

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

TESIS PROFESIONAL:

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE
MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave
marmorata* Roezl**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

BEATRIZ ADRIANA SANTIAGO SANTIAGO

ASESOR:

DRA. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ

COMISIÓN REVISORA:

M.C. JAIME GALVÁN ESPINOSA

DR. FELIPE DE JESÚS PALMA CRUZ

DRA. MARIA DE JESÚS RAMÍREZ ALTAMIRANO

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a la Dra. Claudia López Sánchez por confiar en mí para la realización de este proyecto, por compartirme sus conocimientos e instruirme a lo largo de este trabajo.

Al Dr. Felipe de Jesús Palma Cruz por todo el aprendizaje de diferentes temas que siempre nos inculcó.

Al M.C. Víctor Adrián Espinoza por la paciencia, la enseñanza y la alegría que siempre recibí de él.

A todos los compañeros del laboratorio de control ambiental por siempre brindarme su apoyo cuando lo necesité, por las risas y toda la convivencia que pasé con ellos.

A mi amado esposo, Ricardo, por todo el amor, comprensión y apoyo infinito que siempre me ha regalado.

A mi madre querida, Enimia, que siempre ha sido una mujer muy trabajadora y fuerte la cual me educó desde pequeña y que sin ella yo no sería quién soy.

A mi padre, Luis, que me enseñó que la vida es dura, que puedes caerte, pero siempre podrás levantarte.

A mis hermanos Ana, Rosa, Carlos y Noel, por la alegría y por el apoyo que siempre ha existido entre hermanos.

A todos mis amigos y compañeros de carrera, por apoyarme siempre, por las aventuras, por las risas, sin ello estos años no hubieran sido de la misma manera.

Por último, pero no menos importante, gracias a Dios, a la fe que existe en mí que siempre me dio fuerza y esperanza para continuar.

RESUMEN

Los agaves han sido fundamentales en la alimentación y bebida de los mexicanos; actualmente con ellos se produce el mezcal; una bebida destilada de suma importancia cultural y económica para Oaxaca. En el presente trabajo, se compararon los consorcios microbianos presentes en el proceso de fermentación del mezcal tradicional a partir de *Agave rhodacantha* y *Agave marmorata*. Las muestras se tomaron en dos palenques: uno de San Pedro, Teozacoalco, Nochixtlán, y otro ubicado en San Isidro Tapanala, San Carlos Yautepec. Las muestras del mosto de agave fueron aisladas y purificadas para después realizar la identificación molecular mediante protocolos de extracción de ADN genómico. La calidad del ADN se verificó por medio de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.2%. Para levaduras se amplificó el gen 5.8S utilizando los oligos ITS1 e ITS4; y en bacterias ácido lácticas se amplificó el gen 16S usando los oligos 8F y 1492R. Los amplicones se cuantificaron en NanoDrop a una absorbancia de 260/280 y a 260 nm, y se enviaron a la empresa Macrogen para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron en el programa BioEdit y fueron alineadas utilizando el software BLAST para la identificación de cada cepa. Se identificaron con técnicas moleculares en el palenque I con *A. rhodacantha* Trel dos especies de levaduras; *Pichia kluyveri*, *Pichia fermentans* y cinco especies de BAL; *Bacillus siamensis*, *Bacillus velezensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*, en el palenque II con *A. marmorata* Roezl se identificaron dos especies de levaduras; *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kluyveri* y tres especies de BAL; *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, y *Lactiplantibacillus plantarum*. Sin duda alguna es importante conocer el tipo de microorganismo que participan en la fermentación del mezcal tradicional pues de ellos dependen los sabores y aromas del producto final.

SUMMARY

Agaves have been fundamental in the food and drink of Mexicans; Currently, mezcal is produced with them; a distilled beverage of great cultural and economic importance for Oaxaca. In the present work, the microbial consortia present in the fermentation process of traditional mezcal from *Agave rhodacantha* and *Agave marmorata* were compared. The samples were taken in two mezcal factories: one in San Pedro, Teozacoalco, Nochixtlán, and another located in San Isidro Tapanala, San Carlos Yautepec. Agave juice samples were isolated and purified to later perform molecular identification using genomic DNA extraction protocols. DNA quality was verified by horizontal 1.2% agarose gel electrophoresis. For yeast, the 5.8S gene was amplified using the oligos ITS1 and ITS4; and in lactic acid bacteria, the 16S gene was amplified using oligos 8F and 1492R. The amplicons were quantified in NanoDrop at an absorbance of 260/280 and at 260 nm, and they were sent to MacroGen for sequencing. The obtained sequences were analyzed in the BioEdit program and aligned using the BLAST software for the identification of each strain. Two species of yeasts were identified with molecular techniques in the mezcal factory I with *A. rhodacantha* Trel; *Pichia kluyveri*, *Pichia fermentans* and five LAB species; *Bacillus siamensis*, *Bacillus velezensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis*, in the mezcal factory II with *A. marmorata* Roezl two species of yeasts were identified; *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri* and three LAB species; *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, and *Lactiplantibacillus plantarum*. Without a doubt, it is important to know the type of microorganism that participates in the fermentation of traditional mezcal, since the flavors and aromas of the final product depend on them.

CONTENIDO

RESUMEN	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. ANTECEDENTES	5
4. FUNDAMENTO TEÓRICO	6
4.1 EL GÉNERO AGAVE	6
4.1.2 Características de <i>Agave marmorata</i> Roezl.....	8
4.1.3 Características de <i>Agave rhodacantha</i> Trel.....	9
4.2 MEZCAL.....	10
4.2.1 Compuestos volátiles en el mezcal	11
4.2.2 Proceso de elaboración.....	12
4.2.3 Corte.....	12
4.2.4 Cocción	13
4.2.5 Molienda	14
4.2.6 Fermentación.....	15
4.2.7 Destilación.....	17
4.3 CONSORCIOS MICROBIANOS	19

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

4.3.1	Levaduras. Características generales	20
4.3.2	Levaduras <i>Saccharomyces</i>	22
4.3.3	Levaduras <i>no-Saccharomyces</i>	22
4.3.4	Bacterias. Características generales.....	23
4.3.5	Bacterias ácido lácticas (BAL).....	24
4.3.6	Metabolismo de las BAL.....	25
4.4	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	27
4.4.1	ESTRUCTURA DEL ADN	27
4.4.2	Región ITS	29
4.4.3	Electroforesis de ADN.....	30
4.4.4	PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	31
4.4.5	Secuenciación Sanger.....	32
5.	METODOLOGÍA	34
5.1	LOCALIZACION	34
5.1.1	San Pedro, Teozacoalco.....	34
5.1.2	SAN ISIDRO TAPANALA, YAUTEPEC	35
5.2	MUESTREO	36
5.3	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LEVADURAS Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	36
5.4	CARACTERIZACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA	39
5.5	PRESERVACIÓN DE MICROORGANISMOS POR CONGELACIÓN	41
5.6	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	43
5.6.1	Levaduras.....	43
5.6.2	Bacterias Ácido Lácticas.....	47

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

5.7	ELECTROFORESIS HORIZONTAL EN GEL DE AGAROSA AL 1.2%.....	52
5.8	CUANTIFICACIÓN DE ADN GENMICO	54
5.9	PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).....	56
5.10	SECUENCIACIÓN.....	58
5.11	ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS	60
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
6.2	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN	62
6.3	CARACTERIZACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA	66
6.4	PRESERVACIÓN DE MICROORGANISMOS POR CONGELACIÓN	72
1.3	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	73
1.3	PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).....	77
6.7	ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS.....	82
7.	CONCLUSIONES	86
	BIBLIOGRAFÍA	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Modo de preparación de medio ADS y YPD	37
Tabla 3 Modo de preparación de medio MRS.....	37
Tabla 4 Caracterización macroscópica	39
Tabla 5 Levaduras y BAL aisladas del palenque 1 de San Pedro Teozacoalco.....	62
Tabla 6 Levaduras y BAL aisladas del palenque 2 de San Isidro Tapanala	63
Tabla 7 Morfología macroscópica de las colonias de levaduras de los palenques 1 y 2	66
Tabla 8 Morfología macroscópica de las colonias de BAL de los palenques 1 y 2.....	67
Tabla 9 Cuantificación de ADN de levaduras del palenque 1	73
Tabla 10 Cuantificación de ADN de BAL del palenque 1.....	74
Tabla 11 Cuantificación de ADN de levaduras del palenque 2	75
Tabla 12 Cuantificación de ADN de BAL del palenque 2.....	76
Tabla 13 Cuantificación de amplicones de levaduras del palenque 1	77
Tabla 14 Cuantificación de amplicones de BAL del palenque 1.....	78
Tabla 15 Cuantificación de amplicones de levaduras del palenque 2	79
Tabla 16 Cuantificación de amplicones de BAL del palenque 2.....	80
Tabla 17 Levaduras identificadas de los palenques I y II.....	82
Tabla 18 Bacterias ácido lácticas identificadas de los palenques I y II.....	83

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Pureza de ADN relación A260/A280	81
Gráfica 2 Porcentaje de Q Cover e Identidad.....	84
Gráfica 3 Especies Identificadas en el Palenque I	85
Gráfica 4 Especies Identificadas en el Palenque II	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de una célula de levadura. (P. Ribéreau & Gaillardin)	21
Figura 2 Estructura de una célula procariota	24
Figura 3 Imagen 3 a) Estructura de la doble cadena de ADN. Los extremos de las cadenas terminan en un grupo fosfato llamado extremo 5', y en un hidroxilo del azúcar, que se denomina extremo 3'. b) Proceso de transcripción del mensaje genético al ARN mensajero.....	28
Figura 4 Organización de los genes rARN eucarióticos. Modificado de: Deacon, 2006	30
Figura 5 Macro y microlocalización del municipio de San Pedro Tezacoalco (Valencia-Sánchez, 2020)	34
Figura 6 Localización de San Isidro Tapanala. Proyección cónica conforme Lambert Coordenadas planas. Fuente INEGI 2010, elaborado por Joel Barriga M.....	35
Figura 7 Medios de cultivo: YPD, ADS y MRS.....	38
Figura 8 Cepa de levadura en una placa de Petri	41
Figura 9 Método de criopreservación de cultivos microbianos	42
Figura 10 Resiembra de los microorganismos criopreservados después de 48 horas	42
Figura 11 Soluciones preparadas para el protocolo de Osorio et al., 2008	43
Figura 12 Extracción de ADN genómico de levaduras con el protocolo de Osorio et al., 2008.....	45
Figura 13 Soluciones del kit de ADN genómico de YeaStar™	45
Figura 14 Extracción de ADN genómico de levaduras con el Kit de ADN genómico de YeaStar™.....	47
Figura 15 Soluciones preparadas para el método de CTAB	48
Figura 16 Proceso de extracción de ADN genómico de BAL con el método de CTAB.	49
Figura 17 Soluciones del kit de extracción de ADN para bacterias	50
Figura 18 Extracción de ADN genómico de BAL con el kit Fungal/Bacterial Miniprep Quick-DNA™	51
Figura 19 Electroforesis horizontal	53

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

Figura 20 Cuantificación de ADN genómico en NanoDrop	55
Figura 21 Proceso de preparación de las muestras para la PCR	57
Figura 22 Menú principal de la página de Internet de Macrogen	58
Figura 23 Plantilla de Excel de orden de secuencia estándar de Macrogen.....	58
Figura 24 Formato en que se enviaron los amplicones	59
Figura 25 Secuencia de una levadura en formato fasta	60
Figura 26 Secuencias que producen alineaciones significativas	60
Figura 27 Zona de corte de la secuencia	61
Figura 28 Levaduras purificadas en medio ADS del palenque 1 (<i>A. rhodacantha</i> Trel)	64
Figura 29 BAL purificadas en medio MRS del palenque 1 (<i>A. rhodacantha</i> Trel)	64
Figura 30 Levaduras purificadas en medio YPD del palenque 2 (<i>A. marmorata</i> Roezl)	65
Figura 31 BAL purificadas en medio MRS del palenque 2 (<i>A. marmorata</i> Roezl)	65
Figura 32 Morfología macro y microscópica de las cepas de levadura del palenque 1	68
Figura 33 Morfología macro y microscópica de las BAL del palenque 1	69
Figura 34 Morfología macro y microscópica de las cepas de levadura del palenque 2	70
Figura 35 Morfología macro y microscópica de las cepas de BAL del palenque 2	71
Figura 36 Evaluación de viabilidad de la muestra post-criopreservación	72
Figura 37 Gel de agarosa con las muestras de ADN de levaduras del palenque 1	73
Figura 38 Gel de agarosa con las muestras de ADN de BAL del palenque 1	74
Figura 39 Gel de agarosa con ADN de levaduras del palenque 2	75
Figura 40 Gel de agarosa con ADN de BAL del palenque 2	76
Figura 41 Gel de agarosa con amplicones de levaduras del palenque 1	77
Figura 42 Gel de agarosa con amplicones de BAL del palenque 1	78
Figura 43 Gel de agarosa con amplicones de levaduras del palenque 2	79
Figura 44 Gel de agarosa con amplicones de BAL del palenque 2	80

1. INTRODUCCIÓN

Los agaves fueron fundamentales en la alimentación y bebida de los mexicanos, les proveían fibras para todo tipo de uso y un sin número de usos. Actualmente, de los agaves se producen bebidas alcohólicas de suma importancia, tal es el caso del mezcal (Palma-Cruz, 1991).

Nueve estados de la república mexicana cuentan con la Denominación de Origen Mezcal (DOM); Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Tamaulipas, Guanajuato, Michoacán, Puebla, Guerrero y Oaxaca. En los estados mencionados, existen 963 municipios que cuentan con la DOM, de los cuales 570 pertenecen a Oaxaca, lo que lo convierte en el estado con el mayor número de municipios incorporados a la DOM Consejo Regulador del Mezcal (CRM, 2016).

La producción del mezcal comprende cinco etapas: corte, cocción molienda, fermentación y destilación. De estas, la fermentación es una de las más importantes y críticas; generalmente es espontánea, es decir, que se produce de manera natural, con la participación de la microbiota nativa, la cual transforma a los azúcares que contiene la materia prima etanol, CO₂ y otros compuestos que forman parte de la rica gama de sabores y aromas del mezcal (Palma-Cruz, 1991).

Las levaduras se encargan de realizar la conversión de los azúcares presentes en los mostos de fermentación a etanol, estos organismos son de gran importancia en la elaboración de bebidas fermentadas, donde las especies del género *Saccharomyces* son las más importantes al tener como función principal la producción de etanol, no obstante, otros géneros de levaduras no-*Saccharomyces* impactan en la producción de etanol, así como en la generación de compuestos volátiles del fermentado. Cabe recalcar que en este proceso también interviene la fermentación maloláctica, en la cual el ácido málico se transforma a ácido láctico por el metabolismo de bacterias ácido lácticas.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Muchos factores intervienen en la calidad del mezcal, uno de ellos muy importante e interesante es la microbiota presente en la fermentación del mosto de agave, es necesario identificar los consorcios microbianos que interactúan en el proceso fermentativo de producción del mezcal para establecer el papel que juegan estos en el producto final.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El estado de Oaxaca pertenece a la llamada Denominación de Origen (DO) propia del mezcal. Esta bebida alcohólica-destilada es producida en su mayoría por fábricas o palenques de tipo artesanal, cada etapa del proceso cumple una función única iniciando con la selección de la planta con respecto a los años de cultivo, tamaño y contenido de azúcares.

Dentro de los parámetros de estudio para cepas de interés biotecnológico podemos mencionar la producción de etanol relacionado con la unidad de sustrato, gran capacidad de fermentación, tolerancia a altas concentraciones de etanol, tolerancia a bajos valores de pH, requerimientos mínimos de oxígeno, alta estabilidad bajo diferentes condiciones de fermentación, la utilización de una amplia gama de sustratos fermentables, entre otros.

En la fermentación participan los llamados consorcios microbianos que son los que metabolizan los azúcares y otros componentes de los mostos de agave, en la fermentación el mezcal obtiene las características organolépticas como sabor, cuerpo y aroma, es por eso que esta etapa es tan importante.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Comparar los consorcios microbianos de la fermentación del mezcal a partir de *Agave rhodacantha* y *Agave marmorata*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el muestreo en dos regiones productoras del mezcal
- Aislar y purificar levaduras y bacterias lácticas de las dos muestras
- Identificar por técnicas moleculares las levaduras y bacterias lácticas de las dos muestras obtenidas.

3. ANTECEDENTES

Escalante *et al.*, 2008 encontraron a partir de mosto de *Agave salmiana* en San Luis Potosí las especies de *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans* y *Kluyveromyces marxianus* y para bacterias determinaron la presencia predominante de bacterias lácticas. Narváez *et al.*, 2010 reportaron cinco especies de bacterias ácido lácticas: *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus brevis*, *Lb. Composti*, *Lb. Parabuchneri* y *Lb. plantarum*. En el estado de Oaxaca López *et al.*, 2020 hallaron los géneros de levaduras *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Brettanomyces* y *Rhodotorula*. Jiménez *et al.*, 2021 encontraron tres géneros de bacterias ácido lácticas correspondientes a *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*.

En el mezcal producido en Tamaulipas mediante métodos moleculares se identificaron a *Kluyveromyces marxianus*, *Hortaea werneckii*, *Pichia mexicana*, *Rhodotorula glutinis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia delftensis*, *Geotrichum klebahnii*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kluyveri*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia mexicana*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Candida parapsilopsi* (Jacques-Hernández *et al.*, 2009; Arratia *et al.*, 2009). De la Torre-González, 2010 en Tamaulipas identificó a *S. Cerevisiae*, *K. marxianus*, *T. delbrueckii*. En 2017 Figueroa-Romero en Zimatlán, Oaxaca determinó la presencia de *Candida famata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *candida tropicalis*, *candida krusei*, *candida lusitaniae*, *Kloeckera spp.*, *candida zeylanoides*, *candida ciferrii*, *candida utilis*, *candida albicans*. Ochoa-Avalos, 2018 identificó molecularmente a *Kluyveromyces marxianus*, *Clavispora lusitaniae* en *Agave inaequidens*.

Espinoza-Martínez *et al.*, 2022 identificaron cuatro especies de levaduras *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, *Meyerozyma carpophila*, *Pichia kluyveri*, y dos especies de bacterias ácido lácticas: *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum*.

4. FUNDAMENTO TEÓRICO

4.1 EL GÉNERO AGAVE

Los agaves son especies vegetales de importancia ecológica, sociocultural y económica en México, que se considera como centro de origen y diversificación de estas especies (Colunga-García et al., 2007)

La historia de la diversificación de los agaves bajo cultivo y selección humana, iniciada hace 9,000 (Callen, 1965), puede dividirse en tres grandes periodos de acuerdo con el uso que ha guiado, prioritariamente, a los criterios de selección de sus variedades: 1) el de su uso como alimento; 2) el de su uso en la elaboración de bebidas fermentadas, y 3) el de su uso en la elaboración de bebidas destiladas (llamadas genéricamente mezcales). El aprovechamiento de sus fibras ha guiado la selección de variantes específicas a lo largo de los tres periodos (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarrea, 2006).

El género *Agave* es endémico de América, se distribuye desde el sur de los Estados Unidos de América (con dos especies disyuntas en Florida) hasta el norte de Sudamérica, incluyendo las islas del Caribe (García-Mendoza, 2002). El género contiene aproximadamente 210 especies, 159 están presentes en México (75% del total) y 129 son endémicas del territorio mexicano, que representan 61% de las especies del mundo y 81% de las que se distribuyen en México; sin embargo, estas cifras seguramente se modificarán cuando se estudien de manera crítica las especies del Caribe (García-Mendoza, 2019).

Oaxaca es el estado más rico en agaváceas de México, cuenta con 58 especies, 13 de las cuales son endémicas (García-Mendoza et al., 2004). En Oaxaca las especies mezcaleras del género *Agave* están distribuidas en casi todo el Estado, las regiones que no cuentan naturalmente con especies de este género son aquellas en donde predominan los bosques mesófilos y las selvas húmedas, que son zonas donde existe

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

climas cálidos, alta precipitación y humedad atmosférica, tal es el caso de las sierra húmeda de la región Mazateca, la sierra de los Pápalos, Chinantla, la porción de la Sierra Juárez vertiente al Golfo de México y la porción húmeda de la región étnica mixe, en el norte del Estado. En la región de los Chimalapas, considerada por su gran extensión de selvas de gran altura húmedas, existe una especie endémica del género *Agave* (SAGARPA-OAXACA, 2016).

La mayoría de los agaves son potencialmente mezcaleros, hasta magueyes considerados tóxicos por su alta concentración de esteroides, han producido mezcal con un manejo adecuado de la temperatura, nos referimos al *Agave convallis* y otras especies del grupo Marginatae del subgénero Littaeta, de donde se obtiene el mezcal jabalí, un mezcal exótico con un sabor y un efecto muy especial. Este maguey jabalí, abunda en los linderos de los terrenos en el distrito de Miahuatlán, en el distrito de Cuicatlán y en algunas otras regiones de Oaxaca (Palma-Cruz, 1991).

Uno de los constituyentes principales de los Agaves son los polisacáridos (Hernández N. , 2008) las primeras evidencias de la presencia de polisacáridos de fructosa en especies de *Agave* las aportaron (Sánchez-Marroquín & Hope, 1953). Luego, López *et al.* (2003) establecieron la estructura molecular de los fructanos del maguey tequilero y encontraron que presentan estructuras ramificadas y mayor grado de polimerización que los de achicoria.'

Debido a que los fructanos son la principal reserva de carbohidratos solubles en agua de los agaves, su contenido representa el principal componente de varias especies (35 % a 70 % base peso seco) y dado que su hidrólisis libera de 80 % a 86 % de fructosa y de 10 % a 15 % de glucosa, son usados para la producción de jarabes, la cual es una de las aplicaciones más recientes de estas plantas (Escamilla-Treviño, 2012).

Los fructanos son polímeros de fructosa que constituyen los principales carbohidratos de reserva; sólo contienen un residuo de glucosa en el extremo reductor de la molécula (Edelman & Jefford, 1968) y en el agave se almacenan en la cabeza de la planta (Iñiguez et al., 2001). El contenido de fructosa en estos polímeros varía de acuerdo

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

con su grado de polimerización promedio (GPP). Los fructanos son sintetizados a partir de sacarosa y se clasifican como inulinas o levanas; sin embargo, se pueden presentar una variedad de estructuras complejas. Este es el caso de los fructanos del *A. tequilana* Azul, los que, debido a su alto grado de ramificación, han sido nombrados agavinas (López et al., 2003). Por otra parte, derivados de la hidrólisis de estos fructanos se tienen los fructooligosacáridos (FOS), los cuales poseen bajo peso molecular y grado de polimerización menor a 10 unidades de fructosa (Mancilla & López, 2006).

4.1.2 Características de *Agave marmorata* Roezl

Agave marmorata también conocido como “Tepeztate”, “pichomel”, “pitzometl”, “pichometl”, “maguey curandero”, “huiscole”.

Endémica de México, se conoce de los estados de Oaxaca y Puebla. En Oaxaca en los distritos: Coixtlahuaca, Huajuapán, Miahuatlán, Tlacolula, Yautepec. *Agave marmorata* se reconoce por las rosetas laxas con hojas verde-amarillentas a glaucas, ásperas al tacto, margen mamilado, espinas cortas y robustas, inflorescencia paniculada muy laxa y flores pequeñas de color amarillo brillante (García-Mendoza & Franco Martínez, 2018).

