azul de metileno al ebulir.
- ✓ Se tituló cada matraz respectivamente con cada una de las muestras hasta que cambie de color o vire a un rojo ladrillo.

Se tomo nota del volumen gastado al llegar al vire de cada muestra para determinar los ART y ARD.

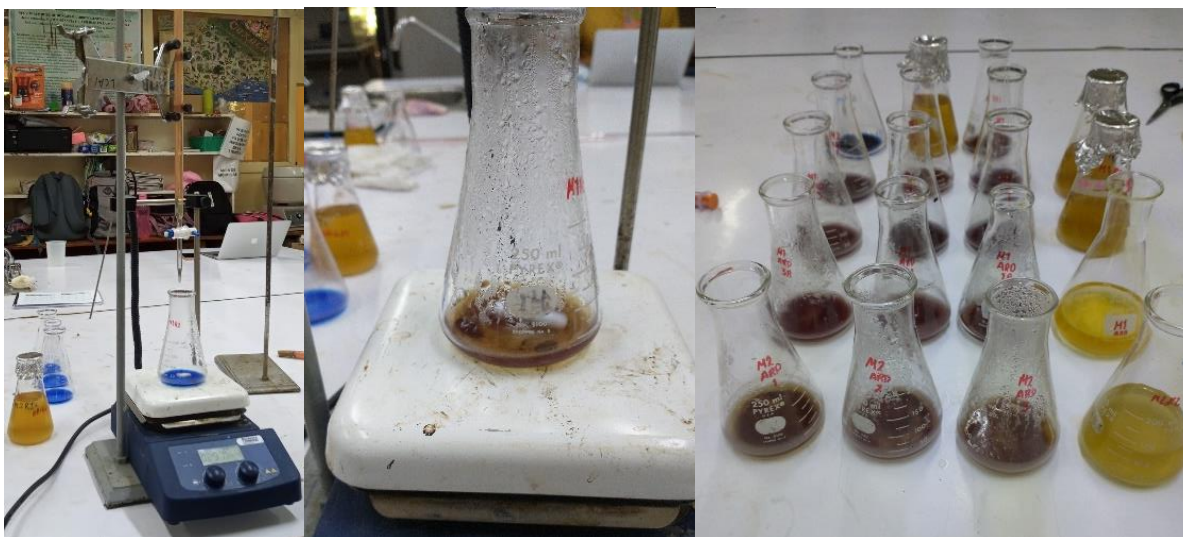


Figura 41. Titulación de las muestras para la determinación de ART y ARD.

CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de conocer y estudiar los microorganismos presentes en ambas muestras de mostos, se determinaron los parámetros fisicoquímicos resumidos en la **Tabla 8**, donde se observa que a pesar de que ambas muestras provengan de distintas localidades entran en un intervalo de pH entre 4.49 y 4.33, indicando que ambas muestras son ácidas, lo que confirma que existe presencia de Bacterias Ácido Lácticas de acuerdo con García *et al.*, (2008) quien menciona que entre bajos valores de pH tenga la muestra existen altas poblaciones de BAL las cuales favorecen el proceso de fermentación. Cabe resaltar que existen más microorganismos que participan en estos procesos de fermentación.

En la presente tesis, de ambas muestras estudiadas de mostos con 3 días de fermentación de mezcal artesanal pertenecientes al *Agave angustifolia*, se lograron

obtener 21 aislamientos pertenecientes a Bacterias Ácido Lácticas y 20 aislamientos pertenecientes a Bacterias Ácido Acéticas.

Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de mosto de mezcal artesanal.

	MUESTRA 1	MUESTRA 2
LUGAR	San Pedro, Teozacoalco	Tapanala, Yautepec
NOMBRE DEL AGAVE	<i>Agave angustifolia</i>	<i>Agave angustifolia</i>
DÍAS DE FERMENTACIÓN	3 días	3 días
pH	4.49*	4.33***
GRADOS BRIX	12.7**	13***
	*Dato tomado a 25°C **Dato tomado a 22.1°C	***Dato tomado a 25.8°C



Figura 43. Medición de pH de la muestra 1 con un pH metro.



Figura 42. Grados Brix de la muestra 1 con apoyo de un Refractómetro digital.

6.1 SIEMBRA Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS

6.1.1 Conteo de UFC/ML en cada medio

Se realizó un conteo en placa de los microorganismos que fueron capaces de crecer en cada uno de los medios. Luego de obtener estos valores se utilizó la siguiente fórmula: UFC/mL sembrados X inversa del factor de dilución como se muestra en la **Tabla 9** y **Tabla 10**.

Tabla 9. Conteo de colonias obtenido del plaqueo de la muestra 1.

MEDIO	DILUCION	TOTAL DE COLONIAS	UFC/ml
MRS	X10 ³	228	228 000
	X10 ⁴	27	270 000
	X10 ⁵	17	1 700 000
	X10 ⁶	0	0
GYC	X10 ³	261	261 000
	X10 ⁴	40	400 000
	X10 ⁵	1	100 000
	X10 ⁶	0	0

Tabla 10. Conteo de colonias obtenido del plaqueo de la muestra 2.

MEDIO	DILUCION	TOTAL DE COLONIAS	UFC/ml
MRS	X10 ³	214-381	214 000 – 381 000
	X10 ⁴	233	2 330 000
	X10 ⁵	8	800 000
	X10 ⁶	6	6 000 000
GYC	X10 ³	2	2 000
	X10 ⁴	2	20 000

A partir del segundo día de incubación se evidenció mayor número de microorganismos en el medio de cultivo MRS para bacterias ácido lácticas. Al mismo tiempo a partir del cuarto día de incubación se incrementó el crecimiento en el medio GYC que está relacionado con el aumento de las BAA (bacterias ácido acéticas) conservando estas hasta el quinto día de incubación.

6.2 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE CULTIVOS MIXTOS Y OBTENCIÓN DE CULTIVO AXÉNICO O PURO

Se estudiaron 21 cepas de Bacterias Ácido Lácticas y 20 cepas de Bacterias Ácido Acéticas de dos muestras de mostos que participan en el proceso de producción de mezcal artesanal con *Agave angustifolia*. En la **Tabla 11**, se pueden apreciar las distintas cepas BAL purificadas en medio MRS y en la **Tabla 12**, se aprecian las cepas BAA purificadas en medio GYC.

Tabla 11. Relación de cepas seleccionadas y purificadas en medio MRS.

MEDIO MRS					
	PURIFICACION 24HRS	PURIFICACION 48HRS		PURIFICACION 24HRS	PURIFICACION 48HRS
L1			L11		
L2			L12		
L3			L13		
L4			L14		

TIPIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE MEZCAL ARTESANAL
CON *Agave angustifolia* Haw.

