

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

TESIS PROFESIONAL

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS
PRESENTES EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE
MEZCAL ARTESANAL EN OAXACA, CON *Agave*
angustifolia HAW.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

ADRIANA PALACIOS JAURI

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

DEDICATORIA

A mí madre, que siempre me ha dado su amor y apoyo incondicional.

A mí abuela, que ha sido otra mamá y me da fuerza día a día.

A mí abuelo, que en paz descanse que cuidó mi alma y me dio seguridad hasta el último de sus días.

A mí hermana, que es motivación y amor en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Tecnológico de Oaxaca, por formarme como estudiante de la carrera de Ingeniería Química; así como al departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, y al Laboratorio de Control Ambiental por darme el espacio para realizar este trabajo.

A la Dra. Claudia López Sánchez por su dirección, por siempre estar al tanto de lo que llegara a necesitar e impulsarme a dar lo mejor en este trabajo, por estar abierta a nuevas ideas y brindarme total apoyo a lo largo del mismo; por la oportunidad y confianza de abrir las puertas del laboratorio del que está a cargo.

Gracias al M.C. Víctor Adrián Espinoza Martínez, de quien aprendí cosas nuevas, que me brindó su apoyo y consejo en la adaptación del trabajo dentro del laboratorio, así como su guía constante.

A mi madre, por apoyarme durante mi vida académica, por hacerme una persona de bien y guiarme en cada paso a lo largo de mi vida; gracias a su apoyo y enseñanzas he llegado a este momento.

A mi otra madre, por sus cuidados y constante apoyo, de quien aprendí a ser fuerte y siempre mirar hacia adelante.

A mi abuelo, por apoyar mis decisiones, aunque no siempre eran de su total agrado, por enseñarme de amabilidad y sobre todo de servicio a los demás, en paz descanse.

A mi hermana, por ser inspiración constante a superarme para hacerla sentir orgullosa, por hacerme sentir apreciada y acompañada en cada etapa de mi vida.

A mis tíos, Daniel y Guadalupe, quienes han sido desde que tengo memoria ejemplo a seguir e impulso para llegar a este momento.

Por último, gracias a todos mis amigos y compañeros dentro del laboratorio de control ambiental por estar conmigo, resolver dudas y darme su apoyo constante, por las risas, los llamados de atención y por su puesto su compañía.

CONTENIDO

RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
1.2. JUSTIFICACIÓN	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	14
3.1. ANTECEDENTES	14
3.2. AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW.....	15
3.3. PRODUCCIÓN DE MEZCAL.....	16
3.3.1. ETAPAS DE PRODUCCIÓN.....	16
3.3.2. CATEGORÍAS DE MEZCAL	17
3.4. LEVADURAS	18
3.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES	19
3.4.2. FERMENTACIÓN DE LEVADURAS	19
3.4.3. MÉTODOS CONVENCIONALES PARA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1. MUESTREO.....	21
4.2. AISLAMIENTO	21
4.3. PURIFICACIÓN DE LAS CEPAS	22
4.4. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA	23
4.5. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	24

4.6.	AISLAMIENTO DIRIGIDO	24
4.7.	FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS	25
4.7.1	Preparación de CBRF, azúcares e inoculación	25
5.	RESULTADOS	26
5.1.	GRADOS Brix, pH Y UFC.	26
5.2.	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN	27
5.3.	OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA	27
5.4.	OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	28
5.5.	AISLAMIENTO DIRIGIDO.....	29
5.6.	FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS.....	30
5.7.	CEPAS IDENTIFICADAS.....	31
6.	CONCLUSIONES.....	32
	REFERENCIAS	33

ÍNDICE DE ILUSTACIONES

Ilustración 1. Diluciones seriadas de la muestra	21
Ilustración 2. Estriado en medio sólido.....	22
Ilustración 3. Criterio de coloración para pruebas bioquímicas.....	25
Ilustración 4. Colonia Y2 en medio ADS	27
Ilustración 5. Morfología macroscópica A. Basidomiceta B. Subglobosa ovoide	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de colonias seleccionas en medio YPD de las muestras 1 y 2.....	22
Tabla 2. Caracterización Macroscópica de las colonias	23
Tabla 3. Datos de las muestras recabados en el laboratorio	26
Tabla 4. Conteo de colonias y UFC/ml de la muestra 1 y 2, en medio YPD	26
Tabla 5. Morfología macroscópica de las colonias aisladas en medio ADS	27
Tabla 6. Forma celular de las cepas aisladas con tinción simple con azul de metileno	28
Tabla 7. Crecimiento en el aislamiento dirigido.....	29
Tabla 8. Resultados de la fermentación de carbohidratos.	30
Tabla 9. Cepas identificadas de cada muestra y código en la colección del Laboratorio de Control Ambiental	31

RESUMEN

Los procesos para la producción de alcohol pueden llevarse a cabo por síntesis química o biológica; la producción por vía biológica ha sido utilizada y estudiada desde hace algunos años, por ello se sabe que entre los microorganismos productores de etanol más utilizados se encuentran las levaduras del género *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, que pueden ser utilizadas como materia de base para procesos de síntesis química, o para la producción de bebidas alcohólicas. La identificación y el aislamiento de las levaduras presentes en el proceso de producción de mezcal artesanal en Oaxaca, con *Agave angustifolia* Haw, es esencial para comprender mejor el proceso de fermentación y para desarrollar técnicas para controlar la calidad y la pureza del mezcal producido. Es por ello que los objetivos del presente trabajo fueron aislar cepas de las muestras de dos mostos de fermentación de tipo artesanal de *Agave angustifolia* Haw, realizar un aislamiento dirigido de las cepas aisladas para posteriormente identificar las cepas aisladas por métodos convencionales. Para conseguirlo se realizó el muestreo de dos mostos de diferentes palenques, ambos de *Agave angustifolia* Haw, posteriormente se purificaron colonias que cumplían con las características morfológicas de interés, se le realizó tinción simple con azul de metileno y se sembraron en tres medios selectivos, para finalmente realizar pruebas bioquímicas que consistió en la prueba de fermentación de seis carbohidratos y así identificar el género de las cepas aisladas, de las cuales se obtuvieron tres géneros para ambas muestras *Candida*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*.