Planta de crecimiento rosetófilo acaules (sin tallo), solitarias o rara vez de 1 a 6 individuos, estoloníferos; rosetas poco densas, 1 a 2 m de alto, 1,5 a 2,5 m de diámetro. Hojas de 16 a 20 por individuo, de 1 a 1,3 m de largo, 0,2 a 0,3 m de ancho, ampliamente lanceoladas, dispuestas en varias direcciones, frecuentemente onduladas, acanaladas, dobladas en el ápice, verde-amarillentas con bandas verde azuladas transversales, ásperas, papilosas, margen crenado, carnosas, dentado, dientes 0,7 a 1 cm largo, 0,7 a 1 cm ancho, espina terminal 1,5 a 2 cm largo, 4-8 mm ancho. Inflorescencias con contorno general más largo que ancho, 5,5 a 7 m de alto, fértil en la mitad o el tercio superior, ramas primarias 20 a 40, de 30 a 50 cm largo, ramas secundarias 8 a 12 cm largo, terciarias 2 a 4 cm largo, a veces cuaternarias 1 a 2 cm largo; pedúnculo verde; brácteas 10 a 20 cm largo, 6 a 9 cm ancho en la base,

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez

triangulares, de consistencia como el papel. Flores 3 a 4 cm largo, amarillas; tépalos 1,2 a 1,7 cm largo, 2 a 3 mm ancho, erectos, gruesos; estambres con filamentos 3 a 3,5 cm largo, insertos a la mitad del tubo o en la base de los tépalos, amarillos; anteras 1 a 1,3 cm largo, 1 a 2 mm ancho, amarillas; el fruto es una cápsula de 2,5 a 3,5 cm de largo, 1,5 a 2 cm de ancho, más largas que anchas, pardas; semillas 5 a 7 mm largo, 3 a 5 mm ancho, negras, provista de alas de aproximadamente de 1 mm de ancho. *Agave marmorata* se reconoce por las rosetas laxas con hojas verde-amarillentas o verde azuladas, ásperas al tacto, espinas cortas y robustas, inflorescencia poco densa y flores pequeñas de color amarillo brillante (García-Mendoza, 2011).

Los usos que se le da son: Producción de mezcal y en algunas áreas se extrae aguamiel; los tallos y las inflorescencias jóvenes se consumen horneadas, ya secas se usan para cercos vivos y fabricar nidos de aves; el jugo de las hojas fresco se utiliza para aliviar úlceras, coágulos, asma, golpes y heridas, cocido se emplea como jarabe para curar tos y afecciones de los bronquios; las flores se usan para ornamentar iglesias, altares y casas durante las festividades de la Semana Mayor (Semana Santa), frescas se aprovechan como forraje para el ganado, y los botones florales o “cacayas” se consumen guisados como verdura (García-Mendoza & Franco Martínez, 2018).

4.1.3 Características de *Agave rhodacantha* Trel

Agave rhodacantha también conocido como “Mexicano”, “espadilla”, “espadín”, “barril gordo”, “maguey mexicano”.

Endémica de México, se conoce de Sonora a Oaxaca. En Oaxaca en los distritos: Ejutla, Huajuapán, Miahuatlán, Nochixtlán, Tlacolula, Silacayoapam y Zimatlán. *Agave rhodacantha* es difícil de caracterizar por el escaso material de herbario disponible. Se diferencia de *A. angustifolia* por las rosetas grandes con numerosas hojas, largas y rígidas, dientes grandes y robustos, cercanos entre sí; la inflorescencia grande y vigorosa, con ramas de mayor longitud. Gentry (1982) menciona que las cápsulas son largamente estipitadas, no se aprecia este carácter en los materiales de la región.

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez

Tiene más de 100 hojas por roseta, (0.8-)1.0-1.6 m largo, (5.0-)6.0-10.0 cm ancho, lanceoladas a linear-lanceoladas, rígidas, fibrosas, engrosadas hacia la base, ascendentes, verdes a verde-glaucas, margen recto a ondulado, dentado, dientes (0.5-)0.7-1.0 cm largo, (0.4-)0.6-1.2 cm ancho, antrorsos, fuertes, negruzcos, distantes entre sí 1.0-3.0 cm, espina terminal 2.0-3.0 cm largo, 5.0-6.0 mm diámetro, cónica, aplanada en el haz, no decurrente, negruzca. Especie protegida por su importancia económica. Se propaga vegetativamente, sembrando los hijuelos a la orilla de los terrenos, huertas y en las cercanías de las casas. Sus usos son: Producción de mezcal; las inflorescencias jóvenes se utilizan como forraje; los botones florales se consumen como verdura en distintos guisos; de las hojas se extraen fibras (ixtle) (García-Mendoza & Franco Martínez, 2018).

4.2 MEZCAL

De manera oficial, el mezcal es una bebida alcohólica destilada obtenida por la fermentación (en la mayoría de los casos artesanal) y posterior destilación del jugo de agave cocido, cuenta con Denominación de Origen y con producción regulada por la NOM-070-SCFI1994.

Se involucra a nueve entidades federativas consideradas en la Denominación de Origen Mezcal: Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Guanajuato, Tamaulipas, Michoacán y Puebla. Oaxaca destaca por el número de especies utilizadas, por su extenso padrón de productores de maguey y de mezcal, por sus altos volúmenes de producción y por la presencia de su mezcal en los mercados regional, nacional e internacional. La producción nacional del año 2021 referido a 45% Alc. Vol. fue de 8,099,591.00 litros, siendo el principal estado productor con el 85.40% de producción de mezcal artesanal al año en Oaxaca (COMERCAM, 2022).

La elaboración de mezcal en Oaxaca involucra ocho especies y diecisiete formas protegidas o silvestres de Agave; El maguey espadín (*Agave angustifolia*) es el que

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez

mayormente se cultiva con fines comerciales en los siete distritos declarados por la norma oficial. Otras especies corresponden al maguey mexicano (*Agave rhodacantha*), papalomé o tobalá (*Agave potatorum*), biliaá (*Agave seemanniana*), tepeztate (*Agave marmorata*), cirial, barril, bicuixe, tobasiche (*Agave karwinskii*), arroqueño (*Agave americana* var. *americana*) y maguey Sierra Negra (*Agave americana* var. *oaxacensis*) (Illey-Granich, 2009). (Illesley & Larson, 2012)

4.2.1 Compuestos volátiles en el mezcal

El aroma y sabor de las bebidas alcohólicas (cerveza, vino, tequila y mezcal, entre otras), son el resultado de numerosos compuestos volátiles y no-volátiles, cuya mezcla compleja define sus atributos sensoriales y la aceptación por el consumidor (López & Guevara, 1999; Vallejo & González, 1999; Cole & Noble, 2003).

Los compuestos volátiles tienen diferente origen:

- Pueden estar contenidos en la materia prima y variar entre especies, regiones geográficas y entre condiciones climáticas de cultivo
- Pueden generarse durante la fermentación en función de la cepa, características del mosto y condiciones del proceso, o durante la maduración del producto (Pinal *et al.*, 1997; Cole & Noble, 2003).

Según Molina-Guerrero *et al.*, 2007 identificaron 85 componentes en extractos orgánicos obtenidos por extracción líquido-líquido con diclorometano de 10 mezcales comerciales jóvenes, de los cuales 30 han sido reportados como odorantes importantes en otras bebidas alcohólicas.

En el grupo de los acetales se destaca la presencia elevada de dietil acetal en nueve extractos orgánicos de mezcales, este compuesto es resultado de la reacción de etanol y acetaldehído, su presencia en bebidas alcohólicas contribuye fuertemente a la generación de un olor fuerte, dulce y afrutado (Consejería de Agricultura y Pesca, 2002).

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

En el grupo de los ácidos se encontraron once compuestos de los cuales ocho se reportan como descriptores de aromas, primordialmente a grasa y queso; los compuestos más abundantes son los ácidos: acético, hexanoico y butanoico presentes en todos los mezcales estudiados. Otro grupo muy abundante lo constituyen los alcoholes con 22 compuestos identificados de los cuales, siete son reportados en la literatura como importantes descriptores de aromas, con notas aromáticas frutales y florales (Molina-Guerrero, y otros, 2007).

4.2.2 Proceso de elaboración

El proceso de creación del mezcal involucra más que el trabajo propio de una actividad productiva, ya que involucra el uso de un amplio sistema de conocimientos y de la participación tanto de los grupos domésticos, como de sus comunidades productoras. El primer paso para hacerlo posible es la plantación del agave mezcalero; del cual ya se han nombrado las especies empleadas (Zamora, 2021).

En la producción de mezcal, después del cultivo y cosecha del agave, se emplean cuatro operaciones unitarias básicas: Cocción de la piña de agave: Molienda y prensado de la piña cocida; fermentación del jarabe y destilación del fermentado. De estas la cocción y la fermentación son consideradas las etapas críticas del proceso que inciden en el rendimiento y la calidad del producto (Damián, 2012).

4.2.3 Corte

Cuando el maguey está listo el palenquero toma la decisión de cortarle el quíote, que es la parte central de la mata y de donde salen las semillas que permiten la reproducción sexual. Es primordial realizar el corte, debido a que, si se pasa de tiempo y éste llega a crecer, la mata ya no servirá para la elaboración del mezcal. Los palenqueros señalan que el momento de hacerlo es cuando las hojas del maguey que están circundantes al quíote se juntan formando una sola, la cual tiene mayor rigidez respecto del resto. En ese momento la mata pasa a la condición de "aguanosa"; si bien ya puede trabajarse, comúnmente se esperan de dos a cuatro meses para desprenderla de la tierra, a razón de que la planta puede tener grandes concentraciones de agua y

azúcares bajos, lo que daría como resultado un bajo rendimiento durante la etapa de destilación (Zamora, 2021).

Una vez transcurridos dichos meses, el palenquero irá a cortar las matas que previamente ha seleccionado. Con un hacha o un marro se desprende el maguey de la tierra y con un machete se rasura, hasta dejarlo completamente limpio. Si el camino lo permite, se sube una camioneta hasta donde estén y se cargan las piñas, de 500 hasta 4,000 kilogramos; dependiendo la capacidad de carga de la camioneta (o camión) Si el camino no está en condiciones transitables, el trabajo lo tendrán que hacer mulas o burros, a los cuales se les cargan 100 kilos por viaje. Estos llevan la carga hasta el palenque (Zamora, 2021).

4.2.4 Cocción

El proceso de cocción o cocimiento al cual se somete las "*piñas*" o cabezas de agave tiene 3 grandes objetivos:

- Ablandar el agave para facilitar la molienda.
- Generar azúcares asimilables por las levaduras en la fermentación. En efecto las piñas de agave son muy ricas en azúcares, sin embargo, estos azúcares forman largas cadenas en las plantas y las levaduras son incapaces de asimilar los azúcares en esta forma. Durante el cocimiento, gracias al calor generado estos azúcares se van a cortar (hidrolizar) para formar azúcares simples (principalmente fructosa) que consume la levadura empleada durante la fermentación para reproducirse y producir alcohol (principalmente etanol).
- Generar algunos compuestos volátiles los cuales son importantes en las características aromáticas del producto final. Algunos de estos compuestos le confieren sus notas características "*ahumadas*" al mezcal. Sin el cocimiento estas notas no estarían presentes y el producto obtenido sería muy diferente (Gallardo V. , 2020).

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez

Este proceso se realiza en una cavidad u horadación circular hecha manualmente en el piso a la cual los productores denominan horno, de dimensiones generalmente entre 5 y 12 metros de diámetro con una profundidad de 2 a 4 metros y la capacidad oscila entre 6 y 30 toneladas (Gallardo J. , 2008).

Se coloca la leña al fondo del horno, se enciende y sobre ella se colocan piedras lo suficientemente sólidas para soportar el calor sin fracturarse (piedra volcánica); una vez que se ha alcanzado la temperatura deseada se procede a colocar las piñas de maguey, las cuales se han partido por mitades o en cuartos para facilitar su acomodo en el horno y asegurar una cocción más eficiente. Esto se puede hacer directamente sobre las piedras o colocando una capa de hojas secas, para así evitar que el maguey entre en contacto directo con las piedras y la ceniza que se produce durante la combustión de la leña; esto es total decisión del palenquero y puede variar dependiendo del maguey y del calor que haya alcanzado el horno. Finalmente, se tapa el maguey con una lona o con costales de nylon y se procede a cubrirlo con la tierra disponible alrededor del horno. Esta etapa requiere de gran resistencia física y velocidad por parte de los hombres que están ayudando, ya que se debe tapar el horno lo más pronto posible, para así evitar que el calor escape o que el humo que produce la leña llegue a impregnarse en exceso en las piñas (Zamora, 2021).

4.2.5 Molienda

Después de la cocción, el siguiente proceso es la molienda, la cual tiene como objetivo el desmenuzar los trozos de mayor tamaño del agave cocido, reduciéndolos a la menor fracción posible y la obtención de los jugos de agave ricos en azúcares y así facilitar la etapa posterior de fermentación (Gallardo V. , 2020).

Posiblemente, esta etapa del proceso de elaboración sea la que presente las mayores variaciones según sea la zona. Ya sea que se prefiera hacerlo mediante la molienda en tahona jalada por una yunta de bueyes o mulas; como se acostumbra principalmente en el altiplano potosino y parte de los valles centrales de Oaxaca, o se realice con

máquinas hebradoras, o de forma manual mediante el machucado con mazos de madera (Zamora, 2021).

4.2.6 Fermentación

La siguiente etapa, consiste en el llenado de las tinas de fermentación con el maguey que previamente ha pasado por la molienda. Se utilizan tinas de madera de sabino u ocote, aunque en la actualidad es común encontrar tinacos u otros polímeros plásticos. Ahí se introduce únicamente el bagazo, no se agrega agua ni otras sustancias acelerantes. El palenquero estará al pendiente de la tina; cada prueba consistirá en meter la mano a la tina y verificar su temperatura, cuando esta tenga el calor indicado, será señal para efectuar el próximo paso: formular. Formular significa agregar agua a las tinas, con el objetivo de activar el proceso de fermentación (Zamora, 2021).

Durante la etapa de fermentación actúan una serie de organismos vivos (microorganismos en particular levaduras) que transforman una parte de los azúcares en alcohol (principalmente etanol) así como en otros compuestos importantes que determinan en gran parte las características organolépticas del producto final como por ejemplo los alcoholes superiores y los ésteres. Esta etapa es fundamental en el proceso de elaboración del mezcal o de las bebidas alcohólicas en general y es seguramente la más difícil de controlar y de estandarizar por el hecho de que existen organismos vivos involucrados en ella (Gallardo V. , 2020).

Llenan las tinas con agua de pozo o manantial (casi hasta el borde), se tapan con una lona plástica amarrada con un mecate alrededor y se dejan “trabajar” para que se produzca la fermentación. Esto puede tardar de dos a diez días, dependiendo de la fuerza y concentración de azúcares con los que cuente el bagazo y también de la temperatura ambiental: a mayor calor, menor periodo de fermentación.

Durante este tiempo, el maestro habrá de revolver la mezcla, con la finalidad de que el proceso sea homogéneo. El palenquero posee el conocimiento empírico para saber detectar el momento adecuado de fermentación del mosto en la tina. Esto ocurre cuando la tina deja de burbujear, entonces “está lista para trabajarse” (Zamora, 2021).

4.2.5.1 Características de la fermentación alcohólica

Se define a este tipo de fermentación como el proceso bioquímico por el cual los microorganismos transforman los azúcares del mosto en etanol y CO₂ (Zambonelli, 1988; Navarre, 1994). Para que la fermentación alcohólica tenga lugar, el mosto debe hallarse en condiciones de limitación de oxígeno. Bajo estas condiciones los microorganismos realizan la degradación de los azúcares de forma incompleta generando etanol, CO₂ y energía (Mesas & Alegre, 1999).

4.2.5.2 Factores que influyen en la fermentación alcohólica

Temperatura. Se conoce que a mayor temperatura la fermentación alcohólica transcurre de forma más rápida, sin embargo, el proceso es menos puro. Se produce menos etanol y más cantidad de compuestos secundarios que a menudo no conllevan a mejorar la calidad de la bebida fermentada. Por otro lado, las levaduras se desarrollan óptimamente a los 30° C. Por arriba de esta temperatura la actividad decrece rápidamente y en torno a los 45° C mueren. Por debajo de 10° C la mayor parte de las levaduras silvestres son inactivas.

Oxígeno. Aunque la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico las levaduras mantienen una leve respiración utilizando para ello el oxígeno combinado en las moléculas del mosto. En caso de carencia de este oxígeno pueden requerirse remontados de mosto con aireación para evitar la parada de la fermentación alcohólica (Navarre C. , 1994)

Nutrientes. Por un lado, están los azúcares, que son fuente de carbono y de energía para las levaduras y que deben encontrarse en concentración superior a 20 g/L para que la fermentación alcohólica transcurra a su velocidad máxima. Por otro están las sustancias nitrogenadas, las sales y los factores de crecimiento (vitaminas) que normalmente se hallan en el mosto en concentración suficiente para el desarrollo de las levaduras.

Compuestos químicos de acción negativa. Se conoce que la acumulación de los propios productos de la fermentación alcohólica pueden ralentizarla. Por otro lado, esos mismos

compuestos junto a otros presentes en el mosto de forma natural (taninos) o artificial (pesticidas, SO₂) pueden actuar como inhibidores del crecimiento de las levaduras (Navarre C. , 1994).

4.2.7 Destilación

El siguiente y último paso es la destilación, de la cual se presentan dos modalidades; mediante alambique de acero inoxidable o mediante olla de barro (Zamora, 2021).

El alambique está compuesto de tres grandes partes, un cazo de cobre de aproximadamente 250 litros en donde se pone a hervir el mosto fermentado , sobre el cual se coloca un cono de madera que funciona como una cámara donde se condensan los volátiles, un segundo cazo de cobre colocado en la parte superior del cono, el cual se mantiene permanentemente lleno de agua fría cuya función principal es realizar el enfriamiento de los vapores al interior del cono, generando de esta manera la condensación (Gallardo V. , 2020).

Todo comienza al sacar el maguey cocido de las tinas de fermentación. A la mezcla de agua, jugos y maguey cocido le llaman guarape. Se coloca en las tinas de acero, se agrega agua fría en la pila central y el alambique hace el proceso de condensación. Este es alimentado con leña que se le atiza desde la parte inferior de la tina. Solo se hace una destilación. De tal modo, el trabajo es más rápido y el rendimiento es superior. Por lo regular, los alambiques tienen una capacidad de 200 litros, algunos de los palenques pueden llegar hasta tener cuatro alambiques.

Por otra parte, para destilar en olla de barro es necesario contar con una hornilla de leña sobre la cual se colocan las ollas, las cuales tienen una capacidad de 20 litros cada una. La mayoría de los palenques tienen dos o tres hornillas, aunque existen palenques que cuentan con cuatro o seis de ellas, especialmente aquellos que están certificados y tienen contratos firmados con comercializadoras de mezcal (Zamora, 2021).

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

La olla está cortada por el cuello, es enterrada en la hornilla y alimentada con el fuego que produce la leña. A la parte superior de la olla, se le realiza un orificio justo al centro, por donde saldrá una penca de maguey que irá goteando el mezcal y este a su vez, cayendo en los bidones plásticos. Sobre la boca de la olla se coloca un cazo de acero inoxidable que tiene agua que va circulando a través de un mecanismo de mangueras colocadas a distintos niveles, para así permitir su fácil circulación y evitar que ésta llegue a calentarse. Esta agua es la que permite la condensación; cuando el guarape caliente choca con la superficie fría del cazo, ocurre el proceso de condensación, las gotas que se producen escurren por la penca hasta llegar al bidón.

Bajo este método se realiza una doble destilación. El producto de la primera de ellas se le nombra xixe. Esta, es una mezcla entre el agua que tiene el guarape y el producto de su destilación. Sin embargo, los niveles de alcohol aún son muy bajos, de 15 a 30 grados. El xixe se vuelve a verter en las ollas. Lo que resulte de esa segunda destilación es el mezcal. Los primeros dos litros destilados se les conoce como "puntas", las cuales forman parte del mezcal que tiene mayor concentración de alcohol, pudiendo llegar hasta los 80/90°, las puntas son separadas. Después de las puntas viene el cuerpo del mezcal, el cual ya tiene una graduación más acorde a la que tendrá el producto final. Por último, se obtienen las colas - bajas en graduación alcohólica-; estas sirven para componer las mezclas finales del mezcal (Zamora, 2021).

4.3 CONSORCIOS MICROBIANOS

Un Consorcio Microbiano es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás. La asociación refleja estilos de vida sinérgicos o sintróficos (que significa "comiendo juntos") en el que el crecimiento y el flujo cíclico de nutrientes se conduce más efectiva y eficientemente que en poblaciones individuales (López, Dominguez, & García, 2007).

Un consorcio microbiano puede desempeñar funciones complicadas que poblaciones individuales no podrían; además, la vida en asociación puede generar mayor resistencia a las fluctuaciones del ambiente y promover la estabilidad de los miembros, en el tiempo. Estos rasgos distintivos dependen de dos características. Primero, los miembros de un consorcio se comunican el uno con el otro. Ya sea por el intercambio de sustancias o por señales moleculares, cada población detecta y responde a la presencia de otras dentro del consorcio, ejerciendo sobre ellas un control positivo o negativo en su crecimiento y/o metabolismo (Brenner, You, & Arnold, 2008).

Los consorcios microbianos pueden resistir mejor los periodos de limitación de nutrientes debido a la diversidad metabólica disponible por la diversidad de especies, combinada con la habilidad de compartir metabolitos dentro de la comunidad. Una población minoritaria puede llegar a ser la más activa en un periodo de limitación de nutrientes si tiene la habilidad metabólica capaz de sostener la supervivencia de todo el consorcio. De hecho, el consorcio contiene unas especies minoritarias las cuales han sido retenidas por selección natural para responder a tal situación (Maier, Pepper, & Gerba, 2009).

Los consorcios microbianos también se han caracterizado en función del uso de los recursos. Muchas especies, comúnmente, se encuentran juntas porque tienen los mismos requerimientos ambientales y comparten elementos de su nicho, o porque

dependen de la presencia de un factor común para su estrategia de vida. Normalmente el lugar geográfico en el que se ubica el consorcio coincide con espacios en donde las condiciones ambientales son las óptimas, es decir, donde los microorganismos experimentan el mayor crecimiento y reproducción. Sin embargo, bajo condiciones extremas y para asegurar su supervivencia, pueden desarrollar estrategias como la Adaptación y la Mutación (Morris & Blackwood, 2007).

4.3.1 Levaduras. Características generales

Las levaduras han sido empleadas, desde la antigüedad, en la producción de cervezas, pan y vino, sin embargo, los fundamentos científicos de su cultivo y uso en grandes cantidades fueron descubiertos por el microbiólogo francés Louis Pasteur en el siglo XIX (Pelizer, 2003; Hernández, Masa, & Lozano, 2003).

Las levaduras son consideradas hongos unicelulares y generalmente sus células son ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Son mayores que las bacterias, alcanzando un diámetro máximo de entre 4 y 5 μm se reproducen predominantemente por gemación o fisión, dando por resultado un crecimiento unicelular, aunque algunas pueden ser dimórficas o bifásicas y crecer como micelio bajo condiciones ambientales especiales. (Ochoa-Ochoa & Vázquez-Juárez, 2004).

La estructura de una levadura es la de una típica célula eucariota *Imagen 1*, su morfología es característica de cada especie. En un cultivo puro se puede observar que existe variación en el tamaño y forma de las células, estas diferencias dependerán de la edad del cultivo y el medio en donde se encuentren (García-Cortés, 2004)

.

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

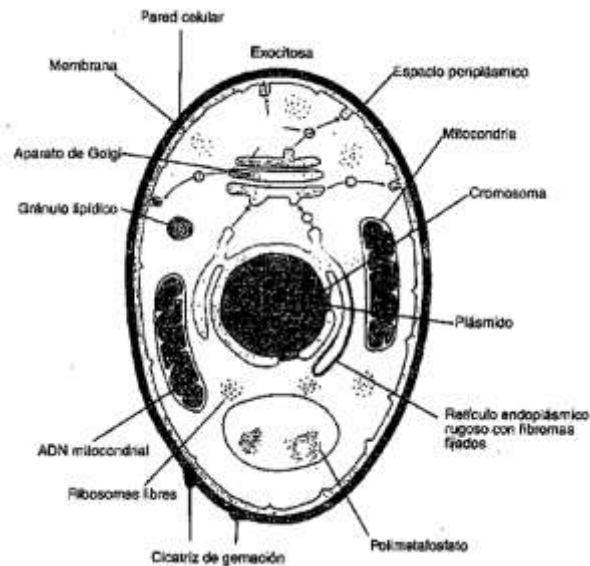


Figura 1 Esquema de una célula de levadura. (P. Ribéreau & Gaillardin)

Son resistentes a antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacterianos de forma natural. Se conoce la secuencia completa de su genoma y se mantiene en constante revisión, lo que ha permitido la manipulación genética de los casi 6600 genes que codifican el genoma de levadura (Bergogne, 1995).