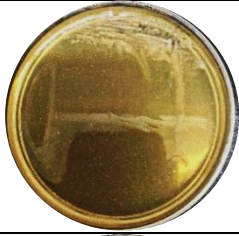
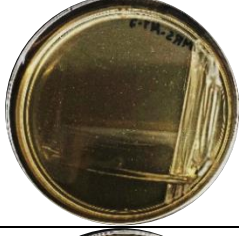
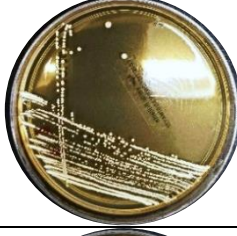
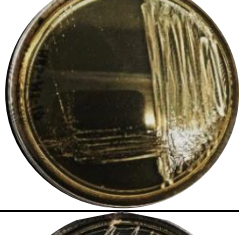
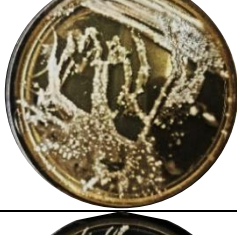
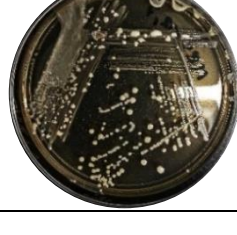
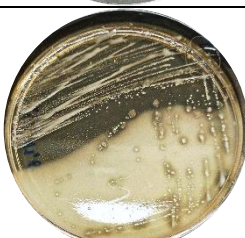
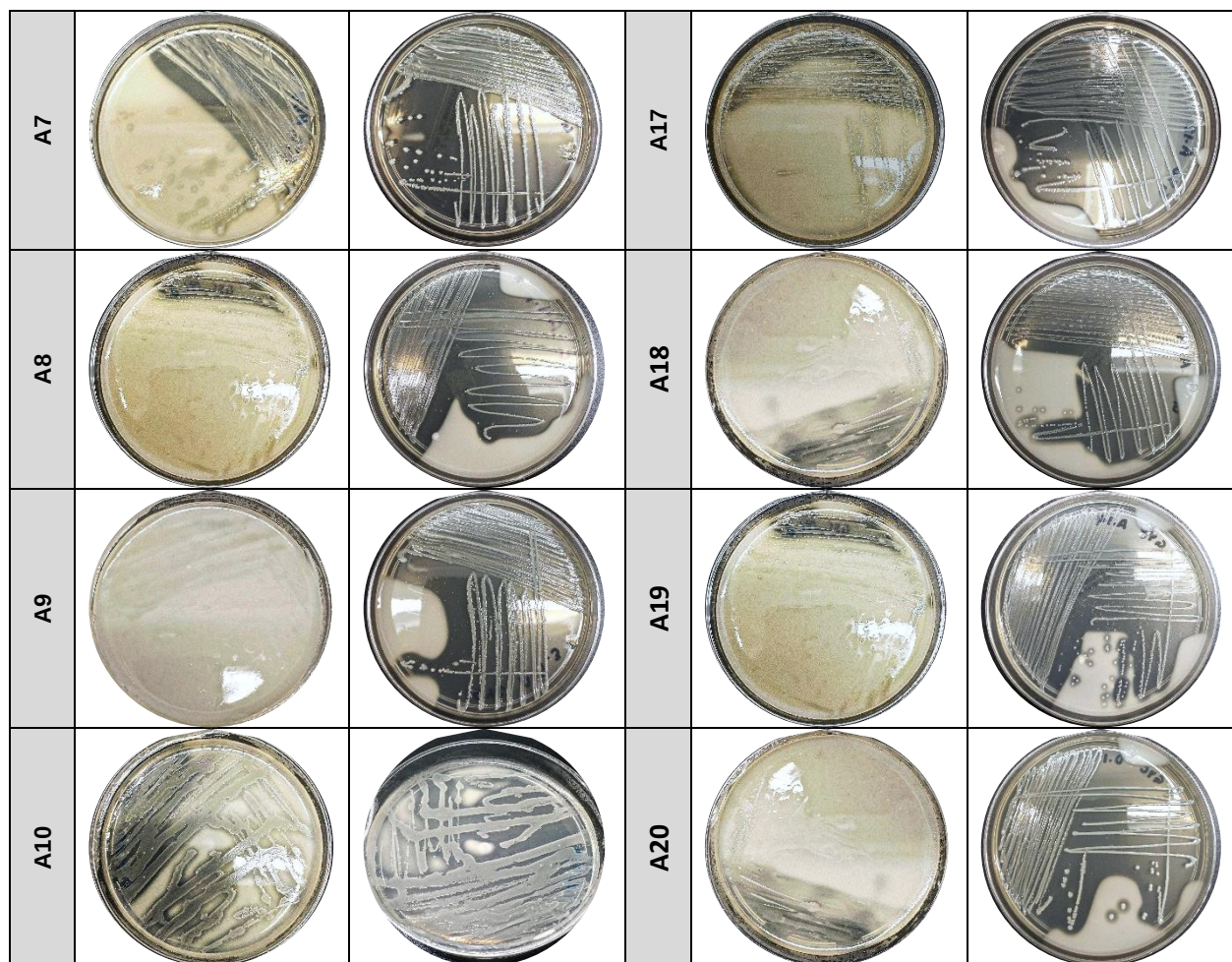
L5			L15		
L6			L16		
L7			L17		
L8			L18		
L9			L19		
L10			L20		
L21					

Tabla 12. Relación de cepas seleccionadas y purificadas en medio GYC.

MEDIO GYC					
	PURIFICACION 72HRS	PURIFICACION 120HRS		PURIFICACION 72HRS	PURIFICACION 120HRS
A1			A11		
A2			A12		
A3			A13		
A4			A14		
A5			A15		
A6			A16		

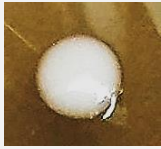


6.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS BACTERIAS AISLADAS

6.3.1 Caracterización macroscópica

Las cepas bacterianas aisladas se identificaron de acuerdo a sus características morfológicas coloniales, utilizando una terminología usada por Briones (2009), describiendo su aspecto, forma, color y otros aspectos, que permitieron observar sus primeras diferencias entre cada una de ellas. De acuerdo a las características macroscópicas de las BAL (**Tabla 13**), las colonias eran en su mayoría blancas o cremosas, circulares, convexas, con una textura lisa, pequeñas y con un aspecto brillante. Además, la mayoría de las colonias de BAA (**Tabla 14**) presentan características macroscópicas de color blanco grisáceo, circulares, con borde entero, convexas con textura lisa y algunas elevadas y aspecto brillante.

Tabla 13. Resultados de la Caracterización Macroscópica de BAL en medio MRS.

CEPA	IMAGEN	FORMA	COLOR	TEXTURA	ELEVACIÓN	BORDE	BRILLO
L1		Circular	Blanco Perla	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
L2		Circular	Blanco	Lisa	Elevada	Entero	Brillante
L3		Ovalada	Blanco Perla	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
L4		Circular	Blanco	Lisa	Elevada	Entero	Brillante
L5		Circular	Amarillo Crema	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
L6		Circular	Amarillo Crema	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
L7		Circular	Crema	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
L8		Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
L9		Circular	Amarillo Crema	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
L10		Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Brillante

TIPIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE MEZCAL ARTESANAL
CON *Agave angustifolia* Haw.

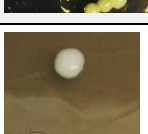
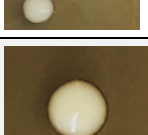
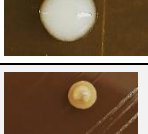
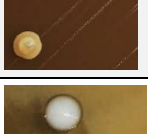
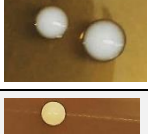
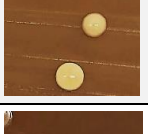
L11		Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
L12		Circular	Amarillo Fosforescente	Lisa	Pulvinada	Entero	Brillante
L13		Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
L14		Circular	Amarillo Fosforescente	Lisa	Pulvinada	Entero	Brillante
L15		Circular	Blanco Perla	Lisa	Elevada	Entero	Brillante
L16		Circular	Amarillo Crema	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
L17		Circular	Blanco	Lisa	Elevada	Entero	Brillante
L18		Circular	Beige	Lisa	Umbilicada-Umbonada	Entero	Brillante
L19		Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
L20		Circular	Beige Pardo	Lisa	Pulvinada	Entero	Brillante
L21		Filamentosa	Café Caramelo	Lisa	Umbilicada-Umbonada	Erosionada	Brillante

Tabla 14. Resultados de la Caracterización Macroscópica de BAA en medio GYC.