ABSTRACT

The processes for the production of alcohol can be carried out by chemical or biological synthesis; biological production has been used and studied for some years, for this reason, it is known that among the most widely used ethanol-producing microorganisms are yeasts of the genus *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*, that can be used as raw material for chemical synthesis processes, or for the production of alcoholic beverages. The identification and isolation of the yeasts present in the production process of artisan mezcal in Oaxaca, with *Agave angustifolia* Haw, is essential to better understand the fermentation process and to develop techniques to control the quality and purity of the mezcal produced. That is why the objectives of this work were to isolate strains from the samples of two

artisanal fermentation musts of *Agave angustifolia* Haw, carry out a directed isolation of the isolated strains to later identify the isolated strains by conventional methods. To achieve this, two musts from different palenques were sampled, both from K*Agave angustifolia* Haw, subsequently colonies that met the morphological characteristics of interest were purified, simple staining with methylene blue was performed and they were sown in three selective media, to finally carry out biochemical tests that consist of the six carbohydrate fermentation test and thus identify the gender of the isolated strains, of which three genera were obtained for both samples *Candida*, *Kluyveromyces* and *Saccharomyces*.

1. INTRODUCCIÓN

Los procesos para la producción de alcohol pueden llevarse a cabo por síntesis química o biológica; la producción por vía biológica ha sido utilizada y estudiada desde hace algunos años, por ello se sabe que entre los microorganismos productores de etanol más utilizados se encuentran las levaduras del género *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, que pueden ser utilizadas como materia de base para procesos de síntesis química, o para la producción de bebidas alcohólicas.

La fermentación espontanea se produce de forma natural, sin necesidad de un inóculo, existen múltiples aspectos que influyen sobre la producción de alcohol relacionadas con la fisiología, las rutas metabólicas implicadas, así como el efecto de ciertos parámetros fisicoquímicos y el ambiente de producción, esto hace que estas fermentaciones no sean producto de la acción de una única especie o cepa de levadura, se sabe que en el mezcal la fermentación se lleva a cabo por consorcios de microorganismos que trabajan en la formación de los diferentes compuestos volátiles y no volátiles presentes este.

En 2021, se produjeron aproximadamente 8.1 millones de litros de la tradicional bebida en México. En Oaxaca una de las actividades económicas más importantes es la producción de Mezcal, en su mayoría de tipo artesanal sin embargo existe una gran variedad de bebidas alcohólicas que se producen en comunidades rurales, en algunos casos estas bebidas se remontan a cientos de años volviéndose parte de la tradición de comunidades y pueblos.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El problema que se plantea en esta tesis es el desconocimiento sobre las cepas de levaduras presentes en el proceso de producción de mezcal artesanal en Oaxaca, específicamente en relación a las levaduras involucradas en la fermentación del mosto de *Agave angustifolia* Haw. A pesar de la importancia del mezcal artesanal en la cultura y economía local, existe una falta de investigación científica en este tema. El objetivo principal de esta tesis será aislar y purificar cepas de levaduras de dos mostos de fermentación de mezcal artesanal de Oaxaca con *Agave angustifolia* Haw. Además, se caracterizarán macroscópica y microscópicamente las cepas aisladas y se identificarán mediante métodos convencionales para tener un mejor entendimiento del proceso de fermentación y su impacto en la calidad y pureza del mezcal producido.

Sin duda el mezcal en Oaxaca es de gran importancia, es por esto que el conocimiento generado con este estudio puede ser utilizado para mejorar la calidad del mezcal producido y, por lo tanto, el bienestar económico de las comunidades involucradas en la producción.

1.2. JUSTIFICACIÓN

El mezcal es una bebida alcohólica originaria de México, producida a partir del proceso de fermentación y destilación del mosto de la planta de agave. En Oaxaca, el mezcal artesanal es una importante parte de la cultura y economía local, y se caracteriza por su diversidad y calidad. Sin embargo, el proceso de producción de mezcal artesanal en Oaxaca es todavía poco estudiado científicamente, especialmente en cuanto a la microbiota presente en el proceso de fermentación.

El proceso de fermentación es esencial en la producción de mezcal, ya que es durante este proceso donde se convierten los azúcares del mosto en alcohol. Además, el uso de levaduras no tradicionales puede impactar a la característica única y autenticidad del mezcal artesanal de Oaxaca.

La identificación y el aislamiento de las levaduras presentes en el proceso de producción de mezcal artesanal en Oaxaca, con *Agave angustifolia* Haw, es esencial para comprender mejor el proceso de fermentación y para desarrollar técnicas para controlar la calidad y la pureza del mezcal producido. Esto puede ayudar a garantizar la autenticidad y la calidad del mezcal artesanal de Oaxaca, y a proteger esta importante bebida que forma parte de la cultura y la economía local.

Además, el estudio de las levaduras presentes en el proceso de producción de mezcal artesanal también puede proporcionar información valiosa sobre la biodiversidad microbiana en la región de Oaxaca. Es posible que se descubran nuevas levaduras que puedan ser utilizadas en la producción de otros productos alimenticios y bebidas, lo que podría tener un impacto económico positivo en la región.