Los constituyentes macromoleculares de las levaduras incluyen proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos (Walker, 1998). Su pared celular comprende entre 15 y 25 % de la masa seca de la célula y sus principales componentes son polisacáridos (80-90 %), esencialmente glucanos y mananos, con una menor contribución de quitina, además de proteínas y lípidos (Zinser & Daum, 1995; Rojas-Ortega, 1995).

El contenido de proteínas en las levaduras varía entre el 40 y el 50 % de su peso seco y tienen una excelente calidad en función de su perfil de aminoácidos esenciales (Chacón-Villalobos, 2004). La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3

y 10, pero les resulta favorable un medio ligeramente ácido con un pH entre 4,5 a 6,5 (Chaucheyras, Millet, & Michalet, 1997).

4.3.2 Levaduras *Saccharomyces*

Estas levaduras son las principales responsables de la fermentación alcohólica de los mostos, incluyendo especies como *Saccharomyces cerevisiae* con elevado poder fermentativo, vigorosas y resistentes al etanol y dióxido de azufre (Navarre J. , 1998). Las células tienen formas variadas: ovaladas, redondas y alargadas, con tamaños también diferentes de 3 a 10 μm x 5 a 12 μm . Se multiplican por gemación múltiple, y forman esporas redondas u ovaladas, conteniendo un asca generalmente de una a cuatro esporas.

Estas levaduras son capaces de fermentar casi todos los azúcares, excepto los de cinco átomos de carbono, produciendo la enzima invertasa, capaz de desdoblar la sacarosa en glucosa y fructuosa aproximadamente en partes iguales, y no asimilan los nitratos.

Dentro de este género podemos encontrar a: *Saccharomyces bailii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces oviformis* (Hidalgo, 2003).

4.3.3 Levaduras *no-Saccharomyces*

Las especies *no-Saccharomyces* (nS) que han sido investigadas en la elaboración de vino, predominan en las primeras etapas de la fermentación alcohólica. Los productos metabólicos resultado del crecimiento de nS incluye glicerol, acetaldehído, ácido acético, ácido succínico, alcoholes superiores y esteres de ácidos grasos (Jolly et al., 2006).

Las levaduras *no-Saccharomyces* tienen un papel importante en las fermentaciones espontáneas hasta que el nivel de etanol alcanza el 4 % (v/v), una concentración que la mayoría de las especies *no-Saccharomyces* no toleran (Benito et al., 2019). Sin embargo, hay géneros de *no-Saccharomyces*, como *Hanseniospora* o *Candida*, que pueden estar presentes hasta el final de la fermentación, y en consecuencia influir

positivamente mejorando propiedades aromáticas y creando perfiles complejos, si se les aplica una disminución de la temperatura (Di Maro et al., 2007).

En los últimos años se ha demostrado que algunas cepas de no-Saccharomyces influyen positivamente en ciertos parámetros como puede ser la calidad, los aromas, la acidez, el color, etc. (Benito. et al., 2019)

4.3.4 Bacterias. Características generales

Las bacterias son organismos unicelulares que pertenecen al grupo de los procariontes; esto quiere decir que carecen de un núcleo celular y de orgánulos como las mitocondrias, los cloroplastos o el aparato de Golgi, por lo que su material genético (ADN) se encuentra libre en el citoplasma. A pesar de su sencilla organización celular, presentan una gran diversidad de formas conocidas como filamentos, cocos, bacilos, vibrios y espirilos. Las bacterias miden entre 0.5 y 5 μ de longitud; son tan pequeñas que es imposible verlas a simple vista, excepto cuando se agrupan en colonias (Sánchez-Contreras et al., 2017).

Estos microorganismos cuentan con una pared que envuelve a la célula y le proporciona solidez y protección contra el ambiente externo. Está cubierta, es decir, la membrana junto con otras estructuras que rodean y protegen el citoplasma, Imagen 2 (Sánchez-Contreras et al., 2017).

A diferencia de la gran mayoría de los organismos superiores, las bacterias tienen que enfrentar y soportar condiciones ambientales cambiantes e impredecibles, y en muchas ocasiones hostiles; para sobrevivir a esto, han desarrollado una sofisticada y compleja protección que a la vez permite de manera selectiva el tránsito de los nutrientes que se encuentran en el exterior y de los productos de desecho desde el interior (Sánchez-Contreras et al., 2017).

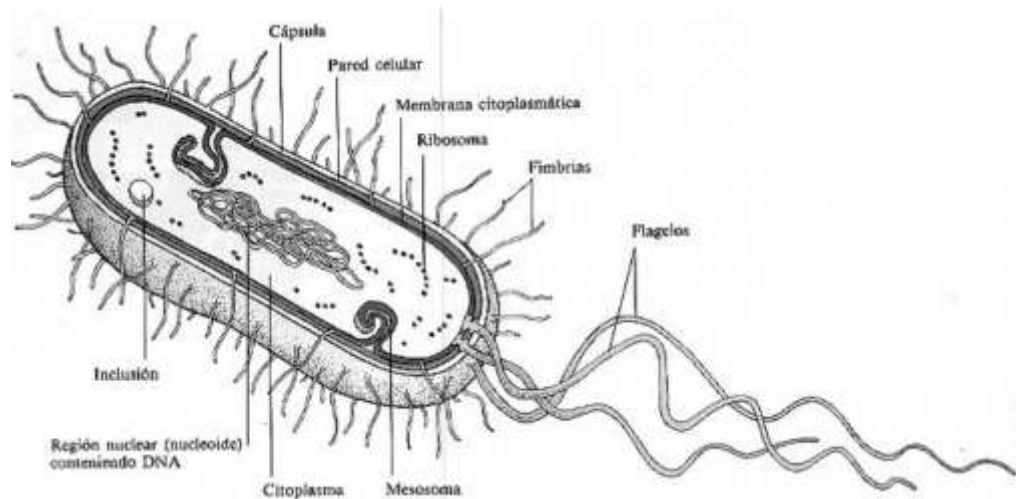


Figura 2 Estructura de una célula procariota

Contienen toda su información genética en un único cromosoma bacteriano circular. También poseen sistemas productores de energía y biosintéticos necesarios para el crecimiento y la reproducción. Poseen como característica particular una pared rígida de peptidoglicanos. Son generalmente de vida libre y poseen ADN extracromosómico en forma de plásmidos, estos codifican genes de resistencia a antibióticos o factores "sexuales" como los pili (Pedranzani et al., 2018).

4.3.5 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BAL), son una clase funcional que designa un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, no patógenas, no toxigénicas, fermentadoras, principalmente producen ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que las hace útiles como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos. Comparten otros rasgos comunes como ser aerotolerantes, no forman esporas, no reducen el nitrato y no producen pigmentos (Almanza & Barrera, 1991).

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez

Las BAL desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación; ellas son muy utilizadas en la industria alimentaria, no solamente por su habilidad por acidificar y por lo tanto preservar alimentos de las esporas, sino también su implicación en la textura, sabor, olor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados (Axelsson, 1993).

Además de producir el ácido láctico, las bacterias acidificantes, llamadas también bacterias iniciadoras, contribuyen al sabor, aroma, textura y el valor nutricional de alimentos fermentados a través de la producción de exopolisacáridos (EPS) y modificación de proteínas (Arribas & Polo, 2008).

Diferentes factores afectan el crecimiento de BAL en un medio de fermentación. Además de los requerimientos nutricionales, la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las BAL. Existe una temperatura óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta y depende de las características del microorganismo utilizando, como también de las condiciones ambientales (Guerra, Rua, & Pastranal, 2001).

Las BAL pertenecen al *phylum Firmicutes* que comprende alrededor de 20 géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leunconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* son los principales miembros de las BAL, siendo *Lactobacillus* el más grande de estos géneros (Bouzar, Cerning, & Desmazeaud, 1997). Las BAL son cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor de 0.5-0.8 μm . Se trata de un grupo de bacterias fisiológicamente uniforme, de pared Grampositiva (Ekinci & Gurel, 2007).

4.3.6 Metabolismo de las BAL

El grupo se subdivide en bacterias homo y heterofermentativos en función de los productos de su metabolismo.

Homofermentativos

El grupo homofermentativo se designa a aquellos microorganismos que producen del 90 al 97% de ácido láctico a partir de la lactosa. Lo conforman algunos géneros como

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

Lactococcus, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, poseen las enzimas aldosa y hexosa isomerasa, utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) al convertir un mol de glucosa en dos moles de ácido láctico (Jay, 1992).

Dentro de este grupo se tiene: *Lactobacillus* de bastones largos, aislados o en cadenas cortas, termófilos, acidificantes muy energéticos y de actividad caseolítica notable. *Streptococcus*, de formas esféricas en cadenas, acidificación rápida y poca caseolítica (18) (Hernandez, 2007).

Heterofermentativos

Se designan a aquellas bacterias que producen un 50% de ácido láctico y cantidades apreciables de etanol, aldehídos y dióxido de carbono (CO₂); es decir que producen cantidades equimolares de lactato, etanol y CO₂, a partir de las hexosas; poseen sólo la enzima fosfocetolasa por lo que siguen las vías monofosfato de hexosa o de las pentosas. Todas las especies de *Leunconostoc*, así como algunos *lactobacilos*, son microorganismo heterofermentativos (Jay, 1992).

Las especies heterolácticas obligadas utilizan solamente la ruta dependiente fosfocetolasa para metabolizar azúcares, y además de ácido láctico, ellas producen cantidades significantes de ácido acético y/o etanol con la generación de dióxido de carbono; la D-galactosa puede ser metabolizada a través de la ruta tagatosa 6-fosfato o ruta Leloir (Almanza & Barrera, 1991). Estas especies fermentativas metabolizan hexosas a través de la ruta glucolítica Embden-Meyerhoff, pero pentosas y algunas otras sustancias son metabolizadas vía fosfocetolasa para producir ácido láctico y otros productos (típicamente ácido acético y etanol). Miembros de las BAL pueden ser subdivididas en dos distintos grupos basados en su metabolismo de carbohidratos (Almanza & Barrera, 1991).

4.4 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Los primeros métodos de identificación molecular fueron la hibridación con una sonda específica, el análisis de secuencias del ADNr 16S, la hibridación ADN-ADN y el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. La identificación por medio de técnicas moleculares se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos. Cabe mencionar que hay otras técnicas que han demostrado buenos resultados en la detección e identificación de microorganismos patógenos en los alimentos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), biosensores, electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE), microarreglos, la pirosecuenciación 454, entre otros (Palomonio & González, 2014).

4.4.1 ESTRUCTURA DEL ADN

La molécula de ADN está constituida (Imagen 3a) por una doble cadena en la que cada una de sus hebras está formada por uniones covalentes sucesivas entre un azúcar (desoxirribosa) y una molécula de fosfato. Cada azúcar de las dos cadenas está unido a una de las siguientes 4 bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Estas 4 bases tienen distintas posibilidades de unión entre ellas a través de puentes de hidrogeno. Así, la A y la T, tienen 2 puentes de hidrogeno, mientras que la G y la C, tienen 3 puentes de hidrogeno. El número de puentes de hidrogeno establece una complementariedad específica entre las bases que determina sus uniones. Sin embargo, en la molécula del ácido ribonucleico (ARN), la T es substituida por el uracilo (U).

En el ADN, los dos extremos de los esqueletos, de las dos cadenas complementarias de unidades fosfato-desoxirribosa, base nitrogenada (llamadas nucleótidos) terminan en un grupo fosfato en uno de los extremos que se denomina extremo 5' (Imagen 3a), y un hidroxilo del azúcar en el otro extremo, que se denomina 3'. Así, los dos esqueletos de desoxirribosa-fosfatobase se enfrentan en sentido contrario de manera que el

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez

extremo 5' se enfrenta siempre al 3' a través de las uniones complementarias de las bases, lo que confiere estabilidad a la doble cadena de ADN (Martínez-Frías, 2010).

Las bases nitrogenadas contienen la información genética, son estructuras planas, aromáticas. Establecen interacciones por formación de puentes de hidrógeno entre bases complementarias de la cadena doble, e interacciones hidrofóbicas que ayudan a estructurar las cadenas mediante el acomodamiento entre bases vecinas de la misma cadena (Burkard, 1999).

La unión de una base nitrogenada a una pentosa da lugar a los compuestos llamados nucleósidos. Se efectúa a través de un enlace glicosídico (Archarya, 2006), con configuración beta (β) entre el carbono 1 de la ribosa o desoxirribosa, y un nitrógeno de la base, el 1 en las pirimidinas, y el 9 en las purinas, con la pérdida de una molécula de agua.

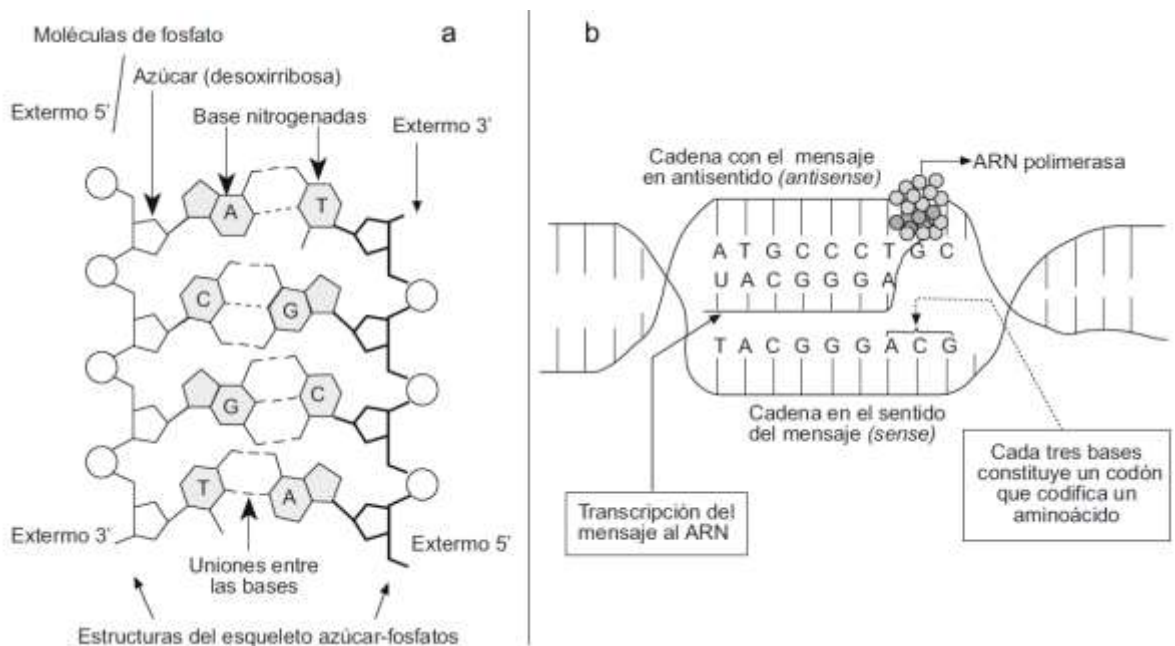


Figura 3 Imagen 3 a) Estructura de la doble cadena de ADN. Los extremos de las cadenas terminan en un grupo fosfato llamado extremo 5', y en un hidroxilo del azúcar, que se denomina extremo 3'. b) Proceso de transcripción del mensaje genético al ARN mensajero.

Para evitar confusiones en la nomenclatura de nucleósidos y nucleótidos, los átomos de la pentosa se designan con números seguidos de un apóstrofe (1', 2', 3', 4' y 5'), para distinguirlos de los de las bases, por lo que los enlaces de los nucleósidos se designan como β (1'-1) en las pirimidinas y β (1'-9) en las purinas (Archarya, 2006).

Los nucleótidos son los ésteres fosfóricos de los nucleósidos. Están formados por la unión de un grupo fosfato al carbono 5' de una pentosa. A su vez la pentosa lleva unida al carbono 1' una base nitrogenada.

Se forma cuando se une un ácido fosfórico a un nucleósido en forma de ion fosfato (-O-HOPO-O-) mediante un enlace éster con el grupo alcohol -OH del carbono 5' de la pentosa. Aunque la ribosa tiene tres posiciones en las que se puede unir el fosfato (2', 3' y 5'), y en la desoxirribosa dos (3' y 5'), los nucleótidos naturales más abundantes son los que tienen fosfato en la posición 5'. Nucleótidos con fosfato en 3' aparecen en la degradación de los ácidos nucleicos (Robert, 2008).

4.4.2 Región ITS

En organismos eucariotas, los genes que codifican para ARN ribosomales se encuentran ordenados en arreglos que incluyen unidades transcripcionales en repetición: 18S - 5.8S - 28S, dos regiones variables: espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2), así como dos secuencias externas ETS (por sus siglas en inglés: External Transcribed Spacer) (Imagen 4) (Jeewon & Hyde, 2007; Korabecna, 2007).

El uso de las regiones variables ITS para el estudio de la diversidad fúngica, ha hecho necesario el diseño de oligonucleótidos universales; es decir, que permitan la amplificación de la región de interés, pero de todos los taxa (Bidartondo & Gardes, 2005). White y colaboradores (1990) diseñaron los primeros oligonucleótidos universales (ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4) para lograr la amplificación de estas regiones, lo que dio pauta al diseño de oligonucleótidos universales y específicos para cada taxón de hongos.

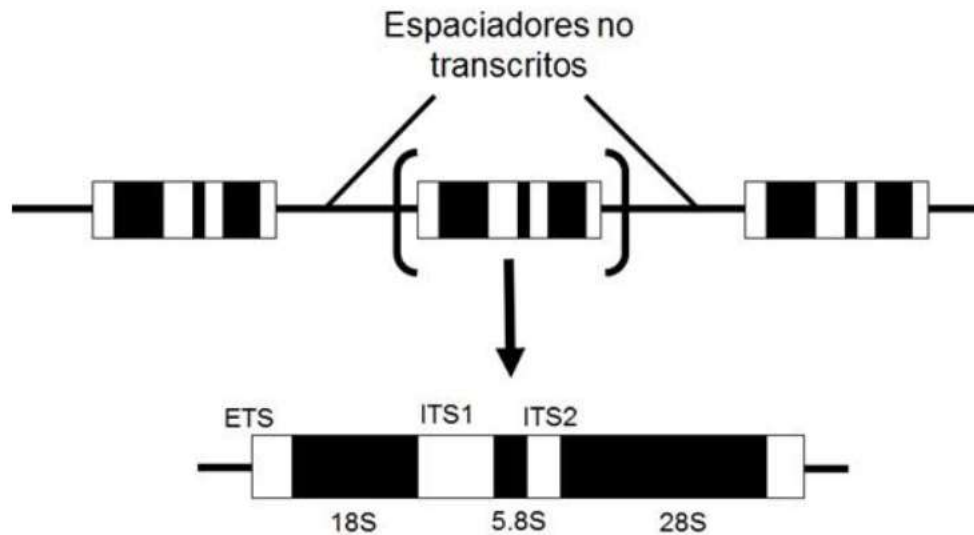


Figura 4 Organización de los genes rARN eucarióticos. Modificado de: Deacon, 2006

4.4.3 Electroforesis de ADN

Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones.

La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución. Por su parte, la electroforesis en geles de poliacrilamida, aunque tiene una mayor limitación en cuanto al tamaño de los fragmentos que podemos separar (5-600 pb), posee un poder de resolución mucho mayor, permitiendo la separación de moléculas que difieren en un sólo par de bases. Los geles de poliacrilamida se corren de forma vertical y tienen la desventaja de ser más complicados en su elaboración y manipulación (Cornejo-Romero *et al.*, 2014).

Los geles de agarosa tienen un poder de resolución mucho menor que los de poliacrilamida, porque no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño menos de unas 50 pb. Sin embargo, el rango de tamaños que pueden separarse es

mucho mayor en un gel de agarosa (moléculas desde 50 pb hasta unos 40 kb) dependiendo de la concentración de este (0.3-2% p/v); cuanto más baja es la concentración de agarosa mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa.

La agarosa es un polímero lineal compuesto de residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glucosídicos α (1 $\rightarrow$ 3) y β (1 $\rightarrow$ 4). Las cadenas del polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y >200 nm (Kirkpatrick 1990). Existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican en función de la temperatura a la que se disuelven y solidifican. Las agarosas estándar se disuelven en el buffer a una temperatura de 90-95°C y solidifican a 35-45°C. La concentración (p/v) de la agarosa es un parámetro de gran importancia pues determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ADN (Cornejo-Romero *et al.*, 2014).

4.4.4 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) es una de las técnicas más importantes en biología molecular, ya que se pueden obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Cornejo-Romero *et al.*, 2014).

En la PCR se simula en un tubo lo que ocurre durante la replicación celular. La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando: el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar; la polimerasa; los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción); desoxinucleótidos (dNTPs); cloruro de magnesio (MgCl₂) u otro cofactor necesario para que trabaje la polimerasa y una solución

amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis (Espinosa, 2003).

Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes (Figura 2), dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (Espinosa, 2003).

4.4.5 Secuenciación Sanger

El método convencional de secuenciación de ADN (Sanger) fue descrito hace ya más de 30 años. Este método ha ayudado a obtener una gran información sobre distintos genomas, tanto procarióticos como eucarióticos, pero a su vez las necesidades de los estudios actuales (secuenciación de genomas completos, diversidad de microorganismos, transcriptómica, descubrimiento de variables alélicas, secuenciación de ARN, etc.) ha dejado en claro que tiene limitaciones tanto en rendimiento como en costo.

La técnica enzimática se basa en la interrupción controlada de la replicación del ADN in vitro. Se realiza una PCR del fragmento que se va a secuenciar, pero, a diferencia

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

de una PCR convencional, se utiliza un solo iniciador y se agregan dideoxinucleótidos (ddNTPs) que carecen del grupo hidroxilo en el extremo 3' y están marcados con radiactividad o con fluoróforos. Cuando se incorpora un dideoxinucleótidos a la cadena en elongación, se termina su amplificación, de tal manera que al final, se tienen fragmentos de diferente longitud, cada uno terminando en un ddNTPs. Los fragmentos obtenidos, se separan y analizan electroforéticamente de manera manual o automática. Con esta técnica Fred Sanger y colaboradores (1977) secuenciaron el primer genoma viral de ADN llamado PhiX174, de aproximadamente 5 500 pb y 11 genes (Cornejo-Romero *et al.*, 2014).