CEPA	IMAGEN	FORMA	COLOR	TEXTURA	ELEVACIÓN	BORDE	BRILLO
A1		Circular	Blanco Grisáceo	Lisa	Elevada	Entero	Brillante
A2		Circular	Blanco Grisáceo	Lisa	Elevada	Entero	Brillante
A3		Circular	Blanco Perla	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
A4		Ovalada/ Fusiforme	Blanco Grisáceo	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
A5		Circular/ Fusiforme	Blanco Perla	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
A6		Irregular	Blanco Grisáceo	Lisa	Elevada	Lobulado	Brillante
A7		Circular	Blanco Grisáceo	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
A8		Circular	Blanco Grisáceo	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
A9		Circular	Blanco Perla	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
A10		Irregular	Blanco Grisáceo	Lisa	Elevada	Lobulado	Brillante

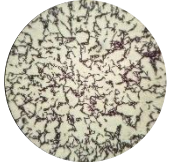
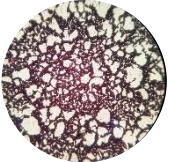
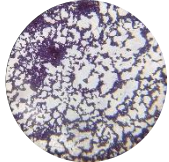
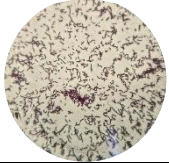
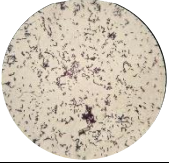
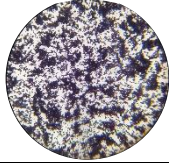
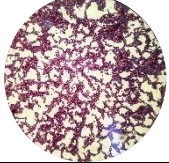
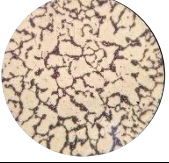
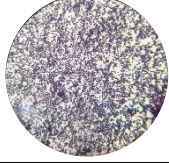
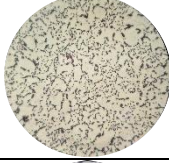
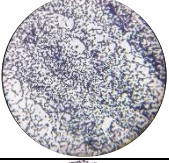
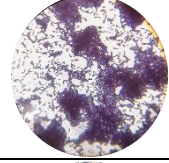
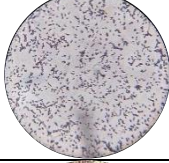
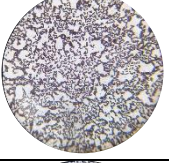
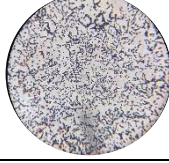
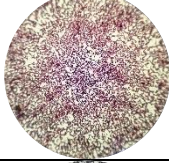
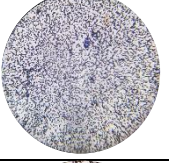
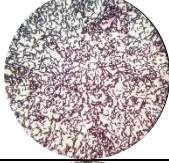
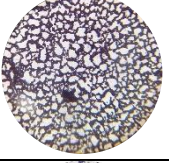
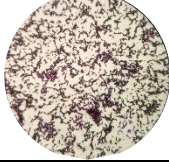
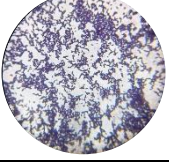
TIPIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE MEZCAL ARTESANAL
CON *Agave angustifolia* Haw.

A11		Circular	Blanco Grisáceo	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
A12		Circular	Blanco Perla	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
A13		Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
A14		Circular	Blanco Grisáceo	Lisa	Elevada	Entero	Brillante
A15		Irregular	Blanco Grisáceo	Arrugada	Elevada	Lobulado	Brillante
A16		Irregular	Blanco	Lisa	Elevada	Entero	Brillante
A17		Circular	Blanco	Arrugada	Convexa	Entero	Brillante
A18		Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
A19		Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Brillante
A20		Circular	Blanco	Lisa	Elevada	Entero	Brillante

6.3.2 Caracterización microscópica

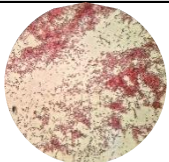
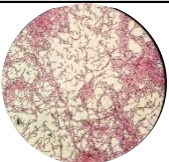
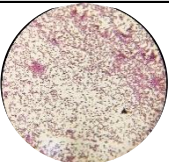
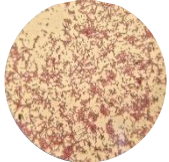
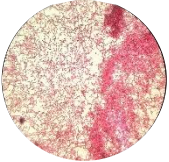
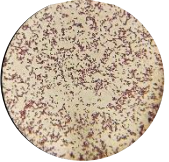
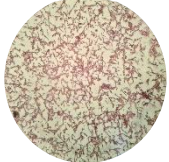
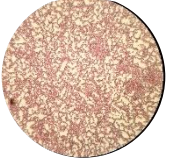
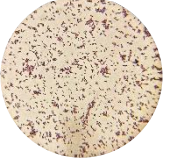
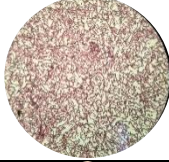
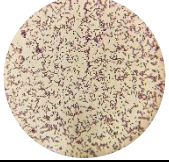
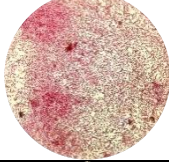
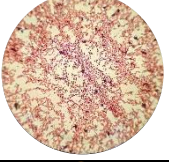
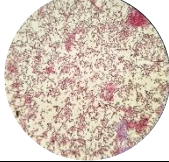
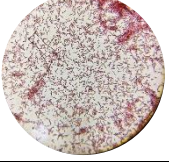
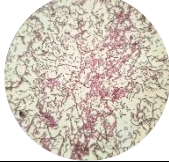
Respecto a la morfología microscópica (BAL) la mayoría son cocos y algunos bacilos de diferentes tamaños (cortos y medianos), presentándose todas como Gram (+) (Tabla 15).

Tabla 15. Caracterización microscópica realizada con un objetivo de x100 de BAL.

ID	IMAGEN	TINCIÓN GRAM	ID	IMAGEN	TINCIÓN GRAM	ID	IMAGEN	TINCIÓN GRAM
L1		COCOS (+)	L9		BACILOS (+)	L17		COCOS (+)
L2		BACILOS (+)	L10		COCOS (+)	L18		COCOS (+)
L3		BACILOS (+)	L11		COCOS (+)	L19		COCOS (+)
L4		COCOS (+)	L12		COCOS (+)	L20		BACILOS (+)
L5		COCOS (+)	L13		BACILOS (+)	L21		COCOS (+)
L6		BACILOS (+)	L14		COCOS (+)			
L7		COCOS (+)	L15		COCOS (+)			
L8		COCOS (+)	L16		COCOS (+)			

Así mismo, la morfología microscópica de BAA en su mayoría son bacilos de distintos tamaños (cortos y medianos) formando cadenas entre ellos, presentándose todas como Gram (-) (Tabla 16).

Tabla 16. Caracterización microscópica realizada con un objetivo de x100 de BAA.

ID	IMAGEN	TINCIÓN GRAM	ID	IMAGEN	TINCIÓN GRAM	ID	IMAGEN	TINCIÓN GRAM
A1		BACILOS (-)	A9		BACILOS (-)	A17		BACILOS (-)
A2		BACILOS (-)	A10		BACILOS (-)	A18		BACILOS (-)
A3		BACILOS (-)	A11		BACILOS (-)	A19		BACILOS (-)
A4		BACILOS (-)	A12		BACILOS (-)	A20		BACILOS (-)
A5		BACILOS (-)	A13		BACILOS (-)			
A6		BACILOS (-)	A14		BACILOS (-)			
A7		BACILOS (-)	A15		BACILOS (-)			
A8		BACILOS (-)	A16		BACILOS (-)			

6.4 CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LAS DISTINTAS CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las morfologías bacterianas encontradas con las 21 cepas de BAL coinciden con las consultadas con las referencias bibliográficas, donde las cepas de BAL presentan tinción Gram positiva como se muestra en la **Tabla 15**, cabe resaltar que no son esporuladas. De acuerdo a las características fenotípicas de las BAL, tales como la morfología de sus colonias y la observación microscópica después de realizar la tinción Gram, se logró observar en las 21 placas sembradas en agar Elliker, colonias de color blanco cremoso, blancas brillantes y amarillas claro, de forma redonda, con bordes enteros, y superficie convexa, de consistencia butirosa y húmeda; lo que corresponde a características previamente reportadas por Muñoz (2010), sin embargo la cepa 21, fue una de las pocas cepas que presentó muy poco crecimiento comparado con otras cepas sembradas en este mismo medio.