En resumen, el estudio del aislamiento e identificación de las levaduras presentes en el proceso de producción de mezcal artesanal en Oaxaca, con *Agave angustifolia* Haw, es esencial para comprender mejor el proceso de fermentación y para garantizar la calidad y autenticidad del mezcal producido. Además, puede proporcionar información valiosa sobre la biodiversidad microbiana en la región y tener un impacto económico positivo en la industria local.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar por métodos convencionales levaduras presentes durante el proceso de producción de mezcal artesanal en Oaxaca con *Agave angustifolia* Haw.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar cepas de las muestras de dos mostos de fermentación de tipo artesanal de *Agave angustifolia* Haw.
- Realizar un aislamiento dirigido de las cepas aisladas.
- Identificar las cepas aisladas por métodos convencionales.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1. ANTECEDENTES

El mezcal es una bebida alcohólica originaria de México elaborada a partir de diferentes especies de Agave; en el estado de Oaxaca una de las especies más utilizada en la elaboración de esta bebida es *Agave angustifolia* Haw, también conocida como maguey espadín. (Palma Cruz, 1991)

La definición etimológica del mezcal proviene del náhuatl Melt e Ixcalli que significan “agave cocido al horno” y es definida en la (NOM-070-SCFI-1994) como "bebida alcohólica que se obtiene por la destilación y rectificación de los mostos (o jugos) preparados directamente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, mismas que son previamente cocidas y sometidas a fermentación alcohólica"; el aroma y el sabor del mezcal se dan por la mezcla de compuestos que se producen durante la fermentación además de los proporcionados por el tipo de agave se emplea. (Hernandez Mota, 2009)

El mezcal es producido en diferentes estados de la república mexicana y la mayor producción de este se da en el estado de Oaxaca a partir de las especies de mostos destilados del *Agave angustifolia haw* y/o del agave silvestre *A. potatorum zucc.* (Hernandez Mota, 2009)

Actualmente existen numerosas investigaciones que se basan en el estudio y caracterización de las diferentes etapas de producción de bebidas alcohólicas destiladas como el mezcal, que van desde la cocción adecuada de la materia prima, así como la identificación de compuestos químicos producidos durante la cocción. En el caso de la fermentación es de vital importancia la identificación de la cepa de levadura empleada y de otros microorganismos presentes. (Pérez Hernández, et al., 2016)

3.2.AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW

La planta agave (comúnmente ‘maguey’), ofrece más de 100 formas de uso ya que se aprovechan sus hojas, tallo, flores y frutos para satisfacer varias necesidades como fuente de alimento, bebida, medicina, ornato, fibra, combustible y fertilizante, además de proporcionar empleo a las personas que le dan algún tipo de aprovechamiento. De estas, podemos destacar la producción de bebidas destiladas como el mezcal. (Barrietos Rivera, et al., 2019)

El mezcal es fabricado a partir de la fermentación y posterior destilación de mostos provenientes de diferentes especies del género *Agave*; una de las especies más utilizadas para su producción es la variedad “Espadín” de la especie *A. angustifolia*, que es de gran importancia para la industria mezcalera a nivel nacional y de un gran valor económico para Oaxaca, ya que los productores prefieren esta especie y variedad, debido a que le toma de siete a nueve años en llegar a la madurez y produce piñas de mayor tamaño; razón por la que se cultiva en mayor extensión con fines comerciales. Al llegar a la madurez (emisión del tallo floral, escapo o quiotte), la planta acumula energía en forma de azúcar en su tallo (corazón o piña), materia esencial para la obtención del alcohol; éste es el momento de la cosecha o corte, antes de florecer o formarse el quiotte. (Rodríguez Garay, et al., 2017)

Las plantas de *Agave angustifolia* que crecen en viveros tienen un mayor crecimiento en altura y diámetro de tallo, así como mayor número de hojas, área foliar y acumulación de materia seca, en comparación con el crecimiento silvestre ya que algunos factores ambientales que limitan el crecimiento y productividad de las plantas son la radiación solar, temperatura, disponibilidad de agua y el abastecimiento de nutrimentos, por ello cuando estas plantas llegan a la etapa adulta desarrollan tallos más grandes y con mayor contenido de azúcares. (Cruz García, et al., 2013)

3.3.PRODUCCIÓN DE MEZCAL

La fermentación del mezcal artesanal en Oaxaca, es de las etapas más importantes del proceso, ya que en este punto se transforman los azúcares del *Agave* en etanol, CO₂ y otros compuestos químicos, esto debido al consorcio microbiano nativo integrado principalmente por levaduras y bacterias. (López Sánchez, et al., 2020)

3.3.1. ETAPAS DE PRODUCCIÓN

La producción de mezcal comprende cinco etapas: corte o cosecha del *Agave*, cocción, molienda, fermentación y destilación. La fermentación es espontánea y de la microbiota que participa en esta etapa dependerán la rica gama de sabores y aromas del producto final. (López Sánchez, et al., 2020)

- Corte: Se cortan las pencas y raíces hasta dejar el centro del maguey al descubierto, a esta forma del maguey se le conoce como “piña”
- Cocción: El horneado tiene una duración aproximada de tres días para lograr una plena cocción, el agave cambia de color blanco a caramelo como indicador de un buen cocimiento.
- Molienda: Se desmenuza y tritura el agave cocido para obtener los mostos que se utilizarán para la fermentación.
- Fermentación: Este proceso tiene dos elementos fundamentales el agua y la temperatura; de esta última depende el tiempo que se tome en fermentar, que pueden ser de tres a cinco días.
- Destilación: Al finalizar el proceso de fermentación, los mostos se llevan a alambiques; la mezcla se calienta, se evapora y condensa lentamente a través de un serpentín. (Oaxaca Mío, 2020)

3.3.2. CATEGORÍAS DE MEZCAL

De acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones existen tres categorías de mezcal y estas son: Mezcal, Mezcal Artesanal y Mezcal Ancestral.