5. METODOLOGÍA

5.1 LOCALIZACION

5.1.1 San Pedro, Teozacoalco

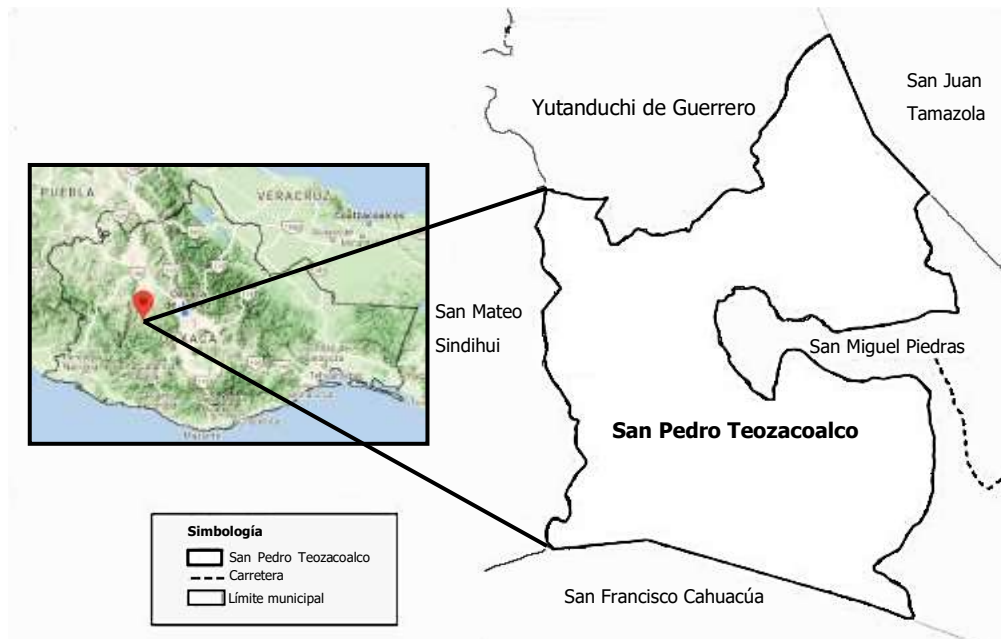


Figura 5 Macro y microlocalización del municipio de San Pedro Teozacoalco (Valencia-Sánchez, 2020)

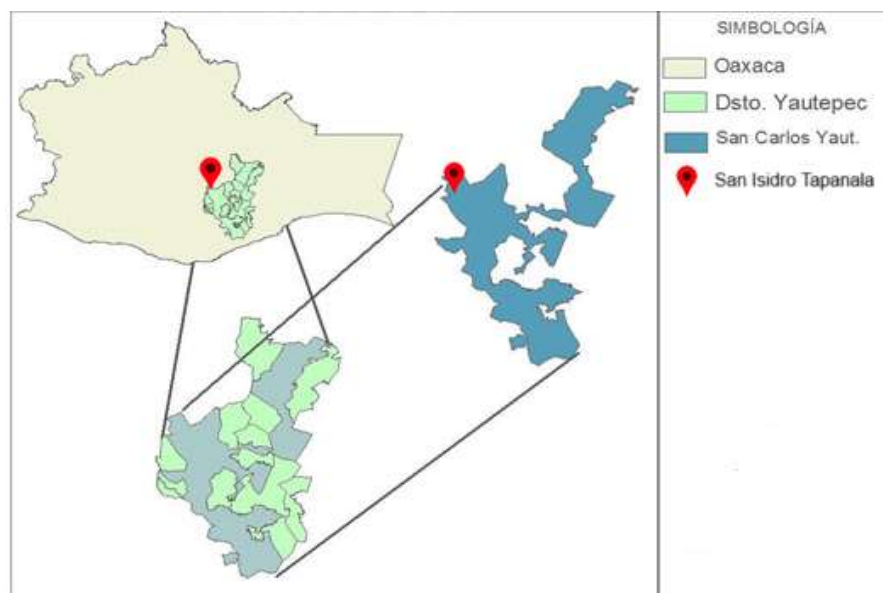
San Pedro Teozacoalco es un municipio del estado mexicano de Oaxaca. El municipio se encuentra localizado en la región de la Mixteca Alta. San Pedro Teozacoalco tiene las siguientes colindancias: al norte y oeste con el municipio de San Mateo Sindihui, al norte con Yutanduchi de Guerrero y con el municipio de San Juan Tamazola, al sur con San Francisco Cahuacá y al oeste con San Miguel Piedras (Fig. 5). Sus coordenadas son 17°01'N 97°17'O / 17.017, -97.283.

Se encuentra a una altura de 1590 metros sobre el nivel del mar, en su territorio se encuentran algunas planicies y lomas. Cuenta con una superficie territorial de 108.45 kilómetros cuadrados (Valencia-Sánchez, 2020).

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

De acuerdo con información del prontuario municipal del INEGI, en el municipio se encuentran las siguientes localidades y asentamientos humanos: Tierra colorada, Loma Larga, Santa Ana, San Isidro, El Calvario, Tierra Blanca segunda sección, Buena Vista, San Antonio el Progreso y San José Río Minas. De acuerdo con la SEDESOL (2017), se cuenta con una zona urbana de atención prioritaria.

5.1.2 SAN ISIDRO TAPANALA, YAUTEPEC



*Figura 6 Localización de San Isidro Tapanala. Proyección cónica conforme Lambert
Coordenadas planas. Fuente INEGI 2010, elaborado por Joel Barriga M.*

La localidad de San Isidro Tapanala está situada en el Municipio de San Carlos Yautepec, en el Estado de Oaxaca. y se encuentra en las coordenadas GPS: Longitud (dec): -96.229167, latitud (dec): 16.538056.

Se encuentra a 14.0 kilómetros, en dirección Oeste, de la localidad de Santiago Quiavicuzas, la cual tiene la mayor población dentro del municipio. Y con respecto a San Carlos Yautepec, que es la capital del municipio, se localiza a en dirección Noroeste, a 65.2 kilómetros.

5.2 MUESTREO

Las muestras fueron tomadas del mosto de las tinas de fermentación de mezcal de tipo artesanal a partir de *Agave rhodacantha* (Mexicano) en un palenque ubicado en San Pedro Tezacoalco (palenque 1), Municipio de Nochixtlán en Oaxaca, y *Agave marmorata* (Tepeztate) en un palenque ubicado en San Isidro Tapanala (palenque 2) en el Municipio de San Carlos Yautepec.

Cada muestra se obtuvo por triplicado en frascos esterilizados a tres profundidades distintas: en la superficie de la tina de fermentación, en la parte media y al fondo de esta. A las cuales se le midieron in situ la temperatura, el pH y los sólidos solubles disueltos. Las muestras fueron transportadas en condiciones óptimas al laboratorio de control ambiental del Instituto Tecnológico de Oaxaca.

5.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LEVADURAS Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Se realizaron diluciones seriadas con el jugo del mosto de cada palenque; empleando caldo peptonado al 1% y se sembraron 50 µL de la dilución 1×10^{-6} por extensión en placa.

Las levaduras se aislaron en dos medios distintos: ADS (agar dextrosa Sabouraud) *Tabla 1* y YPD (Yeast Extract-Peptide Dextrose) *Tabla 2*. A ambos medios se le adicionó 100 mg/100 mL de cloranfenicol.

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

Tabla 1 Modo de preparación de medio ADS y YPD

Reactivo	Cantidad [g/L]
Para ambos medios	
Agar	15
Dextrosa	20
Medio ADS	
Peptona de caseína	5
Peptona de carne	5
Medio YPD	
Extracto de levadura	10
Peptona de caseína	20

Las BAL (bacterias ácido lácticas) se aislaron en medio MRS (Man Rogosa y Sharpe)
Tabla 3, este medio es selectivo para BAL.

Tabla 2 Modo de preparación de medio MRS

Reactivo	Cantidad [g/L]
Agar bacteriológico	15
Dextrosa	20
Sulfato magnésico	0.2
Extracto de carne	8
Tween 80	1
Citrato amónico	2
Peptona bacteriológico	10
Fosfato dipotásico	2
Sulfato de manganeso	0.05
Acetato de sodio	5
Extracto de levadura	4

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez



Figura 7 Medios de cultivo: YPD, ADS y MRS

Las levaduras se incubaron a una temperatura de 29 °C y las BAL a 31 °C; durante un periodo de 48 horas. Se seleccionó de forma visual tomando en cuenta características como: color, borde, tamaño, elevación, opacidad y consistencia.

Para obtener cultivos puros se tomaron en cuenta las colonias que más variedad mostraban y se sembraron cada una de ellas por estría cruzada, esta técnica se repite hasta conseguir colonias individuales de la cepa de interés.

5.4 CARACTERIZACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA

De acuerdo con Briones, 2009 se realizó la caracterización macroscópica como se muestra en la tabla 4.

Tabla 3 Caracterización macroscópica

Terminología para la 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.

Para la observación microscópica en levaduras se realizó una tinción simple con azul de metileno:

- De la caja Petri, con una aza de platino se tomó una pequeña colonia de la cepa de levadura y en un portaobjetos conteniendo una gota de agua salina se hizo un frotis.
- El frotis se cubrió con azul de metileno durante 1 minuto, después se enjuagó con agua destilada. Se secó la tinción a temperatura ambiente con ayuda de papel absorbente.
- Se colocó una gota de aceite de inmersión en el portaobjetos con la muestra ya fijada y se observó en el microscopio con objetivo de inmersión (100x).

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

A las BAL se les realizó tinción gram:

- De la caja Petri, con una aza de platino se tomó una pequeña colonia de la BAL y en un portaobjetos conteniendo una gota de agua salina se hizo un frotis.
- El frotis se cubrió con cristal violeta durante 1 minuto, después se enjuagó con agua destilada y se le retiró el exceso de agua.
- Se agregó una gota de yodo Lugol durante 1 minuto, se enjuagó con agua destilada y se le retiró el exceso de agua.
- Se agregó una gota de Alcohol acetona durante 15 segundos, se enjuagó con agua destilada y se le retiró el exceso de agua.
- Se agregó una gota de safranina durante 1 minuto, se enjuagó con agua destilada y se le retiró el exceso de agua. Se secó la tinción a temperatura ambiente con ayuda de papel absorbente.
- Se colocó una gota de aceite de inmersión en el portaobjetos con la muestra ya fijada y se observó en el microscopio con objetivo de inmersión (100x).

5.5 PRESERVACIÓN DE MICROORGANISMOS POR CONGELACIÓN

Para la conservación de las cepas de levaduras y de bacterias ácido lácticas se utilizó el método de preservación de microorganismos por congelación de Ocares P & Castro F, 2020.

1. Inspección primaria del cultivo microbiano: se observó con un microscopio el cultivo y se determinó la pureza de las colonias.



Figura 8 Cepa de levadura en una placa de Petri

2. Realización de las copias de seguridad del cultivo microbiano
 - Se utilizó glicerol al 10% como crioprotector, el cual se esterilizó a 121°C por 15 minutos.
 - Se prepararon dos viales criogénicos correspondientes a dos copias de seguridad por cada cepa, a los cuales se les asignó una etiqueta con su número de colección correspondiente.
 - Se tomaron de tres a cuatro asadas de la placa de agar y se depositaron en un vial criogénico con 1500 µL de glicerol al 10% en su interior.
 - Las copias de seguridad fueron almacenadas a -20 °C.

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez!



Figura 9 Método de criopreservación de cultivos microbianos

3. Evaluación de viabilidad de la muestra post-criopreservación

- Se recuperaron los microorganismos desde el sistema de congelación, 48 horas posterior al proceso de criopreservación.
- Se resembraron en una placa de agar usando un asa de platino. Las levaduras y las bacterias ácido lácticas se incubaron durante 48 horas a 29 °C y 31 °C respectivamente.

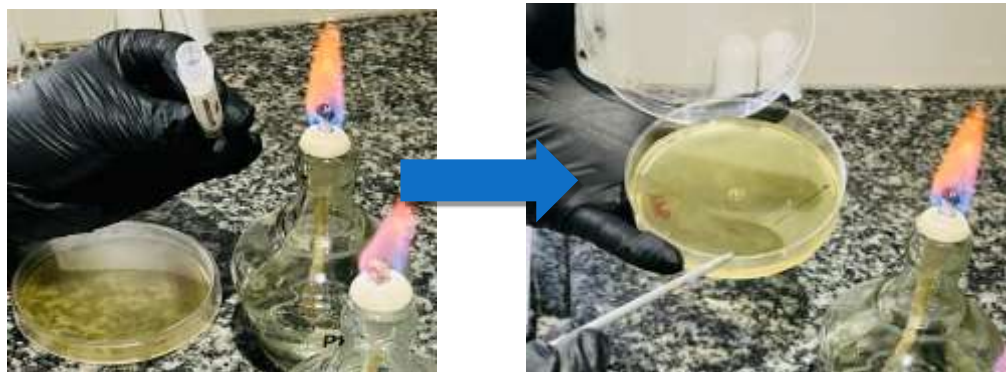


Figura 10 Resiembra de los microorganismos criopreservados después de 48 horas

5.6 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

5.6.1 Levaduras

La extracción de ADN genómico de levaduras se realizó por medio de dos métodos; con el protocolo de Osorio *et al.*, 2008 y con el kit de ADN genómico de YeaStar™.

Para llevar a cabo el protocolo de Osorio *et al.*, 2008 se prepararon las siguientes soluciones

- Solución 1: solución de sorbitol 1M, EDTA 0.1M, con un pH final de 5 y se le añadieron 50 Unidades (U) de la enzima Beta-glucuronidasa.
- Solución 2: Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM con un pH final de 7.4.
- Solución 3: SDS (Solución Dodecil sulfato de sodio) al 10%.
- Solución 4: KAc (acetato de potasio) 5M con un pH de 4.8.



Figura 11 Soluciones preparadas para el protocolo de Osorio *et al.*, 2008

1. Las cepas se tomaron de la placa de agar de dos a tres asadas para ser colectadas en 200 μ L de agua inyectable estéril en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante.
2. Se resuspendieron en 500 μ L de la solución 1, después se incubaron en baño maría a 37°C durante 60 minutos agitando en vórtex periódicamente cada 20 minutos.

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

3. Al término de los 60 minutos se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 500 µL de la solución 2 agitando en vórtex.
4. Posteriormente se añadieron 50 µL de la solución 3 y se incubó en baño María a 65 °C por 30 minutos.
5. Se añadieron 200 µL de la solución 4, se resuspendieron las células agitando en vórtex (mínimo 30 segundos). Se dejó en baño de hielo por 30 minutos, después se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos y se trasladó el sobrenadante a otro tubo. Se volvió a centrifugar por 5 minutos para eliminar otras impurezas y se trasladó el sobrenadante a otro tubo.
6. Se adicionaron 900 µL de isopropanol (conservado a -20 °C), se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos agitando suavemente el tubo. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante.
7. Se añadieron 500 µL de etanol al 70% (conservado a -20 °C), se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN se diluyó en 50 µL de agua inyectable estéril y se conservó a -20 °C.

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez



Figura 12 Extracción de ADN genómico de levaduras con el protocolo de Osorio et al., 2008

Las soluciones del kit de ADN genómico de YeaStar™ de Zymo Research se muestra en la Figura 13



Figura 13 Soluciones del kit de ADN genómico de YeaStar™

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

1. Las cepas se tomaron de la placa de agar de dos a tres asadas para ser colectadas en 200 μ L de agua inyectable estéril en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 minutos y se retiró el sobrenadante.
2. Se agregaron 120 μ L de YD Digestion Buffer y 5 μ L de R-Zymolyase, se suspendió el sedimento agitando en vórtex y se incubó a 37 °C durante 60 minutos.
3. Al termino de los 60 minutos se le agregó 120 μ L de YD Lysis Buffer y se mezcló agitando suavemente.
4. Después se añadieron 250 μ L de cloroformo (conservado a -20 °C) mezclando bien durante un minuto, se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se cargó en la columna Zymo-Spin III y se centrifugó a 10000 rpm durante 1 minuto.
5. Se agregaron 300 μ L de tapón de lavado de ADN y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm durante un 1 minuto, este lavado se repitió por segunda vez.
6. La columna Zymo-Spin III se transfirió a un nuevo tubo y se le agregaron 50 μ L de agua inyectable estéril, se esperó 1 minuto y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 segundos para eluir el ADN. Finalmente, el ADN se conservó a -20 °C.

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

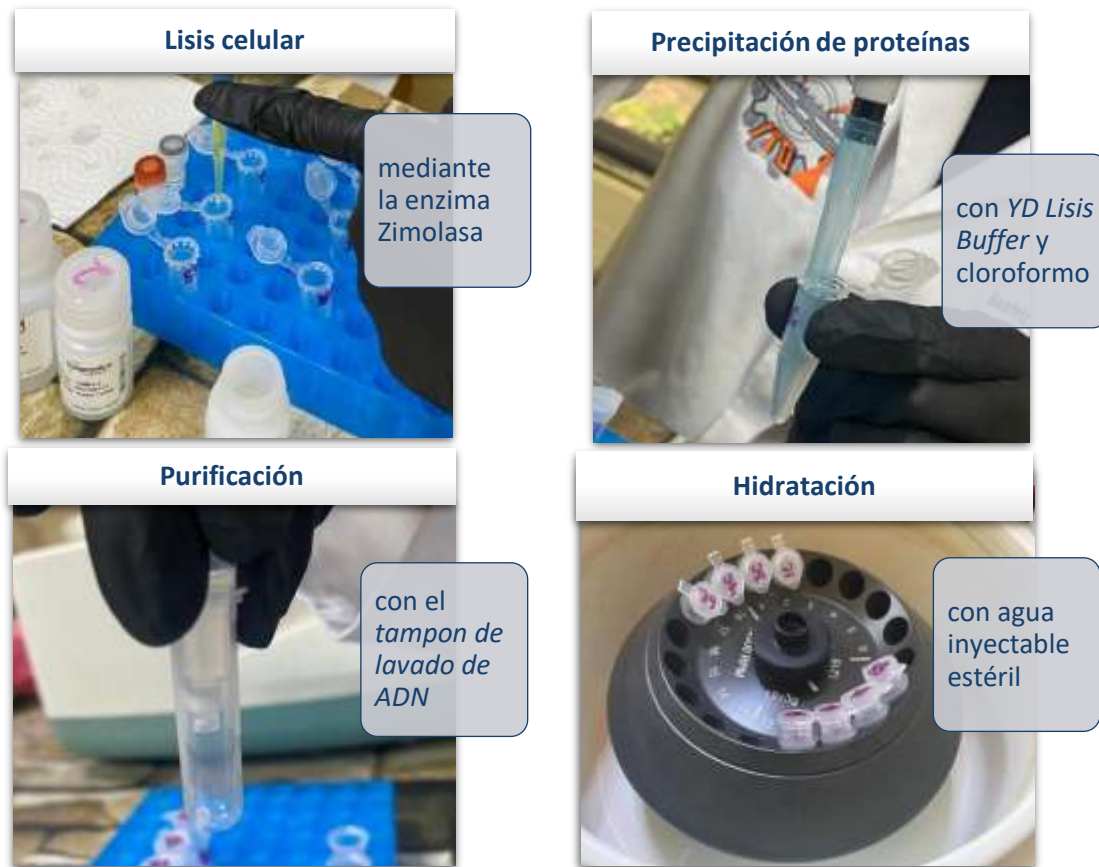


Figura 14 Extracción de ADN genómico de levaduras con el Kit de ADN genómico de YeaStar™

5.6.2 Bacterias Ácido Lácticas

Para la extracción de ADN genómico de bacterias ácido lácticas se usaron dos métodos distintos; el método de CTAB y el Kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep de Zymo Research.

Para el método de CTAB se prepararon las siguientes soluciones:

- Cloroformo: alcohol isoamílico: se mezcló cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24: 1.
- Fenol/cloroformo: alcohol isoamílico: se mezcló en proporción 1: 1 fenol neutro saturado y cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) (v/v)

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez!

- CTAB/NaCl: se mezcló Hexadecyltrimethylammonium Bromide al 10 % y NaCl 5M en proporción 1:1.
- Solución Proteinasa K (20 mg/ ml): se conservó a – 20 °C.
- TE pH 8.0: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA.
- SDS al 10 % (p/v): se disolvieron 10 g de SDS en 100 ml de agua destilada.
- NaCl 5M: se disolvieron 14.610 g de NaCl en un volumen final de 50 ml y se autoclavó.



Figura 15 Soluciones preparadas para el método de CTAB

1. Se tomaron de 2 a 3 asadas de las colonias de la placa de agar y se resuspendieron en 500 μ L de TE hasta que se consiguió una perfecta homogeneización.
2. Posteriormente se añadieron 30 μ L de SDS al 10 % y se mezcló bien, en seguida se agregaron 3 μ L de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó a 37 °C por 60 minutos.
3. Se añadieron 100 μ L de NaCl 5 M, se mezcló haciendo espuma; después se agregaron 80 μ L de CTAB/NaCl, se mezcló bien volteando el tubo y se incubó a 65°C durante 10 minutos.
4. Al termino de los 10 minutos de incubación se añadió un volumen (713 μ L) de la solución fenol/cloroformo: alcohol isoamílico (25/24:1), se mezcló volteando el tubo y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos. Se extrajo la fase superior procurando no tocar la interfase. Esto se repitió dos veces.

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

5. Se extrajo con igual volumen (volumen de la fase superior) de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos y se extrajo la fase superior. Se tomó en cuenta el volumen que se recuperó.
6. Se precipitó con 1/10 volúmenes de acetato sódico y 2 volúmenes de etanol helado a -20°C , y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos.
7. Se retiró el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en 50 μL de agua inyectable estéril y se conservó a -20°C .

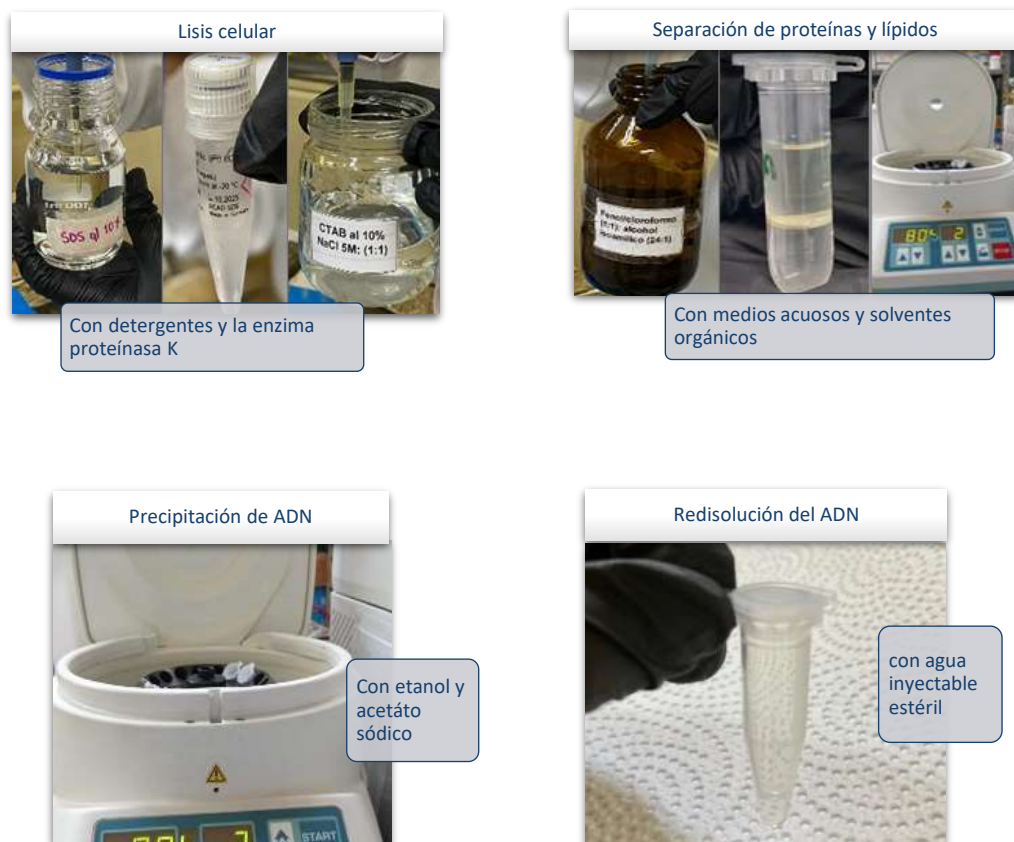


Figura 16 Proceso de extracción de ADN genómico de BAL con el método de CTAB

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez!

El siguiente método fue con el Kit Fungal/Bacterial Miniprep Quick-DNA™ de Zymo Research (*Figura 17*).



Figura 17 Soluciones del kit de extracción de ADN para bacterias

1. Las células se recolectaron con un asa y se resuspendieron en 200 μ L de agua libre de nucleasas, esto se transfirió a un tubo de lisis ZR BashingBead; después se le añadieron 750 μ L de tampón BashingBead. Se agitó en vórtex durante 15 minutos.
2. Se centrifugó el tubo de ZR BashingBead en una microcentrífuga a 12000 rpm durante 1 minuto.
3. Se transfirieron 400 μ L de sobrenadante al filtro Zymo-Spin III-F en un tubo de recolección y se centrifugó a 11000 rpm durante 1 minuto.
4. Se agregaron 1200 μ L de tampón de lisis genómico al filtrado en el tubo de recolección del paso anterior y se mezcló bien. De esta mezcla se transfirieron 800 μ L a una columna Zymo-Spin IIICR3 en un tubo de recolección, se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto. Se desechó el flujo del tubo de recolección y se repitió este paso.