De acuerdo a lo citado por Vélez Ruiz & Ramírez López (2016), el medio MSE es un medio sumamente estricto en las horas de incubación, esto debido a que, tras 4 días de incubación, los estreptococos lácticos pueden desarrollarse en el medio, es por eso que se observó durante los 4 días de incubación y se logró observar que el crecimiento comparado entre las 48 hrs con 96 hrs es notorio, concluyendo que las cepas pertenecientes al palenque de Teozacoalco con las terminaciones 13,14,16,20,22,23 y del palenque de Tapanalá con terminación 02,06,07,08,09 y 10 fueron cepas que no presentaron crecimiento a las 48 horas de incubación. Sin embargo, a las 96 horas la mayoría presentaron crecimiento con excepción de las cepas con terminación 08 y 10 del palenque de Tapanalá, Yautepec; en general se atribuye a tener 9 cepas de BAL del género *Leuconostoc*.

En cambio, en el medio LBS todas las cepas obtuvieron un buen crecimiento, esto indica que el agar LBS sirve para evitar el crecimiento excesivo de mohos, estreptococos y proliferación de organismos por lo que se descartan Bacterias Lácticas de géneros de *Streptococcus* y se asimilan más género de *Lactobacillus*.

Tabla 17. Aislamiento dirigido de Bacterias Ácido Lácticas (Elliker, MSE, LBS).

CEPA	MEDIO ELLIKER	MEDIO MSE		MEDIO LBS
		48 Hrs (2 Días)	96 Hrs (4 Días)	
L1	++	NC	+	+++
L2	+++	NC	+	+++
L3	+++	+	+	+++
L4	+++	NC	+	+++
L5	+++	+	+	+++
L6	+++	+	+	+++
L7	+++	+	++	+++
L8	+++	NC	++	+++
L9	+++	+	+	+++
L10	++	NC	+	+++
L11	+++	NC	+	+++
L12	++	+	++	+++
L13	++	NC	+	+++
L14	+++	+	++	+++
L15	++	+	+	+++
L16	+	+	+	+++
L17	++	NC	+	+++
L18	++	NC	+	+++
L19	++	NC	NC	+++
L20	++	NC	+	+++
L21	+	NC	NC	+++

Abreviaciones: +++, muy buen crecimiento; ++, buen crecimiento; +, poco crecimiento; NC, no hay crecimiento.

Conforme a lo citado por Vélez Ruiz & Ramírez López (2016), se consideran Bacterias Ácido Lácticas (Tabla 18), a aquellas bacterias que resultan con catalasa y oxidasa negativa, esto debido a que en la prueba de catalasa no se generó producción de gas (burbujeo) al adicionar H_2O_2 (agua oxigenada) y en la segunda prueba no hubo vire a azul o morado oscuro, casi negro, al agregar el reactivo diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (TPD) al 1%, también conocido como reactivo Kovac's. Cabe resaltar que durante la primer prueba dos cepas, Tabla 18, dieron como resultado una catalasa positiva, lo que puede indicar que estas cepas son capaces de desarrollar una pseudocatalasa capaces de descomponer el agua oxigenada.

TIPIFICACIÓN DE BACTERIAS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE MEZCAL ARTESANAL
CON *Agave angustifolia* Haw.

Tabla 18. Características microscópicas y funcionales de las cepas de BAL aisladas de dos muestras de mezcal artesanal de *Agave angustifolia* Haw.

CEPA	TINCIÓN GRAM	CATALASA	OXIDASA	TIPO DE FERMENTACIÓN	CRECIMIENTO			
					20	25	40	45
L1	COCOS	-	-	Homofermentativas	++	++	+	++
L2	BACILOS	+	-	Homofermentativas	++	++	+	++
L3	BACILOS	-	-	Homofermentativas	++	+	-	-
L4	COCOS	-	-	Heterofermentativas	++	++	-	-
L5	COCOS	-	-	Homofermentativas	++	+	-	-
L6	BACILOS	-	-	Homofermentativas	++	+	++	-
L7	COCOS	-	-	Heterofermentativas	++	++	++	++
L8	COCOS	-	-	Heterofermentativas	++	++	-	-
L9	BACILOS	-	-	Homofermentativas	++	++	+	+
L10	COCOS	-	-	Heterofermentativas	++	++	+	+
L11	COCOS	-	-	Heterofermentativas	++	+	++	++
L12	COCOS	-	-	Heterofermentativas	++	+	++	++
L13	BACILOS	+	-	Homofermentativas	++	++	-	+
L14	COCOS	-	-	Homofermentativas	++	++	+	-
L15	COCOS	-	-	Homofermentativas	+	++	+	-
L16	COCOS	-	-	Homofermentativas	+	+	++	++
L17	COCOS	-	-	Homofermentativas	++	++	-	+
L18	COCOS	-	-	Homofermentativas	+	+	++	++
L19	COCOS	-	-	Homofermentativas	++	++	-	-
L20	BACILOS	-	-	Homofermentativas	++	++	++	++
L21	COCOS	-	-	Homofermentativas	+	+	-	-

Abreviaciones (Catalasa): +, positivo (formación de burbujas); -, negativo (no hay burbujas).

Abreviaciones (Oxidasa): +, positivo (las colonias de tiñen a color morado-negro); -, negativo (no hay cambio de color).

Abreviaciones (Crecimiento): ++, buen crecimiento; +, poco crecimiento; -, no hay crecimiento.

En base a la caracterización microscópica, se lograron identificar 6 cepas como bacilos Gram positivos (+) y 15 cepas como cocos Gram positivos (+). De esta manera, se identificaron presuntivamente a las Bacterias Lácticas como cocos o bacilos Gram positivos, con catalasa y oxidasa negativos. No obstante, en la Tabla 18, se incluye el tipo de fermentación, como una clasificación de las BAL, dependiendo a la ruta metabólica

utilizada para fermentar la glucosa, de acuerdo con la bibliografía consultada, las Bacterias Ácido Lácticas homofermentativas son capaces de degradar la glucosa vía glucólisis, produciendo ácido láctico; por el contrario, las Bacterias Ácido Lácticas heterofermentativas utilizan la ruta de las pentosas para generar ácido láctico, CO₂, ácido acético y/o etanol según Vélez Ruiz et al. (2016); M. Zuñiga, et al (1992). Dicho lo anterior, se pudieron identificar 6 Bacterias Ácido Lácticas capaces de utilizar las pentosas para generar ácido láctico, la mayoría de ellos son cocos Gram positivos, mientras que las demás BAL son capaces de producir ácido láctico por medio de la glucólisis.

Por otro lado, de acuerdo con Gómez (2018), las BAL también se puede clasificar según su temperatura de crecimiento en mesófilas, termófilas y psicrótrofas, sin embargo esta prueba se realizó de acuerdo a Huertas (2010), a temperaturas de 20 °C, 25 °C, 40 °C y 45 °C, para enfocar más a bacterias con temperatura ideal de incubación entre 20- 25°C (Mesófilas) y 40-45°C (Termófilas), de la Tabla 18, se observa que la mayoría de las bacterias tienen muy buen crecimiento a temperaturas de incubación entre 20- 25°C, además se apreciaron cepas que presentaron crecimiento hasta los 40-45°C de incubación por lo tanto estas cepas se consideran Termófilas. Existen casos como se puede apreciar en la Tabla 18, donde el crecimiento se dio en todas las temperaturas experimentales infiriendo que estos aislados pueden ser expuestos a extremas temperaturas, sin embargo, se logró observar un mayor crecimiento a ciertas temperaturas es por ello que las abreviaciones hacen referencia a un buen y poco crecimiento haciendo referencia a lo antes mencionado. Finalmente cabe destacar que la mayoría de las Bacterias Ácido Lácticas se consideran Mesófilas.

La fermentación de carbohidratos se realizó con 6 azúcares disponibles en laboratorio, Tabla 19, la mayoría de las cepas son capaces de fermentar todos los azúcares este resultado se interpreta en el cambio del medio a un color amarillo, sin embargo, en algunos casos se logró observar una fermentación débil ya que el color del medio no cambió directamente a amarillo, sino el color observado fue un naranja amarillento. Además, en la Tabla 19, se observa que existen 3 cepas BAL que no son capaces de

fermentar la Lactosa, de acuerdo con Santos (1993), aquellas cepas que no fermentan la Lactosa pertenecen al género *Pediococcus*, por el contrario, López Sánchez *et al.*, (2020) ha reportado que el género *Weisella* no fermenta la Lactosa.