- **Mezcal:** Su elaboración debe cumplir con al menos las siguientes cuatro etapas y equipo:
 - Cocción: cocimiento de cabezas o jugos de maguey o agave en hornos de pozo, mampostería o autoclave.
 - Molienda: tahona, molino chileno o egipcio, trapiche, desgarradora, tren de molinos o difusor.
 - Fermentación: recipientes de madera, piletas de mampostería o tanques de acero inoxidable.
 - Destilación: alambiques, destiladores continuos o columnas de cobre o acero inoxidable.
- **Mezcal Artesanal:** Su elaboración debe cumplir con al menos las siguientes cuatro etapas y equipo:
 - Cocción: cocimiento de cabezas de maguey o agave en hornos de pozo o elevados de mampostería.
 - Molienda: con mazo, tahona, molino chileno o egipcio, trapiche o desgarradora.
 - Fermentación: oquedades en piedra, suelo o tronco, piletas de mampostería, recipientes de madera o barro, pieles de animal, cuyo proceso puede incluir la fibra del maguey o agave (bagazo).
 - Destilación: con fuego directo en alambiques de caldera de cobre u olla de barro y montera de barro, madera, cobre o acero inoxidable; cuyo proceso puede incluir la fibra del maguey o agave (bagazo).
- **Mezcal Ancestral:** Su elaboración debe cumplir con al menos las siguientes cuatro etapas y equipo:
 - Cocción: cocimiento de cabezas de maguey o agave en hornos de pozo.
 - Molienda: con mazo, tahona, molino chileno o egipcio.

- Fermentación: oquedades en piedra, suelo o tronco, piletas de mampostería, recipientes de madera o barro, pieles de animal, cuyo proceso puede incluir la fibra del maguey o agave (bagazo).
- Destilación: con fuego directo en olla de barro y montera de barro o madera; cuyo proceso puede incluir la fibra del maguey o agave (bagazo).

3.4. LEVADURAS

La taxonomía de las levaduras transitó por dos periodos, el primero caracterizado por estudios de morfología comparativa, fisiología y genética convencional y el segundo extendido hasta la actualidad, identificada por una ampliación en los estudios de morfología a nivel ultramicroscópico, la aplicación de criterios bioquímicos e introducción de los estudios de la biología molecular. En el caso de la elaboración de bebidas alcohólicas, provienen de dos hábitats diferentes: las materias primas (principalmente vegetales) y las fábricas donde éstas se procesan. (Ramírez Rodríguez, 2009)

Las levaduras contribuyen a la fermentación de una amplia gama de materia, donde dependiendo de la especie es el conjunto de bacterias y hongos filamentosos con los que puede trabajar. (Ramírez Rodríguez, 2009)

La membrana celular de las levaduras está compuesta de fosfolípidos que le otorgan flexibilidad a la membrana; y de esteroides que aumentan la rigidez de la membrana y disminuyen su permeabilidad, mantienen por más tiempo su actividad fermentativa, y al final de la fermentación se degrada una mayor cantidad de azúcares. No obstante, durante el proceso de fermentación, la levadura produce etanol y al aumentar su concentración en el medio este genera la degradación de los esteroides ocasionando una inhibición por etanol. Además, la interacción levadura-levadura dentro del proceso de fermentación que es conocida como *efecto killer*, implica la secreción por parte de ciertas cepas de levaduras de una proteína tóxica de baja masa molecular, llamada toxina *killer*, mata a células denominadas sensibles, las cuales pueden ser del mismo o diferentes géneros. (Vásquez Ortiz, 2022)

3.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Una levadura se define como un hongo basidiomiceto o ascomiceto que se multiplica de manera vegetativa, principalmente por gemación o fisión y que no presenta durante su fase sexual cuerpos fructíferos internos o externos. No poseen capacidad de desplazamiento por sus propios medios, por lo que dependen de vectores como el viento los animales o la misma actividad humana. (Vásquez Ortiz, 2022)

Los dos principales géneros de levaduras de interés comercial son *Candida* y *Saccharomyces*. Especialmente *S. cerevisiae* y especies cercanas han sido empleadas en la producción de alcohol y otras materias, dependiendo del conjunto de microorganismos con los que se encuentre. (Ramírez Rodríguez, 2009)

3.4.2. FERMENTACIÓN DE LEVADURAS

Las levaduras en la fermentación alcohólica son fundamental, ya que este proceso es realizado por un número cepas dominantes asociadas a un número variable de cepas secundarias, donde va aconteciendo una sustitución secuencial de cepas durante la fermentación. En este contexto, resulta necesario conocer las relaciones ecológicas que se establecen en cada fase, tomando en consideración que existe un gran número de especies de levaduras que se diferencian por su aspecto, sus propiedades, sus modos de reproducción y por la forma en la que transforman el azúcar. (Ramírez Rodríguez, 2009)

Las cepas de levaduras convencionales y no convencionales poseen la capacidad de producir etanol bajo distintas condiciones operativas y nutricionales durante la fermentación, mostrando distintos rendimientos en la producción de biomasa y etanol. Entre todos los microorganismos presentes en el proceso, las levaduras son las responsables de la fermentación alcohólica. Estudios realizados por Fleet y col. (1984) y por Heard y Fleet (1986) han demostrado que algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces* también contribuyen durante la fermentación, ya que sobreviven más de lo que inicialmente se suponía. Estos tipos de levaduras tienen rendimientos de entre 25 a 49 g/L de etanol y pueden llegar a producir concentraciones de etanol incluso semejantes a las del género *Saccharomyces*, siempre y cuando se les cultive en un medio apropiado que satisfaga sus necesidades nutricionales. (Pérez, et al., 2013)

Se llama fase de latencia a las primeras horas de la fermentación, la población de levaduras no se incrementa, es necesario para las células adaptarse a las nuevas condiciones ambientales, una vez adaptadas comienzan a crecer en la etapa denominada fase exponencial y es altamente influenciada por la temperatura, la concentración de nitrógeno con grupos amonio, aminoácidos y otros nutrientes, además por la presencia de oxígeno. Después de esta etapa, las levaduras detienen su crecimiento debido a que algunos nutrientes comienzan a ser deficientes, esta nueva etapa se llama fase “cuasi-estacionaria” y la población de levaduras gradualmente decrece hasta casi desaparecer. (Alcázar Valle, 2011)