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez

5. Se agregaron 200 μ L de tampón de prelavado de ADN a la columna Zymo-Spin IIICR en un tubo de recolección nuevo y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto.
6. La columna Zymo-Spin IIICR se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml, se le agregaron 50 μ L de agua inyectable estéril y se centrifugó a 12000 rpm durante 30 segundos para eluir el ADN y se conservó a -20 °C



Figura 18 Extracción de ADN genómico de BAL con el kit Fungal/Bacterial Miniprep Quick-DNA™

5.7 ELECTROFORESIS HORIZONTAL EN GEL DE AGAROSA AL 1.2%

La integridad del ADN obtenido se evaluó por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.2%. Se utilizó el agente intercalante Gel Red en amortiguador TAE, como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb de Promega®, el gel se corrió a 80 Volts durante 60 minutos.

1. Preparación del gel de agarosa

- Se pesó 0.24 g de agarosa y se disolvió en 20 ml de TAE 1x. La mezcla se calentó en un horno de microondas por periodos de diez y cinco segundos hasta que se fundió la agarosa.
- La prensa se selló con masking tape, se colocó el peine en la posición deseada e inmediatamente se vació la solución de agarosa.
- Se dejó solidificar por 30 minutos

2. Preparación de las muestras de ADN

- En un segmento de papel Parafilm® se colocaron 2.5 µL de buffer de carga (con azul de bromofenol), 2 µL de marcador de peso molecular y 5 µL de muestra de ADN.

3. Carga de las muestras y corrida del gel

- Una vez que el gel solidificó, se retiró el sellado de los bordes y el molde con el gel se colocó en la cámara de electroforesis
- Se añadió el buffer de electroforesis (TAE 1x) hasta cubrir el gel unos milímetros, después se retiró cuidadosamente el peine para dejar libre los pocillos para las muestras
- El marcador de peso molecular se cargó en el primer pocillo y las muestras de ADN en los pocillos siguientes; de forma cuidadosa evitando formar burbujas o picar el gel. Se registró el orden de las muestras en los pocillos.

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez!

- Se cerró la cámara de electroforesis, se conectaron los cables a la fuente de alimentación y se aplicó un voltaje de 80 V.
- El gel se corrió hasta que el azul de bromofenol contenido en el buffer de carga haya migrado lo suficiente ($\sim 3/4$ partes del gel), se apagó la fuente de poder y se sacó el gel de la cámara cuidadosamente para ser observado en un transiluminador que emite luz ultravioleta a una longitud de onda de 300 nm.
- Se fotografió el gel.



Figura 19 Electroforesis horizontal

5.8 CUANTIFICACIÓN DE ADN GENMICO

Para estimar la pureza del ADN, así como la presencia de proteínas en los amplicones, se cuantificaron mediante espectrofotometría con el espectrofotómetro NanoDrop™ Lite Thermo Scientific™ a una absorbancia de 260/280 nm y para detectar la presencia de proteínas.

1. Una vez encendido el NanoDrop se seleccionó el botón Home para elegir la opción DNA.
2. Siguiendo las instrucciones mostradas en pantalla, se estableció un blanco pipeteando 1 µL de agua inyectable estéril en el lector y se presionó el botón Blank
3. Cuando se completó la medición se limpió el blanco con una toallita seca de laboratorio
4. Se confirmó el blanco colocando una nueva alícuota de agua inyectable estéril y se presionó el botón Blank.
5. Cuando se completó la medición se limpió el blanco con una toallita seca de laboratorio
6. Se colocó 1 µL de muestra de ADN en la celda y se presionó el botón Measure
7. Una vez contemplada la medición se limpió la celda con una toallita seca de laboratorio y se registraron las medidas. Estos dos últimos pasos se repitieron con todas las muestras de ADN.

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez!

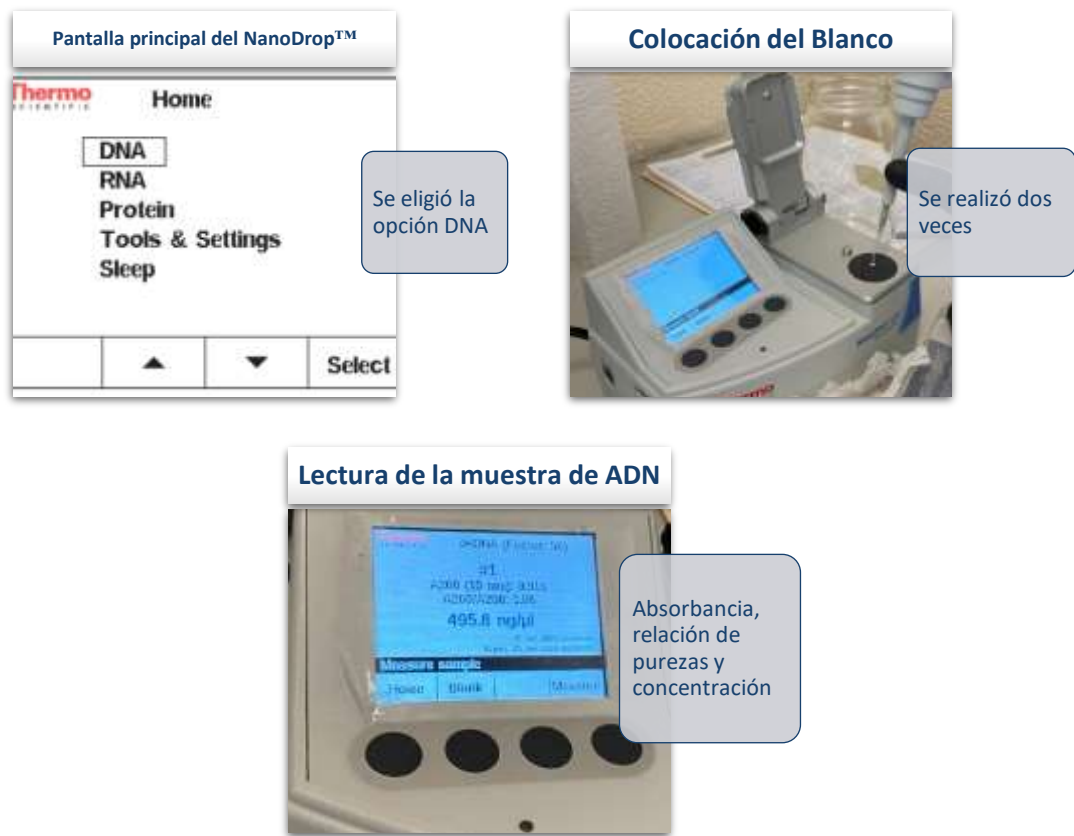


Figura 20 Cuantificación de ADN genómico en NanoDrop

5.9 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

Se realizó la amplificación por PCR con el kit de Thermo Scientific; PCR Master Mix 2x.

1. Se comenzó por descongelar en hielo los oligos ITS1 e ITS4 para levaduras, para bacterias los oligos 8F y 1492R, el máster mix y el agua libre de nucleasas
2. Una vez descongelado el máster mix y el agua, se preparó una mezcla de ambos tomando en cuenta el número de reacciones que se hicieron y se agitó en vórtex durante unos segundos.
3. Para levaduras se colocó 1 µL del oligo ITS1 y para bacterias 1 µL del oligo 8F en un tubo para PCR
4. Posteriormente, para levaduras se colocó 1 µL del oligo ITS4 y para bacterias 1 µL del oligo 1492R dentro del tubo para PCR sin tocar el oligo que se colocó anteriormente
5. Se agregó 1 µL de ADN sin tocar los oligos que se colocaron anteriormente
6. A cada tubo de PCR se le adicionaron 47 µL de la mezcla que se preparó en un principio.
7. Los tubos se colocaron en un termociclador en el cual se programaron los ciclos de temperatura correspondientes. Para levaduras se amplificó el gen 5.8 S usando los primers universales *ITS 1* (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e *ITS 4* (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e *ITS 4* (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, seguida de 29 ciclos de 1 minuto a 94 °C, alineamiento a 55 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C por 2 minutos con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.
8. En bacterias ácido lácticas se amplificó el gen 16S ADN_r utilizando los primers 8F (3' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG '5) y 1492R (3' GTT ACC TTG TTA CGA CTT '5) bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, 29 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, alineamiento a 57 °C

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez

durante 1 minuto, extensión a 72 °C por 1 minutos con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

La calidad de los amplicones se observó en un gel de agarosa al 1.2% y se cuantificaron en NanoDrop.

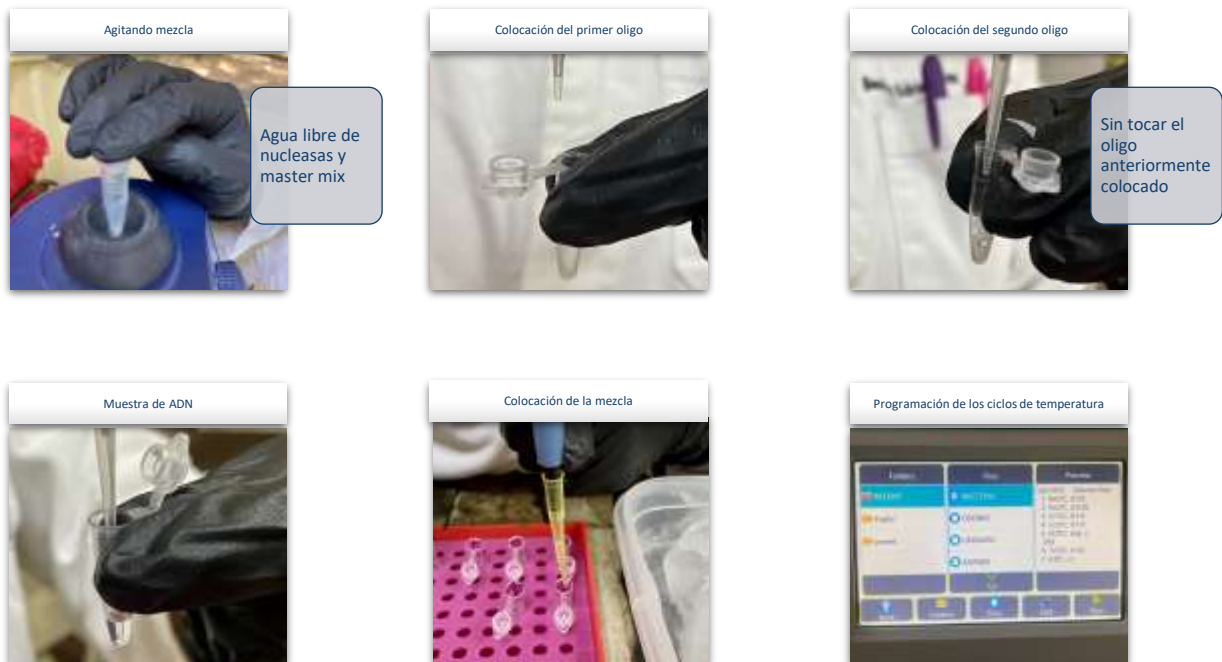


Figura 21 Proceso de preparación de las muestras para la PCR

5.10 SECUENCIACIÓN

Los amplicones (productos de PCR) se enviaron a secuenciar a Macrogen; la cual es una empresa ubicada en Corea del sur especializada en el análisis genómico y en biotecnología.

Se ingresó a la página de Macrogen <https://dna.macrogen.com> y se creó una cuenta para poder solicitar el servicio de secuenciación estándar.



Figura 22 Menú principal de la página de Internet de Macrogen

Al solicitar dicho servicio se descargó una plantilla de Excel en la cual se ingresó la información del pedido: nombre de la muestra, nombre del oligo, la concentración de la muestra, tamaño de la muestra y concentración del oligo.

#	Reaction Information		Sample Information				Primer Seqs
	Sample Name *	Primer Name *	Sample Concentration (ng/ul)	Plate Name	Well Position	Product Size(bp)	Target Size(bp)
1	OAGL1T	RF	495.8			600bp Over	1500
2	OAGL1T	1492H	495.8			600bp Over	1500
3	OAGL2T	RF	426.2			600bp Over	1500
4	OAGL2T	1492H	426.2			600bp Over	1500
5	OAGL3T	RF	523.8			600bp Over	1500
6	OAGL3T	1492H	523.8			600bp Over	1500
7	OAGL4T	RF	535.3			600bp Over	1500
8	OAGL4T	1492H	535.3			600bp Over	1500
9	OAGL5T	RF	350.1			600bp Over	1500
10	OAGL5T	1492H	350.1			600bp Over	1500
11	OAGL6T	RF	396.5			600bp Over	1500
12	OAGL6T	1492H	396.5			600bp Over	1500

Figura 23 Plantilla de Excel de orden de secuencia estándar de Macrogen

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez!

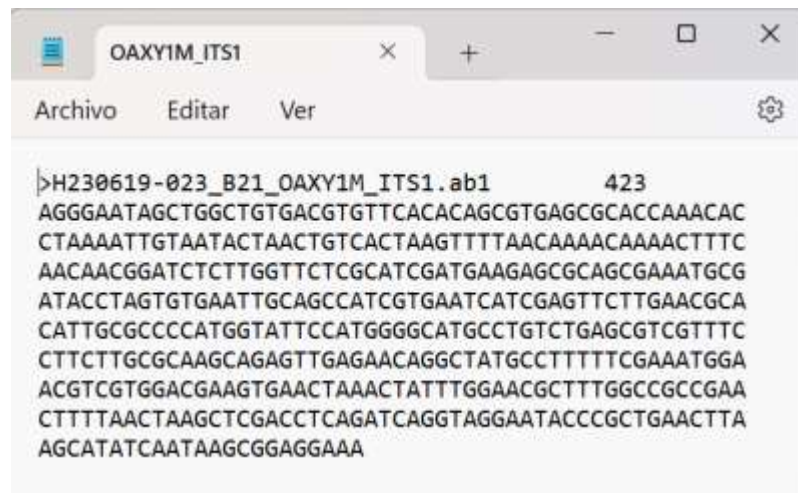
Después se descargó la guía de envío de la paquetería correspondiente. Los tubos de PCR se adhirieron a una hoja de papel (Fig. 24) en la cual se le otorgó la información correspondiente de cada amplicón: nombre de la muestra y concentración de la muestra. Y se enviaron por paquetería en un sobre especial.



Figura 24 Formato en que se enviaron los amplicones

5.11 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

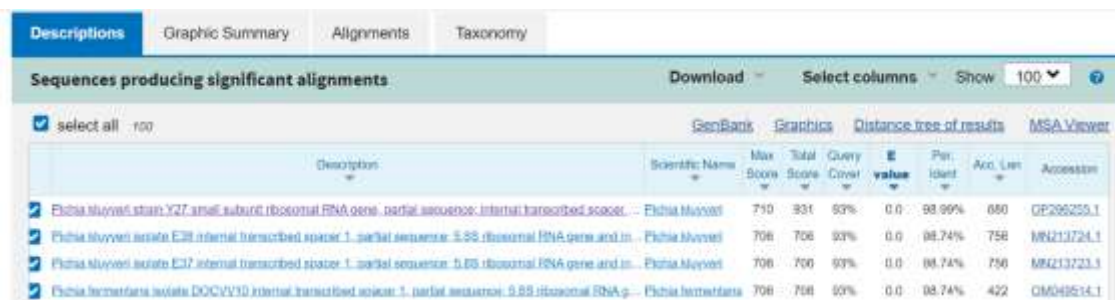
Una vez que se obtuvieron los resultados de la secuenciación de las muestras que se enviaron a Macrogen se procedió a ingresar las secuencias en formato fasta al programa bioinformático BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>



```
>H230619-023_B21_OAXY1M_ITS1.ab1      423
AGGGAATAGCTGGCTGTGACGTGTTACACAGCGTGAGCGCACCAACAC
CTAAATTGTAATACTAACTGTCACTAAGTTTTAACAAACAAAACCTTC
ACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCG
ATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCA
CATTGCGCCCCATGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTC
CTTCTTGCACAAGCAGAGTTGAGAACAGGCTATGCCTTTTCGAAATGGA
ACGTCGTGGACGAAGTGAACATAACTATTTGGAACGCTTTGGCCGCCGAA
CTTTAACTAAGCTCGACCTCAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTA
AGCATATCAATAAGCGGAGGAAA
```

Figura 25 Secuencia de una levadura en formato fasta

Se seleccionó la opción “Nucleotide BLAST” debido a que se trabajó con ácidos nucleicos. Después de unos segundos la plataforma arrojó una lista de los géneros y especies con mayor porcentaje de identificación (Ilustración 5).



Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pichia kluyveri strain Y27 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Pichia kluyveri	710	931	93%	0.0	98.99%	680	CP296255.1
Pichia kluyveri isolate E38 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and in...	Pichia kluyveri	706	706	93%	0.0	98.74%	758	MN213724.1
Pichia kluyveri isolate E37 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and in...	Pichia kluyveri	706	706	93%	0.0	98.74%	756	MN213723.1
Pichia fermentans isolate DDCVY10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA g...	Pichia fermentans	706	706	93%	0.0	98.74%	422	OM408514.1

Figura 26 Secuencias que producen alineaciones significativas

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

Se realizaron secuencias consenso en el programa bioinformático BioEdit.

1. Dentro del programa se abrió la secuencia forward y reverse
2. En el menú de la parte superior se eligió la opción *Edit* → *copy sequence as raw text*
3. En un archivo Word se pegaron las secuencias
4. En BioEdit se seleccionaron las zonas de corte en la secuencia (como se muestra en la Ilustración 6) se copiaron en el buscador del navegador dentro del archivo Word y se eliminaron esas secuencias.
5. Se creó una nueva alineación en BioEdit. En el menú de la parte superior se eligió la opción *File* → *New Alignment* luego *File* → *Import from clipboard*
6. A la secuencia reverse se le creó su complemento. Se eligió la opción *Sequence* → *Nucleotid Acid* → *Reverse Complement*.
7. Se alinearon ambas secuencias (forward y reverse). Se eligió la opción *Sequence* → *Pairwise alignment* → *Align two sequence (allow ends to slide)*.
8. Se creó la secuencia consenso. Se eligió la opción *Alignment* → *Create consensus sequence*.
9. La secuencia consenso se copió en formato fasta eligiendo la opción *Edit* → *Copy sequences to clipboard (fasta format)* y se pegó en la plataforma BLAST para llevar a cabo el alineamiento de las secuencias.



Figura 27 Zona de corte de la secuencia

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

Se logró que gran parte de las colonias de levaduras y BAL se aislaran en medios selectivos y presentaran un buen crecimiento lo que facilitó la purificación. En el palenque 1 (San Pedro Teozacoalco) se purificaron ocho cepas de levaduras y ocho cepas de bacterias ácido lácticas, se codificaron como se muestra en la tabla 4. En el palenque 2 (San Isidro Tapanala) se purificaron diez cepas de levaduras y seis cepas de BAL las cuales se nombraron como se muestra en la tabla 5.

Tabla 4 Levaduras y BAL aisladas del palenque 1 de San Pedro Teozacoalco

<i>Agave rhodacantha</i> (Mexicano Verde)			
LEVADURAS		BAL	
No.	Nombre asignado	No.	Nombre asignado
1	ITOYIV019	19	ITOLIV024
2	ITOYIV020	20	ITOLIV025
3	ITOYIV021	21	ITOLIV026
4	ITOYIV022	22	ITOLIV027
5	ITOYIV023	23	ITOLIV028
6	ITOYIV024	24	ITOLIV029
7	ITOYIV025	25	ITOLIV030
8	ITOYIV026	26	ITOLIV031

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez**

Tabla 5 Levaduras y BAL aisladas del palenque 2 de San Isidro Tapanala

<i>Agave marmorata</i> (Tepeztate)			
LEVADURAS		BAL	
No.	Nombre asignado	No.	Nombre asignado
9	ITOYVI002	27	ITOLVI001
10	ITOYVI003	28	ITOLVI002
11	ITOYVI004	29	ITOLVI003
12	ITOYVI005	30	ITOLVI004
13	ITOYVI006	31	ITOLVI005
14	ITOYVI007	32	ITOLVI006
15	ITOYVI008		
16	ITOYVI009		
17	ITOYVI010		
18	ITOYVI011		

En las siguientes figuras (28-31) se muestran las cepas de levaduras y BAL que se aislaron y purificaron. En total se lograron aislar 18 cepas de levaduras y 14 cepas de BAL en ambos palenques.