Tabla 19. Resultado de los perfiles de fermentación de carbohidratos de cepas de BAL.

AZUCAR	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltosa	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+	D
Lactosa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	D	D	D	D	+	D	+	-
D-Fructuosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactosa	+	+	+	+	D	D	+	+	-	+	+	D	+	-	D	D	+	+	D	D	+

Abreviaciones: D, débil; +, positivo; -, negativo;

En otras palabras, se lograron identificar 21 de BAL, de las cuales 6 cepas (L4, L7, L8, L10, L11, L12) coinciden con características fenotípicas y bioquímicas pertenecientes al género de *Leuconostoc* spp además la caracterización morfológica que presenta como el color de las colonias confirman el género antes mencionado, además se lograron identificar a la mayoría de los aislados de las muestras de mosto de mezcal artesanal como Bacterias Ácido Lácticas pertenecientes al género de los *Lactobacillus*.

6.5 CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LAS DISTINTAS CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS

La morfología bacteriana analizada de las 20 cepas de BAA coinciden con las estudiadas en la literatura, donde las cepas de BAA presentan tinción Gram negativa, las cuales presentan forma elipsoidal en parejas o formando cadenas alargadas como se muestra en la Tabla 16.

De acuerdo a las características fenotípicas de las BAA, se logró observar que las 20 cepas sembradas en placas de agar GYC adicionado con CaCO_3 presentan colonias de color blanco aperlado, blanco grisáceo y blancas brillantes, la mayoría de las colonias tienen una forma circular además se logran observar cepas de BAA que presentan formas irregulares, con bordes enteros, y superficies convexas y elevadas, de textura lisa y brillante; dichas cepas evidencian su metabolismo de la fuente de carbono usando la glucosa y el etanol respectivamente para la producción de ácido acético de manera que degradan el medio formando halos transparentes, Figura 46, de acuerdo a lo mencionado por Gerard, (2015).

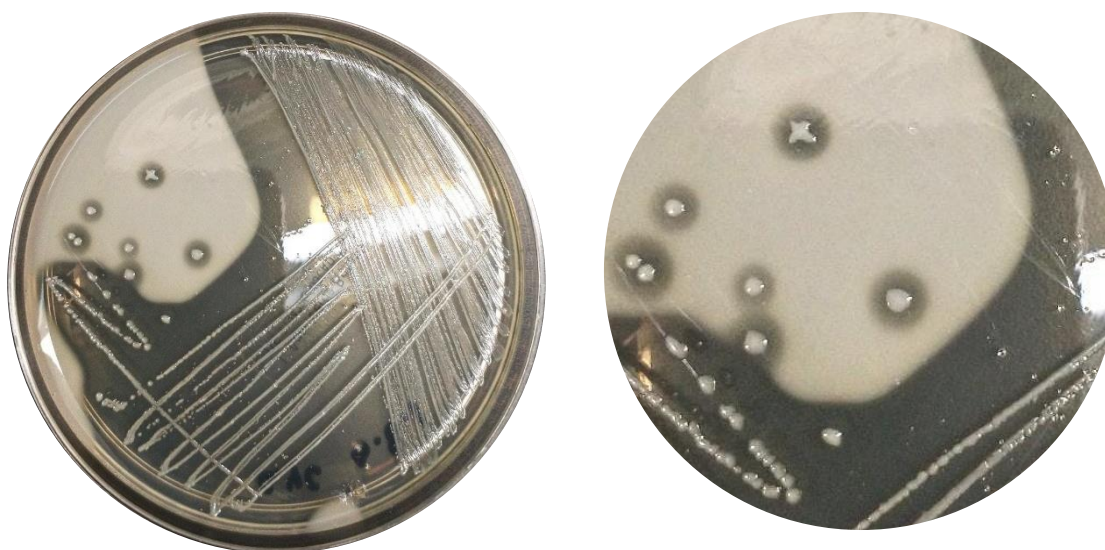


Figura 44. Crecimiento de BAA en medio GYC para la detección de producción de ácido acético.

Las cepas fueron resembradas en medios dirigidos especialmente para BAA como lo es el medio GEY el cual contiene mayor porcentaje de etanol y se disolvió con CaCO_3 para confirmar que las cepas si son capaces de producir ácido acético, en la Tabla 20 se observa que todas las cepas son capaces de tener un buen crecimiento en el medio GEY, además estas cepas fueron sembradas en Agar Glutamato y Agar Manitol, aunque hay discrepancia al respecto de que las bacterias acéticas no utilizan como fuente de carbono el glutamato y el manitol, en cambio otros autores mencionan que las BAA débilmente utilizan el manitol como fuente de carbono y no mencionan nada respecto al glutamato, Malimas *et al*, (2013) y otros autores mencionados por Gerard, (2015) afirman que este

grupo de bacterias no logran crecer en agar glutamato, pero que el crecimiento en agar manitol es más variable según la especie de BAA a tratar, mientras que otros afirman que si logran crecer en agar glutamato y lentamente en agar manitol. Sin embargo en la presente tesis se realizó esta prueba para observar si las cepas que tenemos logran crecer infiriendo a una incubación de 10 días de acuerdo con Gerard, (2015), en la Tabla 20 se acentó el crecimiento en los dos medios en los que se observa que hubo mejor crecimiento (++) en las placas de agar manitol sin embargo al comparar el crecimiento con las placas de agar glutamato se observa en mayor cantidad cepas inhibidas en el crecimiento (+).

Tabla 20. Crecimiento en medios dirigidos para Bacterias Ácido Acéticas.

CEPA	MEDIO GEY – CaCO ₃	AGAR GLUTAMATO	AGAR MANITOL
A1	++	++	++
A2	++	+	+
A3	++	+	++
A4	++	+	+
A5	++	++	++
A6	++	+	++
A7	++	++	++
A8	++	+	+
A9	++	++	++
A10	++	++	++
A11	++	+	+
A12	++	+	++
A13	++	++	++
A14	++	++	+
A15	++	+	+
A16	++	+	+
A17	++	++	++
A18	++	+	++
A19	++	+	+
A20	++	+	+
Abreviaciones: ++, buen crecimiento; +, poco crecimiento; NC, no hay crecimiento.			

Conforme a lo citado por Gerard (2015), se consideran Bacterias Ácido Acéticas (Tabla 21), aquellas bacterias que presentan una catalasa positiva y oxidasa negativa, sin embargo, no se realizó la prueba de oxidasa ya que se necesitan recursos para adquirir discos de papel impregnados con oxalato de p-aminodimetilanilina necesarios para realizar esta prueba. Cabe resaltar que todas las cepas observadas son bacilos largos o elipsoidales capaces de producir todas ácido acético como se aprecia en la Tabla 15 y en la Tabla 21, además podemos apreciar 3 aspectos añadidos como son la 1) oxidación de acetato, 2) oxidación de etanol a CO₂ y la 3) formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol. En el caso 1) es necesario cuidar el pH (6.4) antes de la inoculación ya que esto puede inferir a resultados erróneos a la hora de leer los resultados, esta prueba muestra la alcalinización del medio que contiene azul de bromotimol (verde a azul) debida a la oxidación del sustrato (acetato) interpretando la prueba como positiva en un rango de pH superior o mayor a 6.4, cabe resaltar que hubo cepas que acidificaron (pH < 6.4) el medio tiñendo el medio de color amarillo además también se observó una ligera oxidación del sustrato al observar que la alcalinización del medio fue entre un pH de 6.5 y 6.6 por lo que se consideró un cambio débil en esta oxidación. Para el caso 2) Gerard (2015), menciona que la oxidación del etanol forma ácido acético y la oxidación de esta forma CO₂ y H₂O interpretando el resultado como positivo al cambio del color del medio de azul a amarillo y posterior a un color verde azulado esto debido al indicador (verde de bromocresol) cabe resaltar que todos los resultados se consideran negativos al no presentar el cambio en el color del medio como lo menciona Gerard (2015). En el caso 3) es una prueba poco realizada por autores que tratan de identificar BAA, sin embargo, Malimas et al, (2013) infiere con resultados comprobados molecularmente que hay géneros de BAA que son capaces de formar dihidroxiacetona al poner en evidencia cepas sembradas en placas de agar con glicerol y añadir solución Fehling al finalizar los 10 días de incubación el cual evidencia que las cetosas se isomerizan fácilmente a las correspondientes aldosas que se oxidan tiñendo las cepas de color rojo ladrillo o naranja ladrillo, por lo que a partir de este punto se puede descartar e inferir que género de BAA de acuerdo a Blanco de la Cruz, (2016), puede ser cada una de las cepas estudiadas.