3.4.3. MÉTODOS CONVENCIONALES PARA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

La identificación de levaduras es necesaria por su aplicación industrial, así como por el interés económico y cultural. Respecto a las bebidas alcohólicas, es de gran relevancia la presencia de tantas especies en la fermentación para su elaboración, en el caso específico del mezcal lo cual deja entrever la complejidad del proceso, ya que cada levadura tiene necesidades diferentes y sobre todo es susceptible de producir diversos compuestos. algunos de ellos importantes en el aroma y sabor final de bebidas. (Ramírez Rodríguez, 2009)

Para la identificación de microorganismos. las técnicas convencionales se fundamentan con la descripción morfológica y fisiológica de especies y géneros, que se basan en sus características. Las principales pruebas morfológicas y fisiológicas utilizadas en la identificación son (Ramírez Rodríguez, 2009):

- Morfológicas: reproducción vegetativa (gemación o bipartición), reproducción sexual (cigoto, esporas), morfología celular en medios sólido y líquido, aspecto de la colonia, formación de pseudomicelio, formación de velo.
- Fisiológicos: fermentación y asimilación de azúcares, desarrollo en presencia de etanol, poder fermentativo, asimilación de ácidos orgánicos, escisión de arbutina, necesidades en vitaminas, crecimiento a diferentes temperaturas, fenotipo killer;

asimilación de compuestos nitrogenados. requerimientos vitamínicos, resistencia a cicloheximida y termotolerancia.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MUESTREO

Se obtuvieron dos muestras de mosto de fermentación de tipo artesanal a partir de *Agave angustifolia* Haw, una del palenque ubicado en San Pedro Teozacoalco, Municipio de Nochixtlán en Oaxaca (Muestra 1) y otra del palenque ubicado en San Isidro Tapanala en el Municipio de San Carlos Yaltepec (Muestra 2); de ambas muestras se obtuvo el pH y los sólidos disueltos expresados en grados Brix.

4.2. AISLAMIENTO

Se utilizó el medio sólido YPD (Yeast extract Peptone Dextrose), se procedió a inocular las muestras por extensión de placa; este procedimiento consiste en hacer diluciones con el jugo del mosto de la muestra 1 y muestra 2, para posteriormente extender dichas diluciones en cajas Petri con el medio preparado con un asa de Digralsky.

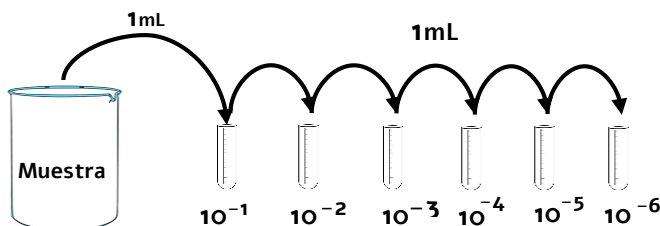


Ilustración 1. Diluciones seriadas de la muestra

La incubación se realizó a una temperatura de 28 ± 2 °C durante 48 horas. Posteriormente se realizó el conteo de colonias utilizando un cuenta colonias. Se tomaron en cuenta únicamente aquellas cajas Petri con entre 30 y 300 colonias.

Se realizó la selección visual de colonias que presenten características distintas entre ellas como color, borde, tamaño, elevación, opacidad y consistencia.

Tabla 1. Número de colonias seleccionas en medio YPD de las muestras 1 y 2.

NÚMERO DE COLONIAS SELECCIONAS					
Dilución	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-6}$	Total de colonias
Muestra 1	4 colonias	3 colonias	1 colonia	0 colonias	8
Muestra 2	2 colonias	2 colonias	2 colonias	1 colonia	7

4.3. PURIFICACIÓN DE LAS CEPAS

La técnica usada para obtener cultivos puros de las cepas a caracterizar en placas de agar es por estría cruzada, como se muestra en la figura 2. Para ello se colocó la colonia y se realiza un barrido con un asa de platino hasta lograr separar colonias individuales de la cepa de interés.

- Se esterilizó el asa de platino en la flama del mechero.
- Se enfrió el asa en un extremo de la placa de agar.
- Se tomó una pequeña parte de la muestra 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.



Ilustración 2. Estriado en medio sólido

4.4. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA

La terminología mencionada a continuación son características para poder realizar la observación macroscópica: (Briones, 2009)

Tabla 2. *Caracterización Macroscópica de las colonias*

Caracterización Macroscópica	
FORMA	Puntiforme, circular, ovalada, irregular, alargada, filamentosa, rizoide, etc.
COLOR	Según sea observado por la luz reflejada o por la luz transmitida, puede ser de. color blanco, amarillo, rojo ladrillo, anaranjado, etc.
SUPERFICIE	Lisa, rugosa, cerebriforme, en anillos concéntricos, etc.
ELEVACIÓN	Aplanada, elevada, pulvinada, convexa, umbonada, etc.
BORDE	Entero o continuo, ondulado, lobulado, festoneado, filamentoso, etc.
OPACIDAD	Transparente, opaca, etc.
CONSISTENCIA	Dura, viscosa, membranosa, gelatinosa, mucosa, etc. Usar el asa bacteriológica para determinar la consistencia.

4.5.OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Se examinó al microscopio con objetivo de inmersión (100x) depositando una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación teñida, para descartar bacterias y confirmar morfología correspondiente a levaduras.

Se utilizó tinción sencilla con azul de metileno:

- Se cubrió con azul de metileno por 1 min la muestra previamente fijada.
- Se enjuagó con agua destilada.
- 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.