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez!**

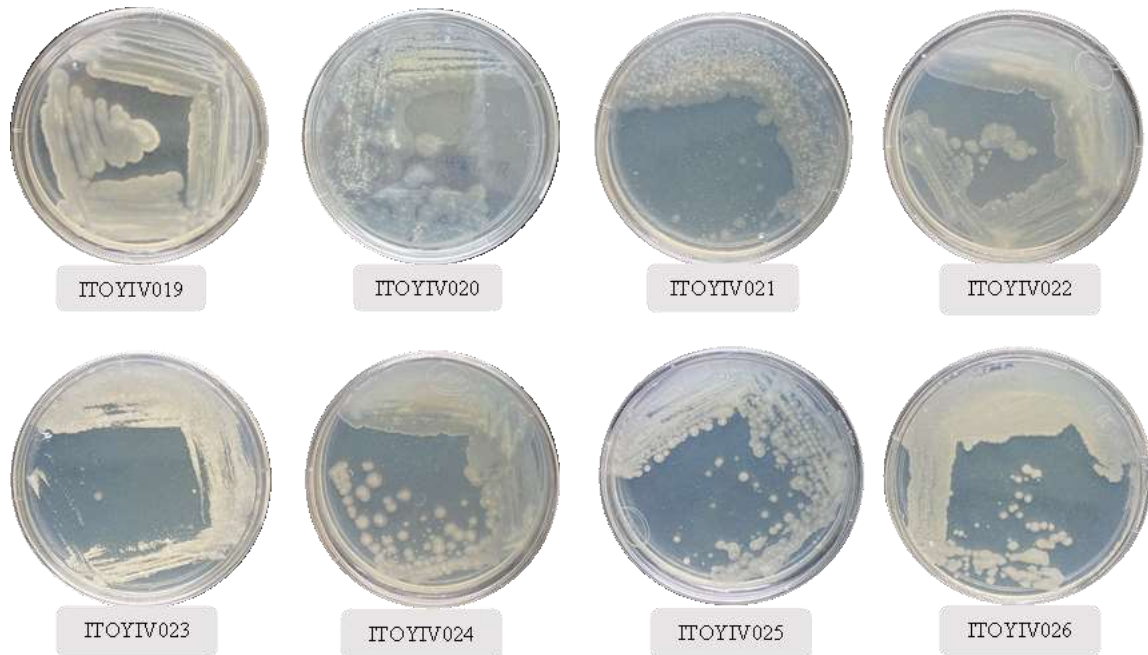


Figura 28 Levaduras purificadas en medio ADS del palenque 1 (A. rhodacantha Trel)

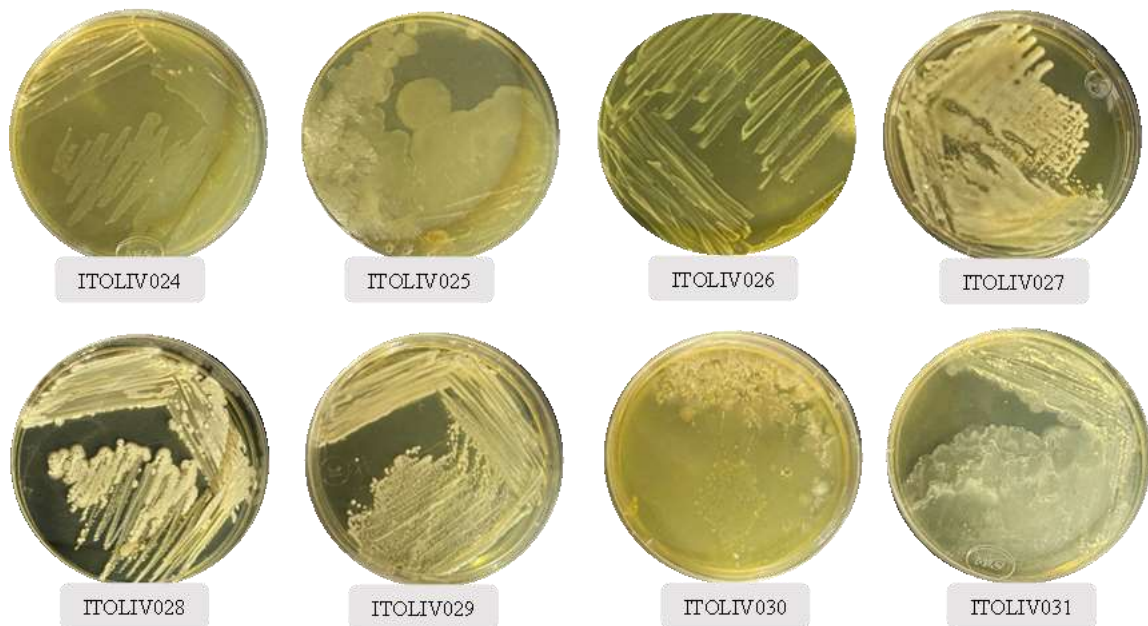


Figura 29 BAL purificadas en medio MRS del palenque 1 (A. rhodacantha Trel)

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**



Figura 30 Levaduras purificadas en medio YPD del palenque 2 (A. marmorata Roezl)

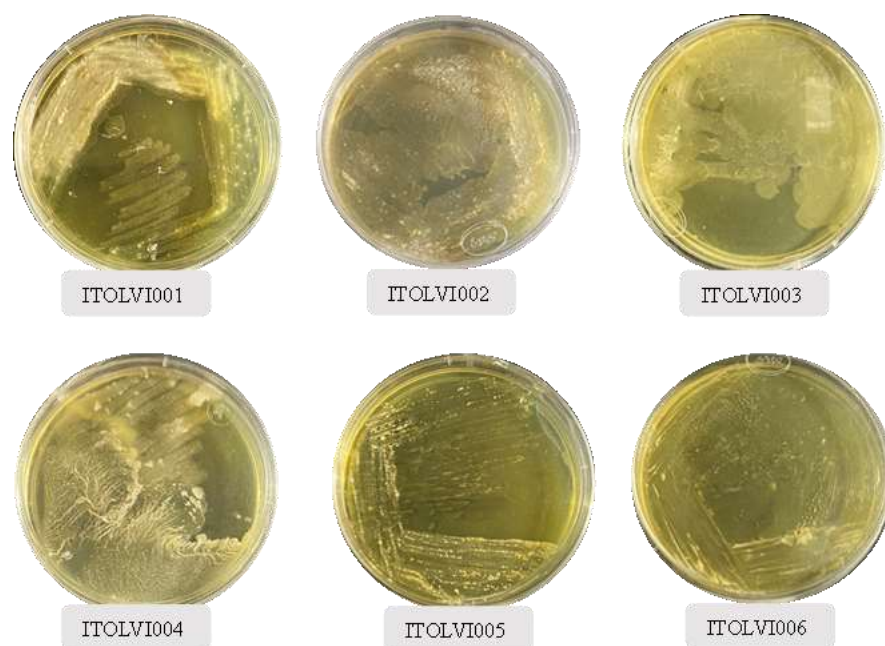


Figura 31 BAL purificadas en medio MRS del palenque 2 (A. marmorata Roezl)

6.3 CARACTERIZACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA

Los aislados obtenidos fueron analizados macroscópicamente y microscópicamente de acuerdo a su morfología y sus características físicas, estructurales y tinción celular. El análisis de características físicas fue realizado a nivel macroscópico (que se basa en la morfología colonial) y microscópico (que se basa en las características celulares como forma, disposición celular, presencia de estructuras específicas y tinción celular).

Tabla 6 Morfología macroscópica de las colonias de levaduras de los palenques 1 y 2

CEPA	FORMA	COLOR	SUPERFICIE	ELEVACIÓN	BORDE	OPACIDAD	CONSISTENCIA
ITOYIV019	Irregular	Blanco	Lisa	Elevada	Ondulado	Brillosa	Seca
ITOYIV020	Circular	Crema	Lisa	Convexa	Continuo	Mate	Seca
ITOYIV021	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Continuo	Mate	Seca
ITOYIV022	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Continuo	Mate	Seca
ITOYIV023	Ovalada	Blanco	Lisa	Aplanada	Continuo	Brillosa	Cremosa
ITOYIV024	Circular	Blanco	Lisa	Aplanada	Continuo	Mate	Seca
ITOYIV025	Irregular	Blanco	Lisa	Aplanada	Continuo	Mate	Seca
ITOYIV026	Circular	Blanco	Lisa	Elevada	Continuo	Brillosa	Cremosa
ITOYVI002	Circular	Blanco	Lisa	Aplanada	Continuo	Brillosa	Cremosa
ITOYVI003	Irregular	Blanco	Lisa	Elevada	Continuo	Brillosa	Cremosa
ITOYVI004	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Continuo	Brillosa	Cremosa
ITOYVI005	Irregular	Blanco	Lisa	Elevada	Continuo	Brillosa	Cremosa
ITOYVI006	Circular	Blanco	Lisa	Aplanada	Continuo	Brillosa	Cremosa
ITOYVI007	Circular	Crema	Lisa	Aplanada	Continuo	Brillosa	Cremosa
ITOYVI008	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Continuo	Mate	Cremosa
ITOYVI009	Irregular	Blanco	Lisa	Elevada	Continuo	Brillosa	Cremosa
ITOYVI010	Circular	Blanco	Lisa	Aplanada	Continuo	Brillosa	Cremosa
ITOYVI011	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Continuo	Brillosa	Cremosa

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez**

Los resultados de morfología colonial muestran que los cultivos de levaduras (Fig. 32 y 34) presentaron características físicas muy similares: formas circulares, superficie lisa, borde continuo y opacidad brillante. Los cultivos de bacterias ácido lácticas (Fig. 33 y 35) mostraron características físicas muy similares: formas circulares e irregulares, superficie rugosa y consistencia viscosa.

Tabla 7 Morfología macroscópica de las colonias de BAL de los palenques 1 y 2

CEPA	FORMA	COLOR	SUPERFICIE	ELEVACIÓN	BORDE	OPACIDAD	CONSISTENCIA
ITOLIV024	Circular	Crema	Rugosa	Elevada	Continuo	Opaca	Viscosa
ITOLIV025	Circular	Crema	Lisa	Aplanada	Continuo	Brillosa	Viscosa
ITOLIV026	Irregular	Blanco	Lisa	Elevada	Continuo	Brillosa	Viscosa
ITOLIV027	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Continuo	Brillosa	Viscosa
ITOLIV028	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Continuo	Brillosa	Viscosa
ITOLIV029	Irregular	Blanco	Lisa	Aplanada	Ondulado	Brillosa	Viscosa
ITOLIV030	Circular	Blanco	Lisa	Convexa	Continuo	Transparente	Viscosa
ITOLIV031	Circular	Crema	Lisa	Aplanada	Continuo	Mate	Viscosa
ITOLVI001	Ovalada	Blanco	Lisa	Elevada	Continuo	Mate	Viscosa
ITOLVI002	Irregular	Blanco	Rugosa	Elevada	Ondulado	Mate	Viscosa
ITOLVI003	Circular	Blanco	Lisa	Aplanada	Ondulado	Mate	Viscosa
ITOLVI004	Irregular	Blanco	Rugosa	Elevada	Ondulado	Transparente	Viscosa
ITOLVI005	Ovalada	Blanco	Rugosa	Convexa	Ondulado	Transparente	Viscosa
ITOLVI006	Irregular	Crema	Rugosa	Elevada	Ondulado	Brillosa	Viscosa

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez**

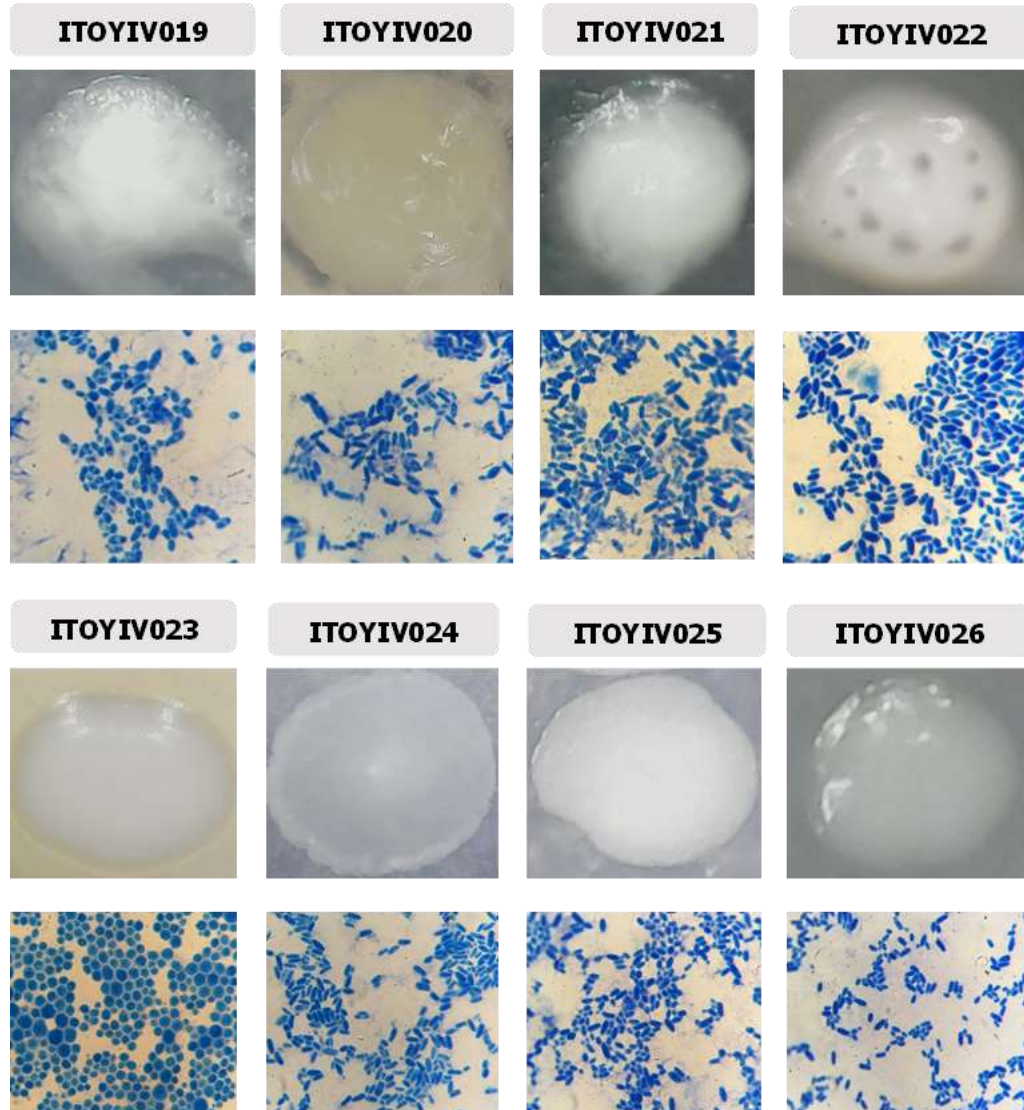


Figura 32 Morfología macro y microscópica de las cepas de levadura del palenque 1

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

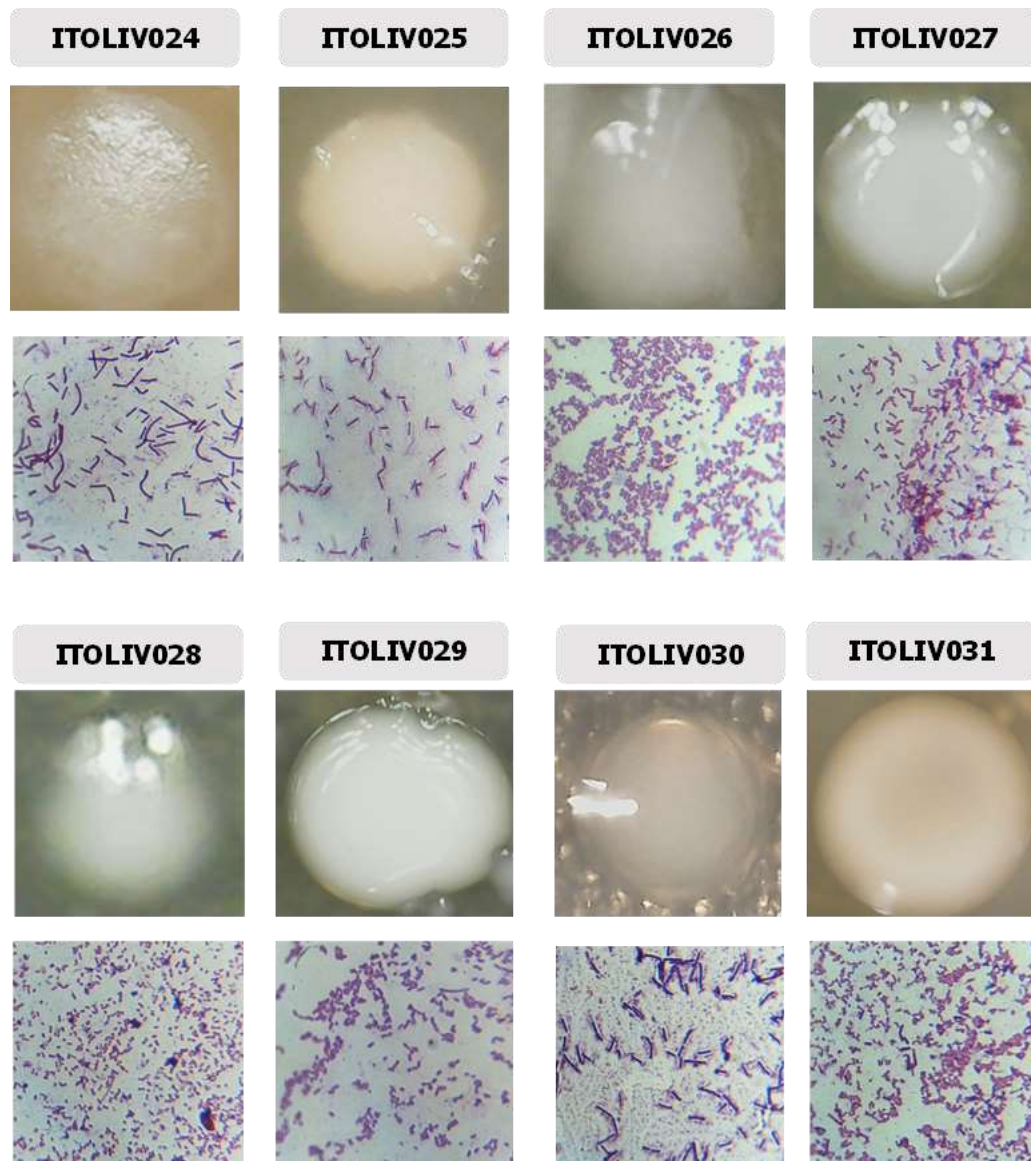


Figura 33 Morfología macro y microscópica de las BAL del palenque 1

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

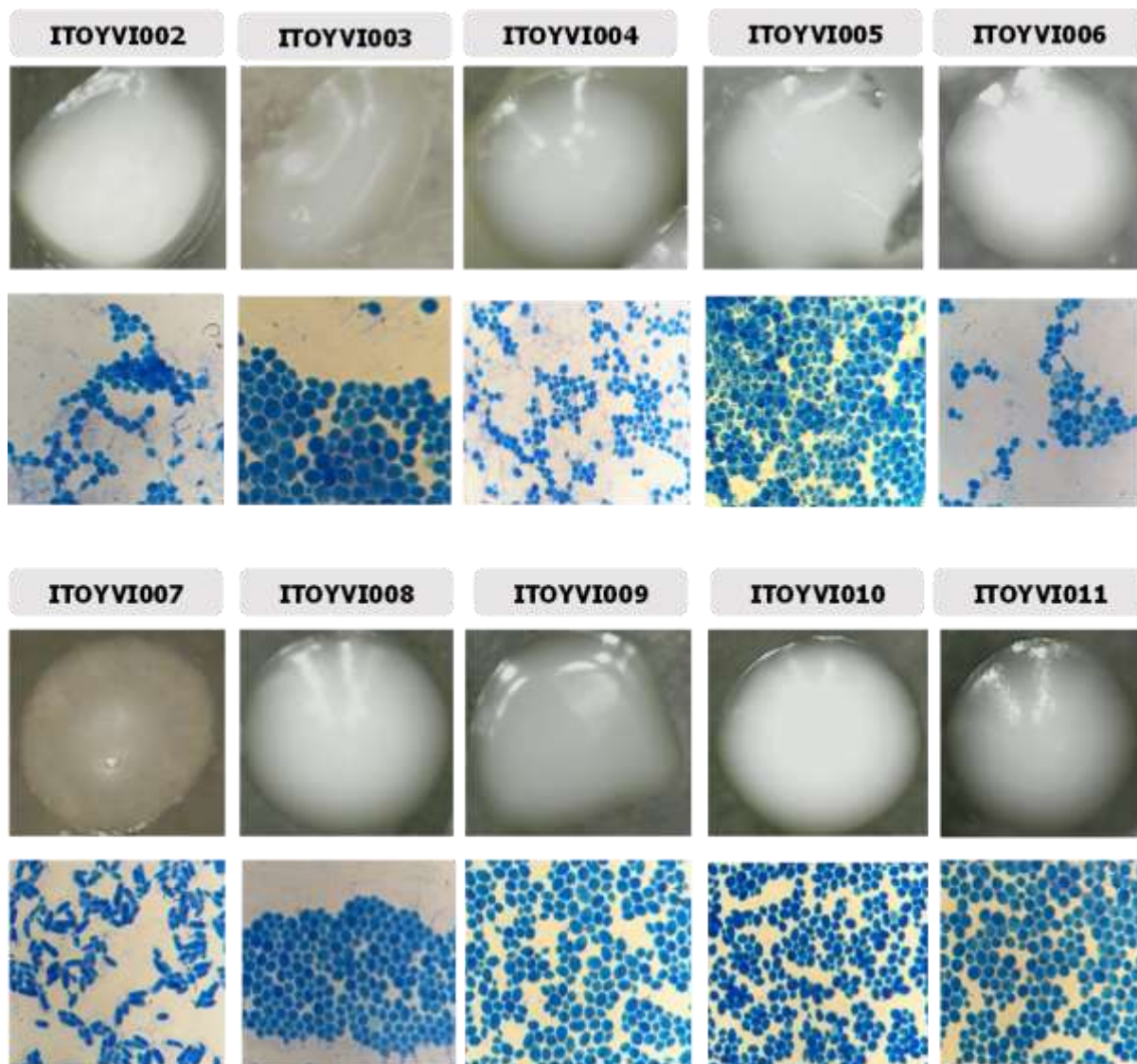


Figura 34 Morfología macro y microscópica de las cepas de levadura del palenque 2

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

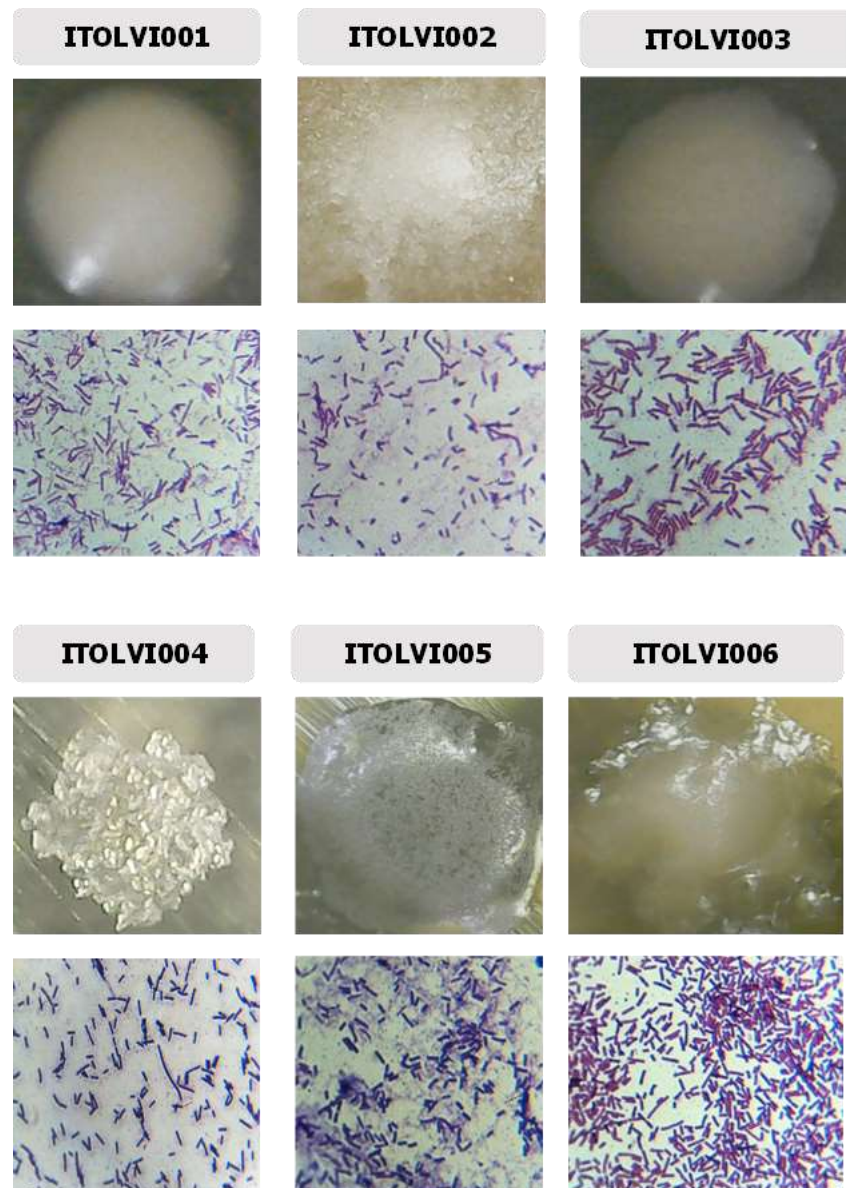


Figura 35 Morfología macro y microscópica de las cepas de BAL del palenque 2

6.4 PRESERVACIÓN DE MICROORGANISMOS POR CONGELACIÓN

Los microorganismos toleraron el proceso de preservación pues si mostraron buen crecimiento después de 48 horas de su criopreservación (Fig. 36).

Las levaduras mostraron un crecimiento mayor a diferencia de las BAL, éstas demoraron mínimo 72 horas para tener un crecimiento reconocible.