Al observar la Tabla 21 logramos observar 10 cepas (A4, A5, A7, A8, A10, A14, A15, A16, A19 y A20) que presentan resultados positivos a la mayoría de las pruebas pertenecientes a Bacterias acéticas pertenecientes al género *Gluconobacter* esto al comparar dichos resultados con Gerard (2015), además se observaron las cepas A3, A11 y A12 que por su debil resultado para la prueba de oxidacion de acetato son probables a pertenecer al género antes mencionado. Los aislados A2, A17 y A18 se identificaron como *Saccharibacter* y las cepas A1, A6, A9, A13 se identificaron como *Asaia*.

Tabla 21. Características funcionales de las cepas aisladas de BAA recuperadas de dos muestras de mezcal artesanal de *A. angustifolia*.

CEPA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de AA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidación de acetato	D	-	D	-	+	D	+	-	D	+	D	D	+	-	+	+	-	+	+	+
PRODUCCIÓN DE AA A PARTIR DE FUENTES DE CARBONO																				
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructuosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Etanol	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Oxidación de etanol a CO₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dihidroxiacetona a partir de glicerol	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Abreviaciones: D, débil; +, positivo; -, negativo;																				

RELACIÓN DE CEPAS CONSERVADAS

Es importante destacar que se integró al banco de cepas del Laboratorio de Control Ambiental en el Instituto Tecnológico de Oaxaca las bacterias trabajadas a lo largo de este proyecto (BAL y BAA) las cuales son microorganismos nativos del proceso de producción del mezcal artesanal con *A. angustifolia*.

La nomenclatura asignada para cada una de las bacterias conservadas lleva una combinación de letras, como se muestra en la Tabla 21, que ayudó a asignar el código correspondiente a cada una de las cepas bacterianas conservadas, como se muestra en la Tabla 22 y Tabla 23.

Tabla 22. Nomenclatura utilizada para el código asignado según el banco de cepas del Laboratorio de Control Ambiental.

ITO	BAA (A) BAL (L)	Palenque San Pedro, Teozacoalco (IV) Tapanala, Yautepec (VI)	Número consecutivo correspondiente
-----	--------------------	---	---------------------------------------

Tabla 23. Nomenclatura asignada a cada cepa purificada de la muestra 1 de acuerdo al banco de cepas del Laboratorio de Control Ambiental.

MUESTRA 1			
BAA		BAL	
A1	ITOAIV050	L1	ITOLIV050
A2	ITOAIV051	L2	ITOLIV051
A3	ITOAIV052	L3	ITOLIV052
A4	ITOAIV053	L4	ITOLIV053
A5	ITOAIV054	L5	ITOLIV054
A6	ITOAIV055	L6	ITOLIV055
A7	ITOAIV056	L7	ITOLIV056
A8	ITOAIV057	L8	ITOLIV057
A9	ITOAIV058	L9	ITOLIV058
A10	ITOAIV059	L10	ITOLIV059
A11	ITOAIV060	L11	ITOLIV060
A12	ITOAIV061		
A13	ITOAIV062		
A14	ITOAIV063		
A15	ITOAIV064		
A16	ITOAIV065		
A17	ITOAIV066		
El código de la columna derecha es el asignado según el banco de cepas del laboratorio de control ambiental.			

Tabla 24. Nomenclatura asignada a cada cepa purificada de la muestra 2 de acuerdo al banco de cepas del Laboratorio de Control Ambiental.

MUESTRA 2			
BAA		BAL	
A1	ITOAVI011	L12	ITOLVI007
A2	ITOVVI012	L13	ITOLVI008
A3	ITOVVI013	L14	ITOLVI009
		L15	ITOLVI010
		L16	ITOLVI011
		L17	ITOLVI012
		L18	ITOLVI013
		L19	ITOLVI014
		L20	ITOLVI015
		L21	ITOLVI016
El código de la columna derecha es el asignado según el banco de cepas del laboratorio de control ambiental.			

CAPITULO 7. CONCLUSIONES

El estudio microbiológico de las dos muestras de mostos derivadas del proceso de producción de mezcal artesanal pertenecientes a palenques productores de mezcal (San Pedro Teozacoalco y San Carlos Yautepec) ha revelado que debido al tiempo de fermentación de las mismas muestras se recuperaron el mayor número de BAA y BAL.

La caracterización funcional realizada a cada grupo de bacterias permitió tipificar a cada una de las bacterias a nivel de géneros identificados por medio de características fenotípicas y bioquímicas; reconociendo 2 géneros principales en bacterias ácido lácticas de acuerdo con Ramírez *et al.*, (2016): 6 aislamientos fueron identificados como *Leuconostoc*, 12 como *Lactobacillus*, asimismo, comparado con Santos W.L, (1993), se pueden identificar 3 aislamientos que presentan características pertenecientes al género *Pediococcus*, no obstante, al comparar los aislamientos con los géneros reportados por López Sánchez *et al.*, (2020) se encuentran características pertenecientes al género *Weisella*; asimismo, comparado con Gerard, (2015);Malimas *et al.*,(2013), se lograron tipificar a nivel género 20 cepas de bacterias ácido acéticas: 4 como *Asaia*, 3 como *Saccharibacter* y 13 como *Gluconobacter*.

Finalmente, se logró generar un banco de bacterias nativas derivadas del proceso de producción del mezcal artesanal con *A. angustifolia* para estudios posteriores dentro del Laboratorio de Control Ambiental en el Instituto Tecnológico de Oaxaca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asai, T., Iizuka, H., & Komagata, K. (1964). THE FLAGELLATION AND TAXONOMY OF GENERA GLUCONOBACTER AND ACETOBACTER WITH REFERENCE TO THE EXISTENCE OF INTERMEDIATE STRAINS. *Revista de Microbiología General y Aplicada*, Vol. 10(No. 2). Obtenido de https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam1955/10/2/10_2_95/_pdf/-char/en
- Bautista, J. A., Orozco Cirilo, S., & Terán Melchor, E. (Agosto - Septiembre de 2015). La disminución de la producción artesanal de mezcal en la Región del mezcal de Oaxaca, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, Vol. 6(No.6). Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015000600012
- Becton Dickinson & Company (BD). (Junio de 2003). BD LBS Agar (Lactobacillus Selection Agar). *INSTRUCCIONES DE USO – MEDIOS EN PLACA LISTOS PARA USAR*. Obtenido de <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-255011.pdf>
- Bernal Martínez, C. L., & Cortés Páez, L. M. (2011). *AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-ACÉTICAS A PARTIR DE PRODUCTOS FERMENTADOS TRADICIONALES COMO UNA HERRAMIENTA PEDAGÓGICA*. Tesis de Pregrado, Universidad Pedagógica Nacional (UPN), Bogotá, Colombia. Obtenido de <https://revistas.pedagogica.edu.co/index.php/biografia/article/view/811/1741>
- Blanco de la Cruz, L. I. (2016). *BIO-CONVERSIÓN MICROBIANA DEL GLICEROL POR MICROORGANISMOS TERMOTOLERANTES AISLADOS DEL NORESTE DE MÉXICO*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN, FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, Monterrey, N.L. Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/14027/1/1080237778.pdf>
- Briones, M. T. (2009). *Microbiología Aplicada*. Azcapotzalco: Universidad Autónoma Metropolitana. Obtenido de http://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/1746/Microbiologia_aplicada_manual_de_laboratorio.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Briones, M. T. (2009). *Microbiología Aplicada*. Azcapotzalco: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. (1999). *Tecnificación del proceso de fabricación del mezcal*. Oaxaca.
- CIATEJ. (2014). *Manual para la estandarización de los procesos de producción del mezcal guerrerense*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Guadalajara, Jalisco. México: Fundación Produce de Guerrero. Obtenido de <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/569/1/manualmezcalguerrerense.pdf>
- COMERCAM. (24 de Mayo de 2021). *COMERCAM A.C.*