4.6. AISLAMIENTO DIRIGIDO

Se utilizaron tres medios para el aislamiento dirigido, los cuales son:

- Agar Rosa de Bengala agregando cloranfenicol (ARB+C), el rosa de bengala es un agente selectivo que inhibe el crecimiento de bacterias y limita el tamaño y la altura de los hongos con crecimiento rápido, lo que permite el desarrollo y la detección de otras levaduras de crecimiento más lento: los hongos aparecen de color rosado. El cloranfenicol sirve como un agente selectivo, inhibiendo el crecimiento bacteriano ya que es un antibiótico recomendado para medios neutros debido a su estabilidad térmica y amplio espectro bacteriano. (CONDALAB, 2019)
- Medio Lisina, en este medio de cultivo, la lisina representa la única fuente de nitrógeno utilizable por lo que las levaduras de género *Saccharomyces* no pueden crecer en este medio, ya que forman un inhibidor intermediario. Por el contrario, la mayoría de las levaduras no-*Saccharomyces* sí que pueden utilizar este aminoácido como única fuente de nitrógeno, por lo que si se observa crecimiento en este medio se trata de levaduras no-*Saccharomyces*, pero si no crecen puede tratarse de levaduras del género *Saccharomyces*. (Martín de la Higuera, 2022)
- Medio Cromogénico para *Candida*, es un medio cromogénico diferencial y selectivo para el aislamiento e identificación de especies de *Candida*. (MCD LAB, s.f.)

4.7.FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Carbohidratos que fueron utilizados:

1. Xilosa
2. Galactosa
3. Sacarosa
4. Manosa
5. Lactosa
6. Inulina

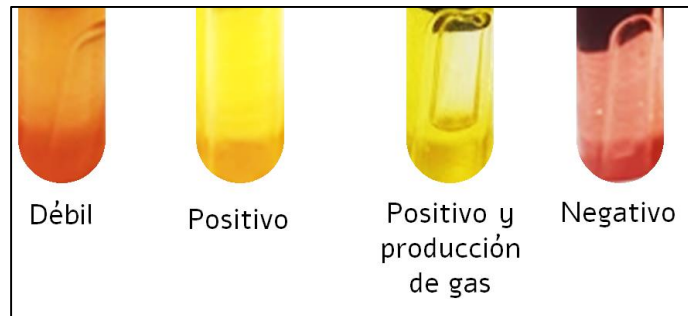


Ilustración 3. Criterio de coloración para pruebas bioquímicas

Se utilizó Caldo Base Rojo de Fenol (CBRF), campana durham y azúcares estériles al 1 %.

4.7.1 Preparación de CBRF, azúcares e inoculación

Se realizaron los cálculos en base a la cantidad de medio, se dispense en tubos de ensaye con tapa de rosca (4ml por tubo), se agregó una campana Durham y se esterilizó.

Para la preparación de los azúcares se esterilizó agua destilada y filtros millipore, se pesó la cantidad de azúcar a preparar y se disolvió en el agua destilada previamente esterilizada.

Con una jeringa estéril se succionó el azúcar preparado, se distribuyó en los tubos con Caldo Base Rojo de Fenol, pasando por los filtros millipore y con un asa de platino se tomó carga microbiana de un cultivo fresco en medio ADS inoculando los tubos por homogenización.

5. RESULTADOS

5.1. GRADOS Brix, pH Y UFC.

Tabla 3. Datos de las muestras recabados en el laboratorio

	MUESTRA 1	MUESTRA 2
LUGAR	San Pedro, Teozacoalco	San Isidro, Tapanala
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 *
*Datos tomados a 25°C		

Tabla 4. Conteo de colonias y UFC/ml de la muestra 1 y 2, en medio YPD

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS POR ML								
DILUCIÓN	x10 ³		x10 ⁴		x10 ⁵		x10 ⁶	
	Colonias	UFC/ml	Colonias	UFC/ml	Colonias	UFC/ml	Colonias	UFC/ml
M1	271	271 000	169	1 690 000	84	8 400 000	0	0
M2	170	170 000	148	1 480 000	19	1 900 000	18	18 000 000

5.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

En la **muestra 1**, se aislaron y purificaron en medio ADS + cloranfenicol (Agar Dextrosa Sabouraud) 8 colonias, mientras de la **muestra 2**, se aislaron y purificaron 7 colonias en el mismo medio. Se incubaron a 28 ± 2 °C durante 48 horas.

5.3. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA

Tabla 5. Morfología macroscópica de las colonias aisladas en medio ADS

CEPA	FORMA	COLOR	SUPERFICIE	ELEVACIÓN	BORDE	OPACIDAD	CONSISTENCIA
Y1	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Brillosa	Cremosa
Y2	Ovalada	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Mate	Cremosa
Y3	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Brillosa	Cremosa
Y4	Circular	Crema	Lisa	Elevada	Entero	Mate	Cremosa
Y5	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Mate	Seca
Y6	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Mate	Seca
Y7	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Mate	Seca
Y8	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Mate	Cremosa
Y9	Circular	Blanca	Lisa	Convexa	Entero	Brillosa	Crema
Y10	Irregular	Crema	Lisa	Elevada	Ondulado	Brillosa	Cremosa
Y11	Irregular	Blanco	Lisa	Convexa	Ondulado	Brillosa	Cremosa
Y12	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Entero	Brillosa	Cremosa
Y13	Ovalada	Blanco	Lisa	Elevada	Entero	Brillante	Cremosa
Y14	Irregular	Blanco	Lisa	Elevada	Ondulado	Mate	Seca
Y15	Irregular	Blanco	Lisa	Elevada	Ondulado	Brillosa	Cremosa



Ilustración 4. Colonia Y2 en medio ADS

5.4.OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Tabla 6. Forma celular de las cepas aisladas con tinción simple con azul de metileno

MUESTRA	CEPAS	FORMA DE LAS CÉLULAS
1	Y1	Basidomiceta
	Y2	Basidomiceta
	Y3	Subglobosas ovoides
	Y4	Basidomiceta
	Y5	Basidomiceta
	Y6	Subglobosas ovoide
	Y7	Subglobosas ovoide
	Y8	Subglobosas ovoide
2	Y9	Subglobosa ovoide
	Y10	Basidomiceta
	Y11	Subglobosa ovoide
	Y12	Subglobosa ovoide
	Y13	Subglobosa ovoide
	Y14	Basidomiceta
	Y15	Subglobosa ovoide