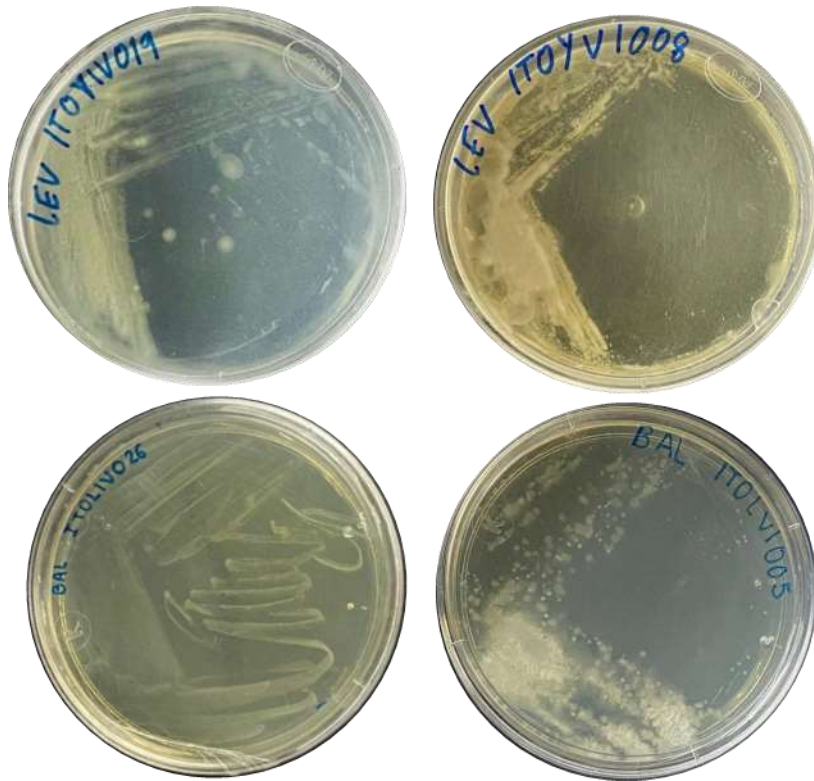


Figura 36 Evaluación de viabilidad de la muestra post-criopreservación

1.3 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

La integridad del ADN genómico que se extrajo se muestra en las siguientes imágenes. En la Fig. 37 se observa el ADN genómico de levaduras pertenecientes al palenque de San Pedro Tezacoalco. En los carriles 2, 3, 4, 5, y 8 se observaron muestras con poca fragmentación, carril 6 y 9 muestra tenue y carril 7 muestra íntegra.

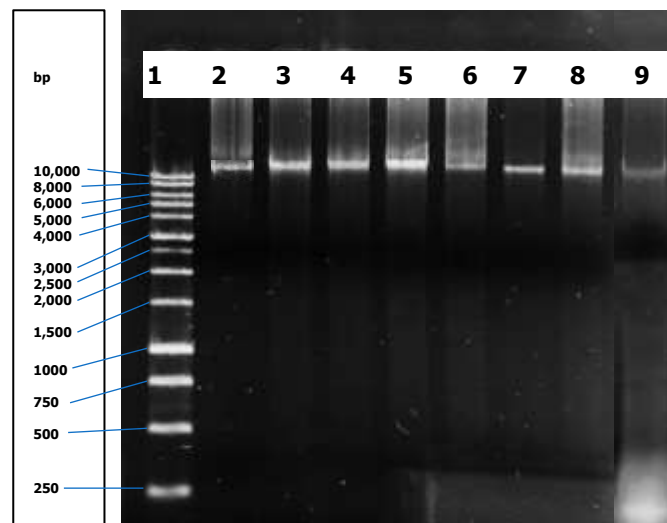


Figura 37 Gel de agarosa con las muestras de ADN de levaduras del palenque 1

Tabla 8 Cuantificación de ADN de levaduras del palenque 1

Número de carril	Cuantificación de ADN (<i>Agave rhodacantha</i>)			
1	Marcador de peso molecular	ng/ μ L	260/280	260
2	ITOIYV019	25.4	1.69	0.5
3	ITOIYV020	43.5	1.69	0.8
4	ITOIYV021	48.3	1.50	0.9
5	ITOIYV022	69.8	1.75	1.3
6	ITOIYV023	65.0	1.67	1.3
7	ITOIYV024	31.4	1.88	0.6
8	ITOIYV025	29.5	1.58	0.5
9	ITOIYV026	349.6	1.96	6.9

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

En la Fig. 38 se tiene el gel de agarosa que contiene las bacterias ácido de lácticas del palenque 2 de San Pedro Teozacoalco. Se muestran bandas mayores a 10000 pares de bases.

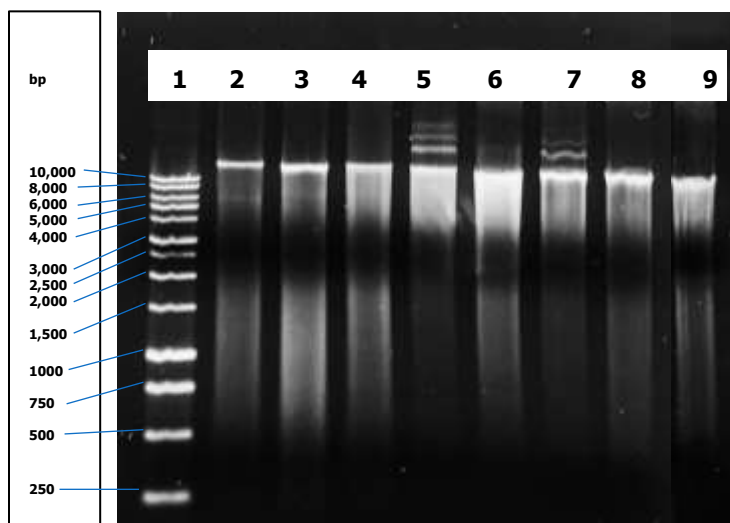


Figura 38 Gel de agarosa con las muestras de ADN de BAL del palenque 1

Tabla 9 Cuantificación de ADN de BAL del palenque 1

Número de carril	Cuantificación de ADN (<i>Agave rhodacantha</i>)			
1	Marcador de peso molecular	ng/ μ L	260/280	260
2	ITOLIV024	78.7	1.82	1.57
3	ITOLIV025	124.4	1.82	2.48
4	ITOLIV026	48.2	1.78	0.96
5	ITOLIV027	88.0	1.83	1.76
6	ITOLIV028	113.1	1.84	2.26
7	ITOLIV029	33.3	1.75	0.66
8	ITOLIV030	46.8	1.82	0.93
9	ITOLIV031	106.4	1.82	2.12

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

A continuación, se muestran las levaduras y bacterias ácido lácticas del palenque de San Isidro Tapanala. Se muestran bandas mayores a 10000 pares de bases. En los carriles 5 y 11 se observó una banda más marcada el resto resultaron un poco tenues (Fig. 39).

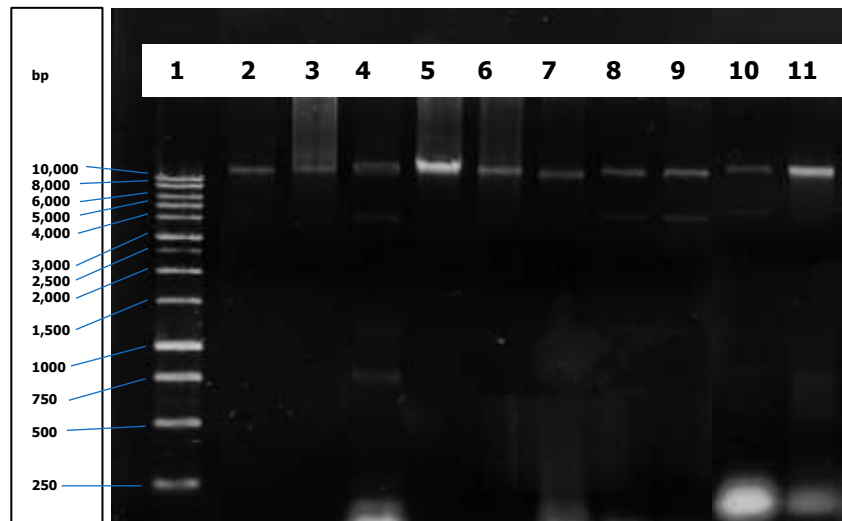


Figura 39 Gel de agarosa con ADN de levaduras del palenque 2

Tabla 10 Cuantificación de ADN de levaduras del palenque 2

Número de carril	Cuantificación de ADN (<i>Agave marmorata</i>)			
1	Marcador de peso molecular	ng/ μ L	260/280	260
2	ITOYVI002	19.9	2.05	7.9
3	ITOYVI003	68.7	0.71	45.2
4	ITOYVI004	766.6	1.91	15.3
5	ITOYVI005	98.7	1.98	24.1
6	ITOYVI006	34.3	1.99	16.4
7	ITOYVI007	913.2	2.20	18.2
8	ITOYVI008	675.8	1.88	13.5
9	ITOYVI009	792.6	2.08	15.85
10	ITOYVI010	761.3	1.89	15.2
11	ITOYVI011	38.5	2.12	0.7

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

Se muestran bandas mayores a 10000 pares de bases (Fig. 40). En los carriles 4, 6 y 7 se muestra un ADN degradado, 2, 3 y 5 muestran un ADN íntegro. La concentración de ADN se encuentra entre los 14 y 105 ng/μL.

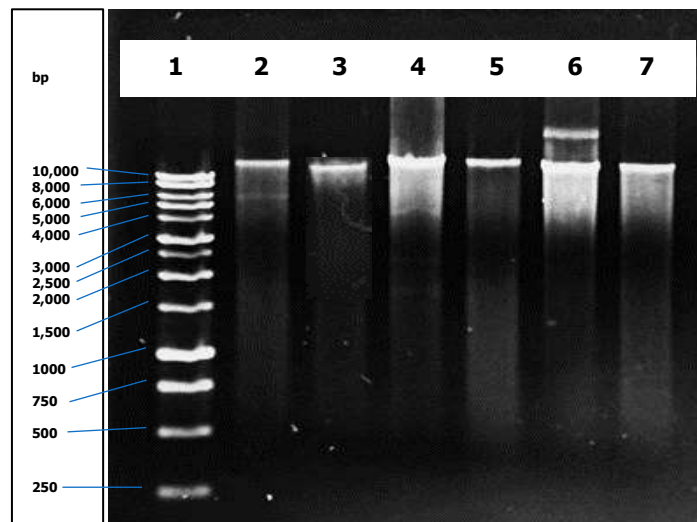


Figura 40 Gel de agarosa con ADN de BAL del palenque 2

Tabla 11 Cuantificación de ADN de BAL del palenque 2

Número de carril	Cuantificación de ADN (<i>Agave marmorata</i>)			
1	Marcador de peso molecular	ng/μL	260/280	260
2	ITOLVI001	50.1	1.81	1.00
3	ITOLVI002	14.9	1.80	0.298
4	ITOLVI003	120.6	1.84	2.411
5	ITOLVI004	50.9	1.80	1.018
6	ITOLVI005	102.7	1.83	2.005
7	ITOLVI006	74.8	1.82	1.497

1.3 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

La calidad de los amplicones se observó en un gel de agarosa al 1.2%. Se observaron bandas entre 500 y 250 pares de bases. La concentración de los amplicones se encuentra entre los 365 y 570 ng/μL. A continuación, se muestran los geles de agarosa de levaduras (Fig. 41) y BAL (Fig. 42) del palenque 1 San Pedro Teozacoalco.

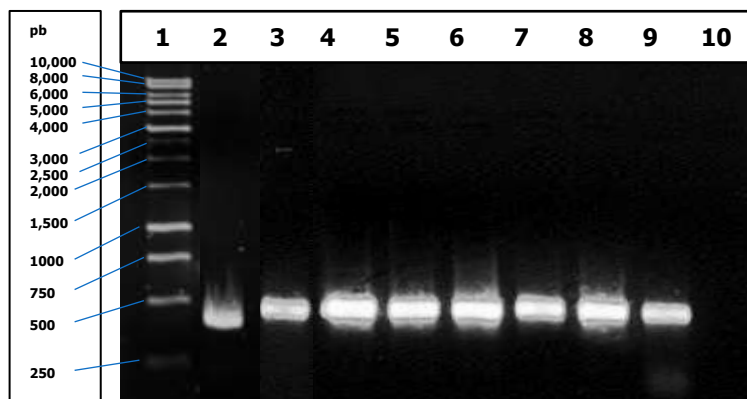


Figura 41 Gel de agarosa con amplicones de levaduras del palenque 1

Tabla 12 Cuantificación de amplicones de levaduras del palenque 1

Número de carril	Cuantificación de amplicones de levaduras			
1	Marcador de peso molecular	ng/μL	260/280	260
2	ITOYIV019	487.5	1.84	9.7
3	ITOYIV020	489.2	1.85	9.7
4	ITOYIV021	365.6	1.84	7.3
5	ITOYIV022	485.9	1.84	9.7
6	ITOYIV023	466.5	1.84	9.3
7	ITOYIV024	472.6	1.84	9.4
8	ITOYIV025	480.7	1.84	9.6
9	ITOYIV026	566.6	1.89	11.3
10	Testigo	-	-	-

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

Se observaron bandas entre 1500 y 1000 pares de bases. La concentración de los amplicones se encuentra entre los 350 y 510 ng/μL.

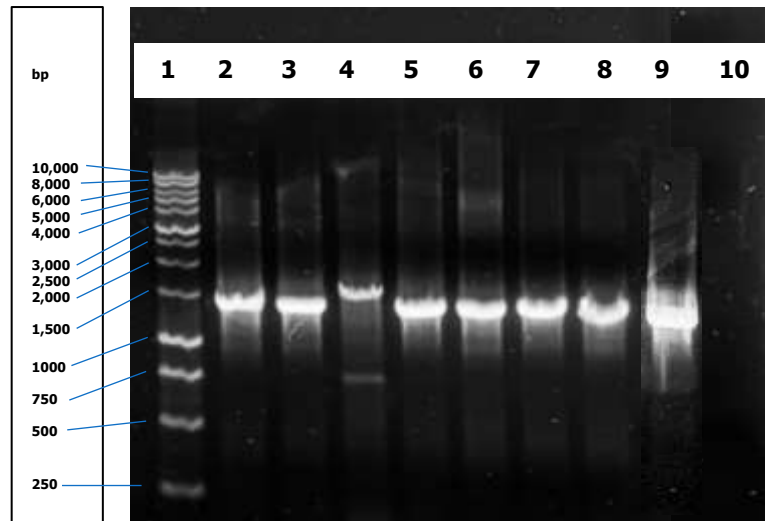


Figura 42 Gel de agarosa con amplicones de BAL del palenque 1

Tabla 13 Cuantificación de amplicones de BAL del palenque 1

Número de carril	Cuantificación de amplicones de BAL			
1	Marcador de peso molecular	ng/μL	260/280	260
2	ITOLIV024	336.5	1.86	6.729
3	ITOLIV025	356.8	1.86	7.137
4	ITOLIV026	413.7	1.85	8.273
5	ITOLIV027	354.4	1.84	7.088
6	ITOLIV028	430.2	1.86	8.604
7	ITOLIV029	440.3	1.85	8.806
8	ITOLIV030	423.2	1.86	8.465
9	ITOLIV031	509	1.86	10.183
10	Testigo	-	-	-

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

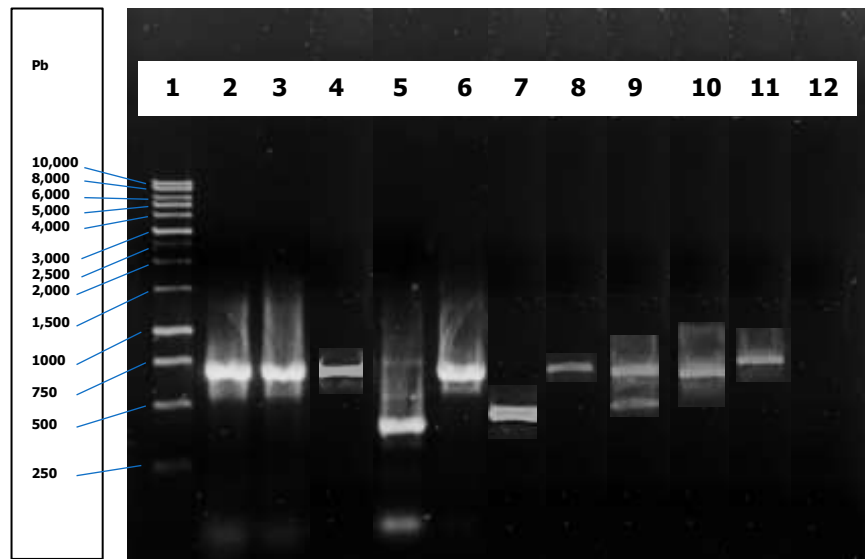


Figura 43 Gel de agarosa con amplicones de levaduras del palenque 2

Tabla 14 Cuantificación de amplicones de levaduras del palenque 2

Número de carril	Cuantificación de amplicones de Levaduras			
1	Marcador de peso molecular	ng/μL	260/280	260
2	ITOYVI002	382.3	1.82	7.6
3	ITOYVI003	419.5	1.82	8.3
4	ITOYVI004	408.3	1.83	8.1
5	ITOYVI005	433.2	1.83	8.6
6	ITOYVI006	396.7	1.81	7.9
7	ITOYVI007	397.9	1.86	7.9
8	ITOYVI008	348.6	1.83	6.9
9	ITOYVI009	406.0	1.84	8.1
10	ITOYVI010	371.5	1.84	7.4
11	ITOYVI011	381.0	1.84	7.6
12	Testigo	-	-	-

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

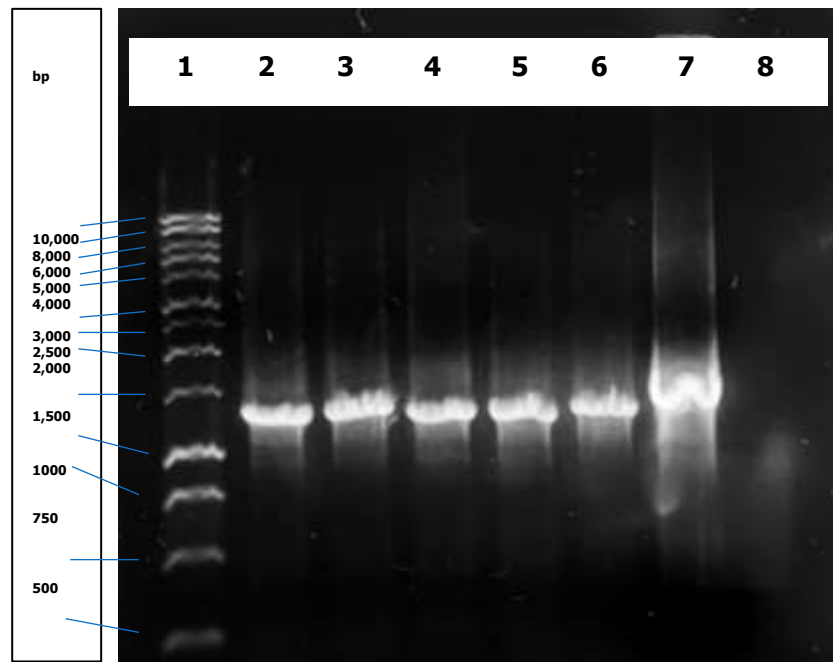
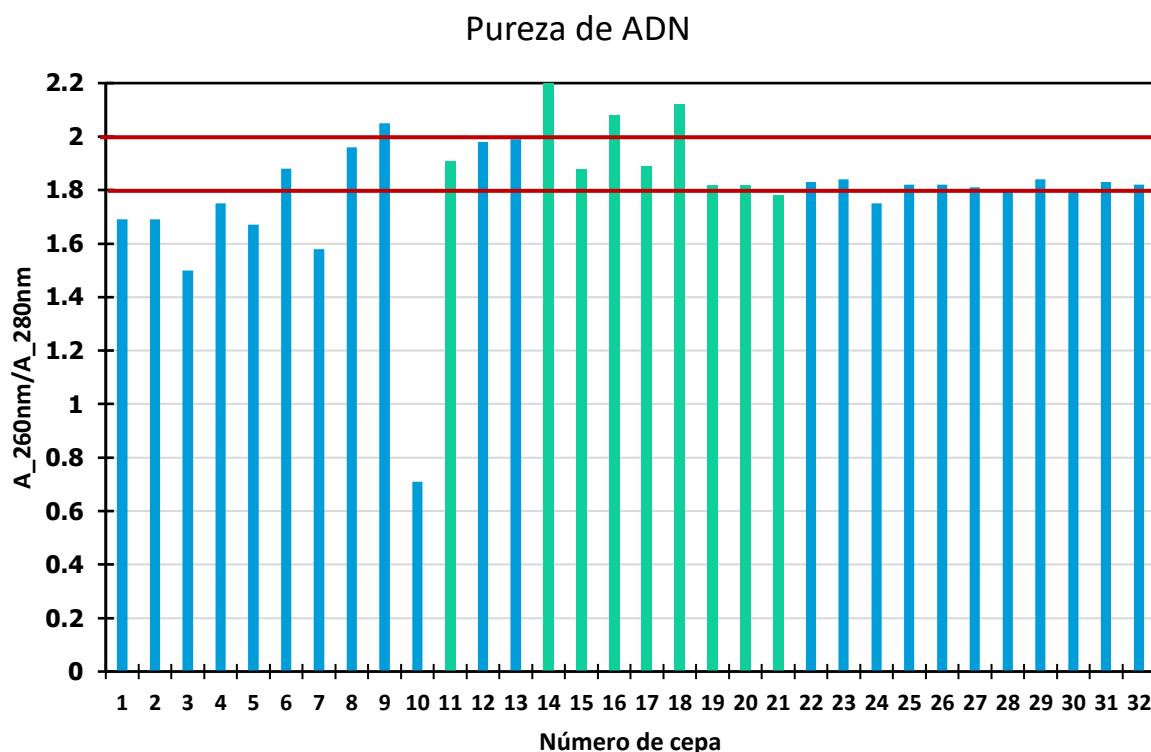


Figura 44 Gel de agarosa con amplicones de BAL del palenque 2

Tabla 15 Cuantificación de amplicones de BAL del palenque 2

Número de carril	Cuantificación de amplicones de BAL			
1	Marcador de peso molecular	ng/ μ L	260/280	260
2	ITOLVI001	495.8	1.86	9.916
3	ITOLVI002	426.2	1.85	8.523
4	ITOLVI003	523.8	1.85	10.476
5	ITOLVI004	535.3	1.86	10.706
6	ITOLVI005	350.1	1.85	9.001
7	ITOLVI006	396.5	1.86	7.930
8	Testigo	-	-	-

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez



Gráfica 1 Pureza de ADN relación A₂₆₀/A₂₈₀

Como resultado de la amplificación de ADN de las 32 cepas seleccionadas se obtuvo que la concentración de ADN amplificado se encuentra entre los 300 y 600 ng/μl. El ADN de las cepas 11 y 14-21 fueron extraídas por protocolo mientras que el resto fueron extraídas por kit. Se demuestra que los kits tanto para levaduras como para BAL mostraron una mejor eficacia en cuanto a la concentración de ADN. La presencia de proteínas se evaluó con la relación A_{260nm}/A_{280nm} (Gráfica 1) se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0, las cepas que se encontraron en este rango fueron: 6,8, 11-13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, y 25-32 es decir 19 cepas se consideraron con una pureza óptima. Las cepas 1-5, 7, 10, 21 y 24 se encontraron por debajo del valor lo que indica que 8 cepas mostraron presencia de proteínas. Las cepas 9,14, 16, y 18 fueron mayor al valor de 2 lo que puede indicar presencia de ARN.

6.7 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

La alineación en BLAST arrojó 3 distintas especies de levaduras: *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentans* Tabla 1 y 6 distintas especies de BAL: *Bacillus siamensis*, *Bacillus velezensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, Tabla 2.