- Condalab. (2019). *Agar GYC - CaCO₃*. Obtenido de www.condalab.com.mx
- Condalab. (13 de 05 de 2019). *Condalab*. Obtenido de Agar MRS: <http://www.condalab.com/>
- Condalab. (14 de 05 de 2019). *Condalab*. Obtenido de Agar GYC: <https://www.condalab.com/>
- Condalab. (2021). *Agar MRS*. Obtenido de www.condalab.com
- Condalab. (2021). *Medio Elliker*. Obtenido de <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1218-14492-medio-elliker.html>
- Diario Oficial de la Federación. (Noviembre de 1994). *RESOLUCION mediante la cual se otorga la protección prevista a la denominación de origen Mezcal, para ser aplicada a la bebida alcohólica del mismo nombre*. Obtenido de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4768551&fecha=28/11/1994#gsc.tab=0
- Diario Oficial de la Federación. (1997). *NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones*. Norma Oficial Mexicana, Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisi Sectorial y Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial, México. Recuperado el 14 de Mayo de 2022, de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4883475&fecha=12/06/1997#gsc.tab=0
- Diario Oficial de la Federación. (2012). *Modificación a la Declaracion General de Protección de la Denominacion de Origen Mezcal*. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Oaxaca de Juárez. Obtenido de <file:///C:/Users/GATEWAY/Downloads/2750-12268-2-PB.pdf>
- Diario Oficial de la Federación. (Febrero de 2017). *NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones*. Obtenido de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017#gsc.tab=0
- Dirección General de Comunicación Social. (2015). *Denominación de Origen del Mezcal*. Secretaría de Economía. México: Secretaria de Relaciones Exteriores. Obtenido de <https://consulmex.sre.gob.mx/mcallen/images/stories/PDF/2016/spmezcal.pdf>
- Espinoza Martínez, V. A., Jiménez Pacheco, A. d., Palma Cruz, F. d., & López Sánchez, C. (31 de Diciembre de 2020). Diversidad microbiana presente durante la fermentación del proceso de producción artesanal de mezcal en Coixtlahuaca, Oaxaca. *Revista del Centro de Graduados e Investigación*, 67-73.
- Esqueda Valle, M., Coronado Andrade, M. L., Gutiérrez Saldaña, A. H., & Fragoso Gadea, T. (s/f). *Agave angustifolia* Haw. *Técnicas para el trasplante de vitroplantas a condiciones de agostadero*. SAGARPA, SINAREFI, CIAD A.C., Universidad Estatal de Sonora, Sonora. Obtenido de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/168835/Agave_angustifolia_Haw._T_cnicas_para_el_Transplante_de_Vitroplantas_a_Condiciones_de_Agostadero.pdf

- Fiorelli, A. L. (2003). *Aislamiento, identificación y estudio de características de interés tecnológico de cepas pertenecientes al género Lactobacillus*. Universidad de la Republica, Facultad de veterinaria, Montevideo, Uruguay.
- Fuentes R., L. E., Tapia H., A., Jimenez S., T., Mascaría E., M. Á., Santoyo P., Y., Caso V., L. R., . . . Castillo R., M. G. (marzo-mayo de 2003). Bacterias acéticas: diversidad e interaccion con las plantas. *Elementos: ciencia y cultura*, Vol.10(No. 049), 47-51. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/294/29404906.pdf>
- García Mendoza, A. J. (2004). *Biodiversidad de Oaxaca* (Primera edición, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza ed.). (A. J. García Mendoza, M. d. Ordoñez, & M. Briones Salas, Edits.) México. Obtenido de https://books.google.com.pe/books?id=TQfX0cL3ieQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- García S., A. (2003). *El mezcal y su importancia para el desarrollo económico del estado de Oaxaca. El sector exportador: retos y oportunidades en el mercado de la Unión Europea*. Tesis Profesional, Escuela de Ciencias Sociales, Universidad de las Américas Puebla., Departamento de Relaciones Internacionales e Historia., Cholula, Puebla, México. Obtenido de http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lri/salvatierra_g_a/
- García, Y., Nereyda , A., Herrera, F., Núñez, O., & Dieppa, O. (2008). Crecimiento de bacterias ácido lácticas y levaduras durante la fermentación líquida de excretas de pollos de ceba para la obtención de probióticos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*.
- Gerard, L. M. (2015). *Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas*. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/59401/GERARD%20-%20Caracterizaci%C3%B3n%20de%20bacterias%20del%20%C3%A1cido%20ac%C3%A9tico%20destinadas%20a%20la%20producci%C3%B3n%20de%20vinagres%20de....pdf?sequence=1>
- Gómez, M. E. (2018). *Identificación de microorganismos termodúricos provenientes de leche cruda productores de enzimas de deterioro, y evaluación de su actividad en biofilms*. Facultad de Agronomía, Unidad de Tecnología de los Alimentos, Montevideo, Uruguay. Obtenido de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21393/1/uy24-19243.pdf>
- Heredia Castro, P. Y., Hernández Mendoza, A., Gonzáles Córdova, A. F., & Vallejo Cordoba, B. (Junio de 2017). Bacteriocinas de Bacterias Ácido Lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. (A. Interciencia, Ed.) *Interciencia*, Vol. 42(No. 6), pp. 340-346. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/339/33951621002.pdf>
- Hernández, I., & Barbero, F. (2008). *Bacterias acéticas: técnicas de detección y eliminación*. Departamento Técnico Guserbiot, S.L., San Luis. Obtenido de http://www.guserbiot.com/pdf/Guserbiot_Viticultura_Bacterias_Aceticas.pdf

- Hernández, V. C. (2015). *Importancia Económica de la Producción del Mezcal en el Estado de Oaxaca*. Monografía, División de Ciencias Socioeconómicas, Departamento de Economía Agrícola, Buena Vista, Saltillo, Coahuila, México. Recuperado el 14 de Mayo de 2022, de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7738/63769%20CASIAN%20HERNANDEZ%2C%20VICTORIA%20%20MONOG.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hidalgo Reyes, M., Cruz Meza, P., & Pérez Hernández, L. M. (2010). TECNIFICACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE MEZCAL, EN EL ESTADO DE OAXACA, MÉXICO. En U. A. Chapingo (Ed.), *XIV INTERNATIONAL CONGRESS ON PROJECT ENGINEERING*, (pág. 13). Madrid.
- Huertas, R. A. (2010). *BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS: PAPEL FUNCIONAL EN LOS ALIMENTOS*. Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Química y Tecnología de Alimentos., Colombia. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>
- Jiménez Pacheco, A. d., Espinoza Martínez, V. A., López Sánchez, C., & Palma Cruz, F. d. (2021). Dinámica poblacional del consorcio microbiano de la fermentación del mezcal de concepción Buenavista, Coixtlahuaca, Oaxaca. *Revista Mexicana de Investigación en Productos Naturales*, Vol. 1(Num. 1), 190. Obtenido de www.amipronat.org.mx
- Kandler, O. (1983). *Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria*. Botanisches Institut, University of Miinchen. Germany: Antonie van Leeuwenhoek.
- López Sánchez, C., Espinoza Martínez, V. A., & Palma Cruz, F. d. (30 de Septiembre de 2020). Consorcio microbiano de la fermentación del mezcal artesanal de San Dionisio Ocotepec, Oaxaca. *Revista del Centro de Graduados e Investigación*, Vol. 35(Num. 83), 44-47.
- López Sánchez, C., Espinoza Martínez, V. E., & Palma Cruz, F. d. (2020). CONSORCIO MICROBIANO DE LA FERMENTACIÓN DEL MEZCAL ARTESANAL DE SAN DIONISIO OCOTEPEC, OAXACA. *Revista del Centro de Graduados e Investigación*, 44-47.
- López Sánchez, C., Reyes Rodríguez, E., & Palma Cruz, F. d. (Diciembre de 2019). BAGAZO DE AGAVE ANGUSTIFOLIA Y TOTOMOXTE, COMO SUPLEMENTO FORRAJERO ENRIQUECIDO CON PLEUROTUS OSTREATUS. (D. S. Torres, Ed.) *Contribución al Conocimiento Científico y Tecnológico en Oaxaca*, 30-36. Obtenido de https://web.ciidiroaxaca.ipn.mx/cccto/sites/web.ciidiroaxaca.ipn.mx/cccto/files/pdf/cccto/cccto_vol3_num-especial-agave-mezcal-2019.pdf
- M. Mota, P. (s/f). *Morfología y estructura bacteriana*.
- M. Zuñiga, I. Pardo, & S. Ferrer. (1992). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 37-42.
- Malimas, T., Winai, C., Huong Thi, L., Pattaraporn, Y., Muramatsu, Y., & Tanasupawat, S. (17 de June de 2013). *Swingsia samuiensis* gen. nov., sp. nov., an osmotolerant acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Revista de Microbiología General y Aplicada*, Volumen 59, 375-384. Obtenido de https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/59/5/59_375/_article