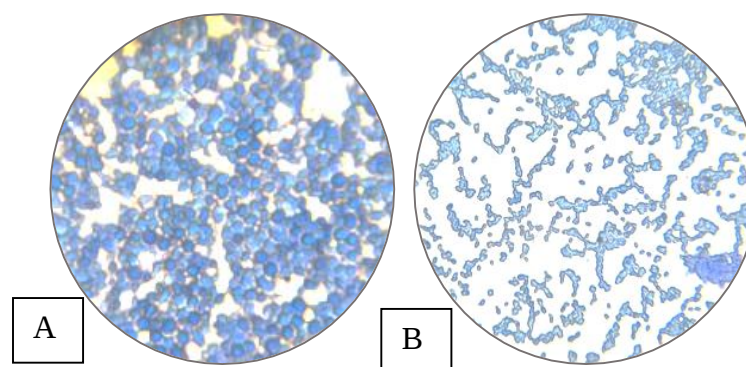


Ilustración 5. Morfología macroscópica A. Basidomiceta B. Subglobosa ovoide

5.5. AISLAMIENTO DIRIGIDO

Tabla 7. Crecimiento en el aislamiento dirigido.

		CEPAS														
		Y 1	Y 2	Y 3	Y 4	Y 5	Y 6	Y 7	Y 8	Y 9	Y 10	Y 11	Y 12	Y 13	Y 14	Y 15
Medio	ADS+c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ARB+c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ML	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ACC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Crecimiento: - Nulo, +Débil, ++Bueno

En el aislamiento dirigido se puede observar que todas las cepas tuvieron buen crecimiento en medio Agar Dextrosa Sabouraud con cloranfenicol (ADS+c), solamente Y9 y Y13 tuvieron un crecimiento débil en Agar Rosa de Bengala con cloranfenicol (ARB+c), las demás cepas presentaron buen crecimiento, las que tuvieron buen crecimiento en Medio Lisina (ML) también presentaron buen crecimiento en Agar Cromogénico para Candida (ACC) a excepción de Y6, Y10 y Y14 que en ACC presentaron un crecimiento débil; se destaca que Y7 tuvo crecimiento débil en Agar Cromogénico para Candida (ACC), y nulo en el Medio Lisina (ML), así como un buen crecimiento en Agar Rosa de Bengala con cloranfenicol (ARB+c), por lo que en este punto ya se esperaba que Y7 perteneciera al género *Saccharomyces*.

5.6.FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Tabla 8. Resultados de la fermentación de carbohidratos.

		CEPAS														
		Y 1	Y 2	Y 3	Y 4	Y 5	Y 6	Y 7	Y 8	Y 9	Y 10	Y 11	Y 12	Y 13	Y 14	Y 15
Carbohidratos	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	6	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-

Resultados: - Negativo, + Débil, ++ Positivo, ++++ Positivo con presencia de gas
Carbohidratos: 1. Xilosa, 2. Galactosa, 3. Sacarosa, 4. Manosa, 5. Lactosa, 6. Inulina

En la fermentación de carbohidratos se puede observar que para la Xilosa todas las cepas el cambio en el indicador fue débil.

En el caso de la Galactosa Y8 fue negativo, para Y1, Y6, Y9, Y14 y Y15 hubo un cambio débil, para Y2, Y3, Y8, Y9, Y10, Y11 y Y12 es evidente un resultado positivo, mientras en Y4 y Y5 el resultado fue positivo y hubo presencia de gas.

Para la Sacarosa todas tuvieron un resultado positivo, las cepas Y2, Y4, Y5, Y7, Y8, Y11, Y12 y Y13 además tuvieron presencia de gas.

Para la Manosa Y5, Y10 y Y11 fueron positivas, pero sin presencia de gas mientras las restantes fueron positivas con presencia de gas.

En el caso de la Lactosa todas las cepas presentaron un cambio débil a excepción de la Y9 que tuvo un claro resultado negativo.

Por último, para la Inulina solo Y12 fue positiva, mientras Y3, Y5, Y8, Y9, Y10, Y12 y Y14 presentaron un cambio débil, para las cepas restantes el resultado fue negativo.

5.7.CEPAS IDENTIFICADAS

Tabla 9. Cepas identificadas de cada muestra y código en la colección del Laboratorio de Control Ambiental

M1: San Pedro, Teozacoalco			M2: San Isidro, Tapanala		
Cepa	Código	Género	Cepa	Código	Género
Y1	ITOYIV21	<i>Candida</i>	Y9	ITOYVI01	<i>Candida</i>
Y2	ITOYIV22	<i>Kluyveromyces</i>	Y10	ITOYVI02	<i>Kluyveromyces</i>
Y3	ITOYIV23	<i>Candida</i>	Y11	ITOYVI03	<i>Saccaromyces</i>
Y4	ITOYIV24	<i>Candida</i>	Y12	ITOYVI04	<i>Saccaromyces</i>
Y5	ITOYIV25	<i>Candida</i>	Y13	ITOYVI05	<i>Candida</i>
Y6	ITOYIV26	<i>Candida</i>	Y14	ITOYVI06	<i>Kluyveromyces</i>
Y7	ITOYIV27	<i>Saccharomyces</i>	Y15	ITOYVI07	<i>Candida</i>
Y8	ITOYIV28	<i>Saccharomyces</i>			

Se obtuvieron un total de tres géneros en ambas muestras, *Candida*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*.

6. CONCLUSIONES

Se aislaron 8 cepas de la muestra 1 de San Pedro, Teozacoalco y 7 cepas de la muestra 2 de San Isidro, Tapanala.

Por métodos convencionales se identificaron un total de ocho cepas del género *Candida*, tres *Kluyveromyces* y cuatro *Saccharomyces*; de las cuales cinco cepas del género *Candida*, una *Kluyveromyces* y dos *Saccharomyces* provienen de la muestra de San Pedro Teozacoalco y una cepa del género *Candida*, dos *Kluyveromyces* y dos *Saccharomyces* provienen de la muestra de San Isidro Tapanala.

REFERENCIAS

Abarca Arauz, R. J. & Navarrete Carpio, V. A., 2010. *Aislamiento y Caracterización de la Bacteria Zymomona Mobilis*. Guayaquil, Ecuador: UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL.