Tabla 16 Levaduras identificadas de los palenques I y II

Palenque I, <i>A. rhodacantha</i>					
No.	CEPA	ESPECIE	Q cover	E value	P ident
1	ITOYIV019	<i>Pichia kluyveri</i>	93%	0.0	98.99%
2	ITOYIV020	<i>Pichia kluyveri</i>	64%	0.0	97.01%
3	ITOYIV021	<i>Pichia kluyveri</i>	35%	0.0	97.77%
4	ITOYIV022	<i>Pichia kluyveri</i>	36%	0.0	98.00%
5	ITOYIV023	<i>Pichia kluyveri</i>	59%	0.0	98.46%
6	ITOYIV024	<i>Pichia fermentans</i>	34%	0.0	98.44%
7	ITOYIV025	<i>Pichia fermentans</i>	68%	0.0	98.01%
8	ITOYIV026	<i>Pichia kluyveri</i>	80%	9e-177	96.64%
Palenque II, <i>A. marmorata</i>					
9	ITOYVI002	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98%	0.0	98.76%
10	ITOYVI003	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79%	0.0	97.92%
11	ITOYVI004	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50%	0.0	99.73%
12	ITOYVI005	<i>Pichia kluyveri</i>	95%	0.0	91.44%
13	ITOYVI006	<i>Saccharomyces sp</i>	82%	0.0	97.47%
14	ITOYVI007	<i>Pichia kluyveri</i>	27%	0.0	98.22%
15	ITOYVI008	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49%	0.0	84.2%
16	ITOYVI009	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49%	0.0	93.32%
17	ITOYVI010	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48%	0.0	96.97%
18	ITOYVI011	<i>Saccharomyces sp</i>	43%	3e-158	82.93%

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

En el palenque I en el cual la muestra pertenece a la especie *A. rhodacantha* predominó la levadura *Pichia kluyveri* y las BAL fueron muy variadas como *Bacillus siamensis*, *Bacillus velezensis* y *Lactobacillus plantarum*. En el palenque 2 en el cual la muestra pertenece a la especie *A. marmorata* predominó *Saccharomyces cerevisiae* al igual en BAL fue muy variada con especies como *Bacillus velezensis* y *Bacillus amyloliquefaciens*

Tabla 17 Bacterias ácido lácticas identificadas de los palenques I y II

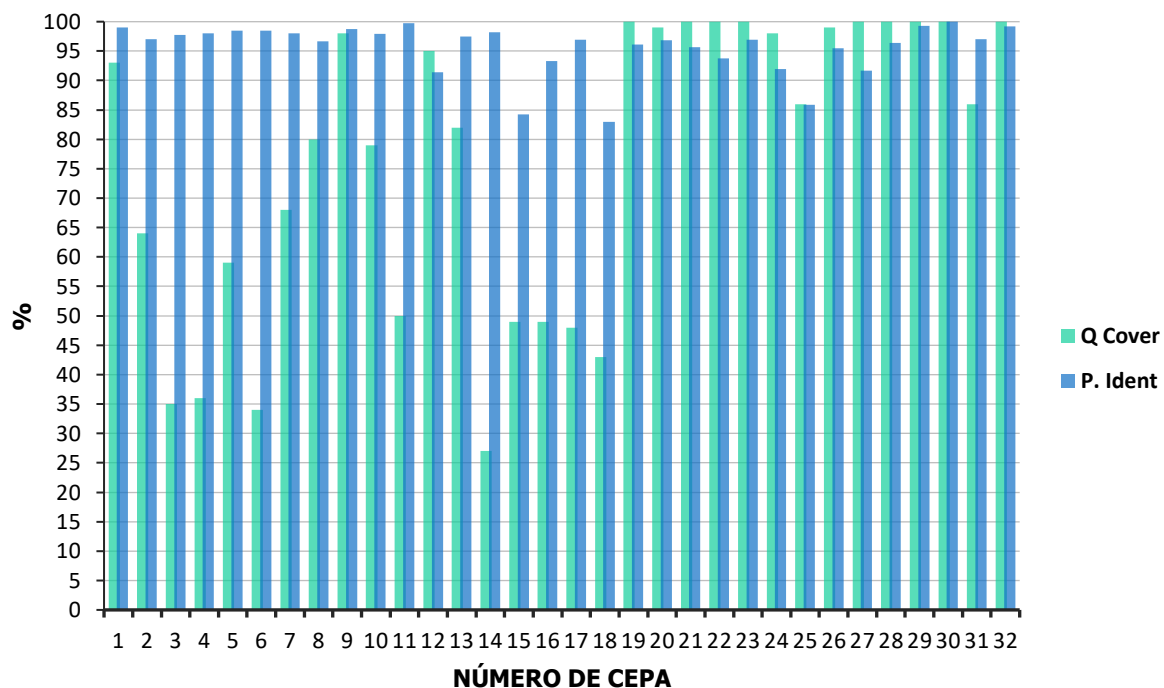
Palenque I, <i>A. rhodacantha</i>					
No.	CEPA	ESPECIE	Q cover	E value	P ident
19	ITOLIV024	<i>Bacillus siamensis</i>	100%	0.0	96.16%
20	ITOLIV025	<i>Bacillus siamensis</i>	99%	0.0	96.85%
21	ITOLIV026	<i>Bacillus velezensis</i>	100%	0.0	95.68%
22	ITOLIV027	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	93.76%
23	ITOLIV028	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	0.0	96.90%
24	ITOLIV029	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	98%	0.0	91.97%
25	ITOLIV030	<i>Bacillus subtilis</i>	86%	0.0	85.83%
26	ITOLIV031	<i>Bacillus velezensis</i>	99%	0.0	95.47%
Palenque II, <i>A. marmorata</i>					
27	ITOLVI001	<i>Bacillus velezensis</i>	100%	0.0	91.67%
28	ITOLVI002	<i>Bacillus velezensis</i>	100%	0.0	96.38%
29	ITOLVI003	<i>Enterobacter cloacae</i>	100%	0.0	99.27%
30	ITOLVI004	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100%	0.0	100%
31	ITOLVI005	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	86%	0.0	97.05%
32	ITOLVI006	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100%	0.0	99.22%

CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

Se obtuvo entre el 82.93 y 100% del porcentaje de identidad (Gráfica 2) lo que significa que tan similar es a la secuencia query (secuencia problema) a la secuencia blanco, es decir, la cantidad de nucleótidos o aminoácidos que son iguales entre las secuencias.

Los valores de Query coverage se obtuvieron entre el 34 al 100% de todas las secuencias, estos valores describen el porcentaje de la secuencia alineada a una secuencia en el genbank, es decir que cantidad de toda la secuencia se tomaron en cuenta para el alineamiento.

El valor esperado (E value) es un parámetro que describe el número de hits que uno puede esperar a ver debido al azar cuando busca en una base de datos de un tamaño particular, el valor e-value dado por el blast depende de la base de datos empleada y de la longitud de la secuencia.

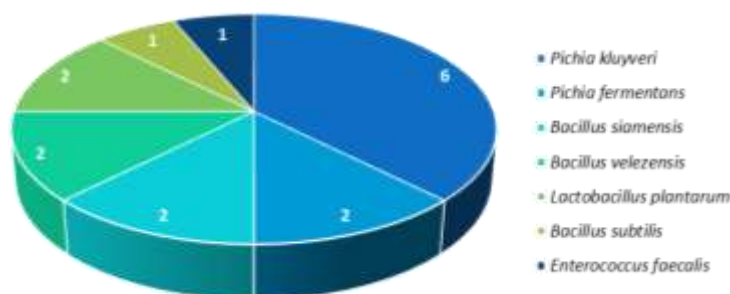


Gráfica 2 Porcentaje de Q Cover e Identidad

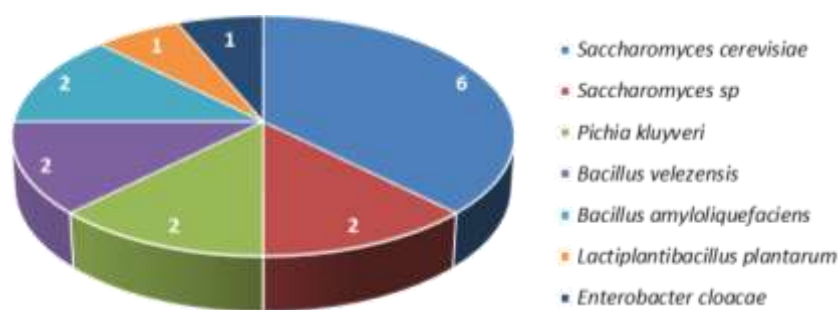
CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl

De las 32 especies que se identificaron la que más predominó en levaduras fue *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae* y en bacterias ácido lácticas fue *Bacillus velezensis* (gráfica 3), lo que coincide con los estudios de Espinoza-Martínez *et al.*, 2022 que identificaron cuatro especies de levaduras *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, *Meyerozyma carphophila*, *Pichia kluyveri*, y dos especies de bacterias ácido lácticas: *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum*, al igual que con Espinosa-Jaime, 2023 que en el estado de Jalisco identificó en *Agave rhodacantha* los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella*.

En la literatura existe una escasa gama de referencias en cuanto a microorganismos identificados en el mosto de agave durante la fermentación de la producción de mezcal con las especies *Agave rhodacantha* y *Agave marmorata*, lo que hace que este estudio aporte nueva información acerca de los consorcios microbianos presentes en estas dos especies de agave.



Gráfica 3 Especies Identificadas en el Palenque I



Gráfica 4 Especies Identificadas en el Palenque II

7. CONCLUSIONES

Se identificaron con técnicas moleculares 2 especies de levaduras; *Pichia kluyveri*, *Pichia fermentans* y 5 especies de BAL; *Bacillus siamensis*, *Bacillus velezensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis* en el palenque I con *A. rhodacantha* (Gráfica 3), en el palenque II con *A. marmorata* (Gráfica 4) se identificaron 2 especies de levaduras; *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kluyveri* y 4 especies de BAL; *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Enterobacter Cloacae*.

Se obtuvo más variedad de especies en cuanto a bacterias ácido lácticas en ambos palenques, en contraste con las levaduras, que solo predominó una especie en cada palenque lo que nos indica que por lo regular son estas levaduras las que se encargan de llevar a cabo la fermentación alcohólica del mosto de agave.

Conociendo los consorcios microbianos que se encuentran a lo largo del proceso de fermentación se puede aprender a controlar dicho proceso para que los pequeños productores comiencen a estandarizar su producción dado que estos microorganismos son responsables de los sabores y aromas del mezcal.

BIBLIOGRAFÍA

- Almanza, F., & Barrera, E. (1991). Tecnología de leche y derivados . *Bogotá Unisur*, 61-66.
- Archarya, S. (2006). Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations the Faculty of Science and Technology 164. *Some Aspects of Physicochemical Properties of DNA and RNA; Acta Universitatis Upsaliensis: Uppsala, Sweden*.
- Arribas, M., & Polo, C. (2008). Occurrence of lactic acid bacteria and niogenic amines in biologically aged wines. *Food Microbiology*. Vol(18), 678-683.
- Axelsson, L. (1993). Lactic acid bacteria classification and physiology. *Salminen, S. y von Wright, A.*, Ed Nueva York: Marcel Dekker.
- Benito, A., Calderón, F., & Benito, S. (2019). The Influence of Non-Saccharomyces Species on Wine Fermentation Quality Parameter. *Fermentation*, 5(3):54.
- Bergogne, E. (1995). Impact écologique de l'antibiothérapie. *Place des microorganismes de substitution dans le contrôle des diarrhées et colites associées aux antibiotiques*, Presse Méd. 24: 145-56.
- Bouzar, F., Cerning, J., & Desmazeaud, M. (1997). Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. *Journal Dairy Science*, vol. 80 p. 2310-2317.
- Bravo, F. (1995). Del vino y otros temas. *Ed. Eypasa, Madrid*.
- Brenner, K., You, L., & Arnold, F. (2008). Engineering Microbial Consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 483-489.
- Burkard, M., Kierzek, R., & Turner, D. (1999). Thermodynamics of Unpaired Terminal Nucleotides on Short RNA Helices Correlates with Stacking at Helix Termini in Larger RNAs. *J Mol Biol*, 290: 967-982.

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

- Callen, E. (1965). Food habitats of some pre-Columbian Mexican Indians. *Economic Botany*, 19:335-343.
- Chacón-Villalobos, A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular (scp) en la agricultura e industria. *Agronomía mesoamericana*, 15(1): 93-106.
- Chaucheyras, F., Millet, L., & Michalet, B. (1997). Effect of the addition of LEVUCCELL *Saccharomyces cerevisiae* on the rumen microflora of sheep during adaptation to high starch diets. *In: Proc. of Evol. of the Rumen Microbial Ecosyst*, 20-21 Chesson, A.; Stewart, CS. and Flint, HJ. (eds), RRI-INRA.
- Cole, V., & Noble, A. (2003). Flavor chemistry . *In: Fermented Beverage Production. A G H Lea, J R Piggott (eds). Kluwer Academic/ Plenum Publishers New York*, 393-396.
- Colunga, G. M., Zizumbo, V. D., & Martínez, T. J. (2007). Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a su protección legal y conservación biológica y cultural. *In: en lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Colunga, G. M. P.; Larqué, S. A.; Eguiarte, L. E. y Zizumbo, V. D. (Eds.). CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México*, 229-248.
- Colunga-GarcíaMarín, P., & Zizumbo-Villarrea, D. (2006). Tequila and other Agave spirits from West-Central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity and Conservation*. DOI: 10.1007/s10531-006-9031-z. Issue: *Online First*, 1-15.
- COMERCAM. (2022). Informe estadístico 2022. *Conselo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal*, 2-6.
- COMERCAM. (2022). Informe estadístico 2022. *Consejo Mexicano Regulador de la calidad del Mezcal*, 2-6.
- Consejería de Agricultura y Pesca. (2002). Diagnóstico del sector vitivinícola y de las bodegas en el Marco de Jerez. *Sevilla, España*.

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez**

- Cornejo-Romero, A., Serrato-Díaz, A., Rendón-Aguilar, B., & Rocha-Munive, M. (2014). *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Damián, R. (2012). Aislamiento, caracterización molecular y bioquímica del consorcio microbiano asociado a la fermentación alcohólica para la producción de mezcal en Michoacan. *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas*, 11-17.
- Damián, R., & Hernández, E. (2010). Caracterización molecular y fermentativa de una levadura utilizada para la producción de mezcal en la región de Etúcuaro, Michoacán. *Departamento de Ingeniería Bioquímica*, Instituto Tecnológico de Morelia: Morelia, Micoacán, México.
- De la Torre-González, F. (2010). *Caracterización cinético-molecular de microorganismos en mostos de mezcal*. Reynosa, Tamaulipas.
- Di Maro, E., Ercolini, D., & Coppola, S. (2007). Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology*, 117(2): 201-210.
- Edelman, J., & Jefford, T. (1968). The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *ew Phytology*, 67: 517-531.
- Ekinci, F., & Gurel, M. (2007). Effect of Using Propionic Acid Bacteria as an Adjunct Culture in Yogurt Production. *Journal Dairy Science*, vol. 91, p. 892-899.
- Escalante, M., Blaschek, H., Barba de la Rosa, A., Santos, L., & A, D.-R. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied*, 626-630.
- Escamilla-Treviño, L. (2012). Potential of plants from the genus *Agave* as bioenergy crops. *BioEnergy Research*, 5: 1-9.

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez**

- Espinosa, d. A. (2003). *Sistemática y evolución molecular: su importancia en la conservación de aves*. En: H. Gómez de Silva y A. Oliveras de Ita (eds.): Conservación de aves experiencias en México. Editorial CIPAMEX. México.
- Espinosa-Jaime, A. (2023). *Análisis de la diversidad y estructura de comunidades microbianas involucradas en el proceso de fermentación del Mezcal en México*. León, Guanajuato: Tesis de Licenciatura en ciencias Agrogenómicas.
- Espinoza, Martínez, Víctor Adrián; López, Sánchez Claudia; Palma, Cruz Felipe de Jesús ;. (2022). Identificación polifásica de consorcios microbianos de la fermentación del mezcal en Oaxaca. *Revista del centro de graduados e investigación. Instituto tecnológico de Mérida*. Vol. 37 Núm. 94, 142-146.
- Figueroa-Romero, J. (2017). *Caracterización de levaduras aisladas de mostos de fermentación del mezcal*. Ciudad de México.
- Gallardo , V. (2020). La producción de Mezcal en el Estado de Michoacán. Morelia, Michoacán: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.
- Gallardo, J. (2008). La producción de Mezcal en el Estado de Michoacán.
- García, Mendoza A. J.; I. S, Francisco Martínez; D. Sandoval Gutiérrez;. (2019). Cuatro especies nuevas de Agave (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botanica Mexicana* 126: e1461. DOI: 10.21829/abm126.2019.1461, 2-17.
- García-Cortés, V. (2004). Introducción a la microbiología. En *Universidad Estatal A Distancia* (pág. 243). 2 da Ed. San José Costa Rica: ISBN: 978-9968-31-358-2.
- García-Mendoza, A. (2011). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Fascículo 88. AGAVACEAE. Instituto de Biología. UNAM. México*.
- García-Mendoza, A., & Franco Martínez, I. (2018). Actualización de la información de las especies y subespecies de magueyes de Oaxaca, con énfasis en las especies mezcaleras. *Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México*.

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez**

Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. NE012., 26-27, 37-38.

García-Mendoza, A., M. J., O., & M. J., B.-S. (2004). Biodiversidad de Oaxaca. *Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza- Worl Wild Life Fund, México.*

Guerra, N., Rua, M., & Pastranal, L. (2001). Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *International Journal of Food Microbiology*, Vol (70): 267-28.

Hernández, E., Maza, E., & Lozano, N. (2003). Producción de proteína unicelular mediante cultivo continuo de levadura en suero de leche desproteinizado. *Revista de la Facultad de Agronomía. 5(2)*, 468-477.

Hernández, N. (2008). Biocombustibles y otras Fuentes de Energía. *Jornadas Nacionales "Pensar en Venezuela" Colegio de Ingenieros Caracas.*

Hernandez, V. (2007). Preparation of a whey-based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. *Journal Food Technology Biotechnological*, vol 45, p. 27-31.

Hidalgo, J. (2003). Tratado de enología tomo 1. Madrid, España: Editorial Mundi-Prensa.

Illsley, C., & Larson, J. (2012). Mezcal, tequila, bacanora, pulque y sotol. *La jornada del Campo*, Núm 53. Suplemento. La Jornada. México.

Iñiguez, C., T., D., D., S., H., A., & M., R. (2001). Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves. *Bioresour Technology*, 77: 101-108.

Jay, M. (1992). Microbiología Moderna de los Alimentos. Tercera edición. Ed Acribia. España.

Jiménez, -Pacheco Alan de Jesús; Espinoza, Martínez, Víctor Adrián; López, Sánchez, Claudia; Palma, Cruz, Felipe de Jesús;. (2021). Dinámica poblacional del

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez**

- consorcio microbiano de la fermentación del mezcal de Concepción Buenavista, Coixtlahuaca, Oaxaca. *Revista Mexicana de investigación en productos naturales*, 190.
- Jolly, N., Augustyn, O., & Pretorius, I. (2006). The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production . *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1):15-39.
- López, M., & Guevara. (1999). Authenticity of three mexican alcoholic beverages by SPME-GCMS. *Annual Meeting of Institute of Food Technologists, New Orleans, LA*, 10-3.
- López, M., Mancilla-Margalli, N., & Mendoza-Díaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7835-7840 doi: 10.1021/jf030383v.
- López, T., Dominguez, L., & García, J. (2007). Arreglo estructural de un consorcio microbiano de interés alimentario en la producción del vinagre. *Trabajo presentado en el octavo Congreso Nacional de Microscopía, Octubre, México*.
- López-Sánchez, C., Espinoza-Martínez, V., & Palma-Cruz, F. (2020). Levaduras presentes en la fermentación del mezcal artesanal de San Dionisio Ocotepec, Oaxaca. *Tercer congreso nacional de investigaciones microbiológicas*.
- Maier, M., Pepper, I., & Gerba, C. (2009). Environmental Microbiology. *San Diego: Academic Press*.
- Mancilla, M., & López, M. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7832-7839.
- Martínez-Frías, M. (2010). Estructura y función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. *Medicina de Familia SEMERGEN*, 36(5):273-277.

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roezl**

- Mesas, J., & Alegre, M. (1999). El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnología de alimentos*, 2:174-183.
- Molina-Guerrero, J., Botello-Álvarez, J., Estrada-Baltazar, A., Navarrete-Bolaños, J., Jiménez-Islas, H., Cárdenas-Manríquez, M., & Rico-Martínez, R. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6 (1), 41-50.
- Morris, S., & Blackwood, C. (2007). The Ecology of Soil Organisms. *Paul, E. (Ed), Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry, Oxford: Elsevier.*
- Narváez, Z., Rojas, H., Rodríguez, L., & Larralde-Corona, C. (2010). Culture independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with Mezcal fermentation. *Current Microbiology*, 61, 444-450.
- Navarre, C. (1994). *Loenologie. 4a ed. Ed. Lavoisier Tec y Doc., Paris.*
- Navarre, J. (1998). *L'oenologie. Paris, Francia: Editorial Lavoisier.*
- Ocares P, Y., & Castro F, J. (2020). Preservación de microorganismo por congelación. *Chillan: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 428. p. 119-134.*, 119-113.
- Ochoa-Avalos, J. (2018). *Identificación de levaduras nativas y caracterización de compuestos volátiles de mezcal producido con Agave inaequidens.* Jiquilpan, Michocacán.
- Ochoa-Ochoa, J., & Vázquez-Juárez, R. (2004). Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológicas. *Universidad y Ciencia. Número Especial I. ISSN: 0186-2979*, 39-50.
- Osorio-Cadavid, E., Ramíres, M., López, W., & Mambuscay, L. (2008). Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras . *Revista Colombiana de Biotecnología*, , Universidad Nacional de Colombia Bogotá, Colombia, vol. XI, núm. 1, pp. 125-131 .

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez**

- Palma-Cruz, F. (1991). El género *Agave* L. y su distribución en el estado de Oaxaca. En *Tesis de licenciatura en Biología* (pág. 170). Escuela de Estudios Profesionales Iztacala-UNAM.
- Palomonio, C., & González, Y. (2014). écnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Perú Med Exp Salud Publica*, 31(3):535-46.
- Pedranzani, H., Tavecchio, N., & Osses, R. (2018). MANUAL TEÓRICO PRÁCTICO DE BIOLOGÍA. *UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS*, 33-40.
- Pelizer, L. (2003). Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *Journal of food engineering* 56(4), 371-375.
- Pinal, L., M, C., H, G., & J, Á. (1997). Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnol*, 19: 45-47.
- Ramos-Sánchez, O., Reyes, R., & Ramos, A. (2014). Desarrollo sustentable en Villa Sola de Vega. *Revista Mexicana de Agronegocios, Sexta Época. Año XVIII. Vol. 34.*, 729-739.
- Robert, H., Moran, L., Scrimgeour, G., & Perry, M. (2008). Principios de Bioquímica. *Cuarta edi. México: pearson educación*, Chapter 19.
- Rojas-Ortega, A. (1995). Obtención de proteína unicelular a partir de residuos de destilería. *Proyecto de graduación. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. Costa Rica*.
- SAGARPA-OAXACA. (2016). Diagnóstico de la Cadena de Valor Mezcal en las Regiones de Oaxaca. *SEDAF- Gobierno del estado de Oaxaca, Consejo Oaxaqueño del Maguey y Mezcal, A. C.*, 2-10.
- Sánchez-Contreras, M., González-Flores, T., Ayora-Talavera, T. R., Evangelista-Martínez, Z., & Pacheco-López, N. A. (2017). ¿Qué son los microbios? *Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias*, Centro de Investigación y Asistencia en

**CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE MEZCAL
ARTESANAL A PARTIR DE *Agave rhodacantha* Trel Y *Agave marmorata* Roez**

Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Unidad Sureste, Mérida, Yucatán.
México. Vol(68) . 10-17. ISSN: 1405-6550.

- Sánchez-Marroquín, A., & Hope, P. (1953). Fermentation and chemical composition studies of some species of Agave juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 246-249 doi: 10.1021/jf60003a007.
- Valencia-Sánchez, R. (2020). San Pedro Tezacoalco, Nochixtlán, Oaxaca. *Plan Municipal de Desarrollo*, 14-15.
- Vallejo, C., & González, C. (1999). El cocimiento una etapa importante en la producción de tequila. *Bebidas Mex*, 7:19-20.
- Walker, G. (1998). Yeast physiology and biotechnology, John Wiley and Sons. (ed.), *Chidester. Arkansas. EE.UU.*
- Zambonelli, C. (1988). Microbiologia e biotecnologia dei vini. *Ed. Edagricole, Bolonia.*
- Zamora, R. (2021). El mezcal de Villa Sola de Vega, Oaxaca: Proceso de producción, comercialización y economía moral. *En tesis de Maestría en Antropología Social. El colegio de San Luis, A.C.*, 78-85.
- Zinser, E., & Daum, G. (1995). Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast *S. cerevisiae*. *Chichester, England*, 11(6):493-536. doi: 10.1002/yea.320110602. PMID: 7645343.