- Mendoza, A. J. (Noviembre de 2017). México, país de Magueyes y Mezcales. (L. J. Orozco, Ed.) *Tecno Agave*(No. 50), 25. Obtenido de <http://www.agared.org/sites/default/files/informes2017/2.%20Tecnoagave%20Num.%2050-%20Noviembre-%20Diciembre%202017.pdf>
- Ministerio de Industria, Energía y Turismo, dentro del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011. (23 de Marzo de 2010). Identifican bacterias presentes en la fermentación del pulque y del mezcal para obtener bebidas de mejor calidad. *Agencia Iberoamericana para la Difusión de la Ciencia y la Tecnología (DCYT)*. Obtenido de <https://www.dicyt.com/noticias/identifican-bacterias-presentes-en-la-fermentacion-del-pulque-y-del-mezcal-para-obtener-bebidas-de-mejor-calidad>
- Muñoz, F. A. (2010). *ASLAMIENTO DE BACTERIAS Lactobacillus s.p y LEVADURAS A PARTIR DE PRODUCTOS LACTEOS ARTESANALES Y EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTAGONICA IN VITRO*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA, BOGOTA COLOMBIA. Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8624/tesis584.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- NOM-070-SCFI-1994. (1997). *NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones*. DOF - Diario Oficial de la Federación. Obtenido de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4883475&fecha=12/06/1997#:~:text=Esta%20NOM%20establece%20las%20caracter%C3%ADsticas,bebida%20alcoh%C3%B3lica%20destilada%20denominada%20mezcal.
- Olivares, F. G. (2011). *Producción de ácidoláctico por medio de fermentación anaerobia y su polimerización a partir de reacciones de apertura de anillo*. Tesis para obtener el título de M. C. de Materiales Poliméricos, Centro de Investigación de Yucatán, A.C., Departamento de Posgrado en Materiales Poliméricos, Mérida, Yucatán. Obtenido de https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1333/1/PMP_M_Tesis_2011_Fati_ma_Orozco_Olivarez.pdf
- Palma Cruz, F. d., Pilae Pérez, & Vinicio Meza. (2016). *Diagnóstico de la Cadena de Valor Mezcal en las Regiones de Oaxaca*. COPLADE., Oaxaca, México. Obtenido de <http://www.coplade.oaxaca.gob.mx/wp-content/uploads/2017/04/Perfiles/AnexosPerfiles/6.%20CV%20MEZCAL.pdf>
- Pérez, C. A. (2010). *Aplicación de Métodos Moleculares para el Estudio de las Bacterias Acéticas Implicadas en la Elaboración de Vinagre de Vino Tradicional*. Tesis Doctoral, Universidad Rovira Y Virgili, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Tarragona. Obtenido de <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/32784/TESl.pdf?sequence=1>
- Porcayo, G. G. (23 de Septiembre de 2016). *Microorganismos en las bebidas fermentadas de Agaves*. Obtenido de Ciencia.mx: <http://www.cienciamx.com/index.php/ciencia/mundo-vivo/10428-estudian-microorganismos-en-las-bebidas-fermentadas-del-agave>

- Ramírez López, C., & Vélez Ruiz, J. F. (2016). *Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra*. (Vol. Vol. 27). Cholula., Puebla, México. Obtenido de https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642016000600012
- Ramírez Ramírez, J. C., Rosas Ulloa, P., Velázquez Gonzáles, M. Y., Armando Ulloa, J., & Arce Romero, F. (S.f.). *Bacterias Lácticas: Importancia en los alimentos y sus efectos en la salud*. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nayarit, Centro de Tecnología de Alimentos, Universidas Autónoma de Nayarit. Obtenido de <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>
- Reynoso Santos, R., López Báez, W., García Mendoza, A. J., Pérez Farrera, M. A., Cadena Iñiguez, P., & Domínguez Gutiérrez, M. H. (Julio-Agosto de 2012). Identificación Taxonómica de agaves (*Agave* spp.) Utilizados para la Elaboración del Licor Comiteco en Chiapas, México. (S. I. Gil, Ed.) *Agroproductividad*, 5(No. 4), 48. Obtenido de https://www.colpos.mx/wb_pdf/Agroproductividad/2012/AGROPRODUCTIVIDAD_IV_2012.pdf
- Ríos Ramírez, S. d., Enríquez del Valle, J. R., Rodríguez Ortiz, G., Ruiz Luna, J., & Velasco Velasco, V. A. (13 de Agosto de 2021). El crecimiento de *Agave angustifolia* Haw. con relación a la condición nutrimental. (I. T. Teposcolula., Ed.) *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Vol. 12(No. 5). Obtenido de <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/2638/4422>
- Santos, W. L. (1993). *AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR *Pediococcus* sp. 347, DE ORIGEN CÁRNICO*. Memoria para optar al grado de Doctoren Veterinaria, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Departamento de Nutrición y Bromatología III, Madrid. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/id/eprint/3192/1/T18956.pdf>
- Solórzano, M. C. (2008). *Identificación de levaduras y bacterias que participan en la producción de Pulque mexicano*.
- Toshinobu, A., Kazou, K., & Hiroshi, I. (6 de Marzo de 1964). THE FLAGELLATION AND TAXONOMY OF GENERA GLUCONOBACTER AND ACETOBACTER WITH REFERENCE TO THE EXISTENCE OF INTERMEDIATE STRAINS. *Revista de Microbiología General y Aplicada*, Vol. 10(No. 2), 95-125. Obtenido de https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam1955/10/2/10_2_95/_pdf/-char/en
- Valdez, J. G. (2017). Breviario Mezcalero. En J. G. Valdez, *Regionalismos y términos comunes, antiguos y contemporáneos del proceso de la elaboración del mezcal* (Primera Edición ed., pág. 198). Guadalajara, Jalisco, México: Alejandra Saenz. Obtenido de https://drive.google.com/file/d/1BJ4oLThwxActR_JCJ5vGhr6_Dh_oElnP/view
- Vázquez García, J. A., Cházaro Basáñez, M., Hernández Vera, G., Vargas Rodríguez, Y. L., & Zamora T., M. d. (2007). *Taxonomía del género Agave en el occidente de México: una panorámica preliminar*. Colima, Jalisco, Michoacán, México. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/256082577_Taxonomia_del_genero_Agave_en_el_o](https://www.researchgate.net/publication/256082577_Taxonomia_del_genero_Agave_en_el_occidente_de_Mexico_una_panoramica_preliminar)
[ccidente_de_Mexico_una_panoramica_preliminar](https://www.researchgate.net/publication/256082577_Taxonomia_del_genero_Agave_en_el_o)

Zuñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 37-42.