Alcázar Valle, E. M., 2011. *CAPACIDADES FERMENTATIVAS Y GENERACIÓN DE VOLÁTILES DE CEPAS DE LEADURAS AISLADAS DE DIFERENTES ESTADOS PRODUCTORES DE MEZCAL..* Jalisco: Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco..

Barrietos Rivera, G. y otros, 2019. *CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE Agave angustifolia Y SU CONSERVACIÓN EN GUERRERO, MÉXICO*. Texcoco: Revista mexicana de ciencias agrícolas.

Briones, M., 2009. *MICROBIOLOGÍA APLICADA*. Azcapotzalco: Universidad Autónoma Metropolitana.

Carrillo, L. y otros, 2007. Capítulo 4: LEVADURAS. En: *MANUAL DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS*. San Salvador de Jujuy: Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, pp. 40-46.

CONDALAB, 2019. *AGAR ROSA DE BENGALA + CLORANFENICOL*. [En línea] [Último acceso: 2023].

Cruz García, H. y otros, 2013. *NUTRIMENTOS Y CARBOHIDRATOS EN PLANTAS DE Agave angustifolia Haw. Y Agave karwinskii Zucc.* Texcoco: Revista Mexicana de ciencias agrícolas.

Dirección General de Normas, 2016. *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-070-SCFI2016, BEBIDAS ALCOHÓLICAS-MEZCAL-ESPECIFICACIONES*. México: Diario Oficial de la Federación.

Fundora, N. y otros, 2005. IDENTIFICACIÓN Y CRACTERIZACIÓN FERMENTATIVA DE CEPAS DE LEVADURAS AISLADAS EN LA DESTILERÍA "A.GUILERAS". *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivdos de la Caña de Azúcar (ICIDCA)*, XXXIX(2), pp. 46-50.

- Garibay Marcelo, M. d. l. A., 2019. *CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LEVADURAS PRESENTES DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL MEZCAL EN EL ESTADO DE GUERRERO*. Chilpancingo de los Bravo: Universidad Autonoma de Guerrero.
- Gutierrez Mora, A., 1987. *ESTUDIO DEL RENDIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL EN UNA CEPA DE *Zymomonas mobilis* AISLADA DE JUGO DE CAÑA*. GUADALAJARA. JALISCO: Universidad de Guadalajara.
- Hernandez Mota, E. G., 2009. *ANÁLISIS METAGENÓMICO Y FÍSICOQUÍMICO DE MOSTOS DE MEZCAL TAMAULIPECO*. Reynosa Tamaulipas: Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología genómica.
- Linares Sicilia, M. J. & Solís Cuesta, F., 2007. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS. En: *Revista Iberoamericana de Micología*. s.l.:Asociación Española de Micología, p. Capítulo 11.
- López Sánchez, C., Espinoza Martínez, V. A. & Palma Cruz, F. d. J., 2020. *CONSORCIO MICROBIANO DE FERMENTACIÓN DEL MEZCAL ARTESANAL DE SAN DIONISIO OCOTEPEC, OAXACA*. Instituto Tecnológico de Mérida: Revista del centro de graduados e investigación.
- Martín de la Higuera, S., 2022. *AISLAMIENTO Y ELECCIÓN DE LEVADURAS no-*Saccharomyces* EN TEMPRANILLO*. Palencia: Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias.
- MCD LAB, s.f. *AGAR CROMOGÉNICO PARA *Candida**. s.l.:s.n.
- Mendoza, M., 2005. IMPORTANCIA DE LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), pp. 15-23.
- Miranda Catilleja, D. E. y otros, 2015. AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS *Saccharomyces* spp. NATIVAS DE VIÑEDOS DE QUERÉTARO, MÉXICO.. *Agrociencia, Ciencia de los alimentos*, XLIX(7), pp. 759-773.

Oaxaca Mío, 2020. *Oaxaca Mío magazine*. [En línea]

Available at: <https://www.oaxaca-mio.com/mezcalesdeoaxaca/procesodeelaboracion/>
[Último acceso: 2023].

Oscare P, Y. & Castro F, J. F., 2020. PRESERVACIÓN DE MICROORGANISMOS POR CONGELACIÓN. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA*, VII(428), pp. 119-134.

Palma Cruz, F. d. J., 1991. *EL GENERO Agave L. Y SU DISTRIBUCION EN EL ESTADO DE OAXACA*. UNAM: Nacional de Estudios Profesionales Iztacala.

Pérez Hernández, E., Chávez Parga, M. d. C. & González Hernández, J. C., 2016. REVISIÓN DEL AGAVE Y EL MEZCAL.. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVIII(1), pp. 148-164.

Pérez, E., Gonzalez-Hernández, J. C., Chávez-Parga, M. & Cortés-Penagos, C., 2013. CARACTERIZACION FERMENTATIVA DE LEVADURAS PRODUCTORAS DE ETANOL A PARTIR DE JUGO DE Agave cupreata EN LA ELABORACION DE MEZCAL.. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3), pp. 451-461.

Ramírez Rodríguez, P. B., 2009. *ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS ESPECÍFICAS DE LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL*. Las Agujas, Zapopan: Universidad de Guadalajara.

Rodríguez Garay, B., Gutiérrez Mora, A. & Rodríguez Domínguez, J. M., 2017. *LA MATERIA PRIMA PARA EL MEZCAL*. Ciudad de México: Ciencia y desarrollo.

Tapiero Cuellar, J. L., 2016. *CINÉTICA DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA EN LA PRODUCCIÓN DE HIDROMIELES A PARTIR DE MIELES MONOFLORALES COLOMBIANAS*.. Quindío, Colombia: Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Maestría en Ciencias Química, Universidad del Quindío.

Vásquez Ortiz, S., 2022. *IDENTIFICACIÓN POLIFÁSICA DE LEVADURAS PRESENTES EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL EN DOS PALENQUES DE OAXACA*.. Oaxaca de Juárez: Instituto Tecnológico de Oaxaca.